

## 地五养肝胶囊对二乙基亚硝胺诱导斑马鱼肝损伤的保护作用

黄丹萍<sup>1</sup>, 袁伟渠<sup>2</sup>, 黎少东<sup>1</sup>, 陈缙光<sup>3</sup>, 李瀚旻<sup>4,5\*</sup>, 杨宏志<sup>1\*</sup>

(1. 中山大学附属第三医院, 广东省肝病研究重点实验室, 广东 广州 510000; 2. 广州中医药大学第四临床医学院, 广东 深圳 518000; 3. 中山大学药学院, 广东 广州 510006; 4. 湖北省中医院, 湖北 武汉 430061; 5. 湖北省中医药研究院, 湖北 武汉 430074)

**摘要:** 目的 考察地五养肝胶囊对二乙基亚硝胺诱导斑马鱼肝损伤的保护作用。方法 360条斑马鱼随机分成空白组(标准培养液)、模型组(二乙基亚硝胺)、地五养肝胶囊干预组(25、50、100 μg/mL)、异甘草酸镁注射液干预组(0.1 mg/mL)。7 d后,测量斑马鱼肝脏面积,计算其相对光密度,整体油红O染色法测定肝内脂滴数。结果 模型组肝脏浑浊,其面积较空白组显著减小( $P < 0.001$ ),相对光密度显著升高( $P < 0.05$ ),脂滴密集分布;50 μg/mL地五养肝胶囊干预组及异甘草酸镁注射液干预组肝脏更清晰,脂滴更少,肝脏面积、相对光密度与空白组比较均无明显差异( $P > 0.05$ )。结论 地五养肝胶囊对二乙基亚硝胺致斑马鱼肝损伤具有一定保护作用。

**关键词:** 地五养肝胶囊; 肝损伤; 二乙基亚硝胺; 斑马鱼

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)07-1468-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.004

## Protective effects of Diwu Yanggan Capsules on diethylnitrosamine-induced liver injury in zebrafishes

HUANG Dan-ping<sup>1</sup>, YUAN Wei-qu<sup>2</sup>, LI Shao-dong<sup>1</sup>, CHEN Zuan-guang<sup>3</sup>, LI Han-min<sup>4,5\*</sup>, YANG Hong-zhi<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory for Liver Disease Research, The Third Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, China; 2. The Fourth Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 4. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China; 5. Hubei Provincial Academy for Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430074, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To investigate the protective effects of Diwu Yanggan Capsules on diethylnitrosamine-induced liver injury in zebrafishes. **METHODS** Three hundred and sixty zebrafishes were randomly divided into blank group (E3 solution), model group (diethylnitrosamine), Diwu Yanggan Capsules intervention groups (25, 50, 100 μg/mL) and Magnesium Isoglycyrrhizinate Injection intervention group (0.1 mg/mL). After 7 d, the areas of zebrafish livers were measured, whose relative optical densities were calculated, and whole oil red O staining was applied to determining the amount of lipid droplets in liver. **RESULTS** The turbid livers in the model group demonstrated significantly smaller areas ( $P < 0.001$ ) and higher relative optical densities ( $P < 0.05$ ) than those in the blank group, with the dense distribution of lipid droplets. The groups intervened with 50 μg/mL Diwu Yanggan Capsules and Magnesium Isoglycyrrhizinate Injection had clearer livers and fewer lipid droplets. No significant differences in liver areas and relative optical densities were observed in these two groups in contrast to those in the

收稿日期: 2018-01-11

基金项目: 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项课题 (JDZX2015173)

作者简介: 黄丹萍 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中西医结合治疗肝病。Tel: (020) 85252325, E-mail: Hdping130@163.com

\* 通信作者: 李瀚旻 (1956—), 男, 博士, 教授, 从事中医药调控肝再生、防治肝脏病的基础与临床应用研究。Tel: 13018089519, E-mail: lihanmin69@126.com

杨宏志 (1960—), 男, 教授, 从事病毒性肝炎、肝硬化和肝癌的中西医结合治疗研究。Tel: (020) 85252325, E-mail: hzyang1960@163.com

blank group ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION** Diwu Yanggan Capsules have certain protective effects on diethylnitrosamine-induced liver injury in zebrafishes.

**KEY WORDS:** Diwu Yanggan Capsules; liver injury; diethylnitrosamine; zebrafishes

地五养肝胶囊由熟地、茵陈、姜黄、五味子、甘草5味中药组成,具有清热解毒、补益肝肾、活血养阴通络的作用<sup>[1]</sup>。在临床应用中发现,它可改善肝硬化失代偿患者的肝再生及合成功能,从而改善预后<sup>[2]</sup>。

斑马鱼作为脊椎动物,其组织形态及器官发育的分子基础与人类具有高度相似性<sup>[3-4]</sup>。目前,国内外已建立非酒精性脂肪肝及肝癌等斑马鱼生物模型,正成为评价肝损伤、观察肝脏疾病的新兴模式生物<sup>[5]</sup>。

由于现阶段针对地五养肝胶囊对肝损伤保护作用的基础研究有限,故本实验将观察其对二乙基亚硝胺诱导斑马鱼肝损伤的保护作用,为临床应用提供更有力的依据。

## 1 材料

1.1 动物 AB品系野生型斑马鱼(中山大学斑马鱼实验中心)。

1.2 药物 地五养肝胶囊(批号20160229)由湖北省中医院肝病研究所提供,主要由茵陈、熟地黄、姜黄、五味子、生甘草组成,比例分别为33.3%、20.0%、13.4%、20.0%、13.4%。制备工艺为将各药材粗粉按比例混合,75%乙醇回流提取3次,过滤提取物,浓缩除去溶剂,粉末压缩干燥,造粒,即得,于室温干燥环境下保存。

1.3 试剂 二乙基亚硝胺(CAS编号55-18-5,分子式 $C_4H_{10}N_2O$ ,相对分子质量102.14,含有量98.0%)、PBS、油红O染色剂、丙二醇、多聚甲醛、氯化钠、氯化钾、氯化钙、无水硫酸镁均购自上海阿拉丁生化科技有限公司;三卡因(CAS编号886-86-2,分子式 $C_9H_{11}NO_2 \cdot CH_4O_3S$ ,含有量 $>97.0\%$ )购自梯希爱(上海)化成有限公司;异甘草酸镁注射液购自正大天晴药业集团股份有限公司。

1.4 仪器 SMZ-T4体视显微镜、显微图像采集系统(重庆奥特光学显微镜有限公司);LightCycler<sup>®</sup>480 II实时荧光定量PCR系统(瑞士Roche公司)。

## 2 方法

2.1 斑马鱼卵处理 将受精后4h的斑马鱼卵置于薄纱布上,E3溶液(斑马鱼标准培养液,包括5 mmol/L氯化钠、0.17 mmol/L氯化钾、

0.16 mmol/L硫酸镁、0.40 mmol/L氯化钙,双蒸水配制,于空气泵中充气0.5 h后使用)冲洗除去附在鱼卵上的杂质,再将其转移至培养皿,于体视显微镜下筛选出形态正常者,转移至24孔板上,并置于恒温定时箱中 $[(26 \pm 1)^\circ C, 14 h/10 h \text{ 昼/夜循环}]$ 。

### 2.2 安全性实验

2.2.1 分组 将受精后5h的斑马鱼鱼卵随机分成7组,每组45个,设3个复孔,作为地五养肝胶囊干预组(0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1 mg/mL)。

2.2.2 观察指标 各组受精后1~7 d斑马鱼的死亡率。

### 2.3 地五养肝胶囊对斑马鱼肝损伤的保护作用

2.3.1 造模与分组 在斑马鱼标准培养液(E3溶液,充氧饱和后)中加入一定量药物,配成含药培养液,使其长期暴露于实验用药中。取形态正常的受精后5h的斑马鱼卵,随机分成6组,即空白组,模型组,地五养肝胶囊干预组(低、中、高剂量),异甘草酸镁注射液干预组,每组60个,在24孔板中各设3个复孔,每个孔溶液量2 mL。空白组中加入斑马鱼标准培养液(E3溶液,充氧饱和后),室温下以其配制成1 mg/mL地五养肝胶囊贮备液及1 mg/mL异甘草酸镁注射液贮备液,4℃下密封保存,最终质量浓度分别为二乙基亚硝胺150 mg/L,地五养肝胶囊25、50、100  $\mu g/mL$ ,异甘草酸镁注射液0.1 mg/mL;模型组中加入含150 mg/L对二乙基亚硝胺的培养液;地五养肝胶囊干预组加入含150 mg/L对二乙基亚硝胺和25、50、100  $\mu g/mL$ 药物的培养液;异甘草酸镁注射液干预组加入含150 mg/L二乙基亚硝胺和0.1 mg/mL药物的培养液。

2.3.2 肝脏面积测量 受精后7 d,将斑马鱼置于三卡因溶液(称取三卡因粉末适量,以0.4%比例溶于斑马鱼标准培养液中,配成25倍贮备液,用于麻醉时稀释成1倍工作液)中进行麻醉,每组选取5条形态正常者,于体视显微镜下观察,通过显微图像采集系统捕捉图像,并测量肝脏面积,重复3次。

2.3.3 肝脏变性 肝脏变性程度可通过测量肝脏

透光度发现<sup>[6]</sup>。将“2.3.2”项下图像导入 Image-pro Plus 6.0 软件,经背景校准后测量肝脏区域的平均光密度,重复3次。

2.3.4 整体油红染色 7 d后,将各组处理后的斑马鱼置于培养皿中,于4%多聚甲醛溶液中固定过夜,次日用PBS洗涤2次,丙二醇梯度渗透(20%~80%),0.5%油红O染色避光孵育过夜。次日,同样浓度丙二醇从高浓度至低浓度脱色、洗净背景,最后用PBS洗净,置于80%丙二醇中,于4℃冰箱中保存。每组随机挑选10条斑马鱼,于体视显微镜下观察其肝脏染色情况,再通过显微图像采集系统采集图像。

2.4 统计学分析 通过SPSS 20.0软件进行处理,组间样本比较采用完全随机分配资料的方差分析,均数间多重比较采用最小显著差异法,LD<sub>50</sub>计算采用概率单位法,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。应用Graphpad 5.0、CoreIDRAW X6软件作图。

### 3 结果

3.1 死亡率 图1显示,地五养肝胶囊对斑马鱼致死率的影响呈浓度与时间依赖性。1 mg/mL药物作用7 d后,死亡率高达100%;0.7~0.9 mg/mL药物在7 d的死亡率大于50%;E3溶液及0.4~0.6 mg/mL药物在7 d的死亡率低于50%。同时,在7 d的LD<sub>50</sub>为0.626 mg/mL。

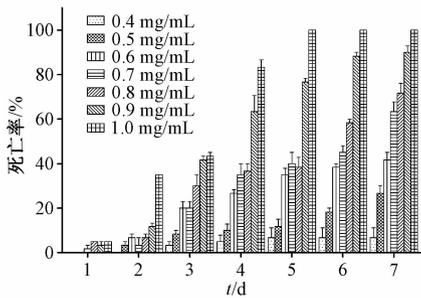


图1 斑马鱼死亡率

Fig.1 Mortalities of zebrafishes

3.2 肝脏面积 图2显示,模型组肝脏面积较空白组明显缩小( $P < 0.001$ )。地五养肝胶囊干预组肝脏面积受药物质量浓度影响,其中各干预组右肝面积与空白组比较无明显差异( $P > 0.05$ ),而模型组明显缩小( $P < 0.001$ );地五养肝胶囊50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 干预组左肝面积与空白组比较无明显差异( $P > 0.05$ ),而模型组( $P < 0.001$ )及地五养肝胶囊25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组( $P < 0.01$ )、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组( $P < 0.01$ )肝脏面积均明显缩小,以模型组更明

显。异甘草酸镁注射液干预组左、右肝脏面积与空白组比较,均无明显差异( $P > 0.05$ )。

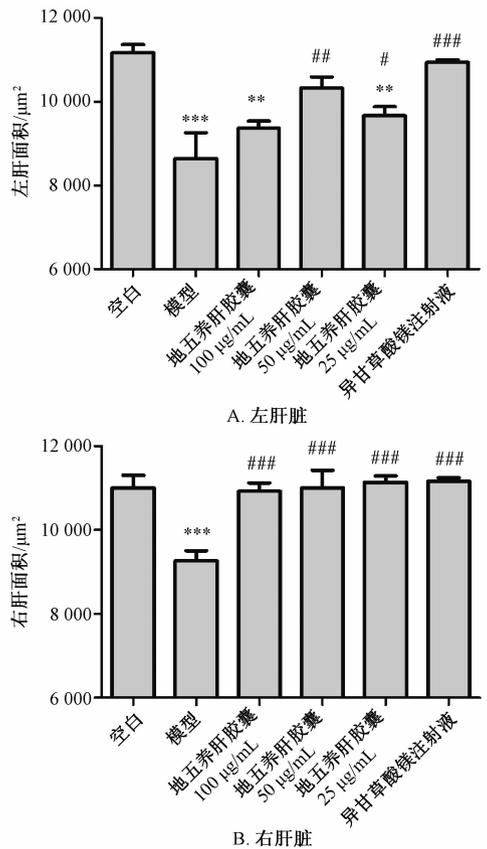


图2 斑马鱼肝脏面积

Fig.2 Areas of zebrafish livers

3.3 肝脏变性 图3显示,空白组、各干预组斑马鱼肝脏透明清晰,而模型组明显浑浊。然后,将所得图片导入Image pro plus 6.0软件,校准后测量肝脏区域光密度,发现空白组、各干预组光密度显著低于模型组( $P < 0.05$ ),见表1。

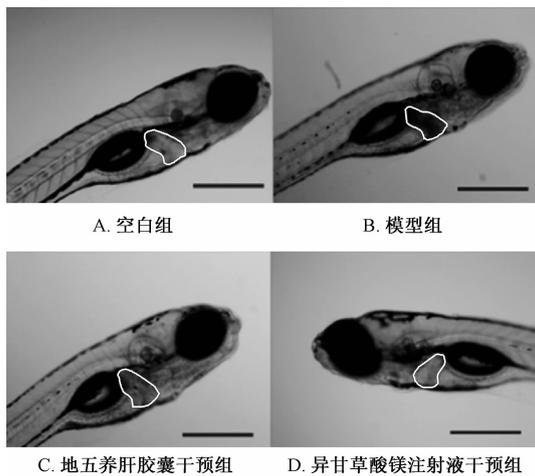
表1 斑马鱼肝脏相对光密度( $\bar{x} \pm s, n = 60$ )

Tab.1 Relative optical densities of zebrafish livers ( $\bar{x} \pm s, n = 60$ )

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	相对光密度
空白组	—	0.28 $\pm$ 0.06 *
模型组	150	0.60 $\pm$ 0.17
异甘草酸镁注射液干预组	0.1 mg/mL	0.29 $\pm$ 0.04 *
地五养肝胶囊干预组	25	0.36 $\pm$ 0.08 *
地五养肝胶囊干预组	50	0.30 $\pm$ 0.04 *
地五养肝胶囊干预组	100	0.30 $\pm$ 0.02 *

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$

3.4 肝脏脂肪沉积 图4显示,染色后空白组斑

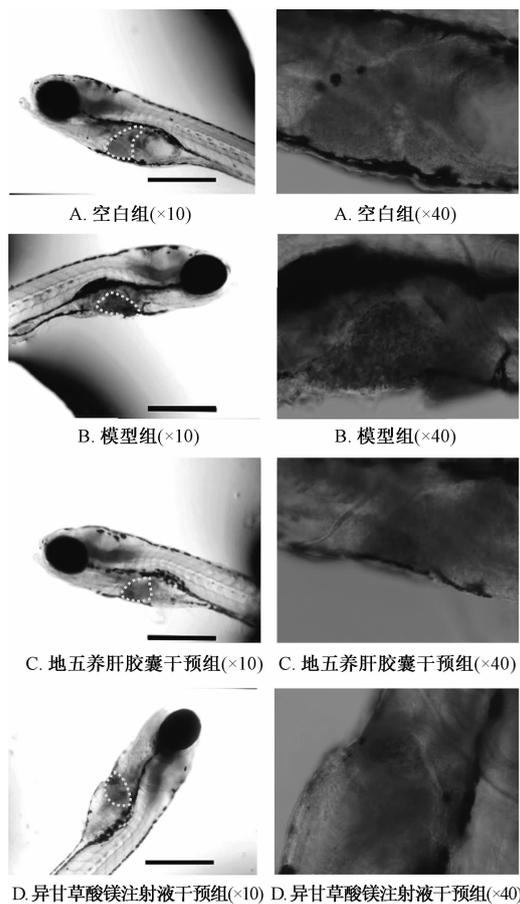


注：白色圈为肝脏所在位置。标尺0.5 mm

图3 斑马鱼肝脏变性 (×100)

Fig. 3 Degeneration of zebrafish livers (×100)

斑马鱼肝脏未观察到明显脂滴形成，模型组可见肝脏脂滴密集，各干预组肝脏脂滴较模型组明显减少。



注：白色圈为肝脏所在位置。标尺0.5 mm

图4 斑马鱼肝脏脂滴沉积

Fig. 4 Lipid droplet deposition of zebrafish livers

#### 4 讨论

地五养肝胶囊中熟地黄性味甘、温，滋补肾阴；五味子性味甘、酸、温，补肾养心，可加强熟地黄补肾功效；茵陈为主药，性味辛、凉，入肝脾经，清湿热，退黄疸；姜黄辛温通络，疏泄肝气兼祛瘀血；生甘草清热解毒力佳，全方酸甘养阴，补泄结合，共奏补肾养肝、清热解、调畅气机之功效。黄芬等<sup>[2]</sup>报道，地五养肝胶囊可明显改善乙肝肝硬化失代偿期患者的临床症状及实验指标；宋红丽等<sup>[7]</sup>将地五养肝胶囊作用于肝肾精虚/MSG-肝再生-大鼠模型，发现在早期可抑制肝再生紊乱，在中晚期可改善被抑制的肝再生，从而修复损伤的肝组织；沈昕等<sup>[8]</sup>研究表明，肝纤维化大鼠采取地五养肝胶囊干预后，可抑制过度活化的Hh信号通路；程思思等<sup>[9]</sup>报道，地五养肝胶囊对肝纤维化大鼠肝组织EMT/MET有影响，从而可减轻肝纤维化病变。

二乙基亚硝胺具有强致癌性，是诱导肝损伤、肝纤维化及肝癌的经典药物，斑马鱼作为一种新兴模式生物，目前已利用该化合物成功诱导出肝纤维化及肝癌模型<sup>[10-12]</sup>；异甘草酸镁注射液能有效改善肝炎急性期患者肝功能，对化学性、药物性肝损害等具有修复作用<sup>[13]</sup>。斑马鱼胚胎时期清晰透明，黑色素于出生后24 h在视网膜上皮细胞中开始生成，之后是鱼体背部，进而形成背条纹、腹条纹<sup>[14]</sup>；其肝脏于出生后30~36 h开始发育，在4 d成熟<sup>[15]</sup>，主要由3部分构成，即顶叶、左叶及右叶，由于肝脏顶叶发育时间晚于背部黑色素生成时间，故显微镜下无法观察到其发育情况，但左、右叶发育时间早于黑色素生成，故于出生后3~7 d可清晰观察到其发育及相关病理变化<sup>[14]</sup>。

斑马鱼肝脏面积是反应其炎症、退化、坏死程度的指标，He等<sup>[6]</sup>对6种已知的对哺乳动物存在肝毒性的药物进行评估，发现斑马鱼肝脏面积在各药物作用下均有不同程度的缩小。本实验发现，二乙基亚硝胺作用下的斑马鱼肝脏面积较空白组明显缩小，而地五养肝胶囊各剂量干预组右肝面积均与空白组无明显差异，而左肝面积在50 μg/mL下也无模型差异，表明该药物对二乙基亚硝胺致肝脏炎症坏死具有一定保护作用，并以50 μg/mL质量浓度最显著。同时安全性实验中发现，地五养肝胶囊对斑马鱼7 d的LD<sub>50</sub>为0.626 mg/mL，远高于50 μg/mL，即对肝损伤发挥保护作用的剂量在安全范围内。

斑马鱼肝脏变性以肝脏颜色变化为特征<sup>[6]</sup>,可反映其肝内坏死程度,能通过可视化的肝脏混浊程度来作定性评估,从而避免了复杂的外科手术<sup>[5,16]</sup>;光密度可通过客观地展示定量数值,排除了光线、视力等干扰,更科学地反映斑马鱼肝损伤及修复程度。肝脏是参与机体代谢的重要器官,其功能受损将导致斑马鱼肝脏内脂肪沉积,从而形成脂滴。本实验发现,地五养肝胶囊干预组肝脏清晰透明,光密度与空白组相当,印证了其对肝损伤的保护作用;在油红O染色图中,模型组肝内明显有脂滴形成,对脂肪代谢能力下降,而治疗组肝脏脂滴明显减少,表明它可保护肝功能,从而维持脂肪代谢能力正常。

综上所述,地五养肝胶囊对斑马鱼肝损伤有一定保护作用,可为其临床应用提供依据,但相关机制目前尚不明确,仍需作进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 肖 锋,万 鸣,高 欢. 地五养肝胶囊的定性研究[J]. 湖北中医杂志, 2015, 37(7): 72.  
[2] 黄 芬,黄丽雯,周 健,等. 地五养肝胶囊辅助治疗乙型肝炎肝硬化失代偿期患者的疗效观察[J]. 西南军医, 2017, 19(2): 134-136.  
[3] Chen J N, Fishman M C. Zebrafishes tinman homolog demarcates the heart field and initiates myocardial differentiation[J]. *Development*, 1996, 122(12): 3809-3816.  
[4] Grunwald D J, Eisen J S. Headwaters of the zebrafishes—emergence of a new model vertebrate [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(9): 717-724.  
[5] Zhang C J, Willett C E, Fremgen T. Zebrafishes: an animal model for toxicological studies [J]. *Curr Protocol Toxicol*,

2003, Chapter 1: Unit1. 7.  
[6] He J H, Guo S Y, Zhu F, et al. A zebrafishes phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity[J]. *J Pharmacol Toxicol*, 2013, 67(1): 25-32.  
[7] 宋红丽,李瀚旻,林立生,等. 地五养肝胶囊对肝肾精虚大鼠肝再生的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2013, 23(2): 90-92.  
[8] 沈 昕,彭 瑜,程思思,等. 地五养肝胶囊对肝纤维化大鼠肝脏 Hedgehog 通路的调节作用[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8): 2954-2957.  
[9] 程思思,沈 昕,彭 瑜,等. 地五养肝胶囊对肝纤维化大鼠肝组织 EMT/MET 的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 826-829.  
[10] 王坤元,刘 莉,戴文聪,等. 二乙基亚硝胺诱导建立斑马鱼肝纤维化模型[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(6): 777-782.  
[11] Mizgirev I V, Revskoy S Y. Transplantable tumor lines generated in clonal zebrafishes [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6): 3120-3125.  
[12] Mizgirev I, Revskoy S. Generation of clonal zebrafishes lines and transplantable hepatic tumors [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(3): 383-394.  
[13] 金雯彦,于 锋. 异甘草酸镁防治药物性肝损伤的药理及临床研究进展[J]. 药学进展, 2013, 37(4): 161-166.  
[14] Westerfield M. The zebrafishes book. A guide for the laboratory use of zebrafishes (*Danio rerio*) [M]. 4th ed. Oregon: University of Oregon Press, 2000.  
[15] Passeri M J, Cinaroglu A, Gao C, et al. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafishes requires sterol regulatory element binding protein activation[J]. *Hepatology*, 2009, 49(2): 443-452.  
[16] McGrath P, Li C Q. Zebrafishes: a predictive model for assessing drug-induced toxicity [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13(9-10): 394-401.