

栀子油对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用

漆乐媛¹, 张风波², 肖日传², 朱梓豪², 张俊逸², 罗光明²

(1. 南昌县中医院, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学 药学院, 南昌 330004)

摘要: 研究栀子油对酒精所致小鼠急性肝损伤的保护作用。将 72 只小鼠随机分为正常组, 模型组, 栀子油低、中、高剂量组(0.3、0.6、1.2 g/kg) 和阳性对照组(联苯双酯滴丸, 200 mg/kg), 每组 12 只, 正常组和模型组灌胃等量的 0.5% 吐温-80 溶液。采用改良后的造模方法(连续给药 10 d 后灌胃 56% 乙醇, 15 mL/kg, 连续灌胃 2 次) 建立小鼠急性肝损伤模型, 测定小鼠血清中 AST、ALT、 γ -GT 和 TG 水平, 检测肝组织匀浆中 ADH、SOD、MDA、GSH 和 GSH-Px 的含量, RT-PCR 检测肝组织中 TNF- α mRNA 的表达量, HE 染色光学显微镜分析小鼠肝损伤程度。结果表明: 与模型组相比, 栀子油各剂量组均能降低血清 ALT、AST、 γ -GT 和 TG 的含量, 提高 ADH、GSH、GSH-Px、SOD 活性, 降低肝组织 MDA 的产生, 下调 TNF- α mRNA 的相对表达量, 肝组织变性坏死等病理症状明显改善, 尤以栀子油高剂量组效果最佳。栀子油对酒精所致小鼠急性肝损伤有保护作用, 其保护机制可能与增强肝组织脂质代谢水平、提高抗氧化酶体系活力、抑制氧化应激反应及炎症因子表达相关。

关键词: 栀子油; 酒精性肝损伤; 保肝作用; 抗氧化

中图分类号: TS225.1; R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2018)08-0076-05

Protective effect of *Gardenia* oil against alcohol-induced acute hepatic injury in mice

QI Leyuan¹, ZHANG Fengbo², XIAO Richuan², ZHU Zihao²,
ZHANG Junyi², LUO Guangming²

(1. Nanchang County Hospital of TCM, Nanchang 330004, China; 2. School of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

Abstract: The protective effect of *Gardenia* oil against alcohol-induced acute hepatic injury in mice was investigated. Totally 72 mice were randomly divided into normal group, model group, low, medium and high dose group(0.3, 0.6, 1.2 g/kg) and positive control group(bifendate pill, 200 mg/kg), 12 mice in each group, and the normal group and the model group were treated with an equal amount of 0.5% Tween-80 solution. The acute liver injury model was induced by modified method, and the model, positive control and experimental groups were orally administrated 56% alcohol(15 mL/kg) twice at 12 h interval on the tenth day after drugs administration. After 12 h, the mice were sacrificed to contribute blood and liver for biochemical and histological examinations. The results showed that compared with the model group, serum ALT, AST, γ -GT and TG contents reduced, ADH, GSH, GSH-Px and SOD activities

收稿日期: 2017-11-08; 修回日期: 2018-04-22

基金项目: 国家公益性科研专项(201507002)

作者简介: 漆乐媛(1986), 女, 药剂师, 硕士, 研究方向为医院药学(E-mail) 148343749@qq.com。

通信作者: 罗光明, 教授, 博士生导师(E-mail) jzlgm88@163.com。

improved, MDA generation and the relative expression of TNF- α mRNA decreased, and liver tissue degeneration and necrosis and other pathological symptoms improved significantly in each *Gardenia* oil dose group especially in the high dose group. The *Gardenia* oil had the protec-

tive effect against alcohol - induced acute hepatic injury which might be depended on the enhancement of lipid metabolism level of liver tissue, improvement of the antioxidant enzyme system activity, inhibition of oxidative stress and reduction of inflammation factors expression.

Key words: *Gardenia* oil; alcohol - induced liver injury; hepatoprotective effect; antioxidation

随着我国经济的发展、生活水平的提高,酒精在人们生活中的消耗逐年增大,酒精性肝损伤也逐渐成了导致肝脏受损的一个主要病因,发病率仅次于病毒性肝病^[1]。酒精经口进入体内被消化道吸收,近90%的酒精会被送到肝脏进行代谢,然而长期大量或一次性过量饮酒,肝脏的P450酶系统会产生过多的中间产物乙醛,激活肝脏内的Kupffer细胞,最终导致肝细胞凋亡^[2]。目前临床上对酒精性肝病常用治疗药物有水飞蓟、联苯双酯滴丸和多烯磷脂酰胆碱等,这些药物对人体的副作用较大。因此,开发一种新的高效保肝药物成为当今医学领域的研究热点。

栀子来源于茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实^[3],性苦、味寒,具有泻火除烦、凉血解毒的功效,主要含有环烯醚萜类、有机酸类和栀子黄色素等成分^[4-5]。目前国内外对栀子保肝作用的研究主要是针对环烯醚萜类成分,暂未有对栀子油进行保肝作用的研究。本实验以栀子油为供试药物,建立急性酒精性肝损伤动物模型,研究栀子油对急性酒精性肝损伤的保护机制,为临床防治肝病的新药研发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF级昆明雄性小鼠,体重16~20g,共72只,由山东省实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(鲁)20140007。于江西中医药大学实验大楼动物房饲养,自由进食进水,适应3d,动物房温度23~27℃,湿度35%~55%。

1.1.2 药品与试剂

栀子,购于江西省九江市湖口县顺昌栀子药材基地,经江西中医药大学中药资源学科罗光明教授鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实;丙氨酸氨基转移酶(ALT,批号:20161217)、天门冬氨酸转移酶(AST,批号:20161217)、 γ -谷氨酰转移酶(γ -GT,批号:20161218)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,批号:20161218)、乙醇脱氢酶(ADH,批号:20161217)、还原型谷胱甘肽(GSH,批号:20161211)、超氧化物歧

化酶(SOD,批号:20161218)和丙二醛(MDA,批号:20161217)试剂盒,均购于南京建成生物工程研究所。苏木素-伊红染液(批号:20161224,南京建成生物工程研究所),联苯双酯滴丸(浙江万邦药业股份有限公司,生产批号:160605,每丸1.5mg);56度二锅头,由北京红星酒业有限公司提供。

动物组织总RNA提取试剂盒,天根生物科技(北京)有限公司,生产批号:P4805;反转录试剂盒,普洛麦格生物技术有限公司(USA),生产批号:ADA5000 00002284267;内参GAPDH和TNF- α 引物,合成于捷瑞生物科技工程有限公司(上海),引物具体序列见表1。

表1 RT-PCR引物序列

基因	上游引物序列	下游引物序列	基因片段长度/bp
GAPDH	5' - GAG. GGG. CCA. TTC. ACA. CTC. TTC -3'	5' - CAT. CAC. CAT. CTT. CCA. GGA. GCC -3'	357
TNF- α	5' - GGC. AGG. TCT. ACT. TTG. GAG. TCA. TTT. GTG. AAT. TCG. C -3'	5' - ACA. TTC. GAG. GCT. CCA. GTG. AAT. TCG. G -3'	300

1.1.3 仪器与设备

DY89-II电动匀浆机,新芝生物科技股份有限公司(宁波);UV-1800型紫外可见分光光度计,岛津公司(日本);MULTISKAN GO酶标仪,赛默飞世尔科技公司(上海);Allegra64R高速冷冻离心机,Beckman公司(USA);凝胶成像仪,BIO-RAD公司(美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 供试药物的提取

取干燥后的栀子药材,经打粉机粉碎后,过20目筛,加5倍量的石油醚试剂,85℃索氏提取3h,提取结束后旋蒸回收石油醚,得栀子油,称重,4℃冰箱保存备用。

1.2.2 实验分组及给药

将72只昆明小鼠随机分为6组,每组12只,分别为正常组、酒精肝损伤模型组、阳性对照组(联苯双酯滴丸,200mg/kg),低剂量栀子油给药组(0.3

g/kg)、中剂量栀子油给药组(0.6 g/kg)、高剂量栀子油给药组(1.2 g/kg),栀子油给药剂量在提取率及药典栀子生药推荐摄入量的基础上得到。

1.2.3 急性酒精性肝损伤改良模型建立

小鼠适应性饲养 3 d 后开始给药,剂量见 1.2.2,正常组和模型组小鼠给予灌胃 0.5% 吐温-80 溶液,其他各组小鼠灌胃相应的药物,连续给药 10 d;末次给药 2 h 后,除正常组给予蒸馏水外,其余各组小鼠均灌胃白酒(15 mL/kg),连续灌胃 2 次,2 次相隔 12 h。

1.2.4 指标检测

末次灌胃白酒后,禁食不禁水 12 h 后摘眼球取血同时取肝组织。全血 3 000 r/min 离心 10 min,取上层血清,检测 ALT、AST、 γ -GT、TG 各项指标;取 0.1 g 肝脏组织,加 9 倍冰生理盐水,制成 10% 的肝匀浆,离心,取上清液,检测 ADH、SOD、MDA、GSH、GSH-Px 各项生化指标,各指标的检测均按其试剂盒说明书进行操作;采用 RT-PCR 检测小鼠肝脏组织中 TNF- α mRNA 的表达水平;取小鼠相同部位肝组织,用动物组织总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,以 GAPDH 作为参照基因进行扩增,检测肝组织中 TNF- α mRNA 的表达水

平。实验操作步骤均按试剂盒说明书进行。引物序列见表 1。

1.2.5 肝组织病理学分析

取各组小鼠肝脏相同部位的肝组织,用 10% 甲醛溶液固定,之后进行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片展片、HE 染色,最后置光镜下观察肝组织的损伤程度。

1.2.6 数据分析

数据均以“均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示($n = 12$),采用数据分析软件 Graph Pad Prism5 进行单因素方差分析,组间差异采用均数两两比较, $p < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 生理状况

给药周期内正常组小鼠毛发光亮,精神状态正常、饮食及饮水量未见异常;模型组小鼠灌胃白酒后出现行动摇摆、嗜睡等症状,饮水及饮食量明显减少;栀子油各剂量组对造模小鼠运动情况、饮水进食、睡眠及毛发等状况均具有不同程度的改善。

2.2 栀子油对急性酒精性肝损伤小鼠血清 ALT、AST、 γ -GT 和 TG 水平的影响(见表 2)

表 2 栀子油对小鼠血清 ALT、AST、 γ -GT 和 TG 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	γ -GT/(U/L)	TG/(mmol/L)
正常组	15.75 \pm 7.39	13.06 \pm 4.74	12.22 \pm 0.75	0.925 \pm 0.077
模型组	114.40 \pm 28.51 ^{△△△}	65.13 \pm 30.99 ^{△△△}	14.13 \pm 0.84 ^{△△△}	1.827 \pm 0.592 ^{△△△}
阳性对照组	32.51 \pm 9.95 ^{***}	23.91 \pm 4.25 ^{***}	12.31 \pm 1.22 ^{**}	0.984 \pm 0.173 ^{***}
栀子油低剂量组	92.49 \pm 16.69 [*]	41.59 \pm 10.88 [*]	12.46 \pm 0.75 ^{**}	1.007 \pm 0.144 ^{***}
栀子油中剂量组	73.23 \pm 14.52 ^{***}	35.56 \pm 9.71 ^{**}	12.55 \pm 0.56 ^{**}	1.050 \pm 0.230 ^{***}
栀子油高剂量组	38.34 \pm 8.86 ^{***}	31.88 \pm 8.00 ^{**}	12.48 \pm 0.85 ^{**}	1.006 \pm 0.134 ^{***}

注:与正常组比较,△ $p < 0.05$,△△ $p < 0.01$,△△△ $p < 0.001$;与模型组比较,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$ 。下同。

由表 2 可知,与正常组相比,模型组小鼠血清 ALT、AST 及 γ -GT、TG 水平极显著高于正常组($p < 0.001$),表明急性酒精性肝损伤模型造模成功;与模型组相比,栀子油低剂量组小鼠血清中 ALT、AST 水平均显著降低,具有显著性差异($p < 0.05$),中、高剂量组则具有极显著或非常显著性差

异($p < 0.001, p < 0.01$);与模型组相比,栀子油各剂量组 γ -GT 水平($p < 0.01$)和 TG 水平($p < 0.001$)也极显著降低,且呈现出一定范围内的剂量依赖规律。

2.3 栀子油对急性酒精性肝损伤小鼠肝组织 ADH、SOD、MDA、GSH、GSH-Px 水平的影响(见表 3)

表 3 栀子油对小鼠肝组织 ADH、SOD、MDA、GSH、GSH-Px 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	ADH/(U/mg)	SOD/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)	GSH/(mg/g)	GSH-Px/(mg/g)
正常组	57.81 \pm 11.73	40.21 \pm 2.37	4.46 \pm 0.76	158.8 \pm 32.8	369.2 \pm 20.8
模型组	22.01 \pm 7.88 ^{△△△}	20.38 \pm 3.59 ^{△△△}	20.94 \pm 3.22 ^{△△△}	59.3 \pm 20.4 ^{△△△}	233.4 \pm 49.9 ^{△△△}
阳性对照组	45.58 \pm 16.11 ^{***}	33.16 \pm 4.05 ^{***}	12.66 \pm 2.54 ^{***}	121.5 \pm 33.6 ^{**}	312.2 \pm 39.0 ^{***}
栀子油低剂量组	32.68 \pm 6.87	23.49 \pm 7.99	15.66 \pm 4.39 [*]	71.3 \pm 21.0	272.2 \pm 12.3
栀子油中剂量组	38.22 \pm 3.93 [*]	28.25 \pm 5.54 [*]	14.64 \pm 2.42 [*]	113.4 \pm 23.4 [*]	308.3 \pm 53.5 ^{**}
栀子油高剂量组	42.73 \pm 9.45 ^{**}	32.13 \pm 2.65 ^{***}	12.67 \pm 3.90 ^{***}	116.4 \pm 21.5 ^{**}	325.7 \pm 13.2 ^{***}

由表3可知,相比正常组,模型组小鼠产生了极显著的氧化还原反应,其肝组织中ADH、SOD、GSH、GSH-Px水平均极显著下降($p < 0.001$),MDA水平极显著上升($p < 0.001$);与模型组相比,梔子油低、中剂量组MDA水平具有显著性降低($p < 0.05$),高剂量组MDA水平极显著性降低($p < 0.001$),梔子油中剂量组ADH、SOD、GSH水平均具有显著性升高($p < 0.05$),中剂量组GSH-Px水平具有非常显著性升高($p < 0.01$),高剂量组ADH、GSH水平非常显著性升高($p < 0.01$),高剂量组SOD、GSH-Px水平具有极显著性升高,改善程度明显与剂量成正比依赖性。

2.4 梔子油对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏组织TNF- α mRNA表达的影响(见表4)

由表4可知,RT-PCR检测结果显示,与正常组相比,急性酒精性肝损伤模型组小鼠肝脏组织TNF- α mRNA的相对表达量发生极显著性增高($p < 0.001$),差异有统计学意义;与模型组比较,阳

性对照组小鼠肝组织中TNF- α mRNA的相对表达量极显著性降低($p < 0.001$);梔子油低、中剂量组小鼠肝组织中TNF- α mRNA的相对表达量均显著性降低($p < 0.05$),梔子油高剂量组则极显著性降低($p < 0.001$),差异均具有统计学意义。

表4 各组小鼠肝组织TNF- α mRNA相对表达量(吸光度)的比较

组别	相对表达量(吸光度)
正常组	0.037 99 \pm 0.011 80
模型组	0.153 90 \pm 0.015 19 ^{△△△}
阳性对照组	0.049 28 \pm 0.007 87 ^{***}
梔子油低剂量组	0.131 10 \pm 0.007 77 [*]
梔子油中剂量组	0.117 51 \pm 0.013 99 [*]
梔子油高剂量组	0.059 24 \pm 0.008 13 ^{***}

2.5 肝脏病理学检查

取小鼠肝脏相同部位进行甲醛固定,石蜡包埋,HE染色,置于光镜下观察肝组织的损伤程度,结果见图1。

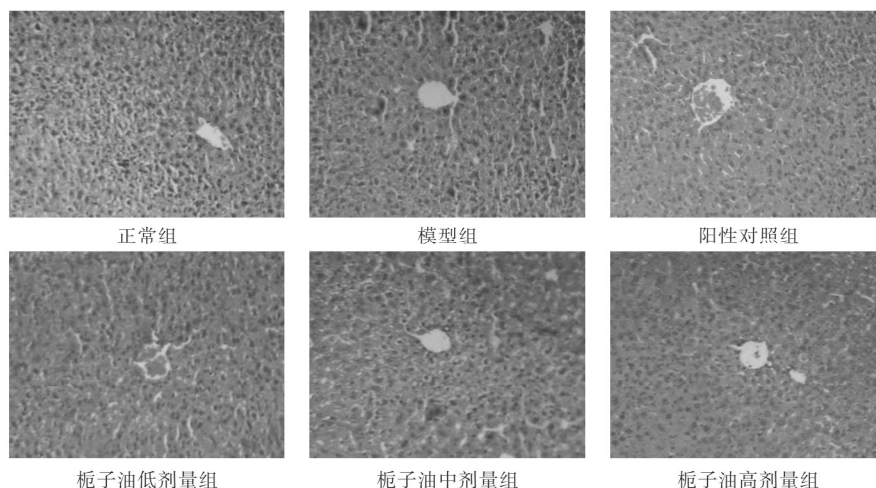


图1 梔子油对酒精致小鼠急性肝损伤的肝组织病理组织学的影响(HE, $\times 40$)

由图1可见,正常组小鼠肝小叶细胞明显呈以中央静脉为中心放射状排列,整体未见明显病变;模型组中央静脉现肝细胞肿胀,肝小叶间静脉出现紊乱,同时还具有水样变性、部分肝细胞脂肪变性等状况,同时发现部分汇管区周边充血有大量炎细胞弥散,表示模型成功;与模型组比较,梔子油各剂量组的病理状况明显改善,肝细胞出现明显再生,组织结构趋于完整,但部分肝组织仍然存在一定程度的紊乱、水样变性、坏死。

3 讨论

肝脏作为五大脏腑之一,是身体内最大的解毒排毒器官,肝脏是否代谢正常与机体健康关系密切。人体摄入的酒精90%以上经肝脏进行分解,过量乙

醇的代谢会导致肝细胞细胞器结构的破坏,进而细胞质及细胞器内的AST和ALT大量释放到血清中,血清中ALT和AST水平会明显升高^[6]。TG在肝细胞内质网上合成,当肝细胞失衡时,脂蛋白的合成将不受抑制,大量的TG会导致脂肪运输阻断,进而在细胞内形成脂滴^[7]。 γ -GT水平的上升是反映酒精致肝脏受损的重要因素,该指标能用来准确区分非酒精性肝病^[8-9]。ADH是肝细胞中分解酒精的关键代谢酶,其活性的提高有助于促进酒精代谢,减轻酒精对肝组织的毒害作用^[10-11]。SOD、GSH-Px是机体抗氧化体系的两种主要酶,能高效地清除各种活性氧自由基,切断自由基的链式反应,当这些酶活性降低时,会引起自由基的积累,细胞氧化与抗氧

化的失衡,进而破坏细胞器的功能和细胞膜的完整性,最终导致整个肝脏损伤^[12]。还原性谷胱甘肽(GSH)是一种小分子肽,为肝细胞非酶体系中重要的还原产物,能够快速清除细胞内的自由基,进行抗脂质过氧化作用,所以其消耗程度也反映了肝损伤的程度^[13-14]。MDA是体内脂质被自由基攻击所产生的脂质过氧化最终代谢产物,MDA量的改变间接反映细胞脂质过氧化的程度,是常用的细胞损伤程度的指标^[15]。大量乙醇的分解也会刺激肝细胞的免疫系统,激活肝脏的巨噬细胞即枯否氏细胞,活化状态的枯否氏细胞迅速激活NF- κ B等转录调节因子,产生大量TNF- α 、IL-1 β 、IL-18等炎症因子,加重肝组织的炎性浸润及损伤,最终导致肝脏炎症发生及肝细胞坏死凋亡^[16-17]。

4 结论

本研究以栀子药材为原料,经提取、纯化得到栀子油药物,成功建立急性酒精性小鼠肝损伤模型。结果表明,栀子油各剂量组与模型组比较,均能降低小鼠血清中AST、ALT、 γ -GT和TG水平,提高肝组织中ADH、SOD、GSH和GSH-Px活性,减少MDA的生成,下调肝组织TNF- α mRNA表达,且呈剂量依赖性,对肝组织损伤的程度有明显改善,与模型组比较有显著统计学意义。肝脏病理学检查结果表明栀子油给药可以明显改善肝细胞结构紊乱、脂肪变性、坏死等组织病理学损伤。说明栀子油在急性酒精性肝损伤保护方面具有良好的效果,尤其在阻止肝细胞受损,增强肝细胞再生及促进肝组织功能恢复等方面具有显著疗效。

综上所述,经口服一定剂量的栀子油药物可以显著改善小鼠急性酒精性肝损伤程度,其作用机制可能与增强肝组织脂质代谢水平,提高抗氧化酶体系活力,抑制氧化应激反应及炎症因子表达相关。

参考文献:

- [1] 邱萍,李相,孔德松,等. 酒精性肝病发病机制研究的新进展[J]. 中国药理学通报,2014,30(2):160-163.
- [2] 赵洁,雷金艳. 酒精性肝病的研究进展[J]. 北京中医药,2009,28(11):907-908.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:248.
- [4] 孟祥乐,李红伟,李颜,等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(11):959-967.
- [5] 唐娜娜,张静. 药用栀子化学成分研究[J]. 中国药师,2014,17(3):381-383.
- [6] 吴伟青,陈静,刘超群,等. 绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学,2011,32(13):310-313.
- [7] 钟卫卫,林世德. 内质网应激与肝损伤研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2010,18(10):1021-1025.
- [8] 刘亮亮,刘万顺,韩宝芹,等. 壳寡糖、氨基葡萄糖对酒精性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2010,40(7):73-76.
- [9] 邢佳,陆文娟,赵云霞,等. 石榴叶多酚对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学,2015,36(21):253-257.
- [10] 李静,张朝辉,段筱杉,等. 大叶藻黄酮对酒精性肝损伤的保护作用[J]. 水产学报,2016,40(5):799-806.
- [11] 宋宇. 生物体内乙醇脱氢酶(ADH)的活力测定、分布及其与乙醇代谢动力学的关系[D]. 成都:四川大学,2007.
- [12] FLORA G J, SETH P K. Beneficial effects of S-adenosyl-L-methionine on aminolevulinic acid dehydratase, glutathione, and lipid peroxidation during acute lead-ethanol administration in mice[J]. Alcohol, 1999, 18(2/3):103-108.
- [13] MISHRA A, PAUL S, SWARNAKAR S. Down regulation of matrix metalloproteinase-9 by melatonin during prevention of alcohol-induced liver injury in mice[J]. Biochimie, 2011, 93(5):854-866.
- [14] 赵云霞,陶明焯,陆文娟,等. 鸡枞菌多糖对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 食品科学,2014,35(19):260-265.
- [15] DAI T, WU Y, LENG A S, et al. RXR α -regulated liver SAME and GSH levels influence susceptibility to alcohol-induced hepatotoxicity[J]. Exp Mol Pathol, 2003, 75(3):194-200.
- [16] ZIMMERMAN S B, TRACH S O. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*[J]. J Mol Biol, 1991, 222(3):599-620.
- [17] BAEUERLE P A. The inducible transcription factor NF- κ B: regulation by distinct protein subunit[J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1072(1):63-80.