

紫叶李果实总黄酮对大鼠酒精性肝损伤的保护作用机制研究^Δ

冯海容^{1*}, 郑轶¹, 常海茹², 赵永会¹ (1.唐山市协和医院药剂科, 河北唐山 063000; 2.唐山市丰润区人民医院药剂科, 河北唐山 063000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)10-1332-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.10.10

摘要 目的:研究紫叶李果实总黄酮(PCE)对酒精性肝损伤(ALD)大鼠的保护作用机制,为将其开发为治疗ALD的新药提供实验依据。方法:将40只大鼠随机分为正常组(蒸馏水)、模型组(蒸馏水)、水飞蓟宾组[阳性对照,30 mg/(kg·d)]和PCE高、低剂量组[80、40 mg/(kg·d)],每组8只。每天上午ig给药(10 mL/kg)1次,持续6周;给药同时,除正常组外其余各组大鼠每天下午ig 50%乙醇(10 mL/kg)1次诱导ALD模型。给药结束后,测定大鼠心、肝、脾等脏器指数和皮下脂肪、棕色脂肪、腹腔脂肪指数;测定谷氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、间接胆红素(IBIL)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)以及总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)等血清生化指标水平;测定肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、TC、TG以及粪便中TC、TG等生化指标水平;观察大鼠肝、肾组织病理变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠肝、脾、肾指数和皮下脂肪、腹腔脂肪指数升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),脑指数和棕色脂肪指数降低($P < 0.05$);血清中HDL水平和HDL/TC比值降低,其余血清指标均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肝组织中SOD、GSH-Px水平降低,其余肝组织生化指标均升高($P < 0.01$);粪便中TC、TG水平升高($P < 0.01$);肝、肾均发生明显病变。与模型组比较,水飞蓟宾组和PCE高剂量组大鼠上述指标均显著改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);PCE低剂量组大鼠血清中ALT、AST和肝组织中MDA水平显著降低($P < 0.01$),肝组织中SOD和GSH-Px水平显著升高($P < 0.05$);各给药组肝、肾病变程度及肝中脂质聚积减轻。结论:PCE可能通过抗氧化、促进肝细胞再生、调节脂质代谢等方面发挥其改善ALD的作用。

关键词 紫叶李果实总黄酮;酒精性肝损伤;保护作用;机制;大鼠

- mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from affected individuals[J]. *Dis Model Mech*, 2016, 9(9):985-997.
- [5] 安福丽,白东玉,郭喜军,等.化浊解毒愈疡煎剂治疗胃溃疡浊毒内蕴证临床研究[J]. *中医学报*, 2013, 28(12): 1909-1910.
- [6] 贺海辉,沈洪,朱宣宣,等.2,4,6-三硝基苯磺酸/乙醇法诱导建立溃疡性结肠炎大鼠模型[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(15):4138-4140.
- [7] Murano M, Maemura K, Hirata I, *et al*. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS) -induced colitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1):51-58.
- [8] Millar AD, Rampton DS, Chander CL, *et al*. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis[J]. *Gut*, 1996, 39(3):407-415.
- [9] 陈文刚,陈建权,刘建平,等.泄浊解毒方对溃疡性结肠炎大鼠Toll样受体4/核因子- κ B信号通路的影响[J]. *江苏中医药*, 2012, 44(2):67-68.
- [10] Rana SV, Sharma S, Kaur J, *et al*. Relationship of cytokines, oxidative stress and GI motility with bacterial overgrowth in ulcerative colitis patients[J]. *J Crohns Colitis*, 2014, 8(8):859-865.
- [11] 马新,谢宜奎,刘彤,等.溃疡性结肠炎肠黏膜组织PAR-2及COX-2表达及其相关性研究[J]. *中国现代普通外科进展*, 2013, 16(2):107-111.
- [12] Bruno ME, Rogier EW, Arsenescu RI, *et al*. Correlation of biomarker expression in colonic mucosa with disease phenotype in Crohn's disease and ulcerative colitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(10):1-9.
- [13] 雷云霞,何磊,盛好,等.中西医结合疗法治疗溃疡性结肠炎对血小板、凝血功能及炎性因子的影响[J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(14):1532-1534, 1537.
- [14] 刘晓冉,王红霞,闫一慧,等.愈疡化浊解毒汤配合心理疗法对胃溃疡临床疗效及患者生活质量的影响[J]. *河北中医*, 2015, 37(12):1790-1792.
- [15] 夏丹,张梦翔,施高翔,等.白头翁汤抑制小鼠阴道念珠菌的增殖并降低炎性细胞因子水平[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(2):153-157.
- [16] 郑家驹.氨基水杨酸盐治疗炎症性肠病的药理学研究[J]. *中国药房*, 2005, 16(13):1025-1028.
- [17] 黄志刚,刘有理,俞善春.美沙拉嗪联合双歧杆菌三联活菌治疗溃疡性结肠炎的疗效及对氧化应激、炎症因子的影响[J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(6):545-547.

^Δ 基金项目:河北省科技局科研项目(No.152496-5-3)

* 主管药师。研究方向:药理作用机制。电话:0315-3406194。

E-mail: 1092811283@qq.com

(收稿日期:2016-10-09 修回日期:2017-02-25)

(编辑:林静)

Study on the Protective Effect Mechanism of Total Flavones from *Prunus cerasifera* Fruits for Alcoholic Liver Disease in Rats

FENG Hairong¹, ZHENG Yi¹, CHANG Hairu², ZHAO Yonghui¹ (1. Dept. of Pharmacy, Tangshan Union Hospital, Hebei Tangshan 063000, China; 2. Dept. of Pharmacy, People's Hospital of Tangshan Fengrun District, Hebei Tangshan 063000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of total flavone from *Prunus cerasifera* fruits (PCE) on alcoholic liver disease (ALD) in rats, and provide experimental basis for developing new medicines for anti-ALD. METHODS: 40 rats were randomly divided into normal group (distilled water), model group (distilled water), silibinin group [positive control, 30 mg/(kg·d)] and PCE high-dose, low-dose groups [80, 40 mg/(kg·d)], 8 in each group. All rats were intragastrically administrated (10 mL/kg) every morning, once, for 6 weeks; meanwhile, except for normal group, rats in other groups received 50% alcohol (10 mL/kg) once intragastrically every afternoon to induce ALD model. After administration, heart, liver, spleen and other organ indexes, subcutaneous fat, brown fat, abdominal fat indexes were determined, as well as serum biochemical indexes [glutamate transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), indirect bilirubin (IBIL), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), and total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL)] level and liver biochemical indexes [superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), TC, TG] and TC, TG levels in feces; pathological changes of liver and kidney tissues were observed. RESULTS: Compared with normal group, heart, liver, spleen indexes, subcutaneous fat, abdominal fat indexes in model group were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), brain index and brown fat index were decreased ($P < 0.05$); HDL level and HDL/TC ratio in serum were decreased, other serum indexes were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); SOD, GSH-Px levels in liver tissue were decreased, other above-mentioned liver biochemical indexes were increased ($P < 0.01$); TC, TG levels in feces were increased ($P < 0.01$); liver and kidney showed obvious lesions. Compared with model group, the above-mentioned indexes in silibinin group and PCE high-dose group were significantly improved ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); ALT, AST in serum and MDA level in liver tissue in PCE low-dose group were significantly decreased ($P < 0.01$), and SOD, GSH-Px levels in liver tissue were significantly increased ($P < 0.05$); lesion degree of liver and kidney and lipid accumulation in liver were reduced in administration groups. CONCLUSIONS: PCE may play a role in anti-ALD by anti-oxidation, promoting liver cell regeneration and regulating lipid metabolism.

KEYWORDS Total flavone from *Prunus cerasifera* fruits; Alcoholic liver disease; Protective effect; Mechanism; Rats

近年来,随着我国社会经济的发展和人民生活水平的提高,酒的生产 and 消耗量不断增加,长期大量饮酒可诱发广泛肝细胞坏死^[1],即酒精性肝损伤(Alcoholic liver disease, ALD)。ALD若得不到及时的治疗,通常可发展为酒精性肝炎、脂肪肝、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌,严重危害人类的健康,目前在国际上已成为导致肝损害的第二大病因,日益引起社会及医学界的高度重视^[2-3]。中药由于具有多靶点、多层次、多途径的作用特点,并具有相对低毒的优势,极具开发价值,在ALD方面也发挥了越来越重要的作用,因此从中医药中发掘治疗ALD的药物已成为国内外研究的热点^[4-5]。

紫叶李(*Prunus cerasifera* Ehrh Cv. atropurpurca)为蔷薇科中药,其果实具有保肝护肝、补中益气、养阴生津、润肠通便等功效,其中含有的大量黄酮类化合物为其主要的有效成分^[6]。总黄酮类化合物广泛地存在于植物中,具有良好的保肝护肝、利胆、抗氧化等多种生物活性及药理作用^[7-8]。目前国内外对紫叶李果实总黄酮(*Prunus cerasifera* Ehrh Cv. atropurpurca total flavone, PCE)抗ALD的研究仍属于空白,因此笔者拟采用50%乙醇诱导大鼠发生ALD,研究PCE对ALD大鼠的肝功能、血胆红素、血脂、血糖、血中谷氨酰转氨酶、肝中脂质

的蓄积、粪便中的脂质、肝的氧化应激指标等的影响,并对大鼠肝、肾病理变化进行观察,初步探讨其对ALD大鼠的保护作用机制。

1 材料

1.1 仪器

HBS-1096B型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);AR64CN型通用电子天平(美国奥豪斯公司);DP-280型全自动生化分析仪(广州东唐电子科技有限公司);GS623型电子天平(日本新光株式会社);TU-18101型通用仪器紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);TG-16G型高速冷冻离心机(常州市万丰仪器制造有限公司);Scientz-II D型超声波细胞粉碎机(成都市生科仪器有限责任公司)。

1.2 药材、试剂盒与试剂

紫叶李果实于2016年8月自唐山市华北理工大学校园采摘,经华北理工大学韩淑英教授鉴定为紫叶李(*Prunus cerasifera* Ehrh Cv. atropurpurca)的果实,晒干后备用。

丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化

物酶(GSH-Px)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、间接胆红素(IBIL)试剂盒以及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;甲醛(分析纯,天津市华东试剂厂,批号:20160426);红星二锅头酒(56℃,北京红星股份有限公司,批号:20160619,实验时用纯净水配成50%的乙醇溶液)。

1.3 动物

清洁级SD大鼠40只,♂,体质量160~200g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2012-0001。动物饲养于单格饲养笼中,室内温度为(25±2)℃、相对湿度为(45±5)%,自然光照,全价颗粒饲料喂养,自由饮水。

2 方法

2.1 PCE的制备

将紫叶李果实去核,粉碎成粗粉,精密称取干燥至恒质量的果实粗粉,待用。于圆底烧瓶中加入500mL饱和石灰水,煮沸2~3min后,加入果实粗粉,然后加热(微沸)回流提取2次,首次用时2h,第2次1.5h,趁热用脱脂棉过滤。将所得滤液放置稍冷(60~70℃),用浓HCl调滤液pH至4~5,放置过夜使沉淀完全,抽滤,得淡黄色PCE粗品。将PCE粗品置于烧杯中,按PCE粗品-水比例为1g:200mL加入蒸馏水,于石棉网上加热溶解,趁热过滤,滤液静置1h,即析出精制PCE。最终总黄酮得率为86%。将所得精制PCE溶解至所需浓度,于4℃冰箱保存,备用。

2.2 PCE抗ALD的作用考察

2.2.1 动物分组、给药与造模 将40只大鼠随机分为5组,即正常组、模型组、水飞蓟宾组[阳性对照,30mg/(kg·d)]和PCE高、低剂量组[80、40mg/(kg·d)]^[6,8],每组8只。各给药组大鼠每天上午ig给药1次,给药体积为10mL/kg,连续6周;正常组和模型组大鼠ig等体积蒸馏水。在给药同时,模型组和各给药组大鼠每天下午均ig1次50%乙醇(10mL/kg)复制ALD模型,持续6周,记录大鼠体质量、摄食量、饮水量的变化。

2.2.2 指标检测 大鼠处死前禁食12h,股动脉取血,常规分离血清,按照试剂盒说明书操作检测血清中ALT、AST、TBIL、DBIL、IBIL、GGT、TC、TG、HDL、LDL水平,并计算AST/ALT、HDL/TC比值;将大鼠处死后取心、肝、脾、肺、肾、大脑等脏器组织以及皮下脂肪、棕色脂肪、腹腔脂肪等脂肪组织,计算脏器(脂肪)指数[脏器(脂肪)指数(g/100g)=脏器(脂肪)的质量(g)/体质量(g)×100],并用肉眼观察大鼠肝的外形、体积、颜色、质地的改变;将部分肝组织于10%甲醛溶液中固定,对其苏木精-伊红(HE)染色病理切片和油红O染色病理切片以及其肾组织的HE病理切片进行观察;将肝组织匀浆后,按照试剂盒说明书操作检测肝组织中SOD、MDA、

GSH-Px水平;按照试剂盒说明书操作检测粪便中TC、TG水平。

2.3 统计学方法

采用SPSS 17.0、Origin 8.6统计软件对实验数据进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,后以LSD法进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PCE对ALD大鼠体质量、摄食量、饮水量的影响

在给予乙醇造模及PCE治疗前,各组大鼠的体质量、摄食量和饮水量均无明显差异($P > 0.05$)。在实验期间,与正常组比较,模型组大鼠的体质量、摄食量明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.05$),饮水量明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,PCE各剂量组大鼠体质量、摄食量均明显增加($P < 0.05$),饮水量明显减少($P < 0.05$),且PCE高剂量组的变化较低剂量组明显,结果见图1。

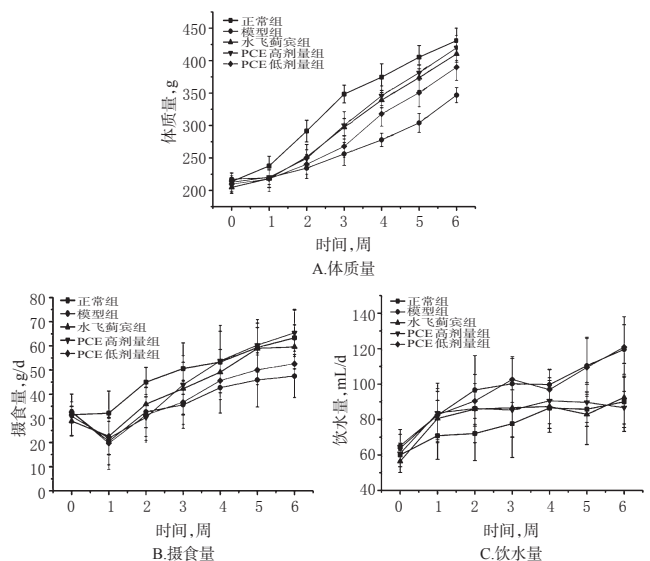


图1 各组大鼠体质量、摄食量、饮水量测定结果

Fig 1 Determination results of body weight, food intake and water intake of rats in each group

3.2 PCE对ALD大鼠脏器和脂肪指数的影响

乙醇造模6周后,与正常组比较,模型组大鼠肝、脾、肾指数以及腹腔脂肪指数均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);脑指数和棕色脂肪指数均明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,水飞蓟宾组和PCE高剂量组大鼠的肝、脾、肾以及皮下脂肪、腹腔脂肪指数均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),脑指数和棕色脂肪指数明显升高($P < 0.05$),且PCE高剂量组的变化较低剂量组明显($P < 0.05$),结果见表1。

3.3 PCE对ALD大鼠血清中ALT、AST、GGT水平以及AST/ALT比值的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中ALT、AST、GGT水平以及AST/ALT比值均明显升高($P < 0.05$ 或 $P <$

表1 各组大鼠脏器指数和脂肪指数测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Determination results of organ indexes and fat indexes of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

指标	正常组	模型组	水飞蓟宾组	PCE高剂量组	PCE低剂量组
大鼠体重/g	430.8±19.20	356.9±11.60**	410.2±12.50**	419.7±19.21**	389.9±20.37*
肝,g/100g	1.957±0.203	3.534±0.193**	2.073±0.407**	1.982±0.320**	2.849±0.716 ^Δ
脾,g/100g	0.119±0.046	0.210±0.061**	0.124±0.019**	0.121±0.024**	0.197±0.029 ^Δ
肺,g/100g	0.342±0.018	0.357±0.093	0.331±0.026	0.337±0.063	0.342±0.017
脑,g/100g	0.413±0.051	0.359±0.037*	0.410±0.068*	0.409±0.059*	0.362±0.035 ^Δ
心,g/100g	0.262±0.021	0.289±0.065	0.277±0.024	0.261±0.032	0.283±0.037
肾,g/100g	0.522±0.097	0.867±0.137*	0.607±0.164*	0.592±0.240*	0.695±0.173
皮下脂肪,g/100g	0.756±0.113	1.067±0.620*	0.801±0.302*	0.790±0.135*	0.983±0.258 ^Δ
腹腔脂肪,g/100g	0.892±0.590	1.193±0.513*	0.945±0.376*	0.916±0.175*	1.062±0.194 ^Δ
棕色脂肪,g/100g	0.321±0.162	0.227±0.197*	0.313±0.124*	0.319±0.297*	0.271±0.263 ^Δ

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与PCE高剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. PCE high-dose group, ^Δ $P<0.05$

0.01)。与模型组比较,各给药组大鼠血清中ALT、AST水平以及水飞蓟宾组、PCE高剂量组大鼠血清中GGT水平和AST/ALT比值均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且PCE高剂量组的变化较低剂量组明显,其中ALT、AST、GGT水平差异有统计学意义($P<0.05$),结果见表2。

表2 各组大鼠血清中ALT、AST、GGT水平以及AST/ALT比值测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Determination results of ALT, AST, GGT levels in serum and AST/ALT ratio of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/(kg·d)	ALT,U/L	AST,U/L	GGT,U/L	AST/ALT
正常组		45.21±10.05	70.66±9.38	1.96±0.57	1.56±0.15
模型组		98.39±16.42**	202.75±19.32**	4.19±1.07**	2.06±0.93*
水飞蓟宾组	30	56.02±14.25**	90.29±12.41**	2.13±0.94**	1.61±0.17*
PCE高剂量组	80	52.91±11.30**	83.98±13.05**	2.06±0.62**	1.59±0.35*
PCE低剂量组	40	80.53±20.15 ^Δ	150.67±19.62** ^Δ	3.27±1.15 ^Δ	1.87±0.12

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与PCE高剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. PCE high-dose group, ^Δ $P<0.05$

3.4 PCE对ALD大鼠血清中TBIL、DBIL、IBIL水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中TBIL、DBIL、IBIL水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,水飞蓟宾组和PCE高剂量组大鼠血清中TBIL、DBIL、IBIL水平明显降低($P<0.01$);且PCE高剂量组的变化较低剂量组明显,差异均有统计学意义($P<0.05$),结果见表3。

3.5 PCE对ALD大鼠血清中TC、TG、HDL、LDL水平以及HDL/TC比值的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中TC、TG、LDL水平均明显升高($P<0.01$),HDL水平以及HDL/TC比值

表3 各组大鼠血清中TBIL、DBIL、IBIL水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Determination results of TBIL, DBIL, IBIL levels in serum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/(kg·d)	TBIL, μ mol/L	DBIL, μ mol/L	IBIL, μ mol/L
正常组		1.72±0.32	1.26±0.24	0.46±0.13
模型组		2.65±1.04**	1.92±0.91*	0.73±0.29**
水飞蓟宾组	30	1.80±0.95**	1.31±0.19**	0.49±0.12**
PCE高剂量组	80	1.78±0.27**	1.30±0.56**	0.48±0.24**
PCE低剂量组	40	2.29±1.07 ^Δ	1.68±0.20 ^Δ	0.61±1.82 ^Δ

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与PCE高剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. PCE high-dose group, ^Δ $P<0.05$

明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,水飞蓟宾组和PCE高剂量组大鼠血清中上述指标均明显改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且PCE高剂量组变化较低剂量组明显,其中TC、HDL水平和HDL/TC比值差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结果见表4。

表4 各组大鼠血清中TC、TG、HDL、LDL水平以及HDL/TC比值测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 4 Determination results of TC, TG, HDL, LDL levels in serum and HDL/TC ratio of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/(kg·d)	TC,mmol/L	TG,mmol/L	HDL,mmol/L	LDL,mmol/L	HDL/TC
正常组		1.83±0.083	0.26±0.037	1.69±0.076	0.31±0.065	0.92±0.056
模型组		3.18±0.094**	0.66±0.031**	0.97±0.033**	0.72±0.015**	0.31±0.027**
水飞蓟宾组	30	2.21±0.090*	0.33±0.016**	1.26±0.061*	0.42±0.053**	0.57±0.062*
PCE高剂量组	80	2.19±0.031*	0.47±0.032*	1.49±0.023**	0.53±0.037*	0.68±0.016**
PCE低剂量组	40	2.92±0.097 ^Δ	0.58±0.017	0.92±0.029 ^Δ	0.65±0.029	0.32±0.025 ^Δ

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与PCE高剂量组比较,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$

Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. PCE high-dose group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$

3.6 PCE对ALD大鼠肝组织中SOD、MDA、GSH-Px水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中SOD、GSH-Px水平明显降低($P<0.01$),MDA水平明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,水飞蓟宾组和PCE各剂量组大鼠肝组织中SOD、GSH-Px水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),MDA水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且PCE高剂量组变化较低剂量组明显($P<0.05$),结果见表5。

3.7 PCE对ALD大鼠肝组织和粪便中TC、TG水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织和粪便中TC、TG水平均明显增加($P<0.01$)。与模型组比较,水飞蓟宾组和PCE高剂量组大鼠肝组织中TC、TG水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而粪便中TC、TG水平明显升高

表5 各组大鼠肝组织中SOD、MDA、GSH-Px水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 5 Determination results of SOD, MDA, GSH-Px levels in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/(kg·d)	SOD,U/g	MDA,nmol/g	GSH-Px, μg/g
正常组		173.60±10.24	20.95±7.61	189.32±12.73
模型组		76.56±6.49**	65.83±9.07**	97.19±9.05**
水飞蓟宾组	30	155.89±9.37 ^{##}	29.42±2.57 ^{##}	176.29±11.09 ^{##}
PCE高剂量组	80	161.07±12.10 ^{##}	25.03±8.11 ^{##}	182.24±6.85 ^{##}
PCE低剂量组	40	105.29±8.94 ^Δ	43.89±7.62 ^Δ	125.95±10.61 ^Δ

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.05$,^{###} $P<0.01$;与PCE高剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, ^{##} $P<0.05$, ^{###} $P<0.01$; vs. PCE high-dose group, ^Δ $P<0.05$

($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且PCE高剂量组变化较低剂量组明显,其中肝组织中TC、TG水平差异有统计学意义($P<0.05$),结果见表6。

表6 各组大鼠肝组织和粪便中TC、TG水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 6 Determination results of TC, TG levels in feces and liver tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/(kg·d)	TC,mmol/L		TG,mmol/L	
		肝组织	粪便	肝组织	粪便
正常组		0.98±0.64	0.86±0.42	0.22±0.017	0.59±0.037
模型组		1.93±0.15**	1.28±0.52**	0.47±0.012**	0.93±0.420**
水飞蓟宾组	30	1.12±0.67 ^{##}	1.51±0.64 ^{##}	0.29±0.093 ^{##}	1.20±0.340 ^{##}
PCE高剂量组	80	1.15±0.58 ^{##}	1.53±0.39 ^{##}	0.27±0.076 ^{##}	1.29±0.160 ^{##}
PCE低剂量组	40	1.67±0.36 ^Δ	1.15±0.68	0.41±0.065 ^Δ	0.87±0.096

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.05$,^{###} $P<0.01$;与PCE高剂量组比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, ^{##} $P<0.05$, ^{###} $P<0.01$; vs. PCE high-dose group, ^Δ $P<0.05$

3.8 PCE对ALD大鼠肝、肾组织病理学变化的影响

3.8.1 对肝组织病理学的影响 正常组大鼠肝为鲜红色、无肿胀,具有良好的光泽,柔软富有弹性;病理切片观察可见明显脂肪颗粒和空泡,但未见脂肪颗粒聚集,无炎症细胞存在。与正常组比较,模型组大鼠肝颜色暗淡,呈暗红色,表面有众多颗粒聚集,光泽度较差,边缘增厚,体积较大;HE染色可见肝窦轮廓较为模糊、细胞较为肿胀,同时肝细胞内具有明显脂肪颗粒;油红O染色亦可见脂肪颗粒聚积,并有少量空泡存在,细胞核因被脂肪颗粒挤压而导致移位,可见少量单核炎症细胞存在。与模型组比较,水飞蓟宾组和PCE各剂量组大鼠肝体积相对较小,呈鲜红色,具有良好的光泽,边缘较薄;HE染色可见肝细胞形态较为规则,肝窦清晰,可见少部分肝细胞有脂肪变性;油红O染色可见非常少量的脂肪颗粒聚积,未见单核炎症细胞,细胞无肿胀,且PCE高剂量组肝状态优于低剂量组,结果见图2。

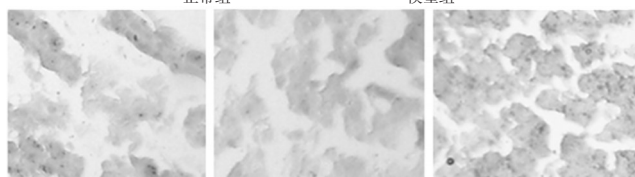
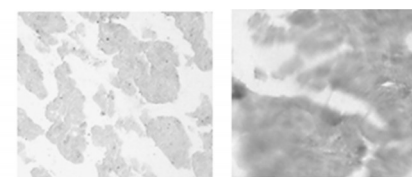
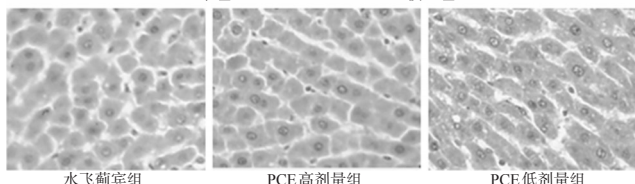
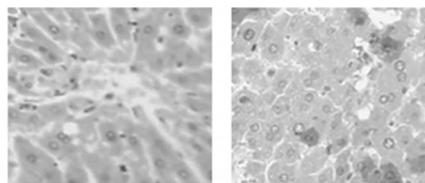


图2 各组大鼠肝组织病理学观察结果($\times 40$)

Fig 2 Results of pathological observation of liver tissues of rats in each group($\times 40$)

3.8.2 对肾组织病理学的影响 正常组大鼠肾小球结构完好、轮廓清晰。与正常组比较,模型组大鼠肾小球有萎缩的迹象,轮廓稍微呈模糊不清。与模型组比较,水飞蓟宾组和PCE各剂量组大鼠肾小球结构大部分完好,偶尔有少量的萎缩迹象,轮廓较为清晰,且PCE高剂量组和低剂量组肾状态相似,结果见图3。

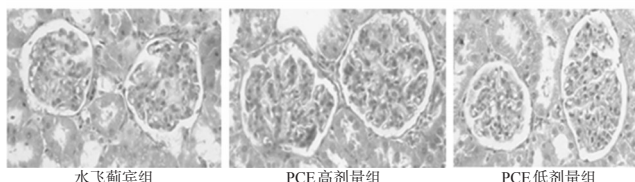
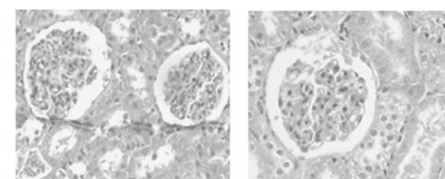


图3 各组大鼠肾组织病理学观察结果(油红O染色, $\times 40$)

Fig 3 Results of pathological observation of liver, kidney tissues of rats in each group (oil red O staining, $\times 40$)

4 讨论

ALD的早期防治在临床上具有十分重要的意义^[9]。

水飞蓟宾作为保肝药在临床上被广泛应用,其作用机制为促进肝细胞再生、清除自由基、抗氧化、调节机体脂质代谢等^[10],可从多层次、多途径防治ALD,因此本研究以其为阳性对照药。

转氨酶升高是肝细胞损害的敏感标志^[11]。通常,ALT、AST大量存在于肝细胞中,当酒精进入体内对肝细胞造成损害时,细胞质中ALT、AST会被大量排放到血液中,导致血清中转氨酶升高,进而继续引起脏器不适。过量饮酒还会使体内氧自由基增加,肝损伤加重,血脂、血糖含量升高。本研究表明,PCE能显著抑制血清中ALT、AST水平的升高,提示PCE具有抑制肝细胞损伤的作用。

SOD催化氧自由基的歧化反应,是机体内清除氧自由基的重要酶之一。肝细胞损伤或脂质聚积时还会产生大量的过氧化物,MDA为过氧化物的最终产物,可严重破坏细胞膜结构。长期大量的饮酒,乙醇能激活氧分子,导致体内自由基的代谢受到严重的影响,自由基在体内大量的堆积,进而使肝细胞中的SOD和GSH大量减少,并使SOD和GSH的活力降低,对身体造成严重的伤害^[12]。GSH对由活性氧和羟自由基诱发的脂氢过氧化物也有很强的清除能力,可起到延缓细胞衰老的作用。本研究表明,PCE能明显降低ALD大鼠肝组织中的MDA水平,并能增加SOD、GSH-Px的活性,提示其能提高肝组织的抗氧化酶(SOD)活性、抑制自由基的产生并促进其清除,抑制氧自由基引起的脂质过氧化反应,使MDA生成减少,从而对肝组织起到保护作用。

此外,长期大量的饮酒还可使脂肪酸氧化减弱,进而使脂肪在血液和肝细胞内沉积,即TG、TC、LDL在体内大量地聚积,而体内HDL则大量地减少。本研究表明,PCE能显著升高血清中HDL和HDL/TC比值水平,以及降低TC、TG在肝细胞内的聚积;可促进体内TC、TG的排泄,即增加了粪便中TC、TG的含量。病理组织形态学检查亦表明PCE能明显减轻大鼠ALD的病变程度,并减少肝中脂质的聚积。胆红素在肝内进行代谢,是临床上判定黄疸的重要依据,也是肝功能检测的重要指标之一^[13]。本研究表明,PCE能显著对抗ALD大鼠血清中TBIL、DBIL、IBIL水平的升高,提示PCE能改善酒精对机体肝功的影响并使黄疸异常恢复正常。

综上所述,PCE具有良好的改善ALD的作用,可改善肝的病理变化,降低血清中ALT、AST、TBIL、DBIL、IBIL、TC、TG、LDL、GGT水平以及肝组织中TC、TG、MDA水平;可升高血清中HDL水平、HDL/TC比值以及

肝组织中SOD、GSH-Px水平,增加粪便中TC、TG含量。PCE改善ALD,主要是通过促进肝细胞再生、清除体内氧化自由基、调节机体脂质代谢等方面发挥作用,但其更多作用机制仍需进一步探究。

参考文献

- [1] 梁惠,吕锐,傅泳,等.益生菌对大鼠酒精性肝损伤的保护作用及机制研究[J].中国药理学通报,2016,32(7):991-997.
- [2] O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ, et al. Alcoholic liver disease[J]. *Hepatology*, 2010, 51(1):307-328.
- [3] 肖凤霞,张旭倩,邓少东,等.毛橘红总黄酮对酒精性肝损伤大鼠肝组织病理的影响[J].中药新药与临床药理, 2012, 23(6):615-619.
- [4] 薛承斌,晏琼,韩定献.贞茯菌胶囊对酒精性肝损伤模型小鼠的保护作用[J].中国药房, 2014, 25(43):4043-4045.
- [5] Lee KW, Bode AM, Dong Z. Molecular targets of phytochemicals for cancer prevention[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(3):211-218.
- [6] 汪洪涛,陈成,余芳,等.紫叶李果实总多酚的提取工艺及其抗氧化活性研究[J].河南农业科学, 2013, 42(10):153-156.
- [7] 王洪武,李守超,贺海波,等.竹节参提取物对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(9):961-966.
- [8] 徐博,吴畏难,李传甲,等.萱草花总黄酮对小鼠急性酒精性肝损伤保护作用及机制探讨[J].中国实验方剂学杂志, 2016, 22(23):104-108.
- [9] Sancho-Bru P, Altamirano J, Rodrigo-Torres D, et al. Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis[J]. *Hepatology*, 2012, 55(6):1931-1941.
- [10] 王红军,姜媛媛,路平,等.水飞蓟宾的抗肿瘤、抗氧化和免疫调节分子药理学机制研究进展[J].药学学报, 2010, 45(4):413-421.
- [11] 吴诚,吕著海,沈存思,等.养元饮对酒精性肝损伤大鼠解酒和保肝作用[J].中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14):150-153.
- [12] 李海燕,李夏,金向群,等.黄芩苷对大鼠慢性酒精性肝损伤的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2008, 14(6):58-60.
- [13] 林佳媛,马国.胆红素代谢及其调节的研究进展[J].复旦学报(医学版), 2014, 41(3):405-411.

(收稿日期:2016-11-22 修回日期:2017-02-11)

(编辑:林静)