

裸茎金腰逆转 ANIT 致小鼠 IC 型肝损伤有效部位的筛选探究

蔡紫嫣, 钟国跃, 陈优婷, 邓文赞, 叶金宝, 黎 莉, 任 刚*

(江西中医药大学, 中药资源与民族药研究中心, 江西 南昌 330004)

摘要: 目的 筛选特色裸茎金腰 *Chrysosplenium nudicaule* Bunge (亚吉玛) 逆转 ANIT 致小鼠肝内胆汁淤积 (IC) 型肝损伤的有效部位。方法 灌胃 ANIT 的橄榄油溶液诱导小鼠急性 IC, 测定小鼠血清中生化指标谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆汁酸 (TBA)、直接胆红素 (DBIL) 和总胆红素 (TBIL) 的水平; RT-PCR 法测定各极性部位对小鼠肝组织中小异源二聚体伴侣 (SHP)、Na⁺-牛磺胆酸转运体 (NTCP) mRNA 的表达的影响。结果 与模型组比较, 乙酸乙酯部位 (EAP) 和正丁醇部位 (BAP) 高剂量组 (4.0 g/kg) 能降低小鼠血清中 ALT、AST、ALP、TBA、DBIL、TBIL 水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且能上调小鼠肝组织 SHP、NTCP mRNA 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 乙酸乙酯和正丁醇萃取部位为裸茎金腰逆转小鼠急性 IC 的活性部位。

关键词: 裸茎金腰; 活性部位; 筛选; ANIT; 肝内胆汁淤积

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)05-1336-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.05.045

肝内胆汁淤积 (intrahepatic cholestasis, IC) 是由肝细胞和 (或) 毛细胆管胆汁形成、分泌或排泄障碍, 导致胆汁酸不能正常流入十二指肠而进入血液循环, 从而引发肝脏病变的临床综合征^[1]。患者早期表现为黄疸、尿黄、皮肤瘙痒等症状, 并且伴随胆盐、血清胆红素和碱性磷酸酶等活性的升高^[2], 长期胆汁淤积会引发肝纤维化、肝硬化, 严重者可导致肝功能衰竭^[3]。目前临床上治疗 IC 的主要药物有 S-腺苷蛋氨酸、熊去氧胆酸和奥贝胆酸^[4], 但存在作用有限、部分患者对药物的治疗无应答反应且有一定的不良反应等问题^[5]。当前 IC 的发病机制仍不明确, 临床药物治疗局限。因此, 寻找治疗 IC 的药物具有重要意义。

裸茎金腰 *Chrysosplenium nudicaule* Bunge, 为虎耳草科金腰属植物, 主要分布于我国西藏、青海、甘肃、云南等省, 海拔 2 500~4 800 m 的高山石隙, 为特色藏药“亚吉玛”的基原植物之一, 以干燥全草入药^[6-7]。在前期研究中发现, 裸茎金腰提取物对 α -萘异硫氰酸酯 (α -naphthylisothiocyanate, ANIT) 诱导的小鼠急性 IC 型肝损伤具有保护作用^[8]。作为前期工作的延续, 本研究采用 ANIT 诱导小鼠 IC 肝损伤模型评价裸茎金腰提取物的不同极性部位对 IC 的逆转作用, 以期筛选出活性部位。

1 材料与方 法

1.1 药物与试剂 裸茎金腰药材购自青海省西宁药材市场, 经青海师范大学确生教授鉴定为虎耳草科金腰属植物裸茎金腰 *Chrysosplenium nudicaule* Bunge 干燥全草。谷丙转

氨酶 (alanine aminotransferase, ALT, 批号 20180328)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST, 批号 20180323)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP, 批号 20180327)、总胆汁酸 (total bile acid, TBA, 批号 20180327)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBIT, 批号 20180327)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL, 批号 20180328) 等试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA, 批号 20180102) 购于四川迪菲特药业有限公司; 动物组织总 RNA 提取试剂盒 (批号 P4505) 购于天根生化科技 (北京) 有限公司; 反转录试剂盒 (批号 0000148580) 购于普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司; 琼脂糖凝胶 (批号 WXBB2174V) 购于西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; GAL RED 染色液 (批号 13G0306) 购于上海开放生物技术有限公司; 小异源二聚体伴侣 (short heterodimer partner, SHP)、钠离子-牛磺胆酸共转运体 (sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP) 和内参 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物等均购于上海捷瑞生物工程有限公司, 具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	正向 (5'→3')	反向 (5'→3')
NTCP	GCATGATGCCACTCCTCTTATAC	TACATAGTGTGGCCTTTTGGACT
SHP	GTCCTTCTGAGCCTTGAGCTG	GTAGAGGCCATGAGGAGGATTC
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCTGTGCTGTA

收稿日期: 2019-09-11

基金项目: 国家自然科学基金 (81873086); 江西省自然科学基金 (20181BAB205076); 江西省中药学一流学科专项科研项目 (JXSYLXK-ZHYA0027)

作者简介: 蔡紫嫣 (1995—), 女, 硕士生, 从事中药药效评价及相关药理机制研究。Tel: (0791) 87119062, E-mail: 1073052829@qq.com

* 通信作者: 任 刚 (1976—), 男, 教授, 博导, 研究方向为中药和民族药的药效与物质基础。Tel: (0791) 87119067, E-mail: 20091005@jxutem.edu.cn

1.2 动物 SPF级雄性KM小鼠, 体质量(20±2)g, 购于江西中医药大学实验动物中心[生产许可证号SCXK(赣)2018-0003]。自由饮水进食, 适应性喂养3d。

1.3 仪器 全波长酶标仪(美国Beckman-Coulter公司); PCR扩增仪C1000、凝胶影像分析仪Chemic Doc XR(美国Bio-Rad公司); 高速冷冻离心机(德国艾本德公司); 超低温冰箱(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 裸茎金腰活性部位制备 裸茎金腰干燥全草6.0kg, 剪段, 倒入渗漉桶中, 依次加入95%、50%乙醇, 水渗漉提取, 合并提取液, 减压浓缩回收溶剂, 得到裸茎金腰总提物浸膏2.5kg。将总浸膏用蒸馏水混悬于水中, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水萃取, 回收溶剂, 得到石油醚萃取物(PEP)、乙酸乙酯萃取物(EAP)、正丁醇萃取物(BAP)、水萃取物(WAP), 得率分别为4.59%、2.37%、1.65%、26.10%。分别称取PEP 0.38、0.19g, EAP 0.20、0.10g, BAP 0.14、0.07g, WAP 2.08、1.04g, 各混悬于30mL 0.5% CMC-Na溶液中。根据文献[9]记载的成人临床剂量(12~15g/d)结合预实验, 确定小鼠的高、低给药剂量为4.0、2.0g生药/kg, 各萃取部位的高、低剂量分别根据在生药里的含量折算。

2.2 动物分组与给药 110只雄性KM小鼠, 随机分为11组, 分别为对照组, 模型组, UDCA(阳性药)组(100mg/kg), PEP高、低剂量组, EAP高、低剂量组, BAP高、低剂量组, WAP高、低剂量组。模型组、不同溶剂提取物给药组均按文献方法制作模型^[8,10]。小鼠连续灌胃5d, 每天1次, 灌胃体积15mL/kg, 对照组和模型组灌胃同等体积的0.5% CMC-Na水溶液, 第3天给药1h后, 除对照组灌胃橄榄油外, 其余各组小鼠灌胃ANIT(60mg/kg, 橄榄油中溶解)进行造模, 造模48h后, 摘眼球取血, 全血静置1h后, 于4℃, 3500r/min离心10min, 并于4℃冰箱保存备用。解剖小鼠, 于冰台上迅速分取小鼠肝脏, 每只小鼠选择相同部位肝组织, 置于-80℃冰箱保存备用。

2.3 肝功能检测 按照试剂盒说明书的操作方法, ALT和AST采用微板法、ALP采用微量酶标法、TBA采用酶比色微板法、DBIL和TBIL采用钒酸氧化法分别进行测定。

2.4 RT-PCR法测定肝组织SHP、NTCP mRNA的表达 按照动物组织RNA提取试剂盒说明书提取小鼠肝组织总RNA。取4.0μL反转录为cDNA, 并以cDNA为模板进行PCR扩增, GAPDH的PCR扩增的反应体系总体积为27μL, 包含了2μL cDNA, 正向引物1μL, 反向引物1μL, Taq PCR Master Mix 12.5μL, dd H₂O 10.5μL; 反应条件为94℃预变性30min, 94℃变性30s, 56℃退火30s, 72℃延伸1min, 循环30次, 72℃终止5min。SHP、NTCP的PCR扩增的反应体系总体积为25μL, 包括2μL cDNA, 正向引物1μL, 反向引物1μL GoTaq Green Master Mix 12.5μL, dd H₂O 8.5μL; 反应条件为95℃预

变性3min, 95℃变性30s, 56℃退火30s, 72℃延伸1min, 循环30次, 72℃终止5min。PCR扩增产物在恒压75V下经1.2%的琼脂糖凝胶电泳25min, 用Gel Red染色后, 在凝胶影像分析仪检测目的条带, 并对条带进行分析。计算目的基因与内参GAPDH的比值, 从而得到目的基因的相对表达值。

2.5 统计学处理方法 用SPSS 21.0软件进行分析, 数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 不同组之间的比较采用One-way ANOVA单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对ANIT致急性肝损伤小鼠血清生化指标的影响 与对照组比较, 模型组小鼠血清ALT、AST、ALP、TBA、DBIL、TBIL水平升高($P < 0.01$), 表明造模成功; 与模型组比较, 除TBA无统计学意义外, UDCA组小鼠血清ALT、AST、ALP、DBIL、TBIL水平均降低($P < 0.01$); 裸茎金腰EAP高剂量组和BAP高剂量组均能降低小鼠血清ALT、AST、ALP、TBA、DBIL、TBIL水平($P < 0.05$, $P < 0.01$), EAP低剂量组除ALT、ALP水平无变化($P > 0.05$)外, 均能降低AST、TBA、DBIL、TBIL水平($P < 0.01$); BAP低剂量组除ALP、TBA水平无变化($P > 0.05$)外, 均能降低AST、ALT、DBIL、TBIL水平($P < 0.01$); PEP高剂量组能降低小鼠血清ALT、AST、ALP、TBA、DBIL、TBIL水平($P < 0.05$, $P < 0.01$), PEP剂量组除能降低小鼠血清AST、DBIL水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)外, 对ALT、ALP、TBA、TBIL水平无变化($P > 0.05$); WAP高、低剂量组均不能明显降低小鼠血清中ALT、AST、ALP、TBA、DBIL、TBIL水平, 除WAP高、低剂量组小鼠血清AST和WAP低剂量AST有统计学意义($P < 0.01$)外, 其余指标均无统计学意义。见表2。

3.2 对ANIT致急性肝损伤小鼠肝组织中SHP、NTCP mRNA的表达水平比较 与对照组比较, 模型组SHP、NTCP mRNA表达降低($P < 0.01$)。与模型组比较, PEP除高剂量组SHP mRNA的表达上调($P < 0.01$)外, 低剂量组SHP和高剂量组NTCP mRNA表达有所上调, 但无统计学意义($P > 0.05$)。EAP高、低剂量组, BAP高、低剂量组SHP、NTCP mRNA表达均上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。WAP高、低剂量组SHP、NTCP mRNA表达无变化。见图1。

4 讨论

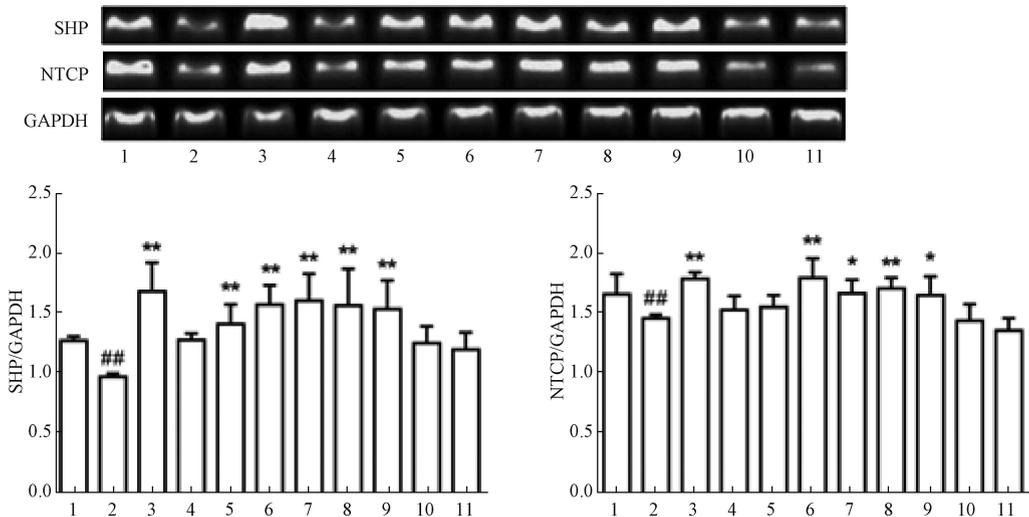
ANIT是一种诱导小鼠肝内胆汁淤积模型的常用急性肝毒性药物, 口服给药后, 随门静脉血进入肝脏, 与肝细胞内谷胱甘肽(glutathione, GSH)可逆性结合, 进入胆汁后损坏肝细胞和胆管上皮细胞, 导致肝细胞肿胀、变性, 从而使胆汁流出和分泌发生障碍, 造成肝内胆汁淤积^[11-12], 其诱发的肝脏损伤所呈现的生化指标与人类肝内胆汁淤积相似, 且造模方法简单, 重复性高, 广泛用于模拟人体肝内胆汁淤积症^[13]。

当小鼠发生IC型肝损伤时, 血液及肝组织中的一些生物化学指标如TBA、DBIL、TBIL、ALP、AST和ALT的水

表2 裸茎金腰提取物各极性部位对小鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ ($g \cdot kg^{-1}$)	ALT/ ($U \cdot L^{-1}$)	AST/ ($U \cdot L^{-1}$)	ALP/ ($U \cdot L^{-1}$)	TBA/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	DBIL/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)	TBIL/ ($\mu mol \cdot L^{-1}$)
对照组	-	11.16±5.04	12.34±3.72	20.77±5.04	3.17±1.26	1.37±0.62	1.25±0.24
模型组	0.06	144.18±17.05 ^{###}	68.03±14.52 ^{###}	78.79±17.29 ^{###}	58.46±14.01 ^{###}	114.39±10.39 ^{###}	78.54±19.73 ^{###}
UDCA组	0.1	89.86±14.37 ^{**}	33.23±7.31 ^{**}	32.48±7.87 ^{**}	9.71±2.10	9.28±3.88 ^{**}	9.16±2.74 ^{**}
石油醚萃取物(PEP)组	2.0	145.38±25.51	54.60±14.52 [*]	90.47±22.97	49.67±11.07	41.20±10.27 ^{**}	58.38±16.35
	4.0	65.83±15.00 ^{**}	35.43±10.02 ^{**}	45.72±14.15 [*]	34.27±9.25	14.63±4.41 ^{**}	24.17±6.04 ^{**}
乙酸乙酯萃取物(EAP)组	2.0	117.97±28.06	42.20±11.90 ^{**}	74.62±17.56	10.77±2.30 ^{**}	5.45±3.13 ^{**}	13.68±4.90 ^{**}
	4.0	83.19±22.40 ^{**}	25.25±7.63 ^{**}	34.32±10.90 ^{**}	10.48±3.31 ^{**}	2.97±2.03 ^{**}	17.72±4.23 ^{**}
正丁醇萃取物(BAP)组	2.0	68.51±17.35 ^{**}	31.77±7.20 ^{**}	50.16±13.26	44.04±10.37	4.77±1.92 ^{**}	7.00±2.91 ^{**}
	4.0	74.27±18.37 ^{**}	32.15±9.96 ^{**}	29.46±7.29 ^{**}	24.23±6.07 ^{**}	3.64±1.67 ^{**}	4.09±1.83 ^{**}
水萃取物(WAP)组	2.0	131.91±33.49	43.16±12.84 ^{**}	89.57±18.59 ^{**}	32.31±9.75	85.04±17.88	60.60±16.95
	4.0	115.24±27.26	45.65±12.40 ^{**}	96.15±24.04	31.44±8.78	92.53±20.39	68.86±18.66

注:与对照组比较,^{###} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$ 。



注:1为对照组,2为模型组,3为UDCA组,4为PEP低剂量组,5为PEP高剂量组,6为EAP低剂量组,7为EAP高剂量组,8为BAP低剂量组,9为BAP高剂量组,10为WAP低剂量组,11为WAP高剂量组。与对照组比较,^{###} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

图1 各组小鼠肝组织 *SHP*、*NTCP* mRNA 表达的影响

平会发生显著的改变,成为检测肝脏受损状态的药效指标^[14-16]。本研究中,模型组小鼠血清中AST、ALT、ALP、TBA、DBIL、TBIL水平比空白小鼠显著升高,提示造模成功。裸茎金腰PEP高剂量组,EAP各剂量组,BAP各剂量组均能显著降低血清ALT、AST、ALP、TBA、DBIL、TBIL水平,且EAP和BAP高剂量组降低ALT、AST、ALP、DBIL的能力要优于UDCA组。这提示了裸茎金腰可以显著改善肝脏的受损状态。

肝内胆红素稳态调控失效是导致IC的主要原因,一些研究^[17-19]表明功能蛋白SHP和NTCP在其中调控肝内胆红素稳态方面扮演了重要角色:NTCP为位于肝细胞基底侧膜的肝脏胆红素转运体,主要功能是吸收大部分结合型牛磺胆酸盐及半游离型胆酸盐进入肝脏,维持胆红素的肝肠循环和血浆中胆红素浓度的稳态水平,NTCP表达的上调促进机体从门静脉血中摄取胆红素;SHP为胆红素的合成限速酶-胆固醇7 α -羟化酶CYP7A1(cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1)的上游调控蛋白,当肝内胆红素浓度高时,其被激活与CYP7A1的启动子结合而抑制其活

性,从而抑制胆红素的合成,维持胆红素稳态。本研究中,与对照组比较,模型组小鼠肝组织中*SHP* mRNA的表达下调,而裸茎金腰EAP和BAP治疗组*SHP*表达上调,提示EAP和BAP治疗组能通过抑制小鼠肝脏胆红素的合成来缓解IC型肝损伤;模型组小鼠肝组织中*NTCP* mRNA的表达下调,可能为机体应对ANIT诱导胆汁淤积时的一种反馈调节,即机体的一种自我保护机制,而EAP和BAP给药组肝组织中*NTCP* mRNA的表达上调,提示EAP和BAP治疗组可能通过反馈性调节*NTCP*的表达使机体趋向正常水平,这与一些抗IC性损伤的中药对*NTCP*表达调节作用类似^[20-22]。可见,各个部位对这2个基因的表达调节结果与以上药效学指标结果基本一致。因此,基于以上数据认为裸茎金腰抗ANIT致小鼠肝内胆红素淤积的有效部位为乙酸乙酯部位和正丁醇部位。

研究表明,金腰属植物的特征性成分为高度羟基化/甲氧基化的黄酮醇类,迄今已从金腰属中分离了50多种黄酮醇类成分^[23]。然而,目前对裸茎金腰的化学成分报道较少。杨云裳等^[24-25]从裸茎金腰的全草中分离鉴定了11个单

体,包括4个黄酮醇衍生物、4个脂肪烃类、1个齐墩果酸衍生物、5-甲氧基阿拉伯糖及 β -谷甾醇。

参考文献:

[1] 中华医学会肝病学会,中华医学会消化病学分会,中华医学会感染病学分会.胆汁淤积性肝病诊断和治疗共识(2015)[J].实用肝脏病杂志,2016,19(6):2-12.

[2] 孙凤霞.重视中西医诊治肝内胆汁淤积性肝病[J].中西医结合肝病杂志,2016,26(4):193-195.

[3] Huo X K, Liu J, Yu Z L, et al. *Alisma orientale* extract exerts the reversing cholestasis effect by activation of farnesoid X receptor[J]. *Phytomedicine*, 2018, 42: 34-42.

[4] 丁嘉欣,杨婷婷,江振洲,等.胆汁淤积性肝病潜在治疗药物研究进展[J].药学进展,2018,42(10):772-779.

[5] Imam M H, Sinakos E, Gossard A, et al. High-dose ursodeoxycholic acid increases risk of adverse outcomes in patients with early stage primary sclerosing cholangitis [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 34(10): 1185-1192.

[6] 中国科学院植物研究所.中国植物志(第34卷)[M].北京:科学出版社,1992:234-236.

[7] 中华人民共和国卫生部药典委员会.部颁药品标准 藏药分册(第一册)[S].北京:中国医药科技出版社,1995:61.

[8] 周燕飞,钟国跃,朱继孝,等.藏族药“亚吉玛”(裸茎金腰)提取物对ANIT致肝内胆汁淤积小鼠的保护作用及机制的探讨[J].中国中药杂志,2019,44(5):1058-1063.

[9] 西藏、青海、四川、甘肃、云南、新疆卫生局.藏药标准(第一、第二分册合编本)[S].西宁:青海人民出版社,1992:55.

[10] 文乐,单佳铃,胡伟琼,等.苗药结石草总生物碱对 α -异硫氰酸萘酯所致肝损伤小鼠的保护作用及机制研究[J].时珍国医国药,2018,29(12):2899-2903.

[11] Carpenter-Deyo L, Marchand D H, Jean P A, et al. Involvement of glutathione in 1-naphthylisothiocyanate (ANIT) metabolism and toxicity to isolated hepatocytes[J]. *Biochem Pharmacol*, 1991, 42: 2171-2180.

[12] Desmet V J, Krstulovic B, Van Damme B. Histochemical study of rat liver in alpha-naphthyl isothiocyanate (ANIT) in-

duced cholestasis[J]. *Am J Pathol*, 1968, 52(2): 401-421.

[13] Tanaka Y, Aleksunes L M, Cui Y J, et al. ANIT-induced intrahepatic cholestasis alters hepatobiliary transporter expression via Nrf2-dependent and independent signaling[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 108(2): 247-257.

[14] Kosters A, Karpen S J. The role of inflammation in cholestasis: clinical and basic aspects [J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30(2): 186-194.

[15] 解静.赶黄草提取物对胆汁淤积性肝细胞损伤的保护作用[D].泸州:西南医科大学,2016.

[16] Siddique A, Kowdley K V. Approach to a patient with elevated serum alkaline phosphatase [J]. *Clin Liver Dis*, 2012, 16(2): 199-229.

[17] 吴海滨,余世锋,兰绍阳.基于FXR探讨茵栀黄注射液利胆退黄的机制研究[J].辽宁中医杂志,2016,43(4):845-848.

[18] 果佳霖,马丽杰,陈阳,等.胆汁淤积性肝损伤治疗靶点与药物治疗进展[J].生命的化学,2018,38(3):445-451.

[19] Goodwin B, Jones S A, Price R R, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis [J]. *Mol Cell*, 2000, 6(3): 517-526.

[20] 刘馨烛,邱剑楠,戚莉,等.岩黄连对急性肝内胆汁淤积大鼠的干预作用及胆汁酸转运体表达的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(4):1700-1703.

[21] 陈浩,李甲,胡蕾,等.基于Sirt1-FXR通路探究京尼平苷酸对胆汁淤积大鼠胆汁酸肝肠循环的影响[J].中国中药杂志,2019,44(4):787-795.

[22] 肖日传,罗光明,董丽华,等.基于黄疸模型的栀子根与栀子果实保肝作用探讨[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(7):101-107.

[23] 杨云裳,张应鹏,史高峰,等.金腰属植物化学成分和构效关系研究进展[J].天然产物研究与开发,2005(2):253-257.

[24] 杨云裳,史高峰,鲁润华.藏药裸茎金腰中的黄酮醇化合物研究[J].中草药,2003,34(增刊):98-100.

[25] 杨云裳,何荔,宋爱新,等.藏药裸茎金腰的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2004,16(4):294-296.