

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.18.010

芝麻酚对模型小鼠肝损伤的改善作用*

谢允东¹, 王小平¹, 何世鹏^{2△}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 西咸新区 712046; 2. 上海大学, 上海 200444)

摘要:目的 探讨芝麻酚对模型小鼠肝损伤的改善作用。方法 将KM小鼠分为正常对照组(等体积0.2% CMC-Na溶液)、模型组(等体积0.2% CMC-Na溶液)、水飞蓟素组(200 mg/kg),以及芝麻酚低、中、高剂量组(6, 12, 24 mg/kg)。正常对照组小鼠仅灌胃等体积0.2% CMC-Na溶液,其余各组小鼠灌胃相应药物及黄药子75%乙醇提取物(18 g/kg),每日1次,持续30 d。检测血浆中生化指标天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)水平,并对小鼠肝脏组织进行病理切片检查。采用Western blotting法检测肝组织匀浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、核因子 κ B(NF- κ B)p65、核因子E₂相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶(HO-1)的水平。结果 与模型组比较,芝麻酚低、中、高剂量组的ALT, AST, TBIL, MDA及NF- κ Bp65, TNF- α , IL-6蛋白表达水平均显著降低, GSH及HO-1蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);芝麻酚高剂量组的SOD和CAT水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组小鼠肝细胞肿胀,边缘模糊,出现细胞核溶解,芝麻酚低、中、高剂量组肝细胞明显改善,损伤较少。结论 芝麻酚可改善黄药子75%乙醇提取物诱导的小鼠肝损伤,其机制可能与调节Nrf2/NF- κ B信号通路而提高机体的抗氧化和抗炎能力有关。

关键词:黄药子;芝麻酚;肝损伤;Nrf2/NF- κ B信号通路;小鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)18-0037-05

Effect of Sesamol on the Improvement of Liver Injury in Model Mice

XIE Yundong¹, WANG Xiaoping¹, HE Shipeng²

(1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xixian New District, Shaanxi, China 712046; 2. Shanghai University, Shanghai, China 200444)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of sesamol on the improvement of liver injury in model mice. **Methods** KM mice were divided into the normal control group (equal volume of 0.2% CMC-Na solution), model group (equal volume of 0.2% CMC-Na solution), silymarin group (200 mg/kg) and sesamol low-dose, medium-dose and high-dose groups (6, 12, 24 mg/kg). Mice in the normal control group were only gavaged with an equal volume of 0.2% CMC-Na solution, and mice in other groups were gavaged with corresponding drugs and 75% ethanol extract (18 g/kg) of *Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae* once a day for 30 d. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TBIL), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in plasma were measured. The liver tissue of mice was examined by the pathological section. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65, nuclear factor E₂-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in the liver homogenate was detected by Western blotting. **Results** Compared with those in the model group, the levels of ALT, AST, TBIL, MDA and NF- κ Bp65, TNF- α and IL-6 decreased significantly, while the expression levels of GSH and HO-1 protein increased significantly in the low-dose, medium-dose and high-dose sesamol groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the levels of SOD and CAT in the high-dose sesamol group increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The hepatocytes in the model group were swollen, the edges were blurred, and the nuclei were dissolved. The hepatocytes of mice in the low-dose, medium-dose and high-dose sesamol groups were significantly improved with less damage. **Conclusion** Sesamol can improve the liver injury induced by 75% ethanol extract of *Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae*, and its mechanism may be related to regulating Nrf2/NF- κ B signal pathway, so as to improve the antioxidant and anti-inflammatory ability of the body.

Key words: *Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae*; sesamol; liver injury; Nrf2/NF- κ B signaling pathway; mice

黄药子为薯蓣科薯蓣属黄独 *Dioscorea bulbifera* L. 多年生草质缠绕藤本植物的地下块茎,药用历史悠久,味辛、苦,性凉,有小毒,归肝、胃、心、肺经,具有解毒消肿、化痰散结、凉血止血功效^[1-2]。内服用于治疗甲状腺肿大、淋巴结结核、咽喉肿痛、吐血、咯血、百日咳、癌肿;外用可治疗疮疖^[3-4]。黄药子疗效确切,但随着其临床应用的增加,主要不良反应肝损伤^[5-7]逐渐显现,从而限制了其临床应用。本课题组前期研究发现,黄药子诱导

的肝损伤与氧化应激和炎性损伤有关。芝麻酚是芝麻中的有效成分,具有较好的抗氧、抗炎等作用^[8-10]。本研究中探讨了芝麻酚对黄药子诱导小鼠肝损伤的改善作用及其机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:DYY-PAGE型电泳仪、DYCP-40C型转移槽(北京六一仪器厂);WD-9405F型水平摇床(北京六

*基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目[2021JQ-730]。

第一作者:谢允东,男,博士,讲师,研究方向为药物性肝损伤的防护,(电子信箱)eng522@126.com。

△通信作者:何世鹏,男,博士,讲师,研究方向为新药研发,(电子信箱)heshipeng@shu.edu.cn。

一仪器厂); Smart Plus - N 型超纯水系统(力康生物医疗科技控股有限公司); H1850 型超速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司); ELX808 型全波长酶标仪(美国 BioTek 公司); DH43L 型电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司)。

试药: 黄药子(陕西兴盛德药业有限责任公司, 批号为 20190920); 芝麻酚(批号为 D050385), 水飞蓟素(批号为 D110160), 购自上海安耐吉试剂公司; 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号为 20201211), 过氧化氢酶(CAT)试剂盒(批号为 20201128), 还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒(批号为 20201105), 丙二醛(MDA)试剂盒(批号为 20201208), 均购自南京建成生物工程研究所; 全蛋白提取试剂盒(批号为 WLA019), 核蛋白和浆蛋白提取试剂盒(批号为 WLA020a), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号为 WLA004), SDS - PAGE 凝胶快速制备试剂盒(批号为 WLA013), ECL 发光液(批号为 WLA003), 核转录因子 κ B(NF - κ B) p65 抗体(批号为 WL01273b), p - NF - κ Bp65 抗体(批号为 WL02169), 核因子 E₂ 相关因子 2(Nrf2)抗体(批号为 WL012135), 血红素加氧酶 - 1(HO - 1)抗体(批号为 WL02400), 肿瘤坏死因子 - α (TNF - α)抗体(批号为 WL01581), 白细胞介素 6(IL - 6)抗体(批号为 WL02841), 羊抗兔 IgG - HRP(批号为 WL023), 内参抗体 Histone H3(批号为 WL0984a), 内参抗体 β - actin(批号为 WL01372), 均购自沈阳万类生物科技有限公司; PVDF 膜(美国 Millipore 公司, 批号为 IPVH00010)。

动物: SPF 级健康 KM 小鼠 48 只, 雄性, 体质量 (20 ± 2) g, 购于成都达硕实验动物有限公司, 动物生产许可证号 SCXK(川)2020 - 030, 动物使用许可证号 SYXK(陕)2017 - 004, 实验动物合格证号 0043206。饲养条件, SPF 级实验室, 温度 $22 \sim 24$ °C, 相对湿度 45% ~ 65%。本动物实验经陕西中医药大学动物伦理委员会审批, 按要求开展。

1.2 方法

黄药子提取物制备: 取黄药子饮片适量, 粉碎得粗粉, 浸泡 2 h 后用 8 倍量 75% 乙醇溶液回流提取, 每次 4 h, 提取 3 次, 合并醇提液, 浓缩并减压干燥, 得干粉, 备用。

分组及给药: 将 48 只小鼠分为正常对照组(等体积 0.2% CMC - Na 溶液)、模型组(等体积 0.2% CMC - Na 溶液)、水飞蓟素组(200 mg/kg)及芝麻酚低、中、高剂量组(6, 12, 24 mg/kg)。正常对照组小鼠仅灌胃等体积 0.2% CMC - Na 溶液, 其余各组小鼠灌胃相应药物及黄药子 75% 乙醇提取物(18 g/kg), 每日 1 次, 持续 30 d。

1.3 检测指标

血浆生化指标: 给药 30 d 后, 小鼠禁食不禁饮 12 h, 之后眼眶取血, 置带抗凝剂的 EP 管中, 冰浴静置 30 min,

4 °C 条件下 4000 r/min 离心 10 min, 取上层血浆, -20 °C 保存, 待测。采用全自动生化分析仪测定小鼠血浆中天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBiL)水平。检测小鼠血浆中 SOD, CAT, GSH, MDA 水平。

组织病理学: 小鼠眼眶取血后处死, 解剖, 取肝脏, 去除多余的瘀血和结缔组织, 将部分肝脏组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 72 h 后依次进行包埋切片、切片脱蜡至水、苏木素 - 伊红(HE)染色、脱水、透明、封片, 光镜下观察肝组织病理变化。

肝组织分子生物学: 取肝脏, 在液氮中研磨, 加入 1 mL RIPA 蛋白裂解液, 冰上匀浆, 每隔 5 min 超声 20 s。裂解 30 min 后, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 以 BCA 法检测蛋白含量。各组取 20 μ g 上样, 10% SDS - PAGE 电泳后湿法电转, 恒流 250 mA 冰上转膜 90 min 至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 清洗 3 次, 加入 NF - κ Bp65, p - NF - κ Bp65, Nrf2, HO - 1, TNF - α , IL - 6(1 : 500), Histone H3, β - actin 一抗(1 : 1 000), 4 °C 孵育过夜。回收一抗, TBST 清洗 3 次, 加入二抗(1 : 5 000) 37 °C 条件下孵育 45 min, 用 TBST 清洗 3 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 Gel - Pro - Analyzer 软件将条带灰度值数字化, 以目的条带与内参条带灰度比值为各目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 24.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Graphpad Prism 8.0 软件绘制检测结果的柱状图。

2 结果

2.1 肝脏组织病理学

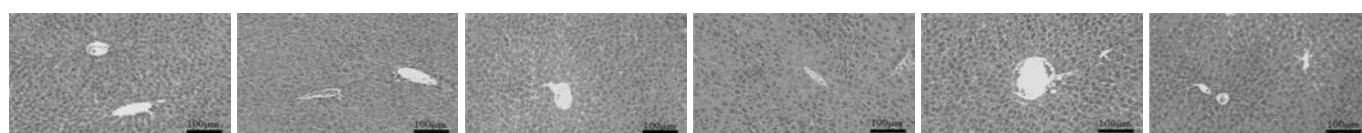
肝脏组织 HE 染色显示, 正常对照组小鼠肝脏肝板呈放射状, 肝细胞正常, 边缘清晰, 肝细胞核正常; 模型组小鼠肝细胞肿胀, 炎性因子浸润, 边缘清晰, 部分肝细胞核溶解。水飞蓟素组肝细胞肿胀、浸润, 损伤等状况明显改善。芝麻酚低、中、高剂量组细胞肿胀降低, 浸润减少, 肝细胞损伤明显改善, 随着剂量的升高, 改善作用更好。结果见图 1。

2.2 肝功能指标

与正常对照组比较, 模型组小鼠血浆中 ALT, AST, TBiL 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 水飞蓟素组和芝麻酚低、中、高剂量组小鼠血浆中 ALT, AST, TBiL 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图 2。

2.3 抗氧化指标

与正常对照组比较, 模型组小鼠血浆中 SOD, CAT,

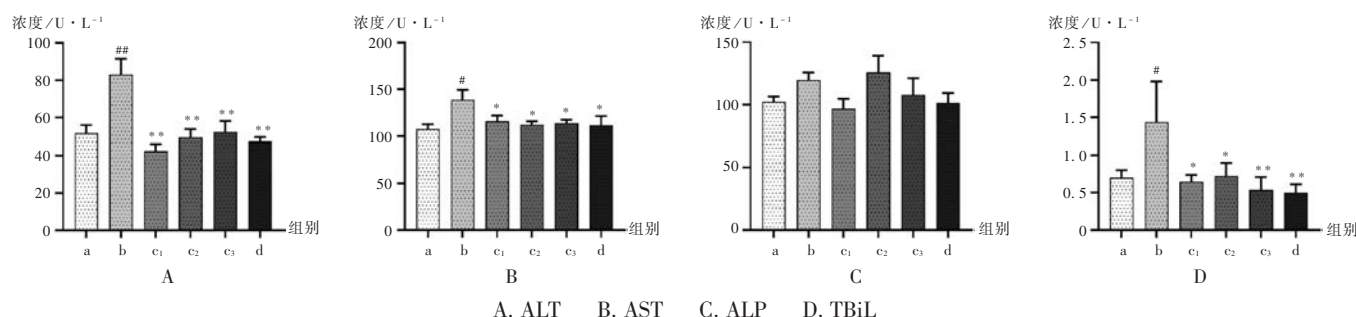


A. 正常对照组 B. 模型组 C. 水飞蓟素组 D-F. 芝麻酚低、中、高剂量组。

图1 各组小鼠肝脏组织病理切片(HE, ×200)

A. Normal control group B. Model group C. Silymarin group D-F. Low-dose, medium-dose, high-dose sesamol groups

Fig.1 Pathological sections of liver tissues of mice in each group(HE, ×200)



A. ALT B. AST C. ALP D. TBiL

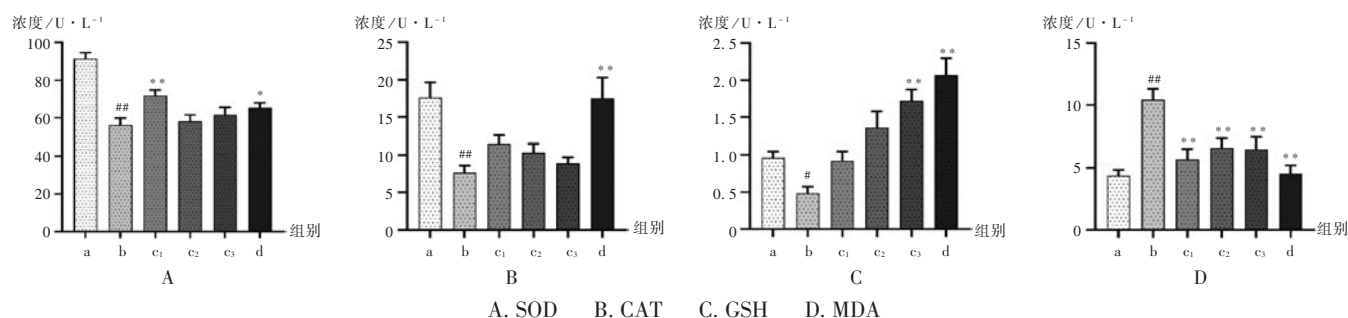
注:a组为正常对照组,b组为模型组,c₁-c₃组分别为芝麻酚低、中、高剂量组,d组为水飞蓟素组。与a组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与b组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。下图同。

图2 各组小鼠肝功能指标检测结果($\bar{X} \pm s, n = 8$)

A. ALT B. AST C. ALP D. TBiL

Note: group a is normal control group, group b is model group, group c₁-c₃ are low-dose, medium-dose, high-dose sesamol groups respectively, group d is silymarin group; compared with those in group a, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with those in group b, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; as well as the following figures.

Fig.2 Test results of the liver function indexes of mice in each group($\bar{X} \pm s, n = 8$)



A. SOD B. CAT C. GSH D. MDA

图3 各组小鼠抗氧化指标检测结果($\bar{X} \pm s, n = 8$)

A. SOD B. CAT C. GSH D. MDA

Fig.3 Test results of the antioxidant indexes of mice in each group($\bar{X} \pm s, n = 8$)

GSH水平均显著降低,MDA水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,水飞蓟素组和芝麻酚高剂量组小鼠血浆中SOD和CAT水平均显著升高,芝麻酚高、中剂量组GSH水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),水飞蓟素组和芝麻酚高、中、低剂量组MDA水平均显著降低($P < 0.01$)。结果见图3。

2.4 肝组织匀浆炎症指标

与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织匀浆中p-NF- κ Bp65,TNF- α ,IL-6蛋白表达水平均显著升高,Nrf2和HO-1蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,水飞蓟素组和芝麻酚低、中、高剂量组小鼠肝组织匀浆中p-NF- κ Bp65,TNF- α ,IL-6蛋白表达水平均显著降低,Nrf2和HO-1蛋白表达水平均显著升高

($P < 0.01$),且呈剂量依赖关系。结果见图4。

3 讨论

黄药子对甲状腺疾病等有显著临床疗效,但长期或大剂量服用会导致肝损伤,其损伤机制与氧化应激密切相关^[11]。黄药子作用于肝细胞诱发产生大量活性氧簇(ROS),并累积于肝细胞内,过量ROS的产生超出了抗氧化体系的抗氧化能力,氧化应激还可能通过免疫激活释放炎症因子直接介导肝细胞的凋亡和肝窦内皮细胞损伤,导致肝脏炎症和细胞坏死^[12-13]。本研究结果表明,小鼠给予黄药子75%乙醇提取物后,肝功能指标ALT,AST,TBiL水平均显著升高,而给予芝麻酚干预后能显著降低上述指标水平,说明芝麻酚对黄药子诱导的小鼠肝损伤具有改善作用。肝脏组织病理切片实验结果

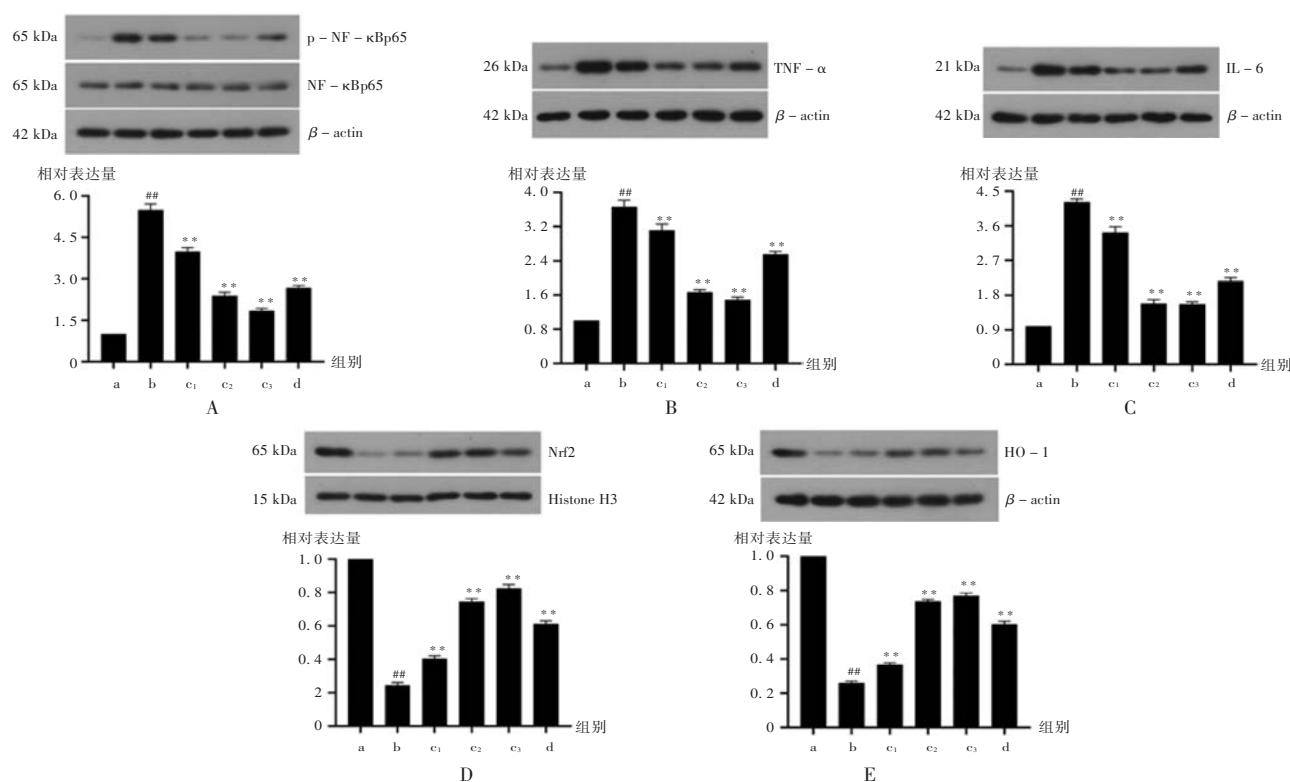


图4 芝麻酚对黄药子诱导肝损伤小鼠肝组织匀浆相关因子、蛋白表达水平 (n=3)

A. p-NF-κBp65 B. TNF-α C. IL-6 D. Nrf2 E. HO-1

Fig.4 Effect of sesamol on the expression of related factors and proteins in liver tissues of mice with liver injury induced by Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae (n=3)

进一步说明芝麻酚对黄药子诱导的肝损伤有改善作用。

NF-κB 与机体炎症反应关系密切^[14-15],磷酸化后进入细胞核调控下游系列炎症因子的表达。本研究结果显示,给予黄药子提取物后,小鼠肝组织中 p-NF-κBp65, TNF-α, IL-6 蛋白表达水平均显著升高,说明肝组织产生了炎症反应。给予芝麻酚干预后, p-NF-κBp65, TNF-α, IL-6 蛋白表达水平均显著下降,说明芝麻酚对黄药子诱导小鼠肝脏产生的炎症反应有显著抑制作用,可能与其抑制 NF-κB 磷酸化有关。Nrf2 是调控细胞氧化损伤的关键转录因子,可与抗氧化物元件(ARE)结合调控抗氧化物的表达, Nrf2 被激活可诱导其下游 HO-1 的表达及其他的抗氧化酶的表达^[16-17]。本研究结果显示,给予黄药子 75% 乙醇提取物后,血浆中抗氧化酶 SOD, CAT, GSH 水平均显著降低,脂质过氧化产物 MDA 水平显著增加,肝组织中 Nrf2 和 HO-1 表达水平均显著下调,说明黄药子 75% 乙醇提取物诱导小鼠产生了氧化应激,给予芝麻酚干预后,抗氧化酶水平显著升高,脂质过氧化产物 MDA 含量显著减少,肝组织中 Nrf2 和 HO-1 表达水平显著升高,说明芝麻酚对黄药子诱导小鼠产生的氧化应激具有改善作用,可能与其激活 Nrf2 蛋白后增强机体的抗氧化酶有关。

综上所述,芝麻酚对黄药子 75% 乙醇提取物诱导的小鼠肝损伤具有一定防护作用,其作用机制可能与调节 Nrf2/

NF-κB 信号通路而提高机体的抗氧化和抗炎能力有关。

参考文献

- [1] 赵惠莎. 黄药子的药理及毒副作用[J]. 浙江中西医结合杂志, 2009,19(3):178-179.
- [2] 程芳. 黄独致中毒性肝炎 8 例报告[J]. 江苏中医, 1995, 16(7):9.
- [3] 王礼启, 刘成钢, 邱国三. 黄药子丸治疗良性甲状腺肿临床观察[J]. 陕西中医函授, 1998(6):23-24.
- [4] 林芳, 华碧春. 中药黄药子抗肿瘤作用研究现状[J]. 亚太传统医药, 2011,7(10):183-184.
- [5] 杜丽霞, 罗明媚, 刘树民. 黄药子现代毒理学研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007,9(3):71-72.
- [6] 金安萍. 黄药子致肝功能异常 1 例[J]. 中国中药杂志, 1996,21(6):57.
- [7] 施海优, 王志雄. 黄药子致肝损害 2 例[J]. 浙江中西医结合杂志, 2005,15(3):193.
- [8] LIN Z, LIN X, MEHMOOD AA, et al. Phytochemical contents and antioxidant and antiproliferative activities of selected black and white sesame seeds[J]. BioMed Research International, 2016, 2016:8495630-8495639.
- [9] YASHASWINI PS, APPU-RAO AG, SINGH SA. Inhibition of lipoxygenase by sesamol corroborates its potential anti-inflammatory activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017,94(Part B):781-787.
- [10] ROHNI D, VIJAYALAKSHMI K. Sesamol antagonizes