

田基黄总黄酮抗胆管结扎所致 大鼠肝纤维化的研究^{*}

王永刚¹, 谭沛², 李沛波¹, 徐冰², 苏薇薇¹, 陈周全², 彭维¹

(1. 中山大学生命科学学院//广州现代中药质量研究开发中心//广东省热带亚热带植物资源重点实验室,
广东 广州 510275;

2. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518110)

摘要: 采用胆总管结扎法制备肝纤维化大鼠模型, 对田基黄总黄酮抗大鼠肝纤维化作用进行了研究。从造模首日起, 灌胃给药, 每天给予田基黄总黄酮 (9、18、36 mg/kg) 1 次, 4 周后, 测定血清总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、透明质酸 (HA)、层粘连蛋白 (LN)、Ⅲ型前胶原 (PCⅢ)、TNF- α 水平及肝组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、丙二醛 (MDA)、羟脯氨酸 (Hyp) 的含量及 MMP-1、TIMP-1 蛋白的表达。结果表明, 田基黄总黄酮能显著降低胆总管结扎诱导的肝纤维化大鼠血清中 TBIL、DBIL、ALT、AST、PCⅢ、HA、LN 的水平、肝组织中 Hyp 的含量和 TIMP-1 蛋白的表达, 说明田基黄总黄酮具有良好的抗胆汁性肝纤维化的作用。此外, 田基黄总黄酮也能提高肝组织 SOD、GSH-Px 的活性, 降低肝组织 MDA 及血清中 TNF- α 的含量。田基黄总黄酮可抑制胆总管结扎诱导的大鼠肝纤维化的形成, 其抗肝纤维化作用可能与其抗氧化作用及抗 TNF- α 的分泌有关。

关键词: 田基黄总黄酮; 肝纤维化; 胆总管结扎

中图分类号: R961 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2016) 01-0012-04

Therapeutic effects of total flavonoids of *Hypericum japonicum* against liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats

WANG Yonggang¹, TAN Pei², LI Peibo, XU Bing², SU Weiwei, CHEN Zhouquan², PENG Wei

(1. Guangzhou Quality R&D Center of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of

Biocontrol and Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Resources,

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Limited Company, Shenzhen 518110, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the therapeutic effects of total flavonoids of *Hypericum japonicum* against liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats. Liver fibrosis model was established by bile duct ligation. After bile duct ligation, the treatment groups orally received total flavonoids of *Hypericum japonicum* (9, 18, 36 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) daily for 4 weeks. Then, rats were all executed. Serum and liver tissues were obtained. Serum levels of TBIL, DBIL, ALT, AST, HA, LN, PCⅢ, TNF- α and the activities of SOD, GSH-Px and the contents of MDA, Hyp, MMP-1 and TIMP-1 in liver tis-

^{*} 收稿日期: 2015-02-09

基金项目: 广东省科技计划重大专项资助项目 (2012A080202011); 广州开发区科技领军人才资助项目 (2015p-158)

作者简介: 王永刚 (1974 年生), 男; 研究方向: 天然产物 (岭南植物) 药物应用研究; E-mail: awad7476@163.com

sues were detected. Results showed that total flavonoids of *Hypericum japonicum* could significantly alleviate liver fibrosis, as indicated by decreasing levels of TBIL, DBIL, ALT, AST, HA, LN, PCⅢ, TNF- α , Hyp and TIMP-1. Moreover, total flavonoids of *Hypericum japonicum* could effectively enhance the activities of SOD, GSH-Px and decrease the content of MDA. Our results show that total flavonoids of *Hypericum japonicum* is effective in attenuating liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats, at least partly, via enhancing the activation of antioxidant enzymes and inhibiting release of TNF- α .

Key words: total flavonoids of *Hypericum japonicum*; liver fibrosis; bile duct ligation

肝纤维化是机体对物理、化学以及生物方面刺激引起的各种慢性肝损伤的一种修复反应，也是多种慢性肝病的共有病理变化^[1]，其中 25%~40% 最终会发展为肝硬化甚至肝癌^[2]，研究肝纤维化的形成机制及防治方法成为国内外生物学和医学领域的研究热点。

田基黄始载于《生草药性备要》，为藤黄科植物地耳草 *Hypericum japonicum* Thunb. 的干燥全草，民间多用其治疗急、慢性肝炎。田基黄具有保肝、抑菌、抗病毒、增强免疫、抑制肿瘤和防治心血管系统疾病等多种药理学作用^[3-4]。田基黄含内酯、香豆素、酚类、蒽醌、黄酮类、维生素 A 样物质及维生素 B1、B2、间环己三醇衍生物、色原酮苷衍生物、双苯吡酮类等成分^[5]。田基黄总黄酮是我们从田基黄中提取的有效部位（黄酮质量分数大于 50%）^[6]，目前正在按中药五类新药进行开发。笔者对田基黄总黄酮抗胆管结扎所致大鼠肝纤维化进行了研究，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物及试剂 田基黄总黄酮（黄酮质量分数为 63.5%）：系本课题组从田基黄（购自广州清平药材市场，经中山大学生命科学学院廖文波教授鉴定为藤黄科植物地耳草 *Hypericum japonicum* Thunb. 的干燥全草）中提取分离得到，为水煎煮后乙酸乙酯萃取得到；水飞蓟素胶囊：德国马博士大药厂生产；TBIL、DBIL、ALT、AST、SOD、MDA、GSH-Px、Hyp、GSH 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所；大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司；HA、LN、PCⅢ放免试剂盒购自上海海军医学研究所生物技术中心；MMP-1 ELISA 试剂盒购自上海凯博生化试剂有限公司；TIMP-1 ELISA 试剂盒购自上海远慕生物科技有限公司。

1.1.2 动物 SD 大鼠，SPF 级，180~220 g，雌雄各半，由广东省医学实验动物中心提供，动物合

格证号：SCXK（粤）2008-0002。

1.2 方法

取 SD 大鼠，随机分为 6 组，即正常对照组、模型对照组、阳性对照水飞蓟素组（50 mg/kg）；田基黄总黄酮低剂量组（9 mg/kg）、中剂量组（18 mg/kg）、高剂量组（36 mg/kg），每组 10 只。参照文献[7]的方法造模，各组大鼠按 4 mL/kg 的剂量腹腔注射体积分数为 10% 的水合氯醛溶液进行麻醉，暴露肝脏下胆管，结扎肝脏与胆管交界处和胆管与胰腺交界处，将两处中间的胆管剪除以造成完全胆管阻塞大鼠模型；正常对照组不作手术处理。从造模当天起，田基黄总黄酮低、中、高剂量组每天分别按剂量按每 100 g 体质量 1 mL 灌胃给予田基黄总黄酮 1 次，连续 28 d，水飞蓟素组给予水飞蓟素。末次给药 1 h 后，各组大鼠用乙醚轻度麻醉，心脏采血，取血清采用试剂盒检测 TBIL、DBIL、ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、TNF- α 水平；然后打开腹腔迅速取出肝组织并在生理盐水下清洗，匀浆后采用试剂盒检测 SOD、MDA、GSH-Px、Hyp，采用 ELISA 法检测 MMP-1 和 TIMP-1 蛋白的表达。

实验数据以“平均值 $\pm$ 标准差”表示，采用的统计软件 SPSS 16.0 进行统计学分析处理，组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）法， $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 实验结果

2.1 田基黄总黄酮对血清中肝功能指标 TBIL、DBIL、ALT、AST 的影响

由表 1 可见，与正常对照组比较，模型对照组大鼠血清中 TBIL、DBIL、ALT 和 AST 水平均显著升高（ $P < 0.01$ ），提示该模型大鼠的胆道梗阻明显，且肝细胞明显破坏。田基黄总黄酮低、中、高剂量组大鼠血清中 TBIL、DBIL、ALT 和 AST 的水平与模型对照组比较，差异均具有统计学意义（ $P < 0.01$ 或 0.05）。说明田基黄总黄酮能降低胆总管结扎所致肝纤维化大鼠的黄疸水平及肝损伤程度。

表 1 田基黄总黄酮对血清中肝功能指标 TBIL、DBIL、ALT、AST 的影响¹⁾ ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	TBIL	DBIL	ALT	AST
	($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
正常对照组	6.23 ± 1.14	3.86 ± 1.12	46.87 ± 13.29	98.76 ± 31.54
模型对照组	30.42 ± 5.19 ^{##}	20.35 ± 3.87 ^{##}	379.91 ± 71.07 ^{##}	568.93 ± 102.65 ^{##}
水飞蓟素组	14.35 ± 3.59 ^{**}	11.58 ± 3.01 ^{**}	149.22 ± 21.03 ^{**}	185.26 ± 34.11 ^{**}
田基黄总黄酮低剂量组	22.54 ± 2.43 [*]	13.21 ± 3.33 [*]	210.35 ± 43.18 [*]	324.11 ± 57.88 ^{**}
田基黄总黄酮中剂量组	15.27 ± 3.16 ^{**}	9.44 ± 2.36 ^{**}	189.03 ± 39.12 ^{**}	289.74 ± 76.34 ^{**}
田基黄总黄酮高剂量组	12.39 ± 2.68 ^{**}	5.68 ± 1.35 ^{**}	123.78 ± 21.86 ^{**}	196.34 ± 43.77 ^{**}

1) 与正常对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$

3.2 田基黄总黄酮对肝纤维化指标 PCⅢ、HA、LN、Hyp 的影响

由表 2 可见, 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠血清中 PCⅢ、HA、LN 含量和肝组织中 Hyp 含量均显著升高 ($P < 0.01$), 提示该模型大鼠具

有明显的肝纤维化病理改变。田基黄总黄酮低、中、高剂量组大鼠血清中 PCⅢ、HA、LN 含量和肝组织中 Hyp 含量与模型对照组比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 0.05), 提示田基黄总黄酮对胆总管结扎所致大鼠肝纤维化具有抑制作用。

表 2 田基黄总黄酮对肝纤维化指标 PCⅢ、HA、LN、Hyp 的影响¹⁾ ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effect of total flavonoids of *Hypericum japonicum* on serum levels of HA, LN, PCⅢ and Hyp contents in liver tissues ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	PCⅢ	HA	LN	Hyp
	($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
正常对照组	85.29 ± 17.82	187.37 ± 32.01	62.01 ± 14.56	165.28 ± 28.92
模型对照组	308.76 ± 42.18 ^{##}	502.32 ± 154.99 ^{##}	231.44 ± 32.90 ^{##}	603.28 ± 134.57 ^{##}
水飞蓟素组	190.32 ± 35.88 ^{**}	295.66 ± 51.49 ^{**}	112.50 ± 21.09 ^{**}	496.53 ± 114.57 [*]
田基黄总黄酮低剂量组	181.34 ± 27.81 ^{**}	302.67 ± 76.83 ^{**}	132.67 ± 28.74 ^{**}	447.35 ± 109.22 [*]
田基黄总黄酮中剂量组	168.83 ± 35.73 ^{**}	256.63 ± 39.08 ^{**}	103.32 ± 21.45 ^{**}	322.51 ± 62.18 ^{**}
田基黄总黄酮高剂量组	125.39 ± 25.57 ^{**}	223.04 ± 52.33 ^{**}	87.74 ± 18.93 ^{**}	212.37 ± 41.76 ^{**}

1) 与正常对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; ^{**} $P < 0.01$

3.3 田基黄总黄酮对肝组织 SOD、GSH-Px、MDA 及血清中 TNF-α 的影响

由表 3 可见, 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠肝组织 SOD、GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.01$), 而 MDA 含量明显提高 ($P < 0.01$), 提示肝纤维化模型大鼠肝脏的抗氧化水平显著降低, 氧化损伤明显。此外, 可通过多种机制参与肝纤维化过程调控的重要细胞因子 TNF-α 也显著升高 ($P < 0.01$)。而田基黄总黄酮低、中、高剂量组大鼠肝组织 SOD、GSH-Px、MDA 及血清中 TNF-α 与模型对照组比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 0.05)。说明田基黄总黄酮能提高肝纤维化模型大鼠肝脏的抗氧化能力, 显著降低肝脏的氧化损伤, 也能抑制 TNF-α 的分泌, 从而抑制肝纤维化的发展。

3.4 田基黄总黄酮对肝组织 MMP-1 和 TIMP-1 蛋白表达的影响

由表 4 可见, 与正常对照组比较, 模型对照组大鼠肝组织 TIMP-1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), 而肝组织 MMP-1 无明显变化 ($P > 0.05$), 提示肝纤维化模型大鼠肝脏的 TIMP-1 蛋白表达增加, 肝脏中细胞外基质分解减少。而田基黄总黄酮低、中、高剂量组大鼠肝组织 TIMP-1 蛋白表达与模型对照组比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 0.05)。说明田基黄总黄酮能抑制肝纤维化模型大鼠肝脏的 TIMP-1 蛋白表达, 显著促进肝脏中细胞外基质的分解。

表3 田基黄总黄酮对肝组织 SOD、GSH-Px、MDA 及血清中 TNF-α 的影响¹⁾ ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of total flavonoids of *Hypericum japonicum* on serum TNF-α levels, SOD and GSH-Px activities and MDA contents in liver tissues ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SOD	GSH - Px	MDA	TNF-α
	(U · mg ⁻¹)	(U · mg ⁻¹)	(nmol · mg ⁻¹)	(pg · mL ⁻¹)
正常对照组	147.92 ± 32.10	1009.87 ± 154.66	1.46 ± 0.21	98.04 ± 18.73
模型对照组	36.76 ± 10.28 ^{##}	289.03 ± 43.11 ^{##}	3.45 ± 0.53 ^{##}	378.99 ± 65.28 ^{##}
水飞蓟素组	75.26 ± 12.99 ^{**}	429.83 ± 128.65 [*]	2.03 ± 0.19 ^{**}	289.67 ± 59.84 [*]
田基黄总黄酮低剂量组	71.25 ± 12.38 ^{**}	530.91 ± 124.32 ^{**}	2.56 ± 0.23 ^{**}	236.65 ± 64.77 ^{**}
田基黄总黄酮中剂量组	89.81 ± 27.32 ^{**}	804.40 ± 190.24 ^{**}	2.11 ± 0.47 ^{**}	206.63 ± 43.28 ^{**}
田基黄总黄酮高剂量组	122.01 ± 17.63 ^{**}	932.84 ± 243.17 ^{**}	1.75 ± 0.24 ^{**}	187.62 ± 31.74 ^{**}

1) 与正常对照组比较：^{##}*P* < 0.01；与模型对照组比较：^{*}*P* < 0.05；^{**}*P* < 0.01

表4 田基黄总黄酮对肝组织 MMP-1 和 TIMP-1 蛋白表达的影响¹⁾ ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of total flavonoids of *Hypericum japonicum* on protein expression levels of MMP-1 and TIMP-1 in liver tissues ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	MMP-1	TIMP-1
	(ng · g ⁻¹)	(ng · g ⁻¹)
正常对照组	19.02 ± 4.32	210.03 ± 31.56
模型对照组	20.99 ± 3.78	699.64 ± 121.98 ^{##}
水飞蓟素组	18.67 ± 4.12	336.89 ± 90.12 ^{**}
田基黄总黄酮低剂量组	20.00 ± 3.21	420.98 ± 76.89 ^{**}
田基黄总黄酮中剂量组	17.98 ± 4.65	356.98 ± 52.10 ^{**}
田基黄总黄酮高剂量组	20.67 ± 2.09	319.77 ± 51.28 ^{**}

1) 与正常对照组比较：^{##}*P* < 0.01；与模型对照组比较：

^{*}*P* < 0.05；^{**}*P* < 0.01

4 讨 论

肝纤维化是是多种慢性肝病的共有病理变化。在各种致病因素作用下，静止期的肝星状细胞（HSC）被激活并增殖、转化为肌成纤维细胞样细胞，其细胞外基质（ECM）的合成和分泌上调，而降解减少，最终导致 ECM 积聚而发生肝纤维化乃至肝硬化^[8]。目前，肝纤维化的治疗主要是通过抑制炎症反应、减少 ECM 的增生和沉积、促进 ECM 降解以及改善微循环和代谢障碍、减少并发症等多个环节^[9]。氧化应激是肝纤维化发生、发展的重要因素之一。多种致肝损伤的因素往往伴随氧化水平的升高或者抗氧化能力的下降，氧化应激与肝纤维化病理机制之间的关系受到越来越多的重视^[10]。

本实验研究显示，田基黄总黄酮能显著降低胆管结扎诱导的肝纤维化大鼠血清中 TBIL、DBIL、ALT、AST、PCⅢ、HA、LN 的水平、肝组织中 Hyp 的含量和 MMP-1 和 TIMP-1 蛋白的表达，说明田基黄总黄酮具有良好的抗胆汁性肝纤维化的作用。此外，田基黄总黄酮也能提高肝组织 SOD、

GSH-Px 的活性，降低肝组织 MDA 及血清中 TNF-α 的含量，提示田基黄总黄酮抗肝纤维化作用可能与其抗氧化作用及抑制 TNF-α 的分泌有关。该实验为田基黄总黄酮抗肝纤维化的临床试验提供药理学实验依据。我们前期研究表明田基黄中槲皮苷、异槲皮苷和田基黄苷三个化合物具有保肝退黄作用^[11]，田基黄总黄酮抗肝纤维化作用是否与此类化合物有关，还需要进一步深入研究。

参考文献：

[1] ELLIS E L, MANN D A. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis [J]. Journal of Hepatology, 2012, 56(5):1171-1180.

[2] 孔维涵. 单味中药抗肝纤维化作用研究进展[J]. 天津药学, 2011, 23(2):68-68.

[3] 廖仰平, 赖岳晓, 叶建新, 等. 田基黄及其制剂的研究进展[J]. 中医药导报, 2012, 18(3):109-111.

[4] 林慧, 梅全喜, 孔祥廉, 等. 田基黄在肝病中的临床应用及药理作用研究概况[J]. 今日药学, 2011, 21(9):550-552.

[5] 毛羽, 王冲, 杜奕欣, 等. 田基黄主要成分抗缺氧活性的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5):1111-1112.

[6] WANG Ning, LI Peibo, WANG Yonggang, et al. Hepatoprotective effect of *Hypericum japonicum* extract and its fractions [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 116(1):1-6.

[7] 孙侠, 黄小琼, 钟海潮, 等. 四氯化碳、酒精与四氯化碳联合、胆管结扎致 SD 大鼠肝纤维化病理学比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(3):36-39.

[8] WELLS R G. Mechanisms of liver fibrosis: new insights into an old problem [J]. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 2006, 3(4):489-495.

[9] 梁健, 周小潇, 邓鑫, 等. 肝纤维化的临床研究进展[J]. 河北中医, 2012, 34(2):294-296.

[10] 李俊峰, 郑素军, 段钟平. 氧化应激在肝纤维化中的作用及治疗对策[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(17):1573-1578.

[11] 李沛波, 王永刚, 吴钉红, 等. 田基黄中三个黄酮类化合物保肝退黄作用的实验研究[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2007, 28(1):40-43.