

水飞蓟素抑制大鼠酒精性脂肪肝库普弗细胞 NF- $\kappa$ B 活性的研究高学梅<sup>1</sup> 洪汝涛<sup>1</sup> 李俊<sup>2</sup> 胡奇珍<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨水飞蓟素抑制酒精性脂肪肝库普弗细胞(KCs)核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活性及与酒精性脂肪肝的关系。方法 45只大鼠随机分为4组:正常组9只,模型组12只,水飞蓟素低、高剂量组各12只,采用酒精灌胃8周制造酒精性脂肪肝模型,HE染色观察肝脏病理组织学改变,联合酶离体灌注消化,Nycodenz密度梯度离心提取肝脏KCs,ELISA法检测其培养上清液白介素-6(IL-6)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)含量,RT-PCR法检测各组大鼠肝脏KCs NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达。结果 与正常组比较,模型组肝细胞可见明显脂肪变性,肝细胞肿胀明显( $P < 0.01$ )。与模型组比较,水飞蓟素各组肝组织病理变化程度均明显减轻( $P < 0.01$ )。ELISA法显示低、高剂量水飞蓟素组IL-6水平显著低于模型组( $P < 0.01$ ),ICAM-1水平在低、高剂量组也低于模型组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。RT-PCR显示低、高剂量水飞蓟素组NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达显著低于模型组( $P < 0.01$ )。结论 水飞蓟素抑制肝脏KCs NF- $\kappa$ B及其基因产物的表达,提示水飞蓟素抑制酒精性脂肪肝进展可能与此有关。

**关键词** 核转录因子- $\kappa$ B;水飞蓟素;脂肪肝;酒精性;细胞间黏附分子-1;白介素-6

中图分类号 R 575.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1242-04

目前认为在酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)早期的发展阶段,活化的肝脏库普弗细胞(kupffer cells, KCs)发挥了至关重要的作用<sup>[1]</sup>。核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是一种重要的转录因子,其活化可以增强促炎细胞因子的转录,免疫反应早期以及炎症反应各阶段的许多分子都受NF- $\kappa$ B的调控<sup>[2]</sup>。大量异常炎性因子的产生在ALD的发病机制中起着重要的作用,而NF- $\kappa$ B是重要的中间环节,控制NF- $\kappa$ B的活性可以很好的控制肝脏的炎症损害,可作为有效的治疗靶点<sup>[3]</sup>。水飞

蓟素是一种生物类黄酮,具有强力抗氧化性及广泛的药理作用。有文献<sup>[4]</sup>报道其可能有保护酒精性脂肪肝的作用,但其具体的作用机制仍不十分明了,该研究探讨水飞蓟素对肝脏KCs NF- $\kappa$ B活性的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康雌性普通SD大鼠,体重350~400g,由安徽医科大学实验动物中心提供,标准环境适应饲养1周,给予正常饮食。

**1.2 试剂与仪器** 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);电子天平(德国Sartorius公司);37℃恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);氧气罐(上海容华高压容器有限公司);蠕动泵(保定创锐泵业有限公司);4℃离心机(德国Eppendorf公司);37℃恒温培养箱(北京福意有限公司);光学显微镜、倒置显微镜(日本Olympus公司);ELISA试剂盒、TRIzol、RT-PCR的试剂盒、DNA Marker、Taq酶、核酸染料(日本TaKaRa公司)。

**1.3 造模** 45只大鼠随机分为4组:正常组(9只)、模型组(12只)、水飞蓟素低剂量组(12只)、水飞蓟素高剂量组(12只)。模型组、水飞蓟素组大鼠给予40%(v/v)、8g/(kg·d)乙醇灌胃,每天第1次上午九点灌胃,第2次间隔8~9h,灌胃至4周末,自5周开始,将乙醇浓度增至50%(v/v),9g/(kg·d),同前分2次灌胃,至8周末。水飞蓟素低、高剂量组在每天早上灌胃酒精后2h给予水飞蓟素100、200mg/kg灌胃至8周末。

**1.4 病理学检测** 取肝左叶相同部位约1g,用10%中性甲醛固定,石蜡包埋,HE染色后于光学显微镜下观察肝组织病理学改变。判断标准如下:0级(正常的肝细胞),1级(<25%肝细胞出现脂肪变性),2级(25%~50%肝细胞出现脂肪变性),3级(51%~75%肝细胞出现脂肪变性),4级(>75%肝细胞出现脂肪变性)<sup>[5]</sup>。

**1.5 大鼠肝脏KCs的分离纯化** 大鼠禁食麻醉后,消毒,分离出肝门静脉,门静脉插管后,预温37℃的D-Hanks液以30ml/min的速度通过导管灌注肝脏,边灌注边剪开下腔静脉,待下腔静脉流出的液

2014-01-15 接收

基金项目:安徽省年度科研计划项目(编号:10020503084)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院消化内科,安徽省消化疾病重点实验室,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:高学梅,女,硕士研究生;

洪汝涛,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:hongrutaoah@aliyun.com

体变清时,开始以流速 75 ml/min 酶灌流液灌注,待肝变软呈土黄色,龟裂状,压之凹陷不易恢复时即停止灌注。分离肝脏,加 20 ml 肝组织消化液于培养皿中消化,然后在 37 °C 恒温培养箱中消化 30 min。细胞悬液通过 200 目滤网过滤,离心(2 000 r/min 5 min 4 °C)后,加 Hanks 液重悬细胞,与 18% Nycodenz 以 1:2 比例充分混匀,移入离心管中,再上浮 1 ml 的 Hanks,进行密度梯度离心(3 500 r/min 20 min 4 °C),KCs 处于界面的下面。用尖嘴吸管吸取界面下的细胞,在 RPMI-1640 培养液中悬浮,离心(2 000 r/min 10 min 4 °C),洗去 Nycodenz,将细胞沉淀重悬于含 10% 小牛血清的 1640 培养液,移入培养瓶,置 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 30 min,计数,以 1 × 10<sup>6</sup>/ml 细胞浓度接种于新培养瓶中培养 24 h 后洗去未贴壁的细胞,即可获得纯化的大鼠 KCs<sup>[6]</sup>。

## 1.6 KCs 鉴定

**1.6.1 细胞形态学观察** 在倒置显微镜下对培养的 KCs 进行观察。

**1.6.2 吞噬功能实验** 加入微量高温消毒的碳素墨水于 KCs 培养液中,6 h 后在倒置显微镜下观察。

**1.7 ELISA 法检测 KCs 培养的上清液中白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 含量** 收集培养板内的细胞培养液,-80 °C 保存待测,按试剂盒说明操作,ELISA 法检测 IL-6、ICAM-1 含量。

**1.8 RT-PCR 法检测大鼠肝脏 KCs 中的 NF-κB 含量** 培养 KCs 2 d 后加入 TRIzol 试剂 1 ml 裂解细胞,收集细胞裂解液,氯仿提取,异丙醇沉淀,用 DEPC 处理水回收总 RNA,使用紫外分光光度仪检测 RNA 浓度,将总 RNA 逆转录成 cDNA 后进行扩增,PCR 反应条件如下:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 20 s,共 30 个循环。循环结束,最后 72 °C 延伸 10 min,降至 4 °C 结束反应,引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列: NF-κB P65 上游 5'-ATCTGTTTCCCCT-CATCTTTCC-3',下游 5'-TGCCTCTTAGTGGTATCT-GTGC-3'; β-actin 上游:5'-TGGAATCCTGTGGCATC-CATGAAAC-3',下游:5'-TAAAACGCAGCTCAGTAA-CAGTCCG-3'。将 5 μl 的 PCR 产物在琼脂糖凝胶中电泳后再用凝胶成像系统摄影。比较目的基因与 β-actin 条带的灰度值,分析目的基因的表达水平。

**1.9 统计学处理** 运用 SPSS 16.0 进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,等级资料(病理分级)采用

Ridit 分析进行统计学处理,计量资料采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间比较采用 LSD 方法检验。

## 2 结果

**2.1 肝脏病理学改变** 光镜下可见正常组肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,肝小叶内偶见脂肪变性的肝细胞,肝细胞无坏死,无炎症细胞浸润,整个肝脏无明显病理改变。模型组肝细胞可见明显脂肪变性,肝细胞肿胀明显,胞质内出现弥漫性的圆形脂滴,肝小叶界限模糊,肝小叶内散见肝细胞点状坏死,汇管区可见炎症细胞浸润。与水飞蓟素各剂量组肝细胞肿胀显著减轻,脂肪变性、炎症细胞浸润及坏死程度均降低,肝组织病理变化程度明显减轻。

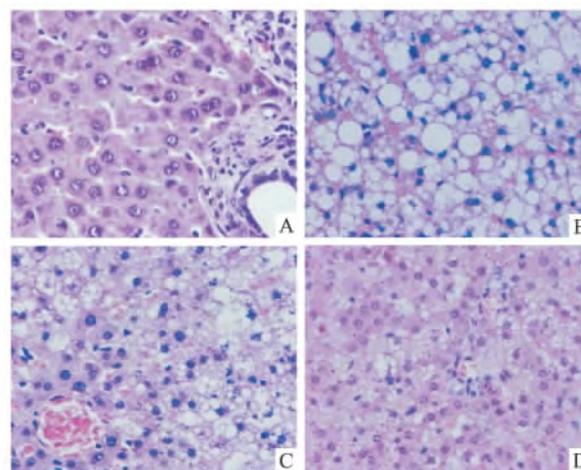


图1 各组大鼠肝脏病理学改变 HE × 400

A: 正常组; B: 模型组; C: 水飞蓟素低剂量组; D: 水飞蓟素高剂量组

表1 水飞蓟素对大鼠脂肪肝组织病理变化的影响 (n=8)

组别	脂肪肝的病理分级					U 值
	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	
正常	6	2	0	0	0	8.367**
模型	0	0	3	4	1	-
水飞蓟素低剂量	1	3	4	0	0	3.789**
水飞蓟素高剂量	1	4	3	0	0	4.243**

$P < 0.05$  表明  $U > 1.96$ ;  $P < 0.01$  表明  $U > 2.58$ ; 与模型组比较: \*\*  $P < 0.01$

**2.2 大鼠 KCs 鉴定** 本实验分离得到的 KCs 以培养基稀释后用 0.4% 的台盼蓝染色计数,每鼠肝可得到 (7 ~ 10) × 10<sup>6</sup> 个细胞,细胞存活率达 90%,吞噬墨汁实验检测细胞纯度达 95%。原代培养过程

中,新分离的 KCs 呈折光性很强的圆球形,形态、大小基本一致,悬浮于培养基中;约 30 min 后,KCs 贴壁,细胞呈扁圆形,变薄,边界开始变得模糊,见图 2。4~6 h 后,细胞开始伸展,体积增大,呈扁圆形;之后细胞逐渐伸展出现伪足,细胞核多呈肾形,细胞质透明,可见吞噬颗粒,48 h 时细胞伸展呈现典型的星形及多角形。

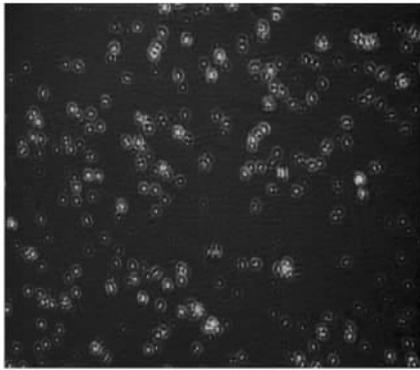


图 2 培养 30 min 后贴壁的 KCs ×200

**2.3 ELISA 法检测 KCs 培养的上清液中 IL-6、ICAM-1 含量** 从图 3 可以看出:方差分析结果显示 IL-6 水平差异有统计学意义 ( $F = 18.48$ ),与正常组相比,模型组细胞培养上清液中 IL-6 含量明显升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比,水飞蓟素低、高剂量组细胞培养液中 IL-6 含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。从图 3 可以看出:方差分析结果显示 ICAM-1 水平差异有统计学意义 ( $F = 22.29$ ),与正常组相比,模型组细胞培养液中 ICAM-1 含量明显升高 ( $P < 0.01$ ),与模型组相比,水飞蓟素低、高剂量组细胞培养液中 ICAM-1 含量明显下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

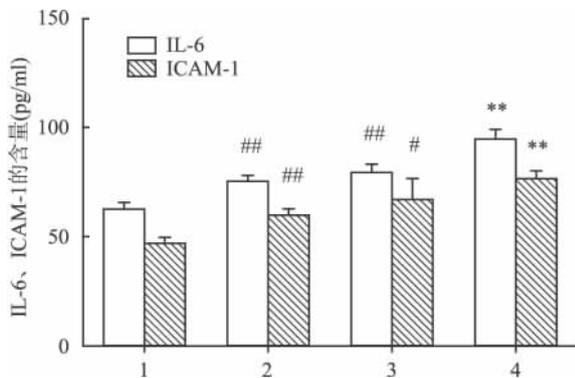


图 3 KCs 培养的上清液中 IL-6、ICAM-1 含量

1:正常组;2:水飞蓟素高剂量组;3:水飞蓟素低剂量组;4:模型组;与正常组比较: \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.4 RT-PCR 法检测大鼠肝脏 KCs NF-κB p65**

**mRNA 表达** 方差分析结果显示 NF-κB p65 mRNA 表达水平差异有统计学意义 ( $F = 51.96$ ),与正常组相比,模型组肝脏 KCs NF-κB p65 mRNA 表达显著增强 ( $P < 0.01$ ),水飞蓟素低、高剂量组较模型组肝脏 KCs NF-κB p65 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ),见图 4。

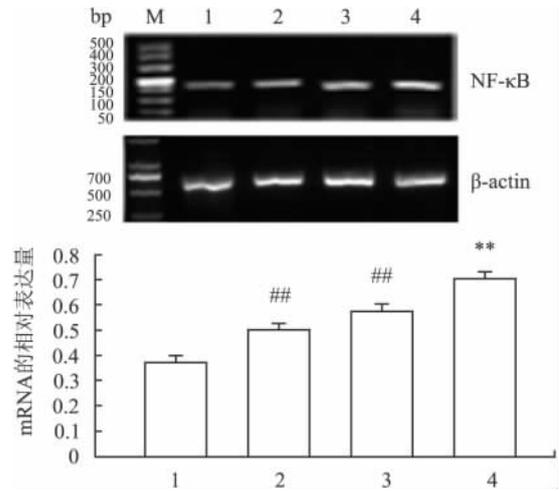


图 4 大鼠肝脏 KCs 中 NF-κB p65 mRNA 的表达

M:Marker 1:正常组 2:水飞蓟素高剂量组 3:水飞蓟素低剂量组 4:模型组;与正常组比较: \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较: ##  $P < 0.01$

**3 讨论**

ALD 是由于酒精的过量摄入导致的肝脏损害及其一系列病变。酒精性脂肪肝是 ALD 中的一个阶段,大量乙醇进入机体后,可以影响脂肪代谢,其代谢物又与蛋白质反应形成复合物,导致肝细胞空泡脂肪变性<sup>[7]</sup>。本次动物模型中模型组肝细胞可见明显脂肪变性,肝细胞肿胀明显,胞质内出现弥漫性的圆形脂滴,汇管区可见炎症细胞浸润,模型组大鼠肝组织有明显脂肪变性,表明造模是成功的。

NF-κB 通过调控各种急性反应蛋白、细胞因子和细胞黏附分子的转录过程,直接参与肝脏的急性慢性炎症<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9]</sup>表明,长期饮酒激活肝脏 KCs 中的 NF-κB。酒精性脂肪肝中肝脏的损伤与肝细胞凋亡有密切关系,而这种凋亡又与 NF-κB 的活化有关。研究<sup>[10]</sup>表明,肝脏 KCs 中的 NF-κB 依赖的基因表达诱导酒精性肝损伤。本研究结果显示,与正常组相比,模型组肝脏 KCs NF-κB 亚基 p65 mRNA 表达增高,其下游产物 IL-6、ICAM-1 含量也升高,本实验结果与相关报道类似:在酒精性脂肪肝的发病过程中可能涉及 NF-κB 的过度表达以及大量细胞因子和炎症介质的释放。

水飞蓟素是从菊科植物水飞蓟种子中提取的一种生物类黄酮,水飞蓟素及其复合物作为抗肝损伤药物,具有清除自由基、抗氧化应激、抗炎症、抑制肝纤维化及抗缺血再灌注损伤等作用,并具有稳定肝细胞膜、保护肝细胞酶系统和提高肝脏解毒功能等生物活性,但其对酒精性脂肪肝具体的作用机制仍不甚清楚。本研究病理结果显示水飞蓟素组的大鼠肝脏脂肪变性明显低于模型组,推测水飞蓟素能有效抑制酒精性脂肪肝肝细胞脂肪变性。同时水飞蓟素组 KCs NF- $\kappa$ B 亚基 p65 mRNA 表达以及 KCs 上清液中 IL-6、ICAM-1 含量明显低于模型组,表明水飞蓟素能够有效抑制肝脏 KCs NF- $\kappa$ B 亚基 p65 mRNA 表达,进而抑制下游基因产物 IL-6、ICAM-1 在其培养上清液中的表达。

### 参考文献

- [1] Järveläinen H A, Fang C, Ingelman-Sundberg M, et al. Kupffer cell inactivation alleviates ethanol-induced steatosis and CYP2E1 induction but not inflammatory responses in rat liver[J]. *J Hepatol* 2000, 32(6):900-10.
- [2] 张志勇,金武丕,许晓俊. 核转录因子- $\kappa$ B 与酒精性肝病的研究进展[J]. *临床肝胆病杂志* 2010, 26(3):269-71.
- [3] Ribeiro P S, Cortez-Pinto H, Solá S, et al. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF- $\kappa$ B in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients[J]. *Am J Gastroenterol*, 2004, 99(9):1708-17.
- [4] Song Z, Deaciuc I, Song M, et al. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006, 30(3):407-13.
- [5] Shi Q Z, Wang L W, Zhang W, et al. Betaine inhibits Toll-like receptor 4 expression in rats with ethanol-induced liver injury[J]. *World J Gastroenterol* 2010, 16(7):897-903.
- [6] 柳枫,朱继业,李涛,等. 大鼠库普弗细胞分离培养方法的改良[J]. *中华肝脏病杂志* 2006, 14(7):532-5.
- [7] Choi J S, Yoon T J, Kang K R, et al. Glycoprotein isolated from *Acanthopanax senticosus* proteins against hepatotoxicity induced by acute and chronic alcohol treatment[J]. *Biol Pharm Bull* 2006, 29(2):306-14.
- [8] 尤红,王宝恩. 核因子- $\kappa$ B 在肝脏疾病中研究进展[J]. *临床肝胆杂志* 2000, 16(1):11-2.
- [9] Mandrekar P, Ambade A, Lim A, et al. An essential role for monocyte chemoattractant protein-1 in alcoholic liver injury: regulation of proinflammatory cytokines and hepatic steatosis in mice[J]. *Hepatology* 2011, 54(6):2185-97.
- [10] Lin M, Rippe R A, Niemelä O, et al. Role of iron in NF- $\kappa$ B activation and cytokine gene expression by rat hepatic macrophages[J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(6 Pt 1):G1355-64.

## Protective effect of silymarin on alcoholic fatty liver in rats possibly *via* impairing NF- $\kappa$ B activation

Gao Xuemei<sup>1</sup>, Hong Rutao<sup>1</sup>, Li Jun<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>*Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Key Laboratory of Digestive Disease of Anhui Province, Hefei 230022;* <sup>2</sup>*School of Pharmacy Anhui Medical University Hefei 230032)*

**Abstract Objective** To explore the inhibition of NF- $\kappa$ B activation by silymarin in kupffer cells (KCs) in alcoholic fatty liver. **Methods** All rats were randomly divided into normal control group ( $n = 9$ ), model group ( $n = 12$ ) and silymarin groups (100 mg/kg, 200 mg/kg;  $n = 12$ , respectively). Rat model of alcoholic fatty livers were induced by intragastric infusion of ethanol for eight weeks. Histopathological changes of liver were assessed by hematoxylin and eosin (HE) staining. Liver KCs were isolated by combined enzymatic digestion and isopyknic gradient centrifugation with nycodenz. The IL-6 and ICAM-1 contents of culture supernatants of KCs were detected by ELISA. NF- $\kappa$ B P65 mRNA expression of KCs was determined by RT-PCR. **Results** Compared with normal group, the liver cells of model group showed obvious steatosis and significant swelling ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the degree of pathological changes in liver tissue in silymarin groups was significantly reduced ( $P < 0.01$ ). IL-6 levels in low and high dose of silymarin groups were significantly lower than those of model group ( $P < 0.01$ ). ICAM-1 levels in low and high dose of silymarin groups were also lower than those of model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). NF- $\kappa$ B P65 mRNA expression in low and high dose of silymarin groups was significantly lower than those of model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Silymarin inhibits NF- $\kappa$ B activation and its gene products, and it may hinder the development of alcoholic fatty liver.

**Key words** nuclear factor- $\kappa$ B; silymarin; fatty liver; alcoholic; intercellular adhesion molecule-1; interleukin-6