

6,7-二乙酰黄芩素对大鼠急性肝性脑病的防治作用及机制研究

黄楠楠¹, 胡 鹏¹, 吴增光¹, 杜乐梅¹, 范栢爽¹, 王丽莉¹, 何 新^{1, 2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 广东药科大学, 广东 广州 510006

摘 要: 目的 研究6, 7-二乙酰黄芩素对硫代乙酰胺致大鼠急性肝性脑病模型的防治作用及机制。方法 Wistar雄性大鼠60只, 随机分为对照组、模型组、乳果糖(阳性药, 6 g/kg)组和6, 7-二乙酰黄芩素低、中、高剂量(6.25、12.50、25.00 mg/kg)组, 每天ig给药1次, 连续给药7 d。第5天给药结束后, 除对照组外, 采用硫代乙酰胺(300 mg/kg)连续ip 2 d建立大鼠肝性脑病模型。观察大鼠状态, 考察大鼠肝性脑病评分与死亡率; 测定各组大鼠血氨、结肠pH值、血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)水平; 采用苏木素-伊红(HE)染色法观察大鼠肝组织病理学变化; 采用ELISA试剂盒检测大鼠脑组织中 γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(Glu)、血浆中的5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)的含量; 采用Western Blotting试验测定脑组织中GABA- α_1 蛋白的表达。结果 造模48 h后, 与模型组比较, 6, 7-二乙酰黄芩素高剂量组大鼠体质量显著升高($P < 0.05$), 肝性脑病评分显著降低($P < 0.05$); 各剂量组死亡率均降低; 中、高剂量组血清ALT、AST、ALP和TBIL水平均显著降低($P < 0.05$); 低、中、高剂量组血氨水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01); 中、高剂量组结肠pH显著降低($P < 0.05$ 、 0.01); 中、高剂量组大鼠肝脏组织病理学损伤明显改善; 各剂量组脑组织中GABA水平显著降低($P < 0.01$); 中、高剂量组血浆中5-HT水平显著降低($P < 0.01$); 高剂量组血浆中NE水平显著降低($P < 0.01$); 高剂量组脑组织中Glu含量显著增加($P < 0.01$); 高剂量脑组织中GABA- α_1 蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。结论 6, 7-二乙酰黄芩素对肝脏具有保护作用, 对急性肝性脑病具有防治作用, 其机制可能与降低血氨、降低结肠pH、调节神经递质水平、抑制相关神经递质受体的表达有关。

关键词: 肝性脑病; 6, 7-二乙酰黄芩素; 硫代乙酰胺; 血氨; 神经递质

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)10-1957-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.10.006

Preventive effect and mechanism of baicalein 6,7-diacetate on acute hepatic encephalopathy in rats

HUANG Nannan¹, HU Peng¹, WU Zengguang¹, DU Lemei¹, FAN Baishuang¹, WANG Lili¹, HE Xin^{1,2}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 30160, China

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To investigate the preventive effect and mechanism of baicalein 6,7-diacetate (BD) on thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rats. **Methods** Totally sixty male Wistar rats were randomly divided into control group, model group, lactulose (positive drug, 6 g/kg) group and 6,7-diacetyl baicalein low, medium and high dose (6.25, 12.50 and 25.00 mg/kg) groups, ig once a day for seven days. A rat model of acute hepatic encephalopathy was established by continuous ip injection of thioacetamide for two days. To observe the status of rats and investigate the stage of hepatic encephalopathy and mortality in rats. The levels of ammonia, AST, ALT, ALP and TBIL in serum and colonic pH of rats in each group were measured. HE staining was used to evaluate the pathological changes of liver in rats. The level of GABA and glutamic acid (Glu) in rat brain, and the level of serotonin (5-HT) and norepinephrine (NE) in plasma were determined by ELISA. The expression of GABA- α_1 in brain tissue was determined by Western Blotting. **Results** 48 hours after modeling, compared with the model group, BD high-dose group significantly increased body weight ($P < 0.05$), hepatic encephalopathy score decreased significantly ($P < 0.05$), mortality of each dose group was reduced, serum ALT, AST, ALP and TBIL levels were significantly decreased in middle and high dose groups ($P < 0.05$); blood ammonia level in low, medium and high dose groups was significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01); colon pH was

收稿日期: 2020-03-16

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2020A1515010156); 广东省普通高校重点领域专项(2019KZDZX1006)

第一作者: 黄楠楠(1995—), 在读硕士研究生, 中药学专业。Tel: 15222378972 E-mail: 448205829@qq.com

*通信作者: 何 新(1966—), 教授, 博士生导师, 从事中药药理学研究。Tel: 13512275330 E-mail: hexintn@163.com

significantly decreased in middle and high dose groups. Compared with model group, the level of GABA in brain tissue was significantly decreased ($P < 0.01$); The level of 5-HT in the middle and high-dose groups was significantly decreased ($P < 0.01$); the plasma NE level in the high-dose group was significantly decreased ($P < 0.01$); the Glu content in the brain tissue of the high-dose group was significantly increased ($P < 0.01$); the expression of GABA - α_1 protein in the high-dose group was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** BD has a protective effect on the liver and a preventive effect on acute hepatic encephalopathy in rats. The mechanism may be related to reducing blood ammonia and colon pH, regulating neurotransmitter level, and inhibiting the expression of related neurotransmitter receptors.

Key words: hepatic encephalopathy; baicalein 6,7-diacetate; thioacetamide; ammonia; neurotransmitter

肝性脑病是由严重肝病引起的中枢神经系统功能失调综合征,可发展为急、慢性肝衰竭的并发症。临床认为,肝性脑病是一种具有多因素发病机制的可逆代谢性脑病^[1-2]。肝性脑病是急性肝功能不全患者的一种特征性症状,可在几天内从改变的精神状态发展为昏迷,该类型死亡率较高,其预后不良,一年内死亡率高达60%^[3]。尽管目前临床对肝性脑病具有疗效较为显著的治疗方法,但肝性脑病死亡率较高,预后较差,病情易反复发作,仍需探索新的、系统的、规范的治疗方法应用于临床治疗。

黄芩素是从黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 干燥根中取分离出来的一种黄酮类化合物,具有极强的抗氧化作用^[4],在临床上主要用于保肝、利胆、利尿、抗血小板凝集,使脑内血管阻力降低,脑内血流量增加,从而对脑血循环状况发挥改善作用^[5]。在动物研究水平上,有研究表明^[6-8],黄芩素对小鼠急性肝损伤有一定的保护作用,具有较强的护肝作用,是一个很好的黄嘌呤氧化酶抑制剂,可用于治疗肝炎。但由于其溶解度较差,且黄芩素在肠道内有首关代谢现象,其在小肠上皮细胞中会被快速代谢,发生葡萄糖醛酸化和硫酸化结合代谢,使黄芩素进入血循环的总量减少^[9-10]。对黄芩素进行结构改造获得其衍生物6,7-二乙酰黄芩素(baicalein 6,7-diacetate, BD),具有羟基保护作用,进而避免葡萄糖醛酸化及硫酸化代谢反应,减少肠的首关效应。实验研究表明,大鼠 ig 6,7-二乙酰化黄芩素(300 mg/kg)后,在大鼠肠内检测到6-单乙酰黄芩素和黄芩素,其生物利用度可能优于黄芩素^[11]。且与黄芩素比较,6,7-二乙酰黄芩素对小鼠急性肝损伤具有显著的保护作用^[12]。本研究采用硫代乙酰胺建立大鼠急性肝性脑病模型,探讨6,7-二乙酰黄芩素对硫代乙酰胺致大鼠急性肝性脑病模型的防治作用及机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级 Wistar 大鼠,体质量250~270 g,北京维

通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2016-0006,雄性(肝性脑病女性发病率明显低于男性,且男性病死率较高^[13-16])。饲养温度(25±1.0)℃,湿度50.0%±10.0%,照明12 h昼夜交替的条件下饲养,不限饮食。常规适应性饲养3 d后用于实验研究。

1.2 药物与主要试剂

6,7-二乙酰黄芩素(由实验室自制,质量分数>98%);硫代乙酰胺(分析纯,生工生物工程(上海)股份有限公司,批号E222BA0008);乳果糖口服液(北京韩美药品有限公司,批号18040008);天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)试剂盒,购于中生北控生物科技股份有限公司;γ-氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(Glu)试剂盒,购于美国Mybiosource公司;5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)试剂盒,购于德国IBL公司;BCA试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号20190429)。

1.3 实验仪器

快速血氨测定仪(NX10N,日本Fujifilm公司);全自动生化分析仪(7020,日本Hitachi公司);高速离心机(ALLEGRA-64R,美国Beckman公司);千分之一天平(JB1003,上海恒平科学仪器有限公司);十万分之一天平(AX205,瑞士Mettler Toledo公司);微型漩涡混合仪(WH-3,上海沪西分析仪器厂有限公司)。

2 方法

2.1 实验动物造模与分组

Wistar 雄性大鼠60只,随机分为对照组、模型组、乳果糖(阳性药,6 g/kg)组和6,7-二乙酰黄芩素低、中、高剂量(6.25、12.50、25.00 mg/kg)组,每组10只,每天ig给药1次,连续给药7 d。第5天给药结束后开始造模,除对照组外,各组大鼠均ip硫代乙酰胺300 mg/kg(30 mg/mL)^[17-19],每天ig给药1次,连续2 d,造模期间大鼠自由饮食、饮水。从首次ip硫代乙酰胺开始,为了防止大鼠电解质紊乱等并发症,每

隔12小时sc 3 mL 10%葡萄糖、2 mL生理盐水和20 μ mol KCl的等量混合液。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 体质量、存活率和一般状态观察 每天称大鼠体质量,记录大鼠死亡情况,每组补充大鼠数量,保证每组10只;观察大鼠一般状况,按Zimmermann氏法^[18]对肝性脑病大鼠进行评分,见表1。

表1 肝性脑病分期标准

Table 1 Staging criteria for hepatic encephalopathy		
分期	症状	得分
0级	正常	0
I级	嗜睡,反应迟缓,活动减少神经反射正常	1
II级	共济失调,反射基本正常	2
III级	各种神经反射逐渐消失	3
IV级	昏迷,角膜反射消失	4

2.2.2 血氨、血清生化指标检测 首次ip硫代乙酰胺48 h后取眼眶血,采用快速血氨测定仪检测全血中氨的含量,采用全自动生化检测仪检测AST、ALT、ALP和TBIL值。

2.2.3 结肠pH检测 首次ip硫代乙酰胺48 h后,取回盲部后端结肠大约10 cm,准确称取结肠内容物质量,采用pH计法测结肠pH值。

2.2.4 肝脏组织病理学检测 取肝脏组织称质量后,取同一部位、同等大小的肝脏组织放于充满中性福尔马林溶液的50 mL离心管中(体积比1:5),

避光常温保存,48 h之内进行HE染色,观察肝脏组织病理学形态变化。

2.2.5 神经递质含量检测 精密称取大鼠脑组织制备10%脑组织匀浆,离心,4 $^{\circ}$ C取上清。采用ELISA试剂盒,按试剂盒说明书分别检测各组大鼠脑组织中的GABA、Glu,血浆中的5-HT、NE的含量。

2.2.6 Western blotting检测 分别精密称取大鼠大脑组织100 mg,研磨、提取总蛋白。用BCA定量试剂盒法测定总蛋白含量,采用SDS-聚丙烯酰胺不连续电泳法进行显影、定影,利用Quantilys One软件测定条带的灰度值,从而测定GABA- α 蛋白表达的含量。

2.3 统计学方法

采用Graphpad prism 5.0统计学软件进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 对肝性脑病大鼠体质量和存活率的影响

大鼠体质量变化见表2,给药期间,各组大鼠体质量均呈增加趋势;造模期间,对照组大鼠体质量呈明显增加趋势,模型组及各给药组大鼠体质量呈明显下降趋势,造模24 h后显著低于对照组大鼠,差异具有统计学意义($P < 0.05$);造模48 h后,6,7-二乙酰黄芩素高剂量组与模型组比较,大鼠体质量显著升高($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠体质量变化情况($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Changes in body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g					
		0 d	2 d	4 d	5 d(造模0 h)	6 d(造模24 h)	7 d(造模48 h)
对照	—	243.30 $\pm$ 8.21	258.84 $\pm$ 5.80	273.86 $\pm$ 7.07	280.40 $\pm$ 7.51	286.20 $\pm$ 6.88	291.98 $\pm$ 6.68
模型	—	241.23 $\pm$ 7.53	255.33 $\pm$ 7.06	269.78 $\pm$ 8.94	282.13 $\pm$ 7.52	255.35 $\pm$ 6.41*	234.60 $\pm$ 9.51*
乳果糖	6 $\times$ 10 ³	241.48 $\pm$ 7.53	255.44 $\pm$ 12.01	266.18 $\pm$ 11.54	275.72 $\pm$ 13.65	254.70 $\pm$ 14.65	241.38 $\pm$ 13.90
6,7-二乙酰黄芩素	6.25	243.61 $\pm$ 4.51	257.48 $\pm$ 7.65	271.78 $\pm$ 6.93	280.08 $\pm$ 8.80	256.76 $\pm$ 10.01	240.01 $\pm$ 10.18
	12.50	239.34 $\pm$ 5.43	253.19 $\pm$ 5.81	265.66 $\pm$ 7.02	280.16 $\pm$ 8.75	258.39 $\pm$ 11.61	244.30 $\pm$ 10.49
	25.00	242.74 $\pm$ 7.67	253.45 $\pm$ 9.52	262.04 $\pm$ 7.77	275.49 $\pm$ 9.37	257.38 $\pm$ 11.18	248.48 $\pm$ 10.66 [#]

与对照组比较:* $P < 0.05$;与模型组比较:† $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; † $P < 0.05$ vs model group

表3结果表明,造模24 h后,模型组大鼠开始出现死亡情况,至造模48 h,模型组大鼠死亡率50%,高于各给药组。

对照组大鼠无异常,活动灵活,反应敏捷。造模24 h后,模型组及各给药组大鼠出现精神不振、萎靡、自由活动减少等状况;造模48 h后,模型组大鼠先后出现嗜睡、反应迟缓、各种反射逐渐消失、共济失调、个别出现昏迷现象等;各给药组大鼠活动明显减少、一般状态差、皮毛疏松、尿黄、行动迟缓。与模型组比较,6,7-二乙酰黄芩素高剂量组能显著降低大鼠肝性脑病评分,改善大鼠状态($P < 0.01$)。

表3 6,7-二乙酰黄芩素对大鼠肝性脑病评分及死亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effects of BD on stage of hepatic encephalopathy and mortality in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	评分	死亡率/%
对照	—	—	0
模型	—	3.1 $\pm$ 0.9	50
乳果糖	6 $\times$ 10 ³	2.9 $\pm$ 1.4	40
6,7-二乙酰黄芩素	6.25	2.9 $\pm$ 1.4	40
	12.50	2.8 $\pm$ 0.8	30
	25.00	1.6 $\pm$ 1.0 ^{##}	20

与模型组比较:## $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs model group

3.2 6,7-二乙酰黄芩素对肝性脑病大鼠血清肝功能指标的影响

表4结果表明,造模48 h后,与对照组比较,模型组大鼠血清ALT、AST、ALP和TBIL水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,乳果糖能显著降低肝性脑病大鼠血清中ALP、ALT、AST和TBIL水平($P<0.05, 0.01$);6,7-二乙酰黄芩素各剂量组能降低肝性脑病大鼠血清ALT、AST、ALP和TBIL水平;其中中、高剂量组与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。

表4 6,7-二乙酰黄芩素对肝性脑病大鼠血清中ALT、AST、ALP、TBIL的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effects of BD on serum ALT, AST, ALP, TBIL in hepatic encephalopathy rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	42.44±17.30	134.11±42.67	151.33±43.37	0.15±0.05
模型	—	1 289.00±348.25**	2 419.80±267.21**	519.80±127.53**	2.37±0.11**
乳果糖	6×10 ³	597.80±253.00 [#]	1 412.80±210.35 [#]	388.60±87.97 [#]	1.53±0.44 [#]
6,7-二乙酰黄芩素	6.25	847.67±216.26 [#]	1 935.80±428.43	381.33±73.20 [#]	1.15±0.14 [#]
	12.50	695.60±157.85 [#]	1 643.60±257.60 [#]	319.60±86.45 [#]	1.14±0.39 [#]
	25.00	400.33±179.91 [#]	1 228.43±381.80 [#]	284.71±45.79 [#]	0.65±0.28 [#]

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ [#] $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ [#] $P<0.01$ vs model group

表5 6,7-二乙酰黄芩素对肝性脑病大鼠血氨、结肠pH的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effects of BD on blood ammonia and colonic pH in hepatic encephalopathy rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血氨/(μg·L ⁻¹)	结肠pH
对照	—	918.9±151.0	6.87±0.24
模型	—	2810.0±323.0**	7.55±0.27**
乳果糖	6×10 ³	1798.0±168.0 [#]	6.77±0.28 [#]
6,7-二乙酰黄芩素	6.25	1838.3±607.3 [#]	7.20±0.46
	12.50	1514.0±269.1 [#]	7.13±0.23 [#]
	25.00	1271.4±323.1 [#]	7.00±0.13 [#]

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ [#] $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ [#] $P<0.01$ vs model group

3.4 6,7-二乙酰黄芩素对肝性脑病大鼠肝脏病理组织学的影响

对照组大鼠肝脏被膜光滑,小叶结构正常,肝细胞未见变性或坏死,汇管区血管及胆管未见异常,间质未见结缔组织增生,肝中央小静脉、肝小动、静脉及胆管系统均未见显著变化。

模型组大鼠肝组织病变明显以肝细胞坏死和纤维组织增生为主,肝组织病变以小叶中央区

3.3 6,7-二乙酰黄芩素对肝性脑病大鼠血氨和结肠pH的影响

表5结果表明,模型组大鼠血氨水平与对照组比较显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。采取预防性给药5 d,乳果糖和6,7-二乙酰黄芩素低、中、高剂量可显著降低肝性脑病大鼠血氨水平($P<0.05, 0.01$)。

与对照组比较,模型组大鼠结肠pH显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。乳果糖和6,7-二乙酰黄芩素中、高剂量可显著降低肝性脑病大鼠结肠pH($P<0.05, 0.01$)。

为主,正常肝小叶结构不明显,可见以纤维组织增生分割包绕肝组织形成假小叶;肝细胞肿胀、溶解及坏死,炎细胞浸润,纤维组织增生,肝淤血。

6,7-二乙酰黄芩素中、高剂量组坏死范围较模型组有所减少,轻微肝淤血。其中以25 mg/kg组保护作用显著,坏死和/或纤维组织增生程度减轻;6.25 mg/kg组与模型组比较坏死程度未见明显改善,结果见图1。

3.5 6,7-二乙酰黄芩素对肝性脑病大鼠神经递质的影响

表6结果表明,与对照组比较,模型组大鼠GABA、5-HT、NE水平显著升高,Glu水平显著降低,均具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,6,7-二乙酰黄芩素各剂量组能够显著降低脑组织中GABA水平,差异具有统计学意义($P<0.01$);各剂量组能够降低血浆中5-HT水平,中、高剂量组差异具有统计学意义($P<0.01$);各剂量组能够降低血浆中NE水平,高剂量组差异具有统计学意义($P<0.01$);各剂量组能够增加脑组织中Glu含量,高剂量组差异具有统计学意义($P<0.01$)。

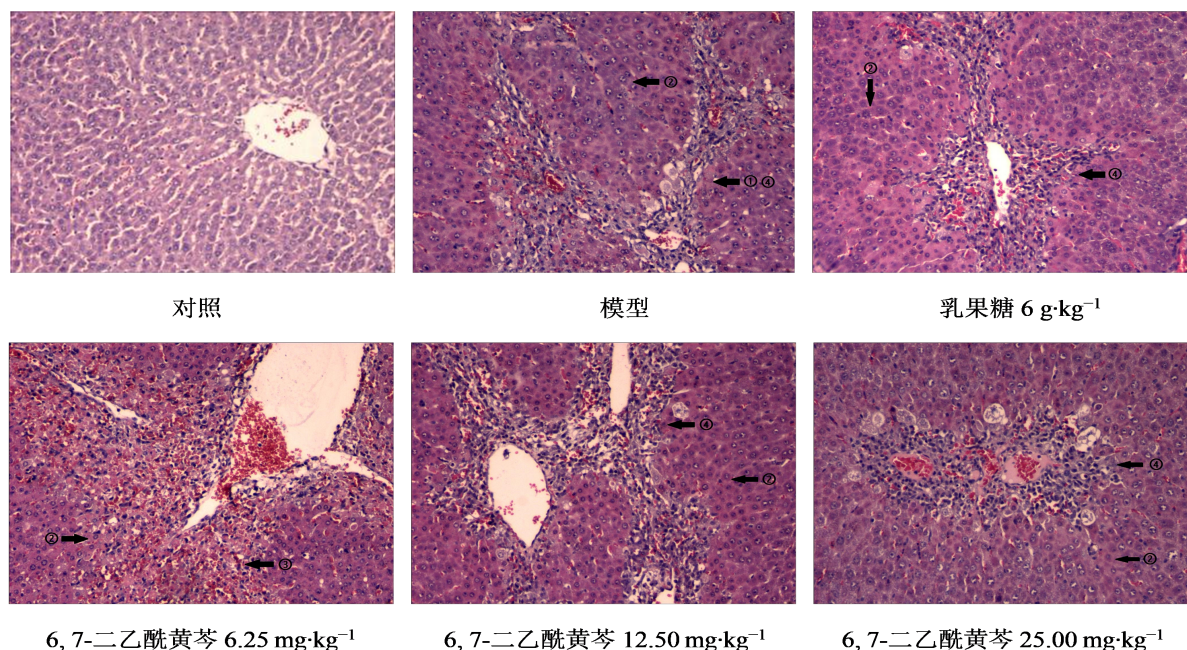


图1 大鼠肝组织病理变化(HE,×200)

Fig. 1 Pathological changes of liver tissue in rats (HE, ×200)

表6 6,7-二乙酰黄芩素对肝性脑病大鼠神经递质的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effects of BD on neurotransmitter levels in hepatic encephalopathy rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	GABA/(pg·mL ⁻¹)	5-HT/(ng·mL ⁻¹)	NE/(ng·mL ⁻¹)	Glu/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	788.39±129.92	10.97±1.91	1.34±0.46	254.64±19.81
模型	—	1 232.20±246.66**	16.91±5.59**	5.44±1.99**	201.38±10.44**
乳果糖	6×10 ³	742.40±95.12 [#]	12.05±11.57 [#]	4.57±1.67	226.20±23.79 [#]
6,7-二乙酰黄芩素	6.25	743.36±175.16 [#]	14.32±8.44	5.28±1.81	206.32±17.78
	12.50	606.11±290.63 [#]	10.61±5.10 [#]	4.04±1.98	193.70±24.85
	25.00	460.52±148.88 [#]	7.22±4.74 [#]	2.82±1.34 [#]	250.05±35.87 [#]

与对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$ [#] $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ [#] $P<0.01$ vs model group

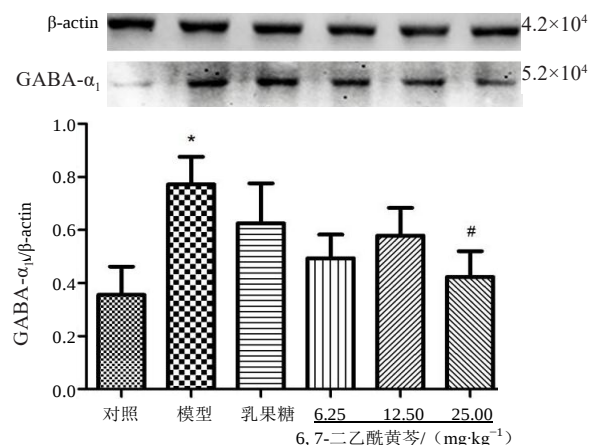
3.6 6,7-二乙酰黄芩素对肝性脑病大鼠 GABA- α_1 的影响

与对照组比较,模型组中 GABA- α_1 表达明显升高($P<0.05$);6,7-二乙酰黄芩素组 GABA- α_1 的表达与模型组比较明显降低,高剂量组差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见图2。

4 讨论

4.1 肝性脑病模型选择

肝性脑病是由严重肝病引起的,具有多因素发病机制的中枢神经系统功能失调综合征,其主要症状是:在发作期或急性期过度兴奋,情绪异常、记忆损伤、运动能力下降、嗜睡以及最终发展为昏迷;广泛的临床表现增加了肝性脑病的复杂性。现临床将肝性脑病分为以下3种类型:A型:急性肝衰竭相关的肝性脑病(ALF);B型:不伴内源性肝病的严重



与对照组比较:* $P<0.01$;与模型组比较:[#] $P<0.05$

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

图2 6,7-二乙酰黄芩素对肝性脑病大鼠 GABA- α_1 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 2 Effects of BD on the expression of GABA- α_1 in hepatic encephalopathy rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

门体分流(较为少见);C型:慢性肝病、肝硬化基础上发生的肝性脑病。其中,A型肝性脑病临床死亡率较高,常在起病数日内由轻度的意识错乱迅速陷入深昏迷,甚至死亡^[18]。A型肝性脑病模型常采用肝毒性药物诱导,如硫代乙酰胺、四氯化碳、D-氨基半乳糖等。其中,采用硫代乙酰胺造模,经肝脏摄取代谢,引起肝细胞的损伤导致肝坏死,并导致星形胶质细胞水肿,影响神经调节功能。A型肝性脑病多与GABA相关,如GABA的异常增多,增加GABA受体的表达,故该模型较多用于研究谷氨酸能神经元、GABA能神经元等在肝性脑病发病机制中的作用。且采用硫代乙酰胺造模,成模时间短,成功率高,重复性好,其对肝脏造成的损伤与人类肝性脑病高度相似^[18-20],故本研究采用硫代乙酰胺致A型肝性脑病模型进行研究。

本研究实验结果表明,采用硫代乙酰胺(300 mg/kg, ip 2次)成功建立大鼠肝性脑病模型。采用乳果糖和6,7-二乙酰黄芩素中、高剂量预防性给药5 d后,可显著改善大鼠状态,降低肝性脑病评分及死亡率,改善大鼠肝脏病理学形态,显著降低血清中AST、ALT、ALP和TBIL水平,表明其对肝脏组织具有保护作用。且可降低大鼠血氨、结肠pH水平,表明其对硫代乙酰胺致大鼠急性肝性脑病大鼠具有防治作用。

4.2 肝性脑病与神经递质

急性肝性脑病时,血液中氨的水平显著升高,血脑屏障的通透性增大,高浓度的氨能引起大脑中星形胶质细胞肿胀,进而导致星形胶质细胞膜上多种神经递质的代谢紊乱,如GABA、Glu、5-HT、NE等^[21]。GABA为抑制性神经传达物质,主要来源于肠道菌群,吸收后经门静脉通过肝脏代谢,肝性脑病时,血脑屏障通透性增大,GABA入脑增多,产生中枢神经系统抑制作用,进而影响大鼠学习、记忆力及认知能力^[2, 22-23]。Glu是一种酸性氨基酸,为兴奋性神经递质。高血氨时,Glu易与血氨形成谷氨氨,能解除代谢过程中氨的毒害作用,大量消耗Glu,使其含量降低^[24]。5-HT为中枢神经系统重要的抑制性神经递质,具有广泛的生物学作用,其异常升高会导致脑的神经生理损伤作用,进而影响人的情绪、痛觉、睡眠等。近年来研究发现,大鼠出现急性肝衰竭肝损伤时,会导致5-HT水平异常增高^[25]。NE为儿茶酚胺类神经递质,由脑内蓝斑区产生,对情绪调节系统起重要作用。在高血氨刺激下,导致NE浓度异常增加^[26-27]。

本课题组对6,7-二乙酰黄芩素对大鼠急性肝性脑病防治作用机制进行研究,结果表明,6,7-二乙酰黄芩素防治肝性脑病的机制可能是调节结肠pH水平,降低血液中氨的水平,从而降低Glu的消耗,使其含量增加;同时降低GABA、5-HT、NE等神经递质的表达,降低GABA- α_1 的表达量,从而对硫代乙酰胺致大鼠急性肝性脑病发挥显著的防治作用。

4.3 肝性脑病相关发病机制

迄今为止,导致肝性脑病的相关机制学说主要包含氨中毒学说、GABA神经递质与假性神经递质学说、细菌感染与炎症反应、脑能量代谢、锰中毒学说等方面^[28-29]。其中氨中毒学说处于中心地位,为肝性脑病的经典假说。氨主要通过尿素循环在肝脏内代谢,因此,在肝脏功能不全的情况下,血液中氨的含量增加。当在酸性环境中,血液中的氨以 NH_4^+ 的形式存在,无毒且不易透过血脑屏障,并可随粪便排出体外;当在碱性环境中,血液中 NH_4^+ 转化为毒性较大的 NH_3 分子,渗入血脑屏障,干扰脑细胞能量代谢、使脑内神经递质发生改变等,最终导致肝性脑病^[30-31]。近年来,学者发现,肝性脑病发病机制并非单一作用,而是多因素如氨中毒学说与GABA/BZ复合体学说、假神经递质学说等发病机制协同作用,共同促进肝性脑病的发生与发展,进而导致其临床表现的复杂多样^[32]。

虽然肝性脑病的治疗药物种类较多,疗效较为显著,但由于肝功能衰竭导致脑功能障碍的病理生理机制复杂,肝性脑病的发病机制尚未明确,患者预后较差,病情易反复发作,长期生存率较低,仍是一个严峻的临床问题,需探索新的、系统的、规范的治疗方法应用于临床。6,7-二乙酰黄芩素具有降低血液中的氨水平、改善肝功能、调节神经递质水平等多种作用机制,是具有良好的治病优势和开发前景的黄芩素类衍生物。基于本实验前期药效学实验及机制的初步探索,发现多数神经递质的紊乱会对肝性脑病患者的认知、记忆等功能产生一定的影响,本实验室下一步拟对其致病机制进行深入探索,为6,7-二乙酰黄芩素防治肝性脑病提供更详实的理论基础。

参考文献

- [1] Farjam M, Dehdab P, Abbassnia F, et al. Thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy in rat: behavioral, biochemical and histological changes [J]. Iran Red Crescent Med J, 2012, 14(3): 164-170.
- [2] Jones E A. Ammonia, the GABA neurotransmitter

- system, and hepatic encephalopathys [J]. Metab Brain Dis, 2002, 17(4): 275-281.
- [3] 张军昌, 王永刚, 林芳, 等. 肝性脑病发病机制新进展 [J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2019, 11: 6-11.
- [4] 高声传, 王童超, 肖江宁. 黄芩中黄芩素的提取方法考察 [J]. 解放军药学报, 2011, 27(6): 502-505.
- [5] 彭雯雯. 黄芩素和七种代谢物液-质联用分析方法的建立及应用 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [6] 王欣, 熊哲. 黄芩素对急性肝损伤模型小鼠的保护作用及其机制 [J]. 医药导报, 2012, 31(8): 1000-1002.
- [7] 吴艳玲, 南极星. 黄芩素对D-氨基半乳糖联合脂多糖所诱导的小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 延边大学医学学报, 2009, 32(4): 239-241.
- [8] 高燕, 顾振纶, 蒋小岗. 黄芩素药理学研究新进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1765-1767.
- [9] Zhang L, Lin G, Chang Q, et al. Role of intestinal first-pass metabolism of baicalein in its absorption process [J]. Pharm Res, 2005, 22(7): 1050-1058.
- [10] Guo X Y, Yang L, Chen Y, et al. Comparison of pharmacokinetics of baicalein and baicalin in rats [J]. Chin Pharm J, 2008, 43: 524-526.
- [11] Hu Y, Guo X Y, Yang L, et al. Metabolites of baicalein 6, 7-diacetate in rats [J]. J Chin Pharm Sci, 2008, 17: 309-313.
- [12] 刘晓岩, 张超逸, 王银叶, 等. 6,7-二乙酰黄芩素对四氯化碳和D-氨基半乳糖所致的急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(13): 1517-1522, 1527.
- [13] 余卞卞, 金可吟. 影响肝硬化合并肝性脑病预后的危险因素分析 [J]. 中国医院统计, 2019, 26(4): 246-248.
- [14] 张桂芹. 肝硬化患者合并肝性脑病的发病原因与预后分析 [J]. 中国医药指南, 2016, 14(22): 31-32.
- [15] 李诺, 温艳惠. 肝硬化合并肝性脑病的病因及预后分析 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(11): 224-225.
- [16] 章新华, 邓根明, 邓建忠. 肝硬化患者肝性脑病病因以及疗效分析 [J]. 当代医学, 2012(20): 87.
- [17] 段志军, 张春乐. 大鼠肝性脑病模型的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(30): 3204-3209.
- [18] 罗松, 张龙江, 卢光明. 肝性脑病动物模型研究及其进展 [J]. 医学研究生学报, 2013, 26(11): 1199-1202.
- [19] 李政, 石虹. 肝性脑病动物模型的研究进展 [J]. 肝脏, 2016(3): 222-224.
- [20] 张景洲. 毒消肝清颗粒治疗肝性脑病作用机理的研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2008.
- [21] Zhang Q J, Liu Y Y, Liu H, et al. Role of ammonia in the pathogenesis of hepatic encephalopathy [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2010, 12(6): 136-139.
- [22] Butterworth R F. Neurosteroids in hepatic encephalopathy: Novel insights and new therapeutic opportunities [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015, 11(6): 1-4.
- [23] Sherry D, Tiziano B, Jerónimo F, et al. Infliximab reduces peripheral inflammation, neuroinflammation, and extracellular GABA in the cerebellum and improves learning and motor coordination in rats with hepatic encephalopathy [J]. J Neuroinflam, 2016, 13(245): 1-14.
- [24] Marta L, Carmina M, Ana A, et al. Interplay between glutamatergic and GABAergic neurotransmission alterations in cognitive and motor impairment in minimal hepatic encephalopathy [J]. Neurochem Int, 2014, 10(11): 1-5.
- [25] 蔡书景, 郭秀英. 肝性脑病大鼠中缝核群内5-羟色胺表达的研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(22): 2424-2423.
- [26] Song M N, Song Y N, Chen F, et al. Changes in serotonin and noradrenaline in hepatic encephalopathy as a result of liver failure in rat [J]. Chin Crit Care Med, 2007, 19(1): 50-52.
- [27] 宋闽宁, 骆梅兰, 黄文琪, 等. 肝性脑病患者血浆5-羟色胺、去甲肾上腺素的检测及其临床意义 [J]. 中华传染病杂志, 2007, 25(10): 628-329.
- [28] Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association. Guidelines on the management of hepatic encephalopathy in cirrhosis [J]. J Prac Hepatol, 2018, 21(26): 999-1014.
- [29] 中华医学会消化病学分会, 中华医学会肝病学会. 中国肝性脑病诊治共识意见(2013年, 重庆) [J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2014, 6(2): 81-93.
- [30] 邱华, 毛德文, 韦艾凌. 大黄煎剂对急性肝衰竭大鼠肝性脑病防治机制的实验研究 [J]. 中国中医急症, 2007, 16(2): 195-197.
- [31] 陈敏, 陈维顺. 肝性脑病发病机制中氨中毒假说的研究进展 [J]. 医学综述, 2016, 22(3): 73-76.
- [32] González-Regueiro J A, Higuera-de la Tijera M F, Moreno-Alcántar R, et al. Pathophysiology of hepatic encephalopathy and future treatment options [J]. Revista de gastroenterologia de Mexico, 2019, 84(2): 195-203.