

- atoma Hepa-1c1c7 cells. Cancer Letters, 1999; 138 : 131 ~ 137
- 13 Ridoux O, Di GC, Delmas F, et al. In vitro antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A (1), in association with pentamidine and amphotericin B. Phytother Res 2001; 15(4) : 298 ~ 301
- 14 Lin C, Tian S, Yi FW, et al. The anticancer effect and mechanism of α -hederin on breast cancer cells. International Journal of Oncology 2014; 45: 757 ~ 763
- 15 赵斌, 葛金芳, 朱娟娟, 等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC_{50} 的计算方法. 安徽医药杂志 2007; 11(9) : 834 ~ 836
- 16 Xu W, Zx L, Liang B, et al. A Plant triterpenoid, avicin D, induces autophagy by activation of AMPA-activated protein kinase. Cell Death Differ, 2007; 14: 1948 ~ 1957
- 17 Yu LJ, Drewes P, Gustafsson F, et al. A chemical genetics approach for

- the discovery of apoptosis inducers: from phenotypic cell based HTS assay and structure activity relationship studies, to identification of potential anticancer agents and molecular targets. Curr Med Chem 2006; 13: 2627 ~ 2644
- 18 Danial N, Kosmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell 2004; 116 : 205 ~ 219
- 19 Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? Biochem Biophys Res Commun, 1999; 266: 699 ~ 717
- 20 Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: Doubt no more. Biochim Biophys Acta, 1998; 1366: 151 ~ 165
- 21 Godbole A, Varghese J, Sarin A. VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal system. Biochim Biophys Acta. 2003; 1642 (122) : 87 ~ 96
- 22 Michael RD. Mitochondria in health and disease perspectives on a new mitochondrial biology. Mol Aspect Med 2004; 25(4) : 365 ~ 451

Research of anti-proliferative effect of α -hederin on colon cancer

Wang Guojuan¹, Yu Wenyan^{2**}, Guo Hongfei¹, Wu Huiyuan¹, Peng Linzhen¹, Xu Ting¹

(¹ Department of Oncology, the Hospital Affiliated to Jingxi University of TCM, Nanchang 330006;

² Research Center for Differentiation and Development of Basic Theory of TCM, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004)

Objective: To discuss the effect of α -hederin on apoptosis and proliferation of colon cancer. **Methods:** By microscopy, MTT, flow cytometry and Western Blot, the morphology, structure, proliferation, cell cycle, and apoptosis of LoVo cell of colon cancer was observed. **Results:** After administration, the morphology of colon cancer LoVo cell was changed. Inhibition rates on LoVo cells were significantly difference among 4.18 mg/L, 8.37 mg/L, 16.73 mg/L α -hederin groups, 9.23×10^{-3} g/L Oxaliplatin group, 8.37 mg/L α -hederin + 9.23×10^{-3} g/L Oxaliplatin group. Among the control group, 4.18 mg/L, 8.37 mg/L, 16.73 mg/L α -hederin group, 9.23×10^{-3} g/L Oxaliplatin group, 8.37 mg/L α -hederin + 9.23×10^{-3} g/L Oxaliplatin group, percentages of LoVo cells in G1 phase, G2 phase, S phase were not significant difference. Furthermore, apoptosis rates of LoVo cells in treatment groups were more outstanding than the control group. The relative expression quantity of LoVo cell caspase 3 significantly increased in treatment groups, compared with the control group. **Conclusion:** α -hederin could affect the morphology of LoVo cells, change cycle of LoVo cells, increase expression quantity of caspase 3, induce their apoptosis, and inhibit their proliferation. Simultaneously, there is a synergistic effect with chemotherapy drugs.

Key word α -hederin (α -常春藤皂苷); colon cancer; cell cycle; apoptosis; proliferation

基于 Microtox 技术的银杏内酯注射液质量控制初步研究*

李欢^{1,2}, 鄢良春², 李浩然^{2,3}, 孙毅⁴, 谭静⁴, 赵军宁^{1,2**}

(¹ 西南医科大学药学院, 泸州 646000; ² 四川省中医药科学院, 成都 610041;

³ 成都中医药大学, 成都 610072; ⁴ 成都百裕制药股份有限公司, 成都 610000)

摘要 目的: 探索 Microtox 技术应用于银杏内酯注射液质量控制检测。方法: 参照本实验室建立的中药注射剂微毒测试技术平台和方法, 首次以新鲜培养的费氏弧菌为测试菌种, 对 7 个不同批次银杏内酯注射液及其溶媒进行发光生物效应检测和生物质量控制研究。结果: 费氏弧菌发光强度随着时间变化呈现先降低后稳定的特点, 在平衡后的 15min ~ 60min 处于相对平稳状态。银杏内酯注射液溶媒 3 个批次的 IC_{50} 值分别为 (5.60 ± 0.39)%, (5.42 ± 0.22)%, (5.59 ± 0.10)%, 各批次比较差异无显著意义, 银杏内酯注射液 7 个批次的 IC_{50} 值分别为 (2.25 ± 0.46)%, (3.77 ± 0.65)%, (3.56 ± 0.55)%, (2.49 ± 0.40)%, (2.73 ± 0.30)%, (2.95 ± 0.55)%, (1.39 ± 0.11)%, 不同批次比较统计差异有显著意义。结论: 银杏内酯注射液对费氏弧菌的发光效应存在显著的浓度-效应关系, 部分批次之间 IC_{50} 值具有显著性差异, 提示 Microtox 技术不仅可以用于检测银杏内酯注射液综合生物效应大小, 同

* “重大新药创制”科技重大专项项目(2015ZX09501004-001-005); 四川省科技厅科技创新团队项目(2017TD0003); 四川省公益性科研院所基本科研业务专项(2017YSKY0010, A-2017N-36)。
** 通讯作者

时对于产品质量控制也有很好的应用前景。

关键词 银杏内酯注射液; Microtox 技术; 发光细菌; 质量控制
DOI:10.13412/j.cnki.zyyj.2017.04.013

银杏内酯注射液(Ginkgolide Injections)是由银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C 和白果内酯为主要成分制成的注射剂,具有活血化瘀、通经活络等功效,用于治疗中风病中中经络(轻度脑梗塞)恢复期淤阻血络证,症见半身不遂,口舌歪斜,言语蹇涩,肢体麻木等^[1]。随着银杏内酯注射液在临床的广泛使用,在其有效性得到公认的同时,近年来临床也观察到神经系统损害、皮肤及其附件损害、血管损害和出凝血障碍等不良反应^[1,2]。与其它中药注射剂类似,银杏内酯注射液按照现行药典标准进行质量控制,完全达到检测要求,但仍不能有效避免临床应用时不良反应或者毒副作用的发生。故探索和应用快速、敏感、可靠的新型毒性测试技术已经成为中药安全性评价,尤其是中药注射剂毒性与质量控制的技术瓶颈和大势所趋。

赵军宁等^[3]提出基于“功效-毒性-物质”的新型中药质量控制模式的思路与方法,将传统中药的功能主治与现代化药物化学、药理及毒理研究成果相结合,以最终建立多指标的质量控制与评价的新型方法体系。本研究探索将 Microtox 技术运用于银杏内酯注射液质量控制检测,为科学评价银杏内酯注射液的生物学毒性以及控制其质量提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验药物 银杏内酯注射液,由成都百裕制药股份有限公司提供,无色或浅黄色澄明液体,共 7 个批次,批号分别为 08160310、08150701、08150702、08150706、08150806、08150807、08150808;银杏内酯注射液溶媒,共 3 个批次,批号为 170301、170302、170303。

1.2 菌种 费氏弧菌冻干粉 CS234,北京滨松光子技术股份有限公司, -20℃ 避光冻存。

1.3 试剂 复苏稀释液、渗透压调节液,北京滨松光子技术股份有限公司。胰蛋白胍(批号 20160103)北京奥博星生物技术有限责任公司。MgSO₄·7H₂O(批号 2015110601)、NaH₂PO₄·H₂O(批号 20120313)、K₂HPO₄·3H₂O(批号 2015090101)、(NH₄)₂HPO₄(批号 2016053101)、甘油、琼脂粉(批号 2015051201)、酵母浸出粉、七水硫酸锌(ZnSO₄·7H₂O),成都科龙试剂有限公司。

1.4 仪器 LUMIStox 300 型生物毒性测试仪、LUMIS-therm 型预温槽和测试管,Dr. Bruno Lange GmbH 公司。摇床培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司。

1.5 方法

1.5.1 测试用菌液的制备 取费氏弧菌冻干粉于恒温恒湿箱(温度 15℃,湿度 75%)平衡 15 分钟后移至超净工作台,加入 1ml 无菌复苏稀释液,用移液枪轻轻吹匀,取 100μl 菌液稀释至 10⁻³ 浓度,取 10μl 10⁻³ 浓度的菌液涂布平板,于 23.5℃ 恒温培养箱培养 2~3 天,待于暗环境中肉眼可见蓝绿色荧光时,挑取发光强度好的单菌落,接种于装有 25ml 液体培养基(NaCl 3%, NaH₂PO₄·H₂O 0.61%, K₂HPO₄·3H₂O 0.275%, MgSO₄·7H₂O 0.0204%, (NH₄)₂HPO₄ 0.05%, 甘油 0.3%, 胰蛋白胍 0.25%, 酵母浸出粉 0.05%) 的离心管中培养,培养转速 180rpm,温度 23.5℃,时间 14~28h,培养至暗环境中肉眼可见蓝绿荧光时,

取 100μl 菌液测定细菌发光强度,当发光强度大于 8000 时将细菌转移至 EP 管中于 7000g 离心 15min,弃去上清液,用复苏稀释液重悬菌泥,轻轻吹散菌泥,混匀,于恒温恒湿箱中平衡 15min 后,取出放于 15℃ 预温槽 10min,即得测试用菌液,可用于受试样品测定。

1.5.2 费氏弧菌稳定性的考察 取测试用菌液 100μl(设 6 个平行管),测定初始发光强度,加入 1ml 复苏稀释液,测定 60min 内费氏弧菌发光强度的衰减情况。

1.5.3 银杏内酯注射液质量控制研究 根据预实验所得银杏内酯注射液 1~100% 抑制率的浓度范围,用蒸馏水配制银杏内酯注射液受试样品,浓度分别为 25%、20%、15%、12%、8%、5%、2.5%、1%,再以渗透压调节液(17:3)调节受试样品渗透压,制成待测样品溶液。以复苏稀释液为空白对照,空白对照和每个样品浓度均设置三个平行管,每批次样品重复测定 3 次。取测试用菌液 100μl 加入待测样品溶液 1ml,反应 10 min 后用生物毒性测试仪测定每管的发光强度。计算各浓度抑制率和 IC₅₀ 值,绘制相应的剂量-效应力曲线。

1.5.4 数据处理^[4,5] 费氏弧菌发光强度抑制率的计算见下式 1-4:

$$f_{kt} = I_{kt} / I_0 \quad \text{式(1)}$$

$$D = (\overline{f_{kt}} \pm f_{kt}) / \overline{f_{kt}} \times 100\% \quad \text{式(2)}$$

$$I_{ct} = I_c \times f_{kt} \quad \text{式(3)}$$

$$H_t = (I_{ct} - I_t) / I_{ct} \times 100\% \quad \text{式(4)}$$

注:式(1)中 I₀ 为对照管发光菌初始发光强度, I_{kt} 为对照管发光菌与复苏稀释液接触一定时间后的发光强度, f_{kt} 为发光系数。式(2)中 D 为发光系数的均值偏差, $\overline{f_{kt}}$ 为 3 个平行管 f_{kt} 的平均值。式(3)中 I_{ct} 为样品管发光菌加入样品前的发光强度, I_c 为样品管发光菌初始发光强度。式(4)中 I_t 为样品管发光菌与样品接触一定时间后的发光强度。

采用 SPSS 进行数据处理和统计分析,拟合样品浓度-效应曲线,计算样品的 IC₅₀ 值。

2 结果

2.1 费氏弧菌稳定性考察结果 由图 1 可见,费氏弧菌发光强度随着时间变化呈现先降低后稳定的特点,在平衡后的 15min~60min 处于相对平稳状态。

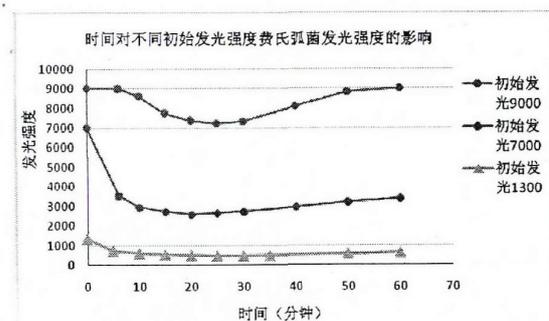


图 1 不同初始发光强度值的费氏弧菌发光强度随着时间变化呈现先降低后稳定的特点,在平衡后的 15min~60min 处于相对平稳状态

2.2 不同批次银杏内酯注射液及溶媒对费氏弧菌的 IC₅₀ 值
 由表 1 可见,银杏内酯注射液 7 个批次的 IC₅₀ 值分别为(2.25 ± 0.46) %、(3.77 ± 0.65) %、(3.56 ± 0.55) %、(2.49 ± 0.40) %、(2.73 ± 0.30) %、(2.95 ± 0.55) %、(1.39 ± 0.11) %。银杏内酯注射液 0815808 批次与其他 6 个批次比较,差异均具有显著

意义。0815701 批次与 0816310 批次、0815807 批次、0815806 批次比较,差异均具有显著意义。

由表 2 可见,银杏内酯注射液溶媒 3 个批次的 IC₅₀ 值分别为(5.60 ± 0.39) %、(5.42 ± 0.22) %、(5.59 ± 0.10) %,各批次比较差异无显著意义。

表 1 不同批次银杏内酯注射液对费氏弧菌的 IC₅₀ 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品批号	0816310	0815701	0815702	0815706	0815806	0815807	0815808
IC ₅₀ 值(%)	2.25 ± 0.46* ##	3.77 ± 0.65**	3.56 ± 0.55**	2.49 ± 0.40** ##	2.73 ± 0.30** ##	2.95 ± 0.55** #	1.39 ± 0.11

与 0815808 比较 * P < 0.05, ** P < 0.01; 与 0815701 比较 # P < 0.05, ## P < 0.01

表 2 不同批次溶媒对费氏弧菌的 IC₅₀ 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

批号	170301	170302	170303
IC ₅₀ 值	5.60 ± 0.39	5.42 ± 0.22	5.59 ± 0.10

2.3 不同批次银杏内酯注射液及溶媒对费氏弧菌的剂量-效应动力曲线图 见图 2、图 3。

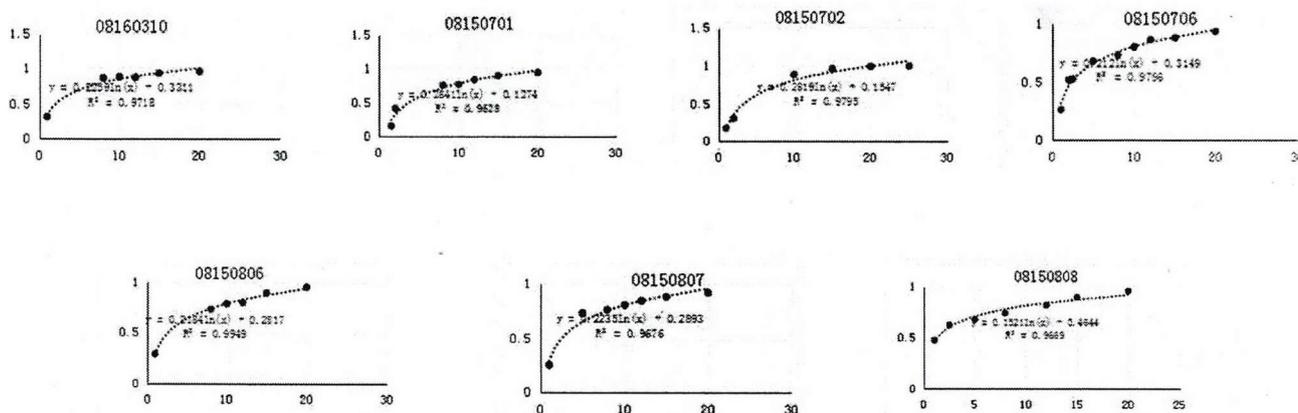


图 2 银杏内酯注射液剂量-效应动力曲线图

银杏内酯注射液对费氏弧菌的发光效应存在显著的浓度-效应关系, R² > 0.9

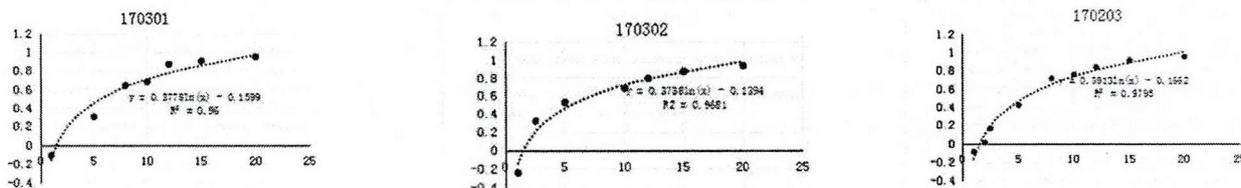


图 3 银杏内酯注射液溶媒剂量-效应动力曲线图

银杏内酯注射液溶媒对费氏弧菌的发光效应存在显著的浓度-效应关系, R² > 0.9

3 讨论

现代药理研究表明,银杏叶提取物中含有抗氧化、抗衰老、降压、促进血液循环、提高脑部功能、有效预防血栓的作用。银

银杏叶提取物也被制成各种制剂及膳食补充物广泛使用,美国药典和欧洲药典、中国药典都对银杏叶提取物如内酯类和黄酮类质量标准有严格的要求^[6]。因此银杏内酯作为口服制剂未见不良反应报道。而银杏内酯注射液,作为一种起效快,生物利用度高,疗效确切的新剂型,在临床上得到广泛应用,临床不良反应可见神经系统损害、皮肤及其附件损害、血管损害和出血障碍等。目前中药注射剂常用检测项目包括鉴别、性状、重金属、pH值、有关物质(蛋白质、鞣质、树脂、草酸盐、钾离子)、灼热残渣、热原或细菌内毒素、装量、无菌、不溶性微粒、含量测定、可见异物、降压物质、过敏反应检查、异常毒性、溶血与凝聚、有害元素、渗透压、聚山梨酯80、指纹图谱^[7,8]、5-HMF、大分子蛋白检查等,但仍然无法避免不良反应的发生。因此,有必要引入新的方法辅助其质量控制。

Microtox技术是一种以非致病细菌(费氏弧菌)作为试验对象,以其发光强度变化为检测指标的一种快速、便捷的生物毒性测试方法^[9-16]。发光细菌种类繁多,但是其发光原理基本相同,都属于酶促氧化反应^[4,17,18],主要参与物质有FMN、NAD(P)H、荧光酶、O₂、RCHO等,与发光细菌相关的代谢过程如图4。

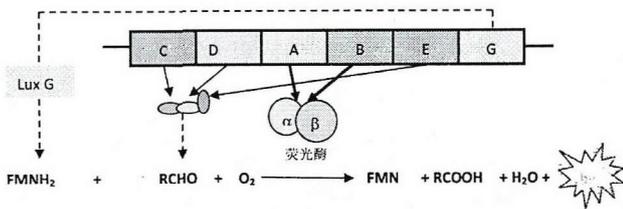


图4 发光细菌发光的原理图^[17]

操纵子上的Lux基因编码的各种酶参与细菌发光过程中的反应,产生蓝绿荧光。

该技术评价体系优点如下:①发光菌具有同高等生物类似的物理化学性质和酶作用过程特点,模拟性强,是一种综合毒性检测方法;②该方法为国际公认的客观可靠的方法,且方法简单,便于操作,重复性好;③反应灵敏度高,比一般生物反应细胞灵敏几个数量级;④可以同时获得多个定量参数,EC₅₀、标准毒物参比值、毒性剂量-效应动力曲线等多个定量参数的测定,综合表征上述注射剂毒性特点^[19-22]。

本研究首次使用新鲜培养的费氏弧菌对不同批次银杏内酯注射液及溶媒进行质量控制检测。研究表明,银杏内酯注射液对费氏弧菌的发光生物效应存在显著的浓度-效应关系,部分批次间IC₅₀值差异具有统计学意义($p < 0.05$),提示Microtox(微毒)技术可以用于检测银杏内酯注射液综合生物效应(毒性)检测,对于产品质量控制具有很好的应用前景。在下一步研究中应扩大受试样品数量,建立银杏内酯注射液质量控制微小毒性生物效应上下限值,为进一步控制银杏内酯注射液质量提供帮助。

参考文献

1 徐露,黄彦. 百裕银杏内酯注射液抑制家兔血小板聚集作用的实验

- 研究. 中国中医急症 2014; 23(4): 638 ~ 639 643
- 2 赵军宁, 鄢良春, 罗荔敏. 基于 Microtox 技术(微毒技术)的中药注射剂毒性早期发现与质量控制技术研究进展. 世界科学技术-中医药现代化 2016; 18(11): 1929 ~ 1934
- 3 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 戈登热治疗指南. 中国新药与临床药理 2016; 27(1): 138 ~ 142
- 4 熊静悦, 李孝容, 鄢良春, 等. 基于 Microtox 技术的中药注射剂微毒快速测试体系反应条件的优化与方法学的考察. 中国中药杂志 2016; 41(9): 1622 ~ 1626
- 5 熊静悦, 李孝容, 鄢良春, 等. Microtox 中药注射剂微毒测试体系明亮发光杆菌 502 和青海弧菌 Q67 发光反应条件的比较研究. 中药药理与临床 2016; 32(2): 227 ~ 230
- 6 郭瑞露, 李鹭, 李力更, 等. 天然药物化学史话: 银杏内酯. 中草药, 2013; 44(6): 641 ~ 645
- 7 章晨峰, 付小环, 毕宇安, 等. 银杏内酯注射液的 HPLC 指纹图谱研究. 中草药 2010; 41(10): 1637 ~ 1639
- 8 吕伏生, 陈伟, 冯芳, 等. ELSD 检测法测定银杏酮酯注射液中银杏内酯 A、B 的含量. 中国药科大学学报 2001; 32(1): 36 ~ 38
- 9 赵军宁, 鄢良春. 基于 Microtox 技术微毒测试的中药综合毒性快速评价. 世界中医药 2014; 9(2): 137 ~ 140 144
- 10 赵军宁, 鄢良春, 郑晓秋, 等. 一种快速检测中药综合毒性的生物测试方法. 中国: 201310572953.0 2013; 11 ~ 18
- 11 赵军宁, 鄢良春, 郑晓秋. 一种快速检测中药注射剂综合毒性的生物测试方法. 中国: ZL201310210195.8
- 12 赵军宁, 鄢良春, 郑晓秋, 等. 一种快速检测鱼腥草注射液综合毒性的生物检测方法. 中国: ZL201310369652.8
- 13 郑晓秋, 鄢良春, 赵军宁, 等. Microtox 技术检测鱼腥草注射液综合毒性的研究. 中药药理与临床 2013; 29(6): 92 ~ 95
- 14 赵军宁, 鄢良春, 朱雅宁, 等. 一种快速检测红花注射液综合毒性的生物测试方法. 中国: ZL201410113782.X
- 15 李孝容, 华桦, 鄢良春, 等. 苍耳子微毒测试(Microtox)与小鼠急性毒性的相关性研究. 中药药理与临床 2016; 32(2): 134 ~ 138
- 16 夏见英, 华桦, 鄢良春, 等. 基于 Microtox 技术快速检测苍耳子药材及其饮片、成方制剂毒性变化规律. 中药药理与临床 2016; 32(2): 151 ~ 154
- 17 Tinikul R, Chaiyen P. Structure, Mechanism, and Mutation of bacterial luciferase/ bioluminescence: fundamentals and applications in biotechnology - Volume 3. Springer International Publishing, 2014: 1 ~ 28
- 18 Meighen EA. Molecular biology of bacterial bioluminescence. Microbiological Review, 1991; 55(1): 123 ~ 142
- 19 Jingyue X, Xiurong Q, Huan L, et al. Biototoxicity based on microtox fast testing system and correlative material basis of Shenmai injection. Remedy Open Access 2016; 1: 1036
- 20 罗荔敏, 鄢良春, 卫天喜, 华桦, 祝勇军, 赵军宁. Microtox(微毒)技术应用于红花注射液综合毒性检测. 世界科学技术-中医药现代化, 2016; 18(11): 1935 ~ 1941
- 21 赵炳祥, 罗荔敏, 鄢良春, 华桦, 胡美, 赵军宁. Microtox 技术应用于参麦注射液综合毒性检测. 世界科学技术-中医药现代化 2016; 18(11): 1942 ~ 1947
- 22 罗荔敏, 鄢良春, 华桦, 祝勇军, 胡美, 赵军宁. Microtox 技术应用于生脉注射液综合毒性检测. 世界科学技术-中医药现代化 2016; 18(11): 1948 ~ 1953

Microtox assay for the quality control of Ginkgolide Injections

Li Huan¹, Yan Liangchun², Li Haoran^{2,3}, Sun Yi⁴, Tan Jing⁴, Zhao Junning^{1,2,*}¹ School of Pharmacy Southwest Medical University, Luzhou 646000; ² Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041; ³ Chengdu University of TCM 610072; ⁴ Chengdu Pharmaceutical Limited by Share Ltd 610000

Objective: To explore how microtox assay is applied to the quality control of Ginkgolide injections. **Methods:** Based on the optimal detection system of microtox assay for TCM injections established by our laboratory and freshly prepared *Vibrio fischeri*, we evaluated the luminous biological effect and the quality control of 7 batches of Ginkgolide injections and their vehicle. **Results:** The luminescence intensity of *Vibrio fischeri* decreased with the time prolonged, then tended to be stable state from 15 to 60 minutes. IC₅₀ values of 3 batches of ginkgolide vehicles were: (5.60 ± 0.39)%, (5.42 ± 0.22)%, (5.59 ± 0.10)% respectively, there was no significant difference among these batches (P > 0.05). IC₅₀ values of 7 batches of ginkgolide injections were (2.25 ± 0.46)%, (3.77 ± 0.65)%, (3.56 ± 0.55)%, (2.49 ± 0.40)%, (2.73 ± 0.30)%, (2.95 ± 0.55)%, (1.39 ± 0.11)% respectively, differences were significant comparing Batch 0815808 with other 6 batches (P < 0.05 or 0.01); differences among Batch 0816310, 0815807, 0815806 and Batch 0815701 were obviously (P < 0.05 or 0.01, table 1). **Conclusion:** There is a significant concentration-effect relationship of ginkgolide injections, and IC₅₀ values of some batches are significant different. Our data suggested that microtox assay could be applied to not only the biological effect of ginkgolide injections, but also the quality control of medicine products.

Key words Ginkgolide Injections (银杏内酯注射液); microtox assay; Luminescent bacteria; quality control

苦瓜皂苷改善非酒精性脂肪肝大鼠中氧化应激的作用研究

刘波, 翟玉荣, 丁汀汀, 罗建周, 高原
(遵义医学院珠海校区, 珠海 519041)

摘要 目的: 探讨苦瓜皂苷对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏的保护作用及通过减轻氧化应激缓解非酒精性脂肪性肝病的情况。方法: 60 只雄性 SD 大鼠随机分为 6 组, 空白对照组 (n = 10) 给予普通饲料喂养, 非酒精性脂肪性肝病模型组 (n = 10)、多烯磷脂酰胆碱治疗组 (50mg/kg · d, n = 10) 以及苦瓜皂苷 (25 mg/kg · d, n = 10)、(50 mg/kg · d, n = 10) 以及 (100 mg/kg · d, n = 10) 治疗组给予高脂饲料喂养 4 周后, 测定大鼠肝功能、空腹血糖、胰岛素、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白 (LDL-C)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 含量; HE 染色后光镜观察肝脏病理变化; 分别采用 RT-qPCR 和 Western blot 法检测 Nrf2 和 HO-1 的表达水平。结果: 与模型组比较, 苦瓜皂苷 (50 mg/kg) 和 (100 mg/kg) 组胰岛素抵抗指数、AST、ALT、TG、TC、LDL-C 和 MDA 水平均明显降低, SOD 和 GSH 水平升高; HE 染色显示各大鼠肝细胞脂肪变性明显减少, 肝细胞排列趋于规则; RT-qPCR 与 Western Blot 结果显示 Nrf2 和 HO-1 表达明显升高。结论: 苦瓜皂苷可降低非酒精性脂肪性肝病大鼠胰岛素抵抗、血脂, 减轻肝细胞脂肪变性, 其作用机制可能与缓解机体氧化应激有关。

关键词 苦瓜皂苷; 非酒精性脂肪性肝病; 氧化应激; Nrf2; HO-1

DOI:10.13412/j.cnki.zyyj.2017.04.014

脂肪肝 (fatty liver) 是临床上一种常见的慢性肝脏疾病, 其病因多种多样, 病理上一般表现为肝脏脂肪 (多为甘油三酯) 堆积。按照发病机制分类, 脂肪肝可分为酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)、病毒性脂肪肝、药物性脂肪肝以及由特殊病因所导致的脂肪肝等^[1]。非酒精性脂肪性肝病指的是排除由酒精和其他对肝脏有明确伤害的因素所引起的, 以肝细胞内过度沉积脂肪颗粒为主要病征的临床病理综合症, 如不及时治疗可发展为肝炎以及肝硬化^[2,3]。且临床数据显示, 非酒精性脂肪性肝病是慢性肝病发病的重要因素, 仅次于病毒性肝炎, 居第 2 位。目前, 非酒精性脂肪性肝病的发病率呈逐年上升趋势, 在发达国家的发病率已达到 20% ~ 30%, 而非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 的发病率则为 10% ~ 20%, 其中 2% ~ 3% 会发展为肝硬

化^[4]。关于非酒精性脂肪性肝病的发病机制, 现在普遍接受的是 "二次打击学说", 其中一次打击是由于胰岛素抵抗所引起的肝脏脂质沉积, 接着是氧化应激、脂质过氧化、炎症、肝细胞坏死、内质网应激以及肝纤维化所导致的二次打击^[5-7]。近年来, 越来越多研究发现, 氧化应激与非酒精性脂肪性肝病的发生发展密切相关, 而我们前期研究发现苦瓜提取物含有多种活性化学成分且具有显著提高免疫力、抗氧化、降血糖及抗肿瘤等的生理效果, 其中苦瓜皂苷 (momordica saponins, MS) 是最重要的活性成分之一^[8,9]。本文研究了苦瓜皂苷对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏的保护作用, 并从核转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2 related factor 2, Nrf2) /血红素加氧酶 (heme oxygenase, HO) -1 信号途径探讨苦瓜皂苷通过减轻大鼠体内氧化应激反应, 缓解非酒精性脂肪性肝病的分子机制。