

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.24.005

龙胆总苷对肝纤维化模型大鼠相关指标的改善作用

汤小林^{1,2}, 章俐俐¹, 瞿萍¹

(1. 江西省儿童医院, 江西 南昌 330006; 2. 南昌大学药学院, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 探讨龙胆总苷对肝纤维化模型大鼠相关指标的改善作用。方法 将60只大鼠随机分为正常对照组(A组, 等体积0.9%氯化钠溶液), 模型组(B组, 等体积0.9%氯化钠溶液), 秋水仙碱组(C组, 0.25 mg/kg), 龙胆总苷高、中、低剂量组(D₁组、D₂组、D₃组, 100, 60, 20 mg/kg), 各10只。除A组外, 其余各组大鼠均腹腔注射15%四氯化碳(CCl₄)油溶液(4 mL/kg), 首剂加倍, 每周2次, 连续8周, 建立大鼠肝纤维化模型。建模当天, 各组大鼠均开始灌胃给予相应药物, 每天1次, 连续8周。以全自动生化分析仪测定大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)水平, 以酶联免疫吸附(ELISA)法测定大鼠血清中转化生长因子β₁(TGF-β₁)、透明质酸(HA)、Ⅲ型胶原(COL Ⅲ)水平, 测定大鼠肝组织匀浆中羟脯氨酸(Hyp)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平; 苏木素-伊红(HE)染色后电镜下观察大鼠肝脏组织病理学及炎症改变程度。结果 与A组比较, B组大鼠血清中的ALT, AST, TBil, HA, COL Ⅲ, TGF-β₁水平显著升高, 肝组织匀浆中Hyp和MDA水平显著升高, SOD水平显著降低($P < 0.05$), 大鼠肝组织病变明显; 与B组比较, C组及D₁组、D₂组、D₃组大鼠血清中AST, ALT, TBil, HA, COL Ⅲ, TGF-β₁水平均明显降低, 肝组织匀浆中Hyp和MDA水平显著降低, SOD水平显著升高($P < 0.05$), 肝组织损伤程度明显减轻。结论 龙胆总苷对肝纤维化模型大鼠各项指标均有较好的改善作用。

关键词: 龙胆总苷; 肝纤维化; 大鼠; 四氯化碳

中图分类号: R932; R285.5; R273

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)24-0017-04

Effect of Gentian Total Glycosides on the Improvement of Related Indexes in Rats with Liver Fibrosis

TANG Xiaolin^{1,2}, ZHANG Lili¹, QU Ping¹

(1. Jiangxi Provincial Children's Hospital, Nanchang, Jiangxi, China 330006; 2. College of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi, China 330006)

Abstract: Objective To investigate the effect of gentian total glycosides on the improvement of related indexes in rats with liver fibrosis. **Methods** Totally 60 SD rats were randomly divided into the normal control group (group A, equal volume of 0.9% sodium chloride solution), model group (group B, equal volume of 0.9% sodium chloride solution), colchicine group (group C, 0.25 mg/kg), gentian total glycosides high, medium and low dose groups (group D₁, group D₂ and group D₃, 100, 60, 20 mg/kg), 10 rats in each group. Except for group A, the rats in the other groups were intraperitoneally injected with 15% CCl₄ oil solution (4 mL/kg), the first dose was doubled, twice a week for 8 consecutive weeks, in order to establish the rat model with liver fibrosis. On the day of modeling, the rats in each group were given corresponding drugs by gavage once a day for 8 weeks. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBil) of rats were measured by automatic biochemical analyzer, and the levels of serum transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁), hyaluronic acid (HA), collagen type Ⅲ (Col Ⅲ) of rats were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the levels of hydroxyproline (Hyp), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the homogenate of rat's liver were measured. The histopathology and inflammatory changes of rat's liver were observed by electron microscope after hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** Compared with those in group A, the levels of serum ALT, AST, TBil, HA, COL Ⅲ, TGF-β₁ of rats were significantly higher, the levels of Hyp and MDA in liver homogenate were significantly higher, while the levels of SOD in liver homogenate were significantly lower in group B ($P < 0.05$), the pathological changes of liver tissue in group B were obvious. Compared with those in group B, the levels of serum AST, ALT, TBil, HA, COL Ⅲ and TGF-β₁ of rats were significantly lower, the levels of Hyp and MDA in liver homogenate were significantly lower, while the level of SOD in liver homogenate was significantly higher in group C, group D₁, group D₂ and group D₃ ($P < 0.05$), the degree of liver injury in group C, group D₁, group D₂ and group D₃ was significantly reduced. **Conclusion** Gentian total glycosides have good effect on the improvement of related indexes in rat models with liver fibrosis.

Key words: gentian total glycosides; liver fibrosis; rats; CCl₄

肝纤维化(HF)是各种因素诱发肝损伤时,在肝脏自我修复过程中出现的一种正常的生理病理过程,主要表现为细胞外基质(ECM)大量沉积,肝纤维化状况可作为评价肝病严重程度的重要指标^[1-3]。肝纤维化可被抑制,甚至能逆转,及时干预可有效减少各种严重肝脏疾病的发生、发展^[4]。龙胆为龙胆科植物条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag.、龙胆 *Gentiana scabra* Bge.、三花龙胆

Gentiana triflora Pall. 的干燥根或根茎^[5],具有清热燥湿、泻肝胆火的功效。现代药理学研究证实,龙胆具有保肝、抗炎、镇痛、解热、抗病毒、抗肿瘤等作用^[6-8]。龙胆总苷系从龙胆中提取纯化所得的有效成分。本研究拟考察龙胆总苷对四氯化碳(CCl₄)诱导的肝纤维化模型大鼠肝纤维化相关指标的影响,探讨龙胆总苷抗肝纤维化的作用机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂

动物:清洁级SD大鼠60只,雄性,体质量为 (180 ± 20) g,购于湖南斯莱克实验动物有限公司,合格证号为SCXK(湘)2011-0003。于温度 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $45\% \sim 50\%$ 环境中适应性喂养1周。

仪器:TGL-27M型台式高速冷冻离心机(上海高致精密仪器有限公司);BS124S型电子分析天平(德国Sartorius公司);CX-31型光学显微镜(日本Olympus公司);Chemix-180型全自动生化分析仪(日本Sysmex公司);UV-2550型紫外分光光度计(日本Shimadzu公司);RM2016型轮式石蜡切片机(奥地利Leica公司)等。

试剂:龙胆总苷(自制,含量 $>85\%$);秋水仙碱(湖北帝鑫化工制造有限公司,批号为201703110); CCl_4 (西陇化工股份有限公司,批号为2017120312);丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(批号为20161224),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(批号为20161219),白蛋白(Alb)试剂盒(批号为20170709),总胆红素(TBil)试剂盒(批号为20170218),均购自南京建成生物有限公司;羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(批号为20170522),透明质酸(HA)试剂盒(批号为20170406),Ⅲ型胶原(COL Ⅲ)试剂盒(批号为20170423),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号为20170319),丙二醛(MDA)试剂盒(批号为20170606),转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)试剂盒(批号为20170518),均购自上海森雄生化科技有限公司;食用大豆油为市场购买。

1.2 方法

分组、建模及给药:将60只大鼠随机分为正常对照组(A组,等体积0.9%氯化钠溶液),模型组(B组,等体积0.9%氯化钠溶液),秋水仙碱组(C组,0.25 mg/kg),龙胆总苷高、中、低剂量组(D_1 组、 D_2 组、 D_3 组,100, 60, 20 mg/kg),各10只。除A组外,其余各组大鼠均腹腔注射15% CCl_4 油溶液(4 mL/kg),首剂加倍,每周2次,连续8周。建模当天,各组大鼠均开始灌胃给予相应药物,每天1次,连续8周。

肝功能指标检测:末次给药后,大鼠禁食12 h,称定体质量后腹腔注射2%戊巴比妥钠(20 mg/kg),尾静脉取血,12 000 r/min离心10 min,取血清,以全自动生化分析仪测定ALT,AST,TBil水平。

肝纤维化指标检测:取上述血清,以酶联免疫吸附(ELISA)法检测TGF- β_1 ,HA,COL Ⅲ水平。

肝损伤及氧化应激指标检测:上述大鼠取血清后,处死,取适量肝右叶组织,用0.9%氯化钠溶液漂洗,滤纸拭干后称定质量,置烧杯后剪碎,倒入匀浆管,肝组织经充分匀浆,3 000 r/min离心15 min,取上清液,按试

剂盒方法测定Hyp,MDA,SOD水平。

组织病理学检查^[9-10]:取大鼠肝组织,切成适宜大小,用10%福尔马林液固定,脱水,透明,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,置光镜下观察大鼠肝组织病理学情况。

1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0统计学软件分析。数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对模型大鼠血清肝功能的影响

与A组比较,B组大鼠血清中ALT,AST,TBil水平均显著升高($P < 0.05$);与B组比较,C组及 D_1 组、 D_2 组、 D_3 组大鼠血清中ALT,AST,TBil水平均显著降低($P < 0.05$)。详见表1。

表1 各组大鼠血清中ALT,AST,TBil水平比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBil($\mu\text{mol/L}$)
A组	54.2 $\pm$ 4.85	143.7 $\pm$ 20.73	35.1 $\pm$ 5.4
B组	86.3 $\pm$ 15.17*	206.4 $\pm$ 25.31*	153.8 $\pm$ 28.1*
C组	74.5 $\pm$ 13.12#	181.7 $\pm$ 22.35#	49.8 $\pm$ 7.2#
D_1 组	68.3 $\pm$ 10.38#	168.4 $\pm$ 20.36#	40.9 $\pm$ 5.3#
D_2 组	73.4 $\pm$ 11.87#	176.3 $\pm$ 24.52#	50.9 $\pm$ 6.3#
D_3 组	78.2 $\pm$ 13.81#	185.6 $\pm$ 26.65#	55.6 $\pm$ 5.8#

注:与A组比较,* $P < 0.05$;与B组比较,# $P < 0.05$ 。下表同。

2.2 对模型大鼠血清肝纤维化程度的影响

与A组比较,B组大鼠血清中HA,COL Ⅲ,TGF- β_1 水平均显著升高($P < 0.05$);与B组比较,C组及 D_1 组、 D_2 组、 D_3 组大鼠血清中HA,COL Ⅲ,TGF- β_1 水平均显著降低($P < 0.05$)。详见表2。

表2 各组大鼠血清中HA,COL Ⅲ,TGF- β_1 水平比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	HA(ng/mL)	COL Ⅲ($\mu\text{g/L}$)	TGF- β_1 (ng/mL)
A组	158.39 $\pm$ 46.51	56.17 $\pm$ 10.47	0.98 $\pm$ 0.13
B组	558.94 $\pm$ 180.64*	78.35 $\pm$ 16.26*	2.27 $\pm$ 0.19*
C组	475.37 $\pm$ 175.49#	70.21 $\pm$ 11.34#	1.74 $\pm$ 0.16#
D_1 组	415.25 $\pm$ 165.45#	63.76 $\pm$ 10.86#	1.49 $\pm$ 0.11#
D_2 组	447.68 $\pm$ 187.69#	69.64 $\pm$ 13.49#	1.70 $\pm$ 0.16#
D_3 组	485.81 $\pm$ 195.45#	72.30 $\pm$ 15.04#	1.79 $\pm$ 0.15#

2.3 对模型大鼠肝损伤及氧化应激情况的影响

与A组比较,B组大鼠肝组织匀浆中Hyp和MDA水平显著升高,SOD水平均显著降低($P < 0.05$);与B组比较,C组及 D_1 组、 D_2 组、 D_3 组大鼠肝组织匀浆中Hyp和MDA水平显著降低,SOD水平均显著升高($P < 0.05$)。详见表3。

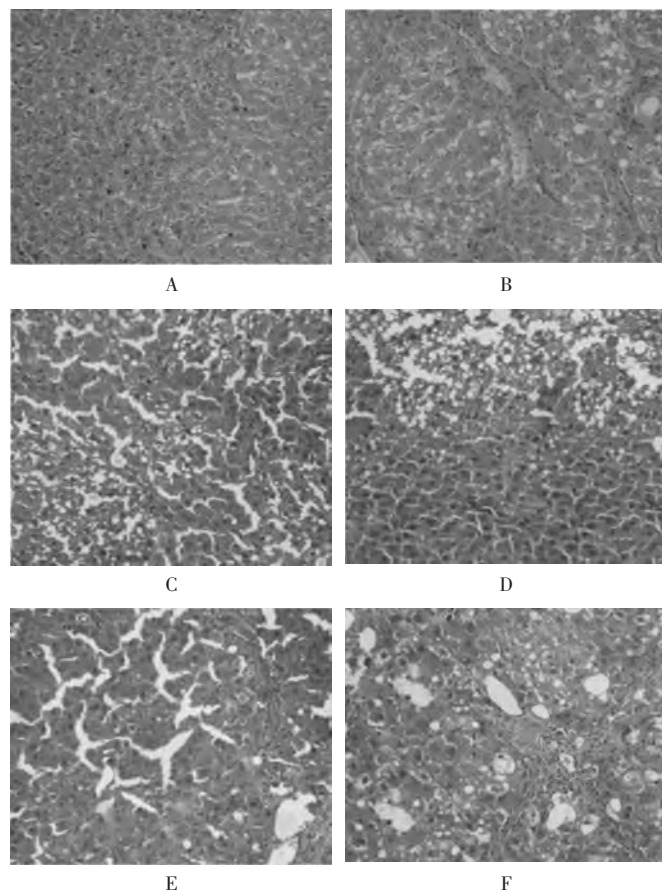
2.4 对模型大鼠肝组织病理学的影响

A组大鼠肝细胞未见明显变性,无炎症反应、脂肪变性及纤维组织增生;B组大鼠肝组织出现明显病变,

表3 各组大鼠肝匀浆中 Hyp, SOD, MDA 水平比较($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	Hyp(mg/g)	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
A 组	0.84 ± 0.27	6.96 ± 0.88	98.49 ± 7.36
B 组	1.55 ± 0.43 [*]	11.69 ± 2.07 [*]	81.26 ± 5.33 [*]
C 组	1.06 ± 0.25 [#]	9.86 ± 1.61 [#]	89.47 ± 4.87 [#]
D ₁ 组	0.86 ± 0.30 [#]	8.38 ± 1.47 [#]	97.69 ± 6.94 [#]
D ₂ 组	0.91 ± 0.30 [#]	8.96 ± 1.51 [#]	88.94 ± 5.17 [#]
D ₃ 组	1.25 ± 0.28 [#]	9.98 ± 1.65 [#]	85.46 ± 4.98 [#]

肝细胞排列紊乱、无序,胞质内充满大小不一的脂滴空泡,伴炎性细胞浸润,出现大量纤维组织增生;C 组大鼠肝细胞伴少量小型空泡,有点状坏死,肝组织内纤维化增生程度及炎性反应较轻;D₁ 组大鼠肝细胞体积有所增大,胞浆疏松化,伴少量小型空泡,少量点状坏死,炎性细胞浸润;D₂ 组大鼠肝细胞胞浆疏松化,有少量点状坏死,伴炎性细胞浸润;D₃ 组大鼠肝细胞胞质内有脂滴空泡,可见大量淋巴细胞浸润及纤维组织增生。详见图 1。



A. A 组 B. B 组 C. C 组 D. D₁ 组 E. D₂ 组 F. D₃ 组
图1 肝组织病理学切片(HE, ×400)

3 讨论

传统中医药治疗肝纤维化有一定优势,并涌现了诸如柴胡、龙胆、杠板归、黄芪、丹参等中药及柴胡鳖甲汤、茵陈蒿汤等复方,故阐明传统中医药治疗肝纤维化的作用机制对其临床推广具有重要意义。建立与人的肝

纤维化发生、发展具有相似性的动物模型是探讨药物作用机制的前提条件,以 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化是较成熟的模型,具有操作简便、成本较低、耗时较短、重复性较好等优点^[11-12]。

ALT, AST, TBil 水平可直接反映肝功能状况^[13]。本研究结果显示, B 组大鼠血清中 ALT, AST, TBil 水平显著升高,表明肝功能受损, C 组及 D₁ 组、D₂ 组、D₃ 组血清中 ALT, AST, TBil 水平均明显降低,表明各药物可改善肝功能。

HA, COL III, TGF-β₁ 是肝纤维化重要标志物, HA 和 COL III 水平异常上升会导致 ECM 合成增加, 分解减慢, 致使 ECM 过度沉积; TGF-β₁ 是肝脏受损时产生的主要细胞因子之一, 能激活肝星状细胞(HSC), 刺激 ECM 大量合成^[14]。本研究中, B 组大鼠血清中 HA, COL III, TGF-β₁ 水平均异常升高, 各给药组则出现不同程度下降, 提示龙胆总苷可能通过降低 HA, COL III, TGF-β₁ 水平实现抗肝纤维化的作用。

正常大鼠肝组织 Hyp 含量较低, 肝损伤模型大鼠肝组织 Hyp 含量明显增加, Hyp 含量可直接反映肝损伤程度^[15]。本研究中, 模型大鼠 Hyp 含量显著升高, 各给药组均不同程度下降, 表明龙胆总苷可能通过降低 Hyp 含量预防肝损伤。

CCl₄ 经肝细胞代谢激活后, 产生的大量自由基会攻击肝细胞膜上的磷脂分子, 引发脂质过氧化反应, 产生 MDA, 破坏细胞膜的结构和功能, 从而损伤肝细胞^[16]。模型组大鼠 MDA 含量显著升高, 各给药组大鼠肝组织匀浆 MDA 含量不同程度降低, 可见, 龙胆总苷抗肝纤维化作用与其抗脂质过氧化反应密切相关。SOD 可清除过氧自由基, 缓解肝损伤, 而肝损伤大鼠的 SOD 含量下降, 清除过氧自由基的能力亦降低。本研究结果显示, 龙胆总苷能提高 SOD 含量, 增强清除氧自由基的能力。

综上所述, 龙胆总苷对肝纤维化模型大鼠各项指标均有较好的改善作用, 其作用机制可能与龙胆总苷能改善脂质代谢、清除肝脏脂质蓄积、增强肝细胞抗氧化能力、抵御肝细胞的氧化应激和过氧化的综合作用相关。

参考文献:

- [1] 邓 灿, 叶波平. 肝纤维化发生机制及治疗研究进展[J]. 药物生物技术, 2017, 24(5): 454-458.
- [2] SENEGAS A, GAUTHERON J, MAURIN AGD, et al. IKK - related genetic diseases: probing NF-κB functions in humans and other matters[J]. Cellul Molec Life Sci Cmls, 2015, 72(7): 1275-1281.
- [3] MAGDALENO F, ARRIAZU E, RUIZ DGM, et al. Cartilage oligomeric matrix protein participates in the pathogenesis of liver fibrosis[J]. J Hepatol, 2016, 65(5): 963-968.
- [4] 胡根文, 薛进华, 柏 燕, 等. 两种大鼠肝纤维化模型的病理特点及影像学研究[J]. 赣南医学院学报, 2018, 38(5): 422-425.