

## 水飞蓟宾对高脂诱导非酒精性脂肪肝大鼠的调脂保肝作用

高华武, 陈 明, 龙子江\*, 吴珍妮, 胡满燕, 田丽娜

安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038

**摘要:** **目的** 探讨水飞蓟宾对高脂诱导的非酒精性脂肪肝 (NAFL) 模型大鼠的调脂保肝作用。**方法** 采用 ig 高脂乳剂配合高脂饲料制备大鼠 NAFL 模型, 持续 4 周, 对照组给予生理盐水和普通饲料。模型大鼠随机分为模型组、辛伐他汀 (阳性药, 1.8 mg/kg) 组和水飞蓟宾低、中、高剂量 (18.9、37.8、75.6 mg/kg) 组, 第 5 周在继续造模的基础上 ig 给药, 每天 1 次, 持续 8 周。末次给药后, 称取肝脏质量并计算肝系数; HE 染色观察肝组织病理形态; 腹主动脉取血, 分离血清, 试剂盒法检测三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT) 水平。**结果** 连续治疗 8 周后, 与对照组比较, 水飞蓟宾高、中剂量均可明显改善肝组织脂肪变性程度; 各剂量组肝系数均显著下降 ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ); 各剂量组均显著降低血清 TC、TG、AST、ALT 水平 ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ); 高、中剂量组显著降低 LDL、升高 HDL 水平 ( $P < 0.01$ )。**结论** 水飞蓟宾对 NAFL 大鼠发挥治疗作用, 其作用可能与降脂、保肝有关。**关键词:** 非酒精性脂肪肝; 水飞蓟宾; 调脂; 保肝

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)06-0773-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.06.008

## Lipid hepatoprotective effect of silibinin on fat-induced nonalcoholic fatty liver rat model

GAO Hua-wu, CHEN Ming, LONG Zi-jiang, WU Zhen-ni, HU Man-yan, TIAN Li-na

Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China

**Abstract: Objective** To investigate the lipid hepatoprotective effect of silibinin on high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver (NAFL) rat model and provide a theoretical basis for the treatment of silibinin on NAFL. **Methods** The NAFL rat model was established by administration of high fat emulsion and high fat diet. Rats in control group was treated with saline and normal diet. The model rats were randomly divided into model group, simvastatin (positive drug, 1.8 mg/kg) group, Silibinin groups with low, middle and high doses (18.9, 37.8 and 75.6 mg/kg). From the fifth week, NAFL rats were treated with different drug once a day for eight weeks. All rats were anaesthetized after final administration, Liver tissues were weighed for the calculation of hepatic coefficient. The hepatic morphology was observed through HE staining. Serum was obtained from abdominal aortic blood for detection of triglyceride separation (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) levels. **Results** After eight-week treatment, compared with model group, middle and high doses of silibinin could significantly improve the hepatic steatosis. The levels of hepatic coefficient, serum TC, TG, AST and ALT in rats treated with individual dose of Silibinin were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ). Particularly, high dose of silibinin significantly reduced LDL level whereas elevated HDL level in serum ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Silibinin has a therapeutic effect on nonalcoholic fatty liver rats, and possible mechanism is related to lipid-lowering and hepatic protection.

**Keywords:** non-alcoholic fatty liver disease; silibinin; hyperlipidemia; liver

非酒精性脂肪肝 (NAFL) 是目前发达国家最常见的慢性肝病之一, 容易诱发动脉粥样硬化、冠心病、糖尿病等疾病, 严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。其特点是肝实质细胞变性和以三酰甘油 (TG) 为代表的

脂滴在肝细胞中蓄积, 可发展为肝硬化和肝癌<sup>[2]</sup>。目前临床对 NAFL 的治疗缺乏有效的手段, 大部分降脂药物存在肝损害等副作用, 因此, 研发安全有效治疗 NAFL 的药物具有重要意义。

收稿日期: 2017-01-16

作者简介: 高华武 (1987—), 男, 助教, 从事基础药理研究。Tel: 15156071673 E-mail: ghw2015yl@163.com

\*通信作者 龙子江, 研究方向为心血管药理。Tel: 0551-65169216 E-mail: lzjyls@163.com

水飞蓟宾(silibinin)为黄酮木脂素类化合物,是水飞蓟的果实或种子提取物的主要活性成分,具有抗氧化、抗脂质过氧化以及膜稳定作用,多与其他药联合用于治疗急慢性肝炎、肝硬化及代谢中毒性肝损伤等疾病<sup>[3]</sup>。本研究以ig高脂乳剂配合高脂饲料饲养大鼠制备NAFL大鼠模型,探讨水飞蓟宾对NAFL的治疗作用,为传统中药水飞蓟宾临床应用提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,体质量(200±20)g,由南京医科大学实验动物中心提供,许可证号SCXK(苏)2016-0002。

### 1.2 药物及主要试剂

水飞蓟宾,批号130404,35 mg,由天津天士力制药集团股份有限公司提供;辛伐他汀片,批号43120307,5 mg,由鲁南贝特制药有限公司提供。

胆固醇、3号胆盐、丙基硫氧嘧啶,均由合肥博美生物科技有限公司提供;聚山梨酯-80,由国药集团化学试剂有限公司提供。

TG、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)测定试剂盒,由浙江东瓯诊断品限公司提供;猪油(自制)、蒸馏水。

### 1.3 主要仪器

日立7020型全自动生化分析仪,株式会社日立高新技术公司;X1R台式低温高速离心机,美国热电;GL-88B漩涡混合器,其林贝尔仪器制造公司;FA1004电子分析天平,上海精密科学仪器有限公司;YBL-2生物组织包埋机,孝感亚光医用生物科技研究所;LEICA RM234石蜡切片机,莱卡上海分公司。

## 2 方法

### 2.1 高脂乳剂及高脂饲料的配制

高脂乳剂:先将猪油(200 g)在磁力搅拌器上加热至100℃融化,加入胆固醇(60 g)、丙基硫氧嘧啶(2 g)搅拌溶解,再缓慢加入聚山梨酯-80(100 g),制成油相;同时在另一烧杯中取100 mL蒸馏水,水浴加热至60℃时,加入3号胆盐(20 g),边加边搅拌直至完全溶解,制成水相,然后将水相加入油相,充分搅均,即得高脂乳剂,4℃储存,临用前于37℃水浴加热。

高脂饲料:高脂饲料由猪油(12%)、胆固醇(2%)、丙硫氧嘧啶(0.2%)、普通混合饲料粉(85.8%)

组成,将以上各物先人工充分混匀,再经搅拌,压成圆条状颗粒,真空包装后,经60℃辐照消毒备用,由安徽省实验动物中心制作。

### 2.2 NAFL大鼠模型的建立

SD大鼠适应饲养后,按随机数字表法随机分为对照组(8只,给予等容积的生理盐水)和模型大鼠(ig给予高脂乳剂,体积为2 mL/100 g)。各造模大鼠给予高脂饲料喂养,对照组给予普通饲料饲养,每周称1次体质量。造模4周后,随机抽取4只造模组大鼠眼眶取血1 mL,静置,离心后取血清检测胆固醇含量,各大鼠胆固醇含量均高,证明脂肪肝造模成功<sup>[4-6]</sup>。

### 2.3 分组与给药

模型大鼠随机分为模型组、辛伐他汀组(阳性药,1.8 mg/kg)和水飞蓟宾低、中、高剂量(18.9、37.8、75.6 mg/kg)组,每组8只。造模第5周在继续ig高脂乳剂的基础上ig给予药物治疗,各药物组和模型组每天上午ig脂肪乳,体积为2 mL/100 g,对照组给予等体积的生理盐水。下午ig给予药物治疗,给药体积为2 mL/100 g,给药期间,模型组和各给药组给予高脂饲料喂养,对照组给予普通饲料喂养,持续给药8周。每周称量体质量1次,根据体质量调整给药体积。

### 2.4 指标的检测

末次给药后,禁食不禁水12 h,3.5%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,静置30 min,3 000 r/min离心15 min,分离血清检测TC、TG、HDL、LDL、ALT、AST水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。动物处死后,迅速取出肝脏,预冷的生理盐水冲洗肝脏,擦干后称取质量,计算肝系数。肝脏指数=肝脏质量/体质量。取距肝大叶边缘5 mm处的肝组织置于10%的甲醛溶液中固定,HE染色检测肝纤维化程度。

### 2.5 统计学分析

实验数据采用SPSS 20.0软件进行统计学处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,单因素方差分析法比较组间均数。组间两两比较,方差齐性时采用LSD检验,方差不齐时用Tamhane's T2检验。

## 3 结果

### 3.1 对NAFL模型大鼠肝组织病理学的影响

光镜下显示,对照组大鼠肝组织结构正常,肝小叶结构清晰,中央静脉均匀分布,周围细胞索呈放射状排列,肝窦正常,无脂肪变肝细胞;模型组肝小叶界限不清晰,细胞索排列紊乱,肝窦变窄,

肝细胞肿胀,细胞质出现大量球形脂滴,呈空泡状,细胞核被挤压至细胞边缘,伴有不同程度的肝细胞坏死。与模型组比较,水飞蓟宾高、中剂量组和辛伐他汀组经治疗8周后有明显改善,大鼠肝小叶界限较为清晰,细胞索呈放射状排列,肝窦扩张,脂肪变空泡状肝细胞显著减少,细胞体积接近正常细胞,见图1。

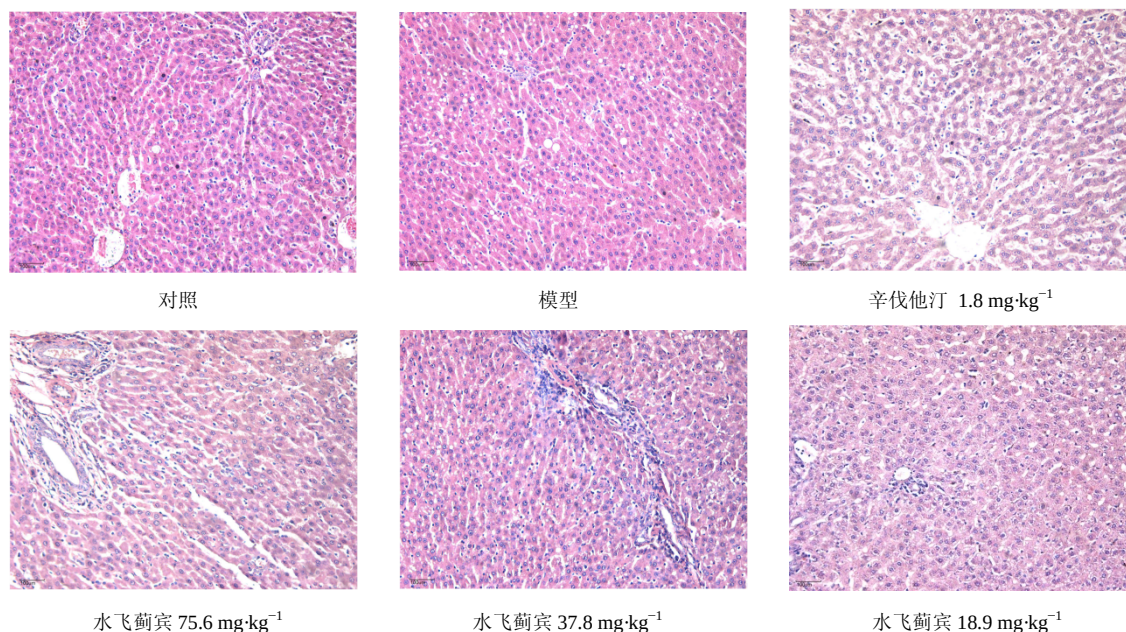


图1 水飞蓟宾对NAFL模型大鼠肝组织病理学的影响

Fig. 1 Effect of silibinin on non-alcoholic fatty liver model of liver histopathology

表1 水飞蓟宾对NAFL模型大鼠肝系数的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Effect of silibinin on non-alcoholic fatty liver model of liver index ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别   | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 体质量/g                      | 肝质量/g                   | 肝系数/%                   |
|------|---------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照   | —                         | 357.75±9.75                | 7.87±0.51               | 2.20±0.14               |
| 模型   | —                         | 335.50±13.66**             | 11.83±0.84**            | 3.45±0.27**             |
| 辛伐他汀 | 1.8                       | 393.63±12.09 <sup>##</sup> | 9.55±0.59 <sup>##</sup> | 2.43±0.21 <sup>##</sup> |
| 水飞蓟宾 | 75.6                      | 397.63±11.79 <sup>##</sup> | 9.09±0.61 <sup>##</sup> | 2.29±0.16 <sup>##</sup> |
|      | 37.8                      | 373.25±16.80 <sup>##</sup> | 9.41±0.57 <sup>##</sup> | 2.52±0.18 <sup>##</sup> |
|      | 18.9                      | 340.13±16.85               | 10.96±0.44              | 3.23±0.20 <sup>#</sup>  |

与对照组比较: \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$  <sup>##</sup> $P<0.01$ , 下同

<sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs control group; <sup>#</sup> $P<0.05$  <sup>##</sup> $P<0.01$  vs model group, same as below

### 3.3 对NAFL模型大鼠血脂的影响

与对照组比较,模型组血清TC、TG、LDL水平均显著升高( $P<0.01$ ),HDL水平显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,水飞蓟宾各剂量组均能显著降低血清TC、TG水平( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),高、中剂量组显著降低LDL、升高HDL水平( $P<0.01$ ),表明水飞蓟宾能降低脂肪肝模型大鼠血清脂质,调节脂质代谢紊乱,且呈剂量相关性,结果见图2。

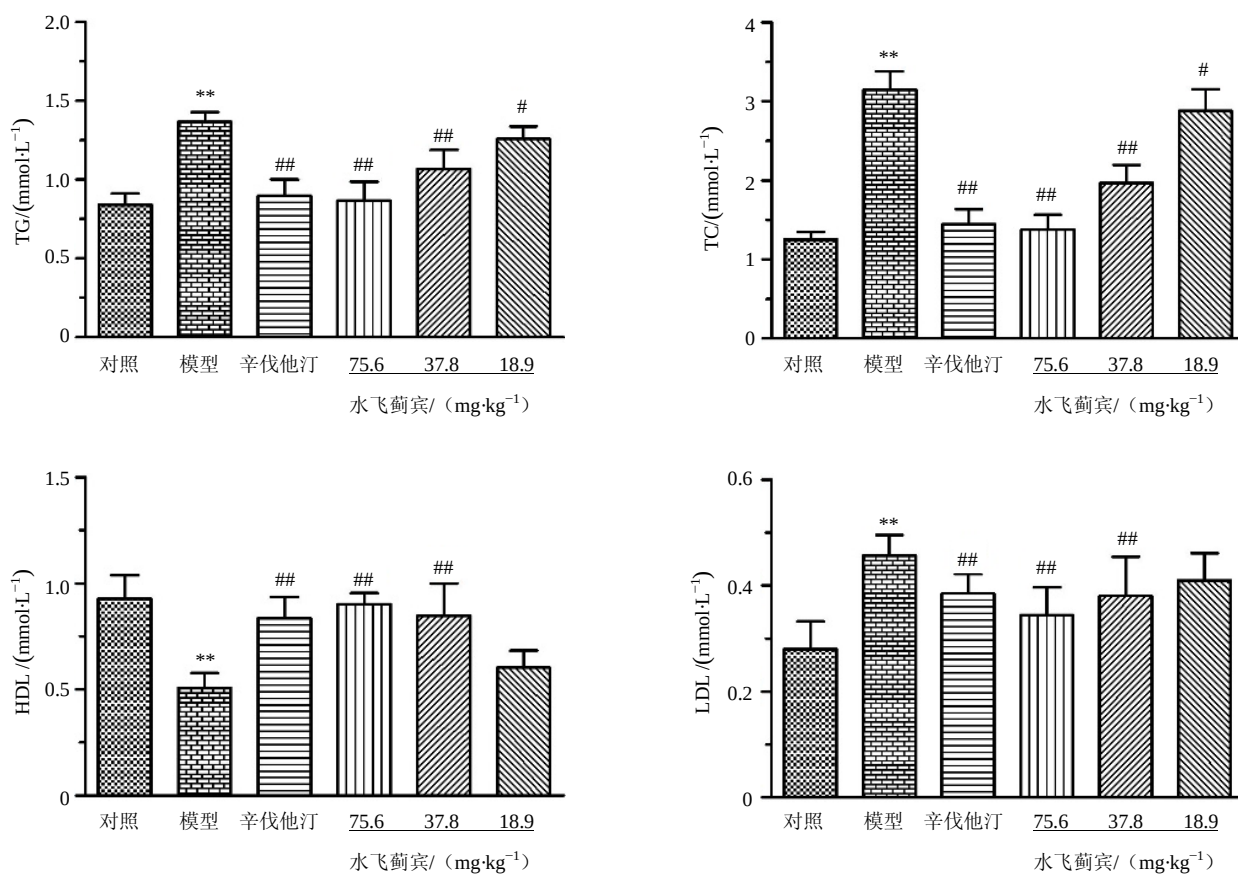
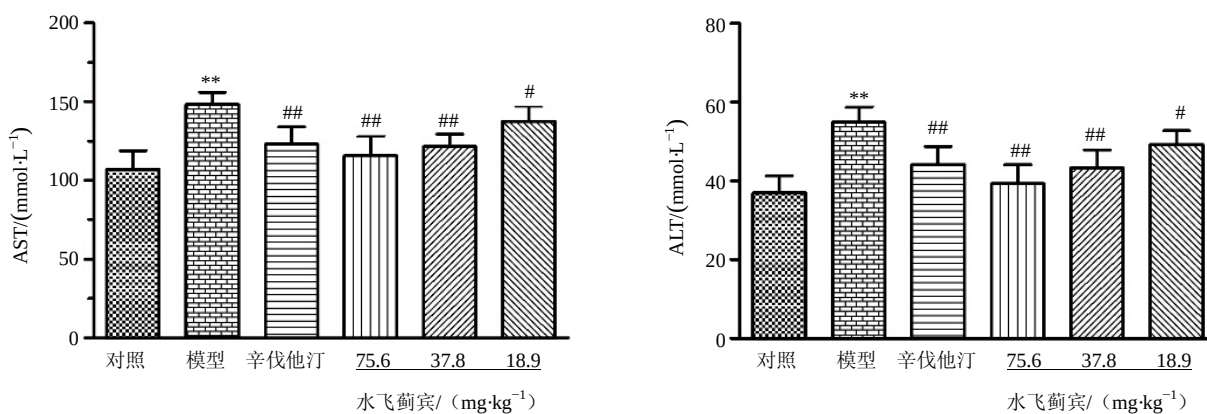
### 3.2 对NAFL模型大鼠肝系数的影响

与对照组比较,造模12周后模型组大鼠体质量、肝脏质量及肝系数显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,阳性对照辛伐他汀组体质量、肝脏质量及肝系数显著降低( $P<0.01$ ),水飞蓟宾各剂量组肝系数均显著下降( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),且呈剂量相关性,见表1。

### 3.4 对NAFL模型大鼠肝功能的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清AST、ALT水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,水飞蓟宾各给药组血清AST、ALT均降低,其中18.9 mg/kg剂量组较为显著( $P<0.05$ ),37.8、75.6 mg/kg剂量组非常显著( $P<0.01$ ),表明水飞蓟宾可降低大鼠血清ALT、AST水平,对肝脏具有直接保护肝作用,见图3。



图2 水飞蓟宾对NAFL模型大鼠血脂的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Fig. 2 Effect of silibinin on non-alcoholic fatty liver model of serum lipids ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )图3 水飞蓟宾对NAFL模型大鼠肝功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )Fig. 3 Effect of silibinin on non-alcoholic fatty liver model of liver function ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

#### 4 讨论

NAFL 患病率高, 在全球一般人群中患病率大约为 20%, 2 型糖尿病患者中并发患病率高达 70%<sup>[7]</sup>。常与肥胖、血脂紊乱、II 型糖尿病、高血压等代谢综合征 (MS) 症状并存, 其治疗手段主要

为降脂、保肝和抗氧化等, 但都不是特异性的有效的手段。研究不同方法、不同原因造成的脂肪肝动物模型对阐明脂肪肝的发病机制和治疗尤为重要。本实验在邱根全<sup>[4]</sup>、刘嵩<sup>[5]</sup>、李国栋<sup>[6]</sup>等研究的基础上, 对造模方法加以改进, 以高脂乳剂配合高脂饲

料进行造模,方法简单易行,造模4周后随机抽取大鼠检测总胆固醇,均达到高血脂水平,成模率高。HE染色显示肝细胞排列紊乱,体积肿胀,胞质内含大量大小不一的空性脂滴,细胞核挤向细胞边缘,部分细胞变性坏死,表明脂肪肝模型复制成功。

NAFL的发病机制复杂,目前还不十分清楚,在发病初期,当脂肪含量超过肝脏体积的5%时,TG在肝细胞累积成脂滴,形成肝脏脂肪变性<sup>[8]</sup>,影响脂质代谢,主要表现为TC、TG、LDL异常升高,HDL异常下降,进一步加剧脂质在肝脏的堆积。随着肝脏TG的继续累积,增加非酯化脂肪酸(NEFA)合成、减少其 $\beta$ 氧化<sup>[9]</sup>,过量的脂肪酸富集在肝脏引起肝脏损伤,主要表现为ALT、AST的异常升高,肝细胞脂肪变性,同时机体抗氧化能力减弱[即超氧化物歧化酶(SOD)活性下降,丙二醛(MDA)水平升高],进一步导致肝脏内脂质过氧化损伤<sup>[10]</sup>。

临床常用调脂去脂、保肝降酶以及抗纤维化等方法治疗脂肪肝,随着研究的深入,药用植物中提取的有效成分,逐渐成为脂肪肝实验研究的热点和临床治疗新途径。水飞蓟宾为中药水飞蓟种子的种皮中提取的有效成分,能维持肝脏线粒体功能的完整性,改善肝细胞功能<sup>[11]</sup>。汪艳丽等<sup>[12]</sup>采用50%乙醇复制急性酒精肝损伤模型,并用水飞蓟宾进行干预,发现水飞蓟宾能升高肝细胞SOD、GSH、TG、血TG水平,减轻酒精肝模型小鼠肝脏病理损伤。研究显示,水飞蓟宾对肝脏的保护作用,与下调CTGF、TMP1、TMP2的表达有关<sup>[13-14]</sup>。

本实验研究表明,ig水飞蓟宾后能降低高脂诱导的NAFL模型大鼠肝系数、降低TC、TG、LD水平、降低ALT、AST活性,改善肝脏组织脂肪变性,表明水飞蓟宾通过降低脂质水平、改善肝功能达到了抗NAFL作用,为水飞蓟宾治疗NAFL的临床用途提供了依据。

#### 参考文献

- [1] Tziomalos K. Lipid-lowering agents in the management of nonalcoholic fatty liver disease [J]. World J Hepatol, 2014, 6(10): 738-744.
- [2] Suomela E, Oikonen M, Virtanen J, et al. Prevalence and determinants of fatty liver in normal-weight and overweight young adults. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study [J]. Ann Med, 2015, 47(1): 40-46.
- [3] 王红军,姜媛媛,路平,等.水飞蓟宾的抗肿瘤、抗氧化和免疫调节分子药理学机制研究进展[J].药学报,2010,45(4): 413-421.
- [4] 邱根全,叶峰,刘昉,等.小柴胡汤对实验大鼠NAFL的影响[J].西安交通大学学报(医学版),2013,34(3): 400-402.
- [5] 刘嵩,卢笑丛,葛建,等.高脂所致脂肪肝动物模型建立的动态研究[J].中国药理学通报,2006,22(11): 1399-403.
- [6] 李国栋,陈园园,王盼,等.野菊花中萜类和黄酮类化合物保肝作用研究[J].中草药,2013,44(24): 3510-514.
- [7] Chalasani N, Younossi Z, Lavine J E, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association [J]. Hepatology, 2012, 55(6): 2005-23.
- [8] Sattar N, Forrest E, Preiss D. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. BMJ, 2014, 29: 349-356.
- [9] Wang D Q, Portincasa P, Neuschwander-Tetri B A. Steatosis in the liver [J]. Compr Physiol, 2013, 3(4): 1493-532.
- [10] Rasouli N, Kern P A. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93: 64-73.
- [11] 郅敏,姚嘉茵,鲁义,等.水飞蓟宾治疗非酒精性脂肪性肝病的实验研究[J].新医学,2010,41(10): 647-652.
- [12] 汪艳丽,余燕影,田洁,等.水飞蓟宾乳糖修饰对急性酒精性肝损伤保护作用的影响[J].时珍国医国药,2013,24(10): 2360-2363.
- [13] 宋维芳,许瑞龄,王登妮,等.水飞蓟宾对大鼠实验性肝纤维化发生发展作用机制的研究[J].山西医科大学学报,2009,40(5): 423-428.
- [14] 闻勤生,王旭霞,徐辉,等.水飞蓟宾在非酒精性脂肪性肝炎进展过程中对肝纤维化的影响[J].胃肠病学和肝病杂志,2007,16(1): 57-59.