

黄芩苷对急、慢性肝损伤模型鼠的保护作用

刘晓君*, 杨洁芳#(重庆市第九人民医院, 重庆 400700)

中图分类号 R285;R575 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1374-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.10

摘要 目的:研究黄芩苷对急、慢性肝损伤模型鼠的保护作用。方法:腹腔注射10% CCl₄橄榄油溶液(0.2 ml/100 g)以复制小鼠急性肝损伤模型。50只KM小鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组与黄芩苷高、中、低剂量(1.00、0.50、0.25 g/kg)组。灌胃给药,每天1次,连续6 d,末次给药12 h后复制模型。另外,腹腔注射硫代乙酰胺(TAA, 200 mg/kg),每周2次,连续12周以复制大鼠慢性肝损伤模型。50只SD大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组与黄芩苷高、中、低剂量(0.8、0.4、0.2 g/kg)组。复制模型同时灌胃给药,每天1次连续12周。测定鼠血清与肝匀浆中丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性,并对鼠肝组织病理学进行评级。结果:与正常对照组比较,模型组鼠血清ALT活性增强,肝组织匀浆ALT活性减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$);鼠肝组织病理程度严重。与模型组比较,黄芩苷高、中、低剂量组鼠血清ALT活性减弱,肝组织匀浆ALT活性增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);鼠肝组织病理程度有一定改善。结论:黄芩苷对急、慢性肝损伤模型鼠具有一定保护作用,其机制与调节ALT水平、改善肝组织病理程度有关。

关键词 肝损伤;丙氨酸氨基转移酶;病理学;大鼠;小鼠

Protective Effect of Baicalin on Acute and Chronic Liver Injury Model Rats and Mice

LIU Xiao-jun, YANG Jie-fang (Chongqing Ninth People's Hospital, Chongqing 400700, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study protective effect on acute and chronic liver injury model rats and mice. METHODS: The acute liver injury model of mice was induced by intraperitoneal injection of 10% Carbon tetrachloride olive oil solution (0.2 ml/100 g). 50 KM mice were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), baicalin high-dose, medium-dose and low-dose groups (1.00, 0.50, 0.25 g/kg). They were given relevant medicines subcutaneously, once a day, for continuous 6 days; 12 hours after last administration, model mice were induced. The chronic liver injury model of rat was induced by intraperitoneal injection of thioacetamide (TAA, 200 mg/kg), twice a week, for continuous 12 weeks. 50 rats were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), baicalin high-dose, medium-dose and low-dose groups (0.8, 0.4, 0.2 g/kg). They were given relevant medicines intragastrically, once a day, for consecutive 12 weeks. The activity of ALT in serum and liver homogenate were determined; The pathology scale of liver tissue was evaluated. RESULTS: Compared with normal control group, the activity of ALT in serum increased in model group, but that of liver homogenate decreased; there was statistical significance ($P < 0.01$). The pathological degree of liver tissue was aggravated. Compared with model group, the activity of ALT in serum decreased in baicalin high-dose, medium-dose and low-dose groups, but that of liver homogenate increased; there was statistical significance ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The pathological degree of liver tissue was alleviated. CONCLUSIONS: Baicalin has the protective effect on acute and chronic liver injury in the rats and mice, the mechanism of which may be associated with the regulation of ALT levels and improving liver pathological degree.

KEYWORDS Liver injury; ALT; Pathology; Rat; Mice

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)为多年生草本植物,别名山茶根、土金茶根,是唇形科黄芩属的一种植物,具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎、降血压之功效,临床用于湿温、暑温致胸闷呕恶、湿热痞满、泻痢、黄疸、肺热咳嗽等证的治疗^[1]。黄芩中的主要成分为黄酮类化合物,其中主要黄酮类成分为黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、黄芩新素和千层纸素A等^[2]。研究表明,黄芩苷不但具有清除自由基、抗病毒、抗肿瘤、抗心律失常等作用,而且还有抗肺炎衣原体所致的动脉粥样硬化作用,对缺血再灌注损伤模型动物的大脑和心肌具有

保护作用,对不同原因引起的肝损伤具有保护作用,能明显促进成纤维细胞增殖,在体外对某些寄生虫均有明显的抑制和杀灭作用^[3-5]。黄芩苷对急、慢性肝损伤的保护作用报道较少,故本研究ip CCl₄以复制小鼠急性肝损伤模型、ip 硫代乙酰胺(TAA)以复制大鼠慢性肝损伤模型来研究黄芩苷对急、慢性肝损伤模型鼠的保护作用,为临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

722型分光光度计(江苏科达智能仪器厂);TDL80-ZB型飞鸽牌离心机(上海安亭科学仪器厂);DY89-1型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);YP6000型电子天平(上海精科实业有限公司);CX21型光学显微镜(日本Olympus

* 主管药师。研究方向:临床药学。E-mail:747770637@qq.com
通信作者:副主任药师。研究方向:临床药学。电话:023-68209538

公司)。

1.2 药品与试剂

黄芩苷(西安绿立生物工程技术有限公司,批号:20120713,质量分数:95%);TAA(上海士锋生物科技有限公司,批号:20110927);丙氨酸氨基转移酶(ALT)测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物

清洁级 KM 小鼠(体质量 20~22 g)及 SD 大鼠(体质量 200~220 g),♀ ♂ 兼半,均购自重庆市中药研究院实验动物研究所[实验动物使用许可证号:SCXK(渝)2012-0006]。

2 方法

2.1 小鼠急性肝损伤模型的复制与分组、给药

ip 10% CCL₄橄榄油溶液 0.2 ml/100 g 以复制小鼠急性肝损伤模型(正常对照小鼠 ip 等容橄榄油)。50 只 KM 小鼠随机均分为 5 组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组与黄芩苷高、中、低剂量(1.00、0.50、0.25 g/kg)组,ig 给药,每天 1 次,连续 6 d,末次给药 12 h 后复制模型。

2.2 大鼠慢性肝损伤模型的复制与分组、给药

ip TAA(200 mg/kg),每周 2 次,连续 12 周,以复制大鼠慢性肝损伤模型。50 只 SD 大鼠随机均分为 5 组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组与黄芩苷高、中、低剂量(0.8、0.4、0.2 g/kg)组,复制模型的同时 ig 给药,每天 1 次,连续 12 周。

2.3 指标的测定

急性肝损伤模型小鼠复制成功 48 h 后,慢性肝损伤模型大鼠末次给药 24 h 后,摘除眼球取血,处死鼠,制备血清;取适量肝组织用冰生理盐水冲洗后制备成 10% 的肝组织匀浆,测定血清及肝匀浆中 ALT 活性。

2.4 病理学观察

肝组织切片,经 HE 染色,光镜下观察肝细胞损伤程度,参照文献^[6]纤维化标准给鼠组织病理学评级。(1)炎性细胞浸润:(-)无;(+)平均 10 个高倍视野见炎性细胞浸润灶≤5 个;(++)平均 10 个高倍视野见炎性细胞浸润灶>5 个,且<10 个;(+++)平均 10 个高倍视野见炎性细胞浸润灶≥10 个。(2)肝细胞变性:(-)无;(+)平均 10 个高倍视野见少数气球样或弥散颗粒变性≤5 个;(++)平均 10 个高倍视野见气球样变>5 个,且<10 个;(+++)平均 10 个高倍视野见气球样变≥10 个。(3)肝细胞坏死:(-)无;(+)平均 10 个高倍视野见点状坏死灶≤5 个;(++)平均 10 个高倍视野见点状坏死灶>5 个,且<10 个;(+++)平均 10 个高倍视野见点状坏死灶≥10 个或见灶状坏死。

2.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件处理分析实验数据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以 LSD 法进行统计。病理分级以等级计数资料方法处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩苷对急性肝损伤模型小鼠血清与肝组织匀浆 ALT

活性的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠血清 ALT 活性增强,肝组织匀浆 ALT 活性减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,黄芩苷高、中、低剂量组小鼠血清 ALT 活性减弱,肝组织匀浆 ALT 活性增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。黄芩苷对急性肝损伤模型小鼠血清与肝组织匀浆 ALT 活性的影响见表 1。

表 1 黄芩苷对急性肝损伤模型小鼠血清与肝组织匀浆 ALT 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of baicalin on the activity of ALT in serum and liver homogenate of acute liver injury mice($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量,g/kg	n	ALT,U/L	
			血清	肝组织匀浆
正常对照组		10	50.13 ± 10.45	15 638.48 ± 1 429.61
模型组		10	229.65 ± 41.59*	1 427.53 ± 186.67*
黄芩苷高剂量组	1.00	10	78.47 ± 18.38**	13 426.28 ± 1 107.92**
黄芩苷中剂量组	0.50	10	127.52 ± 25.76**	10 573.46 ± 972.37**
黄芩苷低剂量组	0.25	10	162.81 ± 36.42*	6 872.24 ± 785.49**

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.2 黄芩苷对慢性肝损伤模型大鼠血清与肝组织匀浆 ALT 活性的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清 ALT 活性增强,肝组织匀浆 ALT 活性减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,黄芩苷高、中、低剂量组大鼠血清 ALT 活性减弱,肝组织匀浆 ALT 活性增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。黄芩苷对慢性肝损伤模型大鼠血清与肝组织匀浆 ALT 活性的影响见表 2。

表 2 黄芩苷对慢性肝损伤模型大鼠血清与肝组织匀浆 ALT 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab2 Effects of baicalin on the activity of ALT in serum and liver homogenate of chronic liver injury rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量,g/kg	n	ALT,U/L	
			血清	肝组织匀浆
正常对照组		10	84.52 ± 12.61	20 347.64 ± 1 872.35
模型组		10	382.13 ± 48.76*	2 518.52 ± 225.47*
黄芩苷高剂量组	0.8	10	137.39 ± 25.84**	16 279.16 ± 1 256.43**
黄芩苷中剂量组	0.4	10	185.27 ± 37.51**	11 349.55 ± 1 463.21**
黄芩苷低剂量组	0.2	10	266.45 ± 45.26*	8 035.82 ± 941.76**

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.3 黄芩苷对急性肝损伤模型小鼠肝组织病理学评级的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织炎性细胞浸润、肝细胞变性、肝细胞坏死程度加重,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,黄芩苷高、中、低剂量组小鼠肝组织炎性细胞浸润、肝细胞变性、肝细胞坏死程度改善,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。黄芩苷对急性肝损伤模型小鼠肝组织病理学评级的影响见表 3。

表3 黄芩苷对急性肝损伤模型小鼠肝组织病理学评级的影响

Tab 3 Effects of baicalin on pathological scale of acute liver injury mice

组别	炎性细胞浸润				肝细胞变性				肝细胞坏死			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常对照组	6	4	0	0	6	4	0	0	10	0	0	0
模型组*	1	2	4	3	0	2	5	3	1	1	6	2
黄芩苷高剂量组**	3	6	1	0	5	4	1	0	8	1	1	0
黄芩苷中剂量组**	2	4	3	1	2	5	2	1	2	4	3	1
黄芩苷低剂量组**	2	3	3	2	1	4	3	2	3	3	2	2

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.4 黄芩苷对慢性肝损伤模型大鼠肝组织病理学评级的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织炎性细胞浸润、肝细胞变性、肝细胞坏死程度加重,肝组织明显损伤,肝细胞浊肿、气球样变性,病变以肝小叶中央静脉周围为重,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,黄芩苷高、中、低剂量组大鼠肝组织也有不同程度的肝细胞破坏、炎性细胞浸润等肝损伤病变,但病变程度改善,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。黄芩苷对慢性肝损伤模型大鼠肝组织病理学评级的影响见表4。

表4 黄芩苷对慢性肝损伤模型大鼠肝组织病理学评级的影响

Tab 4 Effects of baicalin on pathological scale of chronic liver injury rats

组别	炎性细胞浸润				肝细胞变性				肝细胞坏死			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常对照组	5	5	0	0	5	5	0	0	10	0	0	0
模型组*	1	1	5	3	0	2	6	2	1	2	5	2
黄芩苷高剂量组**	4	5	1	0	4	5	1	0	8	1	1	0
黄芩苷中剂量组**	3	3	3	1	2	4	3	1	4	4	1	1
黄芩苷低剂量组**	2	3	3	2	1	3	4	2	3	3	2	2

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

4 讨论

CCl₄、TAA 诱发的化学性肝损伤是目前国际上常用的急、慢性肝炎模型,可引起细胞膜的脂质过氧化、膜结构和功能完整性的破坏,从而导致肝细胞变性坏死^[7-8]。本研究中 ip CCl₄、TAA 以复制急、慢性肝损伤模型,病理表现为实验鼠部分肝小叶结构破坏,肝细胞普遍浊肿,索状排列紊乱,出现以中央静脉为中心的局灶性肝细胞变性、坏死或细胞核固缩溶解,大量炎细胞浸润;高、中、低剂量黄芩苷可明显改善该症状,证明其具有肝保护作用。

ALT 与天冬氨酸氨基转移酶(AST)主要分布在肝脏细胞内,如果肝细胞坏死,ALT 和 AST 就会升高。其升高的程度与

肝细胞受损的程度相一致,因此是目前最常用的肝功能指标。这两种酶在肝细胞内的分布是不同的,ALT 主要分布在肝细胞浆,AST 主要分布在肝细胞浆和肝细胞的线粒体中。因此,不同类型的肝炎患者的 ALT 和 AST 升高的程度及其 AST/ALT 的比值是不一样的。急性肝炎和慢性肝炎,虽有肝细胞的损伤,但肝细胞的线粒体仍保持完整,故释放入血的只有存在于肝细胞浆内的 ALT。所以,肝功能主要表现为 ALT 的升高,故本研究只选用 ALT 作为酶指数。ALT 能敏感地反映肝细胞损伤与否及损伤程度,因为肝脏中 ALT 的浓度比血中高 1 000~5 000 倍,当肝细胞破坏、细胞通透性增高及线粒体损伤时,高浓度 ALT 向血中释放,血清 ALT 活性增强,并且 ALT 活性的高低变化与肝细胞受损的程度相一致^[9-10]。ig 黄芩苷后可明显抑制模型鼠血清 ALT 活性的增强,说明黄芩苷能增强肝细胞抗损伤能力,增加膜结构的稳定性,对肝脏有一定的保护作用。

综上所述,黄芩苷可改善急、慢性肝损伤模型鼠肝组织病理状态,减弱其血清 ALT 活性,增强其肝组织匀浆 ALT 活性,从而起到保护肝脏的作用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:282.
- [2] Wu S, Sun A, Liu R, *et al.* Separation and purification of baicalin and wogonoside from Chinese medicine plant *Scutellaria baicalensis* Georgi by high-speed counter-current chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1 066(1/2):243.
- [3] 初正云, 初明, 滕宇. 黄芩苷体内抗流感病毒作用[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(22):467.
- [4] 汤立建, 赵良才, 李庆林, 等. 黄芩黄酮类成分抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(1):87.
- [5] 文敏, 李雪, 付守廷. 黄芩苷药理作用研究新进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(2):126.
- [6] 陈刚, 李宏波, 邱少敏. CCl₄皮下注射制备大鼠肝纤维化模型的研究[J]. 现代医学, 2010, 38(3):225.
- [7] 严俊, 茹仁萍, 尤琳雅. 18 α 、18 β -甘草酸不同配比物对大鼠 CCl₄急性肝损伤保护作用的研究[J]. 中国中医药科技, 2009, 16(3):184.
- [8] 陈成伟. 药物与中毒性肝病[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2002:136.
- [9] 李学俊, 赖菁, 谢仕斌, 等. 相同肝实质细胞体积分摊的 ALT 或 AST 水平与炎症分级[J]. 中华全科医学, 2010, 8(11):364.
- [10] 梁锦屏, 王琳琳, 周娅. 内毒素致肝损伤小鼠模型相关指标的动态变化[J]. 宁夏医学杂志, 2007, 29(8):1 423.

(收稿日期:2014-01-09 修回日期:2014-02-16)