

排钱草总生物碱通过抑制 NF- κ B 通路对急性肝衰竭大鼠的保护作用

高升¹, 余丽娜^{2,3#}, 曹开放¹, 欧阳石^{2*}

1. 广州医科大学附属第五医院 中医科, 广州市加速康复腹部外科重点实验室, 广东 广州 510700

2. 广州医科大学附属第五医院 感染科, 广州市加速康复腹部外科重点实验室, 广东 广州 510700

3. 华北理工大学 公共卫生学院, 河北 唐山 063210

摘要: 目的 探讨排钱草总生物碱通过抑制核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路对急性肝衰竭 (ALF) 大鼠的保护作用及其机制。方法 Wistar 雄性大鼠随机分成对照组、模型组和排钱草总生物碱组, ip *D*-半乳糖胺 (*D*-GalN) (400 mg/kg)/脂多糖 (LPS) (10 μ g/kg) 建立 ALF 大鼠模型。对照组和模型组大鼠均 ig 3 g/kg 生理盐水; 排钱草总生物碱组大鼠 ig 排钱草总生物碱 3 g/kg, 给予药物干预 14 d 后, 观察排钱草总生物碱对大鼠一般情况的影响, 测定 ALF 大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平并用 HE 染色观察排钱草总生物碱对 ALF 大鼠肝组织病理学的影响, 采用 Western blotting 法检测各组大鼠肝组织 NF- κ B 及 I κ B 磷酸化的表达水平。结果 排钱草总生物碱可有效降低模型大鼠血清 ALT、AST 水平 ($P < 0.001$); HE 染色显示, 排钱草总生物碱可以使模型大鼠肝组织坏死程度减轻, 可见部分增生肝细胞, 炎性浸润减轻。Western blotting 结果显示, 排钱草总生物碱可以抑制模型大鼠肝组织 p-NF- κ B 和 p-I κ B 表达升高, 从而抑制 NF- κ B 通路的激活。结论 排钱草总生物碱可能通过抑制 NF- κ B 通路发挥其对 ALF 大鼠的保肝作用。

关键词: 排钱草; 排钱草总生物碱; 急性肝衰竭; 丙氨酸氨基转移酶; 天门冬氨酸氨基转移酶; NF- κ B 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2022)04-0687-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.04.003

Protective effect of total alkaloid of *Phyllodium pulchellum* on rats with acute liver failure by inhibiting NF- κ B signaling pathway

GAO Sheng¹, YU Li-na^{2,3}, CAO Kai-fang², OUYANG Shi¹

1. Guangzhou Key Laboratory of Enhanced Recovery after Abdominal Surgery, Department of Traditional Chinese Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University Guangzhou, Guangzhou 510700, China

2. Guangzhou Key Laboratory of Enhanced Recovery after Abdominal Surgery, Department of Infection Disease, the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University Guangzhou, Guangzhou 510700, China

3. School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of total alkaloid of *Phyllodium pulchellum* on rats with acute liver failure by inhibiting NF- κ B signaling pathway, and to further reveal the protective mechanism. **Methods** Wistar male rats were divided into control group, model group, and total alkaloid of *P. pulchellum* group. ALF model was made by ip *D*-GalN (400 mg/kg)/LPS (10 μ g/kg). Rats in control group and model group were ig normal saline 3 g/kg, and rats in total alkaloid of *P. pulchellum* group were ig total alkaloid of *P. pulchellum* 3 g/kg. After 14 d of drug intervention, the effects of total alkaloid of *P. pulchellum* on general condition of rats were observed. ALT and AST levels in serum of rats with ALF were determined, and HE staining was used to observe the effects of total alkaloid of *P. pulchellum* on liver histopathology of rats with ALF. The phosphorylation levels of NF- κ B and I κ B in liver tissues were detected by Western blotting. **Results** Total alkaloid of *P. pulchellum* can decrease ALT and AST in serum ($P < 0.001$). HE staining showed that total alkaloid of *P. pulchellum* can reduce the necrosis of rat liver tissue, and some hyperplasia liver cells can be seen, and inflammatory infiltration can be reduced. Western blotting showed that total alkaloid of *P. pulchellum* can

收稿日期: 2021-11-08

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81803884); 广东省中医药局科研项目 (20191215)

作者简介: 高升, 男, 研究方向为临床医学。E-mail: 2013687011@gzhmu.edu.cn

*通信作者: 欧阳石, 副主任医师, 研究方向是感染性疾病的预防与治疗。E-mail: ouyangshi@gzhmu.edu.cn

#并列第一作者: 余丽娜

inhibit the increase of p-NF- κ B and p-I κ B, and thus inhibit the activation of NF- κ B pathway. **Conclusion** Total alkaloid of *P. pulchellum* may exert its hepatoprotective effect by inhibiting NF- κ B pathway.

Key words: *Phyllodium pulchellum* (Lour.) Desv.; total alkaloid of *P. pulchellum*; acute liver failure; ALT; AST; NF- κ B signaling pathway

急性肝衰竭 (ALF) 病情进展迅速, 是肝病领域最为凶险的危重急症^[1]。中医常依据肝衰竭发病起以身目黄染为其主要症将其归入“黄疸”, 有关记载最早见于《黄帝内经》“湿热相搏……民病黄瘁”, 并提出“阳黄 - 阴黄 - 阴黄”辨证论治模式^[2]。阳黄, 见《伤寒微旨论》: “阳黄证因湿多成热, 热则生黄, 此即所谓湿热证也”。由湿热蕴蒸肝胆, 胆热液泄, 外渗肌肤, 下流膀胱, 而致一身面目及小便尽黄。证见发热烦渴, 身目黄色鲜明如橘子色, 小便色深如浓茶, 伴食欲减退或恶心呕吐, 大便不畅, 腹胀胁痛, 舌质红, 苔黄腻, 脉弦数等。见于疾病初期, 病情较急, 肝细胞炎症反应明显为阳黄; “阴黄”黄色晦暗如烟熏, 脘闷腹胀, 畏寒神疲, 一般病情缠绵, 不易速愈。患者从阳黄转向阴黄, 表明病情加重, 预后往往不佳^[3]。瀑布样的级联炎症反应在肝衰的早期进程中占有重要的地位, 是促进多器官衰竭最重要的发生机制^[4], 也极有可能是肝衰竭从早期阳黄向晚期阴黄转换的节点。核因子 κ B (NF- κ B) 是一种细胞核转录因子, 可介导细胞内免疫炎症反应, 活化后的 NF- κ B 诱导大量炎症因子的合成, 引起炎症风暴^[5]。

中医药在肝衰竭的治疗中, 具有对抗内毒素血症、抑制炎症反应, 提高生存率, 改善临床症状等作用。排钱草为豆科排钱草属植物排钱草 *Phyllodium pulchellum* (Lour.) Desv. 的干燥地上部分, 是民间常用药。药源分布广泛, 易于搜集, 全草含生物碱、酚类、有机酸和氨基酸等成分^[6]。据《中药大辞典》记载其具有清热利湿、活血祛瘀等功效, 民间常用来治疗急慢性肝炎、血吸虫病肝脾肿大等。药理活性及临床研究均显示排钱草总生物碱有较好的抗肝炎及抗肝纤维化作用^[7-8]。基于前期研究发现肝衰竭大鼠阳黄期予以排钱草口服干预, 可显著改善肝功能。本研究旨在探讨排钱草总生物碱的抗肝衰作用及可能作用机制, 为排钱草总生物碱在防止肝衰患者从“阳黄期”向“阴黄期”转换, 提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠, 12 周龄, 体质量 (200 \pm 20) g, 购自广东省实验动物中心, 动物使用许可证号:

SCXK (粤) 2016-0041。实验过程遵循“3R”原则。

1.2 材料及试剂

排钱草购自广州清平药材市场, 经广州医科大学附属第五医院王腾华中药师鉴定为豆科排钱草属植物排钱草 *P. pulchellum* (Lour.) Desv. 的干燥地上部分。D-半乳糖胺 (D-GalN)、脂多糖 (LPS) 购自美国 Sigma 公司; 磷酸化 NF- κ B 和 I κ B (货号 4972)、山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (货号 7079) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 购自正能生物, 货号 380626; SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自雅酶, 货号 PG212; ECL 化学发光液购自碧云天, 货号 P0018FS; 全蛋白提取试剂盒和 BCA 蛋白含量检测试剂盒均购自中国南京凯基生物公司; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 检测试剂盒 (批号 C009-6)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 检测试剂盒 (批号 C010-1-1) 均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验仪器

石蜡切片机 (美国 Optical 公司), 全自动生化分析仪 (美国 Abbott 公司); Western 电泳槽及转膜槽 (美国 Bio-Rad 公司); 化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 排钱草总生物碱提取与制备

采用回流提取法制备排钱草总生物碱^[9]。选取排钱草的干燥地上部分 (900 g) 撵磨成粉, 经 95% 乙醇 (15 L) 回流提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 合并乙醇提液, 浓缩, 浓缩液经 3% 酒石酸酸化所得酸水液, 酸水液用碳酸钠调节至 pH 9 后用醋酸乙酯萃取, 提取排钱草总生物碱, 用蒸馏水配成相当于原生药 0.3 g/mL, 滤过, 备用。采用紫外 - 可见分光光度法测定排钱草总生物碱提取物中总生物碱的含量, 以 5- 甲氧基 - N,N- 二甲基色胺计算不得少于 50.0%。

2.2 ALF 大鼠模型制备

Wistar 大鼠于造模前 12 h 禁食, 正常饮水。ip D-GalN (400 mg/kg) /LPS (10 μ g/kg) 建立 ALF 模型^[10]。根据《肝衰竭诊治指南 (2018 年版)》^[11]中 ALF 组织病理学表现 (肝细胞呈一次性坏死, 可呈大块或亚大块坏死, 或桥接坏死, 伴存活肝细胞严重变性, 肝窦网状支架塌陷或部分塌陷) 诊断标准

来判断 ALF 模型是否建立成功。

2.3 实验动物分组及处理

将 45 只 Wistar 大鼠随机分成 3 组, 每组 15 只。对照组和模型组大鼠均 ig 3 g/kg 生理盐水; 排钱草总生物碱组大鼠 ig 排钱草总生物碱 3 g/kg^[12], 连续 14 d 后尾静脉取血处死。充分暴露腹腔, 分离出肝脏, 洗净, 切取小块放入 10% 甲醛固定液, 常规石蜡包埋; 另一块迅速切碎装入冻存管-80 °C 冻存, 用于 Western blotting 测定。

2.4 排钱草总生物碱对 ALF 大鼠一般情况影响

观察各组大鼠精神状态、食欲、毛色光泽、体重质量等一般情况。

2.5 排钱草总生物碱对 ALF 大鼠血浆中 ALT、AST 水平的影响

取适量血液, 3 500 转/min 离心 5 min, 取上层血浆分装入 EP 管中, 按相应试剂盒说明书方法操作, 测定大鼠血浆中 ALT 和 AST 水平。

2.6 排钱草总生物碱对 ALF 大鼠肝组织病理学的影响

将用 10% 甲醛固定好的肝组织取出, 经常规脱水、透明、石蜡包埋, 在切片机上切成 5 μm 厚度组织片, 进行 HE 染色。切片常规脱蜡冲洗, 苏木素染核, 水洗, 乙醇分化数秒, 流水冲洗 1h, 梯度脱水各 10 min, 镜下观察细胞核蓝色, 伊红染色数秒, 各梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 将透明切片滴上树胶, 盖上盖玻片, 镜检; 低高倍显微镜下对肝组织损伤和炎症浸润程度进行评估。

2.7 排钱草总生物碱对 ALF 大鼠 NF-κB 信号通路相关蛋白表达水平的影响

提取“2.3”项下大鼠肝组织匀浆中的总蛋白, 根据 BCA 试剂盒对蛋白含量进行测定。在电泳槽中的 SDS-PAGE 胶上样, 蛋白凝胶电泳, 结束后转

PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭, 加 NF-κB、Iκβ、p-NF-κB、p-Iκβ 一抗 (稀释倍数 1:1 000) 及 GAPDH 一抗 (稀释倍数 1:5 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后, 二抗室温孵育 2 h, 清洗后显影, 用 Image J 软件对条带进行灰度值分析。

2.8 统计学处理

采用 SPSS 20.0 版软件包及 GraphPad 8.0 版软件完成实验数据统计学处理、统计学相关绘图工作。计量资料间的依照所统计组数按需使用 *T* 检验或单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 ALF 大鼠一般情况影响

对照组大鼠状态良好, 模型组大鼠建模后出现精神萎靡, 活动减少, 饮食明显减少, 反应迟钝。排钱草总生物碱组大鼠精神、活动、食欲等情况较模型组大鼠有不同程度的改善。

3.2 对 ALF 大鼠肝功能的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清中 ALT、AST 水平明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 排钱草总生物碱组大鼠血清中 ALT、AST 水平降低 ($P < 0.001$), 见图 1。光镜下 HE 染色显示, 与对照组相比, 模型组肝细胞呈大块或亚大块坏死, 存活肝细胞严重变性, 肝窦网状支架塌陷或部分塌陷。与模型组比较, 排钱草总生物碱组大鼠肝组织坏死程度减轻, 可见部分增生肝细胞, 炎症浸润减轻。见图 2。

3.3 对 ALF 大鼠 NF-κB 信号通路相关蛋白表达水平的影响

与对照组比较, 模型组 ALF 大鼠 NF-κB 通路中 NF-κB 及 Iκβ 的磷酸化水平明显升高 ($P < 0.01$), 给予排钱草总生物碱干预后明显抑制了 NF-κB 及 Iκβ 的磷酸化 ($P < 0.01$), 见图 3。

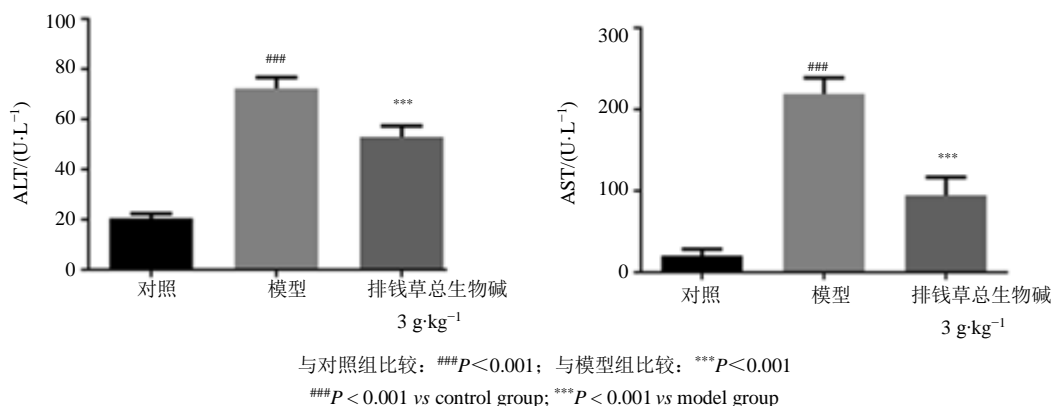


图 1 排钱草总生物碱对 ALF 大鼠血清中 ALT 和 AST 的影响

Fig. 1 Effects of total alkaloid of *P. pulchellum* on ALT and AST in rats with acute liver failure

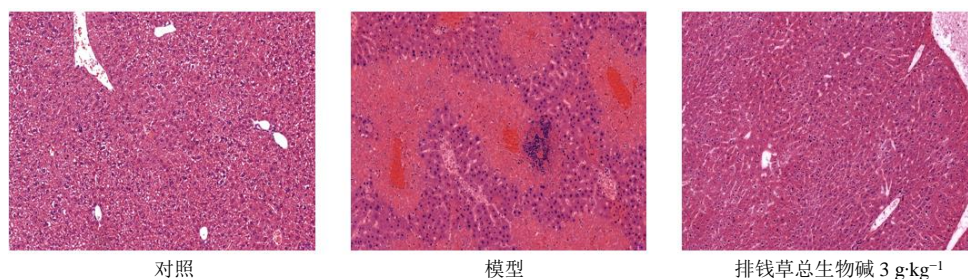


图 2 排钱草总生物碱对 ALF 大鼠肝组织病理学的影响 (HE, ×100)

Fig. 2 Effect of total alkaloid of *P. pulchellum* on liver histopathology in rats with acute liver failure (HE, ×100)

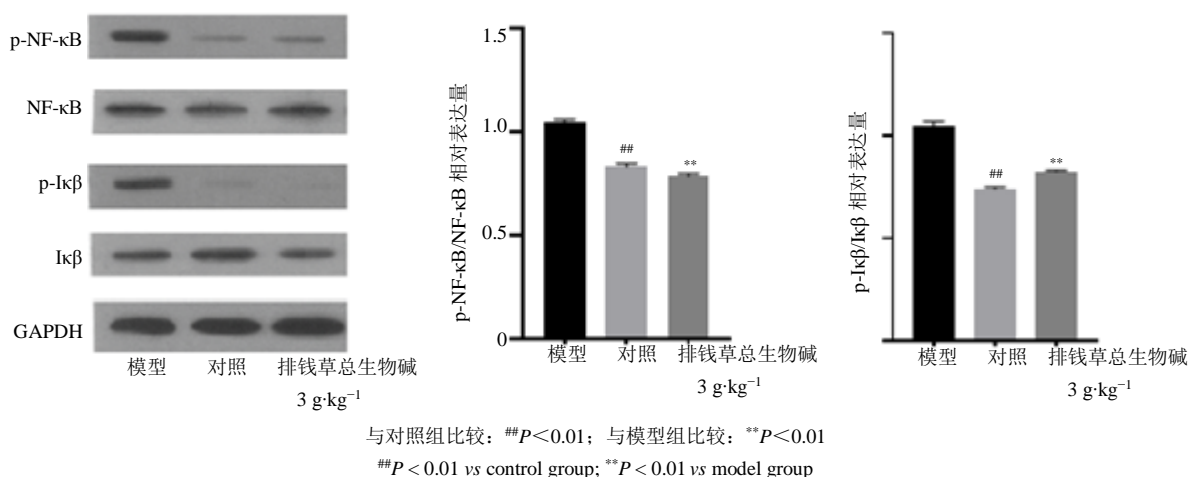


图 3 排钱草总生物碱对 ALF 大鼠肝组织中 NF-κB、IκB 表达的影响

Fig. 3 Effect of *P. pulchellum* on the expression of NF-κB and IκB in liver tissues of ALF rats

4 讨论

ALF 在临床上是一种起病凶险且常既往无相关肝病史的疾病,临床表现主要为严重的肝脏损伤、意识和凝血功能障碍^[13]。肝脏炎症反应的过度激活和大范围的肝细胞坏死是其主要特点,信号通路的活化在此过程中发挥着重要作用,如核因子 E2 相关因子 2 信号通路、信号转导及转录激活因子 3 信号通路及细胞外信号调节激酶 1/2 信号通路的激活参与了 ALF 的发生^[14]。近期研究也发现通过抑制 NF-κB 炎症信号通路可以使白细胞介素 (IL) -1β、IL-6、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 等炎症因子的蛋白表达降低,进而改善小鼠肝组织炎症反应^[15]。Gehrke 等^[16]发现, IL-1 受体抑制剂可使 NF-κB 信号通路下调,从而降低 ALF 小鼠死亡率。Zhong 等^[17]发现,姜黄素可通过抑制 NF-κB 信号通路的磷酸化对抗 D-GlaN/LPS 引起的 ALF。表明 NF-κB 信号通路在 ALF 发生发展过程中起着重要的作用。

目前关于 ALF 的治疗尚无特效药物和手段,主要采取病因和对症支持治疗为主的内科综合治疗。

排钱草具有清热利湿、活血祛瘀等功效,目前国内研究也表明,在大鼠肝纤维化模型中,排钱草表现出抗炎、抗纤维化作用^[18]。本课题组前期研究显示早期对阳黄症肝衰竭大鼠予以排钱草干预,可显著改善肝功能。本研究也表明了排钱草总生物碱干预的 ALF 大鼠,血清 ALT、AST 水平较模型组明显下降,肝组织坏死程度减轻,这表明排钱草总生物碱对于 ALF 大鼠具有潜在的治疗作用。

为了阐明排钱草总生物碱改善 ALF 大鼠的潜在机制,通过 Western blotting 检测了大鼠肝脏 NF-κB、IκB 及 p-NF-κB、p-IκB 的蛋白表达水平,发现 ALF 大鼠的 p-NF-κB、p-IκB 水平明显升高,排钱草总生物碱干预后 p-NF-κB、p-IκB 明显下降。NF-κB 信号通路是调节炎症的重要信号通路之一,在细胞中通常以 p65 及 p50 组成的二聚体形式存在,静息时与 IκB 结合,当受到 LPS、IL-1 等刺激时,IκB 磷酸化,释放 NF-κB,使之恢复转录活性并从细胞质转移到细胞核内,从而调节炎症相关基因的表达。在许多疾病中如自身炎症性疾病、恶性肿瘤和急性

呼吸窘迫综合征等中都发现 NF- κ B 异常激活。一些研究表明,在药物及手术所致的 ALF 模型中,NF- κ B 的激活能增加炎症介质的释放和肝细胞的凋亡,减轻 NF- κ B 通路的激活可以明显改善预后^[19]。这表明 NF- κ B 通路在 ALF 大鼠中有着重要的作用,排钱草总生物碱可能通过抑制 NF- κ B、I κ B 的磷酸化来抑制 NF- κ B 通路的激活,从而减轻肝脏炎症,减少肝细胞损伤来发挥肝保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang T, Sun K, Wang Y, *et al.* Disruption of the gut-liver axis in the pathogenesis of acute-on-chronic liver failure [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 30(2): 130-135.
- [2] 谭年花, 陈斌, 彭杰, 等. 乙肝相关性慢加急性肝衰竭“阳黄-阴黄-阴黄”不同证候分型患者 Treg/Th17 的表达 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 33-38.
- [3] 孙克伟, 陈斌, 黄裕红, 等. 慢性乙型重型肝炎不同黄疸证的临床特点研究 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(1): 8-11.
- [4] 王挺帅, 王娜, 张荣臻, 等. 免疫反应与炎症损伤在肝衰竭发病机制中的作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(6): 1415-1419.
- [5] 党翠. PPAR γ 、NF- κ B 及 COX-2 在大鼠肝损伤模型中的表达及法医学意义 [D]. 太原: 山西医科大学, 2013.
- [6] 范亚楚, 郭中龙, 信兰婷, 等. 排钱草化学成分的研究 [J]. 中成药, 2017, 39(6): 1195-1198.
- [7] 段桂姣, 蒋锐沅, 王振常. 中药抗肝纤维化作用机制的研究进展 [J]. 中医药导报, 2020, 26(5): 113-117.
- [8] 钟鸣, 张宝璟, 王超, 等. 排钱草生物碱对乙醛刺激的人源肝星状细胞增殖及细胞外基质的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(1): 4-7.
- [9] 杨帆. 山豆根生物碱成分的提取分离及抗氧化、抗肿瘤活性研究 [D]. 长春: 长春师范学院, 2012.
- [10] 王凤玲. 大黄素对急性肝衰竭大鼠 NF- κ B 信号通路的调控作用的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2018, 26(9): 543-549.
- [11] 肝衰竭诊治指南 (2018 年版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(1): 38-44.
- [12] 钟鸣, 黄琳芸, 余胜民, 等. 排钱草对大鼠实验性肝纤维化的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 1999(4): 22-24.
- [13] Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, *et al.* Acute liver failure [J]. *Lancet*, 2010, 376(9736): 190-201.
- [14] 刘亨晶, 李初谊, 王盼, 等. 异甘草酸镁通过 ERK1/2 信号通路对大鼠急性肝衰竭保护机制的初步研究 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2021, 30(6): 671-675.
- [15] 黄鹤鸣, 刘彦君, 付荣, 等. BET 抑制剂(+)JQ1 通过调节 NF- κ B 信号通路保护小鼠急性肝衰竭实验研究 [J]. 实用肝病杂志, 2020, 23(6): 781-784.
- [16] Gehrke N, Hövelmeyer N, Waisman A, *et al.* Hepatocyte-specific deletion of IL1-RI attenuates liver injury by blocking IL-1 driven autoinflammation [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(5): 986-995.
- [17] Zhong W, Qian K, Xiong J, *et al.* Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF- κ B related signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 302-313.
- [18] 陈少锋, 赵湘培, 余胜民, 等. 排钱草总生物碱对大鼠肝星状细胞相关细胞因子蛋白表达的影响 [J]. 广西医学, 2018, 40(2): 174-176.
- [19] Yang F, Li X, Wang L K, *et al.* Inhibitions of NF- κ B and TNF- α result in differential effects in rats with acute on chronic liver failure induced by D-Gal and LPS [J]. *Inflammation*, 2014, 37(3): 848-57.

[责任编辑 金玉洁]