

基于偏最小二乘法和多指标综合指数法的栀子根不同提取部位保肝作用评价

肖日传¹, 罗光明^{1,2*}, 朱继孝^{2,3}, 董丽华^{1*}, 张风波¹, 伍珊娜¹, 杨晓娟¹, 张俊逸¹

1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 江西 南昌 330004

3. 江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新中心, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 基于偏最小二乘(PLS)法和多指标指数法, 比较栀子根不同提取部位醇提物、石油醚部位、醋酸乙酯部位、氯仿部位、正丁醇部位和剩余水提部位对黄疸型肝炎小鼠的保肝退黄作用。**方法** 栀子根不同提取部位分别设置高、低剂量(9、3 g/kg), 分别ig给药, 连续7 d, 于给药第5天采用 α -萘异硫氰酸酯(ANIT)复制小鼠黄疸型肝炎模型, 测定血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(AKP)、总胆汁酸(TBA)、总胆红素(TBIL)、 γ -谷氨酰转氨酶(γ -GT)水平, 肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)水平, HE染色观察小鼠肝脏病理学变化, 采用PLS法结合多指标指数法比较栀子根各提取部位的总保肝效应。**结果** 与模型组相比, 除石油醚部位高、低剂量组和氯仿部位低剂量组外, 栀子根其余各提取部位对某个指标或多个指标均有一定程度的改善作用, 对小鼠肝组织病理学损伤有一定减轻, 多指标综合评价表明, 栀子根醋酸乙酯部位高剂量组保肝退黄效果最好。**结论** 栀子根醋酸乙酯部位、正丁醇部位有较好抑制黄疸型肝炎的作用, 其中以醋酸乙酯高剂量组作用最佳, 可能是保肝的活性部位, 机制可能与提高清除氧自由基能力、抑制脂质过氧化及增强胆红素代谢、胆汁分泌有关。

关键词: 栀子根; α -萘异硫氰酸酯; 有效部位; 保肝退黄; 多指标综合指数法

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)23-4921-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.016

Evaluation of hepatoprotective effects of different extracts in root of *Gardenia jasminoides* based on partial least squares method and multi-attribute comprehensive index method

XIAO Ri-chuan¹, LUO Guang-ming¹, ZHU Ji-xiao^{2,3}, DONG Li-hua¹, ZHANG Feng-bo¹, WU Shan-na¹, YANG Xiao-juan¹, ZHANG Jun-yi¹

1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Research Center of Chinese Herbal Medicine and Ethnic Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. Collaborative Innovation Center of Modern Science and Technology and Industrial Development of Jiangxi Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** To compare the hepatoprotective effects of different extracts in root of *Gardenia jasminoides* including ethanol extract, petroleum ether fraction, ethyl acetate, chloroform extract, *n*-butanol extract, and surplus water extract on the jaundice hepatitis mice by the partial least squares (PLS) method and multi index comprehensive evaluation method. **Methods** Setting up two groups of high and low doses (9 and 3 g/kg) in different extraction sites in root of *G. jasminoides* respectively, and administered to the stomach for 7 d. Copying a icteric hepatitis model of mice by alpha naphthylisothiocyanate (ANIT) in 5th d. Then, the alanine aminotransferase (ALT), aspartic transaminase (AST), alkaline phosphatase (AKP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT), total bile acid (TBA), total bilirubin (TBIL), superoxide dismutase (SOD), malonic dialdehyde (MDA), glutathione (GSH) activity were determined in serum and liver, and pathological changes were observed in mouse liver by HE stain, total hepatoprotective effect of the different extracts in root of *G. jasminoides* was compared by PLS and multi index comprehensive evaluation method. **Results** In addition to the high

收稿日期: 2017-05-03

基金项目: 国家公益性行业科研专项(201507002)

作者简介: 肖日传, 男, 在读硕士, 研究方向为中药资源开发与利用。E-mail: 1090019360@qq.com

*通信作者 罗光明, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源开发与利用。E-mail: jzlgm88@163.com

董丽华, 女, 在读博士, 研究方向为中药资源开发与利用。E-mail: 695708434@qq.com

dose group of petroleum ether and low dose group of chloroform, the different extracts in root of *G. jasminoides* were improved on some indexes or multiple indicators to an extent and compared with the model group, the pathological damage of liver tissue was alleviated obviously, multi index comprehensive evaluation showed that the high dose group of ethyl acetate in root of *G. jasminoides* had the best hepatoprotective effect. **Conclusion** The ethyl acetate extract and *n*-butanol extract in root of *G. jasminoides* have better inhibitory effect on icteric hepatitis, and the high dose group of ethyl acetate has the best effect, which may be the active site of liver protection, and mechanism may be related to improving the ability of eliminating oxygen free radical, inhibiting lipid peroxidation and enhancing bile bilirubin metabolism and secretion.

Key words: root of *Gardenia jasminoides*; alpha naphthylisothiocyanate; active fractions; treatment of jaundice hepatitis; multi index comprehensive evaluation

梔子根为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥根,为畚族常用药材,畚医称之为“山里黄根”,在畚药处方中被广泛使用,在浙江、福建、湖南等地的民间主要用来治疗乙型肝炎、丙型肝炎、黄疸型肝炎、肾炎水肿、感冒高热等病症^[1]。梔子根在《浙江省中药炮制规范》《中华本草》、广州部队《常用中草药手册》《四川中药志》《岭南草药志》和《中药大辞典》等本草著作^[2-3]、畚医药数据库、民间验方中均有记载,20 世纪五六十年代梔子根开始在临床上大量使用,1964 年,厦门市中医院康良石等^[4]老中医采用水边黄梔子根治愈传染性肝炎病例 30 例,效果良好,1975 年,广西中医学院伍绍岐^[5]以板蓝根和梔子根汤合用治愈急性黄疸性肝炎病例 53 例,疗效极佳。此外,临床上已经推出松梔丸、茵梔颗粒、复方梔子根颗粒、梔子根汤、梔子根去黄合剂、康氏乙肝合剂、康氏抗纤颗粒等以梔子根为君药配伍使用的中药复方,其中松梔丸被批准为中药第 3 类新药,是我国第 1 个治疗丙型肝炎的中成药,该方源于湖南省湘西侗族蒙氏家族祖传秘方,经反复验证,多年临床使用,证实对多种肝病疗效确切,由湘潭继蒙肝病研究所刘秀英教授研究开发为中药新药。

目前国内外对梔子根的化学成分和药理作用研究较少,仅有的研究表明,梔子根含有环烯醚萜类、三萜类、多糖、挥发油等化学成分^[6-10],现代药理研究表明,梔子根对四氯化碳诱导的急性肝损伤和脂多糖联合卡介苗诱导的免疫性肝损伤有一定的保护作用^[11-12],但是对大多古籍记载的用来治疗黄疸型肝炎的药效学研究却未见报道。为了科学阐释和验证梔子根实际的临床疗效,深入研究梔子根各提取部位的活性差异,确定其有效部位,本实验通过建立小鼠黄疸模型,采用偏最小二乘法(PLS)和多指标综合指数法对梔子根不同提取部位的总保肝效应值进行综合分析比较,探究其保肝退黄的药效部位,

以期对梔子根有效部位化学成分分离鉴定提供实验基础,为其治疗黄疸型肝炎的作用机制研究和进一步的临床应用提供理论依据,为更好地利用梔子资源和新产品的开发提供新的思路和方法。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性昆明小鼠,体质量 18~22 g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,合格证号为 SCXK(鲁)20140007。动物房室温 20~27 ℃;湿度 45%~60%;每日照明 10 h,熄灯 14 h;普通饲料喂养,自由饮水,正常适应。

1.2 药物与试剂

梔子根药材由九江湖口中药材基地提供,经江西中医药大学药学院葛菲教授鉴定为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥根。联苯双酯滴丸(万邦药业股份有限公司,批号 A02140812);5S 压榨一级花生油(山东鲁花集团有限公司,批号 XC20151215);无水乙醇(天津市恒星化学试剂制造有限公司,批号 20160510);徕卡石蜡(Leica Biosystems Richmond Inc.,批号 39601006); α -萘异硫氰酸酯(ANIT,阿拉丁化学试剂有限公司,批号 k1424065);丙氨酸转氨酶(ALT,批号 20161224)、天冬氨酸转氨酶(AST,批号 20161222)试剂盒购于南昌百特生物有限公司;碱性磷酸酶(AKP,批号 20161219)、总蛋白(TP,批号 20160918)、总胆汁酸(TBA,批号 20161224)、总胆红素(TBIL,批号 20160918)、 γ -谷氨酰转移酶(γ -GT,批号 20161224)、超氧化物歧化酶(SOD,批号 20161224)、丙二醛(MDA,批号 20161215)试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH,批号 20161222)、无毒环保 HE 染液(批号 20170106)均购于南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

Sartorius bs224s 电子分析天平(北京赛多利斯

仪器系统有限公司); KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); AU480 全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司); UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); JW-3021HR 高速冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司); DFY-400 摇摆式中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司); TKY-BMB 型石蜡包埋机及专用包埋冷台(湖北泰康医疗设备有限公司); LEICA RM2245 石蜡切片机(德国徕卡); T10standard 分散机(德国 IKA 公司); MULTISKAN GO 酶标仪(赛默飞世尔科技公司)。

2 方法

2.1 栀子根不同提取部位的制备

2.1.1 栀子根醇提物的制备 取栀子根药材, 切块粉碎, 取干燥粗粉 90 g, 分别以 10 倍量和 8 倍量 70% 乙醇进行 2 次回流提取, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩定容至 150 mL, 使生药质量浓度为 0.6 g/mL。取其中 75 mL 醇提液, 作为醇提物高剂量组给药药液; 取上述溶液 20 mL 稀释 3 倍作为醇提物低剂量组给药药液; 剩余 75 mL 醇提液用于萃取。

2.1.2 不同提取部位的制备 将 75 mL 醇提液置于 500 mL 分液漏斗中, 每次以 100 mL 石油醚萃取, 反复多次, 直至萃取液接近无色, 合并溶液, 回收溶剂得石油醚浸膏。按上述方法依次用醋酸乙酯、氯仿、正丁醇萃取, 即得到各部位浸膏, 各部位临用前以 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 溶液溶解配制, 均稀释定容至 75 mL, 使药液生药质量浓度为 0.6 g/mL, 即得石油醚部位、醋酸乙酯部位、氯仿部位、正丁醇部位和剩余水提部位高剂量组给药药液; 取上述各溶液 20 mL 稀释 3 倍, 使生药质量浓度为 0.2 g/mL, 即为各部位低剂量组给药溶液。

2.2 分组、给药及造模

将小鼠随机分为 15 组, 每组 10 只, 分别为对照组、模型组、阳性药联苯双酯组(150 mg/kg) 及栀子根不同提取部位给药组(共 6 个提取部位, 每个提取部位分设高、低剂量, 因灌胃容积为 15 mL/kg 经换算, 高剂量即相当于生药剂量 9 g/kg, 低剂量相当于生药剂量 3 g/kg), 各组小鼠适应性喂养 5 d 后, 分别 ig 给予相应的药液, 给药体积为 15 mL/kg, 对照组和模型组 ig 给予等量双蒸水, 每天 1 次, 连续 7 d。第 5 天给药 2 h 后, 除对照组小鼠 ig 花生油外, 其余组均以 80 mg/kg 的 ANIT 花生油溶液 ig 造模, 造模前禁食不禁水 16 h, 造模后禁食

不禁水 4 h, 处理前 12 h 禁食不禁水, 造模 48 h 后处理。摘眼球取血, 剖腹取肝脏, 全血 3 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清液冷藏备用。摘取小鼠左叶完整肝脏于 10% 甲醛溶液固定, 用于病理学分析。取部分肝组织置离心管, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴制备肝匀浆, 以 2 500 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清液冷藏备用。

2.3 生化指标检测及肝脏病理学观察

酶标仪法测定小鼠血清中 ALT、AST、AKP、TBA、TBIL、 γ -GT 的活性和肝组织中 SOD、GSH 的水平, 紫外分光光度法测定肝组织中 MDA 的量, 各指标详细测定步骤按试剂盒说明书进行。

取出用 10% 甲醛固定好的肝组织, 切成小块, 置包埋盒中, 用纱布包好, 流水冲洗(6 h), 再进行常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(厚度调整为 4 μ m)、展片、烤片(60 °C 恒温箱中烘烤 3 h), 苏木素-伊红(HE) 染色, 中性树胶覆盖封片。200 倍显微镜下观察小鼠肝组织形态学改变。

2.4 数据处理

采用 Graphpad Prism 6.0 软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用 One-way ANOVA。

2.5 效应整合

根据多指标综合指数法^[13], 对血清和肝脏中 ALT、AST、AKP、TBA、TBIL、 γ -GT、SOD、MDA、GSH 共 9 个指标进行标准化处理, 计算各提取部位的总保肝效应值。当模型组指标值大于对照组时 $V_{\text{标}} = (V_{\text{模型}} - V_{\text{给药}}) / V_{\text{模型}}$ (V 为各指标值), 模型组指标值小于对照组时 $V_{\text{标}} = (V_{\text{给药}} - V_{\text{模型}}) / V_{\text{模型}}$ 。通过查阅文献, 结合临床上实际检测和衡量肝脏功能的指标, 确定上述指标的相对重要性, 再利用直观的变量重要性值(VIP 值) 定义各指标的权重, 总保肝效应值即为 9 项指标的归一化值加权后的总和。本实验采用 SIMCA-P 11.5 软件中的 PLS 法^[14] 计算各指标的 VIP 值, VIP 值能在一定程度上说明各指标对结果的重要性影响, 一般认为指标 VIP 值大于 1 则其贡献较大。最终确定 AST、SOD、MDA 指标的权重系数为 3, TBA、TBIL、GSH 指标权重系数为 2, ALT、AKP、 γ -GT 权重系数为 1。通过计算综合效应值可更好地评价栀子根各提取部位的保肝退黄功效。

3 结果

3.1 栀子根不同提取部位对黄疸型肝炎小鼠血清生化指标的影响

与对照组相比, 模型组小鼠血清中 ALT、AST、

AKP、 γ -GT、TBIL 和 TBA 均显著升高 ($P<0.01$), 说明 ANIT 诱导小鼠致黄疸型肝炎的动物模型造模成功; 与模型组相比, 联苯双酯组小鼠血清 ALT、AST、TBIL 和 TBA 明显下降 ($P<0.01$), 说明联苯双酯对 ANIT 诱导的胆汁瘀积型肝损伤有较强的改善作用和明显的降酶退黄效果; 与模型组比较, 除了石油醚部位高、低剂量组和氯仿部位低剂量组外, 栀子根其他部位对某项指标或多个指标均有明显的改善作用; 其中醇提物组高、低剂量对 ALT、AST、AKP、 γ -GT、TBIL 和 TBA 各指标均有一定程度的

改善 ($P<0.05$ 、 0.01); 醋酸乙酯部位不同剂量能显著抑制小鼠血清中 ALT、AST、TBIL、TBA 指标的升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 高剂量可明显降低 γ -GT 水平 ($P<0.05$); 正丁醇部位不同剂量能显著降低小鼠血清中 AST、AKP、TBA、 γ -GT 水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 高剂量组可明显降低 TBIL 活性 ($P<0.01$); 而氯仿高剂量组、剩余水提部位仅对少数指标有改善作用, 具体结果见表 1。说明栀子根醇提物、醋酸乙酯部位、正丁醇部位有较明显的保肝退黄作用, 而石油醚、氯仿、水提部位则几乎没有降酶保肝的作用。

表 1 栀子根不同提取部位对黄疸型肝炎小鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of different extraction parts in root of *G. jasminoides* on serum biochemical index of mice with jaundice liver damage ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	AKP/(U·L ⁻¹)	γ -GT/(U·L ⁻¹)	TBIL/(μ mol·L ⁻¹)	TBA/(μ mol·L ⁻¹)
对照	—	16.62 ± 5.01	28.82 ± 5.77	20.29 ± 6.55	19.76 ± 4.96	1.53 ± 0.40	19.79 ± 7.27
模型	—	212.70 ± 23.59 ^{##}	176.80 ± 33.84 ^{##}	131.00 ± 25.03 ^{##}	35.20 ± 6.51 ^{##}	117.60 ± 23.40 ^{##}	346.20 ± 68.01 ^{##}
联苯双酯	0.15	97.98 ± 21.00 ^{**}	105.20 ± 8.95 ^{**}	108.60 ± 17.97	32.36 ± 4.59	72.22 ± 19.70 ^{**}	228.80 ± 33.32 ^{**}
栀子根醇提物	3	141.20 ± 18.89 ^{**}	110.60 ± 26.75 ^{**}	93.06 ± 17.54 [*]	26.12 ± 3.67 [*]	75.03 ± 18.35 [*]	242.90 ± 65.51 ^{**}
	9	138.80 ± 20.98 ^{**}	108.50 ± 52.71 ^{**}	77.92 ± 19.82 ^{**}	23.82 ± 5.12 ^{**}	72.15 ± 13.75 [*]	245.60 ± 77.97 [*]
栀子根石油醚部位	3	185.50 ± 33.65	147.30 ± 29.86	105.30 ± 24.59	33.78 ± 3.63	98.20 ± 20.41	331.40 ± 14.23
	9	202.70 ± 23.51	185.80 ± 37.45	115.30 ± 20.90	37.20 ± 4.95	91.49 ± 10.15	329.20 ± 50.43
栀子根氯仿部位	3	222.30 ± 25.88	156.20 ± 17.97	110.31 ± 15.85	27.66 ± 9.10	80.72 ± 15.13	335.70 ± 56.45
	9	205.80 ± 25.08	110.00 ± 34.31	109.01 ± 12.55	25.86 ± 2.50 [*]	98.11 ± 4.54	249.10 ± 65.09 ^{**}
栀子根醋酸乙酯部位	3	140.20 ± 30.39 ^{**}	114.00 ± 23.49 [*]	107.70 ± 18.73	27.16 ± 3.57	65.13 ± 21.73 ^{**}	245.90 ± 39.62 [*]
	9	152.90 ± 8.25 ^{**}	106.20 ± 15.97 ^{**}	104.90 ± 11.57	24.94 ± 6.20 [*]	60.06 ± 26.90 ^{**}	238.70 ± 65.42 [*]
栀子根正丁醇部位	3	203.10 ± 30.90	124.80 ± 30.10 ^{**}	93.65 ± 21.82 [*]	24.13 ± 2.75 ^{**}	83.36 ± 9.95	245.80 ± 49.43 [*]
	9	248.70 ± 26.08	111.40 ± 43.20 [*]	71.91 ± 19.43 ^{**}	26.18 ± 3.39 ^{**}	63.07 ± 18.81 ^{**}	215.50 ± 62.68 ^{**}
栀子根水提部位	3	211.50 ± 30.03	156.90 ± 33.02	117.30 ± 13.35	29.09 ± 2.78	76.79 ± 24.98 [*]	299.70 ± 86.91
	9	168.80 ± 21.60 [*]	99.22 ± 14.50 ^{**}	114.30 ± 24.32	28.28 ± 2.76	51.92 ± 23.28 ^{**}	268.50 ± 63.90

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$, 下同

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as below

3.2 栀子根不同提取部位对黄疸型肝炎小鼠肝脏生化指标的影响

与对照组相比, 模型组小鼠肝组织中 SOD、GSH 活性显著降低 ($P<0.01$), MDA 的量明显升高 ($P<0.01$), 表明黄疸动物模型复制成功。与模型组比较, 栀子根醇提物、醋酸乙酯部位和正丁醇部位不同剂量能显著抑制 SOD 和 GSH 活性的降低, 显著抑制 MDA 水平的升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 而其他部位对小鼠肝脏生化指标没有明显的改善作用, 具体结果见表 2。初步判断醋酸乙酯和正丁醇部位可能是治疗黄疸的有效部位, 与上述血清指标结果一致。

3.3 基于多指标综合指数法的栀子根不同提取部位保肝退黄效应评价

首先将所有指标的数据导入到 SIMCA-P 11.5 软件 (Umetrics AB 公司), 将 9 个指标作为变量 (Variables), 15 个组别作为观测值 (observations), 分析模型选择 PLS Model, 可得到 VIP 值, 如图 1 所示, AST、SOD、MDA、TBA 指标的 VIP 值均大于 1, 表明其影响相对重要, 而 TBIL、GSH、 γ -GT、ALT、AKP 指标的 VIP 值较小, 表明变量相对影响不大。再结合各指标标准化后的数据, 利用多指标综合加权计算保肝总效应值, 结果见表 3。各组保肝总效应大小为醋酸乙酯部位高剂量组 > 醇提物

表2 梔子根不同提取部位对黄疸型肝炎小鼠肝脏氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effect of different extraction parts in root of *G. jasminoides* on liver tissue on oxidative stress index of mice with jaundice liver damage ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	GSH/(mg·g ⁻¹)
对照	—	315.00±23.34	5.54±0.75	29.64±4.22
模型	—	218.30±20.54 ^{##}	13.46±2.14 ^{##}	15.19±1.85 ^{##}
联苯双酯	0.15	278.50±45.77 ^{**}	8.49±0.75 ^{**}	26.90±3.46 ^{**}
梔子根醇提物	3	268.60±31.90 [*]	9.21±0.90 ^{**}	22.33±3.11 [*]
	9	272.90±28.20 ^{**}	9.04±1.59 ^{**}	21.87±3.16 [*]
梔子根石油醚部位	3	231.30±25.94	12.40±2.05	15.80±1.92
	9	224.40±17.53	12.21±1.77	16.53±2.08
梔子根氯仿部位	3	256.60±16.87	11.24±1.94	18.22±2.76
	9	261.80±36.16	10.54±1.23	16.83±2.23
梔子根醋酸乙酯部位	3	266.30±24.99 [*]	9.35±0.97 ^{**}	19.20±1.87
	9	279.30±41.89 ^{**}	9.23±1.32 ^{**}	25.14±4.15 ^{**}
梔子根正丁醇部位	3	275.20±14.65 [*]	9.92±1.07 [*]	17.51±2.37
	9	270.60±19.72 [*]	9.52±1.04 ^{**}	20.05±3.55 [*]
梔子根水提部位	3	249.60±42.73	12.97±1.29	16.28±2.74
	9	258.20±20.96	10.20±1.66 [*]	16.92±2.31

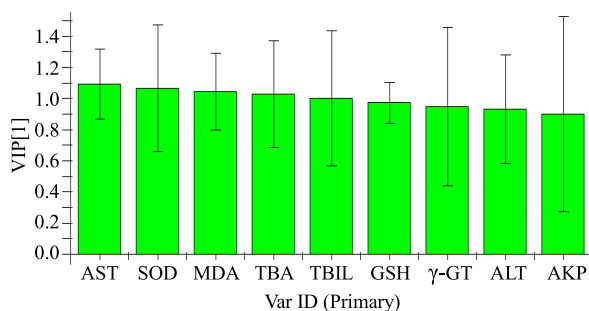


图1 保肝指标的VIP图

Fig. 1 VIP plot of liver function index

高剂量组>醇提物低剂量组>正丁醇部位高剂量组>醋酸乙酯部位低剂量组>水提部位高剂量组>正丁醇部位低剂量组>氯仿部位高剂量组>氯仿部位低剂量组>水提部位低剂量组>石油醚部位低剂量组>石油醚部位高剂量组,研究表明醋酸乙酯高剂量的保肝总效应值最高,大于醇提物,正丁醇部位高剂量的效应值仅次于醇提物,且梔子根各提取部位在一定剂量范围内,随着剂量的增加,其保肝效应也增大,呈一定的量效关系。

表3 梔子根不同提取部位对黄疸型肝炎小鼠的总保肝效应值

Table 3 Total effect of different extraction parts in root of *G. jasminoides* on jaundice liver damage

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>I</i> ^c -ALT	<i>I</i> ^a -AST	<i>I</i> ^b -TBA	<i>I</i> ^b -TBIL	<i>I</i> ^c -AKP	<i>I</i> ^c -γ-GT	<i>I</i> ^a -SOD	<i>I</i> ^a -MDA	<i>I</i> ^b -GSH	总保肝效应值
对照	—	0.92	0.84	0.94	0.99	0.85	0.44	0.44	0.59	0.95	13.58
联苯双酯	0.15	0.54	0.40	0.34	0.39	0.17	0.08	0.28	0.37	0.77	6.94
梔子根醇提物	3	0.34	0.37	0.30	0.36	0.29	0.26	0.23	0.32	0.47	5.91
	9	0.35	0.39	0.29	0.39	0.41	0.32	0.25	0.33	0.44	6.23
梔子根石油醚部位	3	0.13	0.17	0.04	0.16	0.20	0.04	0.06	0.08	0.04	1.78
	9	0.05	0.05	0.05	0.22	0.12	0.06	0.03	0.09	0.09	1.46
梔子根氯仿部位	3	0.05	0.12	0.03	0.31	0.16	0.21	0.18	0.16	0.2	2.88
	9	0.03	0.38	0.28	0.17	0.17	0.27	0.20	0.22	0.11	3.99
梔子根醋酸乙酯部位	3	0.34	0.36	0.29	0.45	0.18	0.23	0.22	0.31	0.26	5.42
	9	0.28	0.40	0.31	0.49	0.20	0.29	0.28	0.31	0.66	6.66
梔子根正丁醇部位	3	0.05	0.29	0.29	0.29	0.29	0.31	0.26	0.26	0.15	4.54
	9	0.17	0.37	0.38	0.46	0.45	0.26	0.24	0.29	0.32	5.90
梔子根水提部位	3	0.01	0.11	0.13	0.35	0.10	0.17	0.14	0.04	0.07	2.25
	9	0.21	0.44	0.22	0.56	0.13	0.20	0.18	0.24	0.11	4.90

a-权重系数为3, b-权重系数为2, c-权重系数为1, 总保肝效应值=3*I*^a+2*I*^b+*I*^c

a-weight coefficient is 3, b-weight coefficient is 2, c-weight coefficient is 1, total hepatoprotective effect = 3*I*^a+2*I*^b+*I*^c

3.4 肝脏病理学检查

选取各提取部位高剂量组肝脏组织制作病理切片, 200 倍光镜下观察发现对照组小鼠肝细胞形态无明显异常, 细胞围绕中央静脉整齐单行排列; 模型组细胞结构破坏, 细胞核碎裂, 静脉周围点状或小灶状坏死, 坏死区空泡样变并伴有炎性细胞浸润、体积变

大等病理性变化; 阳性药组肝细胞结构基本完整, 形态清晰, 未见成片状变性、坏死细胞; 栀子根醇提物及醋酸乙酯和正丁醇部位肝细胞轻度肿胀, 变性坏死区有较大幅度的改善, 而其他部位对肝组织损伤并没有明显的减轻, 由此进一步说明栀子根中保肝退黄作用以醋酸乙酯部位、正丁醇部位为佳。见图 2。

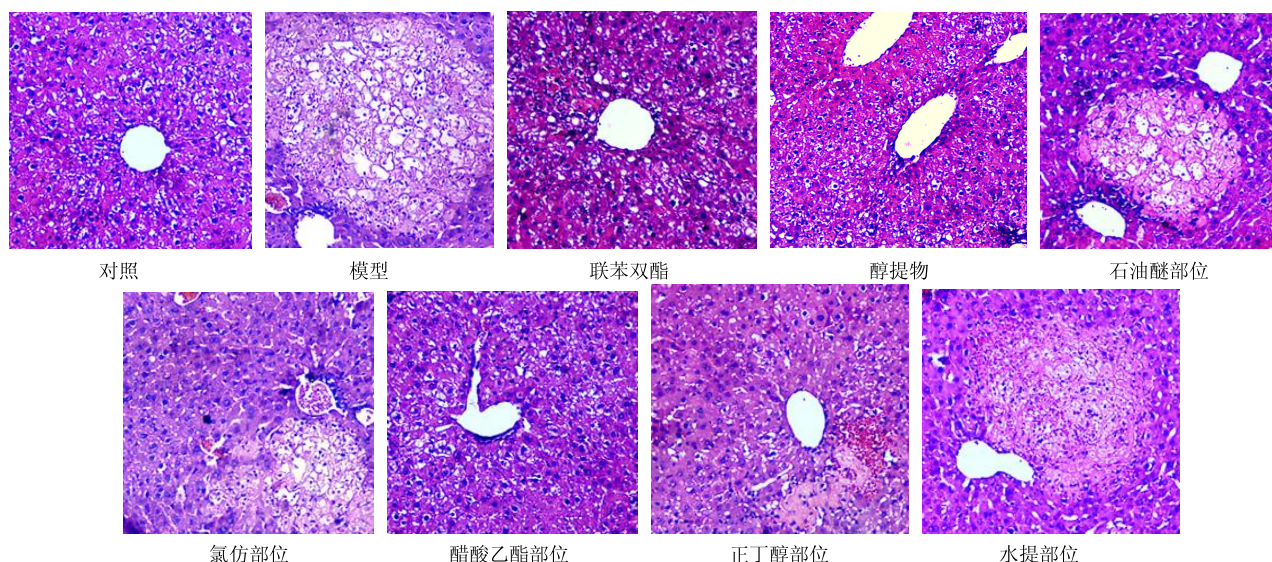


图 2 栀子根不同提取部位对黄疸型肝炎小鼠肝脏病理改变的影响 ($\times 200$, HE)

Fig. 2 Effect of different extraction parts in root of *G. jasminoides* on liver pathological changes of mice with icteric hepatitis ($\times 200$, HE)

4 讨论

黄疸型肝炎, 又称为胆汁淤积型肝损伤, 是一种常见的肝胆疾病, 感染该疾病的患者将出现食欲减退、呕吐乏力、皮肤和巩膜呈浅黄至深黄色, 皮肤瘙痒等临床症状。中医认为, 黄疸型肝炎属于中医“黄疸”中的“阳黄”“急黄”范畴, 其病理基础为湿热内蕴, 瘀热互结为黄疸发生的重要病理因素。由于患者体中阳偏盛, 感受湿浊之邪后湿从热化, 或直接感受湿热疫毒之邪, 导致湿热阻滞, 脾胃肝胆功能失调, 胆液不循常道, 随血泛滥引起目黄、身黄、尿黄等症状。该病的治疗当以清热解郁除湿, 利胆退黄为要义。

ANIT 是一种间接性肝毒剂, 既能造成胆管的损伤, 又能杀死肝细胞, 被广泛用于诱导胆汁淤积型肝损伤模型^[15-19]。通过预试验, 确定 ANIT 的给药剂量为 80 mg/kg, 实验过程中观察小鼠造模前后的变化, 发现给予 ANIT 之后, 除对照组外, 其他各组小鼠变得安静, 倦怠乏力, 蜷缩抱团, 毛发膨胀, 毫无光泽, 进食量和饮水量明显减少, 尿液呈

深黄色, 不同提取部位有不同程度的影响, 与造模前的活跃状态迥异。这同黄疸型肝炎的临床表现相符。模型组小鼠血清中 ALT、AST、AKP、TBIL、TBA、 γ -GT 各指标值均明显升高, 升高的程度与肝细胞损伤、胆汁淤积的程度呈正相关关系, 说明黄疸模型复制成功, 其中 AKP、TBIL、TBA、 γ -GT 是判断黄疸型肝炎损伤程度的重要指标。为了综合反映栀子根不同提取部位的保肝退黄活性, 本实验除了选取血清中常见的黄疸型肝炎功能指标外, 还选取了肝组织中 SOD、MDA、GSH 3 项指标进行测定, 再采用 PLS 法计算 9 项指标的 VIP 值, 确定重要性程度, 结合文献及临床实际定义各指标权重。由于药物对各指标的影响程度不同且各指标量纲不一致, 故需要对指标进行归一化处理, 将标化处理后的指标值乘以其权重, 多指标综合指数法计算总保肝效应值, 最后来全面评价其药效。

栀子根为畜族常用药材, 畜民称之为山里黄根, 常用作治疗黄疸, 本实验通过建立 ANIT 诱导动物黄疸型肝炎模型, 从血清和肝组织中多项生化

指标、组织病理切片表明, 栀子根醇提物、醋酸乙酯提取部位和正丁醇提取部位对黄疸型肝损伤有一定程度的减轻, 对胆管的阻塞有缓解, 对肝细胞的死亡有改善, 且在一定剂量范围内, 随着剂量的增加, 对肝脏的保护作用也逐渐增强, 呈现较好的量效关系。通过计算保肝总效应值, 表明醋酸乙酯高剂量组的保肝退黄效果最佳, 比醇提物效果还要好, 推测醋酸乙酯部位可能是保肝的有效部位, 根据各指标的实质影响, 认为其对肝细胞的保护可能是通过抗氧化作用, 降低脂质过氧化程度, 调节胆汁酸和胆红素的代谢来发挥效果的, 当然该部位的化学成分及药效物质基础仍有待进一步研究。本实验采用 PLS 结合多指标综合指数法用于栀子根不同提取部位保肝作用的比较研究, 初步确定了栀子根保肝的活性部位, 为栀子根的临床应用和新产品的开发提供了实验依据, 为深入探讨栀子根保肝退黄机制及物质基础提供理论支撑。

参考文献

- [1] 王伟影, 毛菊华, 陈张金, 等. 畚药山里黄根的质量标准研究 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 1105-1109.
- [2] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药饮片炮制规范 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2010.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [4] 康良石, 康明焜, 林庆祥, 等. 水边黄栀子根治疗传染性肝炎三十例 [J]. 福建中医药, 1964, 9(2): 44.
- [5] 伍绍歧. 板蓝根栀子根汤治疗急性黄疸型肝炎 53 例报告 [J]. 广西中医药, 1980, 3(3): 13-14.
- [6] 曹百一, 刘润祥, 王 晶, 等. 栀子根化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(10): 784-787.
- [7] 王 斌, 杨 彬, 穆 鑫, 等. 栀子根挥发油的成分分析 [J]. 化学与生物工程, 2011, 28(8): 84-87.
- [8] 何嘉娜, 黄 真, 汪小玉, 等. 正交试验法优化畚药山里黄根多糖的提取工艺 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(2): 351-354.
- [9] 李 江, 林 兴, 黄忠仕, 等. 栀子花根的生药学鉴定 [J]. 中草药, 2004, 35(11): 1299-1301.
- [10] 王雪芬, 陈家源, 张贵岭. 栀子茎和根化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1986, 11(10): 44-45.
- [11] 陈梦静, 汪小玉, 沈 炜, 等. 畚药山里黄根水提物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(6): 708-711.
- [12] 黄思斯, 黄 真, 汪小玉. 畚药山里黄根水提液对 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 浙江中医杂志, 2015, 50(10): 774-775.
- [13] 庞汉青, 唐于平, 史旭芹, 等. 基于主成分分析和多指标综合指数法丹参不同有效部位的活血化瘀作用比较 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3239-3247.
- [14] 吴 莎, 刘启安, 李 云, 等. 最小二乘支持向量机和偏最小二乘法在栀子中间体纯化工艺近红外定量分析中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 990-997.
- [15] Ai G, Huang Z M, Liu Q C. Total flavonoids from flowers of *Abelmoschus manihot* for Amelioration of α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis by regulating expression of transporters [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(2): 162-166.
- [16] Zhao Y L, Ma X, Wang J B, *et al.* Large dose means significant effect-dose and effect relationship of Chi-Dan-Tui-Huang decoction on α -naphthylisothiocyanate-induced cholestatic hepatitis in rats [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0637-0.
- [17] Tang X W, Yang Q L, Yang F, *et al.* Target profiling analyses of bile acids in the evaluation of hepatoprotective effect of gentiopicroside on ANIT-induced cholestatic liver injury in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194(8): 63-71.
- [18] Fang Z Z, Tanaka N, Lu D, *et al.* Role of the lipid-regulated NF- κ B/IL-6/STAT3 axis in α -naphthyl isothiocyanate-induced liver injury [J]. *Arch Toxicol*, 2017, 91(5): 2235-2244.
- [19] Ding L L, Zhang B F, Zhan C S, *et al.* Danning tablets attenuates α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis by modulating the expression of transporters and metabolic enzymes [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2014, 14(1): 249.