

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.14.006

文章编号: 1005-8982(2017)14-0028-05

溪黄草黄酮对小鼠非酒精性脂肪肝纤维化的影响及其机制探讨*

郑玉峰, 张英剑, 郭虹, 高磊, 苏秀丽

[河南科技大学临床医学院(河南科技大学第一附属医院)

新区医院消化内科, 河南 洛阳 471003]

摘要:目的 观察不同浓度溪黄草黄酮(FRSH)对非酒精性脂肪肝纤维化小鼠的影响,并探讨初步机制。

方法 将小鼠随机分为 5 组:对照组、模型组及 FRSH 低、中、高剂量组(FRSH-L、FRSH-M、FRSH-H)。检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)和谷氨酸氨基转移酶(AST)水平;苏木精-伊红染色法观察肝脏组织的病理状态;Western blot 检测肝组织中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)蛋白的表达;实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测肝组织中转化生长因子- β (TGF- β)、过氧化物酶体增殖物活化受体- γ (PPAR γ)mRNA 的表达。**结果** 与模型组比较,FRSH 能够降低血清中 ALT、AST 的含量,并改善肝组织的脂肪变性,减轻炎症、坏死程度;肝组织中 TIMP-1 蛋白和 TGF- β mRNA 表达降低,MMP-9 蛋白和 PPAR γ mRNA 表达增加。**结论** FRSH 能抑制非酒精性脂肪性肝纤维化的发生、发展,可能与 MMP-9、TIMP-1、TGF- β 及 PPAR γ 的表达相关。

关键词: 溪黄草黄酮;非酒精性脂肪性肝纤维化;基质金属蛋白酶-9;基质金属蛋白酶抑制剂-1;转化生长因子- β ;过氧化物酶体增殖物活化受体- γ

中图分类号: R575.2

文献标识码: A

Effect of flavonoids from *Rabdosia serra* (Maxim) Hara on fibrosing nonalcoholic steatohepatitis in mice*

Yu-feng Zheng, Ying-jian Zhang, Hong Guo, Lei Gao, Xiu-li Su

[Department of Gastroenterology, Clinical Medical School (the First Affiliated Hospital), Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China]

Abstract: Objective To investigate the effect of flavonoids from *Rabdosia serra* (Maxim) Hara (FRSH) on fibrosing nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in mice and discuss the mechanism. **Methods** Mice were randomly divided into five groups: control group, model group, and treatment groups (FRSH-L, FRSH-M and FRSH-H groups). The mice in the model group were given high-fat and methionine-choline deficient (MCD) diet. In the treatment groups MCD diet and different concentrations of FRSH were used. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were examined. The pathological changes of the liver were observed after HE staining. The expressions of MMP-9 and TIMP-1 in the liver were determined by Western blot. The mRNA levels of TGF- β and PPAR γ were detected by qRT-PCR. **Results** Compared with the model group, treatment with FRSH significantly decreased the serum levels of ALT and AST and improved the liver inflammation and fibrosis. Moreover, the expressions of TIMP-1 protein and TGF- β mRNA were reduced and the expressions of MMP-9 protein and PPAR γ mRNA were increased in the liver after FRSH treatment. **Conclusions** FRSH could retard the development of fibrosing nonalcoholic steatohepatitis through modulation of the expressions of MMP-9, TIMP-1, TGF- β and PPAR γ .

收稿日期:2016-12-08

* 基金项目:河南省医学科技公关计划(No:201504039)

[通信作者] 张英剑, E-mail: 376292327@qq.com

Keywords: flavonoids from *Rabdosia serra* (Maxim.) hara; fibrosing nonalcoholic steatohepatitis; MMP-9; TIMP-1; TGF- β ; PPAR γ

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的全球发病率呈逐年上升趋势^[1-2]。但目前临床上没有 NAFLD 的特效药物^[3-5]。研究发现,溪黄草水煎剂能够降低四氯化碳 CCl₄ 诱导的急性肝损伤大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 与谷氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase, AST) 的水平^[6]。另有研究显示,溪黄草具有减轻肝细胞肿胀、脂肪变性及细胞坏死的作用^[7]。因此,本实验观察溪黄草黄酮 (flavonoids from *rabdosia serra hara*, FRSH) 对非酒精性脂肪肝纤维化小鼠的影响,并探讨其初步作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

50 只无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠,7~8 周龄,体重 18~20g,购自中国医学科学院实验动物中心,饲养温度 (22±2)℃,12h 昼/夜循环照明,自由进食、饮水,动物许可证号:SYXK(豫)2012-0009。

1.2 实验试剂与材料

蛋氨酸-胆碱缺乏 (methionine-choline deficient diet, MCD) 饲料与蛋氨酸-胆碱充足饲料均购自美国 ICN 生物医学化学药品公司,基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,Trizol reagent 购自北京赛百盛公司,引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 非酒精性脂肪性肝纤维化小鼠模型的复制与分组

小鼠普通喂养 7 d 后,随机分为对照组、模型组 (高脂、MCD)、溪黄草黄酮低、中、高剂量组 (FRSH-L、FRSH-M、FRSH-H),每组 10 只。分组方法如下:①对照组采用蛋氨酸-胆碱充足饲料喂养;②模型组采用蛋氨酸-胆碱缺乏饲料喂养;③FRSH-L、FRSH-M、FRSH-H 组采用蛋氨酸-胆碱缺乏饲料喂养,同时给予溪黄草黄酮 12.5、25.0 和 50.0 mg/kg, 1 d/次,连续给药 20 d。

1.4 血清 ALT、AST 水平检测

给药完成后,小鼠禁食、禁水 12 h,腹腔注射水

合氯醛深度麻醉,摘眼球取血。血样 4℃、3 500 r/min 离心。采用全自动生化分析仪酶法测定血清中 ALT、AST 的水平。

1.5 苏木精-伊红染色

切除小鼠肝脏,4%中性甲醛固定后进行常规石蜡包埋、切片,用二甲苯透明,分别置于梯度乙醇 (100%、95%、90%、80%和 70%) 各 5 min,双蒸馏水浸泡 1 min,苏木精染色 5 min,双蒸馏水冲洗 2 s,1%盐酸乙醇分化 2 s,双蒸馏水冲洗 2 s,1%氨水浸泡 10 s 返蓝,蒸馏水冲洗,1%伊红复染 2 min,蒸馏水冲洗后再次置于梯度乙醇中脱水 (70%、80%、95%和 100%) 各 1 min,二甲苯透明,中性树脂封片,用光学显微镜观察肝脏组织的病理状态的变化。

1.6 Western blot 检测

取各组小鼠肝脏组织,提取细胞总蛋白,采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒检测蛋白浓度。取等量蛋白进行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶电泳,分离后电转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上,加入胎牛蛋白,室温下封闭 2 h,加入一抗孵育 4℃ 孵育过夜,三羟甲基氨基甲烷盐缓冲溶液 (tris buffered saline and tween 20, TBST) 洗涤 3 次;再加入相对应二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,用化学发光法试剂盒检测蛋白条带。

1.7 实时荧光定量聚合酶链反应

按照 Trizol 说明书提取肝组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,引物序列见表 1。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增条件为 93℃ 预变性 6 min,

表 1 qPCR 引物序列

基因	引物序列
TGF- β	正向引物: 5'-AACAATTCCTGGCGTTACCTT-3'
	反向引物: 5'-GAATCGAAAGCCCTGTATTCC-3'
PPAR γ	正向引物: 5'-GTTGACACAGAGATGCCATTC-3'
	反向引物: 5'-GGTCTTCATGAGGCCTG-3'
GAPDH	正向引物: 5'-GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3'
	反向引物: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'

注: TGF- β : 转化生长因子- β (transforming growth factor- β); PPAR γ : 过氧化物酶体增殖物活化受体- γ (peroxisome proliferative activated receptor- γ)

92℃变性 25 s,64℃退火 45 s,62℃延伸 6 min,共 40 个循环。所得结果在荧光定量操作系统进行分析,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对结果进行计算。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较用方差分析 (One-way, ANOVA),两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 ALT、AST 水平比较

各组血清 ALT、AST 水平比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较,经 LSD-*t* 检验,与对照组比较,模型组血清 ALT、AST 水平升高 ($t = -6.384$ 和 -8.675 , $P = 0.004$ 和 0.002);与模型组比较,给予溪黄草黄酮处理后的小鼠血清 ALT、AST 水平降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组血清 ALT、AST 水平比较 ($n = 10, u/L, \bar{x} \pm s$)

组别	ALT	AST
对照组	31.28 ± 3.52	30.24 ± 5.42
模型组	256.43 ± 8.75 ¹⁾	342.64 ± 12.43 ¹⁾
FRSH-L 组	198.84 ± 10.45 ²⁾	275.75 ± 15.43 ²⁾
FRSH-M 组	132.36 ± 11.25 ²⁾	200.56 ± 16.43 ²⁾
FRSH-H 组	88.56 ± 5.74 ²⁾	118.33 ± 9.75 ²⁾
<i>F</i> 值	6.021	11.162
<i>P</i> 值	0.004	0.002

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$; 2)与模型组比较, $P < 0.05$

2.2 肝组织病理学变化

对照组小鼠肝组织细胞结构正常,排列整齐。模型组小鼠肝组织出现大泡的脂肪变性,并伴有炎症细胞的浸润和灶状肝细胞坏死,以及汇管区组织增生。随着溪黄草黄酮剂量的增大,干细胞脂肪变性明显减轻,炎症活动度与细胞坏死情况也逐渐改善。见图 1。

2.3 肝组织中 MMP-9、TIMP-1 蛋白的表达

各组肝组织中 MMP-9、TIMP-1 蛋白的表达水平比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($F = 5.382$ 和 8.375 , $P = 0.003$ 和 0.002)。进一步两两比较,经 LSD-*t* 检验,与对照组比较,模型组肝组织中 MMP-9 蛋白的表达水平降低 ($t = -4.152$, $P = 0.005$)、TIMP-1 蛋白的表达水平升高 ($t = -5.672$, $P = 0.003$);与模型组比较,给予溪黄草黄酮处理后,随着剂量增大,肝组织中 MMP-9 蛋白的表达水平逐渐升高;TIMP-1 蛋白的表达水平逐渐降低。见图 2。

2.4 肝组织中 PPAR γ 、TGF- β mRNA 的表达

各组 PPAR γ 、TGF- β mRNA 表达水平比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($F = 6.314$ 和 9.165 , $P = 0.003$ 和 0.004)。进一步两两比较,经 LSD-*t* 检验,与对照组比较,模型组肝组织中 PPAR γ mRNA 表达水平降低 ($t = -2.312$, $P = 0.004$)、TGF- β mRNA 表达水平升高 ($t = -12.315$, $P = 0.001$);与模型组比较,给予溪黄草黄酮处理后,随着剂量增大,肝组织中 PPAR γ mRNA 表达水平逐渐升高;TGF- β mRNA 表达水平逐渐降低。见图 3。

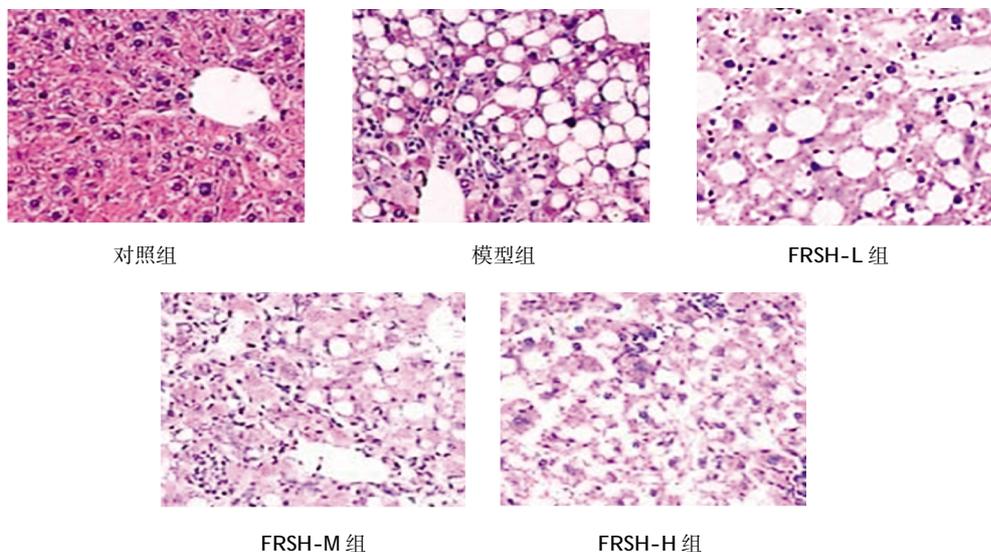
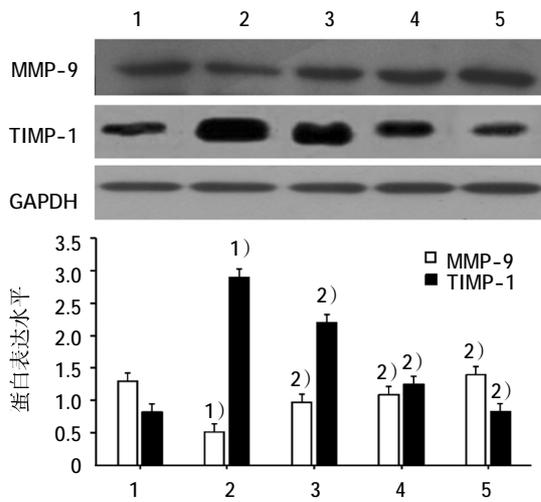


图 1 各组小鼠肝组织病理学变化 ($\times 200$)

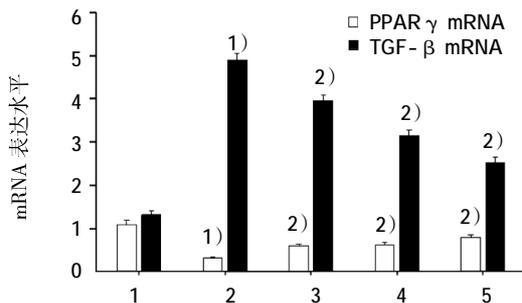


1: 对照组; 2: 模型组; 3: FRSH-L 组; 4: FRSH-M 组; 5: FRSH-H 组

1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

图 2 各组肝组织中 MMP-9、TIMP-1 蛋白的表达变化

($n=10, \bar{x} \pm s$)



1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

图 3 各组肝组织中 TGF- β 和 PPAR γ mRNA 的

表达变化 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

脂肪性肝炎和肝纤维化是单纯性脂肪肝向肝硬化进展的必经阶段。因此,防治肝病的主要措施是调控脂肪代谢、抗炎、抗肝纤维化等。基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组锌离子依赖酶,其中 MMP-9 在肝纤维化的发生、发展中发挥重要作用^[8];基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是一组具有抑制 MMPs 功能的活性肽,能够使 MMPs 失去降解功能, TIMP-1 是 MMPs 的天然抑制剂^[9]。发生肝纤维化的时, TIMP-1 大量表达,导致 MMPs 灭活。本实验结果显示,给予溪黄草黄酮治疗后,非酒精性脂肪性肝纤维化小鼠肝组织中 MMP-9 蛋白的表达升高、TIMP-1 蛋白的表达降低,提示基质降解系统受到抑制,启动抗纤维化的级联反应,从而逆转肝纤维化。

TGF- β_1 在维持肝脏内环境的稳态中发挥重要作用。正常情况下与其他细胞因子处于平衡状态,表达失衡后,会导致肝病的进展。本实验结果发现,模型组肝组织中 TGF- β_1 表达升高,给予溪黄草黄酮处理后则下降,提示 NAFLD 模型中 TGF- β_1 表达上调,促进肝纤维发生、发展,而给予溪黄草黄酮处理后,减少 TGF- β_1 因子分泌,从而减轻肝脏炎症及纤维化。PPAR γ 对体内代谢、细胞生长分化及凋亡有重要影响,与心血管疾病及脂肪肝等疾病的发生密切相关。研究发现,PPAR γ 参与脂肪酸代谢,其活化后可以减少脂肪酸转运至肝脏,从而降低脂肪的合成^[10-11]。NAFLD 模型中,PPAR γ 的表达降低,肝组织脂肪变性,细胞坏死凋亡增多,给予溪黄草黄酮处理后,PPAR γ 表达增加,肝细胞纤维化改善,推测 PPAR γ 通过调节脂肪酸代谢的多个环节,推断肝损伤中肝纤维化的发展与 PPAR γ 的表达相关。溪黄草黄酮通过激活 PPAR γ ,可逆转活化肝星状细胞恢复静息状态,减少分泌 TGF- β_1 ,进而减轻肝脏纤维化的程度,PPAR γ 可能作为抗非酒精性脂肪肝纤维化治疗的新靶点,进一步深入研究。

本实验发现,溪黄草黄酮能有效抑制非酒精性脂肪肝纤维化的发生、发展,可能与 MMP-9、TIMP-1、TGF- β 、PPAR γ 因子的表达密切相关,溪黄草黄酮有望开发成为治疗非酒精性脂肪肝纤维化的有效药物,其疗效还需进一步通过临床实验证实。

参 考 文 献:

- [1] FAN J G, FARRELL G C. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China[J]. J Hepatol, 2009, 50(1): 204-210.
- [2] BELLENTANI S, MATINO M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Ann Hepatol, 2009, 8(suppl1): S4-S8.
- [3] HUANG M A, GREENSON J K, CHAO C, et al. One-years intense nutritional counseling results in histological improvement in patients with nonalcoholic ateohepatitis: a pilot study[J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100(5): 1072-1081.
- [4] HASEGAWA T, YONEDA M, NAKAMURA K, et al. Plasma transforming growth factor-beta level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with nonalcoholic ateohepatitis: a pilot study[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2001, 15(10): 1667-1672.
- [5] LIN L, ZHU D, ZOU L, et al. Antibacterial activity-guided purification and identification of a novel C-20 oxygenated ent-kaurane from Rabdosia serra (MAXIM) HARA[J]. Food Chem, 2013, 139(1/2/3/4): 902-909.
- [6] 刘银黄, 陈秀琴, 沈婕, 等. 溪黄草水煎剂对大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 山东中医杂志, 2007, 26(8): 565-566.

- [7] 韩坚, 钟志勇, 林煌权, 等. 溪黄草茶浸膏对化学性肝损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(6): 414-417.
- [8] LEROY V, MONIER F, BOTTARI S, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIII NP and hyaluronic acid[J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99(2): 271-279.
- [9] WANG X, LI KF, ADAMS E, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors: a review on bioanalytical methods, pharmacokinetics and metabolism[J]. Curr Drug Metab, 2011, 12(4): 395-410.
- [10] LAPSYS N M, KRIKETOS A D, LIM-FRASER M, et al. Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human skeletal muscle[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(11): 4293-4297.
- [11] WALTON R G, ZHU B, UNAL R, et al. Increasing adipocyte lipoprotein lipase improves glucose metabolism in high fat diet-induced obesity[J]. J Biol Chem, 2015, 290(18): 11547-11556.

(童颖丹 编辑)

《中国现代医学杂志》投稿须知

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年, 期刊号 ISSN1005-8982/CN43-1225/R, 旬刊(2017 年 7 月开始), 系中国科技论文统计源期刊、北京大学图书馆中文核心期刊、中国核心学术期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊, 被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录, 公开发行。本刊是中华人民共和国教育部主管的国家级综合性医学学术期刊, 以服务于广大医药卫生科技人员, 促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学肝胆肠外科研究中心主办, 中南大学湘雅医院承办。

本刊刊登的论文内容涉及基础医学、临床医学、预防医学及医学相关学科的新理论、新技术、新成果以及医学信息、动态等。文稿须具有科学性、创新性、实用性。文字要求准确、通顺、精练。本刊设基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。学术报告类论文字数控制在 3000 字以内; 病例报告类论文字数控制在 800 字以内。稿件格式为题名、作者姓名、作者单位、邮编、摘要(具体要求见投稿细则)、关键词、正文、参考文献。

本刊对国家级的科研成果或阶段性成果及部级以上课题项目的进展报道实行速审快发。一般稿件 2 个月内有评审结果, 录用后等待发表。请作者自行登录本刊网站(www.zgxdyx.com)查询稿件处理结果, 恕不另行通知。稿件发表后, 赠当期杂志 2 本。

投 稿 细 则

1. 文稿力求文字精练、准确、通顺; 文题简明、醒目, 能反映出文章的主题; 勿用不规范字。请作者仔细校对全文, 并认真复核数据。摘要应与正文内药物剂量、病例数、百分比等数据一致。如有错误, 将降低审稿人和编辑对该文真实性的信任度, 导致退稿。	6. 所有栏目需附关键词 3~5 个, 其中临床报道、学术报告和病例报告只需中文关键词, 其余栏目需中英文关键词齐全。
2. 文题中不使用英文缩略语。摘要中一般也不使用英文缩略语, 如因为该词出现多次而需要使用时, 应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文缩略语(此处不需写出英文全称)。正文中首次使用英文缩略语时, 也应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文全称及英文缩略语。此规则对已公知、公用的缩略语除外。	7. 照片、图片(黑白原始照片必须清晰, 大小 5 cm × 7 cm), 须在文章内标明其位置, 并附标题, 显微镜下照片应标明放大倍数, 图背面标明作者姓名、文章编号、图序及照片方向(上、下)。
3. 单位介绍信原件, 注明稿件非一稿多投。采用网上投稿方式时, 请将该介绍信照片插入提交的论文 Word 文稿第一页。	8. 所有栏目参考文献须引用 10 条以上, 以近 5 年文献为主。引用期刊的格式为: 作者. 文题. 刊名, 年, 卷(期): 起止页码.; 引用书籍的格式为: 著者. 书名. 版次. 出版地: 出版社, 年份: 起止页码.; 每条参考文献应列出作者姓名, 如超过 3 名者, 则在 3 名作者后写等。中文格式: 解勤之, 陈方平, 蹇在伏, 等. 红细胞收缩: 血小板无力症的可能代偿机制[J]. 中国医学工程, 1998, 8(11): 3-5。英文格式: SZEMAN B, NAGY G. Changes in cognitive function in patient with diabetes mellitus[J]. Orv Hetil, 2012, 153(9): 323-329.
4. 所有栏目投稿的中英文论文题目、作者姓名及作者单位需齐全(每位作者只标注一个主要单位, 其余的可以作者简介方式在首页左下角注明, 标注通信作者的必须留下通信作者本人的电话或电子邮箱, 以便核实)。	9. 综述第一作者须有副高以上职称证明(参考文献 35 条以上)。
5. 栏目对中英文摘要的要求: 基础研究·论著、临床研究·论著、新进展研究·论著需中英文摘要齐全, 并按目的、方法、结果、结论四要素书写, 200~500 个字。综述需中英文摘要齐全, 不需按四要素书写。临床报道和学术报告只需中文摘要, 病例报告无需中英文摘要。	10. 凡国家、省部级自然科学基金、博士基金、863 计划及国家重点实验室项目的论文, 请注明基金名称及编号并附相关项目批准文件或任务书复印件, 可优先发表。项目主要负责人为通信作者。采用网上投稿方式时, 请将相关证明材料的照片插入提交的论文 Word 文稿最后一页。