

【实验研究】

栀子苷对非酒精性脂肪性肝病金黄地鼠脂质代谢及炎症损伤的影响*

李国辉, 周海虹[△], 赵正晓, 张玉梅, 柳进, 陈少东
(厦门大学医学院 福建 厦门 361102)

摘要: 目的: 观察栀子苷对高脂饮食诱导的金黄地鼠非酒精性脂肪性肝病模型脂质代谢、肝组织病理变化及炎症损伤的影响, 并与栀子进行比较, 以明确栀子抗脂肪肝作用的效应成分。方法: 24只雄性金黄地鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、栀子组和栀子苷组。实验后观察肝组织病理学变化, 并检测肝组织TG含量、血清TG、CHO含量及ALT、AST活性。结果: 与模型组比较, 栀子组、栀子苷组肝TG含量、血清TG、CHO含量及ALT、AST活性均显著降低, 且栀子苷对ALT、AST活性的降低作用优于栀子。结论: 栀子苷与栀子对高脂饮食诱导的地鼠脂肪肝均有显著干预作用, 且栀子苷抗炎损伤作用优于栀子。

关键词: 栀子; 栀子苷; 非酒精性脂肪性肝病; 金黄地鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1006-3250(2015) 05-0524-02

Effect of geniposide on the lipid metabolism and inflammatory injury of nonalcoholic fatty liver disease in the hamster

LI Guo-hui, ZHOU Hai-hong[△], ZHAO Zheng-xiao, ZHANG Yu-mei, LIU Jin, CHEN Shao-dong
(TCM Department of Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Objective: To observe geniposide's effect on lipid metabolism, hepatic tissue pathological change and inflammatory injury of golden hamsters with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), caused by high fat diet. Compare the geniposide's effect with gardenia to make clear the effective components in Gardenia that can resist fatty liver. Methods: 24 male golden hamsters were averagely divided into control group, model group, gardenia group and geniposide group. The experiment was based on building the model, and then observe hamsters' general condition and pathological change of hepatic tissue, examine the content of hepatic tissue TG, serum TG, CHO and the activity of ALT, AST. Results: In gardenia group and gardenoside group, The content of hepatic tissue TG, serum TG, CHO and the activity of ALT, AST are significantly lower than the model group. Besides, gardenoside can lower the activity of ALT, AST better than gardenia. Conclusion: Both gardenoside and gardenia have notable intervention effects on hamsters' NAFLD caused by HFD and gardenoside have better effects on resisting inflammatory injury than gardenia, which suggested that gardenoside was the primary effective component in resisting NAFLD.

Key words: Gardenia; Gardenoside; NAFLD; Effective substance; Golden hamster

近年来, 随着人们生活方式与饮食结构的改变, 非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的发病率及检出率逐年增加^[1]。现代医学对 NAFLD 缺乏有效的治疗手段^[2], 而中药及其复方的多途径、多环节、多靶点药理作用是其治疗脂肪肝的优势。笔者前期研究发现, 《伤寒论》茵陈蒿汤具有显著调节脂质代谢、抗脂质过氧化损伤及炎症损伤, 降低游离脂肪酸 (FFA) 诱导 HepG2 细胞内甘油三酯 (TG) 含量等药理作用^[3-4]; 并运用数学模型“均匀设计法”筛选出该方改善脂质代谢、抗炎损伤的主要效应中药是栀子, 其发挥效应最

优剂量为 1.5 g/(kg·d) (相当于成人每日临床用药量 10 g)^[5-6]。栀子为茜草科植物栀子的成熟果实, 是临床常用中药, 具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒等功效。栀子苷是从栀子中提取的主要有效成分之一, 属于环烯醚萜类化合物, 具有保肝、利胆、减轻胰腺损伤、调节胃肠功能、调节血糖及镇痛、抗炎等药理作用^[7], 但对栀子苷抗 NAFLD 药理效应及机理研究的报道甚少。本实验采用高脂饲料诱导金黄地鼠 NAFLD 模型, 观察栀子苷对地鼠脂质代谢、炎症损伤及肝组织病理变化的影响, 并与栀子的作用进行比较, 以期明确栀子抗脂肪肝的效应成分。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性金黄地鼠 24 只, 体质量 (100 ± 10) g, 购自中国科学院上海实验动物中心 (动物许可证号 SCXK(沪) 2007-0011)。于厦门大学医学院实验动物中心适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 药物

*基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81274155); 厦门市重大科技计划项目 (3502Z20100006)

作者简介: 李国辉, 男, 四川雅安人, 医学本科, 从事中医理论与临床研究。

△通讯作者: 周海虹, Tel: 0592-2183069, E-mail: hhzhou@xmu.edu.cn.

栀子饮片购自同仁堂股份有限公司厦门分公司。采用传统水煎提取工艺,按前期实验结果得出的最优效应剂量 $1.5\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 制备药液, 4°C 冰箱保存备用。栀子苷购自南京泽朗生物科技有限公司(货号SZY111009),用时以蒸馏水配成所需浓度的混悬液。

1.3 主要试剂与仪器

TG试剂盒(批号20111029)、ALT试剂盒(批号20111025)、AST试剂盒(批号20111028)、CHO试剂盒(批号20111105)均购自南京建成生物工程研究所。1-15K型微量冷冻离心机、2-16K冷冻离心机(美国Sigma公司)、ULT1386-3-V39超低温冰箱(-80°C)(美国Thermo Scientific Revco公司)、M5多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司)、AL104电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

1.4 模型制备与分组给药

24只金黄地鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、栀子组、栀子苷组,每组各6只。除正常组给予普通饲料外,其余各组均给予高脂饲料(配方:83.25%基础饲料,10%猪油,1.5%胆固醇,0.2%脱氧胆酸钠,5%糖,0.05%丙硫氧嘧啶,由苏州双狮动物饲料有限公司提供)饲养6周,自由饮水。自造模第3周起,药物组按 $1\text{ ml}/100\text{ g}$ 的体积(相当于栀子组用量为 $1.5\text{ g}/\text{kg}$,栀子苷组用量为 $60\text{ mg}/\text{kg}$)灌胃给药,每日1次;正常组、模型组灌服相应量的饮用水,连续给药4周。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 样本获取 灌胃给药4周后称取动物体质量,用10%水合氯醛按 $0.36\text{ ml}/100\text{ g}$ 腹腔注射麻醉,心脏采血,离心后吸取血清, -80°C 保存。

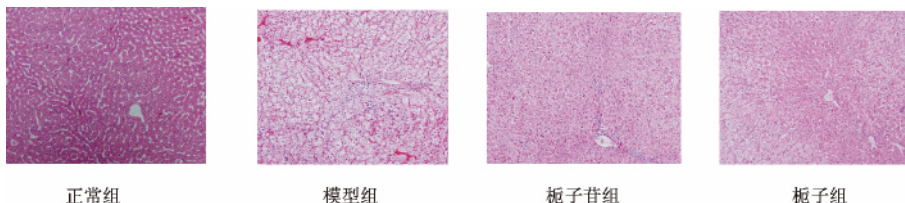


图1 各组地鼠肝组织变化比较(HE染色 $\times 200$)

2.3 各组地鼠肝组织TG、血清TG、CHO含量和ALT、AST活性比较

表1显示,与正常组比较模型组肝组织TG含量显著增高($P < 0.01$);栀子组和栀子苷组肝组织TG含量均显著低于模型组($P < 0.01$),接近正常组。与正常组比较,模型组血清TG、CHO含量及ALT、AST活性均显著增高($P < 0.01$)。与模型组比较,栀子组和栀子苷组血清TG、CHO含量,ALT、AST活性均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而栀子苷组降低血清ALT、AST活性与栀子组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

取出肝脏,在同一肝叶和位置切取一块组织作冰冻切片。另取 200 mg 湿肝加入乙醇-丙酮(1:1) 3 ml ,匀浆 $3000\text{ r}/\text{min}$, $10\text{ s}\times 4$ 次,放置 4°C 冰箱过夜。翌日 4°C 离心($3000\text{ r}/\text{min}$, 20 min)后,取 10 ul 上清液用于TG含量测定。

1.5.2 一般情况观察 造模过程中观察各组地鼠体质量、毛色、精神状态、肝质量等。①肝组织病理变化:HE染色,采用光镜观察;②肝组织TG含量测定:按生化试剂盒检测;③血清TG、CHO含量及ALT、AST活性检测:均按生化试剂盒检测。

1.6 统计学方法

采用SPSS 12.0统计软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

表1显示,与正常组比较模型组地鼠活动减少,毛色光泽度较差,肝质量明显增加($P < 0.01$),肝脏体积增大,颜色黄红相间,表面粗糙呈颗粒状,切面油腻,体质量有增加趋势,但无统计学意义。栀子组和栀子苷组体质量、肝质量与模型组比较均有降低趋势,但差异无统计学意义,而肝脏颜色较红润、表面光滑、切面油腻感较轻。

2.2 各组地鼠肝组织病理变化

图1显示,与正常组比较模型组肝脏存在明显脂肪变性,变性的肝细胞肿大变圆,胞浆内出现脂肪空泡,并可见散在的点状坏死灶和炎性细胞浸润,结合一般情况观察提示造模成功。栀子组和栀子苷组肝脏脂肪变性程度及细胞肿胀明显减轻,胞内脂滴数量减少,体积变小,炎性细胞浸润及坏死灶减少。

NAFLD是一种与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和遗传易感密切相关的代谢应激性肝脏损伤^[1],其发病机制复杂,目前尚未完全阐明。中医学文献尚无“脂肪肝”病名记载,根据其临床表现,属于中医学“癥积”、“痰浊”、“瘀血”、“胁痛”等范畴。目前普遍认为,本病多因饮食失节或感受湿邪,或情志失调,或久病体虚引起肝失疏泄、脾失健运、肾精亏损,湿邪、痰浊、瘀血等病理因素互结胁下所致^[8]。在长期临床实践中我们认为,痰、湿、瘀血结于胁下,日久易化热蕴毒,湿热毒邪损伤络脉与NAFLD的发生发展及演变密切相关。栀子具有清

(下转第541页)

9.08%和阳虚质9.04%^[7]。江苏地区人群偏颇体质类型以阳虚为主占11.9%，其次为气虚质占9.9%、湿热质占9.3%^[8]。青海地区阳虚质占14.20%，气虚质占12.2%，阴虚质占10.2%^[9]。新疆人群体质类型有独特的分布规律，以阴虚为主。本文研究结果有助于辨识易感人群，调整人体素质，防治西北燥证，提高新疆地区民众的健康水平。

参考文献:

[1] 周铭心,宋晓平,单雨娟,等.西北燥证证候类型分析[J].新疆医科大学学报,2007,30(1):1-6.

[2] 孙广仁.普通高等教育“十五”国家级规划教材·中医基础理论[J].北京:中国中医药出版社,2002,8:209.

[3] 田维军,魏桂芝.中医虚证全书[M].江西:江西科学技术出版社,1997:12.

[4] 王燕,周铭心.102例新疆地区高血压病与西北燥证证型相

关性分析[J].中国中西医结合杂志,2012,32(9):1200-1203.

[5] 王燕,周铭心.神经衰弱与西北燥证病机关联性分析[J].辽宁中医杂志,2012,39(1):55-57.

[6] Yan Wang, Xiaozhong Wang, Haiyan Yuan, et al. Analysis of the Correlation between Xinjiang Acne and Northwest Dryness Syndrome [M]. Journal of Traditional Chinese Medicine 2013.

[7] 王琦,朱燕波.中国一般人群中中医体质流行病学调查—基于全国9省市21948例流行病学调查数据[J].中华中医药杂志,2009,24(1):7-12.

[8] 吴承玉,骆文斌,王娜娜,等.江苏地区2043例中医体质流行病学调查研究[J].中国中医基础医学杂志,2009,15(2):138-140.

[9] 李杰.中医体质分类的流行病学调查及阳虚体质的相关研究[D].南京中医药大学博士学位论文,2008.

收稿日期:2015-02-08

(上接第525页)

热利湿、凉血解毒之功效,针对脂肪肝“湿”、“热”、

“毒”等病理因素而发挥治疗作用。

表1 各组地鼠肝TG、血清TG、CHO含量及ALT、AST活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	肝质量 (g)	肝TG (mmol/L)	血清TG (mmol/L)	血清CHO (mmol/L)	血清AST (U/ml)	血清ALT (U/ml)
正常组	4.59	0.73 ± 0.14	1.46 ± 0.37	2.88 ± 0.61	23.54 ± 1.80	15.72 ± 8.03
模型组	7.54**	1.47 ± 0.32**	16.62 ± 3.68**	7.27 ± 0.41**	91.79 ± 25.96**	101.72 ± 22.36**
栀子组	7.29	0.83 ± 0.18 ^{△△}	9.87 ± 3.76 ^{△△}	5.38 ± 0.13 [△]	60.34 ± 11.39 [△]	62.82 ± 21.51 [△]
栀子苷组	6.97	0.97 ± 0.19 ^{△△}	8.06 ± 3.33 ^{△△}	6.06 ± 1.35 [△]	44.54 ± 17.85 ^{△△#}	54.48 ± 18.06 ^{△△#}

注:与正常组比较:**P<0.01;与模型组比较:△P<0.05,△△P<0.01;与栀子组比较:#P<0.05

目前,建立NAFLD模型多采用高脂饮食诱导大鼠的造模方法,模型周期一般为10~12周^[3,5],也有采用高脂饮食诱导小鼠NAFLD模型,造模时间需要8周^[9]。金黄地鼠多用于高脂血症模型研究^[10],而用其建立脂肪肝模型研究的报道尚为少见。本实验采用高脂饮食诱导金黄地鼠NAFLD模型6周后,动物肝质量显著增加,肝脏出现明显的脂肪变性,肝组织TG含量、血清TG、CHO含量以及ALT、AST活性均显著高于正常组,提示造模成功,且造模周期较大鼠、小鼠造模所需时间短、取血方便、血量充足,可作为较理想的脂肪肝模型。

脂肪肝的实质是肝脏TG的积聚。本实验研究结果显示,虽仅用药干预4周,栀子和栀子苷组均能显著降低模型地鼠肝TG含量和血清TG、CHO含量,结合肝湿重和肝组织病理学变化,表明栀子和栀子苷均有较强的抑制肝脏脂肪沉积和降低血脂水平的药理学效应。

脂肪肝由于FFA和TG在肝组织中储积,可引起氧化应激和脂质过氧化损伤,被激活的枯否细胞和脂肪细胞分泌肿瘤坏死因子-α(TNF-α),后者作为肝脂毒性细胞因子,可引起线粒体膜通透性改变,导致肝细胞发生炎症、坏死甚至纤维化。本实验结果显示,栀子和栀子苷均能明显降低模型地鼠血清ALT、AST活性,表明对肝脂毒性炎症损伤有较好的干预作用,且栀子苷抗炎损伤效应优于栀子。

综上,栀子苷能够明显改善NAFLD地鼠的脂质

代谢异常及炎症损伤,其效应与栀子相似,且抗肝脂毒性炎症损伤作用优于栀子,提示栀子苷是栀子抗NAFLD的主要效应成分。关于栀子苷抗脂肪肝作用的具体靶点及通路有待进一步研究。

参考文献:

[1] 李军祥,陈治水,危北海.非酒精性脂肪性肝病的中西医结合诊疗共识意见[J].中国中西医结合杂志,2011,2:155-158.

[2] Scott McNear, Stephen A. Harrison. Current status of therapy in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Therapeutic Advances in Gastroenterology 2009, 2(1):29-43.

[3] 梁惠卿,陈少东,张其清,等.茵陈蒿汤防治大鼠非酒精性脂肪性肝病的实验研究[J].光明中医,2009,2:212-214.

[4] 陈少东,周海虹,李雪梅,等.茵陈蒿汤抗游离脂肪酸对HepG2细胞脂毒性作用的效应中药研究[J].中华中医药杂志,2010,9:1381-1384.

[5] 徐维佳,范应,陈少东,等.均匀设计法筛选茵陈蒿汤抗脂肪肝脂质代谢异常的效应组分[J].中国医院药学杂志,2011,4:274-277.

[6] 李晶,刘益华,林曼婷,等.栀子与茵陈蒿汤对非酒精性脂肪性肝病大鼠脂质代谢及血清酶学影响的比较[J].中华中医药杂志,2012,6:1693-1695.

[7] 刘益华,李晶,林曼婷,等.栀子有效成分栀子苷的现代研究进展[J].中国药理学杂志,2012,6:406-409.

[8] 谢晶日,齐妍.中医药治疗非酒精性脂肪性肝病的研究概况[J].中医杂志,2010,6:560-562.

[9] 王俊杰,方会龙,李纯伟,等.非酒精性脂肪肝模型小鼠的建立[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,24:4395-4399.

[10] 郭金英,李华,谢人明.金黄地鼠高脂血症模型的建立[J].中国实验动物学报,2007,1:5-7.

收稿日期:2015-02-14