

水飞蓟宾和卡托普利联合用药对大鼠酒精性肝病作用及机制的研究

李光明 李万平 李晓冰 张红 李华 李茂

摘要 目的 观察水飞蓟宾和卡托普利联合用药对酒精性肝病作用及其机制。方法 取健康的雄性SD大鼠60只,随机选取12只作为正常组,其余48只大鼠作为造模组,造模组采用35%、40%、45%、50%的酒精每周递增法分两次灌胃。造模6周,病检有脂肪肝形成,将造模组随机分为4组:模型组、卡托普利组、水飞蓟宾、卡托普利和水飞蓟宾联合用药组,每组12只,于两次灌胃酒精的间隙给药。连续给药6周后,腹主动脉取血,制备肝匀浆、肝脏病理切片。检测大鼠血浆中天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、肝匀浆中核转录因子-κB(NF-κB)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平。结果 模型组AST、ALT、LDL-C、

NF-κB、TNF-α均显著升高,HDL-C降低($P < 0.05$);卡托普利和水飞蓟宾联合用药能降低大鼠血浆中ALT、AST、LDL-C、NF-κB、TNF-α的含量($P < 0.05$),升高血浆中HDL-C的含量($P < 0.05$);肝切片检查显示,正常组大鼠肝细胞形态正常,肝血窦及门管区清晰,模型组大鼠肝细胞肿大,排列紊乱伴有炎细胞浸润,大部分肝细胞发生脂肪变性,联合用药组只有少量肝细胞发生脂肪变性,且大多数肝细胞排列比较正常,细胞水肿较少,炎细胞浸润较低。结论 卡托普利和水飞蓟宾联合用药对酒精性肝病大鼠有显著的治疗作用,其机制可能与降低NF-κB、TNF-α的水平有关。

关键词 水飞蓟宾;卡托普利;酒精性肝病

中图分类号 R 96

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2019)02 - 0276 - 05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2019.02.023

2018 - 09 - 27 接收

基金项目:四川省科技厅应用基础研究计划项目(编号:14JC0149)

作者单位:西南医科大学药学院药理教研室 泸州 646000

作者简介:李光明,男,硕士研究生;

李万平,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 675832860@qq.com

酒精性肝病(alcoholic liver disease,ALD)是由于长期饮酒所致的肝脏疾病,主要有3种类型:酒精性脂肪肝、急性酒精性肝炎和酒精性肝硬化。研究^[1]表明,长期大量饮酒,使肝细胞反复发生脂肪

Influence of Jiawei Xiaoyaosan on hepatoma cell apoptosis and calcium

Wang Kun ,Wang Yaoyao ,Yang Mao ,et al

(Dept of Pathology ,The First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine ,Guiyang 550001)

Abstract Objective To probe the inhibitory effect of human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721 and the influence of intracellular free Ca^{2+} levels induced by Jiawei Xiaoyaosan , so as to reveal the pathogenesis of Chinese medicine treatment of liver cancer. **Methods** Determined by MTT method was used to determine the high ,medium and low dose Jiawei Xiaoyaosan for liver cancer SMMC -7721 cell growth inhibition. The rate of apoptosis of liver cancer SMMC-7721 cell were examined by flow cytometry. The fluorescent intensity of intracellular free Ca^{2+} was observed by laser scanning confocal microscopy. **Results** Jiawei Xiaoyaosan had an inhibitory effect on the growth of liver cancer SMMC-7721 cells , and the inhibition rate increased with the increase of drug concentration. The apoptotic rate of Jiawei Xiaoyaosan was 0.276 in the high ρ . 0.202 in the medium and 0.096 in the low dose groups. When adding different doses of Jiawei Xiaoyaosan , the fluorescence intensity of calcium ions was different. The fluorescence enhancement was not obvious at low and medium doses , while the intracellular fluorescence intensity was significantly enhanced at high doses. **Conclusion** Jiawei Xiaoyaosan can inhibit the proliferation of cancer cells and promote their apoptosis , and can cause changes in intracellular Ca^{2+} at the same time. This may be one of the mechanisms of Jiawei Xiaoyaosan to induce apoptosis of liver cancer SMMC-7721 cells.

Key words Jiawei Xiaoyaosan;hepatoma SMMC-7721 cell;cell growth inhibition rate;apoptosis;intracellular free Ca^{2+}

变性、坏死和再生,最终引起 ALD。其发病机制可能与乙醇及其代谢产物对肝脏的炎症毒性作用、氧应激、免疫介导和细胞因子、细胞凋亡等有关^[2]。乙醇在体内氧化及其代谢产物,引起细胞免疫应答,导致细胞和组织的损伤,诱导炎症细胞因子的表达,如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)^[3],导致肝脏损害,促使核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)的分泌^[4],从而加重了炎症反应,氧化过程产生的活性氧促发氧化应激,加重酒精性肝病^[5]。

水飞蓟宾已经成为临床治疗肝病的常用药物之一^[6],是经典的治疗肝损害药物。目前,国内外也很少报道卡托普利用于肝病的治疗,卡托普利与水飞蓟宾联合用于酒精性肝病也未见报道。该研究采用食用酒精灌胃 SD 大鼠并建立酒精性肝病大鼠模型,旨在观察卡托普利和水飞蓟宾联合用药对大鼠酒精性肝病的治疗作用^[7]。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 60 只, SPF 级, 体质量 120 ~ 150 g, 由西南医科大学动物实验中心提供。

1.2 试剂、药品及仪器 食用级酒精(纯度为 95%, 批号:2017022801)购自吉林省新天龙实业股份有限公司, 临用时配成所需浓度;卡托普利片(批号:160619)购自国药集团汕头金石制药有限公司;水飞蓟宾胶囊(批号:650709130)购自天津天力士特制药股份公司;大鼠 NF- κ B 酶联免疫反应试剂盒(批号:201705)购自北京安迪华泰生物科技有限公司;大鼠 TNF- α 酶联免疫反应试剂盒(批号:201705)购自北京安迪华泰生物科技有限公司;西门子 ADVIA2400 全自动生化分析仪(型号 ADVIA2400)购自德国西门子有限公司;电热恒温水槽(型号 CU-600)购自上海齐欣科学仪器有限公司;全自动酶标仪(型号 ELX808)购自美国伯腾仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 模型的建立及给药 将健康 SD 雄性大鼠 60 只在实验动物房适应地饲养 1 周,期间自由饮食、饮水。结束后,随机选取 12 只作为正常组,其余 48 只大鼠作为造模组,造模组采用 35%、40%、45%、50% 的酒精每周递增按 [1.5 ml/(100 g · d)] 分两次灌胃法复制。期间,正常组给予相似的处理,灌胃纯净水。造模 6 周后,将造模组随机分为 4 组,

每组 12 只,即模型组、卡托普利组(KT 组)、水飞蓟宾组(SF 组)、卡托普利和水飞蓟宾联合用药组(KT + SF 组)。给药剂量按成人和大鼠体表面积等效剂量折算,持续 6 周,病理证实脂肪肝形成。第 7 周开始,造模组在两次灌胃酒精的间隙,模型组灌胃纯净水 [1.5 ml/(100 g · d)],KT [1.35 mg/(100 g · d)],SF [3.78 mg/(100 g · d)],KT + SF [1.35 mg/(100 g · d) + 3.78 mg/(100 g · d)],正常组给予相同剂量的纯净水处理,连续灌胃 6 周。

1.3.2 样品的采集与处理 末次灌胃后,禁食不禁水 12 h,1% 戊巴比妥钠 0.4 ml/kg 腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,分离血清备用。10% 的肝匀浆制备:处于麻醉状态的大鼠,迅速摘取肝脏左叶在预冷的 0.9% 生理盐水中漂洗数次,滤纸吸干秤全部肝重,再称取 0.2 g 左右的组织,充分研碎制成 10% 肝组织匀浆 2 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-20 °C 冰箱备用。取肝右叶,10% 甲醛溶液固定,脱水、石蜡包埋、切片厚度 5 mm,苏木精-伊红(HE)染色,放置于 200 倍光镜下,分析其病理学变化并拍照。实验过程中,有 5 只大鼠死亡,每组以 10 只作为样本采集。

1.3.3 指标检测方法

1.3.3.1 全自动生化分析仪检测 西门子 ADVIA2400 全自动生化分析仪检测天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol,HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)的含量。

1.3.3.2 ELISA 法 ELISA 法检测肝匀浆 TNF- α 、NF- κ B 水平。实验方法按试剂盒说明操作。

1.3.3.3 HE 染色法 HE 染色后观察肝脏组织病理切片。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较进行正态性、方差齐性检验,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血生化指标

2.1.1 ALT 由图 1 可见,与正常组比较,模型组、卡托普利组、水飞蓟宾组、联合用药组 ALT 明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,卡托普利组、水飞蓟宾组、联合用药组 ALT 明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

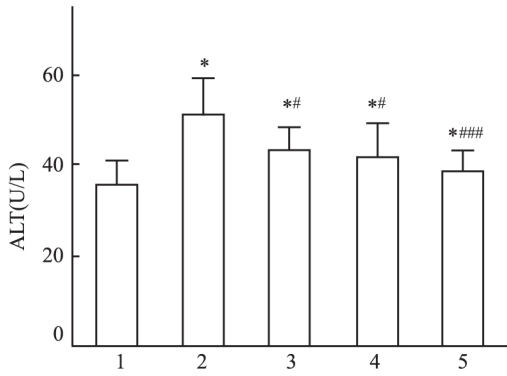


图1 各组大鼠血清 ALT 含量

1: 正常组; 2: 模型组; 3: KT 组; 4: SF 组; 5: KT + SF 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

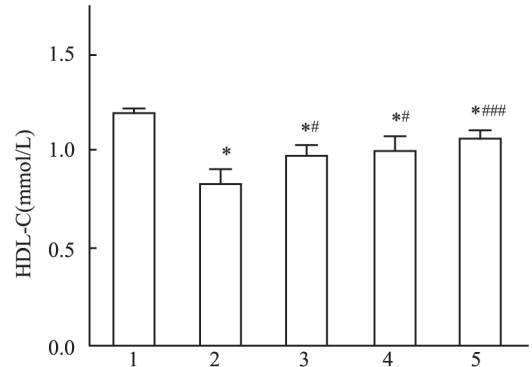


图3 各组大鼠血清 HDL-C 含量

1: 正常组; 2: 模型组; 3: KT 组; 4: SF 组; 5: KT + SF 组; 与正常组相比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

2.1.2 AST 由图2可见,与正常组比较,模型组、卡托普利组、水飞蓟宾组、联合用药组 AST 明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,卡托普利组、水飞蓟宾组、联合用药组 AST 明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

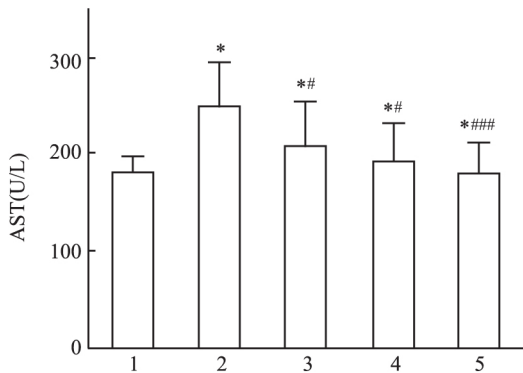


图2 各组大鼠血清 AST 含量

1: 正常组; 2: 模型组; 3: KT 组; 4: SF 组; 5: KT + SF 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

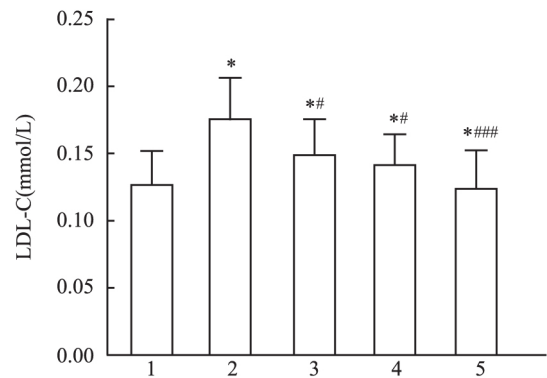


图4 各组大鼠血清 LDL-C 含量

1: 正常组; 2: 模型组; 3: KT 组; 4: SF 组; 5: KT + SF 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

2.1.3 HDL-C 由图3可见,与正常组比较,模型组、卡托普利组、水飞蓟宾组、联合用药组 HDL-C 明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,卡托普利组、水飞蓟宾组、联合用药组 HDL-C 明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.1.4 LDL-C 由图4可见,与正常组比较,模型组、卡托普利组、水飞蓟宾组、联合用药组 LDL-C 明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与正常组比较,卡托普利组、水飞蓟宾组、联合用药组 LDL-C 明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 NF- κ B、TNF- α 由图5可见,与正常组比较,模型组、卡托普利组、水飞蓟宾组、联合用药组 NF- κ B、TNF- α 明显增加,差异有统计学意义($P <$

0.05);与模型组比较,卡托普利组、水飞蓟宾组、联合用药组 NF- κ B、TNF- α 明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 肝脏病理切片 光镜下观察:正常组大鼠肝细胞形态正常,肝血窦及门管区清晰,肝小叶呈发散状向四周整齐排列,包浆均匀,未见变性及坏死;模型组大鼠肝细胞肿大,排列散乱,汇管区内有纤维组织增生,伴有炎细胞浸润,大部分肝细胞发生脂肪变,以气球样肝细胞水样变性为主,有大小不一的脂滴空泡,将细胞核挤压在一边,胞质疏松,呈网状半透明;KT组大鼠肝细胞轻微肿大,排列稍紊乱,脂肪变性及细胞水肿不明显,有少量炎细胞浸润,肝索呈放射状,围绕在中央静脉周围,包浆较为紧密,脂滴空泡数量明显减少,主要为小脂滴;SF组以及KT+SF组与KT组相似。见图6。

3 讨论

少量饮酒对肝脏的损伤,可以自行恢复,如果长

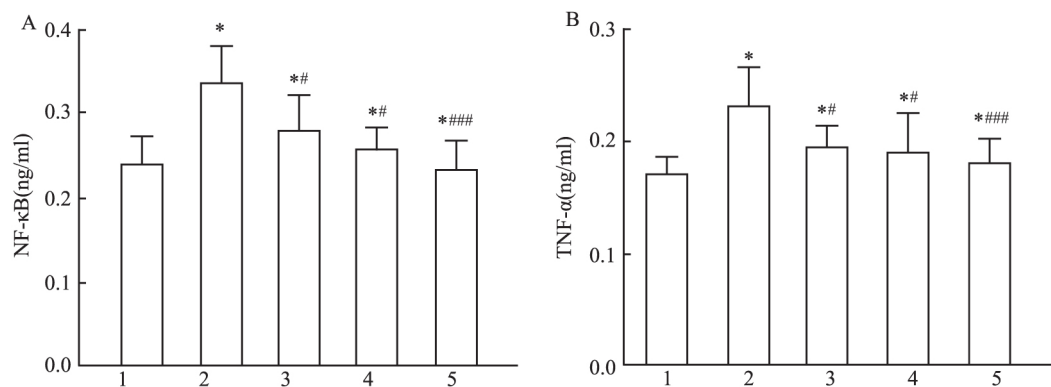


图5 各组大鼠肝组织 NF-κB、TNF-α 表达

A: NF-κB; B: TNF-α; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: KT 组; 4: SF 组; 5: KT + SF 组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

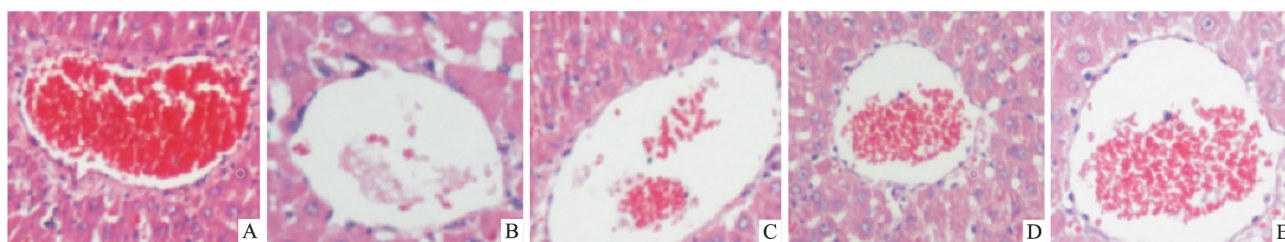


图6 各组大鼠肝脏病理学变化 HE × 200

A: 正常组; B: 模型组; C: KT 组; D: SF 组; E: KT + SF 组

期大量高度数饮酒且达到一定极值,有可能会增加肝脏损害风险。为了模拟酒精性肝病模型,本研究采用了目前广泛应用的逐渐增加酒精浓度的灌胃的方法造模。实验结果显示,与正常组比较,模型组血清中 ALT、AST、LDL-C,肝匀浆中 NF-κB、TNF-α 的含量显著升高,血浆中 HDL-C 的含量显著降低,且模型组肝脏病理切片也呈现出典型肝病症状,说明实验造模成功,为实验的展开提供了证据。研究^[8]表明, HDL-C、LDL-C 可以衡量胆固醇的运载能力, LDL-C 与血清的总胆固醇水平呈正相关性,其主要作用是将肝脏的胆固醇转运到肝外组织细胞。当浓度升高时,易沉积于血管的动脉壁内,形成动脉粥样硬化斑块,阻塞相应的血管。HDL-C 与总胆固醇含量呈负相关性,主要作用是将肝外的胆固醇逆向转运,进入肝细胞降解,并进行分解反应,成为胆酸盐。两者的量反应肝脏的功能。实验显示,与模型组比较,联合用药组 HDL-C 显著增加, LDL-C 显著降低,说明联合用药可能通过调节 HDL-C、LDL-C 的含量,减弱酒精对肝脏的损伤。

AST 和 ALT 是肝细胞内的重要功能酶,属于肝功能的检测首选指标。AST 主要存在于心肌中,其次是肝脏线粒体内。在正常情况下,ALT、AST 在血

清中含量很低,当肝细胞受损时,肝细胞膜通透性增高,细胞质中的 ALT 与 AST 释放进入血浆中,在肝细胞损伤的患者体内,ALT、AST 的变化反映疾病进展,检查血清中 ALT、AST 作为临床诊疗的依据。通过 AST 与 ALT 对比显示:用药组的各组大鼠血清中 ALT、AST 的量比模型组低,且与模型组比较,联合用药组 ALT、AST 显著降低,推测卡托普利和水飞蓟宾联合用药可能通过调节 ALT、AST 来保护酒精对肝脏的损伤,其机制可能是对肝细胞膜的功能恢复有改善作用。

在 ALD 中乙醇破坏了肠道黏膜屏障,同时抑制了 Kupffer 细胞的吞噬的功能^[9], Kupffer 细胞对内毒素的清除减少,最终导致肠源性内毒素血症。同时, LPS、细胞因子作用于细胞时,可诱发 IκB 家族成员的顺序磷酸化和泛素化, IκB 降解并从 NF-κB 上解离下来,暴露 NF-κB 的核定位信号,使 NF-κB 通过核孔进入细胞核,并与特定基因的 κB 位点结合,激活靶基因转录,从而参与细胞分化、发育、凋亡、黏附及炎症反应;加重肝脏细胞的损伤,引起肝脏组织脂肪变性、炎症反应、纤维化,甚至坏死和凋亡。在凋亡方面,在肝炎时, TNF-α 的表达导致肝细胞的凋亡。TNF-α 的变化是肝脏损伤最早发生的活

动之一,在正常情况下,肝脏产生少量 TNF- α ,但在发生 ALD 时,血液中 TNF- α 水平显著上升。TNF- α 通过多种途径诱导细胞凋亡, TNF- α 与受体结合,最终导致 caspase3 活化,使肝细胞凋亡。另一方面, TNF- α 能激活 NF- κ B 信号通路,进而增加炎症因子活性,导致炎症因子 IL-1 等的合成,诱导 IL-6 合成,进一步加重肝脏炎症反应。本实验显示,各用药组大鼠的 TNF- α 、NF- κ B 显著降低,可能是药物减弱了乙醇在体内代谢所引发的炎症反应,减少了酒精对肝脏的损伤。

参考文献

[1] 贾艳,付怡静,刘晓阳等.我国酒精性脂肪肝的研究进展[J].胃肠病学和肝病杂志 2014 23(4):376-9.
 [2] 刘玮,钱善军,黄平.虎杖对大鼠酒精性脂肪肝的作用及机制[J].中成药 2018 40(1):184-6.
 [3] 张巧红,徐艳玲,杨靖华.鞣花酸对酒精性脂肪肝大鼠肝损伤

的保护作用及对 TNF- α 、Leptin 的影响[J].中成药 2016 38(8):1821-4.
 [4] Szuster-ciesielska A, Mizerska-dudka M, Daniluk J, et al. Butein inhibits ethanol-induced activation of liver stellate cells through TGF- β , NF- κ B, p38, and JNK signaling pathways and inhibition of oxidative stress[J]. J Gastroenterol 2013 48(2):222-37.
 [5] 曹智丽,周俊英,王娟等.过氧化物酶体增殖物激活受体在酒精性肝病中的作用[J].中国老年学杂志 2017 37(21):5481-4.
 [6] 邵爽,刘春燕,高沿航等.水飞蓟宾治疗药物性肝损伤的研究进展[J].临床肝胆病杂志 2017 33(6):1179-82.
 [7] 何明.护肝宁片联合水飞蓟宾治疗非酒精性脂肪肝病疗效分析[J].中国实用医药 2012 17(17):176-7.
 [8] 吴燕丹. TC/HDL-C、LDL-C/HDL-C、TG/HDL-C 与冠心病不同程度相关性[J].临床误诊误治 2014 27(6):64-7.
 [9] 高学梅,洪汝涛,李俊等.水飞蓟宾抑制大鼠酒精性脂肪肝库普弗细胞 NF- κ B 活性的研究[J].安徽医科大学学报 2014, 49(9):1242-5.

Study on the effect and mechanism of combined use of silybin and captopril on alcoholic liver disease in rats

Li Guangming, Li Wanping, Li Xiaobing, et al
 (Pharmacology Teaching and Research Section of Pharmaceutical College,
 Southwest Medical University, Luzhou 646000)

Abstract Objective To observe the effect of combined use of silybin and captopril on alcohol-induced liver disease and its mechanism. **Methods** A total of 60 healthy male SD rats were randomly selected as the normal group and the remaining 48 rats were used as the modeling group. The model was made up of 35%, 40%, 45%, 50% alcohol by weekly increment method. The method was administered twice. 6 weeks of modeling, pathological examination showed fatty liver formation. The model group was randomly divided into 4 groups: model group, captopril group, silymarin, captopril and silybin combined groups, 12 in each group. In the gap between two intragastric administrations. Six weeks after continuous administration, blood was collected from the abdominal aorta to prepare liver homogenate and liver pathological sections. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), nuclear factor- κ B (NF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected. **Results** The AST, ALT, LDL-C, NF- κ B, TNF- α in the model group were all significantly increased, HDL-C was significantly decreased ($P < 0.05$); captopril and silybin combined use reduced plasma ALT, AST, and LDL-C, NF- κ B, and TNF- α levels ($P < 0.05$) and increased plasma HDL-C levels ($P < 0.05$). The biopsy showed normal morphology of the liver cells in the normal group, and the hepatic sinusoids and portal area were clear. The hepatocytes in the model group were swollen, and the arrangement was scattered with inflammatory cell infiltration. Most of the hepatocytes developed fatty degeneration, and only a small number of hepatocytes in the combination group developed steatosis, and most of the hepatocytes were arranged normally, with less cell edema and lower inflammatory cell infiltration. **Conclusion** Captopril combined with silybin has a significant therapeutic effect on rats with alcoholic liver disease, and its mechanism may be related to the decrease of NF- κ B and TNF- α levels.

Key words silymarin; captopril; alcoholic liver disease