

疸清颗粒对急性肝内胆胆汁淤积模型大鼠肝功能的保护作用及其机制研究^Δ

荀 蕾^{1*}, 卢秉久^{2#}(1.辽宁中医药大学第一临床学院, 沈阳 110000; 2.辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1794-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.19

摘要 目的:研究疸清颗粒对急性肝内胆胆汁淤积模型大鼠肝功能的保护作用及其机制。方法:将60只大鼠随机分为空白对照组(生理盐水)、模型1组(生理盐水)、模型2组(生理盐水)、茵栀黄颗粒组(阳性药物, 1.62 g/kg)和疸清颗粒高、低剂量组(6.48、1.62 g/kg), 每组10只。除正常对照组外, 其余各组大鼠均ig α -茶基异硫氰酸盐复制急性肝内胆胆汁淤积大鼠模型, 模型1组在造模成功后48 h处死, 其余各组大鼠于造模当日开始ig相应药物, 每天1次, 连续7 d。测定大鼠血清中生化指标[丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、碱性磷酸酶(ALP)及总胆汁酸(TBA)]水平、3 h胆汁流量及流速、血清中脂蛋白(LP-X)浓度及肝组织中Na⁺-H⁺交换体mRNA的表达。结果:与空白对照组比较, 模型1组、模型2组大鼠血清中各生化指标水平均升高、LP-X浓度增加, 3 h胆汁流量及流速降低, Na⁺-H⁺交换体 mRNA表达减弱, 且模型1组各指标变化幅度大于模型2组($P < 0.05$); 与模型2组比较, 各给药组上述指标均得到明显改善($P < 0.05$)。结论:疸清颗粒对急性肝内胆胆汁淤积大鼠肝功能具有一定的保护作用, 其机制可能与上调肝组织中Na⁺-H⁺交换体mRNA的表达有关。

关键词 疸清颗粒; 茵栀黄颗粒; 肝内胆胆汁淤积; 肝功能; Na⁺-H⁺交换体mRNA; 大鼠

Study on Protective Effect of Danqing Granules on Liver Function of Rats with Acute Intrahepatic Cholestasis and Its Mechanism

XUN Lei¹, LU Bingjiu²(1.The First Clinical College, Liaoning University of TCM, Shenyang 110000, China; 2.The Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of Danqing granules on liver function of rats with acute intrahepatic cholestasis and its mechanism. METHODS: 60 rats were randomly divided into blank control group (normal saline), model group 1 (normal saline), model group 2 (normal saline), Yinzhihuang granules group (positive drug, 1.62 g/kg), Danqing granules high-dose and low-dose groups (6.48, 1.62 g/kg), with 10 rats in each group. Those group were given α -naphthylisothiocyanate intragastrically to induce acute intrahepatic cholestasis model except normal control group. 48 h after modeling, the rats of model group 1 were sacrificed, and other groups were given relevant medicine intragastrically on the day of modeling, once a day, for consecutive 7 d. The levels of biochemical indexes in serum (ALT, AST, TBIL, DBIL, ALP and TBA), 3 h bile flow and flow velocity, the concentration of LP-X in serum, mRNA expression of Na⁺-H⁺ permutoid were detected in rats. RESULTS: Compared with blank control group, the biochemical indexes and LP-X concentration increased in model group 1 and model group 2, while 3 h bile flow and flow velocity and mRNA expression of Na⁺-H⁺ permutoid decreased; and the change of each index in model group 1 were more significant than in model group 2 ($P < 0.05$). Compared with model group 2, above indexes of treatment groups were all improved significantly ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Danqing granules have positive effect on liver function of acute intrahepatic cholestasis rats, and its mechanism may be associated with up-regulation of mRNA expression of Na⁺-H⁺ permutoid.

KEYWORDS Danqing granules; Yinzhihuang granules; Intrahepatic cholestasis; Liver function; Na⁺-H⁺ permutoid mRNA; Rat

肝内胆胆汁淤积是一种可由多种致病因素所引起, 表现为肝细胞及胆管受损, 最终导致胆汁淤积于肝内的临床综合征^[1-2], 是临床常见病。肝内胆胆汁淤积症患者临床表现为黄疸、皮肤瘙痒、大便色白、血清中胆红素水平升高[且以直接胆红素(DBIL)水平升高为主], 并伴有轻微的消化道症状。长期的胆汁淤积可导致肝细胞受损, 甚至坏死, 最终发展为肝炎或者肝硬化^[3]。西医治疗常采用腺苷蛋氨酸、熊去氧胆酸等药品, 费用较高。

疸清颗粒是我院的自制制剂, 以活血祛湿立法, 是治疗肝

内胆胆汁淤积的有效方剂, 且价格便宜。笔者在前期的临床研究中观察到, 疸清颗粒在利胆退黄方面具有较为快速且肯定的疗效。本次研究拟通过疸清颗粒干预急性肝内胆胆汁淤积模型大鼠, 通过检测其对大鼠肝功能各指标的影响, 进一步研究疸清颗粒在抑制肝细胞损害方面是否具有特殊疗效; 并观察疸清颗粒对急性肝内胆胆汁淤积大鼠的治疗作用并阐述其可能的作用机制, 为其临床应用提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

PE-9600 原位聚合酶链反应(PCR)仪(美国铂金埃尔默股份有限公司); LCII 荧光定量扩增仪(瑞士罗氏公司); DY-CP-44P 电泳仪(北京六一仪器设备厂); Blofuge28RS 高速冷冻离心机(德国贺利氏集团公司); CX7 全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司); MDF-U33V 超低温冰箱(上海茸研仪器有限

^Δ 基金项目:沈阳市科技计划项目(No.F13-208-9-00)

* 主治医师, 博士研究生。研究方向: 中医肝病。电话: 024-44871798。E-mail: 38803084@qq.com

通信作者: 主任医师, 教授, 硕士。研究方向: 中医肝病。电话: 024-31207012。E-mail: lubingjiu@163.com

公司)。

1.2 药品与试剂

痘清颗粒(辽宁中医药大学附属医院自制,批号:辽药制字Z05010235,批号:20140225,规格:每袋3g);茵栀黄颗粒(鲁南厚普制药有限公司,批号:00915018,规格:每袋3g);2% α -茶基异硫氰酸盐(ANIT)溶液(美国Sigma公司);动物组织RNA提取试剂(Trizol)(美国Invitrogen公司,批号:15596-018,纯度:99%);HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒(批号: CW0744)、广谱蛋白Marker(批号: CW2307A)均由北京康为世纪生物科技有限公司提供;Na⁺-H⁺交换体扩增引物由北京金唯智生物科技有限公司合成;大鼠血清脂蛋白(LP-X)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海心语生物科技有限公司,批号:SY-m0098)。

1.3 动物

健康纯系Wistar大鼠,60只,♀♂各半,体质量(200±20)g,由辽宁长生生物技术有限公司提供[许可证号:SCXK(辽)2010-0001],在三级动物室用无菌饲料喂养。

2 方法

2.1 动物造模、分组与给药

实验动物自由饮食,无不良因素影响,实验前先正常饲养2d以适应环境,第3天将60只大鼠随机分为6组:空白对照组(生理盐水)、模型1组(生理盐水)、模型2组(生理盐水)、茵栀黄颗粒组(阳性药物,1.62g/kg,根据体表面积法换算,此剂量为临床等效剂量)和痘清颗粒高、低剂量组(6.48、1.62g/kg,根据体表面积法换算,此剂量分别为临床剂量的等效和4倍剂量),每组10只。除空白对照组外,其余各组大鼠均于实验第3天开始ig ANIT溶液复制急性肝内胆汁淤积大鼠模型^[4],并于造模当日开始ig相应药物,每天1次,连续7d。

2.2 样本采集

于造模后48h(48h内正常饮食),将模型1组大鼠用20%乌拉坦(40mg/kg)麻醉,背位固定,进行胆管造瘘引流胆汁,收集3h胆汁量;腹主动脉取血留用后将大鼠处死,剖取肝脏组织以观察相应指标。其余大鼠在末次给药12~16h后,同模型1组操作,收集样本。

2.3 大鼠血清中各项生化指标测定

取“2.2”项下采集的全血2ml,以离心半径为17.5cm、3000r/min离心10min(下同),取上清液,送辽宁省中医院检验科,采用全自动生化分析仪分析血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、DBIL、碱性磷酸酶

(ALP)及总胆汁酸(TBA)水平。

2.4 大鼠3h胆汁流量及流速测定

取“2.2”项下收集的胆汁,测定流量并计算3h内胆汁流速(胆汁流速=收集胆汁总量/时间)。

2.5 大鼠血清中LP-X浓度测定

取“2.2”项下采集的全血2ml,离心,取上清液,按照ELISA试剂盒说明书操作检测血清中LP-X浓度。

2.6 大鼠肝组织中Na⁺-H⁺交换体mRNA表达测定

采用RT-PCR法。用Trizol试剂提取大鼠肝组织样本中总RNA,按HiFi-MMLVcDNA第一链合成试剂盒说明书操作反转录合成cDNA。取5 μ l cDNA用荧光染料UltraSYBR Mixture采用嵌合荧光法进行PCR扩增,以 β -actin为内参照。Na⁺-H⁺上游引物序列为5'-CGGCATCAACAAGGGACT-3'、下游引物序列为5'-GCTCAAAGAAACGCAACA-3',产物大小390bp; β -actin上游引物序列为5'-GCCTTCCTTCTTGGGTA-3'、下游引物序列为5'-GGCATAGAGTCTTACGG-3',产物大小97bp。扩增程序为:95℃、5min;95℃、15s,60℃、60s,72℃、32s,共40个循环。取5 μ l扩增产物行1%琼脂糖凝胶电泳,选取样本cDNA进行5倍梯度稀释,稀释后各样品分别取2 μ l作模板,分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增,同时在60~95℃进行融解曲线分析。结果显示,各标准曲线的R²值均达到0.99,说明线性相关度较高,且扩增效率均在90%以上。根据RT-PCR原始测定结果,采用REST软件进行定量分析,按2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算出样品中目的基因相对表达水平^[5]。

2.7 统计学方法

使用SPSS 17.0软件对数据进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析;对于符合正态分布以及方差齐性的资料,采用LSD检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠血清中各项生化指标测定结果

与空白对照组比较,模型1组、模型2组、茵栀黄颗粒组及痘清颗粒高、低剂量组大鼠血清中各项生化指标水平均明显升高,但茵栀黄颗粒组及痘清颗粒高、低剂量组大鼠血清中各项生化指标升高程度不及模型1组和模型2组,并且模型2组各项生化指标升高程度也不及模型1组,以上差异均有统计学意义($P < 0.05$);痘清颗粒低剂量组大鼠血清中各项生化指标水平高于茵栀黄组和痘清颗粒高剂量组,但组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中生化指标测定结果见表1。

表1 各组大鼠血清中生化指标测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Serum biochemical index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	ALT, U/L	AST, U/L	TBIL, μ mol/L	DBIL, μ mol/L	ALP, U/L	TBA, μ mol/L
空白对照组	49.45 ± 2.69	48.94 ± 3.9	1.40 ± 0.24	1.04 ± 0.23	135.19 ± 14.12	7.57 ± 0.89
模型1组	88.27 ± 4.28*	77.45 ± 8.53*	9.84 ± 1.39*	7.95 ± 1.32*	249.37 ± 10.29*	32.21 ± 4.10*
模型2组	71.23 ± 5.25**	70.10 ± 6.15**	8.02 ± 0.31**	6.62 ± 0.52**	230.31 ± 23.13**	28.52 ± 4.01**
茵栀黄颗粒组	54.12 ± 2.64** Δ	61.59 ± 10.03** Δ	5.87 ± 0.59** Δ	4.86 ± 0.85** Δ	197.85 ± 19.22** Δ	19.30 ± 4.25** Δ
痘清颗粒高剂量组	53.56 ± 3.21** Δ	59.66 ± 8.97** Δ	5.59 ± 0.47** Δ	4.45 ± 0.41** Δ	199.04 ± 22.62** Δ	19.18 ± 3.56** Δ
痘清颗粒低剂量组	56.97 ± 5.59** Δ	62.01 ± 7.91** Δ	6.23 ± 0.71** Δ	5.07 ± 0.38** Δ	207.36 ± 18.63** Δ	21.98 ± 3.94** Δ

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型1组比较,** $P < 0.05$;与模型2组比较, $\Delta P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group 1, ** $P < 0.05$; vs. model group 2, $\Delta P < 0.05$

3.2 大鼠3h胆汁流量及流速测定结果

与空白对照组比较,模型1组、模型2组、茵栀黄颗粒组及痘清颗粒高、低剂量组大鼠3h胆汁流量减少、流速减缓,但茵栀黄颗粒组及痘清颗粒高、低剂量组大鼠3h胆汁流量减少及胆汁流速减缓程度不及模型1组和模型2组,并且模型2组胆汁流量减少及胆汁流速减缓程度也不及模型1组,以上差异均

有统计学意义($P < 0.05$);痘清颗粒低剂量组大鼠3h胆汁流量减少程度以及胆汁流速减缓程度均高于茵栀黄组和痘清颗粒高剂量组,但组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠3h胆汁流量及流速测定结果见表2。

3.3 大鼠血清中LP-X浓度、肝组织中Na⁺-H⁺交换体mRNA表达测定结果

表2 各组大鼠3 h胆汁流量及胆汁流速测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 3 h bile flow and velocity measurement of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	3 h胆汁流量, ml	胆汁流速, ml/h
空白对照组	2.59 ± 0.21	0.94 ± 0.17
模型1组	1.43 ± 0.15*	0.32 ± 0.08*
模型2组	1.67 ± 0.15**	0.45 ± 0.06**
茵栀黄颗粒组	2.02 ± 0.31** Δ	0.68 ± 0.11** Δ
痘清颗粒高剂量组	1.94 ± 0.35** Δ	0.66 ± 0.10** Δ
痘清颗粒低剂量组	1.92 ± 0.36** Δ	0.58 ± 0.14** Δ

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与模型1组比较, # $P < 0.05$;与模型2组比较, $\Delta P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group 1, # $P < 0.05$; vs. model group 2, $\Delta P < 0.05$

与空白对照组比较,模型1组、模型2组、茵栀黄颗粒组和痘清颗粒高、低剂量组大鼠血清中LP-X浓度升高、肝组织中Na⁺-H⁺交换体mRNA表达减弱,但茵栀黄颗粒组及痘清颗粒高、低剂量组大鼠LP-X浓度升高程度、Na⁺-H⁺交换体mRNA表达减弱程度均不及模型1组和模型2组,并且模型2组大鼠LP-X浓度升高程度、Na⁺-H⁺交换体mRNA表达减弱程度也不及模型1组,以上差异均有统计学意义($P < 0.05$);痘清颗粒低剂量组大鼠血清中LP-X浓度略高于茵栀黄颗粒组和痘清颗粒高剂量组、Na⁺-H⁺交换体mRNA表达略弱于茵栀黄颗粒组和痘清颗粒高剂量组,但组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠血清中LP-X浓度、肝组织中Na⁺-H⁺交换体mRNA表达测定结果见表3。

表3 各组大鼠血清中LP-X浓度、肝组织中Na⁺-H⁺交换体mRNA表达测定结果($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

Tab 3 The serum concentration of LP-X and mRNA expression of Na⁺-H⁺ permutoid in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

组别	LP-X	Na ⁺ -H ⁺ 交换体mRNA相对表达水平
空白对照组	0.14 ± 0.02	0.42 ± 0.06
模型1组	0.25 ± 0.03*	0.15 ± 0.02*
模型2组	0.22 ± 0.03**	0.20 ± 0.04**
茵栀黄颗粒组	0.17 ± 0.03** Δ	0.29 ± 0.05** Δ
痘清颗粒高剂量组	0.18 ± 0.03** Δ	0.31 ± 0.03** Δ
痘清颗粒低剂量组	0.19 ± 0.04** Δ	0.28 ± 0.03** Δ

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$;与模型1组比较, # $P < 0.05$;与模型2组比较, $\Delta P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group 1, # $P < 0.05$; vs. model group 2, $\Delta P < 0.05$

4 讨论

祖国医学在治疗胆汁淤积疾病方面具有独特的优势,胆汁淤积疾病在中医学范畴中称之为黄疸,各家名医均认为此病是由湿热内蕴、阻于血分、胆汁溢于血脉肌肤所致,治疗中多以清热利湿、活血化痰立法^[5-6]。茵栀黄颗粒是治疗慢性肝炎、黄疸的有效中成药,因此本文将作为阳性对照药物^[7]。痘清颗粒取方自本院较成熟的院内方剂,针对黄疸患者可帮助其显著退黄,并有助于改善异常肝功能。现此方经本院自制加工为成剂,使用更加方便,其组方中含茵陈、大黄、赤芍、桃仁、白术、泽泻、猪苓、茯苓、桂枝等;方中重用赤芍,退湿之余尚活血,使药效事半功倍^[8]。

本研究采用经典的胆汁淤积动物模型,检测大鼠血清中TBIL、DBIL、ALT、AST、TBA、ALP等生化指标,以评价大鼠肝脏受损、胆汁分泌排泄情况。LP-X是肝内外阻塞引起胆汁淤积时患者血清中会高表达的一种特殊脂蛋白,测定其水平可

以了解胆汁淤积的严重程度^[9]。位于肝细胞膜肝窦膜和基侧膜的Na⁺-H⁺交换体可以使细胞内、外的Na⁺和H⁺进行交换,而当胆汁淤积时所产生的毒物可以降低Na⁺-H⁺交换体的活性,从而抑制肝细胞对胆汁酸的摄取,进一步造成淤胆,形成恶性循环^[10]。

本研究结果表明,与空白对照组比较,模型1组、模型2组、茵栀黄颗粒组及痘清颗粒高、低剂量组大鼠血清中各项生化指标水平以及血清中LP-X浓度显著升高,3 h胆汁流量减少、胆汁流速减缓,Na⁺-H⁺交换体mRNA的表达减弱($P < 0.05$),提示造模成功;而上述各项指标的变化幅度大小均为模型1组 > 模型2组 > 茵栀黄颗粒组和痘清颗粒高、低剂量组,且茵栀黄颗粒组及痘清颗粒高、低剂量组间比较各项指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)。这提示痘清颗粒促进胆汁排泄、保护肝功能的作用与与阳性药物茵栀黄颗粒相近,这与药物投入临床使用的临床疗效及患者反馈结果相一致。模型1组在模型刚建立后48 h处死,模型2组虽然未进行药物干预但是各项指标较模型1组有所改善,这提示大鼠于造模48 h后急性肝损伤程度较为严重,但即使未用药干预,大鼠也有一定自我恢复的能力,在7 d时肝损伤的程度也可一定程度地减轻;但肝功自我恢复情况不如用痘清颗粒干预的大鼠,即排除大鼠自身恢复能力后仍能观察到痘清颗粒的治疗作用。

综上所述,痘清颗粒对急性肝内胆汁淤积大鼠的肝功能具有一定保护作用,可减轻大鼠胆汁淤积程度和肝损害,其作用机制可能与上调肝组织中Na⁺-H⁺交换体mRNA的表达有关。

参考文献

- [1] 李晓玲,孙凤霞,王晓静,等.复方茵丹汤对大鼠急性肝内胆汁淤积的干预作用[J].中国中西医结合消化杂志,2014,22(9):497.
- [2] 卢秉久,郑佳连,赵志超,等.活血祛湿方对ANIT诱导的肝内胆汁淤积型大鼠的疗效实验研究[C]//深圳:世界中国第五届肝病国际学术大会论文集,2013:170-171.
- [3] 朱平生,龙爱华,王兵,等.不同经典方剂对肝内胆汁淤积大鼠肝肾功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):200.
- [4] 欧巧群,钱新华,黄笑群,等. ANIT诱导大鼠亚急性肝内胆汁淤积的生化病理变化[J].胃肠病学和肝病杂志,2015,24(4):463.
- [5] 崔晶,卢秉久,李莹,等.活血祛湿方对肝内胆汁淤积型大鼠血清学指标的影响[J].实用中医内科杂志,2011,25(11):37.
- [6] 孙源源,申玲玲,杨香瑜,等.茵栀黄口服液对妊娠期肝内胆汁淤积症大鼠肝损伤的治疗作用[J].中国药师,2015,18(7):1091.
- [7] 徐继会,王德华.茵栀黄加苦参素注射剂治疗急性黄疸型病毒性肝炎的临床疗效观察[J].中国药房,2008,19(27):2148.
- [8] 陈菲,方步武,吴咸中,等.3种中药复方对药物所致肝内胆汁淤积大鼠胆汁的影响[J].中国药业,2015,24(20):14.
- [9] 朱波.72例药物性肝炎的临床特点与致病药物分析[J].中国药业,2012,21(11):57.
- [10] 邹姝丽,刘建,兰易,等.鹅去氧胆酸对胆汁淤积孕鼠血生化指标、肝脏病理及胎鼠预后的影响[J].中国新药与临床杂志,2008,27(4):274.

(收稿日期:2015-12-03 修回日期:2016-03-11)

(编辑:林 静)