

胡黄连苷 II 对大鼠胆管结扎胆汁淤积的改善作用

庄辉传¹, 许锐¹, 王涛², 相芳^{1*}

1. 中国人民解放军第八一医院 传染科门诊药房, 江苏 南京 210002

2. 中国药科大学 江苏省新药筛选重点实验室, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 考察胡黄连苷 II (PSII) 对大鼠胆管结扎胆汁淤积模型的改善作用。**方法** 采用胆总管结扎建立大鼠胆汁淤积模型, 另取 10 只大鼠只分离胆管不结扎, 作为假手术组 (0.5% CMC-Na), 50 只胆管结扎大鼠随机分为 5 组: 模型组 (0.5% CMC-Na)、熊去胆酸 (UCDA) 100 mg/kg 阳性药组和 PSII 80、40 和 20 mg/kg 组, 造模后各组连续 ig 给药 7 d。观察大鼠一般状况及体质量; 试剂盒法检测血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、白蛋白 (ALB)、碱性磷酸酶 (ALP)、谷氨酰转肽酶 (GGT)、总胆红素 (TBIL)、总胆汁酸 (TBA) 水平; 取肝脏称质量, 计算肝脏系数; 试剂盒法测定肝脏组织匀浆中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性, 匀浆上清液中髓过氧化物酶 (MPO) 活性。**结果** 与模型组比较, PSII 对模型大鼠一般状态和体质量无明显影响, 可显著降低模型大鼠肝脏系数 ($P < 0.01, 0.05$); PSII 80、40 mg/kg 给药均可显著降低模型大鼠血清 ALT、AST、ALP、GGT、TBIL 水平, 80 mg/kg 对血清 TBA 也发挥显著降低作用 ($P < 0.01$); PSII 80、40 mg/kg 给药均可显著升高肝脏 SOD 和 CAT 活性 ($P < 0.05, 0.01$), 对肝脏 GSH-Px 活性未见明显影响, 均可显著降低肝脏 MPO 活性 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** PSII 对于大鼠胆管结扎所致的胆汁淤积性肝损伤具有明显的改善作用, 涉及的机制可能包括上调肝组织抗氧化酶活性及抑制炎症细胞活化和浸润。

关键词: 胡黄连苷 II; 胆汁淤积; 氧化应激; 炎症

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2018) 10-1786-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.10.007

Effects of picroside II on cholestatic liver injury in rats induced by bile duct ligation

ZHUANG Huichuan¹, XU Rui¹, WANG Tao², XIANG Fang¹

1. Pharmacy of Infectious Diseases, 81 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China

2. Jiangsu Key Laboratory of Drug Screening, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of picroside II (PSII) on the cholestasis of bile duct ligation in rats. **Methods** Cholestasis model was established by common bile duct ligation, another 10 rats were separated from the bile duct without any ligature as the sham operation group (0.5% CMC-Na). Fifty rats with bile duct ligation were randomly divided into five groups: model group (0.5% CMC-Na), UCDA (100 mg/kg, positive drug) group, PSII 80, 40 and 20 mg/kg group. After modeling, rats in each group were ig administered continuously for 7 days. The general condition and body weight of rats were observed. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB), alkaline phosphatase (ALP), glutamyl transpeptidase (GGT), total bilirubin (TBIL) and total bile acid (TBA) were measured by kit method. The liver weight was taken to calculate the liver coefficient, and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver homogenate and myeloperoxidase (MPO) in the supernatant of liver homogenate were determined by kit method. **Results** Compared with the model group, PSII had no significant effect on the general state and body weight of the model rats, but could significantly reduce the liver coefficient of the model rats ($P < 0.01, 0.05$); The serum levels of ALT, AST, ALP, GGT, and TBIL in model rats were significantly decreased after 80 and 40 mg/kg PSII administration, and serum TBA was also significantly reduced

收稿日期: 2018-04-30

第一作者: 庄辉传, 从事药学工作。E-mail: 2303935502@qq.com

*通信作者: 相芳, E-mail: gynkey@sina.com

by 80 mg/kg ($P < 0.01$). PSII 80 and 40 mg/kg administration could significantly increase the activity of SOD and CAT in liver, but there was no significant difference in liver GSH-Px activity, and both 80 and 40 mg/kg PSII administration significantly reduced liver MPO activity ($P < 0.01, 0.05$). **Conclusion** PSII can significantly improve cholestatic liver injury caused by bile duct ligation in rats. The mechanisms involved may include up-regulating the activity of antioxidant enzymes in liver and inhibiting activation and infiltration of inflammatory cells.

Key words: Picroside II; cholestasis; oxidative stress; inflammation

胡黄连苷 II (picroside II, PSII) 为玄参科植物胡黄连 *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell 根茎主要药用成分环烯醚萜类的主要有效成分, 有明确的保护肝脏损伤、抗哮喘、神经细胞保护、抗氧化等作用^[1-3]。在保护肝脏损伤方面, 研究表明, PSII 对四氯化碳、D-氨基半乳糖、对乙酰氨基酚等多种因素所致的肝细胞损伤具有明显的改善作用^[4]。

胆汁淤积是多种原因引起一组疾病共同的临床症状, 诱因包括病毒性肝炎、脂肪性肝炎、败血症、妊娠、药物肝毒性、器官移植以及遗传性疾病等, 可引起疾病恶化及死亡。胆汁淤积可分为肝内胆汁淤积和肝外胆汁淤积, 而胆汁酸成分则是各种胆汁淤积状态下诱发组织损害的核心因素^[5]。鉴于 PSII 已报道的广泛的肝保护作用, 本研究通过胆总管结扎建立大鼠胆汁淤积模型, 考察 PSII 对此模型胆汁淤积性肝损伤的改善作用, 为其潜在的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

PSII, 类白色粉末, 质量分数 98%, 购自南京泽郎医药科技有限公司, 临用前采用无菌 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 研磨配制成混悬液, 供 ig 给药用。熊去氧胆酸 (UCDA), 白色粉末, 质量分数 > 98%, 购自美国 Sigma 公司, 临用前采用无菌 0.5% CMC-Na 研磨配制成混悬液, 供 ig 给药用。

丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、白蛋白 (ALB)、碱性磷酸酶 (ALP)、谷氨酰转肽酶 (GGT)、总胆红素 (TBIL)、总胆汁酸 (TBA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、髓过氧化物酶 (MPO) 检测试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天生物技术研究。

1.2 动物

60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (250±20) g, 购自浙江省实验动物中心, 生产许可证号 SCXK (浙) 2014-0001。大鼠饲养于独立送风笼具 (IVC) 中, 空气洁净度 10 000 级, 温度 (24±2) °C, 相对湿度 60%~80%, 空气交换次数 10~15 次/h, 12 h/12 h 明暗光照

周期, 每笼不超过 5 只。

1.3 主要仪器

BS210S 精密电子天平 (0.1 mg~10 g), 德国赛多利斯 (Sartorius); FEJ-200 电子天平 (0.1~200 g), 福州富日衡之宝电子有限公司; Safire II 全波长测读仪, TECAN 公司; 1K15 台式高速离心机, Sigma 公司; T25 组织分散器, 德国 IKA 公司; Milli-Q 自动纯水机, 美国 Millipore 公司; Forma -80 °C 超低温冰箱, 美国 Thermo 公司。

2 方法

2.1 模型建立和分组

参考文献方法^[6], 取上述 SD 大鼠 50 只, ip 1 g/kg 乌拉坦麻醉, 腹部消毒后沿腹白线切开, 将胃及十二指肠拉出, 自十二指肠与胰腺结合处, 向上分离总胆管, 在胆总管靠近十二指肠和肝脏的两个方向分别结扎, 然后在 2 个结扎点中间剪断胆总管即可。手术完毕, 将胃及十二指肠放回腹腔, 缝合腹壁肌肉和皮肤。另取 10 只大鼠只分离胆管不结扎, 作为假手术组 (0.5% CMC-Na)。50 只胆管结扎大鼠分为 5 组: 模型组 (0.5% CMC-Na)、UCDA (100 mg/kg, 阳性药) 组和 PSII 80、40、20 mg/kg 组。造模后各组连续 ig 给药 7 d, 给药体积均为 10 mL/kg。给药第 7 天禁食过夜, 末次给药 24 h 后, 进行各项指标检测。

2.2 检测指标

2.2.1 一般状况及体质量 每天给药前观察大鼠毛色、行为、分泌物等一般状态情况, 每 2 天测定体质量 1 次, 根据体质量调整给药量。

2.2.2 血液生化检查 末次给药 24 h 后, 股动脉取血, 室温静置 40 min 后, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 采用试剂盒测定血清中 ALT、AST、ALB、ALP、GGT、TBIL 和 TBA 水平。

2.2.3 肝脏质量及脏器系数 采血完毕, 脱颈椎处死大鼠, 取出全部肝脏称质量, 计算肝脏系数。

肝脏系数 = 肝脏质量 (g) / 体质量 (g)

2.2.4 肝脏生化检查 肝脏称质量完毕, 取部分肝脏组织, 常规制备 10% 组织匀浆, 4 °C, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照试剂盒说明书测定 SOD、CAT、GSH-Px 活性, 评价肝脏氧化应激状态。

另取部分肝组织匀浆上清液,按照试剂盒说明书测定MPO活性,考察肝脏中性粒细胞水平及炎症状态。

2.3 数据处理与统计分析

计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS13.1统计软件,组间比较采用student-*t*检验考察显著性。

3 结果

3.1 给药后一般状况观察和体质量、肝脏系数的变化

与假手术组比较,胆管结扎后,随着时间进展,大鼠逐渐活动减少,皮毛变暗,粪便颜色变浅,尿液呈金黄色,体质量下降。造模7 d后,解剖可见模型动物肝脏色泽黄褐色,与假手术组比较,体质量显著降低($P < 0.01$),肝脏质量及肝脏系数均明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较,PSII各剂量组对模型大鼠一般状态和体质量无明显影响,但可明显降低模型动物肝脏系数,具有统计学显著差异($P < 0.01, 0.05$),UCDA 100 mg/kg对肝脏系数也具有明显的改善作用($P < 0.05$),结果见表1。

3.2 对胆管结扎大鼠血清生化指标的影响

与假手术组比较,模型组大鼠血清ALT、AST水平显著升高($P < 0.01$),而ALB水平明显降低($P < 0.05$),表明肝脏出现明显损伤;血清中TBIL、TBA水平均显著升高($P < 0.01$),同时ALP、GGT水平也显著升高($P < 0.01$),表明模型动物出现明显的胆汁淤积和胆管损伤。与模型动物比较,PSII 80.40 mg/kg给药均可显著降低血清ALT、AST、ALP、GGT、TBIL水平($P < 0.01$),80 mg/kg对血清TBA也有显著降低作用($P < 0.01$);PSII 20 mg/kg对血清ALP和TBIL有明显降低作用($P < 0.01$),但对其他指标未见明显影响。UCDA 100 mg/kg给药可明显降低血清ALT、AST、ALP和GGT水平($P < 0.05, 0.01$),对其余指标影响不显著,结果见表2。

3.3 对胆管结扎模型大鼠肝脏抗氧化酶活性的影响

与假手术组比较,胆管结扎造模7 d后,模型组肝脏抗氧化酶活性下降,主要表现为SOD和CAT活性显著降低($P < 0.01$),GSH-Px部分降低,提示肝脏出现明显的氧化应激状态。与模型组比较,PS II 80、

表1 PSII对胆管结扎大鼠体质量和肝脏系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of PSII on body weight and liver weight of bile duct ligation rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g		肝脏质量/ g	肝脏系数/ (g·g ⁻¹)
		造模前	造模7 d后		
假手术	—	258.9±12.0	267.4±11.4	9.4±0.5	0.035 2±0.001 4
模型	—	256.3±11.5	253.0±8.1**	11.2±1.2**	0.044 4±0.005 1**
UCDA	100	257.2±15.7	252.1±11.4	10.0±0.8 [#]	0.039 9±0.003 6 [#]
PSII	80	257.0±11.9	255.9±14.4	9.8±0.5 ^{##}	0.038 3±0.002 5 ^{##}
	40	261.7±12.9	262.5±11.8	10.4±0.8	0.039 5±0.002 6 [#]
	20	254.4±14.5	258.4±10.4	10.2±1.2	0.039 4±0.004 4 [#]

与假手术组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

表2 PSII对胆管结扎大鼠血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of picoside II on serum biochemistry of bile duct ligation rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	ALT/ (IU·L ⁻¹)	AST/ (IU·L ⁻¹)	ALB/ (μmol·L ⁻¹)	ALP/ (IU·L ⁻¹)	GGT/ (IU·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	TBA/ (μmol·L ⁻¹)
假手术	—	69.7±11.1	203.8±33.7	33.0±4.2	181.6±46.6	1.6±0.5	0.9±0.4	22.4±4.8
模型	—	173.2±17.9**	427.0±70.0**	28.9±2.5*	655.5±148.9**	53.8±11.6**	131.1±42.1**	276.9±41.8**
UCDA	100	131.9±43.0 [#]	324.4±64.2 ^{##}	29.7±2.8	511.0±37.9 ^{##}	35.3±9.1 ^{##}	132.1±32.4	276.2±45.8
PSII	80	114.2±31.3 ^{##}	301.5±66.6 ^{##}	32.6±3.5	371.1±103.3 ^{##}	33.4±6.9 ^{##}	72.3±25.4 ^{##}	230.4±20.2 ^{##}
	40	121.1±27.2 ^{##}	329.9±68.4 ^{##}	33.3±2.6	420.2±109.0 ^{##}	39.7±6.2 ^{##}	77.2±11.8 ^{##}	248.7±29.9
	20	155.2±38.2	365.2±67.1	31.1±3.1	406.7±113.6 ^{##}	44.5±10.6	74.9±14.4 ^{##}	257.0±18.0

与假手术组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

40 mg/kg 给药均可显著升高肝脏SOD和CAT活性($P < 0.05, 0.01$),对肝脏GSH-Px活性有升高趋势,未达统计学显著差异。UCDA 100mg/kg ig 给药对模型大鼠肝脏SOD、CAT和GSH-Px活性具有部分升高作用,但均未达统计学显著差异。结果见图1。

3.4 对胆管结扎模型大鼠肝脏MPO水平的影响

胆管结扎造模7 d后,与假手术组比较,模型组

大鼠肝脏MPO活性显著升高($P < 0.01$),表明肝脏出现明显的中性粒细胞浸润和炎症反应;与模型动物比较,PSII 80、40 mg/kg 给药均可显著降低肝脏MPO活性,差异具有统计学意义($P < 0.05, 0.01$),PSII 20 mg/kg 和 UCDA 100 mg/kg 给药可部分降低肝脏MPO活性,未达统计学显著差异。结果见图2。

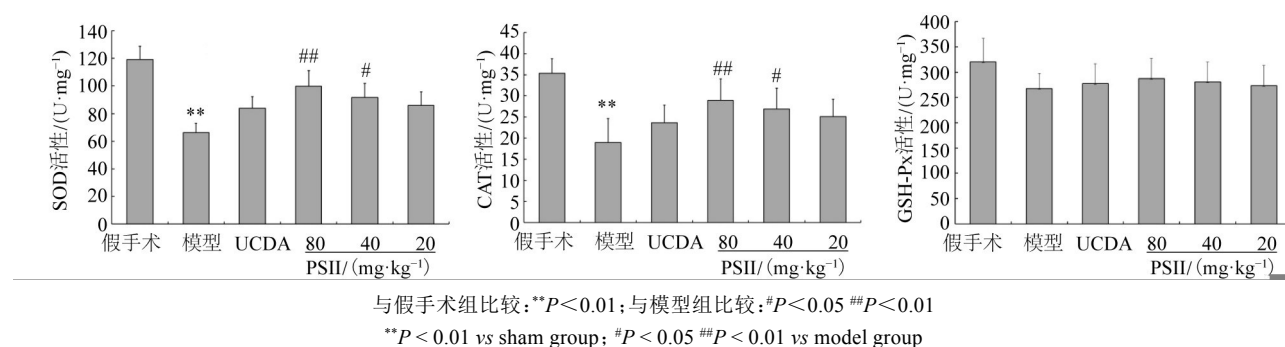


图1 PSII对胆管结扎大鼠肝脏组织抗氧化酶活性的影响($\pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of PSII on the activities of antioxidant enzymes in the liver of bile duct ligation rats ($\pm s, n = 10$)

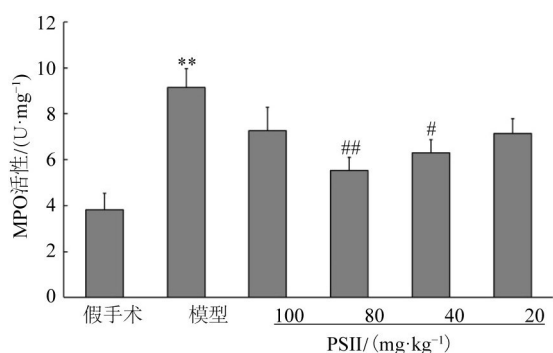


图2 PSII对胆管结扎大鼠肝脏组织MPO活性的影响($\pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of PSII on MPO activity of liver tissue in bile duct ligation rats ($\pm s, n = 10$)

4 讨论

大鼠胆总管结扎所致的胆汁淤积模型近似于临床的肝外胆汁淤积,但因其损伤因素单一且明确,可最大程度反映胆汁淤积状态下胆汁酸诱发的组织损伤,该模型的生理病理及分子机制也已获得了相对全面的阐明,相关研究对于阐明胆汁淤积性组织损害的发生、发展及药物干预的机制具有重要的参考价值,是目前应用最广和最成熟的胆汁淤积模型^[7]。为此,本研究选择该模型考察PSII在改善胆汁淤积性肝损伤中的作用。

大鼠胆管结扎后,胆汁不能正常分泌进入十二

指肠,胆汁中的成分在肝组织内大量淤积,并反流入血,造成黄疸和机体损伤。胆汁酸成分是多种胆汁淤积性肝损伤的重要和起始因素^[8],在肝脏中,肝细胞和胆管上皮细胞都是毒性胆汁酸成分的损伤靶点。尽管胆汁酸诱发细胞损伤的确切机制尚在不断更新,但线粒体途径介导的细胞损伤(能量代谢障碍、活性氧生成、凋亡等)^[9]和炎症反应所致的组织应激反应(中性粒细胞浸润、免疫攻击、氧化应激等)目前被认为是2个主要损伤机制^[10]。

为了评价PSII对该模型的改善作用,本研究选择肝脏形态、血清生化、肝脏生化等经典指标进行考察,其中血清生化指标中选择3组指标,分别考察肝细胞损伤(ALT、AST、ALB)、胆管上皮细胞损伤(ALP、GGT)和胆汁淤积状态(TBIL和TBA);肝脏生化选择2组指标,分别考察肝脏的氧化应激状态(SOD、CAT、GSH-Px)和中性粒细胞浸润程度(MPO)。

肝脏外观、质量系数以及血生化各项指标显示,模型大鼠肝脏出现明显的损伤,伴有明显的胆汁淤积和胆管损伤。与模型组比较,PSII各剂量组可明显降低模型动物肝脏系数,80和40 mg/kg 给药均可显著降低血清ALT、AST、ALP、GGT、TBIL水平,改善作用具有一定的剂量依赖性,由此提示,PSII对胆汁淤积性肝细胞损伤和胆管上皮细胞损伤具有明显的改善作用。

胆汁淤积状态下,一方面由于线粒体损伤,导致

氧化磷酸化脱偶联,呼吸链电子传递障碍,使得活性氧生成增加^[11];另一方面,由于中性粒细胞的浸润,被激活后,通过呼吸爆发,产生大量的超氧阴离子和活性氧^[12]。基于这2个因素,胆汁淤积状态下肝脏组织通常都存在明显氧化应激状态,表现为氧自由基增多、抗氧化酶活性下降和抗氧化物质耗竭。本试验中可见PSII 80和40 mg/kg ig给药对模型动物肝脏SOD、CAT活性下降具有明显的改善作用,提示抗氧化作用是其发挥改善作用的机制之一。

MPO主要存在于中性粒细胞等髓系细胞中,外界刺激可导致中性粒细胞聚集,释放MPO。MPO不仅能杀灭吞噬于细胞内的微生物,而且可释放到细胞外,破坏多种靶物质,对机体产生和调节炎症反应等多方面发挥作用^[13]。在本实验中,模型组动物肝脏组中MPO活性显著升高,而PSII可显著降低MPO活性,表明模型动物肝脏存在中性粒细胞活化和浸润,而PSII对此具有明显抑制作用。因此可见,对于中性粒细胞等炎症细胞的抑制作用,亦可能是PSII改善本模型胆管损伤的机制之一。

本实验结果显示,PSII对于大鼠胆管结扎所致的胆汁淤积性肝损伤具有明显的改善作用,涉及的机制可能包括上调肝组织抗氧化酶活性及抑制炎症细胞活化和浸润。

参考文献

- [1] 陈伟伟,李鹏,姚仲青,等.胡黄连苷-I和胡黄连苷-II研究进展[J].中药材,2015,38(8):1756-1760.
- [2] 张红艳,翟丽,王婷婷,等.胡黄连苷II通过抑制cyto C/caspase-9/caspase-3通路发挥神经保护作用[J].中国药理学通报,2017,33(5):668-674.
- [3] 李白雪,张传涛,冯全生,等.胡黄连苷II对体外H₂O₂诱导肝细胞(L-02)损伤Keap1Nrf2(ARE)抗氧化通路mRNA表达的影响[J].中华中医药杂志,2015,30(3):682-685.
- [4] 张文锐,周微,宋瑛世,等.胡黄连苷II药理研究进展[J].中国生化药物杂志,2014,34(5):183-186.
- [5] 高晓光,刘克辛,孟强.转运体和代谢酶在胆汁淤积性肝损伤中的作用机制[J].药物评价研究,2017,40(9):1210-1215.
- [6] 王涛,周植星,刘薇,等.秋水仙碱对大鼠胆管结扎所致胆汁淤积模型肝损伤的影响[J].中国药科大学学报,2014,45(6):715-719.
- [7] Shen K, Feng X, Su R, et al. Epigallocatechin 3-gallate ameliorates bile duct ligation induced liver injury in mice by modulation of mitochondrial oxidative stress and inflammation[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0126278.
- [8] Maillette de Buy Wenniger L, Beuers U. Bile salts and cholestasis[J]. Digestive and Liver Disease, 2010, 42(6): 409-418.
- [9] Tan M, Tang C, Zhang Y, et al. SIRT1/PGC-1 α signaling protects hepatocytes against mitochondrial oxidative stress induced by bile acids[J]. Free Radic Res, 2015, 49(8): 935-945.
- [10] Garcia-Irigoyen O, Moschetta A. A novel protective role for FXR against inflammasome activation and endotoxemia[J]. Cell Metab, 2017, 25(4): 763-764.
- [11] Gonzalez-Sanchez E, Perez M J, Nytofte N S, et al. Protective role of biliverdin against bile acid-induced oxidative stress in liver cells[J]. Free Radic Biol Med, 2016, 97(7): 466-477.
- [12] Cai S Y, Boyer J L. The role of inflammation in the mechanisms of bile acid-induced liver damage[J]. Dig Dis, 2017, 35(3): 232-234.
- [13] Sen A, Ozkan S, Recebova K, et al. Effects of Myrtus communis extract treatment in bile duct ligated rats[J]. J Surg Res, 2016, 205(2): 359-367.