

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.22.017

当飞利肝宁胶囊对急性肝损伤模型小鼠肝组织锌指蛋白 A20 表达及 NF- κ B 信号通路的影响

周文君, 缪虹雨, 李萌, 党延后, 张莉, 徐汉辰, 季光*

上海中医药大学附属龙华医院, 上海市徐汇区宛平南路 725 号, 200032



摘要 目的 探讨当飞利肝宁胶囊对急性肝损伤的保护作用及机制。方法 30 只 C57BL/6 小鼠随机分为空白组、模型组和当飞利肝宁组, 每组 10 只。当飞利肝宁组给予当飞利肝宁胶囊 0.225 g/(kg·d) 灌胃 10 天, 空白组和模型组小鼠给予等剂量的生理盐水灌胃。药物干预结束后, 模型组和当飞利肝宁组小鼠给予腹腔注射 D-半乳糖胺 800 mg/kg 建立急性肝损伤模型, 对照组小鼠腹腔注射 100 μ l 生理盐水。24 h 后取材, 检测各组小鼠肝组织病理、肝功能 [包括丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和门冬氨酸氨基转移酶 (AST)], 血清和肝组织匀浆中锌指蛋白 A20 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 表达, 肝组织锌指蛋白 A20、TNF- α 、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 8 (IL-8) mRNA 表达及核因子 κ B p65 (NF- κ B p65)、磷酸化核因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65)、核因子 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、磷酸化核因子 κ B 抑制蛋白 α (p-I κ B α) 蛋白表达。结果 肝组织病理结果显示, 模型组小鼠的肝组织炎症细胞浸润明显增加, 而当飞利肝宁组小鼠肝组织炎症细胞浸润情况较模型组明显改善。与空白组比较, 模型组小鼠的血清 ALT、AST 水平升高, 血清和肝组织 TNF- α 表达升高, 肝组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达及 p-I κ B α 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 当飞利肝宁组小鼠血清 ALT、AST 水平降低, 血清和肝组织锌指蛋白 A20 表达升高、TNF- α 表达降低, 肝组织锌指蛋白 A20 mRNA 表达及 NF- κ B p65 蛋白升高, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 及 p-I κ B α 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 当飞利肝宁胶囊能有效改善小鼠急性肝损伤, 上调锌指蛋白 A20 的表达从而调控 NF- κ B 信号通路的激活可能是其潜在作用机制之一。

关键词 急性肝损伤; 当飞利肝宁胶囊; 锌指蛋白 A20; 炎症因子; NF- κ B 信号通路

急性肝损伤临床多见于病毒感染、酗酒、药物及肝脏外科手术后, 其特点是肝脏大量炎症细胞浸润, 引起肝脏的急性炎症反应^[1-2]。肝脏组织持续的炎症反应可导致肝损伤向更严重的肝脏疾病进展, 如肝硬化、肝功能衰竭等^[3]。当飞利肝宁胶囊是由当药和水飞蓟的提取物组成的中药复方制剂, 该药物已被证明对肝功能具有较好的保护作用^[4-7]。本课题组前期研究也表明, 当飞利肝宁胶囊可减轻非酒精性脂肪性肝病大鼠的肝损伤^[8]。D-半乳糖胺作为肝细胞磷酸核苷的干扰剂, 引起肝细胞的弥漫性坏死和炎症, 是诱导急性肝损伤的经典模型^[9]。本研究探讨当飞利肝宁胶囊对 D-半乳糖胺诱导的小鼠急性肝损伤的疗效及其潜在的作用

机制。所有动物实验程序均按照《实验室动物的管理和使用指南》^[10]进行。本实验通过上海中医药大学动物伦理办公室批准 (批准号: PZSHUTCM200619004)。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 30 只, 4~6 周龄, 体重 20~25 g, 购自上海斯莱克实验动物技术公司, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2014-0005。动物饲养在 SPF 级动物房, 适应性喂养 1 周后进行实验。

1.2 药物、试剂与主要仪器

当飞利肝宁胶囊为四川美大康药业有限公司产品 (批号: 130920, 规格: 0.3 g/粒)。D-半乳糖胺 (美国 Sigma 公司, 批号: G0500); 蛋白酶抑

基金项目: 国家自然科学基金 (81803897)

* 通讯作者: jiliver@vip.sina.com, (021) 64385700 转 9507

制剂、磷酸酶抑制剂 (美国 Roche 公司, 批号: 17325200、10689000); BCA 试剂盒 (中国康为生物科技有限公司, 批号: 26912D); 锌指蛋白 A20、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 酶联免疫试剂盒 (中国西唐生物科技有限公司, 批号: F11630、F11737); 锌指蛋白 A20 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号: ab13597); 磷酸化核因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65) 抗体 (批号: 3033)、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65) 抗体 (批号: 8242)、磷酸化核因子 κ B 抑制蛋白 α (p-I κ B α) 抗体 (批号: 2859)、核因子 κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 抗体 (批号: 4812)、二抗抗兔 IgG (批号: 7074), 美国 CST 公司; β -actin、H3 抗体 (中国杭州华安生物技术有限公司, 批号: JF47-01、ER1903-02); 化学发光试剂 (美国 Millipore 公司, 批号: 407207); GoScriptTM 逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司, 批号: A3500); Trizol 和 Power SYBR Green PCR Master Mix (美国 Life Technologies 公司, 批号: 15596018、4368702); RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: P0013B); 伊红、苏木素 (中国索莱宝科技有限公司, 批号分别为: 20140306、20131128)。

Eppendorf 5417R 型台式冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Step One PlusTM 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); Power-pac Basic 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); G-Box Chemi XT4 型化学发光成像仪 (英国 Syngene 公司); 7170S 型生化分析仪 (日本日立公司); MP FastPrep-24 型匀浆机 (美国 MP Biomedicals 公司); ECLIPSE 50i 型光学显微镜 (美国尼康公司)。

1.3 分组及干预方法

采用随机数字表法将 30 只小鼠分为空白组、模型组及当飞利肝宁组, 每组 10 只。从实验开始, 当飞利肝宁组小鼠每天给予当飞利肝宁胶囊内容物灌胃, 按临床等效剂量换算成 0.225 g/(kg·d), 每日灌胃 1 次, 连续 10 天, 空白组和模型组小鼠给予等剂量生理盐水灌胃。药物干预结束后, 模型组和当飞利肝宁组小鼠给予腹腔注射 D-半乳糖胺 800 mg/kg^[8], 对照组小鼠腹腔注射 100 μ l 生理盐水。

1.4 观察指标及方法

D-半乳糖胺注射后 24 h 处死小鼠。分离血清, 将肝组织冷冻于 -80℃ 冰箱或固定于 10% 甲醛。

1.4.1 肝组织病理染色

每组取小鼠相同部位的肝组织经 10% 中性甲醛浸泡 24 h 固定, 常规步骤脱水包埋。将包埋好的组织进行 5 μ m 切片, 经苏木精-伊红 (HE) 染色, 光学显微镜下观察组织形态并拍照。

1.4.2 肝功能指标检测 全血室温下静置 2 h 后分离血清, 利用日立 7170S 生化分析仪测定丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性水平。

1.4.3 血清和肝脏组织匀浆中锌指蛋白 A20 及 TNF- α 表达 采用酶联免疫吸附法测定, 根据酶联免疫试剂盒操作说明检测。

1.4.4 肝组织锌指蛋白 A20 及炎症因子 mRNA 表达 采用 qRT-PCR 法测定, 用 Trizol 将组织标本研磨于液氮中。利用逆转录试剂盒将总 RNA 转化为 cDNA。PCR 引物由上海闪晶分子生物科技有限公司合成, 引物序列如表 1 所示。定量 RT-PCR 使用 Power SYBR Green PCR Master Mix 根据说明书进行。以 β -actin 作为内参基因, 检测锌指蛋白 A20、TNF- α 、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 8 (IL-8) 的表达, 结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法获得数据。

表 1 PCR 引物序列

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')	产物大小 (bp)
锌指蛋白 A20	GAACAGCGATCAG-GCCAGG	GGACAGTTGGGT-GTCTCACATT	105
TNF- α	CCCTCCA-GAAAAGACACCATG	CACCCCGAAGT-TCAGTAGACAG	61
IL-1 β	TCGTGCTGTCGGAC-CCAT	GGCTTGTGCTCT-GCTTGTA	89
IL-6	GGGACTGATGCTG-GTGACAAC	CAACTCTTTTCT-CATTCCACGA	118
IL-8	GGCATCTTCGTC-CGTCCC	GCCAACAGTAGC-CTTACCC	183
β -actin	GAGACCTTCAA-CACCCAGC	ATGTCACG-CACGATTCCC	149

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-6, 白细胞介素 6; IL-8, 白细胞介素 8

1.4.5 肝组织 NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 蛋白表达 采用免疫印迹分析法, 将含有蛋白酶、磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液加入肝组织, 匀浆机匀浆 20 s/次, 静置 5 min, 重复 5 次。采用 BCA 法测定蛋白浓度。裂解产物经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转移至 PVDF 膜上。封闭后, 加一抗 (1:1000) 4℃ 孵育过夜, 二抗 (1:5000) 室温下孵育 1 h, 加入化学发光试剂反应 5 min 后, 用 GBOX 凝胶成像

系统采集并分析图片。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行分析, 计量数据符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 并采用 Tukey 事后检验法评估两组间的差异。根据 Spearman 计算锌指蛋白 A20 表达与各参数的相关性。采用 Kruskal-Wallis ANOVA 检验和 Dunn's multiple comparison 检验比较 qRT-PCR、免疫印迹分析法结果和病理评分。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肝组织 HE 染色结果

空白组小鼠肝脏组织呈现正常形态。与空白组比较, 模型组小鼠肝组织炎症细胞浸润明显增加, 箭头所指为炎症细胞。当飞利肝宁组的小鼠肝组织炎症细胞浸润情况较模型组明显改善 (彩图请扫描文中二维码获取)。

2.2 各组小鼠肝功能指标比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠血清 ALT 和 AST 水平均显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 当飞利肝宁组小鼠血清 ALT 和 AST 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠肝功能指标比较 (U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ALT	AST
空白组	10	42.80 $\pm$ 12.08	81.55 $\pm$ 11.77
模型组	10	196.55 $\pm$ 64.32*	220.90 $\pm$ 71.99*
当飞利肝宁组	10	141.62 $\pm$ 37.06#	143.35 $\pm$ 35.52##

注: ALT, 丙氨酸氨基转移酶; AST, 门冬氨酸氨基转移酶; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.3 各组小鼠血清及肝组织锌指蛋白 A20 和 TNF- α 表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组小鼠血清和肝组织锌指蛋白 A20 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 血清和肝组织 TNF- α 表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 当飞利肝宁组小鼠血清和肝组织锌指蛋白 A20 表达均升高, TNF- α 表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.4 各组小鼠肝组织锌指蛋白 A20、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 mRNA 表达比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组小鼠肝组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 的表达水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而锌指蛋白 A20 和 IL-8 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 当飞利肝宁组小鼠肝组织锌指蛋白 A20 mRNA 表达升高, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), IL-8 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组小鼠肝组织中 I κ B α 和 NF- κ B p65 蛋白及其磷酸化水平比较

表 5 示, 与空白组比较, 模型组小鼠肝组织 p-I κ B α 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 当飞利肝宁组小鼠肝组织 p-I κ B α 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达降低, NF- κ B p65 蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组小鼠肝组织 I κ B α 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组小鼠肝组织中 I κ B α 和 NF- κ B p65 蛋白及其磷酸化蛋白电泳图见图 1。

表 3 各组小鼠血清及肝组织锌指蛋白 A20 和 TNF- α 表达比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血清		肝组织	
		锌指蛋白 A20	TNF- α	锌指蛋白 A20	TNF- α
空白组	10	23.39 $\pm$ 10.79	9.48 $\pm$ 4.14	110.57 $\pm$ 35.45	238.13 $\pm$ 67.49
模型组	10	17.74 $\pm$ 8.31	57.29 $\pm$ 19.08*	148.14 $\pm$ 23.16	499.42 $\pm$ 160.87*
当飞利肝宁组	10	39.60 $\pm$ 19.70##	33.93 $\pm$ 16.40#	368.33 $\pm$ 162.83##	334.60 $\pm$ 148.73##

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表 4 各组小鼠肝组织锌指蛋白 A20、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

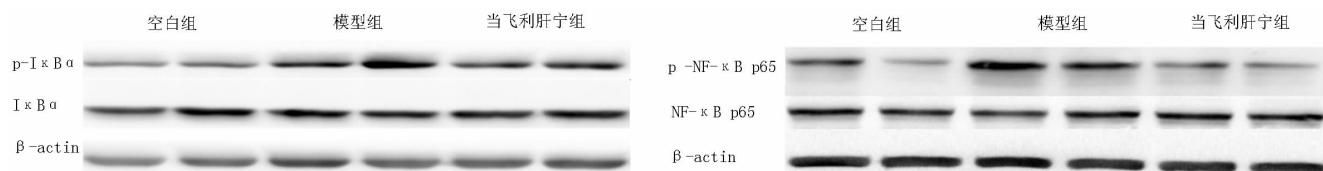
组别	鼠数	锌指蛋白 A20	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-8
空白组	10	1.09 $\pm$ 0.14	1.02 $\pm$ 0.25	1.16 $\pm$ 0.23	1.01 $\pm$ 0.27	0.90 $\pm$ 0.20
模型组	10	0.92 $\pm$ 0.21	5.23 $\pm$ 2.20**	42.17 $\pm$ 22.65*	24.83 $\pm$ 8.86**	1.88 $\pm$ 1.71
当飞利肝宁组	10	2.37 $\pm$ 1.08#	2.05 $\pm$ 0.96#	17.75 $\pm$ 8.94#	11.33 $\pm$ 2.47#	1.56 $\pm$ 1.07

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; IL-6, 白细胞介素 6; IL-8, 白细胞介素 8; 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

表 5 各组小鼠肝组织中 IκBα 和 NF-κB p65 蛋白及其磷酸化蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IκBα	p-IκBα	NF-κB p65	p-NF-κB p65
空白组	1.71 ± 0.43	2.21 ± 0.14	0.72 ± 0.07	0.68 ± 0.08
模型组	2.15 ± 0.34	2.66 ± 0.36*	0.62 ± 0.11	0.80 ± 0.18*
当飞利肝宁组	1.78 ± 0.18	1.50 ± 0.24##	0.91 ± 0.07#	0.29 ± 0.10#

注: NF-κB p65, 核因子 κB p65; p-NF-κB p65, 磷酸化核因子 κB p65; IκBα, 核因子 κB 抑制蛋白 α; p-IκBα, 磷酸化核因子 κB 抑制蛋白 α; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$



注: NF-κB p65, 核因子 κB p65; p-NF-κB p65, 磷酸化核因子 κB p65; IκBα, 核因子 κB 抑制蛋白 α; p-IκBα, 磷酸化核因子 κB 抑制蛋白 α

图 1 各组小鼠肝组织中 NF-κB p65、p-NF-κB p65、IκBα、p-IκBα 蛋白电泳图

3 讨论

根据肝损伤患者临床表现可归于中医学“胁痛”“黄疸”辨证论治,重症患者可参照“积聚”“鼓胀”辨治。肝损伤病因可分为内外两因,内因是正气不足,外因是湿热疫毒侵袭,病位在肝,可涉及脾、胃、胆、肾等脏腑。治疗上清热利湿解毒是常用治法,可辅以益气健脾、理气活血等^[1]。当飞利肝宁胶囊具有清热利湿、益肝退黄作用,是治疗各种原因肝损伤的常用制剂。

急性肝损伤以严重的炎症反应和肝细胞坏死为特征,可导致病情进展为肝衰竭^[2]。有研究^[3-14]已证实,炎症在急性肝损伤的发展中具有重要作用。当飞利肝宁胶囊的药用成分为当药和水飞蓟的提取物,对这两种植物提取物的前期研究^[7-18]显示,其对炎症损伤具有抑制作用。当飞利肝宁胶囊对四氯化碳(CCl_4)诱导的非酒精性脂肪肝大鼠肝脏损伤具有一定的保护作用^[9]。

急性肝损伤的两种临床判断方法是血清转氨酶水平的快速升高和肝组织活检的炎症浸润^[9]。在本研究中,我们将 D-半乳糖胺经腹腔注射入小鼠体内后,从肝组织 HE 染色和血清转氨酶水平升高再次证实急性肝损伤模型的建立。而当飞利肝宁胶囊的干预能有效缓解 D-半乳糖胺引起的转氨酶升高和炎症细胞浸润程度,说明当飞利肝宁胶囊对急性肝损伤模型小鼠起到了减轻肝脏损伤的作用。

锌指蛋白 A20 可以通过对核因子 κB (NF-κB) 激活后的负反馈调节,起到抑制炎症的作用^[20]。研究^[21]发现,炎症刺激诱导后表达的锌指蛋白

A20 可抑制多种促炎因子如 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8、细胞间黏附分子的过度释放所引起的细胞凋亡和坏死。既往研究^[22]表明, D-半乳糖胺和脂多糖(LPS)刺激后,肝细胞中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 表达明显增加。本研究结果显示,模型组小鼠 TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA 水平明显升高,证实了炎症的产生。而当飞利肝宁胶囊可显著上调小鼠肝脏组织中锌指蛋白 A20 mRNA 表达水平,并逆转了 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 水平的升高。因此,我们认为调控锌指蛋白 A20 的表达可能是当飞利肝宁胶囊治疗肝损伤的潜在机制之一。

在正常生理条件下, NF-κB 是存在于细胞质的非活化形式的二聚体,当受到炎症细胞因子或其他外部的刺激后,会导致细胞质 IκBα 的磷酸化,而 IκBα 的磷酸化则使 NF-κB 被激活并参与细胞炎症反应和细胞凋亡的过程^[23]。随着研究的逐步深入,发现锌指蛋白 A20 的表达水平及调控的分子的表达参与 NF-κB 信号通路激活后的负反馈调节^[24-25]。本研究结果显示,模型组小鼠 p-IκBα 及 p-NF-κB p65 蛋白表达升高,说明 NF-κB 信号通路异常激活,而当飞利肝宁胶囊的干预可以抑制 IκBα 及 NF-κB p65 的蛋白磷酸化。

综上所述,当飞利肝宁胶囊能有效缓解 D-半乳糖胺诱导的小鼠急性肝损伤,通过调节肝组织锌指蛋白 A20 的表达从而抑制 NF-κB 信号通路的活化可能是潜在的药效机制之一。D-半乳糖胺诱导的损伤模型虽然在病理学上接近人体急性肝损伤的病理改变,其致损伤机制主要是影响肝细胞的蛋白合成,无法体现机体免疫功能在参与肝损伤与修复过

程中的重要作用,今后有必要结合免疫性肝损伤模型进行综合评价。

参考文献

- [1] AYATA CK, GANAL SC, HOCKENJOS B, et al. Purinergic P2Y2 receptors promote neutrophil infiltration and hepatocyte death in mice with acute liver injury [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(6): 1620–1629.
- [2] BERNAL W, WENDON J. Acute liver failure [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(26): 2525–2534.
- [3] BERNAL W, HYYRYLAINEN A, GERA A, et al. Lessons from look-back in acute liver failure? A single centre experience of 3300 patients [J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 74–80.
- [4] 黄欣, 张哲永. 当飞利肝宁胶囊治疗非酒精性脂肪性肝病 32 例临床观察 [J]. *中医杂志*, 2007, 48(6): 524–525.
- [5] 丁葆英. 当飞利肝宁胶囊治疗慢性乙型肝炎 45 例 [J]. *中医杂志*, 2009, 50(4): 367–367.
- [6] 马欢杰. 当飞利肝宁胶囊治疗慢性乙型肝炎肝纤维化患者 50 例 [J]. *中医杂志*, 2009, 50(9): 75.
- [7] 赵灏, 陈伟平, 蒋兰英. 当飞利肝宁胶囊对慢性乙型肝炎患者抗氧化体系的影响 [J]. *中医杂志*, 2007, 48(5): 466.
- [8] SONG HY, MAO ZM, YANG LL, et al. Dangfei liganning capsules attenuate the susceptibility of rat nonalcoholic fatty liver to carbon tetrachloride toxicity [J]. *J Tradit Chin Med*, 2011, 31(4): 327–333.
- [9] MARKOV AK, FARIAS LA, BENNETT WS, et al. Prevention of galactosamine-induced hepatotoxicity in rats with fructose-1,6-diphosphate [J]. *Pharmacology*, 1991, 43(6): 310–317.
- [10] National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals [M]. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011: 963–965.
- [11] 杨建辉, 杨柳青, 张峰. 中医药抗肝损害的研究近况 [J]. *河南中医*, 2012, 32(7): 839–841.
- [12] EMOND JC, ARAN PP, WHITTINGTON PF, et al. Liver transplantation in the management of fulminant hepatic failure [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(6): 1583.
- [13] LIU S, TIAN L, CHAI G, et al. Targeting heme oxygenase-1 by quercetin ameliorates alcohol-induced acute liver injury via inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Food Funct*, 2018, 9(8): 4184–4193.
- [14] WANG D, GAO Q, ZHAO G, et al. Protective effect and mechanism of theanine on lipopolysaccharide-induced inflammation and acute liver injury in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(29): 7674–7683.
- [15] YANG X, FUJISAWA M, YOSHIMURA T, et al. Spred2 deficiency exacerbates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice via increased production of TNF α [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 188.
- [16] MORIO K, IMAMURA M, DAIJO K, et al. Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein level increases in patients with acute liver injury [J]. *J Gastroenterol*, 2017, 52(12): 1252–1257.
- [17] BAHMANI M, SHIRZAD H, RAFIEIAN S, et al. Silybum marianum: beyond hepatoprotection [J]. *J Evid Based Complement Altern Med*, 2015, 20(4): 292–301.
- [18] ALACA N, ZBEYLI D, USLU S, et al. Treatment with milk thistle extract (silybum marianum), ursodeoxycholic acid, or their combination attenuates cholestatic liver injury in rats: role of the hepatic stem cells [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2017, 28(6): 476–484.
- [19] MAO ZM, SONG HY, YANG LL, et al. Effects of the mixture of Swertia pseudochinensis Hara and Silybum marianum Gaertn extracts on CCl₄-induced liver injury in rats with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J Chin Integr Med*, 2012, 10(2): 193–199.
- [20] DANIEL S, ARVELO MB, PATEL VI, et al. A20 protects endothelial cells from TNF α , Fas α , and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation [J]. *Blood*, 2004, 104(8): 2376–2384.
- [21] CATRYSSSE L, GHAREMANI MF, VEREECKE L, et al. A20 prevents chronic liver inflammation and cancer by protecting hepatocytes from death [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(6): e2250.
- [22] XU H, WANG L, ZHENG P, et al. Elevated serum A20 is associated with severity of chronic hepatitis B and A20 inhibits NF- κ B-mediated inflammatory response [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 38914–38926.
- [23] MANNA SK. Double-edged sword effect of biochanin to inhibit nuclear factor kappaB: Suppression of serine/threonine and tyrosine kinases [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2012, 83(10): 1383–1392.
- [24] ZHAN J, QIN W, ZHANG Y, et al. Upregulation of neuronal zinc finger protein A20 expression is required for electroacupuncture to attenuate the cerebral inflammatory injury mediated by the nuclear factor- κ B signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 258.
- [25] LEE SH, LEE HR, KWON JY, et al. A20 ameliorates inflammatory bowel disease in mice via inhibiting NF- κ B and STAT3 activation [J]. *Immunol Lett*, 2018, 198: 44–51. doi: 10.1016/j.imlet.2018.03.015.

Effects of Dangfei Liganning Capsules (当飞利肝宁胶囊) on the Expression of Zinc Finger Protein A20 and NF- κ B Signaling Pathway in the Liver Tissue of Acute Liver Injury Model Mice

ZHOU Wenjun, MIAO Hongyu, LI Meng, DANG Yanqi, ZHANG Li, XU Hanchen, JI Guang

Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200032

ABSTRACT **Objective** To explore the protective effect and mechanism of *Dangfei Liganning Capsules* (当飞利肝宁胶囊) on acute liver injury. **Method** A total of 30 C57BL/6 mice were randomly divided into a blank group, a model group and a *Dangfei Liganning Capsules* group, with 10 mice in each group. *Dangfei Liganning Capsules* group was given *Dangfei Liganning Capsules* 0.225 g/ (kg · d) by gavage for 10 days, and mice in the blank group and model group were given the same amount of normal saline by gavage. After intervention, mice in the model group and *Dangfei Liganning Capsules* group were given intraperitoneal injection of D-galactosamine 800 mg/kg to establish acute liver injury models, and mice in the control group were intraperitoneally injected with 100 μ l of normal saline. Samples were taken 24 hours later to detect liver tissue pathology and liver function including alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), zinc finger protein A20 and tumor necrosis factor α (TNF- α) expression in serum and liver tissue homogenate, expression of zinc finger protein A20, TNF- α , interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) mRNA and expression of nuclear factor κ B p65 (NF- κ B p65) and phosphorylated nuclear factor κ B p65 (p-NF- κ B p65), nuclear factor κ B inhibitory protein α (I κ B α), phosphorylated nuclear factor κ B inhibitory protein α (p-I κ B α) protein in liver tissue. **Results** Liver histopathological results showed that the infiltration of inflammatory cells in the liver tissue of mice in the model group was significantly increased, while the infiltration of inflammatory cells in the liver tissue of mice in the *Dangfei Liganning Capsules* group was significantly improved compared to the model group. Compared with the blank group, the serum ALT and AST levels of the model group increased, TNF- α expression in the serum and liver tissue increased, expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA and expression of p-I κ B α and p-NF- κ B p65 protein in the liver tissue increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, in *Dangfei Liganning Capsules* group, serum ALT and AST levels decreased, expression of zinc finger protein A20 in the serum and liver tissue increased, TNF- α expression decreased, expression of zinc finger protein A20 mRNA and expression of NF- κ B p65 protein increased, TNF- α , IL-1 β , IL-6 mRNA, and expression of p-I κ B α and p-NF- κ B p65 protein in the liver tissue decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Dangfei Liganning Capsules* can effectively improve acute liver injury in mice. Up-regulating the expression of zinc finger protein A20 to regulate the activation of NF- κ B signaling pathway may be one of its potential mechanisms. **Keywords** acute liver injury; *Dangfei Liganning Capsules* (当飞利肝宁胶囊); zinc finger protein A20; inflammatory factor; NF- κ B signaling pathway

(收稿日期: 2020-06-01; 修回日期: 2020-07-18)

编辑: 邓媛

《中医杂志》(英文版) 欢迎投稿

Journal of Traditional Chinese Medicine [《中医杂志》(英文版)] (ISSN 0255-2922, CN 11-2167/R, 双月刊) 由中华中医药学会与中国中医科学院联合主办, 是我国中医药界具有权威的中医药英文科技期刊, 现发行和交换 90 多个国家和地区。

《中医杂志》(英文版) 自 1981 年创刊以来一直坚持正确的办刊宗旨, 国际影响力不断提升。2010 年入选 SCI-E (《科学引文索引》扩刊版), 2011 年获得中国中医科学院自主选题项目资助, 2013 年获得“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助, 自 2012 年起连续被评为“中国最具国际影响力学术期刊”。本刊先后被国际知名文献数据库 MEDLINE、《化学文摘》(CA)、《医学文摘》(EM) 等收录, 是 MEDLINE 收录的第一份中国出版的中医药期刊, 是 SCI 收录的 30 余种全科医学和替代医学期刊中唯一的中国传统医学综合性学术期刊。

《中医杂志》(英文版) 主要栏目包括循证研究、理论研究、基础研究、临床观察、中药研究、文献研究, 思路与方法、综述等。内容以报道中医药基础、临床研究成果和科研前沿进展为主, 覆盖中医药学科各个领域。欢迎广大专家学者积极投稿。作者可直接登录本刊网站 <http://www.journalctcm.com> 投稿。

联系邮箱: jtcmen@126.com。电话: 010-64089190。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。