

# 紫檀芪对急性梗阻性胆管炎引起肝损伤的保护作用和机制研究

王亚利 余建华 沈志宏 朱志杨 鲁葆春

**[摘要]** 目的 探讨紫檀芪对急性梗阻性胆管炎(AOC)引起的肝损伤的保护作用及其可能的机制。方法 选用雄性C57BL/6小鼠24只,随机分为假手术组(Sham组)、AOC组、AOC+低剂量紫檀芪组(紫檀芪 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )和AOC+高剂量紫檀芪组(紫檀芪 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ),每组6只。结扎胆总管3 d后腹腔注射大肠杆菌内毒素建立AOC模型,6 h后检测小鼠血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ )水平;Western blot法检测肝组织中核因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )的表达水平;取肝组织切片进行苏木精-伊红染色,光镜下观察肝组织损伤情况。结果 AOC组中ALT、AST、TBIL、IL- $1\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的水平均较Sham组明显升高( $q$ 分别=23.29、17.59、25.75、32.28、23.29, $P$ 均 $<0.05$ ),相比于AOC组,AOC+低剂量紫檀芪组和AOC+高剂量紫檀芪组的ALT、AST、TBIL、TNF- $\alpha$ 和IL- $1\beta$ 的水平都明显降低( $q$ 分别=11.87、8.13、9.51、17.17、11.87;13.68、10.20、13.94、24.28、13.68, $P$ 均 $<0.05$ )。与AOC+低剂量紫檀芪组比较,AOC+高剂量紫檀芪组TBIL、TNF- $\alpha$ 含量明显降低( $q$ 分别=4.42、7.10, $P$ 均 $<0.05$ ),而ALT、AST、IL- $1\beta$ 未见明显差异( $q$ 分别=1.81、2.07、1.81, $P$ 均 $>0.05$ )。紫檀芪治疗组肝组织病理损伤也较AOC组明显减轻,另外紫檀芪可以抑制AOC导致的肝组织中p-NF- $\kappa\text{B}$ 、NF- $\kappa\text{B}$ 的表达,且与AOC+低剂量紫檀芪组相比,AOC+高剂量紫檀芪组p-NF- $\kappa\text{B}$ 表达下降,而NF- $\kappa\text{B}$ 未见明显降低。结论 紫檀芪治疗AOC小鼠疗效显著,可改善AOC小鼠肝组织损伤情况,其肝组织病理损伤程度及炎症因子TNF- $\alpha$ 的表达水平呈现明显的相关性,其机制可能与抑制肝组织NF- $\kappa\text{B}$ 通路的激活有关。

**[关键词]** 紫檀芪; 急性梗阻性胆管炎; 肝损伤; 核因子- $\kappa\text{B}$

**Protective effect and mechanism of pterostilbene on liver injury caused by acute obstructive cholangitis** WANG Yali, YU Jianhua, SHEN Zhihong, et al. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Shaoxing Hospital of Zhejiang University, Shaoxing 312000, China.

**[Abstract]** **Objective** To explore the protective effect of pterostilbene on liver injury induced by acute obstructive cholangitis (AOC) and its possible mechanism. **Methods** Totally 24 male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: sham operation group (Sham group), acute obstructive cholangitis group (AOC group), AOC+low-dose pterostilbene ( $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) group and AOC+ high-dose pterostilbene ( $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) group. AOC model was established by intraperitoneal injection of LPS after ligation of common bile duct for three days. Six hours later, the levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) were detected. The expression of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) in liver tissue was detected by Western blot method, and the liver tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), and the injury of liver tissue was observed under light microscope. **Results** The levels of ALT, AST, TBIL, IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$  were significantly increased in AOC group compared with those in Sham group ( $q=23.29, 17.59, 25.75,$

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.002.004

基金项目:浙江省自然科学基金一般项目(LY19H160016);浙江省医药卫生科技项目(2019ZD057;2020RC127;2020KY978;2018RC077;2018KY836)

作者单位:312000 浙江绍兴,浙江大学绍兴医院肝胆胰外科

32.28, 23.29,  $P<0.05$ ), and these parameters were significantly decreased after dealing with pterostilbene of different concentration ( $q=11.87, 8.13, 9.51, 17.17, 11.87; 13.68, 10.20, 13.94, 24.28, 13.68, P<0.05$ ). The levels of TBIL and TNF- $\alpha$  in the AOC+high-dose pterostilbene group were significantly lower than

those in the AOC+low-dose pterostilbene group ( $q=4.42, 7.10, P<0.05$ ), but there was no significant difference in ALT, AST and IL-1 $\beta$  ( $q=1.81, 2.07, 1.81, P>0.05$ ). The pathological injury of liver tissue was also significantly alleviated compared with the AOC group. In addition, pterostilbene could inhibit the expression of p-NF- $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B in liver tissue induced by AOC. Compared with the AOC+ low-dose pterostilbene group, the AOC+high-dose pterostilbene group showed a decreasing in the expression of p-NF- $\kappa$ B, while NF- $\kappa$ B did not significantly decrease. **Conclusion** Pterostilbene is effective in the treatment of AOC mice, it can improve the liver tissue injury of AOC mice. The degree of liver pathological injury and the expression level of TNF- $\alpha$  are significantly correlated. The mechanism may be related to the inhibition of the activation of NF- $\kappa$ B pathway in liver tissue.

**[Key words]** pterostilbene; acute obstructive cholangitis; liver injury; NF- $\kappa$ B

急性梗阻性胆管炎 (acute obstructive cholangitis, AOC) 是发生在胆道梗阻基础上的严重胆道感染, 具有起病急骤、发展迅速、病情凶险等特点<sup>[1]</sup>。随着抗生素的广泛应用和胆道引流技术的进步, 急性梗阻性胆管炎死亡率近年来已明显下降, 然而, 对于部分重症患者, AOC 导致的器官衰竭仍然是致命的<sup>[2,3]</sup>。肝脏在 AOC 病程进展中是累及较早、较重的器官之一, 其损伤程度直接与该疾病的预后相关<sup>[4]</sup>。

紫檀芪是蓝莓中发现的一种天然植物抗毒素, 是白藜芦醇的二甲基化类似物, 具有类似白藜芦醇的药理作用, 例如抗炎、抗氧化、抗肿瘤等<sup>[5,6]</sup>。此外, 紫檀芪比白藜芦醇具有更高的生物利用度和安全性<sup>[5,7]</sup>。本次研究主要探讨紫檀芪对 AOC 导致肝损伤的保护作用及可能的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 24 只成年雄性 C57BL/6 小鼠均购自浙江省实验动物中心, 体重 20~25 g, 鼠龄 6~8 周, 饲养于 SPF 级实验室中, 环境温度 22°C~25°C, 保持 12 h 明/暗交替光照, 自由进食及饮水。所有程序均经浙江大学伦理委员会批准, 所有手术均在七氟烷麻醉下进行。实验时间为 2019 年 8 月。

**1.2 分组及处理** 在 SPF 级实验室中饲养 1 周后, 小鼠被随机分为假手术组 (Sham 组)、AOC 组、AOC+低剂量紫檀芪组 (紫檀芪 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 和 AOC+高剂量紫檀芪组 (紫檀芪 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。所有小鼠饥饿 1 d 后, 用七氟烷诱导麻醉, 吸入式小型动物麻醉装置维持麻醉下进行。Sham 组分离胆总管周围组织后关闭腹腔, 每天腹腔注射青霉素 5 万单位, 3 d 后腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液 0.1 ml, 再注射空气 0.1 ml; AOC 组分离胆总管, 用 4-0 丝线结扎, 每天腹腔注射青霉素 5 万单位, 3 d 后向小鼠腹腔内缓慢注入大肠杆菌内毒素 10  $\mu$ g (体积控制 0.1 ml), 再注射空气 0.1 ml。AOC+低剂量紫檀芪组

和 AOC+高剂量紫檀芪组手术方法及青霉素注射剂量同 AOC 组, 然后于手术后 4 h 分别予紫檀芪 (由上海源叶生物科技有限公司生产) 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 和 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 灌胃, 共 3 d。所有小鼠在注射大肠杆菌内毒素或 0.9% 氯化钠注射液 6 h 后处死。采集下腔静脉血液和血清, 储存在 -80 °C 冰箱。肝组织标本在液氮中快速冷冻, 然后置于 -80 °C 条件下储存。

**1.3 指标检测** ①肝功能: 采用贝克曼全自动生化分析仪测定各组小鼠血清谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 水平。②病理: 取肝组织 4% 甲醛固定、石蜡包埋, 采用苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色, 观察各组小鼠肝组织病理形态学变化。③白介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的测定: 采用酶联免疫吸附法进行检测。④蛋白印迹分析: 将适量的各组小鼠肝组织放入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 缓冲液中, 研磨成匀浆, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 加入相应的 5X SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 每孔加 20  $\mu$ l 样品, SDS-PAGE 凝胶恒压电泳, 250 mA 湿转条件下转膜 2 h, 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h, 4 °C 条件下加入一抗 (p-NF- $\kappa$ B, 1:1000; NF- $\kappa$ B, 1:1000;  $\beta$ -actin, 1:1000, 均由 Cell Signaling Technology 抗体公司生产) 孵育过夜; 分别用羊抗兔、羊抗鼠 IgG 二抗室温下孵育 2 h; 用 BeyoECL Plus 检测蛋白, 凝胶成像仪下显影、拍照。

**1.4 统计学方法** 所有数据均采用 Graph Pad 软件进行统计分析。计量资料均以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。组间比较采用 one-way ANOVA (方差分析), 两两比较采用  $q$  检验。设  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

## 2.1 四组小鼠血清ALT、AST和TBIL水平比较见表1

表1 四组小鼠血清ALT、AST和TBIL水平比较/ $\mu\text{mol/L}$ 

组别	ALT	AST	TBIL
Sham组	50.14 ± 3.77	180.46 ± 36.00	0.54 ± 0.31
AOC组	752.84 ± 74.53*	1093.82 ± 186.29*	260.88 ± 33.25*
AOC+低剂量紫檀芪组	410.24 ± 33.77 <sup>#</sup>	671.56 ± 57.56 <sup>#</sup>	164.72 ± 17.22 <sup>#</sup>
AOC+高剂量紫檀芪组	292.64 ± 64.51 <sup>#</sup>	563.96 ± 61.78 <sup>#</sup>	120.00 ± 15.26 <sup>#△</sup>

注: \*:与 Sham 组比较,  $P < 0.05$ ; #:与 AOC 组比较,  $P < 0.05$ ;  $\Delta$ :与 AOC+低剂量紫檀芪组比较,  $P < 0.05$ 。

由表1可见, AOC组ALT、AST和TBIL水平均较Sham组明显上升( $q$ 分别=23.29、17.59、25.75,  $P$ 均 $< 0.05$ ), 但AOC+低剂量紫檀芪组和AOC+高剂量紫檀芪组的ALT、AST和TBIL的水平都明显低于AOC组( $q$ 分别=11.87、8.13、9.51; 13.68、10.20、13.94,  $P$ 均 $< 0.05$ )。与AOC+低剂量紫檀芪组相比, AOC+高剂量紫檀芪组TBIL含量明显降低( $q=4.42$ ,  $P < 0.05$ ), 而ALT和AST无明显差异( $q$ 分别=1.81、2.07,  $P$ 均 $> 0.05$ )。

## 2.2 紫檀芪对小鼠肝组织损伤的影响见图1

由封二图1可见, Sham组小鼠肝组织结构正常, 未见炎性细胞浸润; AOC组小鼠肝组织中可见大量炎性细胞浸润, 大片状肝细胞坏死并脓肿形成; AOC+低剂量紫檀芪组小鼠肝组织小片状肝细胞坏死及脓肿形成伴炎性细胞浸润, 但较AOC组明显减轻; AOC+高剂量紫檀芪组小片状肝细胞坏死及少量炎性细胞浸润, 未见明显肝脓肿形成。

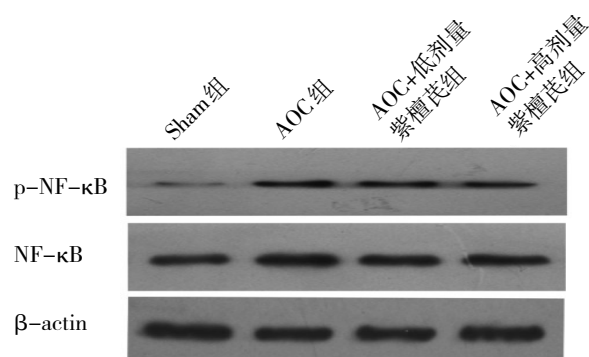
2.3 紫檀芪对NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B表达的影响见图1

图1 Western blot检测小鼠肝组织中NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B的表达的水平

由图1可见, 与Sham组比较, AOC组小鼠肝组织NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B的表达明显增加, 而AOC+低剂量紫檀芪组和AOC+高剂量紫檀芪组NF- $\kappa$ B、p-NF- $\kappa$ B的表达较AOC组明显下降, 但仍高于Sham组。同时, 与AOC+低剂量紫檀芪组相比, AOC+高剂量紫

檀芪组p-NF- $\kappa$ B表达下降, 而NF- $\kappa$ B未见明显降低。

2.4 紫檀芪对小鼠诱导的IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达的影响见表2表2 紫檀芪对小鼠诱导的IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达的影响/pg/ml

组别	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
Sham组	35.24 ± 18.86	41.73 ± 10.39
AOC组	233.36 ± 20.69*	205.15 ± 25.13*
AOC+低剂量紫檀芪组	132.40 ± 16.57 <sup>#</sup>	165.02 ± 14.97 <sup>#</sup>
AOC+高剂量紫檀芪组	117.01 ± 10.00 <sup>#</sup>	107.05 ± 10.09 <sup>#△</sup>

注: \*:与 Sham 组比较,  $P < 0.05$ ; #:与 AOC 组比较,  $P < 0.05$ ;  $\Delta$ :与 AOC+低剂量紫檀芪组比较,  $P < 0.05$ 。

由表2可见, 与Sham组相比, AOC组血清IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量明显增加( $q$ 分别=32.28、23.29,  $P$ 均 $< 0.05$ ), 而AOC+低剂量紫檀芪组和AOC+高剂量紫檀芪组的IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量明显低于AOC组( $q$ 分别=11.87、17.17; 13.68、24.28,  $P$ 均 $< 0.05$ )。与AOC+低剂量紫檀芪组比较, AOC+高剂量紫檀芪组TNF- $\alpha$ 含量明显低于AOC组( $q=7.10$ ,  $P < 0.05$ ), 而IL-1 $\beta$ 未见明显差异( $q=1.81$ ,  $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

AOC是在胆汁淤积基础上发生的一种严重的感染性疾病, 其导致的肝损伤与该疾病预后直接相关<sup>[4]</sup>。AOC通常导致脓毒症、全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征, 尽管临床上外科干预和使用抗生素方面取得了许多进展, 但AOC死亡率仍然很高<sup>[2]</sup>。而肝细胞在AOC中的受损机制仍存在较多争议。目前认为AOC导致肝损伤主要通过胆汁淤积诱导的促炎细胞因子的释放和炎症细胞通路的激活, 导致肝细胞损伤和凋亡<sup>[8,9]</sup>, 另外, 肝细胞代偿性去除胆汁酸也可导致肝细胞过度氧化, 有害氧自由基和细胞因子聚集<sup>[10,11]</sup>。因此, 控制炎症损伤导致组织破坏, 减轻胆汁淤积引起的氧化应激, 是早期



干预急性重症胆管炎导致肝损害的重要手段。

紫檀芪是白藜芦醇的二甲基化类似物,具有与白藜芦醇相似的药理作用,且有更高的生物利用度和安全性。近期研究证实,紫檀芪可以抑制NF- $\kappa$ B的表达,减轻下游炎症介质TNF- $\alpha$ 等的表达,减轻急性胰腺炎引起的炎症反应<sup>[12]</sup>。p-NF- $\kappa$ B是一种关键转录因子,在氧化应激和炎症反应中发挥关键作用,其激活将导致下游炎症分子的表达,如IL-1、IL-6和TNF- $\alpha$ 等<sup>[13]</sup>。近期研究表明,在胆总管结扎基础上注射大肠杆菌构建的AOC动物模型中发现,NF- $\kappa$ B蛋白的表达较对照组明显增加,进而增加下游促炎细胞因子(如TNF- $\alpha$ 、IL-6)的表达,并加重肝肾等重要脏器的损伤<sup>[14]</sup>,抑制NF- $\kappa$ B通路可以减轻炎症并改善炎症过分激活导致的不良后果<sup>[15]</sup>。本次研究显示,AOC可以引起小鼠肝组织NF- $\kappa$ B和下游炎症因子的表达增加,导致小鼠肝组织和肝功能的损伤,紫檀芪预处理的AOC小鼠模型中,肝组织NF- $\kappa$ B和p-NF- $\kappa$ B蛋白的表达水平较AOC组小鼠明显下降,并抑制其下游TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 炎症因子的表达,改善AOC诱导的肝组织损伤,其肝组织病理损伤程度及炎症因子TNF- $\alpha$ 的表达水平与剂量呈现明显的相关性。证明紫檀芪能够在体内通过抑制NF- $\kappa$ B炎症通路的激活而有效抑制AOC诱导的炎症反应,从而减轻AOC小鼠早期肝损伤。

综上,紫檀芪对AOC导致的早期肝损伤具有保护作用,其作用可能是通过抑制NF- $\kappa$ B通路的激活实现的。然而目前关于紫檀芪的研究主要以基础研究为主,缺乏临床实践方面的资料,为更好地应用紫檀芪,可能还需要更多的多中心、随机和前瞻性的临床研究来综合评估其疗效。

#### 参考文献

- Lazaridis KN, LaRusso NF. The Cholangiopathies[J]. *Mayo Clin Proc*, 2015, 90(6): 791-800.
- Sokal A, Sauvanet A, Fantin B, et al. Acute cholangitis: Diagnosis and management[J]. *J Visc Surg*, 2019, 156(6): 515-525.
- Lee JM, Lee SH, Chung KH, et al. Risk factors of organ failure in cholangitis with bacteriobilia[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(24): 7506-7513.
- Yu JH, Tang HJ, Zhang WG, et al. Catheterization of the gallbladder: A novel mouse model of severe acute cholangitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(10): 1771-1779.
- Estrela JM, Ortega A, Mena S, et al. Pterostilbene: Biomedical applications[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2013, 50(3): 65-78.
- Ma Z, Zhang X, Xu L, et al. Pterostilbene: Mechanisms of its action as oncostatic agent in cell models and in vivo studies[J]. *Pharmacol Res*, 2019, 145: 104265.
- Ruiz MJ, Fernandez M, Pico Y, et al. Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(8): 3180-3186.
- Navaneethan U, Jayanthi V, Mohan P. Pathogenesis of cholangitis in obstructive jaundice-revisited[J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2011, 57(1): 97-104.
- Guo Y, Zhang Y, Hong K, et al. AMPK inhibition blocks ROS-NF kappa B signaling and attenuates endotoxemia-induced liver injury[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86881.
- Aydin S, Tokac M, Taner G, et al. Antioxidant and antigenotoxic effects of lycopene in obstructive jaundice[J]. *J Surg Res*, 2013, 182(2): 285-295.
- Ambade A, Catalano D, Lim A, et al. Inhibition of heat shock protein (molecular weight 90 kDa) attenuates proinflammatory cytokines and prevents lipopolysaccharide-induced liver injury in mice[J]. *Hepatology*, 2012, 55(5): 1585-1595.
- Lin YJ, Ding Y, Wu J, et al. Pterostilbene as treatment for severe acute pancreatitis[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(3): 1-9.
- Killeen MJ, Linder M, Pontoniere P, et al. NF-kappa-beta signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities[J]. *Drug Discov Today*, 2014, 19(4): 373-378.
- Tu B, Gong JP, Feng HY, et al. Role of NF-kB in multiple organ dysfunction during acute obstructive cholangitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(1): 179-183.
- He W, Zhang Y, Zhang J, et al. Cytidine-phosphate-guanosine oligonucleotides induce interleukin-8 production through activation of TLR9, MyD88, NF-kappaB, and ERK pathways in odontoblast cells[J]. *J Endod*, 2012, 38(6): 780-785.

(收稿日期 2019-09-21)

(本文编辑 蔡华波)