

# 黄芩水煎液及黄芩苷抗大鼠肝纤维化药效作用比较研究

孟洪宇<sup>1</sup> 常虹<sup>2</sup>

(1 黑龙江中医药大学中医学院, 哈尔滨, 150040; 2 包头医学院药学院, 包头, 014060)

**摘要** 目的:探讨比较黄芩水煎液及黄芩苷对肝纤维化大鼠的防治作用及量效关系。方法:采用皮下注射四氯化碳(CCL<sub>4</sub>)8周诱导大鼠肝纤维化模型,并同时灌胃给予高、中、低剂量的黄芩水煎液及黄芩苷,给药结束后,检测大鼠肝脏病理组织形态;试剂盒检测肝脏HYP,血清肝功能指标(ALT、AST、ALP、GGT)及肝组织匀浆及血清SOD、MDA水平;放免法检测血清肝纤维化指标(HA、PC-III、C-IV及LN)。结果:与模型组比较,中、低剂量黄芩水煎液及黄芩苷均能有效改善大鼠肝功能,降低血清HA、LN、PC III水平及肝脏HYP含量,提高血清及肝组织SOD,降低MDA水平,并尤以低剂量组作用佳,但黄芩水煎液高剂量组具有加重肝损伤趋势。结论:中、低剂量黄芩水煎液及黄芩苷均能有效改善大鼠肝纤维化,其机制可能与其抗氧化能力有关。

**关键词** 黄芩水煎液;黄芩苷;肝纤维化

## Comparison Study on Inhibitory Effects of Raix Scutellariae Decoction and Baicalin on Hepatic Fibrosis Rats

Meng Hongyu<sup>1</sup>, Chang Hong<sup>2</sup>

(1 Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2 School of Pharmacy, Baotou Medical College, Baotou 014060, China)

**Abstract Objective:** To study the therapeutic effect and dose-effect relationship of Raix Scutellariae decoction and Baicalin on hepatic fibrosis (HF) rats. **Methods:** HF rat model was established by subcutaneous injection of CCL<sub>4</sub> for 8 weeks. Meanwhile, different doses of Raix Scutellariae decoction and Baicalin were administered. Histomorphology of liver tissue was observed. Liver HYP from hepatic tissue, the serum levels of ALT, AST, ALP, GGT, the liver and serum levels of SOD and MDA were detected by Kit. The liver fibrosis indexes including HA, PC-III, C-IV and LN were measured by radioimmunoassay. **Results:** As compared with those in model group, the liver content of HYP, the serum levels of HA, LN, PC III, the serum and liver levels of MDA, SOD were significantly changed in middle and low dose of Raix Scutellariae decoction and Baicalin groups, which also could significantly improve hepatic function. Additionally, the middle and low dosages were beneficial. However, the high dosage of Raix Scutellariae decoction could obviously aggravate liver injury. **Conclusion:** Middle and low dose of Raix Scutellariae decoction and Baicalin can effectively improve HF in rats and the action may be completed by antagonizing lipid peroxidation.

**Key Words** Raix Scutellariae decoction; Baicalin; Hepatic fibrosis

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.03.039

肝纤维化主要是指各种致病因子所致肝内结缔组织异常增生,导致肝内弥漫性细胞外基质过度沉积的一种病理过程<sup>[1]</sup>。它是肝硬化及各种终末期肝病复杂病症发生的基础,但也是其早期可逆阶段<sup>[2]</sup>。因此,开发安全有效的抗肝纤维化药物进行早期防治,甚至逆转肝纤维化已成为亟需解决的问题。黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根,具有清热燥湿,泻火解毒等功效<sup>[3]</sup>;临床常用清肝胆湿热,为黄疸常用药<sup>[4]</sup>。黄芩具有抗炎、抗菌、保护肝脏等广泛的药理活性,研究证实黄芩具

有显著的抗纤维化作用,但多数研究集中于黄酮类有效成分黄芩苷<sup>[5-8]</sup>,其他有效成分如多糖类等也亦有较强活性如抗氧化作用<sup>[9]</sup>,因此本实验通过比较不同剂量黄芩水煎液及黄芩苷对肝纤维化的防治作用,以及相应的量效关系,为开发抗纤维化药物及黄芩临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠90只,体重170~200g,购自北京大学医学部(实验动物科学部),

基金项目:内蒙古自然科学基金项目(2017MS0813);包头医学院科学研究基金项目(BYJJ-QM 201652)

作者简介:孟洪宇(1988.10—),女,在读博士研究生,研究方向:中医理论体系研究,E-mail:menghyhy@126.com

通信作者:常虹(1985.12—),女,博士,讲师,研究方向:中药药理,E-mail:changhong\_cool@163.com

许可证号 SCXK(京)2011-0012。

1.1.2 药物 黄芩饮片(批号 14101608,内蒙古腾翔中药饮片公司);黄芩苷(批号 20150306,西安沃森生物科技有限公司);水飞蓟素胶囊(批号 131102819,德国博士大药厂); $\text{CCL}_4$ (批号 20091217,天津市北方天医化学试剂厂);特级初榨橄榄油(批号 20150123,山东鲁花集团有限公司);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转氨酶(GGT)试剂盒均购自美国贝克曼公司;超氧化物歧化酶(SOD,批号 20150505)、丙二醛(MDA,批号 20150421)、羟脯氨酸(HYP,批号 20150527)、总蛋白定量测定(批号 20150519)试剂盒均购自南京建成;HA、LN、PCⅢ、CⅣ(批号 20151020,北京北方生物技术研究所有限公司)。

1.1.3 试剂与仪器 AU640 全自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司);XH6080 放免仪(西安核仪厂);酶标仪(美国赛默飞);NP-T 生物组织自动脱水机(孝感市诺普电子科技有限公司);NP-B 型生物组织包埋机(孝感市诺普电子科技有限公司);RM2235 切片机(德国徕卡公司);CX31 显微镜(日本奥林巴斯公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将 90 只大鼠适应饲养 1 周后,按体重随机分为 9 组,每组 10 只。分别为对照组、模型组、黄芩水煎液高(De-h)、中(De-m)、低(De-l)剂量组,黄芩苷高(Bai-h)、中(Bai-m)、低剂量组,阳性对照水飞蓟素(Y)组。模型组及各给药组大鼠按 3 mL/kg(首次 5 mL/kg)腹部皮下注射 40%  $\text{CCL}_4$  橄榄油液,2 次/周,持续 8 周;对照组注射等量橄榄油液。造模同时给药,De-h、De-m、De-l 组分别以 3 g/kg、6 g/kg、12 g/kg 灌胃给予黄芩水煎液;Bai-h、Bai-m、Bai-l 分别以 25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 给予黄芩苷水溶液;Y 组以 50 mg/kg 灌胃给药;模型组和对照组按大鼠体重 5 mL/kg 灌胃给予生理盐水。

1.2.2 检测指标与方法 1)病理组织学检查:各实验组待 8 周实验结束,麻醉处死后于肝右叶中部切取 1.0 cm × 1.0 cm × 0.3 cm 大小肝组织一块置于多聚水合氯醛中固定;进行石蜡包埋,常规切片,行苏木精伊红染色(HE)染色,光镜下观察切片情况,描述肝脏病理变化。2)肝功能指标检测:实验 8 周后,腹主动脉取血,4 ℃,3 000 r/min 离心,分离上层血清,以全自动生化仪进行检测。3)肝纤维化指标

检测,放免法检测 HA, LN, PCⅢ 及 CⅣ。4)肝组织 HYP 检测:比色法测定肝组织匀浆 HYP,以酶标仪进行测定。5)抗氧化指标的测定:酶标仪检测血清及肝组织 MDA 及 SOD。所有操作均严格按照试剂盒说明进行。

## 2 结果

2.1 大鼠一般情况 正常组大鼠精神状态良好,体重稳定增加;模型组大鼠第 2 周精神萎靡、体毛蓬松、进食减少、大便稀溏,体重增长缓慢,4 周之后,大鼠精神状态改善,但皮肤出现溃烂;黄芩水煎高剂量组前 2 周大鼠尿量增加,大便稀溏,体重下降,体毛发黄,随后逐渐改善,体重增长稳定;黄芩水煎中、低剂量组,黄芩苷各剂量组及水飞蓟素组大鼠精神状态较模型组有改善。

### 2.2 黄芩对肝纤维化大鼠肝组织形态影响

2.2.1 肝组织大体形态改变 对比实验第 8 周时各组肝组织形态,结果显示正常对照组大鼠肝脏颜色鲜红,质嫩;模型组肝脏表面颗粒样变严重,有花斑样改变,质硬,边缘钝有些大鼠肝脏甚至由于产生大量再生结节与其他脏器黏连。各给药组情况较模型组改善。

2.2.2 HE 染色分析 图 1 为 HE 染色结果:对照组大鼠肝组织结构清晰,肝细胞排列整齐。模型组大鼠肝脏汇管区周围纤维化并且大量增生,将肝小叶分割包绕成假小叶,肝细胞脂肪变性、坏死,并有炎性细胞浸润;De-h 组(图 1C)肝组织结构未见改善,仍有假小叶,但 De-m、De-l 组(图 1D, E)大鼠肝小叶结构均有不同程度的改善,尤以低剂量组效果佳。黄芩苷各剂量组(图 1F, G, H)大鼠肝脏肝小叶结构也得到修复,胶原纤维增生减少,仍以中、低剂量改善程度佳。阳性药物(图 1)水飞蓟素组虽得到改善,但效果低于黄芩水煎液及黄芩苷中、低剂量组。提示黄芩对肝脏具有一定保护作用,可减少胶原的增生,减轻肝损伤,但要注意剂量的选择。

2.3 黄芩对肝纤维化大鼠肝功能指标 ALT、AST、ALP、GGT 的影响 图 2 结果显示,模型大鼠各血清指标较对照组均显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组均能显著降低血清 ALP 水平,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且 Bai-l 组与对照比较差异无统计学意义,但 De-l 组则加重肝纤维化大鼠 ALT,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示高剂量黄芩水煎液有肝损伤作用;De-l、Bai-l 组均可有效降低 AST 水平(分别  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且 Bai-l 组与对照组比较,差异无统计学意义;Bai-

m、Bai-l 及阳性药物组可有效降低 GGT 水平(分别  $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$ ), 且与正常对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。从黄芩对这些肝功能指标的影响结果可见, 中、低剂量黄芩水煎液及黄芩苷均能有效改善大鼠肝脏功能, 尤以低剂量组效果最佳, 且综合比较优于阳性药物组, 但高剂量的黄芩水煎液可能具有肝损伤作用, 与病理结果一致。

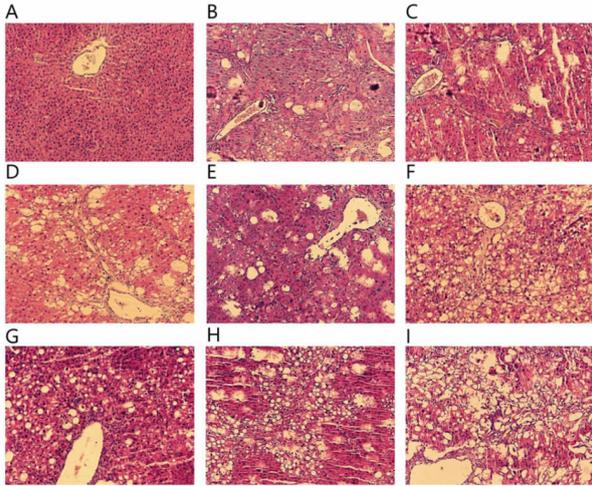


图1 肝组织 HE 染色病理形态结果(100 倍)

注:(A)对照组;(B)模型组;(C-E)黄芩水煎液高、中、低剂量组;(F-H)黄芩苷高、中、低剂量组;(I)阳性药物组。与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

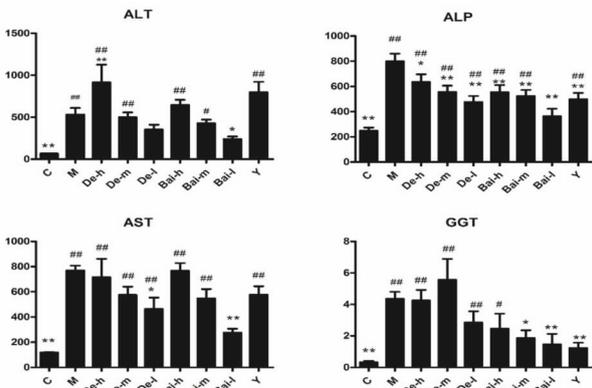


图2 不同组对肝纤维化大鼠血清 ALT、AST、ALP、GGT 的影响

注:与对照组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ;与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

2.4 黄芩对肝纤维化大鼠血清 HA, LN, PC III 及 CIV 的影响 图3结果显示, 与对照组比较, 模型组血清 HA、LN、PC III 及 CIV 水平显著增高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, De-l、Bai-m、Bai-l 组及阳性药物组均能显著降低血清 HA 水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且与正常组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但 Bai-h 组则显著增高 HA 水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与模型组比较,

仅 Bai-l 组及阳性药物组能够显著降低 LN 水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 并且黄芩苷低剂量组与正常对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 优于阳性药物组; De-l、Bai-m、Bai-l 组及阳性药物组与模型组比较, 均能显著降低 PC III 水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

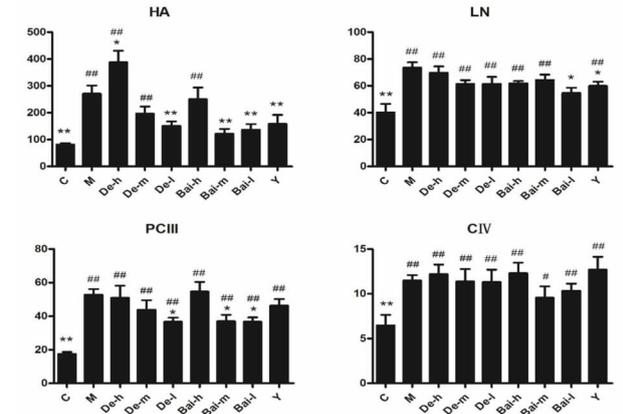


图3 不同组对肝纤维化大鼠血清 HA, LN, PC III 及 CIV 的影响

注:与对照组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ;与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

2.5 黄芩对肝纤维化大鼠肝组织 HYP 的影响 图4结果显示与正常组比较, 模型组大鼠 HYP 值显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组除 De-h、Bai-h 组, 其余各组均能显著降低 HYP 水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

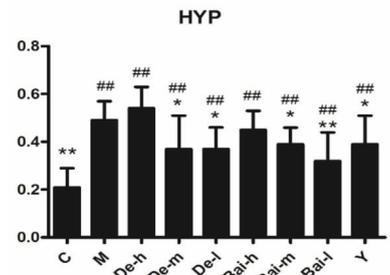


图4 不同组对肝纤维化大鼠肝组织 HYP 的影响

注:与对照组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ;与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

2.6 黄芩对肝纤维化大鼠血清及肝组织匀浆 SOD, MDA 的影响 图5结果显示, 与对照组比较, 模型组血清和肝组织 SOD 显著降低, 血清和肝组织 MDA 水平显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 黄芩水煎液及黄芩苷各剂量组能够显著降低血清及肝组织 MDA 水平( $P < 0.01$ ), 除 De-h 组, 各组均能显著提高血清及肝组织 SOD 水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。虽 De-h 组未能显著提高肝纤维化大鼠抗氧化能力, 但仍有改善趋势, 与病理

及血清肝纤维化指标所示结果不呈正相关,根据实验结果,推测黄芩能够通过抗氧化作用,改善肝功能和肝纤维化。

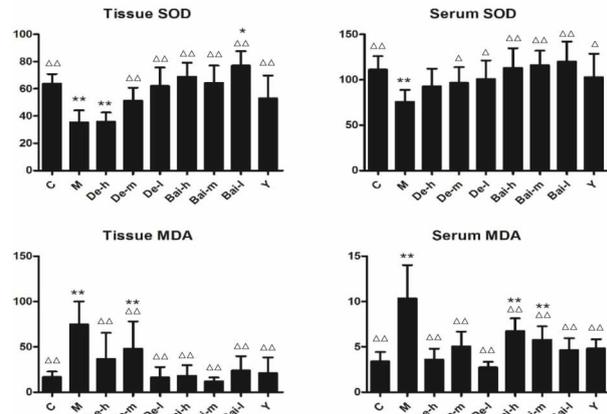


图5 不同组对肝纤维化大鼠肝组织及血清SOD、MDA的影响

注:与对照组比较, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01; 与模型组比较, Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01

### 3 讨论

肝纤维化是由于胶原为主的细胞外基质 (ECM) 在肝内合成与降解失衡,造成过多沉积而形成<sup>[10]</sup>。透明质酸 (HA)、层黏连蛋白 (LN)、Ⅲ型前胶原蛋白 (PC Ⅲ)、Ⅳ型前胶原蛋白 (C Ⅳ) 是构成 ECM 的主要成分,其中 HA 属于 ECM 中蛋白多糖,能较早反映肝细胞损伤,是反映肝纤维化的敏感指标;LN 是一种细胞外基质非胶原糖蛋白;PC Ⅲ 是 ECM 的主要成分,能够较好的反映肝纤维化程度,也是目前研究最多反映肝纤维化活动性的血清标志物;C Ⅳ 是基底膜的主要成分<sup>[11]</sup>。这 4 个指标联合能较为客观的反映肝纤维化程度,用于临床纤维化疾病的诊断与疗效评价。HYP 为胶原蛋白分子所特有,约占胶原蛋白氨基酸总量的 13.4%,它的含量可以反映胶原代谢情况而直接反映肝脏纤维化程度<sup>[12]</sup>。实验结果表明一定剂量的黄芩水煎剂及黄芩苷能够不同程度的降低血清 HA、LN、PC Ⅲ 水平,尤以 Bai-l 组最佳,其中 De-h 更加重 HA 升高,可能为其加重肝纤维化的机制之一。黄芩水煎液和黄芩苷的中、低剂量组及阳性药物组能够不同程度的降低 HYP 水平,尤以黄芩苷低剂量组最佳。推测中低剂量的黄芩能够通过减少 ECM 过度堆积,发挥抗肝纤维化作用。同样作为诊断肝纤维化“金标准”的病理结果同样显示,除 De-h 组,各给药组均有不同改善,且黄芩苷高剂量组作用低于黄芩苷中低剂量组,提示对于黄芩苷及黄芩水煎液均有抗纤维化作用,但不与剂量呈正相关,大剂量可能有肝损伤,应

用时应注意量的选择。

氧化应激是纤维化发生的重要机制,当细胞受损时会释放活性氧物质,引起炎症反应细胞浸润,释放众多促纤维化因子,而引起的 ECM 的堆积<sup>[13]</sup>。SOD 是机体内广泛存在的一类重要的过氧化物分解酶,是机体抗过氧化能力指标之一。MDA 是一种氧化应激因子是脂质过氧化的最终产物。因此本实验通过检测药物对模型大鼠提升 SOD、清除 MDA 的能力,来评价药物抗氧化能力,揭示其机制。实验结果表明,黄芩水煎剂及黄芩苷组各剂量均能降低肝纤维化大鼠血清和肝组织 MDA 水平,除 De-h 组均能提高血清及肝组织 SOD 水平;提示黄芩能够通过抗氧化作用抗肝、肺纤维化。

本研究通过对比黄芩水煎液及黄芩苷对肝纤维化大鼠作用,发现中、低剂量黄芩具有良好的抗纤维化作用,总体而言,黄芩苷优于水煎液,其作用机制及大剂量肝损伤机制有待深入研究。

### 参考文献

- [1] 滕鹏,曹文富,唐书娟. 中西医结合治疗肝纤维化研究进展[J]. 实用中医药杂志,2015,31(4):355-356.
- [2] Ismail MH, Pinzani M. Reversal of liver fibrosis[J]. Saudi J Gastroenterol, 2009, 15(1):72-79.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:302.
- [4] 王洪玉,苑艺蕾,陈平平,等. 黄芩解热抗炎作用有效组分筛选的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2016,32(5):542-545.
- [5] 洪川. 中药黄芩的化学成分及药理研究进展[J]. 化工管理,2017(2):204.
- [6] 常虹,郭凯,孟洪宇,等. 中药有效成分作用于肝星状细胞抗肝纤维化分子机制研究进展[J]. 中国现代中药,2017,19(1):148-153.
- [7] 朱庆均. 黄芩苷与黄芩素治疗纤维化疾病研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(7):1271-1276.
- [8] 刘志勇,叶军,薛东英. 黄芩苷对肝纤维化大鼠相关细胞因子表达的影响[J]. 中国当代医药,2013,20(12):18-21.
- [9] 刘梦杰,王飞,张燕,等. 黄芩多糖的体内抗氧化活性[J]. 中国食品学报,2016,16(7):52-58.
- [10] Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story[J]. Gut, 2015, 64(5):830-841.
- [11] 杜伟,单幼兰,廖权利,等. HA、P Ⅲ NP、LN、C Ⅳ 在慢性肝病及肝纤维化诊断中的临床意义[J]. 重庆医科大学学报,2013,38(5):530-533.
- [12] Okuno H, Hazama H, Murase T, et al. Drug metabolizing activity in rats with chronic liver injury induced by carbon tetrachloride: relationship with the content of hydroxyproline in the liver[J]. Jpn J Pharmacol, 1986, 41(3):363-371.
- [13] 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.