

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.10.006

芒果苷改善肝损伤模型小鼠肝功能实验研究

陈 星¹, 夏晓冬¹, 童德银¹, 车道标^{1,2△}

(1. 江苏省宿迁市第一人民医院, 江苏 宿迁 223800; 2. 江苏省人民医院, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 探讨芒果苷对肝损伤模型小鼠肝功能的改善作用。方法 将50只ICR小鼠随机分为5组,即空白对照组(等体积0.9%氯化钠溶液)、模型组(等体积0.9%氯化钠溶液)、水飞蓟素组(0.1 g/kg)和芒果苷高、低剂量组(40,20 mg/kg),各10只。上述后4组小鼠皮下注射四氯化碳-橄榄油(1:1, V/V),3 mL/kg,每周2次,连续6周,以建立小鼠肝纤维化模型。建模成功后,各组小鼠灌胃相应药物,每天1次,连续6周。采用光学显微镜观察肝脏病理改变情况;采用干化学法和全自动生化分析仪检测小鼠血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性;采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测小鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)和白细胞介素6(IL-6)的含量;采用Western blot法检测炎症因子蛋白表达水平。结果 空白对照组小鼠肝脏中央静脉和周围肝细胞结构正常,模型组小鼠肝组织细胞存在气球样变性和脂肪变化,水飞蓟素组和芒果苷高、低剂量组上述肝组织病理形态学均有不同程度改善。与空白对照组比较,模型组小鼠血清ALT和AST活性均显著增强,TNF- α ,IL-1 β ,IL-6含量均显著增加,正Nod样受体蛋白3(NLRP3),凋亡相关斑点样蛋白(ASC),含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶1(Caspase-1),IL-1 β ,p-P65,P65,核因子 κ B抑制因子 α (I κ B α),TGF- β ,p-Samd-3,Smad-3蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,水飞蓟素组和芒果苷高、低剂量组小鼠血清ALT和AST活性显著减弱,TNF- α ,IL-1 β ,IL-6含量均显著减少,NLRP3,ASC,Caspase-1,IL-1 β ,p-P65,P65,I κ B α ,TGF- β ,p-Samd-3,Smad-3蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$)。结论 芒果苷对肝损伤模型小鼠肝功能具有一定改善作用,其机制与降低炎症反应有关。

关键词: 芒果苷;肝脏保护;四氯化碳;肝脏损伤;小鼠

中图分类号:R965;R975+.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)10-0017-04

Experimental Study on Mangiferin in Improving the Liver Function in Model Mice with Liver Injury

CHEN Xing¹, XIA Xiaodong¹, TONG Deyin¹, CHE Daobiao^{1,2}

(1. Suqian First Hospital, Suqian, Jiangsu, China 223800; 2. Jiangsu Province Hospital, Nanjing, Jiangsu, China 210029)

Abstract: Objective To investigate the effect of mangiferin on improving liver function in model mice with liver injury. **Methods** Totally 50 ICR mice were randomly divided into five groups: blank control group(equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution), model group(equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution), silymarin group(0.1 g/kg) and mangiferin high, low dose groups(40,20 mg/kg), 10 mice in each group. The mice in the latter four groups were subcutaneously injected with CCl₄-olive oil(1:1, V/V) 3 mL/kg twice a week for 6 consecutive weeks to establish models of liver fibrosis. After successful modeling, the mice in each group were given corresponding drugs once a day for 6 consecutive weeks. The pathological changes of liver were observed by optical microscope, and the activities of serum aspartate transaminase(AST) and alanine transaminase(ALT) in mice were detected by dry chemistry and automatic biochemical analyzer. The levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6(IL-6) in mice were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), and the expression levels of inflammatory factors protein were detected by Western blot. **Results** The structure of hepatic central vein and surrounding hepatocytes was normal in the blank control group. There were balloon-like degeneration and fat changes in hepatic tissue cells in the model group. The above pathological morphology of hepatic tissue in silymarin group and mangiferin high, low dose groups were improved in varying degrees. Compared with the blank control group, the activity of ALT and AST in serum of mice increased significantly, the content of TNF- α , IL-1 β and IL-6 increased significantly, positive Nod-like receptor protein 3(NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD(ASC), Caspase-containing aspartate protein hydrolase 1(Caspase-1), the expression levels of IL-1 β , p-P65, P65, nuclear factor κ B inhibitor α (I κ B α), TGF- β , p-Samd-3 and Smad-3 protein increased significantly in the model group($P < 0.01$). Compared with the model group, the activities of ALT and AST in serum of mice decreased significantly, the content of TNF- α , IL-1 β and IL-6 decreased significantly, and the expression levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 β , p-P65, P65, I κ B α , TGF- β , p-Samd-3 and Smad-3 protein decreased significantly in the silymarin group and mangiferin high, low dose groups($P < 0.01$). **Conclusion** Mangiferin can improve the liver function of mice with liver injury, and its mechanism is related to the reduction of inflammatory reaction.

Key words: mangiferin; liver protection; carbon tetrachloride; liver injury; mice

肝纤维化发病机制复杂,与活化的肝星状细胞沉积 生大量的促炎因子、趋化因子和分子,许多炎症因子在肝
细胞外基质有密切关系^[1-2]。肝星状细胞活化过程中产 星状细胞的活化中起着关键作用,如肿瘤坏死因子- α

第一作者:陈星,男,硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药临床药学及中药复方作用机制,(电子信箱)nanjingchenxing@126.com。

△通信作者:车道标,男,副主任药师,研究方向为中药临床药学,(电子信箱)CDBNJ2009@163.com。

(TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)和白细胞介素 6(IL-6)^[3]。此外,核因子 κ B(NF- κ B)、活性氧、脂质过氧化产物和多种生长因子也促进肝星状细胞的增殖,与增加的肌成纤维细胞共同作用,最终导致肝纤维化的多种信号通路的病理生理改变。转化生长因子 β (TGF- β)等分子靶标在肝纤维化中具有重要意义。TGF- β 是生长因子基因超家族中特征性细胞因子^[4-5],分布广泛,被认为是强有力的促纤维化介质,可促进肝星状细胞的活化和细胞外基质蛋白的沉积,从而导致肝纤维化^[6]。同时,TGF- β 与肝硬化的发展密切相关,可刺激细胞外基质蛋白的产生并消除基质蛋白的去除现象^[7-9]。芒果苷是芒果叶的主要成分,是一种四羟基吡酮的碳糖苷,属双苯吡酮类化合物,具有抗炎和神经保护等多种药理特性^[10]。本研究中探讨了芒果苷对四氯化碳肝损伤模型小鼠的保护作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂

动物:无菌级 ICR 小鼠 50 只,雄性,8~12 周,购自上海西普尔必凯实验动物有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(沪)2008-0016。所有动物于室温(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,空气相对湿度 40%~50%,昼夜交替 12 h,普通饲料喂养,自由进食、饮水。

仪器:UV-3200S 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);BH-2 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);DYCZ-24KS 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

试剂:芒果苷(美国 Sigma 公司,批号为 111607-200301);所有抗体均购自 Cell Signaling Technology;TNF- α , IL-6, IL-1 β 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号分别为 20060922, 20060925, 20060926),均购自南京凯基生物技术公司;天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(批号分别为 20160514, 20161157)均购自南京建成生物工程研究所;苏木素-伊红染液(HE, 北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

分组、给药与建模:将 50 只 ICR 小鼠随机分为 5 组,即空白对照组(A 组,等体积 0.9% 氯化钠溶液)、模型组(B 组,等体积 0.9% 氯化钠溶液)、水飞蓟素组(C 组,0.1 g/kg)和芒果苷低、高剂量组(D₁ 组、D₂ 组,20, 40 mg/kg),各 10 只。上述后 4 组小鼠皮下注射四氯化碳-橄榄油(1:1, V/V), 3 mL/kg, 每周 2 次,连续 6 周,以建立小鼠肝纤维化模型。空白对照组小鼠皮下注射等量橄榄油。建模成功后,各组小鼠灌胃相应药物,每天 1 次,连续 6 周。

肝脏组织病理学检查:小鼠眼眶取血后处死,将肝脏组织固定于 4% 中性福尔马林溶液中过夜。将组织固定包埋于石蜡中,切成 4 mm 厚的切片。然后去石蜡,HE 染色,采用光学显微镜观察肝脏病理改变情况。

AST 和 ALT 活性检测:采用干化学法和全自动生化分析仪检测小鼠血清 AST 和 ALT 活性,严格按试剂盒说明书步骤操作。

TNF- α , IL-1 β , IL-6 含量检测:采用 ELISA 法检测小鼠血清 TNF- α , IL-1 β , IL-6 含量。严格按试剂盒说明书步骤操作。

炎症相关因子蛋白表达水平检测:采用 Western blot 法检测。将小鼠肝组织剪碎,取 50 mg,加 1 mL RIPA 裂解液提取总蛋白,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。各组取 20 μg 上样,转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 清洗 3 次,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,回收一抗, TBST 清洗 4 次,加入二抗,室温振荡 2 h,回收二抗, TBST 清洗 4 次,加入 ECL 化学发光试剂,将 PVDF 膜放入暗盒中,压上 X 胶片,取出胶片后显影、定影、清洗。然后,通过 Image J 软件将条带灰度值数字化,目的条带与内参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对肝组织病理形态学的影响

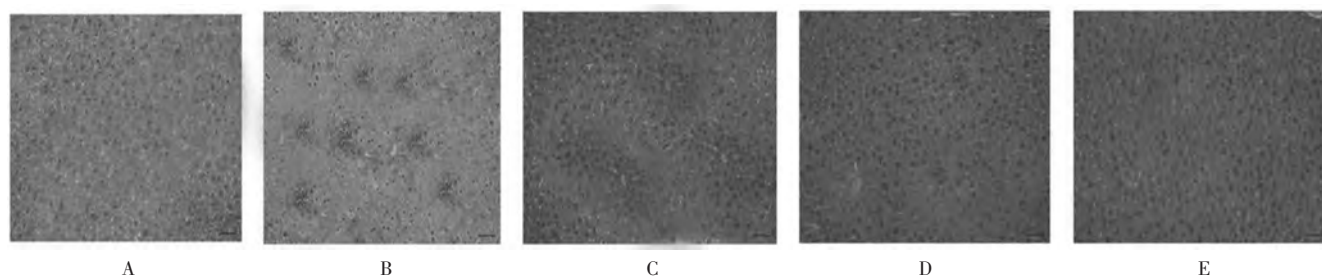
A 组小鼠肝脏中央静脉和周围肝细胞结构正常。B 组小鼠肝组织细胞存在气球样变性和脂肪变化,上述气球样变性和脂肪变化与纤维结缔组织链和严重炎症细胞浸润相关。C 组和 D₁ 组、D₂ 组上述肝组织病理形态学均有不同程度改善。详见图 1。

2.2 其他观察指标

结果见表 1 和图 2。与 A 组比较,B 组小鼠肝组织匀浆中正 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3),凋亡相关斑点样蛋白(ASC),含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1(Caspase-1), IL-1 β , p-P65, P65, 核因子 κ B 抑制因子 α (I κ B α), TGF- β , p-Smad-3, Smad-3 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$);与 B 组比较,C 组和 D₁ 组、D₂ 组小鼠肝组织匀浆中蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$)。

3 讨论

抑制炎症相关途径是治疗肝纤维化的有效靶点。本研究结果显示,芒果苷可通过抑制 NLRP3, ASC, Caspase-1 的表达,降低 p-P65 和 p-I κ B α 的生成,抑



A. 空白对照组 B. 模型组 C. 水飞蓟素组 D. 芒果苷低剂量组 E. 芒果苷高剂量组

图1 肝组织病理形态学($\times 200$)

表1 各组小鼠血清转氨酶活性和炎症因子水平比较
($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	转氨酶(U/L)		炎症因子水平(pg/mL)		
		ALT	AST	TNF- α	IL-1 β	IL-6
A组		42.58 $\pm$ 1.25	23.58 $\pm$ 2.01	42.56 $\pm$ 2.36	17.84 $\pm$ 1.24	24.55 $\pm$ 1.69
B组		84.99 $\pm$ 2.58*	81.24 $\pm$ 3.52*	98.47 $\pm$ 3.01*	63.69 $\pm$ 3.41*	80.27 $\pm$ 4.15*
C组	100	54.36 $\pm$ 3.26*	34.77 $\pm$ 2.47*	49.88 $\pm$ 1.69*	26.35 $\pm$ 2.44*	37.88 $\pm$ 2.74*
D ₁ 组	20	71.25 $\pm$ 4.21*	45.62 $\pm$ 2.99*	62.35 $\pm$ 2.47*	40.25 $\pm$ 3.52*	46.58 $\pm$ 3.61*
D ₂ 组	40	64.21 $\pm$ 3.14*	41.22 $\pm$ 3.17*	56.22 $\pm$ 3.24*	36.55 $\pm$ 2.91*	41.27 $\pm$ 2.24*

注:与A组比较,* $P < 0.01$;与B组比较,* $P < 0.01$ 。

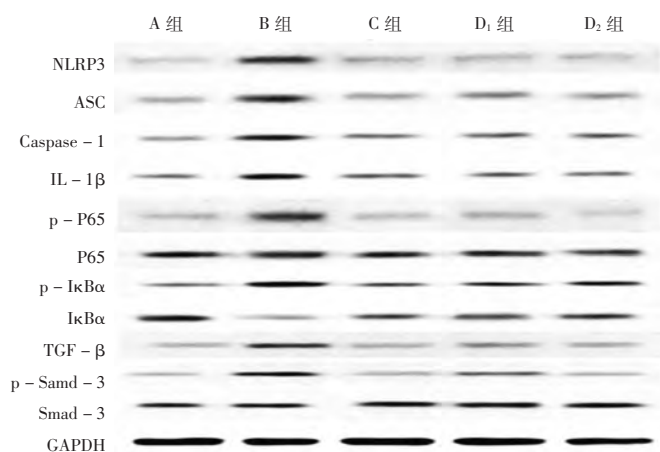


图2 肝组织匀浆中相关炎症因子蛋白表达

制 TGF- β 和 p-Samd-3 在肝组织中的表达,从而抑制 NLRP3 炎症小体反应。四氯化碳已被广泛用于实验性诱导肝纤维化^[11-12],其产生过量自由基,导致肝细胞膜脂质过氧化,随后释放炎症细胞因子和损伤肝细胞。本研究结果显示,20 mg/kg 和 40 mg/kg 芒果苷能显著改善模型小鼠 ALT、AST、炎症细胞因子水平和肝组织病理形态等。

炎症过程为涉及成纤维过程的主要事件^[13]。肝脏损伤时,肝巨噬细胞可激活 NF- κ B 及其下游信号传导。NF- κ B 作为转录因子,上调多种炎症细胞因子的释放,包括 TNF- α , IL-6, IL-1 β 。TNF- α , IL-6, IL-1 β , 进一步维持炎症级联反应。本研究结果显示,四氯化碳可增加小鼠血清 TNF- α , IL-6, IL-1 β 含量,升高

p-I κ B α 表达水平,从而加重肝脏炎症和纤维化^[14]。20 mg/kg 和 40 mg/kg 芒果苷能显著降低模型小鼠 TNF- α , IL-6, IL-1 β 的水平,对 NF- κ B 信号转导也有明显的抑制作用。

TGF- β 可促进肝星状细胞的活化和细胞外基质蛋白的积累,导致肝纤维化,其过量产生会刺激细胞外基质蛋白的各种成分的合成和释放。一旦激活,TGF- β 结合到 I 型和 II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体,将激活受体调节的 SMAS,包括 Smad-3。活化 Smads 的核易位是操纵 TGF- β 依赖基因的基本过程。TGF- β /Smad 信号通路失活可能是抗肝纤维化的一个有前途的治疗靶点。本研究结果显示,在四氯化碳处理的小鼠中,TGF- β 和 Smad-3 磷酸的表达水平升高,20mg/kg 和 40 mg/kg 芒果苷可显著抑制 Smad-3 和 TGF- β 的磷酸化。

综上所述,芒果苷对肝损伤模型小鼠具有一定改善作用,其机制与降低炎症反应有关。

参考文献:

- [1] SANCHEZVALLE V, CHAVEZTAPIA NC, URIBE M, et al. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review[J]. Current Medicinal Chemistry, 2012, 19(28):4850-4860.
- [2] REEVES HL, FRIEDMAN SL. Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis[J]. Frontiers Bioscience A Journal & Virtual Library, 2002, 7:d808-d826.
- [3] TACKE F, WEISKIRCHEN R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2012, 6(1):67-80.
- [4] SAKAI K, JAWAID S, SASAKI T, et al. Transforming growth factor- β -independent role of connective tissue growth factor in the development of liver fibrosis[J]. American Journal Pathology, 2014, 184(10):2611-2617.
- [5] BOURDOITIN K, BONNIER D, LEYME A, et al. Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta[J]. Hepatology, 2011, 54(6):2173-2184.
- [6] KAMADA Y, TAMURA S, KISO S, et al. Enhanced carbon te-