

- [6] WANG J, LIU Y, WANG X, et al. miR-1266 promotes cell proliferation, migration and invasion in cervical cancer by targeting DAB2IP [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864 (12): 3623-3630.
- [7] 张展, 王金铭, 刘月华, 等. 微小RNA-26 a靶向调控高迁移率族蛋白A1抑制宫颈癌细胞迁移、侵袭的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(10): 778-784.
- [8] ZHENG L, JIAO W, SONG H, et al. miRNA-558 promotes gastric cancer progression through attenuating Smad4-mediated repression of heparanase expression [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(9): e2382. DOI: 10.1038/cddis.2016.293.
- [9] LI Y, ZHENG F, XIAO X, et al. CircHIPK3 sponges miR-558 to suppress heparanase expression in bladder cancer cells [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(9): 1646-1659.
- [10] Qu H, Zheng L, Song H, et al. microRNA-558 facilitates the expression of hypoxia-inducible factor 2 alpha through binding to 5'-untranslated region in neuroblastoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (26): 40657-40673.
- [11] QU H, ZHENG L, PU J, et al. miRNA-558 promotes tumorigenesis and aggressiveness of neuroblastoma cells through activating the transcription of heparanase [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(9): 2539-2551.
- [12] PAN H, PENG Z, LIN J, et al. Forkhead box C1 boosts triple-negative breast cancer metastasis through activating the transcription of chemokine receptor-4 [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(12): 3794-3804.
- [13] 李倩, 任琛琛, 杨立, 等. 上皮性卵巢癌组织中FOXO1 mRNA表达变化及其启动子区甲基化情况观察[J]. *山东医药*, 2015, 55(38): 21-23.
- [14] 黄玲, 任琛琛, 杨立, 等. 上皮性卵巢癌组织中FOXO1的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2017, 57(13): 13-16.
- [15] 任琛琛, 刘迦希, 杨立, 等. 上调FOXO1的表达对SKOV3细胞增殖及侵袭的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2017, 52(3): 271-274.

(收稿日期: 2019-06-17, 修回日期: 2019-07-23)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.10.008

◇ 药学研究 ◇

茵陈五苓散对实验性梗阻性黄疸大鼠肝损伤的保护作用

张伟¹, 赵卫华¹, 徐云兴¹, 王红坡²作者单位:¹郑州煤炭工业(集团)有限责任公司总医院药剂科, 河南 郑州 452370;²新乡医学院第一附属医院磁共振科, 河南 卫辉 453100

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(15A320010)

摘要: **目的** 探究茵陈五苓散对实验性梗阻性黄疸大鼠肝损伤的保护作用。 **方法** 2017年1月至2019年5月, 60只SD大鼠, 选取45只制成实验性梗阻性黄疸大鼠模型, 剩余15只为对照组, 45只模型大鼠按照随机数字表法分为: 模型组、低剂量茵陈五苓散组(10 g·kg⁻¹·d⁻¹)和高剂量茵陈五苓散组(20 g·kg⁻¹·d⁻¹)每组各15只; 实验组使用对应浓度茵陈五苓散灌胃, 对照组和模型组使用等量生理盐水灌胃, 持续15 d。使用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清总胆红素(TBIL)和内毒素(ET)水平; 使用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠肝组织匀浆丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量水平; 使用蛋白质印记法检测各组大鼠肝组织凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤-2蛋白(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天门冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase-3)和钙蛋白酶(Calpain)蛋白表达水平。 **结果** 相比对照组, 模型组大鼠体重、肝指数、ALT、AST、TBIL、ET、MDA、Bax蛋白、Caspase-3蛋白、Calpain蛋白水平均显著升高($P < 0.05$), SOD、Bcl-2蛋白水平均显著降低($P < 0.05$); 相比模型组, 低剂量茵陈五苓散组大鼠体重、肝指数、ALT、AST、TBIL、ET、MDA、Bax蛋白、Caspase-3蛋白、Calpain蛋白水平分别为[(0.75±0.23)g、(2.53±0.17)、(130.50±12.05)U/L、(125.55±20.95)U/L、(100.10±10.38)μmol/L、(0.52±0.03)EU/mL、(13.50±3.21)U/mg、(1.00±0.15)、(1.20±0.20)、(0.75±0.15)], 高低剂量茵陈五苓散组分别为[(0.69±0.10)g、(2.11±0.13)、(93.15±10.25)U/L、(83.47±12.27)U/L、(72.30±10.25)μmol/L、(0.40±0.03)EU/mL、(9.26±2.20)U/mg、(0.90±0.11)、(1.00±0.19)、(0.45±0.10)]均显著降低($P < 0.05$), 且高剂量茵陈五苓散组显著低于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.05$); 相比模型组, 低剂量茵陈五苓散组大鼠SOD、Bcl-2蛋白水平分别为[(200.47±27.15)U/mg、(0.69±0.23)], 高剂量茵陈五苓散组大鼠分别为[(270.15±32.06)U/mg、(0.75±0.10)], 均显著升高($P < 0.05$), 且高剂量茵陈五苓散组显著高于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.05$)。 **结论** 茵陈五苓散通过降低脂质过氧化物水平、提高SOD活性、抑制钙蛋白酶的表达同时抑制肝细胞的凋亡实现实验性梗阻性黄疸大鼠肝脏的保护作用, 且在一定剂量范围内呈剂量依赖性。

关键词: 黄疸, 阻塞性; 茵陈五苓散; 肝损伤; 钙蛋白酶; 氧化应激; 大鼠, Sprague-Dawley

Protection effect of *Yinchen-Wuling* powder on liver injury in experimental obstructive jaundice rats

ZHANG Wei¹, ZHAO Weihua¹, XU Yunxing¹, WANG Hongpo²

Author Affiliations: ¹Department of Pharmacy, General Hospital of Zhengzhou Coal Industry Group Co.Ltd, Zhengzhou, Henan 452370, China; ²Department of Magnetic Resonance Imaging, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui, Henan 453100, China

Abstract: Objective To explore the protection effect of *Yinchen-Wuling* powder on liver injury in experimental obstructive jaundice (EOJ) rats. **Methods** January 2017 to May 2019, of the 60 SD rats, 45 cases were enrolled to be made into EOJ models, and the remaining 15 cases were enrolled as control group. According to random number table method, the 45 model rats were divided into model group, low-dose *Yinchen-Wuling* powder group ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and high-dose *Yinchen-Wuling* powder group ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), with 15 cases in each group. The experimental groups were gavaged with corresponding concentrations of *Yinchen-Wuling* powder, while control group and model group were gavaged with same amount of normal saline for 15 days. Levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), serum total bilirubin (TBIL) and endotoxin (ET) in each group were measured by fully-automatic biochemical analyzer. The levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver tissue homogenate of each group were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of apoptosis-related proteins [B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cysteine-containing aspartate-specific protease-3 (Caspase-3)] and calpain protein in liver tissue were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, weight, liver index, levels of ALT, AST, TBIL, ET and MDA, expression levels of Bax protein, Caspase-3 protein and Calpain protein were significantly increased in the model group, while expression levels of SOD and Bcl-2 protein were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, weight, liver index, levels of ALT, AST, TBIL, ET and MDA, expression levels of Bax protein, Caspase-3 protein and Calpain protein were significantly decreased in low-dose *Yinchen-Wuling* powder group [$(0.75 \pm 0.23) \text{ g}$, (2.53 ± 0.17) , $(130.50 \pm 12.05) \text{ U/L}$, $(125.55 \pm 20.95) \text{ U/L}$, $(100.10 \pm 10.38) \mu\text{mol/L}$, $(0.52 \pm 0.03) \text{ EU/mL}$, $(13.50 \pm 3.21) \text{ U/mg}$, (1.00 ± 0.15) , (1.20 ± 0.20) , (0.75 ± 0.15)] and high-dose *Yinchen-Wuling* powder group [$(0.69 \pm 0.10) \text{ g}$, (2.11 ± 0.13) , $(93.15 \pm 10.25) \text{ U/L}$, $(83.47 \pm 12.27) \text{ U/L}$, $(72.30 \pm 10.25) \mu\text{mol/L}$, $(0.40 \pm 0.03) \text{ EU/mL}$, $(9.26 \pm 2.20) \text{ U/mg}$, (0.90 ± 0.11) , (1.00 ± 0.19) , (0.45 ± 0.10)] ($P < 0.05$). And the above indexes in high-dose *Yinchen-Wuling* powder group were significantly lower than those in low-dose *Yinchen-Wuling* powder group ($P < 0.05$). Compared with model group, expression levels of SOD and Bcl-2 protein were significantly increased in low-dose *Yinchen-Wuling* powder group [$(200.47 \pm 27.15) \text{ U/mg}$, (0.69 ± 0.23)] and high-dose *Yinchen-Wuling* powder group [$(270.15 \pm 32.06) \text{ U/mg}$, (0.75 ± 0.10)] ($P < 0.05$). And the above indexes in high-dose *Yinchen-Wuling* powder group were significantly higher than those in low-dose *Yinchen-Wuling* powder group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Yinchen-Wuling* powder can protect liver of EOJ rats by reducing lipid peroxide level, increasing SOD activity, inhibiting calpain expression and hepatocytes apoptosis. The above protective effects are dose-dependent within a certain dose range.

Key words: Jaundice, obstructive; *Yinchen-Wuling* powder; Liver injury; Calpain; Oxidative stress; Rats, Sprague-Dawley

梗阻性黄疸(Obstructive Jaundice, OJ)是指胆道系统发生梗阻后,导致胆红素或游离胆红素返流入血,并出现巩膜黄染的现象^[1-2]。王婷、许卫娜^[3]研究表明:持续性的OJ对肝脏有较大的影响,严重会导致肝脏纤维化和肝硬化。目前使用中药治疗OJ效果较为突出^[4]。中医认为黄疸湿热结于脾胃,熏蒸肝胆,故治则不外清热利湿^[5]。茵陈五苓散中包含茵陈、泽泻、茯苓片、猪苓、白术、桂枝等药物,可以提高机体的抗氧化作用同时防止肝脏纤维化和肝炎。本研究旨在探究茵陈五苓散对实验性OJ大鼠肝损伤的保护作用及保护机理。

1 材料与仪器

1.1 动物

2017年1月至2019年5月,60只SPF级

雄性SD大鼠,购自广东省医学动物实验中心,粤监证字 2004A029号,饲养温度 $20 \sim 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,本研究经过伦理委员会批准且遵循动物实验 3-R 原则。

1.2 药物与试剂 茵陈、泽泻、茯苓片、猪苓、白术、桂枝,均购自武汉市中医院;丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒和超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)试剂盒购自江莱生物有限公司;B淋巴细胞瘤-2蛋白(Bcl-2,货号 sc-56015,批号 20181203)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax,货号 sc-20067,批号 20190102)、半胱氨酸天门冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase-3,货号 sc-56053,批号 20190201)一抗购于美国 Santa Cruz 公司;钙蛋白酶[Calpain,货号 EY-(K)-1003,批号 12582012]一抗购自上海一研;HRP 羊抗

鼠IgG、HRP羊抗兔IgG购于美国Thermo公司。

1.3 仪器 Sysmex-chemix-180型全自动生化分析仪购自日本Furuno Electric公司;BS-124s型电子天平购自北京赛多斯仪器系统有限公司;SG-51正置型金相显微镜购自上海光学仪器厂;蛋白电泳及转膜仪购自美国Bio-Rad公司;凝胶成像系统购于以色列DNR公司;LD-66实验室切片机购自长沙益广制药机械公司。

2 方法

2.1 造模及药物干预 将60只大鼠适应性喂养1周,采用随机数字表法将大鼠分为:对照组、模型组、低剂量茵陈五苓散组和高剂量茵陈五苓散组,每组各15只;除对照组外各组大鼠制成实验性OJ大鼠模型;造模具体方法参考韩德兰等^[6]研究。完成造模后12 h,低剂量茵陈五苓散组和高剂量茵陈五苓散组使用对应浓度茵陈五苓散灌胃。茵陈五苓散组成:茵陈30 g、茯苓片15 g、猪苓15 g、白术15 g、桂枝10 g水煎;低剂量茵陈五苓散组灌胃剂量为 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;高剂量茵陈五苓散组灌胃剂量为 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$;对照组和模型组使用等量生理盐水灌胃,连续15 d。

2.2 检测项目

2.2.1 一般情况的观察 药物干预完成后立即称大鼠体质量,处死并检测肝脏相关质量计算肝指数。肝指数=肝脏湿质量/体质量 $\times 100\%$ 。

2.2.2 大鼠肝功能指标检测 各组大鼠眼球取血,按照检测试剂盒说明书方法检测各组大鼠丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清总胆红素(TBIL)和内毒素(ET)水平。

2.2.3 大鼠氧化应激指标监测 取大鼠肝组织,剪碎并使用胰蛋白酶制成匀浆,试剂盒说明书操作,检测大鼠肝组织中SOD、MDA含量水平。

2.2.4 蛋白质印迹法检测蛋白表达水平 使用蛋白质印迹法检测Bcl-2、Bax、Caspase-3和钙蛋白酶表达水平。取大鼠肝脏组织,使用胰蛋白酶消化后,提取总蛋白并转移到PVDF膜上加入置脱脂奶粉室温封闭,并加入稀释后的Bcl-2、Bax、Caspase-3

蛋白抗体,稀释比例1:500,内参蛋白实验 β -actin,稀释比例为1:1 000,分析比较各目的蛋白与内参蛋白条灰度,计算各蛋白相对表达量。

2.3 统计学方法 本研究数据分析采用软件为SPSS 22.0,作图采用软件为GraphPad Prism 5,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法;若 $P < 0.05$ 则表明差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠体质量及肝指数检测结果 由表1可以看出,相比对照组,模型组大鼠体质量、肝指数显著升高($P < 0.01$);相比模型组,低剂量茵陈五苓散组和高剂量茵陈五苓散组大鼠体质量、肝指数显著降低($P < 0.01$),且高剂量茵陈五苓散组显著低于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.01$)。

表1 大鼠60只体质量及肝指数检测结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	体质量/g	肝指数
对照组	15	385.22 $\pm$ 38.21	2.04 $\pm$ 0.12
模型组	15	485.78 $\pm$ 55.54 ^a	3.21 $\pm$ 0.14 ^a
低剂量茵陈五苓散组	15	420.11 $\pm$ 49.21 ^b	2.53 $\pm$ 0.17 ^b
高剂量茵陈五苓散组	15	398.79 $\pm$ 39.99 ^{bc}	2.11 $\pm$ 0.13 ^{bc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$;与低剂量茵陈五苓散组比较,^c $P < 0.01$

3.2 大鼠肝脏指标检测结果 相比空白对照组,模型组大鼠ALT、AST、TBIL、TBIL、ET水平均显著升高($P < 0.01$);相比模型组,低剂量茵陈五苓散组和高剂量茵陈五苓散组大鼠ALT、AST、TBIL、TBIL、ET水平均显著降低($P < 0.01$),且高剂量茵陈五苓散组显著低于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.01$)。见表2。

3.3 大鼠肝脏内氧化物质检测结果 相比空白对照组,模型组大鼠MDA含量水平显著升高($P < 0.01$),SOD水平显著降低($P < 0.01$);相比模型组,低剂量茵陈五苓散组和高剂量茵陈五苓散组大鼠MDA含量水平显著降低($P < 0.01$),且高剂量茵陈五苓散组显著低于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.01$),SOD水平显著升高且高剂量茵陈五苓散组显著高于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.01$)。见表3。

表2 大鼠60只肝脏指标检测结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL($\mu\text{mol/L}$)	ET(EU/mL)
对照组	15	72.30 $\pm$ 7.21	42.30 $\pm$ 8.20	9.31 $\pm$ 1.30	0.33 $\pm$ 0.03
模型组	15	212.02 $\pm$ 30.00 ^a	200.15 $\pm$ 42.40 ^a	188.58 $\pm$ 20.10 ^a	0.77 $\pm$ 0.03 ^a
低剂量茵陈五苓散组	15	130.50 $\pm$ 12.05 ^b	125.55 $\pm$ 20.95 ^b	100.10 $\pm$ 10.38 ^b	0.52 $\pm$ 0.03 ^b
高剂量茵陈五苓散组	15	93.15 $\pm$ 10.25 ^{bc}	83.47 $\pm$ 12.27 ^{bc}	72.30 $\pm$ 10.25 ^{bc}	0.40 $\pm$ 0.03 ^{bc}

注:ALT为丙氨酸氨基转移酶,AST为天冬氨酸氨基转移酶,TBIL为血清总胆红素,ET为内毒素。与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$;与低剂量茵陈五苓散组比较,^c $P < 0.01$

表3 大鼠肝脏内氧化物质检测结果/(U/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MDA	SOD
对照组	15	8.31±2.10	310.54±44.05
模型组	15	19.00±4.20 ^a	220.78±45.65 ^a
低剂量茵陈五苓散组	15	13.50±3.21 ^b	200.47±27.15 ^b
高剂量茵陈五苓散组	15	9.26±2.20 ^{bc}	270.15±32.06 ^{bc}

注:MDA为丙二醛,SOD为超氧化物歧化酶。与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$;与低剂量茵陈五苓散组比较,^c $P < 0.01$

3.4 大鼠肝脏组织凋亡蛋白水平检测结果 相比空白对照组,模型组大鼠Bax蛋白表达水平和Caspase-3蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$),Bcl-2蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$);相比模型组,低剂量茵陈五苓散组和高剂量茵陈五苓散组大鼠Bax蛋白表达水平和Caspase-3蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$),且高剂量茵陈五苓散组显著低于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.01$),Bcl-2蛋白表达水平显著升高且高剂量茵陈五苓散组显著高于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.01$)。见图1和表4。

表4 大鼠肝脏组织凋亡蛋白水平检测结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Bcl-2/ β -actin值	Bax/ β -actin值	Caspase-3/ β -actin值
对照组	15	1.45±0.21	0.25±0.09	0.45±0.12
模型组	15	0.45±0.10 ^a	1.39±0.21 ^a	1.60±0.30 ^a
低剂量茵陈五苓散组	15	0.69±0.23 ^b	1.00±0.15 ^b	1.20±0.20 ^b
高剂量茵陈五苓散组	15	0.75±0.10 ^{bc}	0.90±0.11 ^{bc}	1.00±0.19 ^{bc}

注:Bcl-2为B淋巴细胞瘤-2蛋白,Bax为Bcl-2相关X蛋白,Caspase-3为半胱氨酸天门冬氨酸特异性蛋白酶, β -actin为 β -肌动蛋白。与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$;与低剂量茵陈五苓散组比较,^c $P < 0.01$

3.5 大鼠钙蛋白酶蛋白表达水平检测结果 相比空白对照组,模型组大鼠钙蛋白酶蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);相比模型组,低剂量茵陈五苓散组和高剂量茵陈五苓散组大鼠肝组织钙蛋白酶蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$),且高剂量茵陈五苓散组显著低于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.01$)。见图2和表5。

表5 大鼠钙蛋白酶蛋白表达水平检测结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Calpain/ β -actin值
对照组	15	1.00±0.20
模型组	15	1.80±0.25 ^a
低剂量茵陈五苓散组	15	0.75±0.15 ^b
高剂量茵陈五苓散组	15	0.45±0.10 ^{bc}

注:Calpain为钙蛋白酶, β -actin为 β -肌动蛋白。与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$;与低剂量茵陈五苓散组比较,^c $P < 0.01$

4 讨论

肝脏损伤重要指标包括:血清ALT、AST活力等。黄新造等^[7]研究表明:血清ALT、AST活力可以一定程度上反映肝脏受损程度。本研究中可以看出,相比模型组,使用茵陈五苓散处理的各组大鼠ALT、AST水平均显著降低说明了茵陈五苓散可以有效降低肝细胞的受损程度。这可能是因为茵陈五苓散以茵陈为君药,配合泽泻、猪苓具有清热解毒利湿、健脾化浊之功,同时茵陈是利胆退黄的主药,可以减轻肝细胞坏死的程度,促进胆汁分泌降低血清中的ALT及AST水平。杨建桥、严清和^[8]研究表明:茵陈五苓散可以降低ALT及AST水平,保护小鼠肝组织,本研究得出的结论与其相类似。

发生OJ会使得肠粘膜屏障受到损害,使得大量的ET会进入血液,进一步加重黏膜屏障的受损程度,并形成恶性循环^[9]。TBIL是由体内红细胞裂解而释放出的血红蛋白产生的,主要包括间接胆红素和直接胆红素^[10]。耿焱等^[11]研究表明:检查TBIL含量水平不仅能反映肝脏损害的程度,尤其对黄疸的鉴别具有重要意义,胆汁淤积会引起黄疸,TBIL含量水平显著升高。本研究发现相比模型组,使用茵陈五苓散处理的各组大鼠TBIL和ET水平均显著降低说明了茵陈五苓散可以有效保护肠粘膜屏障。同时茵陈五苓散可以防止大量的胆酸及胆红素淤积导致肝脏湿热毒邪蕴积,影响血气运行,从而造成肝细胞受损。王缚鲲等^[12]研究表明:TBIL是预测减黄效果的最佳指标,降低其含量可有效缓解OJ,本研究得出的结论与其相类似。

随着医疗的进步,对活性氧的研究越来越深入,研究发现若发生氧化应激反映会使得MDA的水平升高,同时自由基清除剂如SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等会严重减少或缺乏,同时还会影响细胞膜的通透性细胞内的SOD、GSH-Px等酶释放至细胞外^[13]。MDA也是反应体内脂质氧化的重要指标^[14]。本研究发现,相比模型组,使用茵陈五苓散处理的各组大鼠MDA含量水平显著降低,SOD水平显著升高,说明大鼠体内的脂质氧化受到了显著的抑制,同时氧自由基也显著减少,这可能是因为茵陈五苓散中包含的茯苓片、白术等中药具有抗氧化、清除自由基的效果。胡明华等^[15]研究表明:降低自由基的含量水平可以有效保护OJ病人肝脏,本研究得出的结论与其相类似。

OJ会损伤肝细胞,使得肝脏纤维化并促进肝细胞的程序性死亡,细胞的凋亡受到基因的调控,

其中Caspase家族是细胞凋亡的核心。Caspase家族中Caspase-3和Caspase-9是重要的凋亡基因,可以启动细胞的凋亡程序^[16]。除了Caspase家族蛋白可以调控细胞的凋亡,Bcl-2家族蛋白也可以调控细胞的凋亡,在Bcl-2家族中主要由Bcl-2蛋白和Bax蛋白分别抑制和促进细胞的凋亡^[18-20]。本研究发现,相比模型组,使用茵陈五苓散处理的各组大鼠Bax蛋白表达水平和Caspase-3蛋白表达水平均显著降低,Bcl-2蛋白表达水平显著升高,说明使用茵陈五苓散处理后可以显著降低大鼠肝脏细胞的凋亡,有效保护发生OJ后的肝细胞。

钙蛋白酶是一种降解蛋白的酶,会降解肌原纤维中的蛋白,在OJ病人肝组织内其表达会显著增加,且与肝脏受损程度正相关^[21]。本实验发现,相比模型组,使用茵陈五苓散处理的各组大鼠肝组织钙蛋白酶蛋白表达水平显著降低,说明大鼠肝脏损伤得到了有效的缓解,这些可能和降低肝脏炎性细胞浸润及成纤维细胞的增生有关。崔玉宝^[21]研究表明:使用茵陈五苓散可以降低肝脏组织内的钙蛋白酶基因及蛋白的表达并促进肝脏功能恢复。

综上所述,茵陈五苓散可以有效保护实验性OJ大鼠肝脏,其作用机制与抑制氧化应激、钙蛋白酶的表达及肝细胞的凋亡相关。但本研究使用的剂量梯度较少,在后续的研究中将进一步探讨茵陈五苓散的剂量对实验性OJ大鼠肝脏保护的效果。

(本文图1,2见插图10-2)

参考文献

- [1] Pavlidis ET, Pavlidis TE. Pathophysiological consequences of obstructive jaundice and perioperative management. [J]. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2018, 17(1): 17-21.
- [2] HUANG X, LI CH, ZHANG AQ, et al. A simple rat model of in situ reversible obstructive jaundice in situ reversible obstructive jaundice model [J]. *Ann Surg Treat Res*, 2017, 92(6): 389-395.
- [3] 王婷, 许卫娜. 苯扎贝特辅助治疗胆汁性肝硬化的临床效果及对患者肝纤维化和肝脏弹性硬度的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36(3): 415-419.
- [4] 汪凯, 张桂信, 陈海龙. 中药治疗梗阻性黄疸研究进展 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2018, 24(1): 112-114.
- [5] 陈勇, 张勤. 消黄汤经验方和穴位按摩联合蓝光照射辨治湿热熏蒸型新生儿黄疸的临床效果 [J]. *世界中医药*, 2018, 13(1): 112-115.
- [6] 韩德兰, 刘丽, 赵芝, 等. 梗阻性黄疸大鼠肝改变与TNF- α 的关系 [J]. *河北医药*, 2010, 32(17): 2322-2323.
- [7] 黄新造, 柯文炳, 占桂香, 等. 肝苏胶囊联合黄芩苷胶囊治疗慢性乙型病毒性肝炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(2): 271-274.
- [8] 杨建桥, 严清和. 茵陈五苓散对脂肪性肝纤维化小鼠的保护作用 [J]. *中国现代医生*, 2011, 49(20): 13-14.
- [9] 蔡芸芸, 曹铁留, 沈婕, 等. "胆脾同治"法调节恶性梗阻性黄疸患者术后肠黏膜屏障功能的临床研究 [J]. *世界中医药*, 2018, 13(2): 317-320.
- [10] 毕研贞, 樊增, 陈东风, 等. 人肝源性干细胞腹腔移植不同时间对刀豆蛋白A诱导小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2017, 25(3): 205-210.
- [11] 耿焱, 彭娜, 童华生, 等. 氧化应激在中暑大鼠急性肝损伤中的作用及机制研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2017, 42(4): 285-289.
- [12] 王缚鲲, 白云, 王宪灵, 等. 良性梗阻性黄疸患者减黄术后 δ 胆红素测定的意义 [J]. *实用医学杂志*, 2003, 19(6): 635-637.
- [13] DING L, SU XX, ZHANG WH, et al. Gene expressions underlying mishandled calcium clearance and elevated generation of reactive oxygen species in the coronary artery smooth muscle cells of chronic heart failure rats [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2017, 130(4): 460-469.
- [14] 罗磊, 张冰洁, 关宁宇, 等. 金银花叶黄酮对衰老模型小鼠的体内抗氧化作用 [J]. *食品科学*, 2017, 38(19): 171-176.
- [15] 胡明华, 李涛, 房淑彬. 一氧化氮等自由基在梗阻性黄疸及其并发SIRS中的作用 [J]. *皖南医学院学报*, 2002, 21(1): 24-27.
- [16] DUENSING TD, WATSON SR. Assessment of apoptosis (programmed cell death) by flow cytometry [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018, 2018(1) DOI: 10.1101/pdb.prot093807.
- [17] 贾晓鹏, 孙亚楠, 王伟, 等. 二十二碳六烯酸诱导前列腺癌细胞凋亡的信号通路研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(10): 1667-1670.
- [18] GE Y, CAI YM, BONNEAU L, et al. Inhibition of cathepsin B by caspase-3 inhibitors blocks programmed cell death in arabidopsis [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(9): 1493-1501.
- [19] 邵广田, 陈霄雷, 邵璐斐. p38信号通路对缺氧下大鼠星形胶质细胞增殖凋亡的影响及机制研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(13): 1252-1255.
- [20] 袁芳. 山楂叶总黄酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及bcl-2、Bax、caspase-3蛋白表达影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(8): 42-45.
- [21] 崔玉宝. 茵陈五苓散对梗阻性黄疸大鼠肝组织中钙蛋白酶的干预作用 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2015, 40(5): 511-516.

(收稿日期: 2019-09-14, 修回日期: 2019-10-16)