

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.10.004

染料木素磺酸钠对慢性肝损伤小鼠肝功能及肝组织 $\alpha 7nAChR$ 和 IL-1 β 蛋白表达的影响*

李小花,黎 晓,万群雄,李 和,李良东,黄志华[△],曾 靖
(赣南医学院基础医学院,江西赣州 341000)

[摘要] **目的** 观察染料木素磺酸钠(GSS)对小鼠慢性肝损伤的保护作用,以及其对肝组织 $\alpha 7$ 尼古丁受体($\alpha 7nAChR$)和白细胞介素 1 β (IL-1 β)蛋白表达的影响。**方法** 取 SPF 级雄性昆明种小鼠 60 只分成 5 组,分别为对照组、模型组、GSS 低剂量组、GSS 高剂量组及阳性药物组,每组 12 只。除对照组外其余 4 组采用腹腔注射 10% 四氯化碳(CCl_4),体积为 0.1 mL/10 g,持续 6 周,制备小鼠慢性肝损伤动物模型。同时 GSS 高、低剂量组分别灌胃给予不同剂量的 GSS(0.30、0.10 mg/kg),阳性药物组给予联苯双酯 2.50 mg/kg,对照组及模型组给予等体积生理盐水,连续 6 周。测定小鼠血清 AST 及 ALT 活性,并计算 AST/ALT 比值;Western blot 方法检测 $\alpha 7nAChR$ 、IL-1 β 蛋白表达水平。**结果** 模型组小鼠血清 ALT、AST 水平较对照组升高($P < 0.05$),肝组织 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达水平降低($P < 0.01$),IL-1 β 的表达水平升高($P < 0.05$);经 GSS 治疗后,血清 AST、ALT 水平明显低于模型组($P < 0.05$), $\alpha 7nAChR$ 表达水平升高($P < 0.01$),IL-1 β 表达水平降低($P < 0.05$)。**结论** GSS 可升高损伤的肝组织 $\alpha 7nAChR$ 的表达,激活胆碱能抗炎通路,从而减少致炎细胞因子的表达,可通过抑制炎症反应对抗小鼠慢性肝损伤。

[关键词] 染料木素磺酸钠;慢性肝损伤; $\alpha 7$ 尼古丁受体;白细胞介素 1 β

[中图分类号] R392.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)10-1308-03

Effects of genistein sodium sulfonate on liver function and liver tissue $\alpha 7nAChR$ and IL-1 β expression in mice chronic hepatic injury*

Li Xiaohua, Li Xiao, Wan Qunxiong, Li He, Li Liangdong, Huang Zhihua[△], Zeng Jing
(College of Basic Medicine, Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the protective effects of genistein sodium sulfonate(GSS) on mice chronic hepatic injury induced by carbon tetrachloride(CCl_4) and its influence on the protein expression of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor($\alpha 7nAChR$) and interleukin-1 beta (IL-1 β) in liver tissue. **Methods** 60 SPF grade male Kunming mice were randomly divided into 5 groups, including the control group, model group, low and high doses GSS groups, and positive control group, 12 cases in each group. Except for the control group, the other 4 groups were intra peritoneally injected by 10% CCl_4 with a volume of 0.1 mL/10 g for 6 weeks. The mice chronic liver injury was prepared. At the same time, the high and low doses DSS groups were given the different doses of GSS(0.30, 0.10 mg/kg), the positive control group was given bifendate(DDB, 2.5mg/kg), the control group and the model group were given the equal volume of normal saline for 6 consecutive weeks. The AST and ALT activity was detect and the ratio of ALT/AST was calculated; the Western blot method was used to detect the expression levels of $\alpha 7nAChR$ and IL-1 β protein in liver. **Results** The serum levels of ALT and AST in the model group were increased obviously, and the expression level of $\alpha 7nAChR$ in the liver tissue was decreased, while the expression level of IL-1 β was increased; after the GSS treatment, the serum AST and ALT levels were significantly lower than those in the model group($P < 0.05$), while the expression level of $\alpha 7nAChR$ was increased ($P < 0.01$) and the expression level of IL-1 β was decreased($P < 0.05$). **Conclusion** GSS might increase the expression of $\alpha 7nAChR$ in injured liver tissue, activates the cholinergic anti-inflammatory pathway, thus decreases the expression of inflammatory cytokines and antagonizes the mice chronic liver injury by inhibiting the inflammatory reaction.

[Key words] genistein sodium sulfonate; chronic hepatic injury; $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor; interleukin-1beta

肝脏疾病是消化系统疾病死亡的重要原因,近年来各地发病率及病死率明显上升,目前临床上缺乏特效治疗药物,研究该类药物具有重要意义。染料木素为植物雌激素的一种,化学结构与雌二醇相似,能与雌激素细胞膜及细胞内受体结合发挥作用,如抗肿瘤作用、神经保护作用、调节骨代谢与脂代谢、心脑血管保护及抗氧化等作用^[1-7]。但考虑染料木素难溶于水,生物利用度低,势必影响其临床应用和药物开发,因此,课题组参照索志荣等^[8]的方法,对染料木素进行磺化,合成了染料木素磺酸钠(genistein sodium sulfonate, GSS),分子式: $C_{15}H_{10}O_8SNa$,为白色结晶粉末。课题组前期研究证实 GSS 对脑缺血再灌注损伤起保护作用^[9]。本实验通过建立小鼠慢性肝损

伤模型,进一步研究 GSS 对肝损害的保护作用及其对胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway, CAP)的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级昆明小鼠 60 只,体质量 20~25 g,雄性,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号: SCXK(湘)2011-003,合格证号: 4304701590。适应性饲养 7 d,自由进食和饮水。温度 18~20 °C,自由光照,相对湿度 50%~60%,持续通风换气。

1.1.2 药物与试剂 GSS 购自天习化工有限公司,用生理盐

水配成所需浓度;联苯双酯滴丸购自北京协和药厂(批号:12060105);四氯化碳(CCl₄)分析纯,江西洪都试剂化工厂生产(批号:011224),临用前与精制植物油混合配成 10%(W/W)的 CCl₄ 植物油溶液;AST(货号:CH0101202)及 ALT 检测试剂盒购自四川迈克生物科技有限公司(批号:CH0101201); β -actin 一抗(Ta-09)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(ZB-2303)及山羊抗鼠 IgG(ZB-2305)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; $\alpha 7$ 尼古丁受体($\alpha 7nAChR$)(sc-5544)及白细胞介素 1 β (interleukin-1beta,IL-1 β)(sc-7884)一抗购自 Santa Cruz 公司;BSA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京天根生化科技有限公司(J8830/M2114);化学发光试剂盒(1856135/1856136)购自 Thermo Fisher 公司。

1.1.3 仪器 7600-020 型全自动生化分析仪购自日本日立公司;Universal Hood II 型多功能酶标仪、3001 型超高灵敏度化学成像发光仪、Trans-blot 转印槽及小型垂直电泳槽购自美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药 将 60 只小鼠分成 5 组,分别为对照组、模型组、GSS 低剂量组、GSS 高剂量组及阳性药物组,每组 12 只。参考文献[10]的方法制作小鼠慢性肝损伤模型,除对照组外均腹腔注射 10% CCl₄ 油溶液 0.10 mL/10 g,每周 2 次,持续 6 周。同时 GSS 高、低剂量组分别灌胃给予不同剂量的 GSS(0.30、0.10 mg/kg),阳性药物组给予联苯双酯 2.50 mg/kg,对照组及模型组给予等体积的生理盐水,连续 6 周。

1.2.2 肝功能生化检测 小鼠末次给药后,禁食 12 h,摘眼球取血,分离血清,按试剂盒说明,用全自动生化分析仪检测血清 ALT 和 AST 水平。

1.3 Western blot 方法检测 $\alpha 7$ 尼古丁受体($\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, $\alpha 7nAChR$)和 IL-1 β 蛋白表达水平 为探讨 GSS 对慢性肝损伤的保护机制,选择对照组、模型组、GSS 高剂量组肝组织进行检测。取 20 mg 肝组织于 1.5 mL 离心管中,加入 200 μ L 裂解液,捣碎后,再加入 400 μ L 裂解液,置于 4 $^{\circ}$ C 颠倒混匀 1 h。1 100 r/min,4 $^{\circ}$ C,离心 5 min。取上清液 BCA 法行蛋白定量。取 50 μ g 总蛋白,加入上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C,5 min 蛋白变性后,于 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白。将凝胶上的蛋白转印到醋酸纤维素膜上,3%~5%的牛奶室温封闭 1 h。 $\alpha 7nAChR$ 或 IL-1 β 一抗孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜。二抗室温孵育 1 h。将化学发光试剂盒中的两种试剂按 1:1 比例混合,混匀后,在暗室中与硝酸纤维素膜摇动孵育 1 min,于超高灵敏度化学成像发光仪照相,并计算灰度值。

1.3 统计学处理 应用 Prism5.0 统计学软件进行统计学分析。各测量指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间各测定指标的总体比较采用单因素方差分析,组内各指标的多重比较采用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 ALT 和 AST 水平比较 与对照组比较,模型组小鼠血清 ALT 及 AST 水平均明显升高($P < 0.05$),提示肝损伤模型制作成功;经 GSS 治疗后,血清 ALT 及 AST 水平均降低($P < 0.05$),与阳性药物组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);阳性药物组 AST/ALT 较模型组升高,GSS 高、低剂量组 AST/ALT 与阳性药物组比较,明显降低($P < 0.05$),见表 1。

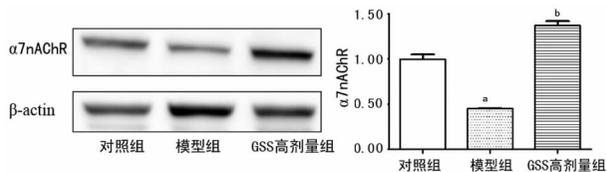
2.2 对照组、模型组及 GSS 高剂量组小鼠肝组织 $\alpha 7nAChR$ 和 IL-1 β 蛋白表达水平比较 与对照组比较,模型组肝组织

$\alpha 7nAChR$ 蛋白表达水平降低($P < 0.01$),IL-1 β 表达水平升高($P < 0.05$);与模型组比较,GSS 高剂量组肝组织 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达水平升高($P < 0.01$),IL-1 β 表达水平降低($P < 0.05$),见图 1、2。

表 1 各组小鼠血清 ALT 和 AST 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

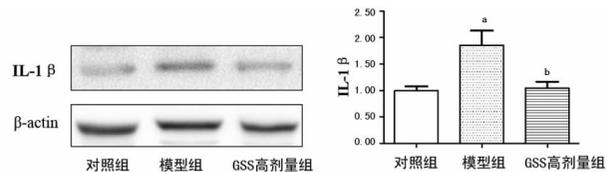
组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	AST/ALT
对照组	55.45 \pm 11.14	235.63 \pm 36.88	4.33 \pm 0.68
模型组	75.46 \pm 18.71 ^a	345.45 \pm 75.97 ^b	4.14 \pm 0.82
阳性药物组	56.00 \pm 18.12 ^d	255.27 \pm 57.56 ^d	4.93 \pm 0.57 ^c
GSS 低剂量组	69.09 \pm 16.99	244.40 \pm 46.25 ^d	3.79 \pm 0.99 ^f
GSS 高剂量组	64.88 \pm 17.94 ^c	248.11 \pm 43.32 ^d	3.97 \pm 0.68 ^e

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$ 与对照组比较;^c: $P < 0.05$,^d: $P < 0.01$,与模型组比较;^e: $P < 0.05$,^f: $P < 0.01$ 与阳性药物组比较。



^a: $P < 0.01$,与对照组比较;^b: $P < 0.01$,与模型组比较。

图 1 各组小鼠肝组织 $\alpha 7nAChR$ 蛋白表达水平比较



^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

图 2 各组小鼠肝组织 IL-1 β 蛋白表达水平比较

3 讨论

肝脏是人体最大的实质性器官,担负消化、解毒、分泌和生物合成功能,其功能障碍直接影响人体健康,甚至危及生命。肝病的发病机制较为复杂,涉及炎症反应、免疫功能紊乱、代谢障碍、自由基损害及质膜损伤等多个生理病理过程。CCl₄ 致肝损伤动物模型是研究护肝药最常用的模型。CCl₄ 在肝微粒体细胞色素 P450 代谢生成氧自由基,这些自由基攻击肝细胞膜上的磷脂分子,使细胞膜发生脂质过氧化,继而与细胞内蛋白质大分子发生共价结合。细胞膜结构完整性遭到破坏,细胞膜的通透性增加,细胞质内酶类渗入到血液中,同时细胞外水分进入细胞内,使肝细胞发生气球样变等,严重时可导致细胞坏死,更多的酶类释放进入血液。因此,血清转氨酶升高,在一定程度上反映了肝细胞损伤和坏死的程度。在轻、中度肝损伤时,以 ALT 升高为明显,ALT 升高远大于 AST 升高;当严重肝细胞损伤时,线粒体受损,可导致线粒体内的酶被释放入血,此时 AST 升高更为明显,血清中 AST/ALT 比值升高。在实验中,CCl₄ 肝损伤模型小鼠血清 AST 及 ALT 水平均显著升高,但 AST/ALT 比值变化不明显,提示肝损伤更为严重。经 GSS 治疗后,血清 AST 和 ALT 水平均降低,说明 GSS 对 CCl₄ 诱导的慢性肝损伤有保护作用。

2000 年,Borovikova 等^[11]发现,神经系统通过迷走神经及其递质乙酰胆碱能够显著、快速地抑制炎症反应细胞释放细胞因子,减轻全身性炎症反应。这一生理机制称作 CAP。胆碱能信号调节异常参与多种炎症反应紊乱(如 AD、脑出血和败血症等)^[12]。刺激外周迷走神经及应用胆碱能递质乙酰胆碱(Acetylcholine, Ach)或拟胆碱药物烟碱能抑制实验性炎症反应,显著降低细胞因子如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的释放^[13]。

$\alpha 7nAChR$ 是 CAP 中的关键受体,它的兴奋介导了大部分的 ACh 在免疫系统中的效应^[14]。IL-1 β 具有广泛的生物作用,可通过自分泌或旁分泌影响其他细胞因子和炎症介质的分泌,诱导抗原递呈细胞表面免疫分子的表达;其作为 T 细胞和 B 细胞的激活和分化因子,可介导免疫球蛋白的分泌、激活补体、杀伤细胞和吞噬细胞,增强由细胞免疫和体液免疫反应介导的组织损伤^[15]。在药物诱导大鼠肝损伤模型中 IL-1 β 高表达,应用护肝药物后可抑制 IL-1 β 表达^[16],从而达到护肝作用。本实验结果显示,GSS 高剂量组 $\alpha 7nAChR$ 受体表达较模型组明显升高,而 IL-1 β 水平明显降低,提示 GSS 可激活 CAP,从而减少致炎细胞因子如 IL-1 β 的表达,通过抑制炎症反应对抗 CCL₄ 诱导的小鼠慢性肝损伤。

参考文献

- [1] Lin AH, Leung GP, Leung SW, et al. Genistein enhances relaxation of the spontaneously hypertensive rat aorta by transactivation of epidermal growth factor receptor following binding to membrane estrogen receptors- α and activation of a G protein-coupled, endothelial nitric oxide synthase-dependent pathway[J]. *Pharmacol Res*, 2011, 63(3):181-189.
 - [2] Ono M, Koga T, Ueo H, et al. Effects of dietary genistein on hormone-dependent rat mammary carcinogenesis induced by ethyl methanesulphonate[J]. *Nutr Cancer*, 2012, 64(8):1204-1210.
 - [3] Park YJ, Jang Y, Kwon YH. Protective effect of isoflavones against homocysteine-mediated neuronal degeneration in SH-SY5Y cells[J]. *Amino Acids*, 2010, 39(3):785-794.
 - [4] Li YQ, Xing XH, Wang H, et al. Dose-dependent effects of genistein on bone homeostasis in rats' mandibular subchondral bone[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(1):66-74.
 - [5] Choi JS, Song J. Effect of genistein on insulin resistance, renal lipid metabolism, and antioxidative activities in ovariectomized rats[J]. *Nutrition*, 2009, 25(6):676-685.
 - [6] 薛进华, 睦荣燕, 黄静瑶, 等. 脑缺血再灌注损伤时细胞因子的改变及染料木素的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(22):191-195.
 - [7] Babu PV, Si H, Fu Z, et al. Genistein prevents hyperglycemia-induced monocyte adhesion to human aortic endothelial cells through preservation of the cAMP signaling pathway and ameliorates vascular inflammation in obese diabetic mice[J]. *J Nutr*, 2012, 142(4):724-730.
 - [8] 索志荣, 张尊听, 郑建斌, 等. 染料木素磺酸钠制备及其抗脂质过氧化作用[J]. *应用化学*, 2005, 22(10):1083-1086.
 - [9] 钟星明, 黄志华, 龚衍, 等. 染料木素磺酸钠对脑缺血再灌注损伤的保护作用及 DREAM 和 PSD95 的表达变化[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 30(8):697-699.
 - [10] 宋敏, 于季军, 杨丹彤, 等. 菟丝子黄酮对慢性肝损伤保护作用的研究[J]. *湖南农业科学*, 2010, 40(23):151-153.
 - [11] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin[J]. *Nature*, 2000, 405(6785):458-462.
 - [12] Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway in intracerebral hemorrhage[J]. *Brain Res*, 2010(1309):164-171.
 - [13] Tracey KJ. Reflex control of immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(6):418-428.
 - [14] Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation[J]. *Lett Nature*, 2003, 421(23):84-388.
 - [15] Glasgow SC, Ramachandran S, Csontos KA, et al. Interleukin-1 beta is prominent in the early pulmonary inflammatory response after hepatic injury[J]. *Surgery*, 2005, 138(1):64-70.
 - [16] 陈盛, 何念海, 罗则佳, 等. 内毒素诱导 D-半乳糖胺致敏大鼠急性肝损害相关指标的动态观察[J]. *重庆医学*, 2013, 42(6):651-654.
- (收稿日期:2014-11-15 修回日期:2014-12-20)
-
- (上接第 1307 页)
- 版, 2008, 18(5):446-447.
- [9] Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, et al. The Wilms' tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes[J]. *Leukemia*, 1999, 13(3):393-399.
 - [10] Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia[J]. *Blood*, 2003, 101(5):1698-1704.
 - [11] 郑晓珂, 曹新伟, 冯卫生, 等. 金钗石斛的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2005, 14(7):826-829.
 - [12] 李小琼, 金徽, 葛晓军, 等. 金钗石斛多糖对脂多糖诱导的小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α · NO 的影响[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(28):13634-13635.
 - [13] 陶凤, 金徽, 杨贵忠, 等. 金钗石斛水提物对糖尿病大鼠肾组织非酶糖基化及氧化的影响[J]. *山东大学学报:医学版*, 2012, 50(10):50-55.
 - [14] 付书婕, 王乃平, 黄仁彬. 植物多糖免疫调节作用的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(1):99-101.
 - [15] Weisser M, Kern W, Rauhut S, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2005, 19(8):1416-1423.
 - [16] Tamaki H, Mishima M, Kawakami M, et al. Monitoring minimal residual disease in leukemia using real-time quantitative polymerase chain reaction for Wilms tumor gene (WT1) [J]. *Int J Hematol*, 2003, 78(4):349-356.
 - [17] 赵谢兰, 雷瑚仪, 高欣, 等. 急性髓性白血病骨髓细胞 NF- κ B 活性及其与 WT1 和 Bcl-2 表达的关系[J]. *中国医师杂志*, 2006, 8(7):880-882.
 - [18] Chabbert-Buffer N, Bouchard P. The normal human menstrual cycle[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2002, 3(3):173-183.
- (收稿日期:2014-10-18 修回日期:2014-12-15)