

大黄不同炮制品对阿托伐他汀的增效减毒作用

赵颖, 李冰韶, 赵馨雨, 刘鑫, 王永洁, 刘欣妍, 余玲, 吴清*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要:目的 探究大黄不同炮制品对阿托伐他汀(ATS)的增效减毒作用。方法 通过人肝脏 L02 细胞实验考察生、酒、熟大黄提取物与 ATS 联用后的保肝作用, 从中筛选出二者联用后保肝作用最优的炮制品提取物。通过人肝癌 HepG2 细胞实验确定该炮制品提取物的有效调脂剂量范围; 基于 SD 大鼠高脂血症模型, 通过测定血脂和转氨酶水平、相关氧化应激参数, 检测肝脏组织病理切片对最优提取物和 ATS 联用的调脂和保肝作用进行整体评价。结果 3 种大黄炮制品中酒大黄醇提物可显著提高 L02 细胞存活率, 对 ATS 所致 L02 细胞损伤的保护效果最好; 同时酒大黄醇提物也可有效降低 HepG2 细胞内总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)水平; ATS 与酒大黄醇提物的保肝配比和调脂配比(质量比)分别为 1:6.7~1:9.0 和 1:35.8~1:71.6。酒大黄醇提物与 ATS 联用后可降低高脂血症大鼠的血脂水平和肝脏中脂质含量; 使大鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平显著降低, 肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)活力显著增强, 丙二醛(MDA)水平显著降低; 且高剂量酒大黄醇提物与 ATS 联用组可显著抑制炎症细胞浸润和胆管增生。结论 酒大黄醇提物能显著改善 ATS 引发的肝功能损伤, 而且能增强 ATS 对高脂血症大鼠的调脂治疗效果, 发挥减毒增效的作用。

关键词: 大黄炮制品; 阿托伐他汀; 调脂; 增效减毒; 总胆固醇; 三酰甘油

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)18-4398-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.020

Study on efficacy-enhancing and toxicity-reducing of different rhubarb processed products combined with atorvastatin

ZHAO Ying, LI Bing-shao, ZHAO Xin-yu, LIU Xin, WANG Yong-jie, LIU Xin-yan, YU Ling, WU Qing

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of different processed products of rhubarb combined with atorvastatin (ATS) on the efficacy-enhancing and toxicity-reducing. **Methods** L02 cells were used to investigate the hepatoprotective effects of raw rhubarb, wine-fried rhubarb and wine-steamed rhubarb in clinical application combined with ATS, and the extracts of the processed products with the best liver protection were screened out. The effective lipid-lowering dose range of the extract of the processed product was determined by HepG2 cell experiments; Finally, based on the model of hyperlipidemia in SD rats, the lipid-lowering and hepatoprotective effects of the optimal extract and ATS were generally evaluated by measuring the blood lipid and transaminase levels and related oxidative stress parameters, detecting the histopathological section of the liver. **Results** The alcohol extract of wine-fried rhubarb in the three processed artillery products significantly improved the survival rate of L02 cells, and had the best protection effect on L02 cells induced by ATS. At the same time, the wine-fried rhubarb ethanol extract also effectively reduced the content of TC and TG in HepG2 hepatic steatosis cells. The liver-protection ratio and lipid-lowering ratio (mass ratio) of ATS to wine-fried rhubarb ethanol extract were 1:6.7—1:9.0 and 1:35.8—1:71.6. The wine-fried rhubarb ethanol extract and ATS reduced the blood lipid level and lipid content in the liver of hyperlipidemia rats; The serum levels of ALT and AST were significantly decreased, the SOD activity in the liver was significantly enhanced, and the MDA content was significantly reduced; And high-dose wine-fried rhubarb ethanol extract and ATS combination group significantly inhibited inflammatory cell infiltration and bile duct hyperplasia. **Conclusion** The combination of wine-fried rhubarb ethanol extract and ATS can significantly improve the liver function damage caused by ATS, enhance the effect of lipid-lowering therapy on hyperlipidemic rats, and play a role in reducing toxicity and increasing efficiency.

Key words: rhubarb processed products; atorvastatin; lipid-lowering; efficacy-enhancing and toxicity-reducing; TC; TG

收稿日期: 2019-06-06

作者简介: 赵颖, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: 18801151218@163.com

*通信作者 吴清, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: qwu@vip.sina.com

高脂血症 (hyperlipemia) 是脂肪代谢紊乱的一种常见疾病, 是动脉粥样硬化发病的主要因素, 可引起严重的心脑血管疾病, 同时也可导致非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的发生^[1]。脂代谢功能障碍使高脂血症患者肝脏的负担增加, 对药物等外界因素的刺激更为敏感, 更易发生肝损伤等肝脏病理变化。

阿托伐他汀 (atorvastatin, ATS) 是第 3 代他汀类降脂药, 疗效确切, 应用广泛。ATS 可通过降低总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和载脂蛋白 B (apo B) 水平治疗家族性和非家族性高胆固醇血症以及混合型高脂血症。但是其用于降脂治疗时可引起肝功能生化异常。服用 ATS 剂量为 10、20、40、80 mg/d 时对应的肝功能异常发生率分别为 0.2%、0.2%、0.6%、2.3%^[2-4], 说明 ATS 所致肝功能异常的发生率与其用药剂量有明显的相关性。ATS 所致肝损伤多表现为剂量依赖性的血清转氨酶升高, 常伴有肝脏肿大、黄疸、直接胆红素升高和凝血酶原时间延长等。研究表明^[5]ATS 可能是通过竞争性抑制 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶, 进而激活 Caspase-3、8、9 通路, 引起肝细胞染色体 DNA 断裂, 使细胞形态产生变化, 最终导致肝细胞的凋亡, 即发生肝细胞型肝损伤。由于 ATS 存在肝毒性的隐患, 可能使高脂血症患者肝脏病变的风险增加, 限制了 ATS 在临床的应用。

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎, 主要含有蒽醌类、蒽酮类、二苯乙烯类、鞣质类、有机酸类、多糖类等成分, 临床常用的炮制品有生大黄、酒大黄和熟大黄等, 炮制可改变大黄化学成分的含量或组成, 从而影响了其药理作用^[6]。大黄临床常用于治疗肝炎、肝纤维化等肝胆类疾病和血脂异常等代谢类疾病^[7-8], 也有将大黄与他汀类药物联合以增强调脂效果的应用案例。但目前与他汀类药物联用的大黄炮制品种类和提取方式并不明确, 缺乏大黄不同炮制品提取物与他汀类药物联用后药效差异的相关研究, 因此本研究通过细胞实验筛选得到与 ATS 联用后保肝和调脂作用均较优的大黄炮制品提取物及其配比关系, 作为动物给药剂量的设置依据, 通过动物实验从整体水平验证及评价该大黄炮制品提取物对 ATS 的减毒增效作用, 为二者在临床上更合理地应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Boxun 超净工作台 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); CO₂ 培养箱、Pico17 高速离心机 (美国赛默飞世尔科技公司); RE-52AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); 循环水式多用真空泵 (上海知信实验仪器技术有限公司); TS2R 倒置显微镜 (Nikon 仪器有限公司); 多功能酶标仪 (德国 BMG Labtech 公司)。

1.2 试药

生大黄 (批号 20170729)、酒大黄、熟大黄 (酒大黄和熟大黄由同一批生大黄炮制而成) 均购于北京本草方源药业有限公司, 经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定符合《中国药典》2015 年版^[9]标准。

DMEM 高糖培养基、青霉素链霉素混合液 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (Animal Blood Ware 公司); 0.25% 含 EDTA 胰酶 (美国 Corning 公司); 混合型高脂血症大鼠模型饲料 (南通特洛菲饲料科技有限公司); ATS (上海麦克林生化科技有限公司, 批号 C10111803); 三酰甘油 (TG)、TC、LDL-C、丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒, 南京建成生物制品研究所; BCA、丙二醛 (MDA)、蛋白浓度测定试剂盒, 南京凯基生物科技有限公司; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 天津市福晨化学试剂厂; 油酸 (OA)、棕榈酸 (PA), 美国 Sigma 公司。

1.3 细胞

人肝脏 L02 细胞、人肝癌 HepG2 细胞 (北京北纳创联生物技术研究院)。

1.4 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (100±10) g, 由斯贝福 (北京) 实验动物科技有限公司提供, 许可证号为 SCXK (京) 2016-0002。

2 方法

2.1 大黄提取物的制备

取生大黄、酒大黄、熟大黄适量, 分别加入 10 倍量水或 70% 乙醇, 回流提取 2 次, 每次 1.5 h, 滤过, 合并滤液, 浓缩, 减压干燥, 得生大黄、酒大黄、熟大黄水提物和醇提物, 其中总蒽醌、游离蒽醌质量分数见表 1。

2.2 大黄提取物对 ATS 所致 L02 细胞损伤的保护作用

取对数生长期的 L02 细胞接种于 96 孔培养板

表 1 不同大黄提取物中蒽醌类成分测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 1 Determination of anthraquinones in different rhubarb extracts ($\bar{x} \pm s, n=8$)

样品	总蒽醌/(mg·g ⁻¹)	游离蒽醌/(mg·g ⁻¹)
生大黄水提物	5.20±0.10	2.71±0.03
酒大黄水提物	4.71±0.07	3.03±0.03
熟大黄水提物	4.33±0.08	3.97±0.04
生大黄醇提物	11.41±0.16	5.21±0.04
酒大黄醇提物	10.90±0.11	7.31±0.07
熟大黄醇提物	9.77±0.24	9.29±0.06

中, 每孔的接种密度为 1.5×10^4 个, 接种 24 h 后, 同时以 0.11 mg/mL (200 μ mol/L) ATS 和 0、0.25、0.50、0.75、1.00 mg/mL 生、酒、熟大黄水提物或醇提物作用于细胞 36 h, 去除各组培养基, 每孔分别加入 100 μ L 10% MTT 工作液, 同时选取一些未接种细胞的孔, 向其中加入 10% MTT 工作液作为空白孔。继续培养 4 h 后, 去除各孔 10% MTT 工作液, 每孔分别加入 150 μ L DMSO, 振荡后用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 酒大黄醇提物和 ATS 联用对 L02 细胞转氨酶水平的影响

取对数生长期的 L02 细胞接种于 6 孔培养板中, 每孔的接种密度为 6×10^5 个, 接种 24 h 后, 同时以 0.11 mg/mL ATS 和 0、0.25、0.50、0.75、1.00 mg/mL 酒大黄醇提物作用于细胞 36 h, 将培养液收集到 EP 管中, 1 000 r/min 离心 10 min, 按照试剂盒说明取上清液检测各组培养液中 ALT、AST 水平。

2.4 酒大黄醇提物和 ATS 联用对 HepG2 肝脂肪变性细胞内 TG、TC 水平的影响

取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔培养板中, 每孔的接种密度为 4×10^5 个, 接种 24 h 后以 0.75 mmol/L (OA-PA 2:1) 脂质诱导液造模 24 h, 然后以 0.014 mg/mL (25 μ mol/L) ATS 分别和酒大黄醇提物 0.10、0.25、0.50、0.75、1.00 mg/mL 联合作用于细胞 24 h, 吸去培养基, PBS 清洗 1 次, 每孔加入 200 μ L RIPA 裂解液, 于冰水浴上裂解完全后将裂解液收集到 EP 管中, 按照试剂盒说明取裂解液检测细胞内 TG、TC 水平, 并以 BCA 法测定各孔蛋白量。

2.5 酒大黄醇提物与 ATS 联用对高脂血症大鼠的调脂活性及保肝作用

2.5.1 给药剂量设置 由“2.2”“2.3”项实验结果可知 ATS 和酒大黄醇提物的质量比为 1:6.7~1:9.0 时, 酒大黄醇提物对 ATS 所致的 L02 细胞损伤可发挥较好的保护作用; 由“2.4”项实验结果可知 ATS 和酒大黄醇提物的质量比为 1:35.8~1:71.6 时, 联用后对 HepG2 细胞的调脂作用较强。同时, 经查阅文献报道^[10-11]和前期预试验摸索, ATS 给药剂量为 60 mg/kg 时可使大鼠血清转氨酶水平显著升高, 且不会在给药期间引起大鼠的大批量死亡。因此, 大鼠 ATS 的给药剂量设为 60 mg/kg, 根据以上细胞实验配比结果及相关文献报道^[9,12-13], 选择酒大黄醇提物超低、低、中、高剂量分别为 0.5、2.0、4.0、8.0 g/kg。

2.5.2 模型制备 选取 SPF 级 SD 雄性大鼠 56 只, 适应性喂养 3 d 后, 随机抽取 8 只作为对照组, 饲喂普通饲料。其余 48 只饲喂高脂饲料以制备高脂血症模型。每周称体质量 1 次。造模 2 周后, 随机抽取 8 只模型大鼠及 8 只对照组大鼠, 眼眶取血, 测定血清中 TG、TC 水平, 以模型大鼠血清中 TG、TC 水平显著高于对照组判定高脂血症模型制备成功。

2.5.3 给药方法与分组 将造模成功的大鼠随机分为模型组、ATS 组 (60 mg/kg)、ATS+酒大黄醇提物 0.5、2.0、4.0、8.0 g/kg (ATS+VL、ATS+L、ATS+M、ATS+H) 组, 每组 8 只。对照组和模型组大鼠均每天 ig 给予 0.5% CMC-Na; ATS 组大鼠每天上午 ig 给予相应剂量的 ATS 混悬液; ATS+VL、ATS+L、ATS+M、ATS+H 组每天上午均 ig 给予相应剂量的 ATS 混悬液, 每天下午分别按各自的给药剂量 ig 给予相应酒大黄醇提物药液。给药期间对照组继续饲喂普通饲料, 其余各组继续饲喂高脂饲料, 各组大鼠每周均称体质量 1 次。

2.5.4 血液和肝脏样本采集 给药 4 周后, 禁食 12 h, 对大鼠腹主动脉取血, 静置 3 h 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存待测。取各组大鼠肝脏, 用预冷的生理盐水洗去表面浮血, 用滤纸吸去表面残留的生理盐水, 称质量, 计算其肝脏指数 (肝脏指数 = 肝脏质量/体质量)。取部分左叶肝脏称质量后, 按照各检测指标试剂盒的相关说明进行匀浆化处理, 离心后取上清液于 -80 $^{\circ}$ C 保存待测。取大鼠左叶肝脏, 于 10% 福尔马林溶液中固定 48 h, 进行 HE 染色制作肝脏组织病理切片。

2.5.5 血清相关指标的检测 取大鼠血清按照各试

剂盒的相关说明操作,通过酶标仪测定其血清中 TG、TC、LDL-C、ALT、AST 水平。

2.5.6 肝脏相关指标的检测 取肝脏组织按照试剂盒的相关说明操作,通过酶标仪测定肝脏中 TG、TC、MDA 含量及 SOD 活力,并以 BCA 法测定各样本的蛋白水平。

2.6 统计学分析

数据分析采用 SPSS 16.0 分析软件,测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据比较采用方差分析(One-way ANOVA)或独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 生、酒、熟大黄提取物对 ATS 所致 L02 细胞损伤的保护作用

与对照组比较,ATS 组细胞存活率显著降低($P < 0.01$)。与 ATS 组比较,生、酒、熟大黄水提取物组细胞存活率无明显提高,而 3 者醇提取物组细胞存活率均有不同程度的提高($P < 0.05$ 、 0.01),其中酒大黄醇提取物 1.00 mg/mL 组细胞存活率是 ATS

组的 2.5 倍,保护作用较好(图 1)。

3.2 酒大黄醇提取物和 ATS 联用对 L02 细胞转氨酶水平的影响

与对照组比较,ATS 组细胞培养液中的 ALT、AST 水平显著升高($P < 0.01$)。与 ATS 组比较,酒大黄醇提取物 0.75、1.00 mg/mL 组细胞培养液中的 ALT、AST 水平显著降低($P < 0.01$,表 2),即 0.75~1.00 mg/mL 酒大黄醇提取物可对 ATS 所致的 L02 细胞损伤发挥较好的保护作用,因此将其作为酒大黄醇提取物联用的保肝剂量,并由此得到 ATS 与酒大黄醇提取物的保肝配比(质量比)为 1:6.7~1:9.0。

3.3 酒大黄醇提取物和 ATS 联用对 HepG2 肝脂肪变性细胞内 TG、TC 水平的影响

与对照组比较,模型组细胞内 TG、TC 水平均显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,ATS 组、ATS 和酒大黄醇提取物各联用组细胞内 TG、TC 水平均显著降低($P < 0.01$)。与 ATS 组比较,ATS 和酒大黄醇提取物 1.00、0.75、0.50 mg/mL 联用组细胞内 TG、

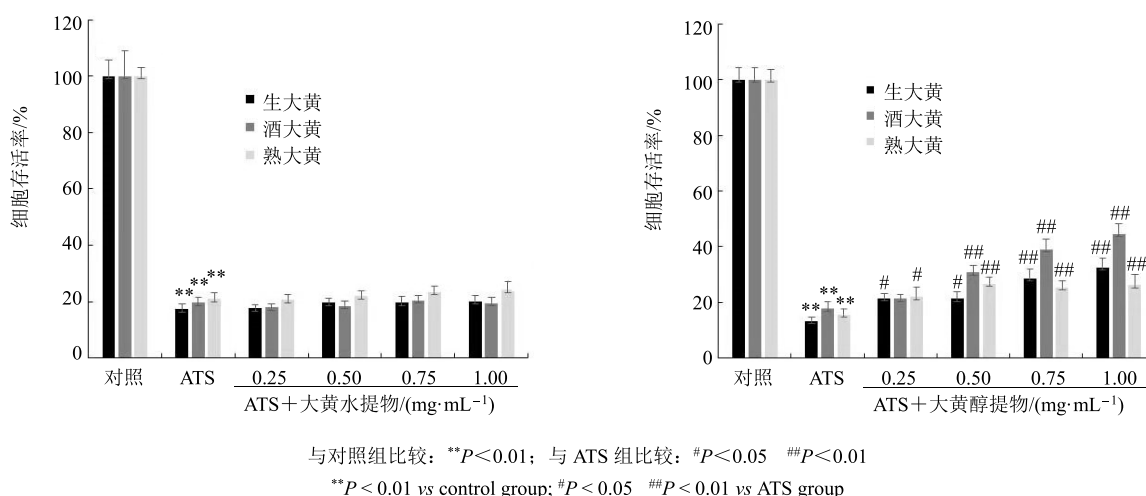


图 1 大黄提取物对 ATS 所致 L02 细胞损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 1 Effect of rhubarb extract on L02 cell injury induced by ATS ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

表 2 酒大黄醇提取物和 ATS 联用对 L02 细胞转氨酶水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of wine-fried rhubarb ethanol extract and ATS on level of L02 cell transaminase ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照	—	0.14 ± 0.05	1.08 ± 0.18
ATS	0.11	1.50 ± 0.21**	4.07 ± 0.62**
ATS+酒大黄醇提取物	0.11+0.25	1.34 ± 0.28	3.42 ± 0.25
	0.11+0.50	1.28 ± 0.20	3.17 ± 0.14 [#]
	0.11+0.75	0.58 ± 0.17 ^{##}	2.54 ± 0.25 ^{##}
	0.11+1.00	0.43 ± 0.06 ^{##}	1.95 ± 0.18 ^{##}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 ATS 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs ATS group

TC 水平均显著降低 ($P < 0.01$, 表 3), 即酒大黄醇提物 0.50~1.00 mg/mL 和 ATS 联用对肝脂肪变性细胞的调脂效果较好, 因此将其作为酒大黄醇提物联用的有效调脂剂量, 并由此得到 ATS 与酒大黄醇提物的调脂配比 (质量比) 为 1:35.8~1:71.6。

3.4 大黄醇提物与 ATS 联用对高脂血症大鼠的调脂活性及保肝作用

3.4.1 对大鼠肝脏指数的影响 与对照组比较, 模型组大鼠肝脏指数显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, ATS+VL、ATS+L、ATS+M、ATS+H 组大鼠肝指数均显著降低 ($P < 0.05$), 与 ATS 组比较, ATS+M 组大鼠肝指数显著降低 ($P < 0.05$, 表 4)。

3.4.2 对血清相关指标的影响 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C、ALT 和 AST 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组均能显著降低大鼠血清 TC、TG 水平 ($P < 0.05$, 0.01), ATS+H 组大鼠血清中 LDL-C 水平显著降低 ($P <$

0.01), ATS 组、ATS+VL 组大鼠血清中 ALT 和 AST 水平均显著升高 ($P < 0.01$), ATS+M 组、ATS+H 组大鼠血清中 AST 水平均显著降低 ($P < 0.05$), 但 ALT 水平无显著性差异。与 ATS 组比较, ATS+L 组、ATS+M 组、ATS+H 组大鼠血清中 ALT 和 AST 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。综上, ATS 和高剂量的酒大黄醇提物联用后降低大鼠血清中 TG 和 LDL-C 水平的作用最强, 而且能够显著降低大鼠血清中的 ALT 和 AST 水平, 使其更接近于对照组水平 (表 5)。

3.4.3 对肝脏相关指标的影响 与对照组比较, 模型组大鼠肝脏中 TC、TG、MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$), SOD 活力显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠肝脏中 TG 和 TC 水平均显著降低 ($P < 0.05$), SOD 活力均显著增强 ($P < 0.05$), ATS+M 组、ATS+H 组大鼠肝脏中 MDA 水平均显著降低 ($P < 0.01$)。与 ATS 组比较, ATS+M 组、ATS+H 组大鼠肝脏中 TG、TC 和 MDA 水

表 3 酒大黄醇提物和 ATS 联用对 HepG2 细胞内 TG、TC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of wine-fried rhubarb ethanol extract and ATS on TG and TC content in HepG2 hepatic steatosis cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	TG/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	TC/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照	—	56.86 ± 1.08	30.88 ± 1.17
模型	—	80.59 ± 1.45 ^{##}	46.67 ± 1.64 ^{##}
ATS	0.014	70.98 ± 2.23 ^{##}	39.57 ± 1.63 ^{##}
ATS+酒大黄醇提物	0.014+0.100	71.32 ± 2.04 ^{##}	40.86 ± 1.59 ^{##}
	0.014+0.250	71.22 ± 1.74 ^{##}	39.56 ± 1.71 ^{##}
	0.014+0.500	62.03 ± 1.39 ^{##△△}	33.54 ± 1.14 ^{##△△}
	0.014+0.750	60.69 ± 1.33 ^{##△△}	32.99 ± 1.34 ^{##△△}
	0.014+1.000	60.24 ± 1.39 ^{##△△}	32.86 ± 1.05 ^{##△△}

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 ATS 组比较: ^{△△} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group; ^{△△} $P < 0.01$ vs ATS group

表 4 各组大鼠的肝脏指数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 4 Statistical results of liver index of each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	肝脏指数
对照	—	2.65 ± 0.09
模型	—	5.93 ± 0.53 ^{**}
ATS	0.06	5.61 ± 0.61
ATS+VL	0.06+0.50	5.43 ± 0.35 [#]
ATS+L	0.06+2.00	5.20 ± 0.44 ^{##}
ATS+M	0.06+4.00	5.05 ± 0.32 ^{**△}
ATS+H	0.06+8.00	5.17 ± 0.42 ^{##}

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与 ATS 组比较: [△] $P < 0.05$

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

[△] $P < 0.05$ vs ATS group

平均显著降低 ($P < 0.05$), SOD 活力均显著增强 ($P < 0.01$)。综上, ATS 和中、高剂量酒大黄醇提物联用 (ATS+M 组、ATS+H 组) 均可显著降低大鼠肝脏中 TG 和 TC 水平, 增强肝脏中的 SOD 活力, 降低 MDA 水平, 使其更接近对照组水平 (表 6)。

3.4.4 对肝脏组织病理学的影响 实验结果显示, 对照组大鼠肝脏肝小叶结构完整, 汇管区无明显异常, 肝细胞形态正常, 未见明显的病理性改变。模型组大鼠的肝细胞中充满大量脂滴, 肝细胞呈严重的空泡性改变且呈弥漫性分布, 肝血窦结构消失, 炎细胞和 Kuppfer 细胞浸润灶明显, 小叶间胆管增生明显, 可见明显的肝脏坏死区域。ATS 组大鼠的肝脏脂肪变性仍未得到改善, 肝细胞呈空泡状, 仍

表 5 各组大鼠血清中 TG、TC、LDL-C、ALT、AST 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Levels of TG, TC, LDL-C, ALT and AST in rat serum ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照	—	0.60 ± 0.14	2.45 ± 0.44	1.16 ± 0.18	5.24 ± 1.32	19.37 ± 2.61
模型	—	1.04 ± 0.24**	7.38 ± 1.50**	2.01 ± 0.25**	19.63 ± 3.81**	28.04 ± 5.38**
ATS	0.06	0.77 ± 0.19 [#]	4.94 ± 1.39 ^{##}	1.71 ± 0.35	37.73 ± 7.55 ^{##}	39.19 ± 5.61 ^{##}
ATS+VL	0.06+0.50	0.70 ± 0.27 ^{##}	4.90 ± 1.07 ^{##}	1.77 ± 0.55	36.23 ± 6.15 ^{##}	34.57 ± 5.38 ^{##}
ATS+L	0.06+2.00	0.68 ± 0.20 ^{##}	4.52 ± 1.48 ^{##}	1.76 ± 0.29	19.01 ± 4.25 ^{△△}	23.67 ± 4.19 ^{△△}
ATS+M	0.06+4.00	0.68 ± 0.26 ^{##}	4.38 ± 1.47 ^{##}	1.70 ± 0.25	16.67 ± 3.59 ^{△△}	22.72 ± 3.99 ^{##△△}
ATS+H	0.06+8.00	0.53 ± 0.10 ^{##△}	3.98 ± 0.89 ^{##}	1.54 ± 0.24 ^{##}	16.90 ± 2.61 ^{△△}	20.52 ± 2.88 ^{##△△}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与 ATS 组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

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

表 6 各组大鼠肝脏中 TG、TC、SOD、MDA 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Levels of TG, TC, SOD and MDA in rat liver ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(μmol·g ⁻¹)
对照	—	107.84 ± 15.39	21.63 ± 2.83	196.73 ± 18.00	2.04 ± 0.56
模型	—	235.14 ± 23.06**	101.54 ± 15.25**	115.10 ± 9.41**	7.02 ± 1.27**
ATS	0.06	204.95 ± 24.07 [#]	83.59 ± 14.32 ^{##}	135.82 ± 10.62 [#]	7.51 ± 1.74
ATS+VL	0.06+0.50	201.91 ± 28.24 [#]	80.99 ± 12.32 ^{##}	135.61 ± 15.10 [#]	6.59 ± 1.16
ATS+L	0.06+2.00	190.59 ± 26.55 ^{##}	82.50 ± 14.61 ^{##}	142.90 ± 17.47 ^{##}	6.03 ± 1.07 [△]
ATS+M	0.06+4.00	177.43 ± 20.73 ^{##△}	64.91 ± 11.03 ^{##△△▲}	158.98 ± 12.65 ^{##△△▲}	3.70 ± 0.83 ^{##△△▲}
ATS+H	0.06+8.00	173.35 ± 21.09 ^{##△}	63.81 ± 7.43 ^{##△△▲}	165.02 ± 18.35 ^{##△△▲}	3.32 ± 0.34 ^{##△△▲}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与 ATS 组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与 ATS+L 组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs ATS group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs ATS+L group

可见明显的炎细胞和 Kuppfer 细胞浸润灶, 伴有胆管增生。ATS+VL 组与 ATS 组类似。ATS+L、ATS+M、ATS+H 均可明显抑制小叶间胆管增生, 同时均可一定程度上抑制炎细胞和 Kuppfer 细胞浸润。综合比较, ATS 和高剂量的酒大黄醇提物联用(ATS+H 组)对大鼠肝脏的改善效果较好, 镜下无可见的小叶间胆管增生, 炎细胞和 Kuppfer 细胞的浸润情况也得到明显的抑制(图 2)。

4 讨论

高脂血症患者由于脂质代谢异常^[14], 其肝脏的代谢负担加重, 肝脏本身即容易出现异常或已存在肝损伤的情况。而临床常用调脂药物 ATS 存在肝毒性, 治疗过程中可能会对高脂血症患者的肝脏造成二次伤害, 加重患者肝脏的损伤程度。常用中药大黄具有较好的调血脂、保肝和抗氧化活性, 临床常用于治疗肝胆类疾病和血脂异常等代谢类疾病。研究表明大黄对实验性肝损伤有明显的保护作用, 可促进胆汁分泌、胆囊收缩、胆道括约肌松弛, 从而起到利胆、退黄作用, 此外大黄还能抑制胰腺脂肪酶、HMG-CoA 还原酶、鲨烯环氧酶活性, 增加胆汁的排泄, 降低血清 TC、TG、LDL 水平, 延缓动

脉粥样硬化。因此, 将大黄与 ATS 联用既能减轻后者的肝损伤副作用, 又可增强调血脂的效果, 即发挥减毒增效的作用。

本研究通过动物实验研究发现高脂饲料喂养法制备高脂血症大鼠模型, 不但会使模型大鼠血脂水平升高, 还会使其形成脂肪肝, 引起大鼠转氨酶水平的升高, 氧化酶水平的降低, 以及脂质过氧化反应的发生。这与相关研究中高脂血症可伴发脂肪肝的结果相符, 说明高脂血症患者可能伴有脂肪肝的发生, 其肝功能本身可能就存在一定程度的损伤, 因此对于一些具有潜在肝毒性的药物可能更加敏感, 出现肝损伤的风险更高。同时本研究发现应用 ATS 对高脂血症大鼠进行调脂治疗时确实会引起转氨酶水平的异常升高, 存在肝损伤的隐患, 这与 ATS 自身潜在的肝毒性有关, 但在一定程度上也可能与高脂血症大鼠的肝脏本身受损后对 ATS 的敏感性增加有关。因此, ATS 虽然是治疗高脂血症的一线药物, 但在用于调脂治疗时也需要定期对患者的肝功能进行监测, 特别是一些有肝病史的患者需慎用 ATS。此外, 本研究发现酒大黄醇提物与 ATS 联用后对于高脂血症大鼠的调脂效果更好, 同时酒大黄

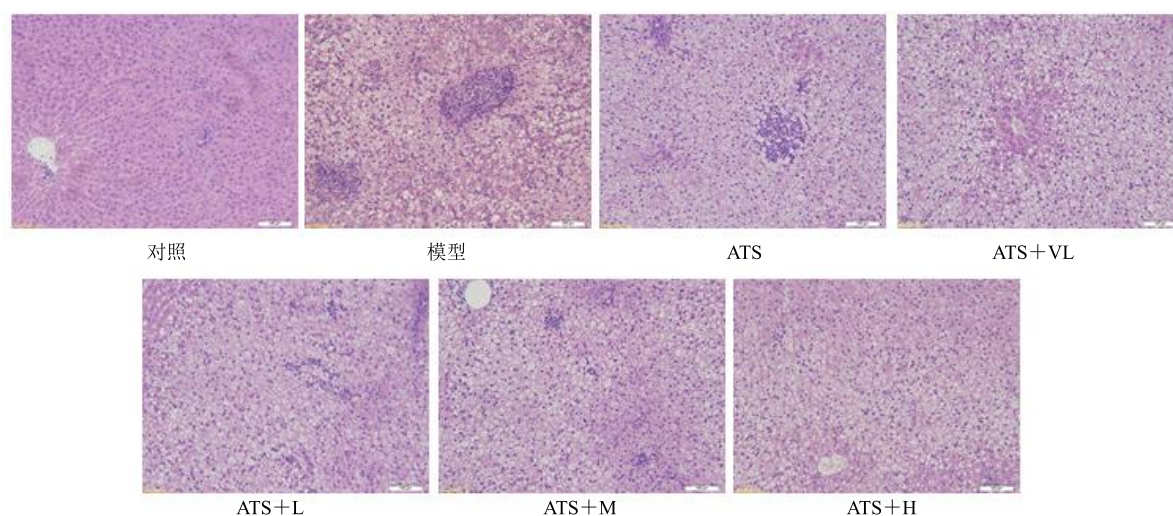


图2 各组大鼠肝脏组织病理切片 HE 染色 (×200)

Fig. 2 HE staining observation of liver histopathological sections (×200)

醇提取物对于 ATS 引发的肝功能异常有着较好的改善作用,中、高剂量酒大黄醇提取物与 ATS 联用可使大鼠肝脏中 SOD 活力显著增强,MDA 水平显著降低,且更接近对照组水平,同时抑制了炎细胞和 Kuppfer 细胞浸润,这说明酒大黄醇提取物可能是通过抗氧化和抗炎机制,抑制氧化应激反应,减轻相关炎症反应,从而对大鼠肝脏发挥保护作用。

本研究分别从细胞和动物水平对大黄不同炮制品提取物与 ATS 联用的调脂活性和保肝作用进行了研究,筛选出了调脂效果和对 ATS 所致肝损伤的保护作用均较优的大黄提取物,即酒大黄醇提取物,并对其与 ATS 联用的调脂和保肝作用进行了整体水平的验证,得到了较为理想的联用效果,对今后酒大黄的临床应用和制备方式选择有一定的参考价值,为二者在临床上更合理安全的应用提供了实验依据和指导,也为高脂血症的临床用药提供了更为开阔的思路。但本研究未能明确酒大黄醇提取物和 ATS 联用发挥减毒增效作用的相关机制,而二者联用的具体作用机制还需要进一步深入的研究。

参考文献

- [1] Sharabi Y, Eldad A. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with hyperlipidemia and obesity [J]. *Am J Med*, 2000, doi: 10.1016/S0002-9343(00)00434-4.
- [2] Bhardwaj S S, Chalasani N. Lipid-lowering agents that cause drug-induced hepatotoxicity [J]. *Clin Liver Dis*, 2007, 11(3): 597-608.
- [3] Björnsson E, Jacobsen E I, Kalaitzakis E. Hepatotoxicity associated with statins: Reports of idiosyncratic liver injury post-marketing [J]. *J Hepatol*, 2012, 56(2): 374-380.
- [4] Calderon R M, Cubeddu L X, Goldberg R B, *et al.* Statins in the treatment of dyslipidemia in the presence of elevated liver aminotransferase levels: A therapeutic dilemma [J]. *Mayo Clin Proc*, 2010, 85(4): 349-356.
- [5] Raal F J, Pappu A S, Illingworth D R, *et al.* Inhibition of cholesterol synthesis by atorvastatin in homozygous familial hypercholesterolaemia [J]. *Atherosclerosis*, 2000, 150(2): 421-428.
- [6] 祝婷婷, 刘 晓, 汪小莉, 等. 大黄不同方法炮制后药理作用及化学成分变化研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(8): 883-887.
- [7] Cao Y J, Pu Z J, Tang Y P, *et al.* Advances in bio-active constituents, pharmacology and clinical applications of rhubarb [J]. *Chin Med-UK*, 2017, doi: 10.1186/s13020-017-0158-5.
- [8] 傅兴圣, 陈 菲, 刘训红, 等. 大黄化学成分与药理作用研究新进展 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(16): 1534-1538.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [10] Wat E, Ng C F, Wong E C, *et al.* The hepatoprotective effect of the combination use of *Fructus Schisandrae* with statin-A preclinical evaluation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, doi: 10.1016/j.jep.2015.12.004.
- [11] Heeba G H, Abdelghany M I. Effect of combined administration of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and atorvastatin on the liver of rats [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(14): 1076-1081.
- [12] 毕超然, 张 鹏, 朴春丽. 大黄临床应用及其用量 [J]. *吉林中医药*, 2019, 39(1): 28-31.
- [13] 陈弘东, 赵天宇, 徐立鹏, 等. 大黄用量临床研究 [J]. *中国临床医生*, 2014, 42(3): 83-85.
- [14] 黄 珮, 郭 姣, 朴胜华. 高脂血症中医证候实质研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 38(9): 1904-1907.