

# 当药和水飞蓟提取混合物对毒性物质诱导的脂肪肝大鼠肝损伤的防治作用



毛志敏<sup>1</sup>, 宋海燕<sup>1</sup>, 杨丽丽<sup>1</sup>, 柳涛<sup>1</sup>, 励冬斐<sup>1</sup>, 郑培永<sup>1</sup>, 刘平<sup>2</sup>, 季光<sup>1,2</sup>

1. 上海中医药大学脾胃病研究所, 上海中医药大学龙华医院消化内科, 上海 200032
2. 上海高校中医内科学 E-研究院, 上海 201203

**目的:** 研究当药和水飞蓟提取混合物对大鼠在非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)基础上由四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)诱导的肝损伤的防治作用及机制。

**方法:** 雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、CCl<sub>4</sub>组、高脂饮食组、高脂饮食加 CCl<sub>4</sub>组、当药和水飞蓟混合物组(提取物组)、甘草酸二铵组。正常组和 CCl<sub>4</sub>组喂食普通饲料, 其余大鼠均给予高脂饲料, 提取物组和甘草酸二铵组大鼠同时分别采用当药和水飞蓟混合物或甘草酸二铵干预。8 周后, 除正常组和高脂饮食组外, 其余各组大鼠均腹腔注射小剂量 CCl<sub>4</sub>, 注射 48 h 后收集血清和肝脏组织。苏木精和伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色观察肝脏组织病理学改变, 检测血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)活性, 肝组织匀浆中三酰甘油(triacylglycerol, TAG)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量, 并用逆转录聚合酶链反应、蛋白质印迹技术检测解偶联蛋白 2(uncoupling protein-2, UCP2)基因和蛋白表达水平。

**结果:** 肝组织 HE 染色显示, 小剂量 CCl<sub>4</sub>未导致正常饮食大鼠肝脏出现病理学异常改变, 高脂饮食组出现肝小叶大面积肝细胞脂肪变性, 高脂饮食加 CCl<sub>4</sub>组脂肪变性加重, 肝细胞气球样变和炎性细胞浸润明显, 提取物组、甘草酸二铵组肝细胞脂肪变性、气球样变性和炎性浸润明显减轻。与正常组比较, CCl<sub>4</sub>组大鼠血清 ALT、AST 活性, 肝组织 TAG、MDA、GSH 水平和 UCP2 表达无明显改变;

 Open Access 开放获取	 Submission Guide 投稿指南
<p>DOI: 10.3736/jcim20120210  <a href="http://www.jcimjournal.com">http://www.jcimjournal.com</a></p> <p>毛志敏, 宋海燕, 杨丽丽, 柳涛, 励冬斐, 郑培永, 刘平, 季光. 当药和水飞蓟提取混合物对毒性物质诱导的脂肪肝大鼠肝损伤的防治作用. 中西医结合学报. 2012; 10(2): 193-199.                      Mao ZM, Song HY, Yang LL, Liu T, Li DF, Zheng PY, Liu P, Ji G. Effects of the mixture of <i>Swertia pseudochinensis</i> Hara and <i>Silybum marianum</i> Gaertn extracts on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats with non-alcoholic fatty liver disease. <i>J Chin Integr Med.</i> 2012; 10(2): 193-199.</p> <p>Received September 1, 2011; accepted October 26, 2011; published online February 15, 2012.                      Full-text LinkOut at PubMed. Journal title in PubMed: <i>Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao</i>.</p> <p><b>基金项目:</b> 上海市教育委员会重点学科建设项目(No. J50305); 上海市科学技术委员会自然科学基金资助项目(No. 11ZR1436900); 上海市教育委员会预算内科研项目(No. 2010JW35); 上海高校创新团队建设项目(第一期)</p> <p><b>Correspondence:</b> Guang Ji, MD, Professor; Tel: 021-64286261; E-mail: jiliver@vip.sina.com</p>	<p><i>Journal of Chinese Integrative Medicine (JCIM)</i> or <i>Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao</i> is an international, peer-reviewed, open-access journal for the study of complementary and alternative medicine or integrative medicine from all regions of the world. <i>JCIM</i> is indexed in PubMed and Directory of Open Access Journals (DOAJ). <i>JCIM</i> is a member journal of CrossRef. Articles published in <i>JCIM</i> have maximum exposure to the international scholarly community.</p> <p><b>Submit your manuscript here:</b>  <a href="http://mc03.manuscriptcentral.com/jcim-en">http://mc03.manuscriptcentral.com/jcim-en</a> (for manuscripts written in English)  <a href="http://mc03.manuscriptcentral.com/jcim-cn">http://mc03.manuscriptcentral.com/jcim-cn</a> (for manuscripts written in Chinese)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• No submission and page charges for manuscripts written in English</li> <li>• Quick decision and rapid publication</li> </ul> <p>Send your postal address by e-mail to <a href="mailto:jcim@163.com">jcim@163.com</a>, we will send you a complimentary print issue upon receipt.</p> <p>ISSN 1672-1977. Published by JCIM Press, Shanghai, China.</p>

各指标除 GSH 外在高脂饮食组较正常组及 CCl<sub>4</sub> 组略有升高;高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 组血清 ALT、AST 水平较高脂饮食组显著升高,肝组织 TAG、MDA 含量和 UCP2 mRNA 及蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ ),肝组织 GSH 含量明显下降;而提取物组和甘草酸二铵组各指标均显著改善( $P < 0.05$ )。

**结论:**NAFLD 大鼠肝组织对小剂量 CCl<sub>4</sub> 损伤敏感性显著增加,肝组织中氧化因素上调,抗氧化应激因素下调是其重要机制。当药和水飞蓟混合物可逆向调节这些氧化应激因素的改变,从而显著改善 NAFLD 大鼠肝组织对 CCl<sub>4</sub> 损伤的易感性。

**关键词:**脂肪肝,非酒精性;肝损伤;四氯化碳;氧化性应激;植物提取物;大鼠

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种与胰岛素抵抗以及遗传易感性密切相关的代谢应激性肝脏损伤,其病理学改变与酒精性肝病相似,但无过量饮酒史,包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎及其相关的肝硬化和肝细胞癌<sup>[1]</sup>。NAFLD 是遗传-环境-代谢应激相关性疾病,其发病机制主要包括以胰岛素抵抗为主的“一次打击”和以氧化应激、肝细胞大量死亡、纤维化为主的“二次打击”<sup>[2]</sup>。随着经济的发展,NAFLD 的发病率也呈逐年上升的趋势<sup>[3]</sup>。有报道显示,NAFLD 患者对毒性物质肝损伤敏感性显著增加<sup>[4]</sup>,对正常人无影响的某些药物、化学物质等,在同等剂量下可导致 NAFLD 患者肝功能损伤,其损伤机制和防治手段的研究显得十分迫切。美大康药业股份有限公司生产的当药和水飞蓟醇提取物(当飞利肝宁,批准文号为国药准字 Z51020085)具有化湿利胆、清热解毒的功效,临床用于治疗各种急慢性肝炎。本研究拟探讨当药和水飞蓟提取物的混合物是否可改善 NAFLD 大鼠对毒性物质的敏感性,并进一步研究其发挥药效的现代生物学基础,为 NAFLD 的临床用药提供科学依据和指导。

## 1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂 当药和水飞蓟混合物由四川美大康药业有限公司提供,生产批号为 100611,主

要成分包括当药苷、当药苦苷、龙胆碱、齐墩果酸、水飞蓟素等,高效液相色谱法测定每克干浸膏含水飞蓟宾 7.5 mg;甘草酸二铵,江苏正大天晴药业股份有限公司生产,批号为 100512。四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒,购于南京建成生物工程有限公司;三酰甘油(triacylglycerol, TAG)试剂盒,购于北化康泰生物有限公司;小鼠抗解偶联蛋白 2(uncoupling protein 2, UCP2)多克隆抗体,购于 Abcam 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体,上海康成生物工程有限公司产品;化学发光试剂,购于 Millipore 公司。逆转录试剂盒、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) GoTaq Green Master 混合物,为 Promega 公司产品。

1.2 实验动物分组及药物干预 无特殊病原体级雄性 Wistar 大鼠 60 只,体质量(170±10)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号为 SCXK(沪)2007-0005。按照完全随机分组法分为正常组、CCl<sub>4</sub> 组、高脂饮食组、高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 组、甘草酸二铵组及当药和水飞蓟混合物组(以下简称提取物组)。其中正常组和 CCl<sub>4</sub> 组大鼠喂食普通饲料,其余大鼠均喂食高脂饲料(88%普通饲料,10%猪油加 2%胆固醇),且甘草酸二铵组、提取物组分别采用对照药甘草

### Related Articles 推荐阅读

郑培永, 马赞颂, 花永强, 柳涛, 邢练军, 季光. 葛根素对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏瘦素受体 mRNA 和磷酸化 Janus 激酶 2/磷酸化信号转导与转录激活因子 3 的影响. 中西医结合学报. 2008; 6(9): 921-927.

Zheng PY, Ma ZS, Hua YQ, Liu T, Xing LJ, Ji G. Effects of puerarin on expressions of leptin receptor mRNA, phosphorylated Janus kinase 2/phosphorylated signal transducers and activators of transcription 3 proteins in the liver of rats with non-alcoholic fatty liver. *J Chin Integr Med.* 2008; 6(9): 921-927.

**Free full text available at** <http://www.jcimjournal.com/FullText2.aspx?articleID=167219772008090921>

谢萍, 周新喜, 张琴. 非酒精性脂肪肝的发病机制和治疗. 中西医结合学报. 2010; 8(3): 201-209.

Xie P, Zhou XX, Zhang Q. Pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *J Chin Integr Med.* 2010; 8(3): 201-209.

**Free full text available at** <http://www.jcimjournal.com/FullText2.aspx?articleID=jcim20100301>

**More free related articles at** <http://www.jcimjournal.com/FullText2.aspx?articleID=jcim20120210>

酸二铵或当药和水飞蓟提取物灌胃干预,按人鼠等效剂量计算(70 kg 成人临床剂量 7 倍),大鼠用药量分别为 0.3 和 0.225 g/kg,其余组予生理盐水灌胃。灌胃 8 周后,除正常组、高脂饮食组外,其余各组均腹腔注射 33% CCl<sub>4</sub>(CCl<sub>4</sub>:玉米油=1:2)0.5 mL/kg 体重。48 h 后麻醉,收集血清和肝组织冻存。

1.3 指标检测方法

1.3.1 肝脏组织病理学观察 4%中性甲醛溶液固定肝组织,脱水透明后石蜡包埋并做 4 μm 切片,脱蜡复水后行苏木精和伊红染色,光学显微镜下观察并拍照。

1.3.2 血清丙氨酸氨基转移酶和门冬氨酸氨基转移酶检测 腹主动脉采血离心收集血清,采用比色法检测丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)活性,用 HITACHI 7170S 生化仪检测。

1.3.3 肝组织 TAG、GSH 和 MDA 检测 肝组织剪碎后加入乙醇、丙酮(1:1)混合液中,于冰浴中匀浆,充分摇匀后,放置于 4 ℃ 冰箱过夜,离心取上清液。按照试剂盒说明书以比色法测定 TAG 含量。肝组织生理盐水匀浆取上清,按照试剂盒以底物反应比色法测定 MDA 和 GSH 含量。

1.3.4 肝组织 UCP2 基因表达检测 每组各取 3 个肝脏组织分别加液氮研磨,加 TRIzol 提取总 RNA,用 Oligo dT 为引物逆转录得 cDNA,进行 UCP2 PCR 扩增,并同时扩增 β-actin 作为内参照。UCP2 上游引物序列:5'-CTACAAGACCATTGCACGA-3';下游引物序列:5'-CTCATAGGTGACAAACATTA-3'。β-actin 上游引物序列:5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3';下游引物序列:5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'。

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳,用 TANON 凝胶成像分析系统获得条带光密度值,并计算 UCP2 与 β-actin 的相对比值。

1.3.5 肝组织 UCP2 蛋白表达检测 采用蛋白质印迹法检测肝组织 UCP2 蛋白的表达。每组各取 3 个肝组织分别加液氮研磨,加裂解液提取组织蛋白,二喹啉甲酸法检测浓度;用 10%聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白,转移至聚偏二氟乙烯膜,封闭后加 UCP2(1:500)或 GAPDH(1:1000)单抗在 4 ℃ 孵育过夜;二抗室温孵育 1 h,加化学发光试剂后,用 TANON 凝胶成像分析系统采集条带光密度值,计算 UCP2 与 GAPDH 的相对值。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,组间两两比较用 LSD-*t* 法,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝脏组织病理学检测 正常组和 CCl<sub>4</sub> 组大鼠肝细胞大小一致,排列成索状,核蓝染,位于细胞中央,CCl<sub>4</sub> 组与正常组无明显区别;高脂饮食组肝脏在中央静脉周围可见脂肪变性,细胞质疏松化;高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 组可见小叶内广泛分布肝细胞大泡脂肪变性,细胞质疏松化,核被挤压到边缘,在中央静脉周围有大量气球样变性,伴炎性细胞浸润,在高倍镜下可见 Mallory 小体形成;提取物组及甘草酸二铵组病理学改变程度较高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 组轻,脂肪变减轻,在中央静脉周围无明显气球样变和炎性浸润。甘草酸二铵比提取物改善效果略差。见图 1。

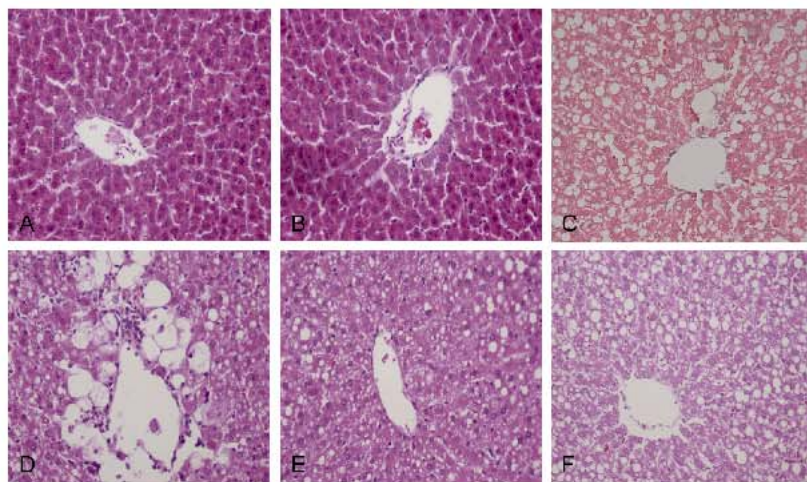


图 1 各组大鼠肝脏组织苏木精和伊红染色(光学显微镜,×200)

Figure 1 Liver tissues of rats in different groups by hematoxylin and eosin staining (Light microscopy, ×200)

A; Normal group; B; CCl<sub>4</sub> group; C; High-fat diet group; D; High-fat diet plus CCl<sub>4</sub> group; E; Dangyao and Shuifeiji group; F; Diammonium glycyrrhizinate group.

2.2 大鼠血清 ALT 和 AST 活性 正常组血清 ALT 和 AST 活性与 CCl<sub>4</sub> 组比较差异无统计学意义,而高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 组血清 ALT 和 AST 活性较高脂饮食组明显升高 ( $P < 0.05$ );与高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 组相比,提取物组及甘草酸二铵组的 ALT、AST 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.3 大鼠肝组织匀浆液 TAG、GSH 和 MDA 水平

CCl<sub>4</sub> 组肝组织匀浆液中 TAG、MDA 和 GSH 含量较正常组无明显变化,而高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 组较高脂饮食组明显升高 ( $P < 0.05$ );与单纯使用高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 相比,当药和水飞蓟混合物、甘草酸二铵可显著降低肝组织匀浆液中 TAG、MDA 和 GSH 水平 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 ALT、AST 水平和肝组织 TAG、MDA、GSH 含量

Table 1 Serum ALT and AST levels and TAG, MDA and GSH contents of liver tissues of rats in different groups

( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	TAG (mg/g liver)	MDA ( $\mu\text{mol/g protein}$ )	GSH (mg/g protein)
Nomal control	10	32.92 $\pm$ 4.17*	41.79 $\pm$ 7.16*	0.77 $\pm$ 0.26*	5.30 $\pm$ 1.17*	106.57 $\pm$ 10.62*
CCl <sub>4</sub>	10	39.84 $\pm$ 4.43* $\Delta$	50.17 $\pm$ 1.61 $\Delta$	0.93 $\pm$ 0.12* $\Delta$	5.55 $\pm$ 0.89* $\Delta$	104.15 $\pm$ 11.32* $\Delta$
High-fat diet	10	57.33 $\pm$ 10.01 $\Delta$	65.18 $\pm$ 19.43 $\Delta$	1.73 $\pm$ 0.16 $\Delta$	8.05 $\pm$ 1.53 $\Delta$	71.59 $\pm$ 13.54 $\Delta$
High-fat diet plus CCl <sub>4</sub>	10	82.90 $\pm$ 15.80*	84.14 $\pm$ 7.90*	2.11 $\pm$ 0.12*	10.11 $\pm$ 1.13*	28.10 $\pm$ 9.07*
Dangyao and Shuifeiji	10	43.28 $\pm$ 3.63* $\Delta$	38.42 $\pm$ 13.35* $\Delta$	1.20 $\pm$ 0.12* $\Delta$	6.50 $\pm$ 0.67 $\Delta$	51.48 $\pm$ 17.21* $\Delta$
Diammonium glycyrrhizinate	10	49.64 $\pm$ 12.84 $\Delta$	31.97 $\pm$ 7.27* $\Delta$	1.18 $\pm$ 0.13* $\Delta$	7.58 $\pm$ 0.64 $\Delta$	51.96 $\pm$ 15.77* $\Delta$

\*  $P < 0.05$ , vs high-fat diet group;  $\Delta P < 0.05$ , vs high-fat diet plus CCl<sub>4</sub> group. ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; TAG: triacylglycerol; MDA: malondialdehyde; GSH: glutathione.

2.4 肝脏组织 UCP2 mRNA 表达水平 CCl<sub>4</sub> 组 UCP2 mRNA 表达较正常相升高,但差异无统计学意义 ( $P = 0.064$ );与高脂饮食组比较,高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 组 UCP2 mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.05$ );与高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 组比较,提取物组、甘草酸二铵组的 UCP2 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。见图 2 和表 2。

2.5 肝脏组织 UCP2 蛋白表达水平 CCl<sub>4</sub> 组 UCP2 蛋白的表达较正常组升高,与高脂饮食组比较,高脂饮食加 CCl<sub>4</sub> 组 UCP2 蛋白的表达明显升高 ( $P < 0.05$ );当药和水飞蓟混合物、甘草酸二铵能显著降低 UCP2 的蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ )。见图 2 和表 2。

表 2 各组大鼠肝组织 UCP-2 相对表达水平

Table 2 UCP2 expression of rat liver

tissues in different groups

( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	UCP2 mRNA expression (Ratio to $\beta$ -actin)	UCP2 protein expression (Ratio to GAPDH)
Nomal control	3	2.27 $\pm$ 0.05* $\Delta$	1.73 $\pm$ 0.01* $\Delta$
CCl <sub>4</sub>	3	2.36 $\pm$ 0.09* $\Delta$	1.92 $\pm$ 0.02* $\Delta$
High-fat diet	3	3.71 $\pm$ 0.02 $\Delta$	2.73 $\pm$ 0.02 $\Delta$
High-fat diet plus CCl <sub>4</sub>	3	5.22 $\pm$ 0.02*	3.06 $\pm$ 0.04*
Dangyao and Shuifeiji	3	2.41 $\pm$ 0.06* $\Delta$	1.88 $\pm$ 0.01* $\Delta$
Diammonium glycyrrhizinate	3	2.40 $\pm$ 0.05* $\Delta$	1.86 $\pm$ 0.03* $\Delta$

\*  $P < 0.05$ , vs high-fat diet group;  $\Delta P < 0.05$ , vs high-fat diet plus CCl<sub>4</sub> group. UCP2: uncoupling protein 2; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

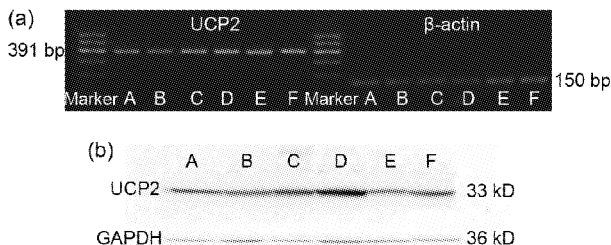


图 2 各组大鼠肝组织 UCP-2 mRNA (a) 和蛋白 (b) 表达  
Figure 2 Expressions of UCP2 mRNA (a) and protein (b) in liver tissues of rats in different groups

A: Normal group; B: CCl<sub>4</sub> group; C: High-fat diet group; D: High-fat diet plus CCl<sub>4</sub> group; E: Dangyao and Shuifeiji group; F: Diammonium glycyrrhizinate group. UCP2: uncoupling protein 2; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

### 3 讨论

本实验参照范建高等<sup>[5]</sup>报道的方法,以高脂饮食诱导 NAFLD 模型。造模 8 周后高脂饮食组血清 ALT、AST 活性和肝组织 TAG 含量显著升高;肝组织 HE 染色后光学显微镜下观察发现,模型组肝细胞排列明显紊乱,胞质疏松有大量脂滴,脂肪变性明显,提示 NAFLD 大鼠模型的成功建立。采用 CCl<sub>4</sub> 腹腔注射是造成急性肝损伤模型的常规方法,在本实验中使用了预实验中摸索到的剂量 (33% CCl<sub>4</sub>),按 0.5 mL/kg 体质量注射,血清 ALT、AST 活性,肝脏脂质含量和肝脏组织病理学等指标均证

实小剂量 CCl<sub>4</sub> 可造成 NAFLD 大鼠急性肝损伤,而该剂量对正常大鼠几乎无影响。这表明,在环境中相对于普通人来说为安全剂量的毒性物质,对 NAFLD 患者由于其损伤敏感性增加可能会造成肝损伤。

正常情况下,肝脏线粒体和内质网会在脂肪酸 β 氧化过程中产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS),但由于各种抗氧化因子的参与,不会造成氧化-抗氧化水平的失衡。但病理情况下,ROS 过度产生,抗氧化能力低下,过多 ROS 使抗氧化因子耗竭,导致氧化与抗氧化平衡系统失调,产生脂质过氧化,导致氧化应激<sup>[6]</sup>。氧化应激在 NAFLD 发生发展中具有重要地位。研究表明,脂肪肝损伤敏感性增加与肝脏氧化与抗氧化物比例失调有关<sup>[7]</sup>。NAFLD 肝细胞内大量游离氧自由基和继发的脂质过氧化,几乎耗竭掉还原型 GSH,其他毒性物质如 CCl<sub>4</sub> 会加剧此过程,从而使 JNK 通路活化,并进一步诱导凋亡。另外,在脂质过氧化过程中,产生大量具有反应活性和细胞毒性的中间产物,导致细胞坏死、凋亡,并通过炎症反应破坏肝实质<sup>[8]</sup>。在本研究中对大鼠腹腔注射小剂量 CCl<sub>4</sub> 后,与喂食普通饲料组注射 CCl<sub>4</sub> 相比,喂食高脂饲料组的大鼠血清 ALT、AST 活性升高,反映肝脏功能损伤加重;肝组织 TAG 含量也明显升高,表明脂肪变更严重;脂质过氧化产物 MDA 水平上调是氧化应激的间接反映指标;且 GSH 水平下降。GSH 能够自行或经过酶的催化与各种氧化剂反应以减小其对脂质及蛋白的损伤,因此,细胞内的 GSH 水平高低也往往被用于衡量细胞抗氧化能力的重要指标。以上结果表明,NAFLD 大鼠在注射 CCl<sub>4</sub> 后促进了氧化应激的发展,是 CCl<sub>4</sub> 等肝毒性物质对 NAFLD 大鼠造成肝损伤的原因之一。

UCP 是一类位于线粒体内膜上的载体蛋白<sup>[9]</sup>,UCP 及其同系物可使线粒体氧化磷酸化解偶联,即进入线粒体内膜的 H<sup>+</sup> 不与 ATP 合成过程偶联,此过程中能量以热的形式散失,形成“质子漏”<sup>[9-11]</sup>。UCP2 广泛存在于骨骼肌、心肌、肝脏和胰腺等组织<sup>[12]</sup>,在成年人肝实质细胞中 UCP2 几乎不表达,但在某些病理情况下如脂肪肝或肝损伤时,肝实质细胞大量表达 UCP2。UCP2 能使经线粒体内膜氧化与磷酸化解偶联增加<sup>[13]</sup>,肝细胞内 ATP 耗竭,增加肝细胞对坏死的敏感性<sup>[14]</sup>。范建高等<sup>[5]</sup>的研究也证实,随着脂肪肝造模时间的延长,肝脏 UCP2 表达增强,ATP 含量下降,两者均于脂肪性肝炎伴肝纤维化阶段达到峰值;Rashid 等<sup>[15]</sup>对 ob/ob 小鼠肝细胞的研究发现,UCP2 mRNA 转录增加了 5~

6 倍,而正常小鼠肝细胞中并无 UCP2 的转录和翻译。Chavin 等<sup>[16]</sup>在脂肪变性的肝细胞中也发现 UCP2 表达增多,其线粒体内 ATP 含量与对照组比较下降约 15%,并且证实 UCP2 表达增多是由于与肥胖相关的氧化应激增强,进而使核因子 κB 激活的结果。本研究中,我们发现,无论是基因或是蛋白表达,喂食高脂饲料组大鼠肝脏 UCP2 均高于正常组,在注射小剂量 CCl<sub>4</sub> 后又显著上升,表明 UCP2 参与 NAFLD 发展和毒性物质对 NAFLD 的肝损伤。

目前现代医学对 NAFLD 和肝损伤并没有很理想的治疗方法,中药在改善肝功能、抗脂质过氧化、调整脂质代谢紊乱等方面有较好的疗效<sup>[17-19]</sup>,受到越来越多的关注。当药民间俗称“肝炎草”,具有保护肝细胞、抗炎、防止或减轻肝细胞损伤并促进受损肝细胞修复的作用<sup>[20,21]</sup>。水飞蓟的提取物水飞蓟素被认为是肝细胞膜的有效保护剂,药理研究证明其具有保护肝细胞正常结构和功能、对抗中毒性肝损伤、对抗脂质过氧化、促进肝细胞再生、清除体内的氧自由基以及抗肝纤维化等作用<sup>[22]</sup>。在本研究中应用的当药和水飞蓟混合物,为天然植物药当药和水飞蓟的提取物,其主要成分是当药苦苷、当药苷、獐牙菜苦苷、齐墩果酸、龙胆苦苷、龙胆碱、水飞蓟素等。应用当药和水飞蓟混合物干预的 NAFLD 大鼠血清 ALT、AST 水平明显下调,肝损伤程度减轻,并且肝脏的 TAG 水平也显著下降,表明该药可有效防治 NAFLD 大鼠对肝毒性物质造成的肝损伤,并有一定的降脂作用。当药和水飞蓟混合物干预组大鼠肝组织 MDA 含量下降,GSH 水平上调,表明该药物可改善机体的氧化应激水平,其中对氧化应激造成的 UCP2 表达的抑制,是当药和水飞蓟混合物改善脂肪肝肝损伤的重要药效机制。

#### 4 利益冲突

所有作者声明不存在与本文相关的任何利益冲突。

#### REFERENCES

- 1 The Chinese National Workshop on Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease for the Chinese Liver Disease Association. Guidelines for management of nonalcoholic fatty liver disease: an updated and revised edition. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2010; 18(3): 163-166. Chinese.  
中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版). 中华

- 肝脏病杂志. 2010; 18(3): 163-166.
- 2 Xie P, Zhou XX, Zhang Q. Pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *J Chin Inter Med.* 2010; 8(3): 201-209. Chinese with abstract in English. 谢萍, 周新喜, 张琴. 非酒精性脂肪肝的发病机制和治疗. *中西医结合学报.* 2010; 8(3): 201-209.
  - 3 Malik A, Cheah PL, Hilmi IN, Chan SP, Goh KL. Non-alcoholic fatty liver disease in Malaysia: a demographic, anthropometric, metabolic and histological study. *J Dig Dis.* 2007; 8(1): 58-64.
  - 4 Donthamsetty S, Bhave VS, Mitra MS, Latendresse JR, Mehendale HM. Nonalcoholic fatty liver sensitizes rats to carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Hepatology.* 2007; 45(2): 391-403.
  - 5 Fan JG, Ding XD, Wang GL, Xu ZJ, Tian LY, Zheng XY. Expression of uncoupling protein 2 and its relationship to the content of adenosine triphosphate in the nonalcoholic fatty livers of rats fed a high-fat diet. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2005; 13(5): 374-377. Chinese with abstract in English. 范建高, 丁晓东, 王国良, 徐正婕, 田丽艳, 郑晓英. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏解偶联蛋白 2 表达及其与能量贮备的关系. *中华肝脏病杂志.* 2005; 13(5): 374-377.
  - 6 Jiang XL, Zhang J, Liu SL, Wang GH. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hepatosteatosis. *Sichuan Yi Xue.* 2009; 30(12): 1958-1960. Chinese with abstract in English. 蒋兴亮, 张均, 刘素兰, 王光华. 非酒精性脂肪肝患者氧化应激和抗氧化酶状态. *四川医学.* 2009; 30(12): 1958-1960.
  - 7 Singh R, Wang Y, Schattenberg JM, Xiang Y, Czaja MJ. Chronic oxidative stress sensitizes hepatocytes to death from 4-hydroxynonenal by JNK/c-Jun overactivation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 297(5): G907-G917.
  - 8 Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol.* 2007; 17(11): 863-869.
  - 9 Krauss S, Zhang CY, Lowell BB. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(3): 248-261.
  - 10 Wang W, Zhou JY. Uncoupling protein 2 and alcoholic liver disease. *Guo Ji Nei Ke Xue Za Zhi.* 2008; 35(5): 295-298. Chinese with abstract in English. 王玮, 周俊英. 解偶联蛋白 2 与酒精性肝病. *国际内科学杂志.* 2008; 35(5): 295-298.
  - 11 Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 2000; 529 (Pt 1): 3-10.
  - 12 Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 1997; 15(3): 269-272.
  - 13 Chan CB, Saleh MC, Koshkin V, Wheeler MB. Uncoupling protein 2 and islet function. *Diabetes.* 2004; 53 (Suppl 1): S136-S142.
  - 14 Diehl AM, Hoek JB. Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control "the benefits of losing control". *J Bioenerg Biomembr.* 1999; 31(5): 493-506.
  - 15 Rashid A, Wu TC, Huang CC, Chen CH, Lin HZ, Yang SQ, Lee FY, Diehl AM. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology.* 1999; 29(4): 1131-1138.
  - 16 Chavin KD, Yang SQ, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, Walajtys-Rode E, Rashid A, Chen CH, Huang CC. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem.* 1999; 274(9): 5692-5700.
  - 17 Zheng PY, Ma ZS, Liu T, Xing LJ, Ji G. Effect of Jiangzhi Granulas on serum leptin and liver leptin receptor mRNA of nonalcoholic fatty liver disease rat. *Zhongguo Zhong Yi Yao Xin Xi Za Zhi.* 2008; 15(6): 36-38. Chinese with abstract in English. 郑培永, 马赞颂, 柳涛, 邢练军, 季光. 降脂颗粒对非酒精性脂肪肝模型大鼠血清瘦素及肝脏瘦素受体 mRNA 的影响. *中国中医药信息杂志.* 2008; 15(6): 36-38.
  - 18 Ma ZS, Liu T, Zheng PY, Xing LJ, Ji G. Effect of Chinese medicine Jiangzhi Granula on hepatic lipid of nonalcoholic fatty liver disease rats. *Zhonghua Zhong Yi Yao Xue Kan.* 2007; 25(5): 942-944. Chinese with abstract in English. 马赞颂, 柳涛, 郑培永, 邢练军, 季光. 降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏脂质的影响. *中华中医药学刊.* 2007; 25(5): 942-944.
  - 19 Zheng PY, Ma ZS, Hua YQ, Liu T, Xing LJ, Ji G. Effects of puerarin on expressions of leptin receptor mRNA, phosphorylated Janus kinase 2/phosphorylated signal transducers and activators of transcription 3 proteins in the liver of rats with non-alcoholic fatty liver. *J Chin Inter Med.* 2008; 6(9): 921-927. Chinese with abstract in English. 郑培永, 马赞颂, 花永强, 柳涛, 邢练军, 季光. 葛根素对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏瘦素受体 mRNA 和磷酸化 Janus 激酶 2/磷酸化信号转导与转录激活因子 3 的影响. *中西医结合学报.* 2008; 6(9): 921-927.
  - 20 Zhou DC, Piao HS, Qin WJ, Ye ZG. Research progress of *Swertia pseudochinensis* Hara. *Shizhen Guo Yi Guo Yao.* 2011; 22(2): 462-465. Chinese. 周大成, 朴惠善, 秦文杰, 叶祖光. 当药的研究进展.

- 时珍国医国药. 2011, 22(2): 462-465.
- 21 Zhou DC, Piao HS, Zhang SY, Zhang GP. Protective effects of *Swertia pseudochinensis* Hara extract on experimental liver injury. *Zhongguo Shi Yan Fang Ji Xue Za Zhi*. 2010; 16 (17): 125-128. Chinese with abstract in English.  
周大成, 朴惠善, 张思玉, 张广平. 当药提取物对鼠试验性肝损伤的保护作用. *中国实验方剂学杂志*. 2010; 16(17): 125-128.
- 22 Yu LC, Gu CH. Research progress of pharmacological effect of Silymarin. *Zhongguo Yi Yuan Yao Xue Za Zhi*. 2001; 21(8): 493-494. Chinese.  
于乐成, 顾长海. 水飞蓟素药理学效应研究进展. *中国医院药学杂志*. 2001; 21(8): 493-494.

## Effects of the mixture of *Swertia pseudochinensis* Hara and *Silybum marianum* Gaertn extracts on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats with non-alcoholic fatty liver disease

Zhi-min Mao<sup>1</sup>, Hai-yan Song<sup>1</sup>, Li-li Yang<sup>1</sup>, Tao Liu<sup>1</sup>, Dong-fei Li<sup>1</sup>, Pei-yong Zheng<sup>1</sup>, Ping Liu<sup>2</sup>, Guang Ji<sup>1,2</sup>

1. Institute of Digestive Disease, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

2. E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**OBJECTIVE:** To study the mechanism of liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in rats with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and the therapeutic effects of the extract mixture of Dangyao (*Swertia pseudochinensis* Hara) and Shuifeiji (*Silybum marianum* Gaertn) on NAFLD rats with liver injury.

**METHODS:** Male Wistar rats were randomized into normal control group, CCl<sub>4</sub> group, high-fat diet group, high-fat diet plus CCl<sub>4</sub> injection group (model group), diammonium glycyrrhizinate group and extract mixture group. Except the normal control and CCl<sub>4</sub> groups, rats were fed with high-fat diet (88% normal chow, 10% lard and 2% cholesterol) to induce NAFLD. Diammonium glycyrrhizinate and extracts were given by gavage. After eight weeks, a nonlethal dose of CCl<sub>4</sub> was injected intraperitoneally to all rats except the normal and high-fat diet groups. And 48 h later, all rats were sacrificed, and serum and liver tissues were collected for further study. Paraffin-processed liver tissue was stained with hematoxylin-eosin (HE) to observe the pathological changes. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured. The levels of triacylglycerol (TAG), malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in liver tissues were also examined. Expression of uncoupling protein 2 (UCP2) was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blotting.

**RESULTS:** Liver sections stained with HE showed that the histopathological changes in the normal control group and the CCl<sub>4</sub> group were mild; massive hepatosteatosis diffusing in lobules was shown in the high-fat diet groups; steatosis, hepatocellular ballooning degeneration and inflammatory infiltration were severe around the central vein in sections of the model group. Compared with the model group, hepatosteatosis and ballooning were significantly attenuated in the treatment groups. Levels of serum ALT and AST, contents of TAG and MDA and the UCP2 expression in liver tissues of the model group increased obviously, while the level of liver GSH decreased. Compared with rats in the model group, the above biomarkers in the treatment groups were improved significantly.

**CONCLUSION:** The mixture of Dangyao and Shuifeiji extracts can decrease the susceptibility and degree of liver injury induced by hepatotoxin in rats with NAFLD. Regulation of the balance of pro- and anti-oxidative stress factors is involved in the mechanism.

**KEYWORDS:** fatty live, non-alcoholic; liver injury; carbon tetrachloride; oxidative stress; plant extracts; rats