

大黄素对小鼠急性脂肪肝的改善作用

王少杰¹, 李晓洁¹, 徐志猛¹, 闫亢¹, 陈曦¹, 江振洲^{1,2}, 张陆勇^{1,3*}(中国药科大学¹江苏省新药筛选重点实验室;²药物质量与安全预警教育部重点实验室;³江苏省药效研究与评价服务中心, 南京 210009)

摘要 探讨大黄素对 DL-乙硫氨酸和四环素分别诱导的小鼠急性脂肪肝的改善作用及机制。雄性 ICR 小鼠连续给予大黄素或阳性对照药熊去氧胆酸共 7 d, 第 7 天给予 DL-乙硫氨酸, 建立 DL-乙硫氨酸脂肪肝模型。雄性 ICR 小鼠连续给予大黄素或阳性对照药东宝甘泰、鸡骨草总黄酮碳苷共 7 d, 在给药第 4 天起每天给予四环素, 建立四环素脂肪肝模型。HE 染色观察肝脏病理改变; 检测血清中丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、三酰甘油 (TG) 和肝 TG、总胆固醇 (TC) 水平。Western blot 测定肝磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (p-AMPK)、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶 (p-ACC)、SREBP1 和脂肪酸合酶 (FAS) 蛋白的表达。RT-PCR 测定肝脏脂肪酸转位酶 (CD36)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α) 和微粒体三酰甘油转运蛋白 (MTTP) 基因的表达。与模型组相比, 大黄素能改善 DL-乙硫氨酸和四环素引起的肝细胞肿大及小泡型脂肪肝变性; 显著降低血清 TG、AST、ALT 和肝脏 TG、TC 的水平; 抑制 DL-乙硫氨酸引起的肝脏脂肪酸合成相关蛋白表达的增多; 减少肝脏脂肪酸的摄取、增加脂肪酸的氧化及分泌。结果表明, 大黄素对 DL-乙硫氨酸和四环素引起的脂肪肝具有改善作用。

关键词 大黄素; DL-乙硫氨酸; 四环素; 急性脂肪肝; 保护作用

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)01-0089-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170114

引用本文 王少杰, 李晓洁, 徐志猛, 等. 大黄素对小鼠急性脂肪肝的改善作用[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(1): 89-95.

Cite this article as: WANG Shaojie, LI Xiaojie, XU Zhimeng, et al. Improvement of emodin on acute fatty liver in mice[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(1): 89-95.

Improvement of emodin on acute fatty liver in mice

WANG Shaojie¹, LI Xiaojie¹, XU Zhimeng¹, YAN Kang¹, CHEN Xi¹, JIANG Zhenzhou^{1,2}, ZHANG Luyong^{1,3*}¹ Jiangsu Key Laboratory of Drug Screening; ² Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education;³ Jiangsu Provincial Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To observe the effects of emodin (Emo) on acute fatty liver in mice induced by DL-ethionine (DL-Eth) or tetracyclin (Tetra) and its potential mechanism, ICR mice of acute fatty liver model induced by DL-Eth were orally administered with Emo or positive control, ursodeoxycholic acid (UDCA) for 7 days. On day 7, except that the control and Emo groups were treated with vehicle control, animals were orally administered with DL-Eth to induce acute fatty liver model. ICR mice of acute fatty liver model induced by Tetra were orally administered with Emo or positive control, Dong Bao Gan Tai (DB) or total flavonoid C-glycosides from *Abrus mollis* extract (AME) for 7 days. From day 4, except that the control group was treated with vehicle control, animals were injected with Tetra intraperitoneally for 4 days to induce acute fatty liver model. Liver histopathological analyses were determined by HE staining. Serum aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), serum triglyceride (TG), hepatic TG and hepatic total cholesteol (TC) were detected. The expression of phosphorylated AMP-activated kinase (p-AMPK), phosphorylated acetyl-CoA carboxylase (p-ACC), SREBP1 and fatty acid synthase (FAS) were determined by Western blot. The expression of fatty acid translocase (CD36), peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) and microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) in liver were determined by

RT-PCR. Compared with model groups, Emo could improve hepatocyte swelling and hepatic steatosis induced by DL-Eth or Tetra. Serum AST, ALT, serum TG, hepatic TG and hepatic TC were decreased by Emo significantly. DL-Eth-induced increase of fatty acid synthetase-associated protein was down-regulated by Emo. Fatty acid uptake was down-regulated by Emo; fatty acid oxidation and secretion were increased by Emo. Emo might be effective in preventing acute fatty liver in mice induced by DL-Eth or Tetra.

Key words emodin; DL-ethionine; tetracyclinacute; fatty liver; protection

非酒精性脂肪肝指除酒精和其他明确的损肝因素所致的,以肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征。常由胰岛素抵抗、肥胖或代谢异常引起^[1-2],已成为慢性肝病的主要诱因,当前的发病率约 1.99%。临床上尚无治疗非酒精性脂肪肝的理想药物。大黄为蓼科植物掌叶大黄、唐古特大黄或药用大黄的干燥根及根茎,是临床应用最为广泛的中药材之一。大黄具有泻热通肠、凉血解毒、逐癖通经、利湿退黄等功效。大黄素(1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌,Emo)是从中药大黄中提取的羟基蒽醌类衍生物,具有抗糖尿病^[3-4]、抗动脉粥样硬化^[5]和抗纤维化作用^[6]。本研究旨在考察大黄素对 DL-乙硫氨酸(DL-ethionine, DL-Eth)和四环素(tetracyclinacute, Tetra)分别诱导的小鼠急性脂肪肝的影响及可能机制,以期在传统中药有效成分的开发和研究提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

大黄素(含量 98%,淮安瑞雷植化制剂厂);熊去氧胆酸(UDCA,含量大于 98%,美国阿拉丁公司);东宝肝泰片(DB,通化东宝药业股份有限公司);鸡骨草总黄酮碳苷(AME,黄酮碳苷含量大于 50%,中国药科大学天然药化教研室);DL-乙硫氨酸[含量大于 98.0%,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司];四环素[含量大于 98.0%,生工生物工程(上海)股份有限公司];SREBP1、FAS 抗体(美国 Santa Cruz 公司);p-AMPK、p-ACC(美国 CST 公司);三酰甘油检测试剂盒及胆固醇检测试剂盒[威特曼生物科技(南京)有限公司];BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);Trizol 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green Master Mix kits 和全蛋白提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)。所有引物由南京英潍捷基公司合成;其他试剂均购自北

京化学试剂公司。

1.2 仪器

FEJ-200 电子天平(福州富日衡之宝电子有限公司);BS210S 精密电子天平(德国赛多利斯公司);高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);全自动生化检测仪 SH-DXC800(美国贝克曼库尔特公司);倒置相差荧光显微镜 CKX31-A12PHP(日本 Olympus 公司);超微量核酸蛋白定量仪(美国 Thermo Nanodrop 公司);实时定量 iQ5 RT-PCR 仪,蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 动物

雄性 ICR 小鼠,SPF 级,18~22 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物许可证号 SCXK(沪)2013-0016。

2 方法

2.1 造模及给药方法

2.1.1 DL-乙硫氨酸急性脂肪肝小鼠模型 将小鼠按体重随机分为 7 组,每组 10 只,分别为:溶剂对照组,大黄素(Emo)组(240 mg/kg),DL-乙硫氨酸(DL-Eth)模型组,大黄素给药(240, 120, 60 mg/kg)、DL-乙硫氨酸造模(DL-Eth + Emo)高、中、低剂量组和熊去氧胆酸给药(150 mg/kg)、DL-乙硫氨酸造模(DL-Eth + UDCA)组。除对照组及 DL-Eth 模型组给予等体积溶剂对照(0.5% CMC-Na)外,其余各组连续灌胃给予大黄素或熊去氧胆酸 7 d,第 7 天给药前造模,小鼠禁食 6 h,除溶剂对照组和 Emo 组给予等体积溶剂对照(0.5% CMC-Na)外,其余各组分别灌胃给予 DL-乙硫氨酸(250 mg/kg, 0.5% CMC-Na)。造模 1 h 后,Emo 组、DL-Eth + Emo 各剂量组及 DL-Eth + UDCA 组分别灌胃给予大黄素或熊去氧胆酸,其余两组给予同体积 0.5% CMC-Na 溶剂对照。将所有动物禁食过夜。在给予 DL-乙硫氨酸 22 h 后,所有动物摘眼球取血后脱颈椎处死,然后快速分离肝脏组织。

2.1.2 四环素急性脂肪肝小鼠模型 将小鼠按体重随机分为 7 组,每组 10 只,分别为:溶剂对照组,四环素 (Tetra) 模型组,大黄素给药 (240, 120, 60 mg/kg)、四环素造模 (Tetra + Emo) 高、中、低剂量组,东宝肝泰片给药 (600 mg/kg)、四环素造模 (Tetra + DB) 组和鸡骨草总黄酮碳苷给药 (200 mg/kg)、四环素造模 (Tetra + AME) 组。除溶剂对照组及 Tetra 模型组给予等体积溶剂对照 (0.5% CMC-Na) 外,其余各组连续灌胃给予大黄素、东宝肝泰片或鸡骨草总黄酮碳苷 7 d,从给药第 4 天起造模,除正常组给予等体积溶剂对照 (生理盐水) 外,其余各组分别腹腔注射四环素 (200 mg/kg)。1 h 后,Tetra + Emo 各剂量组、Tetra + DB 组和 Tetra + AME 组分别灌胃给予大黄素、东宝肝泰片或鸡骨草总黄酮碳苷,持续造模 4 d,将所有动物禁食过夜。在末次给予四环素 22 h 后,所有动物摘眼球取血后脱颈椎处死,然后快速分离肝脏组织。

2.2 血清生化检测

各组动物血样收集完毕后,室温静置 1 ~ 2 h 后,4 500 r/min 离心 10 min,分离血清,全自动生化分析仪检测血清三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 指标。

2.3 肝脏 TG、TC 检测

称取肝脏组织 300 mg,加提取液 (氯仿-甲醇,1:1) 2 mL,制成匀浆,再补加提取液至 5 mL 混匀。经 48 h 抽提,不断振荡,最后 3 000 r/min 离心 10 min 得上清液,按试剂盒说明书分别进行肝脏 TG、TC 的测定。此外,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,以每克蛋白含有的 TG、TC 含量计算肝脏脂质含量。

2.4 组织病理学检测

取肝脏左半叶于 10% 福尔马林固定,经石蜡包埋,制成 5 μ m 切片,HE 染色后,在光镜下观察肝脏病理改变,进行肝脏病理检测。

2.5 Western blot 检测相关蛋白表达

称取各组小鼠肝脏 100 mg,加入全蛋白裂解液 1 mL 进行匀浆,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用 BCA 法对蛋白进行定量,每组取等量蛋白进行电泳,恒流将蛋白转至 PVDF 膜上,室温封闭 1 h,与一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后与二抗室温孵育

1 h 后洗膜曝光。

2.6 RT-PCR 检测相关基因表达

称取各组小鼠肝脏 100 mg,加 Trizol 1 mL,提取总 RNA,定量后取 RNA 2 μ g 逆转录为 cDNA,用 SYBR Green 进行扩增,采用的循环为:95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 1 min,65 $^{\circ}$ C 10 s,共 40 个循环。采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶作为每次扩增过程中的内参,引物序列见表 1。

Table 1 Sequences of real time PCR primers

Gene	Primer sequence (5'→3')
GADPH	Forward:GTCTTCACCACCATGGAGAAGGC
	Reverse:ATTCAATTGTCATACCAGGAAA
PPAR α	Forward:AGGCAGATGACCTGGAAAGTC
	Reverse:ATGCGTGAACCTCGTAGTGG
CD36	Forward:CCATTCCTCAGTTTGTTCC
	Reverse:TGCATTTGCCAATGCTAGC
MTTP	Forward:CTCTTGGCAGTGCTTTTCTCT
	Reverse:GAGCTTGATAGCCGCTCATT

2.7 统计学分析

数据采用 GraphPad 统计软件进行处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 大黄素对小鼠急性肝损伤的改善作用

3.1.1 大黄素对 DL-乙硫氨酸所致小鼠肝损伤的改善作用 如表 2 所示,与正常组相比,灌胃给予 DL-乙硫氨酸后肝脏肿大且出现颗粒状黄色斑点,外观呈黄色,肝脏系数显著增加 ($P < 0.001$),Emo 组对肝脏系数没有明显影响。与 DL-Eth 模型组相比,各给药组对肝脏外观异常均有不同程度的改善并且能显著降低肝脏系数。DL-Eth 模型组血清 AST、ALT 显著升高 ($P < 0.001, P < 0.01$),Emo 组血清 AST、ALT 均有不同程度降低,DL-Eth + Emo 高剂量组显著降低血清 AST 和 ALT ($P < 0.001, P < 0.05$),提示大黄素可以减轻 DL-乙硫氨酸导致的肝脏损伤。

肝脏病理结果如图 1 显示,正常对照组和 Emo 组肝脏无明显病变,DL-Eth 模型组可见明显的肝细胞肿大及小泡型肝脂肪变性,而这一病变在 DL-Eth + Emo 高剂量组和 DL-Eth + UDCA 组得到显著改善。

Table 2 Changes on the serum and hepatic biochemical parameters in DL-ethionine-induced fatty liver in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Dose/ (mg/kg)	Liver index/ %	Serum AST/ (U/L)	Serum ALT/ (U/L)	Serum TG/ (mmol/L)	Hepatic TG/ (mmol/g pro)	Hepatic TC/ (mmol/g pro)
Control		4.02 ± 0.12 ***	90.20 ± 1.92 ***	25.81 ± 1.64 **	1.32 ± 0.16 ***	40.44 ± 4.12 **	101.80 ± 4.38 ***
Emo	240	4.18 ± 0.20 ***	109.12 ± 4.15 **	24.98 ± 1.58 **	1.43 ± 0.26 ***	40.23 ± 2.79 **	107.30 ± 4.69 **
DL-Eth	250	5.20 ± 0.10 ###	145.20 ± 7.00 ###	34.4 ± 5.22 ##	2.32 ± 0.33 ###	69.61 ± 4.04 ##	169.52 ± 6.46 ###
DL-Eth + Emo	250 + 60	4.96 ± 0.11 *	143.20 ± 7.46	33.5 ± 3.78	1.02 ± 0.15 ***	59.40 ± 2.32	111.21 ± 6.67 *
	250 + 120	4.86 ± 0.15 **	137.40 ± 5.73	32.4 ± 2.60	1.13 ± 0.21 ***	38.38 ± 3.42 **	112.89 ± 6.86 *
	250 + 240	4.70 ± 0.16 ***	98.42 ± 4.40 ***	26.6 ± 2.61 *	1.02 ± 0.15 ***	37.62 ± 3.13 ***	114.32 ± 6.83 *
DL-Eth + UDCA	250 + 150	4.93 ± 0.15 *	138.10 ± 4.85	30.12 ± 3.54	1.13 ± 0.21 ***	38.12 ± 2.74 **	85.08 ± 3.80 ***

Emo: Emodin; DL-Eth: DL-ethionine; UDCA: Ursodeoxycholic acid
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs DL-Eth group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs control group

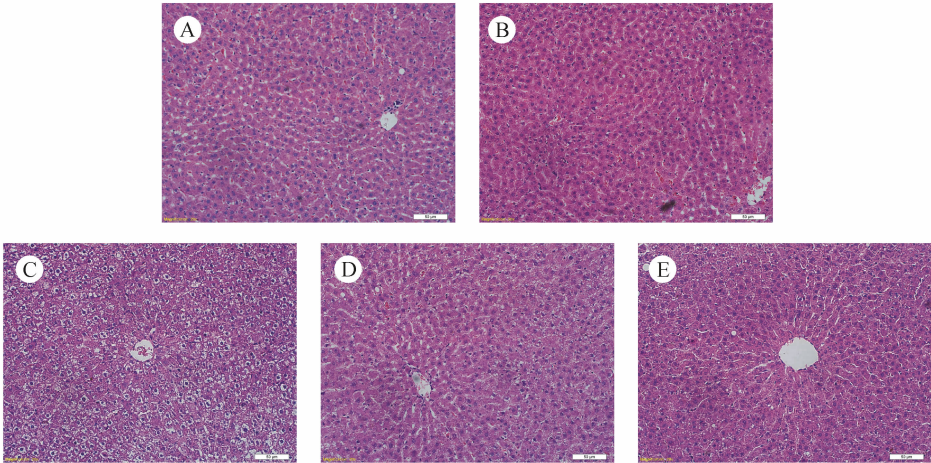


Figure 1 Emodin prevented hepatic steatosis caused by DL-Eth in mice(HE, $\times 200$)
A: Control; B: Emo(240 mg/kg); C: DL-Eth(250 mg/kg); D: DL-Eth + Emo(250 mg/kg + 240 mg/kg); E: DL-Eth + UDCA (250 mg/kg + 150 mg/kg)

3.1.2 大黃素對四環素所致小鼠肝損傷的改善作用 如表 3 所示,與正常組相比,腹腔注射四環素后肝臟腫大、外觀呈黃色,肝臟系數顯著增加($P < 0.001$)。與 Tetra 模型組相比,各給藥組對肝臟外觀異常均有不同程度的改善,并不同程度显著降低肝臟系數。與正常組相比,Tetra 組血清 ALT、AST 显著升高($P < 0.001$);而大黃素各劑量組和阳性

药组 ALT 和 AST 显著降低,提示大黃素可以减轻四環素导致的肝臟損傷。

如图 2 肝臟病理结果显示,正常对照组肝臟无明显病变,Tetra 模型組可见明显的肝細胞腫大及肝脂肪变性,而这一病变在 Tetra + Emo 高劑量組、Tetra + DB 組和 Tetra + AME 組得到显著改善。

Table 3 Changes on the serum and hepatic biochemical parameters in tetracycline-induced fatty liver in mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Dose/ (mg/kg)	Liver index/ %	Serum AST/ (U/L)	Serum ALT/ (U/L)	Serum TG/ (mmol/L)	Hepatic TG/ (mmol/g pro)	Hepatic TC/ (mmol/g pro)
Control		4.40 ± 0.40 ***	95.12 ± 5.09 ***	40.12 ± 5.87 ***	1.24 ± 0.23 ***	35.71 ± 4.12 ***	20.60 ± 3.05 ***
Tetra	200	5.90 ± 0.36 ###	302.10 ± 20.14 ###	150.34 ± 10.97 ###	0.20 ± 0.03 ###	170.12 ± 17.68 ###	69.05 ± 4.31 ###
Tetra + Emo	200 + 60	5.00 ± 0.30 **	200.23 ± 20.91 *	100.34 ± 23.12 **	0.35 ± 0.04 *	151.20 ± 13.87	60.43 ± 4.56
	200 + 120	4.93 ± 0.17 ***	190.51 ± 20.55 **	93.54 ± 24.71 **	0.41 ± 0.06 ***	145.03 ± 12.75 **	55.60 ± 8.30 **
	200 + 240	4.83 ± 0.15 ***	180.43 ± 9.98 ***	80.43 ± 14.32 ***	0.49 ± 0.09 ***	100.24 ± 6.50 ***	41.20 ± 2.59 ***
Tetra + DB	200 + 600	4.70 ± 0.21 ***	181.76 ± 9.07 ***	90.33 ± 11.98 *	0.33 ± 0.05	120.30 ± 7.91 **	49.43 ± 3.65 ***
Tetra + AME	200 + 200	4.50 ± 0.25 ***	186.32 ± 7.64 **	84.67 ± 4.98 **	0.40 ± 0.06 ***	144.40 ± 11.89	54.43 ± 4.16 *

Tetra: Tetracycline; DB: Compound Dong Bao Gan Tai; AME: Total flavonoid C-glycosides from *Abrus mollis* extract

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Tetra group; ### $P < 0.001$ vs control group

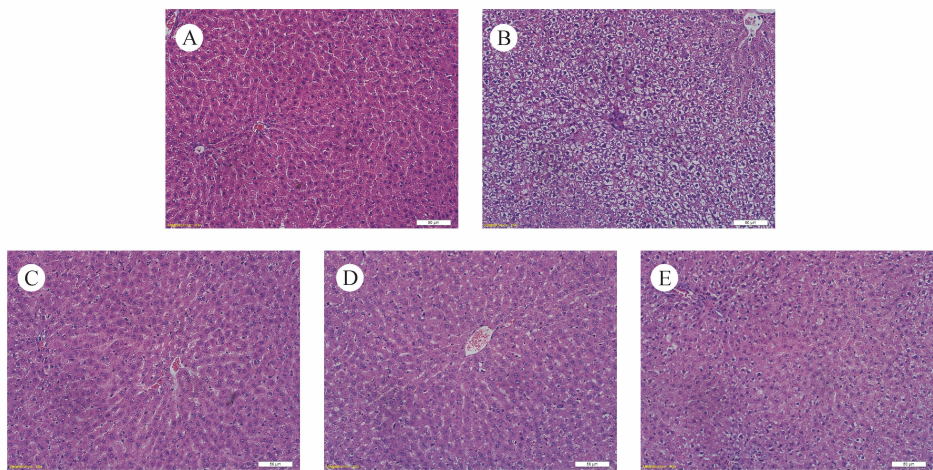


Figure 2 Emodin prevented hepatic steatosis caused by tetracycline in mice (HE, ×200)
A: Control; B: Tetra (200 mg/kg); C: Tetra + Emo (200 mg/kg + 240 mg/kg); D: Tetra + DB (200 mg/kg + 600 mg/kg); E: Tetra + AME (200 mg/kg + 200 mg/kg)

3.2 大黄素对小鼠急性脂肪肝脂质蓄积的改善作用

3.2.1 大黄素对 DL-乙硫氨酸所致小鼠脂质蓄积的改善作用 如表 2 所示,与正常组相比,灌胃给予 DL-乙硫氨酸后,小鼠血脂紊乱,血清 TG 显著升高($P < 0.001$);与 DL-Eth 模型组相比,DL-Eth + Emo 各剂量组及 DL-Eth + UDCA 组血清 TG 均显著降低($P < 0.001$)。DL-Eth 模型组小鼠肝脏 TG 和 TC 显著升高($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$);与模型组相比,DL-Eth + Emo 中、高剂量组和 DL-Eth + UDCA 组肝脏 TG 的含量均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$ 和 $P < 0.01$),DL-Eth + Emo 各剂量组和 DL-Eth + UDCA 组肝脏 TC 的含量均显著降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.001$)。与正常组相比,Emo 组对正常小鼠血脂和肝脂均无影响。

3.2.2 大黄素对四环素所致小鼠脂质蓄积的改善作用 如表 3 所示,与正常组相比,Tetra 模型组血清 TG 显著下降($P < 0.001$),Tetra + Emo 中、高剂量组和 Tetra + AME 组血清 TG 水平均显著升高($P < 0.001$ 和 $P < 0.001$),Tetra 模型组肝脏 TG 和 TC 显著升高($P < 0.001$ 和 $P < 0.001$),Tetra + Emo 各剂量组肝脏 TG 和 TC 水平降低呈剂量依赖性。

3.3 大黄素改善小鼠急性脂肪肝的作用机制
3.3.1 大黄素对 DL-乙硫氨酸诱导的脂肪酸合成相关蛋白改变的调节作用 Western blot 结果表明,DL-Eth 模型组小鼠肝脏中 SREBP1、FAS 表达增加,大黄素能显著下调其表达;DL-乙硫氨酸抑制 AMPK 和 ACC 的磷酸化,大黄素能激活两者的磷酸化(图 3)。

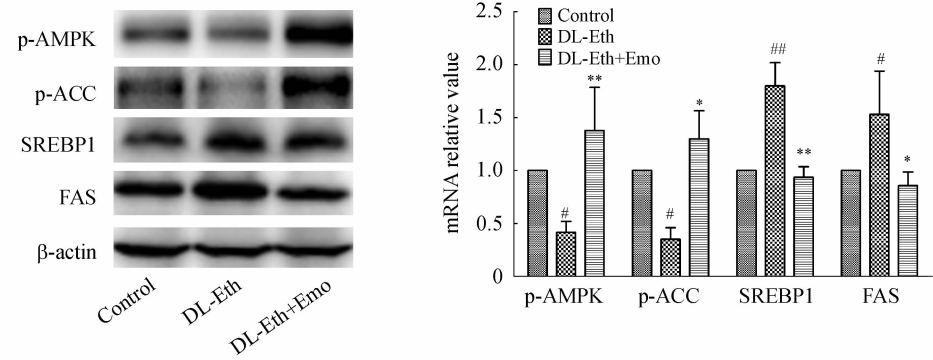


Figure 3 Effect of Emo(240 mg/kg) on AMPK,ACC phosphorylation and lipogenic-related protein expression induced by DL-Eth in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DL-Eth group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group

3.3.2 大黄素对四环素诱导的脂肪酸摄取、氧化和分泌基因改变的调节作用 RT-PCR 结果显示, Tetra 模型组脂肪转位酶 (CD36) 升高, 大黄素显著下调 CD36 的表达, Tetra 模型组过氧化物酶体增

殖物激活受体 α (PPAR α)、微粒体三酰甘油转运蛋白 (MTTP) 显著下调, 大黄素显著上调 PPAR α 、MTTP 的表达 (图 4)。

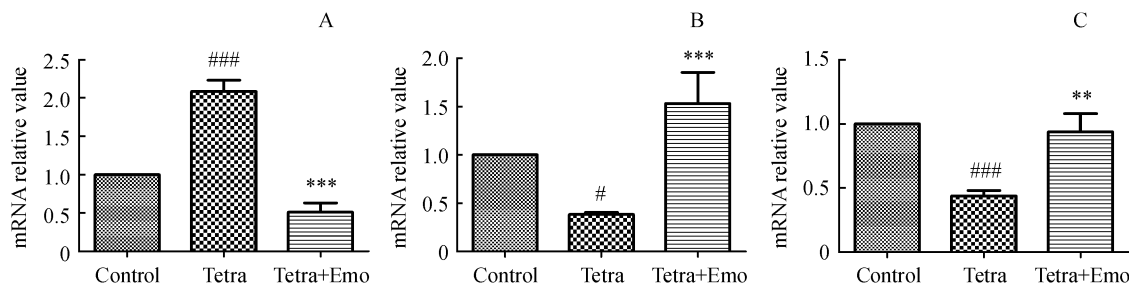


Figure 4 Regulation of Emo (240 mg/kg) on fatty acid uptake, oxidation and secretion-related genes in mice hepatocytes measured by RT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

A: CD36; B: PPAR α ; C: MTTP

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Tetra group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs control group

4 讨论

目前用于建立急性脂肪肝的药物包括四环素、DL-乙硫氨酸等^[7]。DL-乙硫氨酸作用机制是其与甲硫氨酸结构相似并与之竞争, 取代甲基而提供乙基导致肝脏的蛋白合成发生障碍, 使肝脏的载脂蛋白减少, 导致 TG 蓄积于肝脏而成脂肪肝^[8]。四环素可加速脂肪酸的摄取和酯化、损伤线粒体脂肪酸 β -氧化、抑制肝脏极低密度脂蛋白的释放^[9-10], 最终诱发脂肪肝。

本实验表明, DL-乙硫氨酸显著增加血清 TG、肝脏 TG 和肝脏 TC 含量, 大黄素高、中、低 3 个剂量组均可不同程度的降低血清 TG、肝脏 TG 和肝脏 TC 含量, 大黄素高剂量组可显著减少 DL-乙硫氨酸所致的肝细胞脂肪变性。此外, DL-乙硫氨酸造模后血清 AST 和 ALT 显著升高, 大黄素高剂量组 (240 mg/kg) 可显著降低 AST 和 ALT 水平, 大黄素低、中剂量组可一定程度降低血清 AST 和 ALT 水平, 说明大黄素低、中剂量不仅对 DL-乙硫氨酸造成血脂和肝脂障碍有改善作用, 而且还对损伤的肝脏有一定的保护作用。大黄素单给药组血清 AST 较正常组升高 22%, 但大黄素单给药组血清 ALT 较正常组并无升高, 组织病理学检查也未见明显病变。国际医学科学组织主办的巴黎国际会议共识意见分类标准表明: ALT 或者 AST 上升至正常上限 2 倍以上时, 才可定义为肝损伤^[11], 因此 AST 的变化并不能提示大黄素在 240 mg/kg 剂量下有肝毒性, 但是

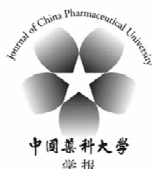
大黄素及其类似物的肝毒性仍需予以关注。

固醇调节元件结合蛋白 1 (SREBP1) 是控制脂肪生成的转录因子, SREBP1 过表达会导致肝脏脂质蓄积进而发展为脂肪肝^[12]。研究表明, 肝脏脂质蓄积、血脂异常和 2 型糖尿病均与 SREBP1 的失调有关^[13-14]。因此, SREBP1 成为治疗脂肪肝的重要靶点。在 DL-乙硫氨酸模型中, 大黄素可以抑制 SREBP1 和下游脂肪酸合成相关蛋白的表达, 减少肝脏脂质生成, 进而减少肝脏的脂质蓄积。激活的 AMPK 作为 SREBP1 的上游激酶可抑制 SREBP1 的转录, 从而降低肝细胞的脂质生成^[15]。本研究结果表明, DL-乙硫氨酸模型小鼠可见肝脏 AMPK 的磷酸化被抑制, 而给予大黄素后 p-AMPK 升高, AMPK 被激活。以上结果提示, 大黄素可通过 AMPK-SREBP1 通路改善 DL-乙硫氨酸所致的肝脏脂质紊乱, 发挥其降低肝脂的药效作用。

在四环素模型中, 给药后增加了 CD36 的表达, 加速肝细胞内脂肪酸的酯化, 增加脂肪酸的摄入; 四环素降低了 PPAR α 的表达, 减弱了肝脏对脂肪酸的氧化; 同时四环素可抑制 MTTP, 使肝脏脂肪酸分泌功能下降。因此, 四环素模型组较正常组血清 TG 显著降低、肝脏 TG 和 TC 含量显著增加, 而给药大黄素后能减少脂肪酸的摄入、增加脂肪酸的氧化和分泌, 使血清 TG 得以恢复。本实验研究表明大黄素同样可缓解四环素引起的肝脏损伤, 改善四环素引起的肝脂紊乱, 对四环素引起的急性脂肪肝具有较好的药效作用。

参考文献

- [1] Hardwick JP, Osei-Hyiaman D, Wiland H, *et al.* PPAR/RXR regulation of fatty acid metabolism and fatty acid omega-hydroxylase (CYP4) isozymes: implications for prevention of lipotoxicity in fatty liver disease[J]. *PPAR Res*, 2009, **2009**:952734.
- [2] Portincasa P, Grattagliano I, Palmieri VO, *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: recent advances from experimental models to clinical management[J]. *Clin Biochem*, 2005, **38** (3):203–217.
- [3] Xue J, Ding W, Liu Y. Anti-diabetic effects of emodin involved in the activation of PPARgamma on high-fat diet-fed and low dose of streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Fitoterapia*, 2010, **81** (3):173–177.
- [4] Song P, Kim JH, Ghim J, *et al.* Emodin regulates glucose utilization by activating AMP-activated protein kinase[J]. *J Biol Chem*, 2013, **288** (8):5732–5742.
- [5] Heo SK, Yun HJ, Park WH, *et al.* Emodin inhibits TNF-alpha-induced human aortic smooth-muscle cell proliferation via caspase-and mitochondrial-dependent apoptosis[J]. *J Cell Biochem*, 2008, **105** (1):70–80.
- [6] Wang CH, Gao ZQ, Ye B, *et al.* Effect of emodin on pancreatic fibrosis in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, **13** (3):378–382.
- [7] Liu WH, Qi Y, Jia D. Research progress on experimental models of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2015, **49** (3):95–97.
- [8] Yoshizawa F, Mochizuki S, Doi M, *et al.* Ethionine-induced ATP depletion represses mTOR signaling in the absence of increases in AMP-activated protein kinase activity in the rat liver[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, **73** (9):1984–1988.
- [9] Yu HY, Wang BL, Zhao J, *et al.* Protective effect of bicyclol on tetracycline-induced fatty liver in mice[J]. *Toxicology*, 2009, **261** (3):112–118.
- [10] Choi YJ, Lee CH, Lee KY, *et al.* Increased hepatic Fatty Acid uptake and esterification contribute to tetracycline-induced steatosis in mice[J]. *Toxicol Sci*, 2015, **145** (2):273–282.
- [11] Bénichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting[J]. *J Hepatol*, 1990, **11** (2):272–276.
- [12] Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, *et al.* Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Mol Med*, 2007, **20** (3):351–358.
- [13] Raghov R, Yellaturu C, Deng X, *et al.* SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, **19** (2):65–73.
- [14] Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury[J]. *J Clin Invest*, 2004, **114** (2):147–152.
- [15] Li Y, Xu S, Mihaylova MM, *et al.* AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice[J]. *Cell Metab*, 2011, **13** (4):376–388.



中國藥科學報

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿

提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果

展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文

科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号: 28-115, 欢迎订阅, 欢迎投稿!