

溪黄草水提物对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的保护作用及机制研究^Δ

许琼梅^{1*}, 李跃龙¹, 曹后康¹, 陈春¹, 王刚¹, 朱依淳¹, 张可锋^{1,2#} (1. 桂林医学院药物研究所, 广西桂林 541004; 2. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000)

中图分类号 R575;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)20-2791-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.20.12

摘要 目的:研究溪黄草水提物(RWE)对四氯化碳(CCl₄)诱导大鼠肝纤维化(HF)的保护作用及其机制。方法:将60只雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组(0.12 mg/kg)和RWE低、中、高剂量组(4、8、16 g/kg,以生药量计),每组10只。除正常组大鼠腹腔注射橄榄油外,其余各组大鼠均腹腔注射40% CCl₄橄榄油溶液以复制HF模型。自建模第1天起,各给药组大鼠均灌胃相应药物(10 mL/kg),正常组和模型组大鼠均灌胃等体积水,每天1次,连续6周。给药结束后,采用生化法或酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)的含量以及肝组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β 的含量或活性;采用苏木精-伊红染色观察大鼠肝组织病理学变化;采用蛋白质印迹法检测大鼠肝组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)蛋白表达情况。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清中ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、Ⅳ-C的含量以及肝组织中MDA、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量均显著升高($P < 0.01$),肝组织中SOD、GSH-Px的活性均显著降低($P < 0.01$);肝组织纤维化明显;肝组织中 α -SMA、TGF- β_1 蛋白的相对表达量均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,秋水仙碱组和RWE各剂量组大鼠血清中ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、Ⅳ-C的含量以及肝组织中MDA、TNF- α 、IL-6的含量,秋水仙碱组和RWE中、高剂量组大鼠肝组织中IL-1 β 的含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),秋水仙碱组和RWE各剂量组大鼠肝组织中SOD、GSH-Px的活性均显著增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肝组织纤维化程度明显减轻;肝组织中 α -SMA、TGF- β_1 蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.01$)。结论:RWE对CCl₄诱导的HF模型大鼠具有一定的保护作用,其作用机制可能与调节脂质代谢减轻肝脂质过氧化损伤、抗氧化应激反应、抑制炎症因子释放及TGF- β_1 蛋白表达等有关。

关键词 溪黄草;水提物;肝纤维化;四氯化碳;氧化应激;炎症因子;转化生长因子 β_1 ;大鼠

Protective Effects and the Mechanism Study of Water Extract of *Rabdosia serra* on Hepatic Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats

XU Qiongmei¹, LI Yuelong¹, CAO Houkang¹, CHEN Chun¹, WANG Gang¹, ZHU Yizhun¹, ZHANG Kefeng^{1,2} (1. Institute of Pharmacy, Guilin Medical University, Guangxi Guilin 541004, China; 2. School of Pharmacy, Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the protective effects and the mechanism of *Rabdosia serra* water extract (RWE) on hepatic fibrosis (HF) induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats. **METHODS:** Sixty male SD rats were randomly divided into normal group, model group, colchicine group (0.12 mg/kg), and RWE low-dose, medium-dose and high-dose groups (4, 8, 16 g/kg, by crude drug), with 10 rats in each group. Except for intraperitoneal injection of olive oil for normal group, other groups were given 40% CCl₄ olive oil solution intraperitoneally to induce HF model. Since the first day of modeling, each treatment group was given relevant medicine (10 mL/kg) intragastrically, while normal group and model group were given constant volume of water intragastrically, once a day, for consecutive 6 weeks. After medication, biochemical process or ELISA were used to determine the contents of ALT, AST, HA, LN, PCⅢ and Ⅳ-C in serum, the activities or contents of SOD, GSH-Px, MDA, TNF- α , IL-6 and IL-1 β in liver tissue. Pathological changes of liver tissue in rats were observed by HE staining. The expression of α -SMA and TGF- β_1 in liver tissue were detected by Western blot. **RESULTS:** Compared with normal group, the contents of ALT, AST, LN, HA, PCⅢ and Ⅳ-C in serum, the contents of MDA, TNF- α , IL-6 and IL-1 β in liver tissue were all increased significantly in model group ($P < 0.01$); the activities of SOD and GSH-Px in liver tissue were decreased significantly ($P < 0.01$). Liver fibrosis was obvious, and the relative expression of α -SMA and TGF- β_1 were increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, the contents of ALT, AST, HA, LN, PCⅢ and Ⅳ-C in serum as well as the contents of MDA, TNF- α and IL-6 in liver tissue in colchicines group and RWE groups, the contents of IL-1 β in liver tissue of rats in colchicines group, RWE medium-dose and high-dose groups were all decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The activities of SOD and GSH-Px in liver

^Δ 基金项目:广西壮族自治区教育厅八桂学者专项经费项目(No. 桂财教函[2017]143号)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理学。E-mail:249218755@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:生药质量及其研发。电话:0773-2303431。E-mail:xueshengcailiao@163.com

tissue of rats were increased significantly in colchicines group and RWE groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The fibrosis degree of liver tissue was significantly reduced, while the relative expression of α -SMA and TGF- β_1 decreased significantly ($P < 0.01$). CONCLUSIONS: RWE can protect CCl₄-induced HF model rats, the mechanism of which may be associated with regulating lipid metabolism, relieving liver lipid peroxidation injury and anti-oxidative stress response, inhibiting the release of inflammatory factors and the expression of TGF- β_1 .

KEYWORDS *Rabdosia serra*; Water extract; Hepatic fibrosis; Carbon tetrachloride; Oxidative stress; Inflammatory factor; TGF- β_1 ; Rats

肝纤维化(HF)是多数慢性肝病共同的病理特征,随着对HF发病机制研究的深入,目前国内外学者普遍认为,延缓或逆转HF的发生是大多数慢性肝病治愈的关键^[1]。肝星状细胞(HSC)在正常情况下为静止型,但当其受到遗传异常、胆汁淤积、病毒感染、酒精摄入等内外因素的长期刺激时,可被激活并转变为肌成纤维细胞(MFB),进而造成细胞外基质(ECM)合成与降解的失衡,导致大量ECM异常沉积,从而引发或加速HF^[2]。

研究表明,秋水仙碱能通过促进胶原酶降解、抑制炎症反应等途径来修复肝细胞,从而发挥抗HF的作用,临床上已将其广泛应用于HF的治疗,但由于该药对不同病因所致HF的治疗效果不一且副作用较多,使得其临床应用受限,而目前尚无针对HF的特效药^[3]。我国中药资源丰富,其应用也十分普遍。中药治疗具有多层次、多靶点、副作用小的特点,对于HF等慢性疾病的防治具有显著优势^[4]。溪黄草[*Rabdosia serra* (Maxim.) Hara]为唇形科植物线纹香茶菜[*R. lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) Hara]干燥全草的地上部分,又名山熊胆、风血草,主产于长江以南的云南、广东、广西等地区,具有清热利湿、退黄、凉血散瘀之功效,民间主要用于治疗黄疸型肝炎^[5]。已有研究证实,溪黄草水煎剂对肝损伤具有明显的防治作用^[6],但有关其抗HF的作用及机制却鲜有报道。为此,本研究以秋水仙碱为阳性对照药物,通过四氯化碳(CCl₄)诱导复制大鼠HF模型,初步探讨溪黄草水提物(RWE)对大鼠HF的保护作用及其可能机制,为溪黄草抗HF药物的研制及应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

AUW220D型半微量电子天平(日本Shimadzu公司);Epoch型全波长酶标仪(美国Bio-Tek公司);BX51型正置显微镜(日本Olympus公司);H2050R型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机厂,离心半径:6 cm);Tanon 5200型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

1.2 药材

溪黄草药材(批号:20170216)购自广西桂林市七星区六合路中药材市场,由桂林医学院张可锋副教授鉴定为唇形科植物线纹香茶菜[*R. lophanthoides* (Buch.-Ham. ex D. Don) Hara]干燥全草的地上部分。

1.3 药品与试剂

秋水仙碱对照品(国药集团化学试剂有限公司,批

号:20170214,纯度:≥99.0%);苏木精-伊红(HE)染色液以及丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为HE20161228、20170801、20170601、20170728、20171221、20171022);透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β 检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为N20012900、AK0017AUG30010、AK0017AUG30008、AK0017AUG30009、AK0017FEB2011、AK0017FEB22012、AK0016APR16014);蛋白酶抑制剂、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液、RIPA裂解液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(南通市碧云天生物技术研究所,批号分别为20170513、20170804、p0008、p0012);兔抗鼠转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、兔抗鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(美国Abcam公司,批号分别为GR121504-3、GR105729-1); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(无锡傲锐东源生物科技有限公司,批号:17AV0305);山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗、山羊抗兔IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为112438、133599);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司,批号:K2JA4078IK);三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(TBST)溶液(北京索莱宝科技有限公司,批号:20170624);CCl₄等试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.4 动物

SPF级雄性SD大鼠60只,6周龄,体质量180~220 g,由桂林医学院SPF实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(桂)2013-0001]。所有大鼠均适应性喂养1周后开始实验。

2 方法

2.1 RWE的制备

取溪黄草药材2.7 kg,加水32.4 L浸泡1 h后,加热至沸腾,保持微沸状态,提取1.5 h;同法提取2次,经双层纱布滤过后,合并滤液,浓缩得质量浓度为1.6 g/mL(以生药量计)的药液,置于4℃冰箱中密封保存,临用前用水稀释至相应浓度。

2.2 分组、造模与给药

将60只SD大鼠适应性喂养1周后,按体质量分层随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组(阳性对照,0.12 mg/kg)和RWE低、中、高剂量组(4、8、16 g/kg,以生药量计),每组10只。秋水仙碱组大鼠用药剂量参考文献[7]

确定;RWE各剂量组参考溪黄草成人临床用药剂量(40 g),通过成人与大鼠等效剂量折算系数(0.02)换算最低剂量,并按常用倍数(2、4倍)设置^[5,8]。实验室温度维持在(20±2)℃,所有大鼠均自由进食、饮水。除正常组大鼠腹腔注射橄榄油(1 mL/kg)外,其余5组大鼠均腹腔注射40% CCl₄橄榄油溶液(1 mL/kg)复制HF模型,每周2次,连续6周^[9]。自造模第1天起,各给药组大鼠均灌胃相应药物(10 mL/kg),正常组和模型组大鼠均灌胃等体积水,每天1次,连续6周。

2.3 血清中相关指标的检测

各组大鼠于末次给药后禁食、不禁水16 h,摘除大鼠眼球取血,于4℃下以转速4 000 r/min离心15 min,分离血清,采用生化法检测血清中ALT、AST的含量,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中HA、LN、PCⅢ、Ⅳ-C的含量。上述指标均使用酶标仪检测,严格按照检测试剂盒说明书操作。

2.4 肝组织中相关指标的检测

采血后处死各组大鼠,取其相同部位肝组织100 mg,加入生理盐水1 mL,研磨,制成10%(m/V)肝组织匀浆,于4℃下以转速4 000 r/min离心15 min,取上清液,置于-20℃贮存,待用。采用生化法检测肝组织中MDA、SOD、GSH-Px的含量或活性,采用ELISA法检测肝组织中TNF-α、IL-6、IL-1β含量。上述指标均使用酶标仪检测,严格按照检测试剂盒说明书操作。

2.5 肝组织病理学观察

切取各组大鼠肝组织适量,用4%多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,切片(厚度约为4 μm),经脱蜡、封片后,行常规HE染色,于正置显微镜下观察肝组织病理学变化。

2.6 蛋白表达情况的检测

表1 各组大鼠血清中ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、Ⅳ-C含量的检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Determination results of the serum contents of ALT, AST, HA, LN, PCⅢ and Ⅳ-C of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	ALT, U/L	AST, U/L	HA, μg/L	LN, μg/L	PCⅢ, μg/L	Ⅳ-C, μg/L
正常组	40.86±3.56	68.19±8.21	103.91±9.96	104.29±12.03	64.75±7.64	216.32±20.07
模型组	152.53±18.59*	212.34±20.03*	248.86±22.69*	268.47±28.31*	188.32±20.11*	354.12±32.83*
秋水仙碱组	101.47±11.20**	156.98±16.44**	151.89±14.76**	192.44±21.36**	147.83±16.98**	296.34±28.56**
RWE低剂量组	119.72±14.58**	169.95±17.54**	225.81±20.58*	235.75±25.28*	167.22±18.01*	314.58±30.18*
RWE中剂量组	102.67±11.77**	134.01±12.62**	189.31±17.18**	206.38±21.63**	159.83±17.51**	298.03±29.12**
RWE高剂量组	85.42±9.12**	106.29±10.13**	148.69±13.24**	185.24±20.68**	151.17±17.60**	290.12±28.86**

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.05$,*** $P<0.01$

Note: vs. normal group, * $P<0.01$; vs. model group, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$

3.2 RWE对HF模型大鼠肝组织中MDA、SOD、GSH-Px、TNF-α、IL-6、IL-1β含量或活性的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中MDA、TNF-α、IL-6、IL-1β的含量均显著升高,SOD、GSH-Px的活性均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组大鼠肝组织中MDA、TNF-α、IL-6、IL-1β的含量,RWE各剂量组大鼠肝组织中MDA、TNF-α、IL-6的含量以及RWE中、高剂量组大鼠肝组织

采用蛋白质印迹法(Western blot)检测肝组织中α-SMA、TGF-β₁蛋白的表达情况。切取各组大鼠肝组织50 mg,置于玻璃匀浆器中,加入含蛋白酶抑制剂(体积分数为1%)的RIPA裂解液1 mL,于4℃下研磨,制成匀浆,并于4℃下以转速14 000 r/min离心5 min,取上清液,参照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书步骤测定蛋白含量。蛋白定量后,加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液适量,于95℃水浴中加热5 min变性。将变性后的蛋白进行SDS-PAGE电泳分离,并于恒流200 mA的条件下转膜2.5 h至PVDF膜上,以5%脱脂牛奶封闭2 h,用TBST溶液清洗3次,每次10 min。然后分别加入α-SMA抗体(1:1 000)、TGF-β₁抗体(1:1 000)和β-actin抗体(1:1 000),于4℃下孵育过夜,随后加入二抗(α-SMA、TGF-β₁:山羊抗兔IgG二抗,β-actin:山羊抗鼠IgG二抗;加入量均为1:5 000),于室温下孵育2 h。采用全自动化学发光图像分析系统进行成像,使用Quantity One 4.6软件分析蛋白条带灰度值,以β-actin作为内参,计算α-SMA、TGF-β₁蛋白的相对表达量^[9]。

2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 RWE对HF模型大鼠血清中ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、Ⅳ-C含量的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、Ⅳ-C的含量均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组和RWE各剂量组大鼠血清中上述指标的含量均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表1。

中IL-1β的含量均显著降低,秋水仙碱组和RWE各剂量组大鼠肝组织中SOD、GSH-Px的活性均显著增强,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表2。

3.3 RWE对HF模型大鼠肝组织病理学变化的影响

正常组大鼠肝小叶结构完整,汇管区结构清晰,汇管区周围未见小胆管及纤维组织增生,细胞排列整齐。模型组大鼠肝小叶结构模糊,小叶内细胞水肿,局灶肝细胞出现点状坏死、炎症细胞浸润及充血现象,纤维化

表2 各组大鼠肝组织中MDA、SOD、GSH-Px、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量或活性的检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Determination results of contents and activities of MDA, SOD, GSH-Px, TNF- α , IL-6 and IL-1 β in liver tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	MDA, nmol/mg prot	SOD, U/mg prot	GSH-Px, U/mg prot	TNF- α , pg/mL	IL-6, pg/mL	IL-1 β , pg/mL
正常组	4.81 \pm 0.42	232.25 \pm 21.84	457.21 \pm 42.14	158.73 \pm 14.73	46.28 \pm 5.84	74.32 \pm 8.47
模型组	7.32 \pm 0.68*	137.52 \pm 11.19*	248.36 \pm 22.84*	344.92 \pm 38.81*	116.87 \pm 13.37*	235.67 \pm 26.66*
秋水仙碱组	6.17 \pm 0.59 ^{##}	193.84 \pm 18.63 ^{##}	301.81 \pm 29.28 ^{##}	295.64 \pm 34.76 ^{##}	91.24 \pm 11.60 ^{##}	189.54 \pm 17.93 ^{##}
RWE低剂量组	6.65 \pm 0.67 [#]	184.33 \pm 17.46 [#]	292.79 \pm 28.63 [#]	308.46 \pm 33.80 [#]	103.12 \pm 13.49 [#]	216.65 \pm 23.31
RWE中剂量组	6.23 \pm 0.63 ^{##}	198.09 \pm 19.15 ^{##}	319.90 \pm 30.34 ^{##}	286.65 \pm 31.00 ^{##}	95.24 \pm 12.83 ^{##}	205.83 \pm 21.54 [#]
RWE高剂量组	5.81 \pm 0.48 ^{##}	210.14 \pm 20.30 ^{##}	328.57 \pm 31.62 ^{##}	264.58 \pm 27.77 ^{##}	87.59 \pm 10.43 ^{##}	187.54 \pm 21.16 ^{##}

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

明显。秋水仙碱组和RWE各剂量组大鼠肝组织中大部分肝小叶结构清晰,肝组织病变、炎症坏死及纤维化程度均有所减轻,且以秋水仙碱组和RWE高剂量组改善效果更为明显,详见图1。

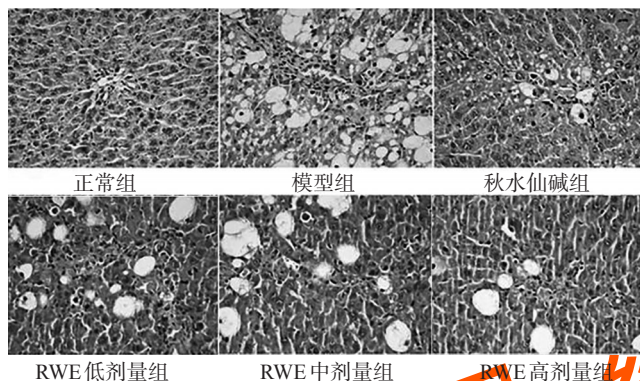


图1 各组大鼠肝组织的病理学切片显微图(HE, $\times 200$)

Fig 1 Micrographs of pathological section of liver tissue of rats in each group(HE, $\times 200$)

3.4 RWE对HF模型大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β_1 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β_1 蛋白的相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组和RWE各剂量组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β_1 蛋白的相对表达量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$),详见图2、表3。

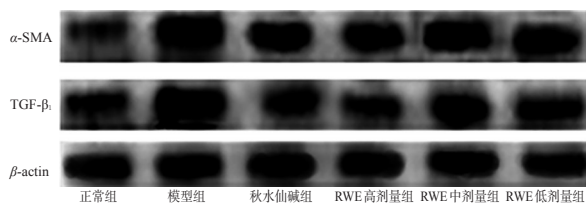


图2 各组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β_1 蛋白表达电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of protein expression of α -SMA and TGF- β_1 in liver tissue of rats in each group

4 讨论

CCl₄是经典的HF诱导剂,通过CCl₄诱导建立的HF动物模型,其肝组织在形态学、病理生理学等方面与人

表3 各组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β_1 蛋白相对表达量的检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Determination results of the relative expression of α -SMA and TGF- β_1 in liver tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	α -SMA	TGF- β_1
正常组	0.23 \pm 0.03	0.46 \pm 0.06
模型组	2.54 \pm 0.27*	1.86 \pm 0.21*
秋水仙碱组	1.47 \pm 0.16 [#]	0.76 \pm 0.08 [#]
RWE低剂量组	1.66 \pm 0.19 [#]	1.17 \pm 0.13 [#]
RWE中剂量组	1.38 \pm 0.15 [#]	0.82 \pm 0.11 [#]
RWE高剂量组	0.95 \pm 0.12 ^{##}	0.55 \pm 0.06 ^{##}

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

类相似^[9]。CCl₄被机体吸收后可引起肝细胞损伤,使细胞膜通透性增加,导致胞内ALT、AST渗出进入血液,使其血液浓度明显升高^[11];与此同时,上述过程伴有HA、LN、PCⅢ、IV-C水平的明显升高,这四者是参与ECM合成的重要成分,能导致肝组织正常结构被破坏,可准确、灵敏地反映肝内纤维产生及肝细胞受损的情况,是临床诊断HF的敏感指标^[12-13]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠血清中ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、IV-C的含量均显著升高,差异均有统计学意义,且肝细胞病变、坏死和纤维化程度明显,提示HF模型复制成功。与模型组比较,秋水仙碱组和RWE各剂量组大鼠血清中上述指标的含量均显著降低,差异均有统计学意义,且肝细胞病变、坏死和纤维化程度均明显减轻,提示RWE能改善HF,对HF模型大鼠具有一定的保护作用。

MDA为自由基参与脂质过氧化反应的最终产物,其异常表达可严重破坏细胞膜的结构,导致细胞肿胀、坏死^[14]。在正常情况下,机体的抗氧化防御系统可以通过抑制自由基产生、清除自由基、修复损伤及诱导抗氧化酶来发挥保护作用,其中SOD和GSH-Px是重要的抗氧化酶,能够有效清除自由基,抑制脂质过氧化物形成^[15]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠肝组织中MDA的含量显著上升,SOD、GSH-Px的活性均显著降低,差异均有统计学意义。这提示其机体脂质代谢紊乱,抗氧化能力减弱。与模型组比较,秋水仙碱组和RWE各剂量组大鼠肝组织中MDA的含量均显著

降低,SOD、GSH-Px的活性均显著增强,差异均有统计学意义。这提示RWE具有调节脂质代谢、减轻肝脂质过氧化损伤以及增强抗氧化酶活性的作用。

有研究表明,几乎在所有肝病的发展过程中都伴有不同程度的氧化应激(OS)反应^[16]。OS反应相关产物能够直接或间接作用于肝细胞,引起脂质、蛋白质等大分子变性,破坏其细胞膜和亚细胞器的结构,造成持续性氧化损伤,并激活枯否细胞(KC),活化的KC会分泌大量的炎症因子(如TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等),这些炎症因子通常以自分泌或旁分泌的形式释放,并直接刺激HSC的活化与增殖^[17-18];而活化后的HSC本身也会产生促HF因子,通过反馈性调节自身或周围HSC细胞群落,维持和增强其纤维化状态,故炎症因子的释放程度可以反映肝内OS水平^[19]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠肝组织中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量均显著升高,差异均有统计学意义。这提示HF可引发炎症反应。与模型组比较,秋水仙碱组和RWE各剂量组大鼠肝组织中TNF- α 、IL-6的含量,秋水仙碱组和RWE中、高剂量组大鼠肝组织中IL-1 β 的含量均显著降低,差异均有统计学意义。这提示RWE抗HF的作用机制可能与减少TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子的释放有关。

TGF- β_1 是公认最具代表性的促HF因子,在HSC的激活和HF维持过程中起着关键作用^[20]。在HF发展进程中,TGF- β_1 释放的纤溶酶与其他蛋白酶可进一步通过自身调节机制增加TGF- β_1 的表达^[20]。高水平的TGF- β_1 可调节相关基因转录,并刺激静止型HSC分化成以 α -SMA高表达为特征的MFB,引起ECM异常沉积,引发或加速HF进程,因此抑制TGF- β_1 产生也是阻止HF形成的重要途径之一^[2,21]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β_1 蛋白的相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义。这提示HF模型复制成功。与模型组比较,秋水仙碱组和RWE各剂量组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β_1 蛋白的相对表达量均显著降低,差异均有统计学意义。这提示RWE抗HF的作用机制可能是通过抑制 α -SMA和TGF- β_1 蛋白的表达来实现。

综上所述,RWE对CCl₄诱导的HF模型大鼠具有一定的保护作用,其作用机制可能与调节脂质代谢、减轻肝脂质过氧化损伤、抗OS反应、抑制炎症因子释放及TGF- β_1 蛋白表达等有关。溪黄草主要分布于我国西南地区,目前已有较为成熟的栽培、采摘及粗加工技术^[22],但民间多用于煲汤及制作凉茶,仅在部分地区用于肝胆疾病的辅助治疗,且相关研究主要集中于药效方面,而抗HF的作用机制研究尚不充分,导致其开发程度不高^[23]。本研究采用多项指标探讨了RWE对HF模型大鼠的保护作用,同时还对其机制进行了较为全面的考察,为溪黄草的开发利用奠定了理论基础,但其具体作用机制仍有待后续深入研究。

参考文献

- [1] SEIFERT L, DEUTSCH M, ALOTHMAN S, et al. Dec-1 regulates hepatic fibrosis and hepatocarcinogenesis by suppressing TLR4 signaling pathways[J]. *Cell Rep*, 2015,13(9):1909-1921.
- [2] VAN ROSSEN E, LIU Z, BLIJWEERT D, et al. Syncoilin is an intermediate filament protein in activated hepatic stellate cells[J]. *Histochem Cell Biol*, 2014, 141(1): 85-99.
- [3] 罗宏丽,肖顺林,余欣. 抑毒调肝合剂抗大鼠肝纤维化的作用及机制研究[J]. *中国药房*, 2017,28(4):501-504.
- [4] 曹后康,高雅,黄思茂,等. 杠板归总黄酮抗大鼠肝纤维化作用的机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2017,33(9):1303-1308.
- [5] 戴斌. 中国现代瑶药[M]. 南宁:广西科学技术出版社, 2010:638-639.
- [6] 刘银花,陈秀琴,沈婕,等. 溪黄草水煎剂对大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *山东中医杂志*, 2007,26(8):565-566.
- [7] 张可锋,黄思茂,陈毅飞,等. 七味净肝灵对二甲亚硝胺诱导肝纤维化大鼠的保护作用及其作用机制[J]. *中药材*, 2018,41(2):464-467.
- [8] 徐叔云,卞如濂,陈修,等. 药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:202-204,1350-1351.
- [9] 高雅,王刚,杜沛霖,等. 白马骨水提物对急性肝损伤小鼠氧化应激及炎症反应的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017,23(21):135-140.
- [10] SANG L, WANG XM, XU DY, et al. Morin enhances hepatic Nrf2 expression in a liver fibrosis rat model[J]. *World J Gastroenterol*, 2017,23(47):8334-8344.
- [11] SHAH MD, D' SOUZA UJA, IQBAL M. The potential protective effect of Commelina nudiflora L. against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity in rats, mediated by suppression of oxidative stress and inflammation[J]. *Environ Health Prev Med*, 2017. DOI: 10.1186/s12199-017-0673-0.
- [12] ZHANG K, GAO Y, ZHONG M, et al. Hepatoprotective effects of Dicliptera chinensis polysaccharides on dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis rats and its underlying mechanism[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016. DOI: 10.1016/j.jep.2015.12.053.
- [13] NALLAGANGULA KS, NAGARAJ SK, VENKATASWAMY L, et al. Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression[J]. *Future Science OA*, 2018. DOI: 10.4155/fsoa-2017-0083.
- [14] GUO Y, LIANG X, MENG M, et al. Hepatoprotective effects of Yulangsan flavone against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis in rats[J]. *Phytomedicine*, 2017. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.07.005.
- [15] RAY S, MURMU N, ADHIKARI J, et al. Inhibition of HepG2 hepatic cancer cell growth and CCl₄ induced liver cytotoxicity in Swiss albino mice by Mahua extract[J]. *J*

柴苓护肝颗粒的质量标准研究^Δ

莫国栋*, 杨瑾, 林丽, 谭芳廷(中山市第二人民医院, 广东中山 528477)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)20-2796-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.20.13

摘要 目的:建立柴苓护肝颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对制剂中柴胡、白术、甘草药材进行定性鉴别,采用紫外-可见分光光度法测定制剂中总黄酮(以芦丁计)的含量,并对制剂的水分、溶化性、粒度进行检查。结果:柴胡、白术、甘草的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。芦丁检测质量浓度线性范围为0.050~0.300 mg/mL($r=0.999\ 8$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率为97.89%~100.01%(RSD=0.68%, $n=9$);样品含量为1.920~2.018 mg/g。3批样品的水分含量分别为1.54%、1.62%、1.57%,均在5 min内容化,不能通过一号筛且能通过五号筛的总和分别为2.13%、2.51%、2.38%,均符合2015年版《中国药典》(四部)的规定。结论:初步拟定柴苓护肝颗粒中总黄酮的含量应不得低于1.57 mg/g(以芦丁计);所建质量标准的相关方法简便、快速、准确、重复性好,可用于柴苓护肝颗粒的质量控制。

关键词 柴苓护肝颗粒;质量标准;薄层色谱法;紫外-可见分光光度法;芦丁;总黄酮;柴胡;白术;甘草

Study on Quality Standard of Chailing Hupan Granules

MO Guodong, YANG Jin, LIN Li, TAN Fangting (Zhongshan Second People's Hospital, Guangdong Zhongshan 528477, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard of Chailing hupan granules. METHODS: TLC was used for qualitative identification of *Radix bupleuri*, *Atractylodes macrocephala* and *Glycyrrhiza uralensis*. The content of total flavonoids (by rutin) in preparation was determined by UV-visible spectrophotometry. The moisture, dissolubility and granularity of preparation were determined. RESULTS: TLC spots of *R. bupleuri*, *A. macrocephala* and *G. uralensis* were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range of rutin was 0.050-0.300 mg/mL ($r=0.999\ 8$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recoveries were 97.89%-100.01% (RSD=0.68%, $n=9$). The content of samples were 1.920-2.018 mg/g. The contents of moisture in 3 batches of samples were 1.54%, 1.62% and 1.57%; all samples dissolved within 5 min. The sum of granules not passing through No.1 sieve and passing through No.5 sieve were 2.13%, 2.51%, 2.38%, which were all in line with the requirements of *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, Vol IV). CONCLUSIONS: The content of total flavonoids in Chailing hupan granules should be no less than 1.57 mg/g (by rutin). Established quality standard is simple, rapid, accurate and reproducible, and can be used for quality control of Chailing hupan granules.

KEYWORDS Chailing hupan granules; Quality standard; TLC; UV-visible spectrophotometry; Rutin; Total flavonoids; *Radix bupleuri*; *Atractylodes macrocephala*; *Glycyrrhiza uralensis*

Environ Pathol Toxicol Oncol, 2014, 33(4):295-314.

- [16] YANG KL, CHANG WT, HONG MY, et al. Prevention of TGF- β -induced early liver fibrosis by a maleic acid derivative anti-oxidant through suppression of ROS, inflammation and hepatic stellate cells activation[J]. *PloS One*, 2017, 12(4):e0174008.
- [17] OTUNOLA GA, AFOLAYAN AJ. Therapeutic effect of aqueous extracts of three dietary spices and their mixture on lipid metabolism and oxidative stress in a rat model of chronic alcohol consumption[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2016, 29(4):1155-1161.
- [18] KARNER CM, ESEN E, OKUNADE AL, et al. Increased glutamine catabolism mediates bone anabolism in response to Wnt signaling[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(2):551-562.
- [19] 蒯博婷, 朱梦琳, 高雅, 等. 杠板归总黄酮对抗结核药物致肝损伤小鼠的保护作用及机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5):51-54.
- [20] Ghafoory S, Varshney R, Robison T, et al. Platelet TGF- β_1 deficiency decreases liver fibrosis in a mouse model of liver injury[J]. *Blood Adv*, 2018, 2(5):470-480.
- [21] MARRONE G, SHAH VH, GRACIA-SANCHO J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration [J]. *J Hepatol*, 2016, 65(3):608-617.
- [22] 邓乔华. 溪黄草资源分布与开发利用的研究[J]. *今日药学*, 2009, 19(9):21-25.
- [23] 黄珊珊. 中药溪黄草研究进展[J]. *今日药学*, 2016, 26(5):365-368.

^Δ 基金项目:中山市社会公益科技研究专项项目(No.2017B1099)

* 副主任药师, 硕士研究生。研究方向:医院药学、医院制剂。电话:0760-28103168。E-mail:moguodong2002@163.com

(收稿日期:2018-02-26 修回日期:2018-06-01)

(编辑:张元媛)