

复方熊去氧胆酸口服液对大鼠淤胆型肝炎的影响

尤梅桂, 陈 同, 倪远宁, 季 晖*

(中国药科大学药理学教研室, 南京 210009)

摘 要 观察复方熊去氧胆酸口服液(C-UDCA)对大鼠肝内胆汁淤积型肝炎的影响。采用灌胃 α -萘异硫氰酸酯(ANIT)诱发大鼠淤胆型肝炎模型,检测经口给予 C-UDCA 后对大鼠胆汁流量、肝功能各项生化指标、肝组织生化指标及肝组织病理形态学的影响。结果显示,C-UDCA 能明显减轻 ANIT 导致的胆管损伤、胆汁淤积和肝细胞损伤。与单方熊去氧胆酸(UDCA)比较,C-UDCA 高、中剂量组能显著降低血清丙氨酸转氨酶(ALT)水平、升高肝组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、SOD 酶活性。提示 C-UDCA 对 ANIT 诱导的急性肝内胆汁淤积型肝炎有明显的改善作用,且 C-UDCA 的作用优于 UDCA。

关键词 复方熊去氧胆酸口服液;淤胆型肝炎; α -萘异硫氰酸酯

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)01-0102-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140119

Effect of compound ursodeoxycholic acid oral liquid on cholestatic hepatitis in rats

YOU Meigui, CHEN Tong, NI Yuanning, JI hui*

Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The study was designed to investigate the effect of compound ursodeoxycholic acid oral liquid (C-UDCA) on acute intrahepatic cholestasis in rats, which was induced by α -naphthylisothiocyanate (ANIT, 150 mg/kg). The effects of C-UDCA were examined by serological determination, histological assessment of liver damage and bile excretion experiments. Results demonstrated that the administration of C-UDCA could significantly ameliorate ANIT-induced bile duct injury, cholestasis and hepatocytic damage. Compared with ursodeoxycholic acid (UDCA), high and medium doses of C-UDCA could remarkably reduce the elevated serum levels of alanine aminotransferase (ALT), while greatly enhancing the activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and SOD in liver tissues. All taken together, our data suggested that C-UDCA exhibited a better hepatoprotective effect against ANIT-induced cholestasis than UDCA.

Key words compound ursodeoxycholic acid oral liquid; cholestatic hepatitis; α -naphthylisothiocyanate

肝内胆汁淤积又称淤胆型肝炎,是由多种原因引起的肝细胞和毛细胆管胆汁分泌障碍,以导致部分或完全性胆汁流出阻滞为特征。主要表现在经肠道随粪便排出的结合胆红素量减少或缺失,使粪便颜色变浅,尿液颜色变深,呈深黄或褐色^[1]。熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)是近来研究较多且在治疗淤胆型肝炎方面证明安全有效的药物^[2]。人体本已存在维生素 B_1 摄入不足,而淤胆型肝炎患者维生素 B_1 更为缺乏,所以临床治疗淤胆型肝炎常需补充治疗量的维生素 B_1 。研究报道

显示甲硫胺酸,维生素 B_1 和熊去氧胆酸联合应用在治疗妊娠期肝内胆汁淤积中可发挥良好的辅助作用^[3],但其作用机制尚不清楚。另有文献报道,用 α -萘异硫氰酸酯(ANIT)诱发的大鼠肝损伤与脂质过氧化作用有关^[4],而维生素 B_2 虽然没有直接的抗氧化作用,但它是谷胱甘肽还原酶的组分,可以促进谷胱甘肽的生成,使细胞免受自由基损伤^[5]。王身笏等^[6]在研究维生素 B_2 对大鼠肝脂质过氧化的影响实验中发现,与二甲基亚硝胺模型组相比,给予维生素 B_2 后血清 GSH-Px 和肝匀浆

SOD 活性显著升高。因此,本实验旨在研究单方 UDCA 中加入维生素 B₁ 和维生素 B₂ 组成复方对淤胆型肝炎的治疗是否具有协同作用,从而为临床提供有价值的实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

复方熊去氧胆酸口服液(C-UDCA,每285 mg 20% PEG400 的水溶剂中含熊去氧胆酸 50 mg,维生素 B₁ 10 mg,维生素 B₂ 5 mg)由江苏省药物研究所有限公司提供;熊去氧胆酸片(优思弗,每片中含熊去氧胆酸 50 mg)购自上海中西三维药业有限公司;丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBil)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)、总胆固醇(T-CHO)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)、Na⁺-K⁺-ATP 酶测定试剂盒均购自南京建成生物科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司); α -萘异硫氰酸酯(美国 Sigma 公司);PEG400(南京化学试剂有限公司);乌拉坦(上海青析化工科技有限公司);0.9%氯化钠注射液(济宁辰欣药业股份有限公司)。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

SH-1000 全波长酶标仪(日本日立公司);分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);EPED-20TF 实验室级超纯水机(南京易普达科技发展有限公司)。

1.3 动物

SD 大鼠雌雄各半,SPF 级,体重 220 ~ 240 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物合格证号:SCXK(沪)2008-0016。

2 方法

2.1 实验设计

大鼠随机分为 6 组,每组 10 只,正常对照组、模型组、熊去氧胆酸(UDCA)组(60 mg/kg)、复方熊去氧胆酸口服液(C-UDCA)-H 组(120 mg/kg)、C-UDCA-M 组(60 mg/kg)、C-UDCA-L 组(30 mg/kg)。第 1 天除正常对照组给予等量 20% PEG400 的水溶剂外,其余各组均用 ANIT (150 mg/kg)橄榄油溶液给大鼠一次性灌胃,制备淤胆型肝炎模型^[7];造模后第 2 天各给药组按 10 mL/kg 的容积灌胃给药,正常对照组及模型组

同时灌胃给予等量 20% PEG400 的水溶剂,每天 1 次,连续 5 d。末次给药 1 h 后,大鼠以 10% 乌拉坦溶液腹腔注射麻醉,打开腹腔,结扎胆总管远端,将直径为 0.5 mm 的聚乙烯管插入胆总管近端,收集 4 h 胆汁,测量胆汁流量后股动脉取血,分离血清,-20 ℃ 保存备用;剖取大鼠肝组织,洗净残血,取部分迅速冻于液氮中,后转入 -80 ℃ 冰箱保存,另取部分左叶肝 10% 甲醛固定,进行病理组织学检查。

检测时从冰箱中取出冷冻保存的肝组织,称取 0.1 g,加入冷生理盐水 0.9 mL 匀浆,3 500 r/min 离心 10 min。取上清液用试剂盒测定蛋白浓度,然后按试剂盒说明测定肝组织匀浆中的 MDA 含量、NO 水平、SOD 和 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性。

2.2 血清生化指标检测

ALT、ALP、TBil、DBil、 γ -GT、T-CHO 均按试剂盒说明书进行测定。

2.3 肝生化指标测定

MDA、NO、SOD、Na⁺-K⁺-ATP 酶测定均按试剂盒说明书进行测定。

2.4 肝病理组织学观察

大鼠肝用 10% 中性甲醛固定,取材、脱水、浸蜡、包埋,再切成 4 μ m 厚切片,HE 染色,光学显微镜($\times 200$)下观察并拍照。

2.5 数据分析

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计分析利用软件 GraphPad Prism software 5.0 完成。两组间比较采用非配对 *t*-检验分析;多组间比较采用单因素方差分析,在此基础上的组间两两比较采用 Tukey's multiple comparison test 分析, $P < 0.05$,表示有显著性差异。

3 结果

3.1 复方熊去氧胆酸口服液对胆汁淤积型肝炎大鼠胆汁流量的影响

由表 1 可见,模型组大鼠胆汁平均流量较正常组呈极显著性下降。与模型组比较,C-UDCA 各剂量组大鼠的胆汁平均流量呈极显著性增加,表明 C-UDCA 具有显著的利胆作用。

3.2 复方熊去氧胆酸口服液对胆汁淤积型肝炎大鼠血清 TBil、DBil 含量的影响

由表 2 可见,与正常组相比,模型组大鼠血清中 TBil、DBil 含量显著增加,表明造模成功。与

模型组比较,受试药 C-UDCA 各剂量组 TBil、DBil 含量均显著降低,提示受试药 C-UDCA 对肝脏受到损害时的代谢功能紊乱有一定的调节作用。

Table 1 Effect of compound ursodeoxycholic acid oral liquid (C-UDCA) on the bile flow ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Dose/(mg/kg)	Bile flow/(mL/h·100g)
Normal	—	0.44 ± 0.02
Model	—	0.33 ± 0.02***
UDCA	60	0.42 ± 0.02###
C-UDCA-H	120	0.43 ± 0.01###
C-UDCA-M	60	0.43 ± 0.02###
C-UDCA-L	30	0.40 ± 0.01###

UDCA; ursodeoxycholic acid. *** $P < 0.001$ vs normal group; ### $P < 0.001$ vs model group

Table 2 Effects of C-UDCA on the serum levels of total bilirubin (TBil), direct bilirubin (DBil) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	TBil/($\mu\text{mol/L}$)	DBil/($\mu\text{mol/L}$)
Normal	3.66 ± 0.63	2.29 ± 0.33
Model	26.13 ± 0.64***	9.79 ± 0.81***
UDCA	11.79 ± 1.01###	6.27 ± 0.64###
C-UDCA-H	11.06 ± 1.82###	6.43 ± 0.74###
C-UDCA-M	11.57 ± 1.40###	7.57 ± 0.87###
C-UDCA-L	19.27 ± 1.57###	7.79 ± 0.48###

*** $P < 0.001$ vs normal group; ### $P < 0.001$ vs model group

Table 3 Effects of C-UDCA on the serum levels of T-CHO, γ -GT, ALP and ALT ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	T-CHO($\mu\text{mol/L}$)	γ -GT/($\mu\text{mol/L}$)	ALP/($\mu\text{mol/L}$)	ALT/($\mu\text{mol/L}$)
Normal	1.56 ± 0.24	2.43 ± 0.69	32.28.3 ± 2.16	29.90 ± 3.90
Model	3.18 ± 0.61***	6.46 ± 0.97***	51.27 ± 4.66***	91.34 ± 6.70***
UDCA	2.29 ± 0.43	4.93 ± 0.89##	42.57 ± 3.03###	45.22 ± 2.68###
C-UDCA-H	2.29 ± 0.43##	3.68 ± 0.86### Δ	37.67 ± 3.08### Δ	33.33 ± 7.46### $\Delta\Delta\Delta$
C-UDCA-M	2.40 ± 0.48#	4.24 ± 0.84###	39.54 ± 2.35###	37.34 ± 3.75### Δ
C-UDCA-L	2.48 ± 0.51#	5.73 ± 0.73	45.92 ± 2.82##	46.61 ± 3.51###

*** $P < 0.001$ vs normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs UDCA group

Table 4 Effects of C-UDCA on the levels of MDA, SOD and NO in liver ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	MDA/(nmol/mg prot)	SOD/(U/mg prot)	NO/($\mu\text{mol/g prot}$)
Normal	4.23 ± 0.28	250.20 ± 9.41	2.38 ± 0.06
Model	5.34 ± 0.61***	159.80 ± 7.77***	3.50 ± 0.07***
UDCA	4.55 ± 0.61#	177.50 ± 6.04###	2.72 ± 0.05###
C-UDCA-H	4.21 ± 0.61###	208.00 ± 9.41### $\Delta\Delta$	2.58 ± 0.08### $\Delta\Delta$
C-UDCA-M	4.43 ± 0.43##	189.70 ± 4.63### Δ	2.64 ± 0.09###
C-UDCA-L	4.70 ± 0.47	162.60 ± 7.96	2.76 ± 0.08###

*** $P < 0.001$ vs normal group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs UDCA group

3.5 复方熊去氧胆酸口服液对胆汁淤积型肝炎大鼠肝组织中Na⁺-K⁺-ATP酶活性的影响

由表5可见,与正常对照组相比,模型组大鼠肝组织中Na⁺-K⁺-ATP酶活性显著下降。与模型组相比,受试药 C-UDCA-H、C-UDCA-M 组肝组织

3.3 复方熊去氧胆酸口服液对胆汁淤积型肝炎大鼠血清生化学指标的影响

由表3可见,与正常组相比,模型组大鼠血清中T-CHO、 γ -GT、ALP 和 ALT 水平均极显著性地增加;与模型组比较,受试药 C-UDCA 各剂量组血清T-CHO、ALP 和 ALT 含量显著性下降,C-UDCA-H、C-UDCA-M 组 γ -GT 水平显著性下降;与 UDCA 组比较,受试药 C-UDCA-H 组 γ -GT、ALP 水平及 C-UDCA-H、C-UDCA-M 组 ALT 水平有显著性差异,提示受试药 C-UDCA 能显著改善 ANIT 导致的肝功能损伤,且 C-UDCA 组在改善肝功能方面优于 UDCA 组。

3.4 复方熊去氧胆酸口服液对胆汁淤积型肝炎大鼠肝组织中脂质过氧化物及内源性抗氧化酶的影响

由表4可见,与正常对照组相比,模型组大鼠肝脏脂质过氧化物MDA及NO含量显著增加,SOD活性显著降低;与模型组比较,受试药 C-UDCA-H、C-UDCA-M 组 MDA 显著性降低,SOD 活性显著性升高;与 UDCA 组比较,受试药 C-UDCA-H 组 NO 含量显著性降低,C-UDCA-H、C-UDCA-M 组 SOD 活性显著性升高,说明受试药 C-UDCA 对机体受自由基的攻击损伤有明显的改善作用且优于 UDCA 组。

中Na⁺-K⁺-ATP酶活性显著性增强;与 UDCA 组比较,受试药 C-UDCA-H、C-UDCA-M 组 Na⁺-K⁺-ATP酶活性显著增强,提示 C-UDCA 组对维持线粒体能量代谢、肝细胞内外电解质平衡的作用优于 UDCA 组。

Table 5 Effects of C-UDCA on Na⁺-K⁺-ATPase activity in liver ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase/(U/mg prot)
Normal	2.74 ± 0.17
Model	1.61 ± 0.37***
UDCA	2.14 ± 0.30##
C-UDCA-H	2.59 ± 0.25###△△
C-UDCA-M	2.52 ± 0.14###△
C-UDCA-L	1.85 ± 0.35

*** $P < 0.001$ vs normal group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs model group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs UDCA group

3.6 复方熊去氧胆酸口服液对胆汁淤积型肝炎大鼠肝组织形态学变化的影响

正常对照组大鼠肝脏肝小叶、汇管区结构正常,肝细胞未见明显变性、坏死,无淤胆,无炎细胞浸润及纤维间隔形成等病理改变;ANIT 模型组表现为大鼠肝脏充血肿大,肝细胞灶状坏死,坏死灶内及周围见数量不等的炎细胞浸润,胆管结构破坏或消失,部分肝细胞脂肪变性及汇管区周围肝细胞水肿。C-UDCA 各组肝脏总体病变程度较模型组轻,肝细胞未见明显变性、坏死(图 1)。

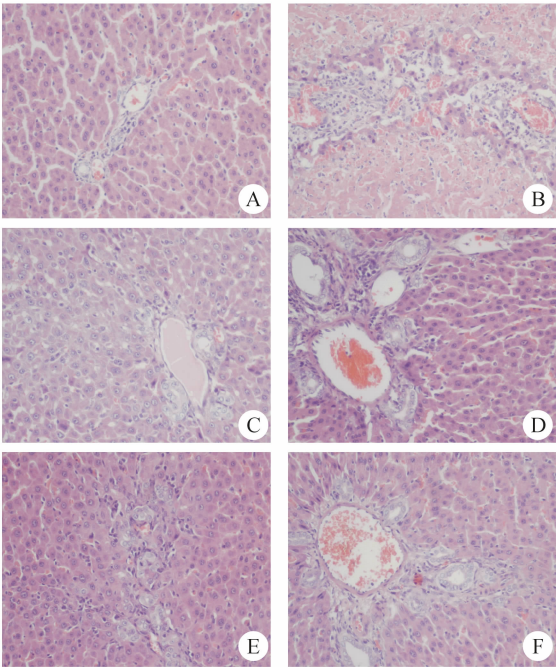


Figure 1 Effects of C-UDCA on morphological changes of rat liver A: Normal; B: Model; C: UDCA; D: C-UDCA-H; E: C-UDCA-M; F: C-UDCA-L

4 讨论

本研究选取 ANIT 诱导大鼠胆汁淤积型肝炎用于受试药物的药效学评价。实验结果显示,模型组大鼠汇管区严重的胆管结构破坏、炎细胞浸润和

肝细胞损伤,伴有血清 TBil、DBil、 γ -GT、ALP、ALT 活性升高;肝组织 MDA、NO 含量显著增加,SOD、Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著降低与文献报道相似^[8-9],提示造模成功。

本实验受试药 C-UDCA 在临床退黄、利胆常用药 UDCA 的基础上添加了适量维生素 B₁ 和维生素 B₂。结果显示,C-UDCA 各剂量组对大鼠肝内胆汁淤积型肝炎均有较好的治疗作用,但各剂量组并未呈明显的量效关系。与 UDCA 组比较,C-UDCA 高、中剂量组能显著降低血清 ALT 水平、显著升高肝组织 Na⁺-K⁺-ATPase、SOD 酶活性。提示维生素 B₁、维生素 B₂ 和熊去氧胆酸具有明显的协同作用,C-UDCA 对于治疗大鼠实验性肝内胆汁淤积型肝炎的疗效优于 UDCA,其作用机制主要是通过提高 SOD 活性对抗 ANIT 引起的脂质过氧化,保护肝细胞。

参考文献

[1] Yu F,Liang FL,Deng MH,*et al.* Integrated therapy of traditional Chinese and western medicine in treating intrahepatic cholestasis [J]. *Mod J Integr Tradit Chin Western Med*(现代中西医结合杂志),2013,**22**(9):1 019 - 1 021.

[2] Kondrackiene J,Beuers U,Kupcinskas L. Efficacy and safety of ursodeoxycholic acid versus cholestyramine in intrahepatic cholestasis of pregnancy [J]. *Gastroenterology*, 2005, **129**(3): 894 - 901.

[3] Chen QH. Role of methionine and Vitamin B1 for injection in the treatment of ICP[J]. *Mod Med Health*(现代医药卫生),2011, **27**(12):1 841 - 1 842.

[4] Zhao L. Pharmacological exploration of corilagin on cholestatic hepatitis via anit-inflammation pathway (Corilagin 对淤胆型肝炎炎症通路干预机制的初步研究) [D]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology,2008.

[5] Cheng CL,Peng CX,Wei LS,*et al.* Effects of vitamin E or in combination with vitamin C or vitamin B2 on functions of the antioxidant system in mice[J]. *J Wuhan Univ Sci Technol*(武汉科技大学学报),2000,**23**(3):313 - 315.

[6] Wang SH,Mei J,Chen QX,*et al.* Regulation of lipid peroxidation contributes to the liver protective effect of β -carotene and riboflavin in rats with intrahepatic cholestasis[J]. *Acta Nutr Sin*(营养学报),1999,**21**(1):22 - 26.

[7] Xu XW,Li LJ,Lu FF,*et al.* Ursodeoxycholic acid therapy in rats with intrahepatic cholestasis[J]. *Chin J Hepatol*(中国肝脏病杂志),2003,**11**(3):244 - 245.

[8] Yoshiji O,Mutsumi K,Emi S,*et al.* Change in hepatic antioxidant defense system with liver injury development in rats with a single alpha-naphthylisothiocyanate intoxication [J]. *Toxicology*, 1999, **139**(3):153 - 165.

[9] Sopjani M,Alesutan I,Wilmes J,*et al.* Stimulation of Na⁺-K⁺-ATPase activity and Na⁺ coupled glucose transport by β -catenin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2010,**402**(3):467 - 470.