

基于 TLR2/MyD88/NF- κ B 和 NALP3 信号通路探讨藏族药短穗兔耳草提取物抗慢性酒精性肝损伤大鼠的作用机制

单佳铃¹, 魏荣锐¹, 王陆¹, 欧阳香¹, 程虹毓², 钟国跃¹, 刘佳成³, 朱继孝^{1*}

(1. 江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004;

2. 江西中医药大学 人文学院, 南昌 330004; 3. 江西省肿瘤医院, 南昌 330029)

[摘要] **目的:** 通过酒精灌胃 8 周建立大鼠慢性酒精性肝损伤模型, 研究藏族药短穗兔耳草提取物对 Toll 样受体 (TLR) 2/髓样分化因子 88 (MyD88)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 和 NOD 样受体蛋白 3 (NALP3) 信号通路的影响, 探讨其提取物抗慢性酒精性肝损伤的作用机制。**方法:** 60 只 SD 雄性大鼠随机分成正常组、模型组、联苯双酯组 ($0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 及短穗兔耳草低、中、高剂量组 ($0.5, 1, 2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每日上午各给药组按 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予相应的药物, 下午梯度乙醇灌胃法给予 56 度白酒灌胃, 连续 8 周后, 取血, 测定各组大鼠血清中天门冬氨酸氨基转移酶 (AST), 丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 甘油三酯 (TC), 总胆固醇 (TG) 及肝脏谷胱甘肽 (GSH) 水平; 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测大鼠血清中白细胞介素- 1β (IL- 1β) 水平; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肝脏中 TLR2, MyD88, NF- κ B 和 NALP3 蛋白的表达; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝脏病理学形态改变。**结果:** 与正常组比较, 模型组血清中 AST, ALT, TC, TG, IL- 1β 水平均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 藏族药短穗兔耳草各剂量组能降低血清 AST, ALT, TC, TG, IL- 1β 水平, 其中高剂量组的效果尤为显著 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与正常组比较, 模型组肝匀浆中 GSH 水平下降; 模型组肝组织中 TLR2, MyD88, NF- κ B 和 NALP3 蛋白水平明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 藏族药短穗兔耳草各剂量组能降低肝脏中 GSH 水平以及 TLR2, MyD88, NF- κ B 和 NALP3 的蛋白表达 ($P < 0.05, P < 0.01$); 肝脏病理切片表明, 藏族药短穗兔耳草能改善大鼠肝组织病理变化。**结论:** 藏族药短穗兔耳草对酒精诱导的慢性酒精性肝损伤大鼠具有一定的保护作用, 其机制可能与 TLR/MyD88/NF- κ B 和 NALP3 信号通路有关。

[关键词] 短穗兔耳草; Toll 样受体 (TLR) 2/髓样分化因子 88 (MyD88)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路; NOD 样受体蛋白 3 (NALP3); 慢性酒精性肝损伤; 作用机制

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)02-0080-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20200237

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20191008.1745.004.html>

[网络出版时间] 2019-10-09 13:21

Mechanism of Anti-chronic Alcoholic Liver Injury in Rats of Tibetan Medicine *Lagotis brachystachys* Extracts by TLR2/MyD88/NF- κ B and NALP3 Signaling Pathway

SHAN Jia-ling¹, WEI Rong-rui¹, WANG Lu¹, OUYANG Xiang¹, CHENG Hong-yu²,
ZHONG Guo-yue¹, LIU Jia-cheng³, ZHU Ji-xiao^{1*}

(1. Research Center for Traditional Chinese Medicine (TCM) Resources and Ethnic Minority, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. School of Humanities, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 3. Jiangxi Cancer Hospital, Nanchang 330029, China)

[Abstract] **Objective:** To established the model of chronic alcoholic liver injury in rats by long-term (8 weeks) alcoholic gavage, to study the effects of Tibetan medicine *Lagotis brachystachys* extracts on Toll-like receptor (TLR) 2/myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) and NOD like

[收稿日期] 20190418 (024)

[基金项目] “江西民族药现代科技与产业发展协同创新中心”开放基金项目 (JXXT2017004)

[第一作者] 单佳铃, 在读硕士, 从事慢性酒精肝损伤机制研究, E-mail: 1486605822@qq.com

[通信作者] *朱继孝, 博士, 副教授, 从事中药与民族药有效成分与作用机制研究, E-mail: zhujx81@sina.com

receptor protein 3 (NALP3) signaling pathways and study preliminary the mechanism of action of chronic alcoholic liver injury. **Method:** Sixty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, model group, bifendate positive drug group ($0.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and *L. brachystachys* low, medium and high-dose groups ($0.5, 1, 2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), the corresponding drugs were given at $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ in each morning, and the 56 degree Liquor was administered by the afternoon gradient alcoholic gavage method. After 8 weeks, the levels of serum aspartate transaminase (AST), serum alanineaminotransferase (ALT), serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), interleukin- 1β (IL- 1β), and the liver levels of *L*-glutathione (GSH) were measured. The expression of TLR2, MyD88, NF- κ B and NALP3 protein in liver were detected by Western blot. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of liver tissue. **Result:** Compared with normal group, the serum levels of AST, ALT, TC, TG and IL- 1β in model group were significantly increased ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with model group, the serum AST, ALT, TC, TG and IL- 1β levels were decreased in the various doses of *L. brachystachys*, and the high dose group was particularly effective ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with normal group, the GSH level in the liver homogenate of model group decreased significantly, and the difference was not statistically significant. The levels of TLR2, MyD88, NF- κ B and NALP3 in the liver tissue of model group were significantly increased ($P < 0.05, P < 0.01$). The GSH levels in the liver and the protein expression of TLR2, MyD88, NF- κ B and NALP3 were decreased in *L. brachystachys* group ($P < 0.05, P < 0.01$). The liver pathological section showed that *L. brachystachys* can improve the pathological changes of rat liver tissue. **Conclusion:** *L. brachystachys* can protect liver from alcohol-induced chronic liver injury in rats. The mechanism was related to TLR2/MyD88/NF- κ B and NALP3 signaling pathway.

[**Key words**] *Lagotis brachystachys*; Toll-like receptor (TLR) 2/myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway; NOD like receptor protein 3 (NALP3); chronic alcoholic liver injury; mechanism

酒精性肝病 (ALD) 是一类由于长期性饮酒导致的慢性进行性肝脏疾病,有数据显示与酒精相关的肝硬化患者的病死率占全球患者病死率的 0.9% 及占有肝硬化相关疾病死亡患者的 47.9%, 对人类的健康造成极大的威胁^[1]。目前临床上治疗 ALD 的药物主要有皮质类固醇、己酮可可碱、抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 制剂和一些抗氧化剂等,但都存在其各自的弊端,如不同个体药物疗效存在差异、只能短期改善症状且并发症多等^[2]。藏族药作为我国医药学中仅次于中医药学的一门民族医药,历史悠久,理论体系完整、健全,药物来源纯净,疗效显著^[3-4]。而近年来的一些研究表明^[5-7],传统医药对 ALD 的治疗具有良好的疗效,这为寻找治疗 ALD 的有效药物提供了途径。

短穗兔耳草,藏族药名“直打洒曾”,为玄参科植物短穗兔耳草的干燥全草,主要分布于甘肃、四川、青海和西藏等地。《晶珠本草》记载短穗兔耳草味苦、平,能清肺胃瘀血、排脓,治疗肺痈咳逆、胸满吐脓血等证,具有清热去火、消炎解毒的功效^[8-10]。课题组前期研究表明短穗兔耳草对四氯化碳 (CCl_4)^[11], α -异硫氰酸萘酯 (ANIT)^[12] 和乙醇^[13]

所致的多种小鼠急性肝损伤均有良好的治疗效果。因此本研究在前期实验的基础上基于 Toll 样受体 (TLR) 2/髓样分化因子 88 (MyD88)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 和 NOD 样受体蛋白 3 (NALP3) 信号通路进一步研究短穗兔耳草对慢性酒精性肝损伤的保护作用及其作用机制。

1 材料

1.1 动物 昆明种雄性大鼠 60 只,SPF 级,体质量 180 ~ 220 g,购自江西中医药大学动物中心,合格证号 SCXK(赣)2018-0003,自由饮水,适应性喂养 1 周后进行实验,本实验符合江西中医药大学动物伦理委员会标准。

1.2 药材 短穗兔耳草由江西中医药大学钟国跃研究员鉴定为玄参科 *Lagotis brachystachys* 短穗兔耳草全草。称取短穗兔耳草 840 g,晒干剪碎,加 10 倍体积 75% 乙醇加热回流提取 3 次,过滤提取液,用旋转蒸发仪减压回收乙醇,浓缩至无醇味,加双蒸水定容至 4.2 L,此为高剂量组 (相当于生药给药量 $2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),取出 2.1 L 加等体积的蒸馏水得到中剂量组 (相当于生药给药量 $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),同法制得低剂量组。给药剂量按照人的临床给药剂量 (10 ~ 15 g)

换算成大鼠中剂量给药量,再按照低:中:高剂量 1:2:4 的比例得出高剂量组的给药剂量^[23]。

1.3 试剂 56 度红星二锅头(北京红星股份有限公司,批号 20180409);联苯双酯滴丸(万邦德制药集团股份有限公司,批号 20151210);天门冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),谷胱甘肽(GSH),考马斯亮兰,甘油三酯(TC),总胆固醇(TG)试剂盒,苏木素-伊红(HE)染色液(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20180628,20180614,20180611, 20180609, 20180613, 20180611, 20180528);大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(欣博盛生物科技有限公司,批号 20180607);脱脂奶粉(美国 BD 公司,批号 5160902);过硫酸铵(麦克林生化科技有限公司,批号 C10168590);TLR2, NALP3 抗体(博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-1019R, bs-10021R);MyD88, NF- κ B, 二抗(武汉 Proteintech 公司,批号分别为 23230-1-AP, 10745-1-AP, SA00001-2); β -肌动蛋白抗体(β -actin, 美国 GeneTeX 公司,批号 42858)。

1.4 仪器 DY89-II 型电动匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Multiskan Go1510 型酶标仪(美国 Thermo 公司);UV2100 型紫外分光光度计(日本岛津有限公司);PowerPac Basic 型电泳仪, Chemic Dox XR+ 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);WD-9405B 型水平摇床(沃德生物医学仪器公司);Centrifuge 5430R 型低温冷冻离心机(美国 Eppendorf 公司);HI1210 型捞片机;HistoCore Arcadia C 型切片机, TP1020-1 型包埋机(德国 Leica 公司);Nikon elipse ci-s 型生物显微镜(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 将 60 只大鼠随机分成 6 组,每组 10 只,为正常组,模型组,联苯双酯组(100 mg·kg⁻¹),短穗兔耳草低、中、高剂量组(0.5, 1.0, 2.0 g·kg⁻¹)。参考文献[14]方法除空白组每天给予蒸馏水灌胃以外,其余各组均采用梯度乙醇法灌胃 56% 的红星二锅头,连续灌胃 8 周,第 1 周用量 4 mL·kg⁻¹,以后的每周依次递增 2 mL·kg⁻¹,直至增加到 10 mL·kg⁻¹。造模的同时进行给药治疗,正常组和模型组给予等体积蒸馏水灌胃,每天 1 次,灌胃体积按 10 mL·kg⁻¹ 计算。末次给药后 12 h 内禁食不禁水,12 h 后 10% 水合氯醛(0.35 mL·kg⁻¹)麻醉大鼠,腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血清;取血后于冰台

上迅速取大鼠肝脏,每组取大鼠肝脏相同部位置于 10% 的甲醛固定液中固定,取其他肝脏置于离心管中于 -80 °C 冰箱保存。

2.2 指标检测

2.2.1 检测大鼠血清中 TC, TG, ALT, AST, GSH 及 IL-1 β 的含量 取大鼠血清,采用微量酶标法根据试剂盒说明书测定血清中 TC, TG, ALT, AST 的含量;ELISA 检测大鼠血清中 IL-1 β 的含量;取大鼠 10% 的肝组织匀浆,微量酶标法检测 GSH 的含量。

2.2.2 HE 染色检测肝组织病理学变化 取已经固定好的大鼠肝组织,用刀片切成小块于包埋盒中流水冲洗过夜,梯度乙醇脱水,石蜡浸腊,包埋,切片,HE 染色等,于显微镜下观察其病理学形态变化。

2.2.3 Western blot 测大鼠肝组织 TLR2, MyD88, NF- κ B 和 NALP3 蛋白的表达 取 60 mg 大鼠肝组织放入 1.5 mL 的离心管中,加 2% SDS 裂解液 1 mL,用组织匀浆仪磨碎后室温放置 20 min 使其充分裂解,于室温 1 000 \times g 离心 15 min 取上清,100 °C 变性 15 min,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样品的蛋白浓度,根据浓度制备样品后进行常规上样电泳,电泳条件 80 V 30 min, 120 V 1 h,电泳完于有转膜液的转膜槽中转膜,250 mA 90 min,取出 PVDF 膜于 5% 的脱脂牛奶中室温封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min, β -actin 一抗(1:5 000), TLR2, MyD88, NF- κ B, NALP3(1:2 000) 4 °C 孵育过夜,所有抗体用 3% BSA 稀释,次日取出洗膜后于水平摇床上二抗(1:5 000)孵育 1 h,洗膜, ECL 显色,采用 Image J 软件计算各条带灰度值。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血清中 TC, TG, ALT, AST 含量的影响 与正常组比较,模型组 ALT, AST, TC, TG 含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,短穗兔耳草高剂量组 TC, TG 水平明显降低($P < 0.05$);短穗兔耳草中、高剂量组 AST, ALT 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对大鼠肝组织中 GSH 含量的影响 与正常组比较,模型组 GSH 水平虽无显著性差异,但也显著下降;与模型组比较,短穗兔耳草高剂量组和联苯双

表 1 短穗兔耳草提取物对慢性酒精性肝损伤大鼠血清中 TC, TG, ALT, AST 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of *Lagotis brachystachys* extract on levels of TC, TG, ALT and AST in serum of rats with chronic alcoholic liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
正常	-	1.57 ± 0.60	0.31 ± 0.10	7.73 ± 3.28	18.58 ± 3.99
模型	-	2.20 ± 0.36 ¹⁾	1.39 ± 0.51 ²⁾	11.31 ± 2.74 ¹⁾	24.29 ± 6.06 ¹⁾
联苯双酯	0.1	2.02 ± 0.26	0.96 ± 0.60	9.88 ± 5.45	20.76 ± 1.04
短穗兔耳草	0.5	2.04 ± 0.25	1.07 ± 0.37	7.01 ± 3.36	16.73 ± 4.42 ³⁾
	1	1.69 ± 0.43	1.10 ± 0.17	4.54 ± 2.49 ³⁾	15.90 ± 3.29 ⁴⁾
	2	1.63 ± 0.34 ³⁾	0.69 ± 0.22 ³⁾	3.78 ± 2.78 ⁴⁾	15.22 ± 4.23 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

酯组 GSH 水平明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其他各组虽与模型组无显著差异。见表 2。

表 2 短穗兔耳草提取物对慢性酒精性肝损伤大鼠肝匀浆中 GSH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of *Lagotis brachystachys* extract on GSH content in liver homogenate of rats with chronic alcoholic liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GSH/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
正常	-	1.06 ± 0.21
模型	-	0.81 ± 0.17
联苯双酯	0.1	1.41 ± 0.4 ³⁾
短穗兔耳草	0.5	0.97 ± 0.34
	1	1.11 ± 0.51
	2	1.61 ± 0.15 ⁴⁾

3.3 对大鼠血清中 IL-1 β 含量的影响 与正常组比较, 模型组血清中 IL-1 β 水平明显上升 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 短穗兔耳草低、中、高剂量组和联苯双酯组血清中 IL-1 β 含量均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 短穗兔耳草提取物对慢性酒精肝损伤大鼠血清中 IL-1 β 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of *Lagotis brachystachys* extract on IL-1 β serum in rats with chronic alcoholic liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

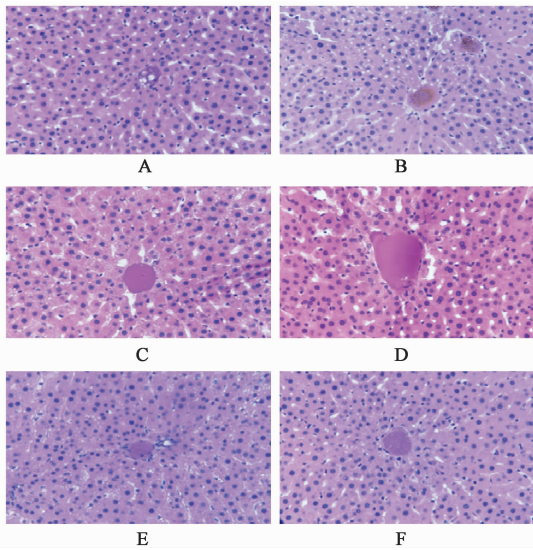
组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹
正常	-	46.22 ± 5.44
模型	-	87.72 ± 6.42 ¹⁾
联苯双酯	0.1	39.65 ± 6.98 ⁴⁾
短穗兔耳草	0.5	44.57 ± 4.56 ⁴⁾
	1	45.84 ± 5.14 ⁴⁾
	2	48.92 ± 5.18 ³⁾

3.4 对大鼠肝组织病理学的影响 正常组大鼠肝组织表面红润细腻而光滑, 显微镜下肝细胞形态正常, 肝血窦及门管区清晰, 肝细胞呈发散状向四周排列。模型组大鼠肝组织表面有大量红黄相间的细颗粒, 显微镜下肝细胞排列散乱, 体积增大, 细胞胞质溶解, 其内有大量的脂滴空泡形成, 空泡成小泡状或颗粒状; 呈现肝细胞灶状坏死, 肝血窦扩张, 并伴有炎性浸润。联苯双酯组较模型组脂滴空泡减少明显, 肝血窦扩张减轻, 炎性浸润减少。短穗兔耳草低剂量组显微镜下脂滴空泡仍明显, 可见点状坏死, 肝血窦扩张并伴有轻微炎性浸润。短穗兔耳草中、高剂量组显微镜下情况有所改善, 细胞水肿明显减少, 肝血窦扩张减轻, 炎性浸润减少。见图 1。

3.5 对大鼠 TLR2/MyD88/NF- κ B 和 NALP3 信号通路蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组经 8 周酒精灌胃造模后 TLR2, MyD88, NF- κ B 蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 短穗兔耳草高剂量组肝组织中 TLR2, MyD88, NF- κ B 和 NALP3 表达水平均显著下调 ($P < 0.01$); 短穗兔耳草低剂量组 NALP3 蛋白及短穗兔耳草中剂量组 NF- κ B, NALP3 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

4 讨论

酒精性肝病是一类由于长期性饮酒导致的慢性进行性肝脏疾病, 疾病的初期表现为酒精性脂肪肝, 之后逐渐发展为酒精性肝炎、肝纤维化、肝硬化等, 如果严重酗酒甚至会引起肝细胞坏死导致肝功能衰竭而引起一系列的并发症^[15-16]。近年来随着嗜酒人数的上升, 酒精性肝病在国内外均呈现逐年上涨的趋势, 根据我国某些地区流行病学调查发现, 我国成人的酒精性肝病的发病率在 4% 左右。嗜酒者中 90% 以上发展为脂肪肝, 10% ~ 35% 发展为酒精



A. 正常组; B. 模型组; C. 联苯双酯组; D. 短穗兔耳草低剂量组; E. 短穗兔耳草中剂量组; F. 短穗兔耳草高剂量组(图 2 同)

图 1 短穗兔耳草提取物对慢性酒精性肝损伤大鼠肝组织病理学形态的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of *Lagotis brachystachys* extract on pathological morphology of liver tissue in rats with chronic alcoholic liver injury (HE, ×400)

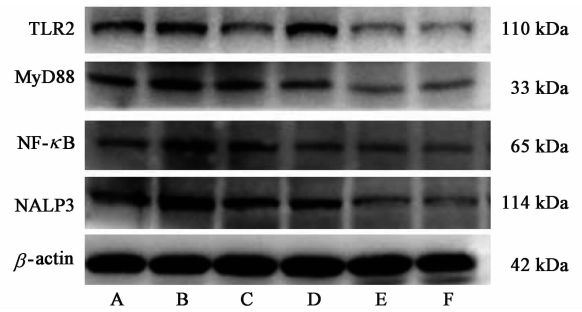


图 2 大鼠 TLR2, MyD88, NF-κB, NALP3 的蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of TLR2, MyD88, NF-κB and NALP3 in rats

性肝炎, 8% ~ 20% 的慢性嗜酒者演变为肝硬化, 甚至是肝癌^[17]。对人类的健康造成极大的威胁。而目前对于 ALD 的治疗尚缺乏针对性强、疗效高及副作用小的药物。

课题组前期研究结果表明短穗兔耳草对乙醇所致的急性酒精性肝损伤具有良好的保护作用^[13], 表示其作用与氧化应激及对炎症因子的调控有关。因此本文在前期研究的基础上基于 TLR/MyD88/NF-κB 和 NALP3 信号通路研究短穗兔耳草提取物

表 4 短穗兔耳草提取物对慢性酒精性肝损伤大鼠 TLR2, MyD88, NF-κB, NALP3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of extract of *Lagotis brachystachys* on expression of TLR2, MyD88, NF-κB and NALP3 in rats with chronic alcoholic liver injury ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TLR2/β-actin	MyD88/β-actin	NF-κB/β-actin	NALP3/β-actin
正常	-	0.85 ± 0.14	0.91 ± 0.02	1.10 ± 0.12	0.76 ± 0.02
模型	-	1.21 ± 1.10 ²⁾	1.18 ± 0.30 ¹⁾	1.42 ± 0.13 ¹⁾	0.88 ± 0.05
联苯双酯	0.1	1.07 ± 0.14	0.93 ± 0.14	1.15 ± 0.58	0.61 ± 0.03 ⁴⁾
短穗兔耳草	0.5	1.35 ± 0.10	0.92 ± 0.12	1.16 ± 0.18	0.56 ± 0.09 ⁴⁾
	1	1.12 ± 0.15	0.96 ± 0.16	0.97 ± 0.13 ⁴⁾	0.55 ± 0.11 ⁴⁾
	2	0.84 ± 0.15 ⁴⁾	0.45 ± 0.10 ⁴⁾	0.74 ± 0.24 ⁴⁾	0.42 ± 0.16 ⁴⁾

抗慢性酒精性肝损伤大鼠的作用机制。短穗兔耳草主要含有黄酮类、环烯醚萜苷类、苯丙素苷类等多种化学成分, 已有药理研究表明其具有抗各种(ANIT, 四氯化碳, 急性酒精性)肝损伤、高尿酸血症、抗氧化等多种药理活性^[18-20]。长期饮酒使乙醇大量积累在体内, 当体内乙醇的摄入量超过人体代谢能力时, 经肝脏代谢的 80% 的乙醇会通过乙醇脱氢酶氧化为乙醛, 乙醛对肝脏有直接毒性, 能使肝脏组织受损而影响肝细胞膜的通透性, 使大量 AST, ALT 入血, 血清中 AST, ALT 升高^[21]。大量乙醇的摄入还会影响线粒体内脂肪酸的代谢, 使肝内 TG 大量聚集。本研究显示不同剂量的短穗兔耳草提取物能够显著降低大鼠血清中 AST, ALT, TC, TG 的含量,

同时, 能够显著降低血清中炎症因子 IL-1β 的含量, 其中高剂量组的总体效果尤为显著。此外, 乙醛的毒性也能够破坏酶的结构功能, 抑制 GSH 的合成, 减弱 SOD 的抗氧化功能, 产生大量的 MDA 等过氧化物^[22]。本研究显示短穗兔耳草高剂量组均能够升高肝组织 GSH 的含量, 而对 SOD 和 MDA 无明显影响, 说明短穗兔耳草对慢性酒精性大鼠具有保护作用。

TLR2/MyD88/NF-κB 信号通路是机体炎症体系中的重要途径, 其广泛存在于各种组织细胞中, 参与多种疾病的发生与调控。TLR2 作为一种跨膜蛋白, 能够识别并启动不同的病原相关分子模式(PAMP)从而启动信号转导途径, 激活的 TLR2 能够

活化下游的信号因子 MyD88 最终激活 NF- κ B, 促进炎症因子的释放(如 IL-1 β , TNF- α 等)。有研究显示酒精轻肝纤维化大鼠肝组织中 TLR4, MyD88, NF- κ B 的表达显著升高, 药物干预后表达显著下降, 说明其作用机制可能与 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路有关^[16]。本研究结果显示, 不同剂量的短穗兔耳草提取物均能不同程度地降低蛋白 TLR2, MyD88, NF- κ B 和 NALP3 的表达, 其中高剂量组的总体效果最为明显。说明短穗兔耳草能够通过抑制 TLR2/MyD88/NF- κ B 和 NALP3 信号通路的表达, 从而达到对慢性酒精性肝损伤大鼠的保护作用。

综上所述, 藏族药短穗兔耳草对酒精诱导的慢性酒精性肝损伤大鼠具有一定的保护作用, 其机制与 TLR2/MyD88/NF- κ B 和 NALP3 信号通路有关, 但目前关于酒精性肝病与 TLR2/MyD88/NF- κ B 和 NALP3 信号通路的药理研究报道并不多见。因此本研究将进一步研究短穗兔耳草不同提取部位对慢性酒精性肝损伤大鼠的保护作用, 为研究短穗兔耳草对慢性酒精性肝损伤的保护作用提供实验依据, 有利于对其机制进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Hartmann P, CHEN W C, Schnabl B. The intestinal microbiome and the leaky gut as therapeutic targets in alcoholic liver disease[J]. *Front Physiol*, 2012, 3:402.

[2] 侯羽菲, 陈吉. 酒精性肝病治疗的新进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(72):156-159.

[3] 钟国跃, 周福成, 石上梅, 等. 藏药材常用品种及质量标准现状调查分析研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(16):2349-2355.

[4] 胡文忠, 刘程惠, 姜爱丽, 等. 藏药的发展历史及研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(20):10746-10748.

[5] 罗慧英, 黄亚红, 朱丽娟, 等. 藏药蕨麻对实验性酒精肝损伤小鼠的保护作用研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, 19(10):1107-1110.

[6] 黄思远, 顾健, 谭睿, 等. 藏药波棱瓜子总木脂素对大鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用及机制探讨[J]. *中药材*, 2018, 41(2):432-436.

[7] 曾俊, 杨瑞山, 蔡晓洋, 等. 俄色叶提取物对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(13):311-314.

[8] 西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社, 1991:253.

[9] 青海省生物研究所. 青藏高原药物图鉴[M]. 西宁:青海人民出版社, 1972:214.

[10] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2012:18.

[11] 朱继孝, 张红阳, 李雪激, 等. 两种兔耳草对四氯化碳致肝损伤小鼠保护作用的比较研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(2):210-214.

[12] 李雪激, 魏春华, 王洪玲, 等. 短穗兔耳草对 α -萘异硫氰酸脂致肝损伤小鼠保护作用的研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(5):613-617.

[13] 史亚夫, 李雪激, 文乐, 等. 短穗兔耳草和短管兔耳草抗急性酒精肝损伤小鼠作用机制的研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(5):600-605.

[14] 胡晓阳, 蒋皓, 邹尚亮, 等. 尖叶假龙胆对酒精性肝损伤大鼠的保护作用[J]. *中医药信息*, 2018, 35(2):13-16.

[15] GE N, LIANG H, LIU Y et al. Protective effect of aplysin on hepatic injury in ethanol-treated rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 62:361-372.

[16] Radan B, Karel D, Jaromir P. Alcoholic liver disease[J]. *World J Hepatol*, 2012, 4(3):81-90.

[17] 高潇雪, 刘立新. 酒精性肝病流行病学及发病机制研究进展[J]. *中华消化病与影像杂志:电子版*, 2016, 6(2):62-65.

[18] 陈耀祖, 张惠迪, 张所明, 等. 藏药短穗兔耳草化学成分的研究[J]. *高等学校化学学报*, 1989, 10(3):260-262.

[19] 卜雕雕, 苏卓, 柏希慧, 等. 复方龙脉宁对急性心肌梗死模型大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B p65 信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(9):67-73.

[20] 于红红, 俞琦, 蔡琨, 等. 泻心汤含药血清对 RAW264.7 源性泡沫细胞 TLR9/MyD88/NF- κ B p65 信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(18):24-29.

[21] 李远辉, 黄挺章, 郭圣奇, 等. 亚麻子提取物对 D-半乳糖胺致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(16):139-142.

[22] 屈胜胜, 张建军, 李艳霞, 等. 巴西莓对大鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用及对炎症细胞因子的影响[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(24):4869-4872.

[责任编辑 孙丛丛]