

姜黄素和水飞蓟素对大鼠非酒精性脂肪性肝炎的作用及机制比较

万忠惠, 吴富梅

万忠惠, 吴富梅, 六盘水职业技术学院医学系 贵州省六盘水市 553001

万忠惠, 讲师, 主要从事内科学基础的研究。

作者贡献分布: 万忠惠负责课题的设计、研究过程及论文写作; 吴富梅负责试剂的提供与数据分析。

通讯作者: 万忠惠, 讲师, 553001, 贵州省六盘水市钟山大道西段, 六盘水职业技术学院医学系, 18908582111@189.cn
电话: 0858-8777566

收稿日期: 2014-12-15 修回日期: 2015-01-06

接受日期: 2015-01-12 在线出版日期: 2015-03-18

Curcumin and silymarin for nonalcoholic steatohepatitis in rats: Comparison of effects and mechanisms

Zhong-Hui Wan, Fu-Mei Wu

Zhong-Hui Wan, Fu-Mei Wu, Department of Medicine, Liupanshui Vocational and Technical College, Liupanshui 553001, Guizhou Province, China

Correspondence to: Zhong-Hui Wan, Lecturer, Department of Medicine, Liupanshui Vocational and Technical College, Xidian, Zhongshan Avenue, Liupanshui 553001, Guizhou Province, China. 18908582111@189.cn

Received: 2014-12-15 Revised: 2015-01-06

Accepted: 2015-01-12 Published online: 2015-03-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of curcumin and silymarin on nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in rats and the underlying mechanisms.

METHODS: Forty-eight SD rats were randomly divided into four groups: a normal control group, a model group, a curcumin group and a silymarin group. NASH was induced by feeding a fat-rich diet in all rats except the normal control group. The rats in the curcumin

group and silymarin group were treated with curcumin and silymarin, respectively. After six weeks, all the rats were sacrificed. Serum alanine aminotransferase (ALT), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and hepatic TG, TC, MDA, and SOD were measured. Expression of peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) mRNA in the liver was detected.

RESULTS: Compared with the other three groups, serum ALT, TG, TC, MDA and hepatic TG, TC, and MDA in the model group were significantly higher. The expression of PPAR α mRNA in the liver of rats in the silymarin group was significantly higher than that in the curcumin group, while serum fasting insulin (FINS) and fasting plasma glucose (FPG) were significantly lower.

CONCLUSION: Both curcumin and silymarin are effective in treating rat nonalcoholic fat liver, but the mechanisms are different. Curcumin exerts anti-inflammatory and antioxidant effects, and silymarin promotes hepatic PPAR α mRNA expression.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Curcumin; Silymarin; Nonalcoholic steatohepatitis; Mechanisms

Wan ZH, Wu FM. Curcumin and silymarin for nonalcoholic steatohepatitis in rats: Comparison of effects and mechanisms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(8): 1285-1289 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1285.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i8.1285>

■背景资料

现今, 还未明确发现非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 的发病机制, 有相关研究认为NASH发生和发展与胰岛素受体(insulin receptor)缺陷和糖转运障碍引起的胰岛素抵抗及炎症有非常重要的关系。

■同行评议者

李康, 教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

■ 研究前沿

姜黄素能抗炎、线粒体保护和抗纤维化的作用, 所以对各种肝脏疾病有抑制作用。本文通过高脂饮食诱导大鼠制备NASH模型, 研究并探讨姜黄素和水飞蓟素对干预NASH的不同作用机制。

摘要

目的: 研究并探讨姜黄素和水飞蓟素对干预非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)的不同作用机制。

方法: 通过高脂饮食诱导大鼠制备NASH模型。将48只健康♂SD大鼠平均分成4组, 其中正常组12只, 给予普通正常饲料; 模型组12只, 姜黄素组12只, 水飞蓟素组12只, 均给予高脂饲料, 即碳水化合物: 脂肪: 蛋白质为37: 45: 18。NASH模型制备成功后, 姜黄素组每天还需按时给予治疗量的姜黄素羧甲基纤维素(carboxy methyl cellulose, CMC)混悬液50 mg/kg, 水飞蓟素组每天按时给予水飞蓟素CMC混悬液100 mg/kg, 正常组和模型组给予CMC溶液灌胃。治疗时间为6 wk。对比大鼠肝脏、血清生物化学指标、胰岛素抵抗水平、组织病理学、组织谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、放射免疫和过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferators-activated receptor α , PPAR α) mRNA表达。

结果: 模型组大鼠的肝指数、总胆固醇(total cholesterol, TC)、谷草转氨酶(aspartate amino transferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、血清三酰甘油、MDA、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)显著高于正常组和两个治疗组; 水飞蓟素组PPAR α mRNA表达明显高于模型组和姜黄素组, FINS和FPG的含量显著低于姜黄素组。

结论: 姜黄素、水飞蓟素对高脂饮食诱导制备大鼠NASH模型具有一定的干预作用, 但二者的作用机制不同, 姜黄素是通过抗炎和抗氧化作用作用于NASH, 水飞蓟素则是通过促进肝脏PPAR α mRNA的表达抑制NASH的发生和发展。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 姜黄素; 水飞蓟素; 非酒精性脂肪性肝炎; 机制

核心提示: 姜黄素、水飞蓟素对高脂饮食诱导制备大鼠非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)模型具有一定的干预

作用, 但二者的作用机制不同, 姜黄素是通过抗炎和抗氧化作用于NASH, 水飞蓟素则是通过促进肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferators-activated receptor α) mRNA的表达抑制NASH的发生和发展。

万忠惠, 吴富梅. 姜黄素和水飞蓟素对大鼠非酒精性脂肪性肝炎的作用及机制比较. 世界华人消化杂志 2015; 23(8): 1285-1289
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1285.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i8.1285>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种主要特征为弥漫性肝细胞大泡性脂肪变的临床综合征, 其引发的因素排除酒精和其他明确的损肝因素, 主要分为单纯性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)、肝硬化和脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)^[1-5]。NASH是一类重要的NAFLD, 是NAFL向肝硬化发展的重要限速步骤^[6]。现今, 还未明确发现NASH的发病机制, 有相关研究^[7]认为NASH发生和发展与胰岛素受体(insulin receptor, IR)缺陷和糖转运障碍引起的胰岛素抵抗及炎症有非常重要的关系。

姜黄素(curcumin)是多酚类化合物中的一种, 是从天南星科和姜科植物中提取出来的, 在中药石菖蒲、郁金、姜黄和莪术中大量存在。有研究^[8]表明姜黄素能抗炎、线粒体保护和抗纤维化的作用, 所以对各种肝脏疾病有抑制作用。水飞蓟素(silymarin)是一种植物提取物, 提取自菊科药用植物水飞蓟种子的种皮。水飞蓟素的主要成分为黄酮类物质, 包括水飞蓟宾、水飞蓟宁、水飞蓟亭和异水飞蓟宾等^[9]。本文通过高脂饮食诱导大鼠制备NASH模型, 研究并探讨姜黄素和水飞蓟素对干预NASH的不同作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 姜黄素(佛山市禾大生物科技有限公司); 水飞蓟素(西安皓源生物技术有限公司)。SD大鼠(♂, 体质量150-180 g, 温度25℃±2℃, 湿度40%-70%)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组和大鼠NASH模型的制备: 将48只健康♂SD大鼠平均分成4组, 其中正常组12只, 给予普通正常饲料; 模型组12只, 姜黄素

■ 相关报道

姜黄素(curcumin)是多酚类化合物中的一种, 是从天南星科和姜科植物中提取出来的, 在中药石菖蒲、郁金、姜黄和莪术中大量存在。有研究表明姜黄素能抗炎、线粒体保护和抗纤维化的作用, 所以对各种肝脏疾病有抑制作用。水飞蓟素(silymarin)是一种植物提取物, 提取自菊科药用植物水飞蓟种子的种皮。水飞蓟素的主要成分为黄酮类物质, 包括水飞蓟宾、水飞蓟宁、水飞蓟亭和异水飞蓟宾等。

表 1 4组大鼠肝功能和血脂检测结果比较 ($n = 12$, mean \pm SD)

分组	三酰甘油(mmol/L)	TC(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常组	0.41 \pm 0.08	0.81 \pm 0.07	51.09 \pm 1.58	81.76 \pm 6.34
模型组	0.73 \pm 0.12	1.52 \pm 0.23	89.77 \pm 4.33	132.7 \pm 2.98
姜黄素组	0.37 \pm 0.06	1.05 \pm 0.14	46.79 \pm 3.12	80.14 \pm 4.11
水飞蓟素组	0.35 \pm 0.15	1.12 \pm 0.08	45.88 \pm 1.87	81.40 \pm 7.14

TC: 总胆固醇; ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶。

组12只, 水飞蓟素组12只, 均给予高脂饲料, 即碳水化合物: 脂肪: 蛋白质为37: 45: 18。饲养6 wk, 然后各组均取出2只, 处死, 观察大鼠NASH模型的制备情况。

1.2.2 姜黄素和水飞蓟素干预: NASH模型制备成功后, 每组大鼠除继续同1.2.1项下喂养以外, 姜黄素组每天还需按时给予治疗量的姜黄素羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)混悬液50 mg/kg, 水飞蓟素组每天按时给予水飞蓟素CMC混悬液100 mg/kg, 正常组和模型组给予CMC溶液灌胃。治疗时间为6 wk。

1.2.3 动物处理: 治疗6 wk结束后, 大鼠禁食不禁水1 h后, 称质量, 腹腔注射氯胺酮麻醉。心脏采血, 用超速离心机离心, 分离出血清, 同时采集肝脏标本。

1.2.4 检测指标: 观察大鼠肝脏: 用肉眼对所有大鼠肝脏的质地和色泽等进行观察, 计算大鼠的肝指数, 即肝脏质量与体质量的百分比。

检测大鼠血清生物化学指标: 大鼠的胆固醇(total cholesterol, TC)、谷草转氨酶(aspartate amino transferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)和血清三酰甘油水平用全自动生物化学分析仪进行测定。

测定大鼠的胰岛素抵抗水平(homeostasis model insulin receptor, HOMA-IR): 血清中空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)的含量和空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)的浓度分别用用比色法和放免法检测, 计算HOMA-IR指数。

大鼠组织病理学观察: 用HE染色法处理大鼠肝脏标本, 在光镜下观察, 对大鼠肝脏脂变程度进行判断。

大鼠肝组织谷胱甘肽(glutathione, GSH)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)的检测: 将大鼠肝组织匀浆后, 用考马斯亮蓝法对蛋白质进行定量。GSH含量和超氧化物歧化酶

(superoxide dismutase, SOD)的活性用比色法进行检测, MDA的含量用硫代巴比妥酸(2-thiobarbituric acid, TBA)法进行测定。

检测IRA(放射免疫): 将提取的大鼠血清在-80 °C的条件下保存, 应用购买的试剂盒测定大鼠血清中白介素-4(interleukin-4, IL-4)、IL-6和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)的水平。

过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferators-activated receptor α , PPAR α) mRNA表达检测: 采用实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)法测定大鼠PPAR α mRNA表达。

统计学处理 选用SPSS17.0软件对实验结果进行统计学处理, 全部实验结果进行 F 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 4组大鼠肝指数比较 模型组大鼠的肝指数显著高于正常组和姜黄素组治疗组和水飞蓟素组, 差异有统计学意义(3.92 ± 0.19 vs 2.29 ± 0.23 , 3.01 ± 0.15 , 3.15 ± 0.21 , $P < 0.05$)。

2.2 4组大鼠肝功能和血脂检测结果比较 模型组大鼠的TC、AST、ALT和血清三酰甘油显著高于正常组和两个治疗组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

2.3 4组大鼠MDA、GSH含量和SOD活性分析结果比较 模型组大鼠的MDA显著高于正常组和两个治疗组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 模型组大鼠的GSH显著低于正常组和两个治疗组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 模型组大鼠的SOD活性显著低于正常组和两个治疗组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

2.4 4组大鼠胰岛素抵抗检测 模型组大鼠血清中FINS和FPG的含量明显高于正常组和水飞蓟素组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 模型组大鼠HOMA-IR明显高于正常组和水飞蓟素组,

■ 创新盘点

本文采用高脂饮食诱导制备大鼠NASH模型, 喂养6 wk后, 大鼠出现NASH疾病的各种特点, 说明大鼠已经由单纯性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)发展到NASH, 方法简单可靠。

■ 应用要点

姜黄素干预NASH的作用机制可能是通过增加谷胱甘肽(glutathione)含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性, 降低丙二醛(malondialdehyde, MDA)的生成量, 同时减少白介素-6(interleukin-6)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α)的表达来达到干预NASH的作用。水飞蓟素干预NASH的作用机制可能是通过降低大鼠血清谷草转氨酶(aspartate amino transferase)活性和MDA含量, 提高肝细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferators-activated receptor α) mRNA的表达和SOD活性, 来达到干预NASH的作用。

■名词解释

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD): 是一种主要特征为弥漫性肝细胞大泡性脂肪变的临床病理综合征, 其引发的因素排除酒精和其他明确的损肝因素, 主要分为NAFL、肝硬化和脂肪性肝炎。

表 2 4组大鼠MDA、GSH含量和SOD活性分析结果比较 (n = 12, mean ± SD)

分组	MDA(nmol/mgprot)	GSH(mg/gprot)	SOD(U/mgprot)
正常组	0.71 ± 0.07	1.49 ± 0.16	390.3 ± 15.14
模型组	1.62 ± 0.04	1.12 ± 0.15	327.8 ± 21.33
姜黄素组	0.58 ± 0.48	1.54 ± 0.17	419.7 ± 41.81
水飞蓟素组	0.62 ± 0.44	1.55 ± 0.13	421.8 ± 55.32

MDA: 丙二醛; GSH: 谷胱甘肽; SOD: 超氧化物歧化酶。

表 3 4组大鼠胰岛素抵抗检测比较 (n = 12, mean ± SD)

分组	FPG(mmol/L)	FINS(mIU/L)	HOMA-IR
正常组	3.49 ± 0.58	16.72 ± 3.39	2.61 ± 0.49
模型组	4.81 ± 2.23	17.15 ± 2.13	3.83 ± 2.17
姜黄素组	4.53 ± 1.19	17.09 ± 1.27	2.73 ± 0.62
水飞蓟素组	2.01 ± 0.12	16.05 ± 2.43	1.42 ± 0.61

FPG: 空腹血糖; FINS: 空腹胰岛素; HOMA-IR: 胰岛素抵抗水平。

表 4 4组大鼠血清炎症相关因子IL-4、IL-6和TNF-α检测结果比较 (n = 12, mean ± SD)

分组	TNF-α(ng/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-4(ng/mL)
正常组	0.79 ± 0.15	189.4 ± 36.51	1.09 ± 0.13
模型组	1.41 ± 0.28	231.5 ± 24.32	1.13 ± 0.17
姜黄素组	0.67 ± 0.13	152.3 ± 31.42	0.99 ± 0.21
水飞蓟素组	0.92 ± 0.24	220.5 ± 18.79	0.98 ± 0.32

IL: 白介素; TNF-α: 肿瘤坏死因子α。

差异有统计学意义($P<0.05$); 但是与姜黄素组差异无统计学意义($P>0.05$)(表3)。

2.5 4组大鼠血清炎症相关因子IL-4、IL-6和TNF-α检测结果比较 模型组大鼠血清中TNF-α水平明显高于正常组和两个治疗组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 模型组大鼠血清中IL-6水平明显高于正常组和姜黄素组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 与水飞蓟素组差异无统计学意义($P>0.05$); 4组大鼠血清炎症相关因子IL-4差异无统计学意义($P>0.05$)(表4)。

2.6 4组大鼠PPARα mRNA表达的变化比较 水飞蓟素组PPARα mRNA表达明显高于模型组和姜黄素组, 差异有统计学意义(1.22 ± 0.24 vs $0.82 \pm 0.15, 0.88 \pm 0.34, P<0.05$), 与正常组(1.49 ± 0.23)差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.7 4组大鼠组织病理学观察结果比较 显微镜下观察发现, 正常大鼠肝细胞有清晰小叶结构, 无炎性浸润和脂肪变性情况; 而模型组大鼠出

现肝细胞小叶结构紊乱排列, 出现大大小小的脂肪空泡, 肝细胞有气球样变出现, 以及程度不等的肝细胞炎性浸润和碎屑样坏死, 有的甚至出现桥接坏死; 经过姜黄素和水飞蓟素治疗后, 肝细胞炎性反应程度和脂肪变程度均较模型组低。

3 讨论

本文采用高脂饮食诱导制备大鼠NASH模型, 喂养6 wk后, 大鼠出现NASH疾病的各种特点, 说明大鼠已经由NAFL发展到NASH, 方法简单可靠。

本文的实验结果表明, 经过6 wk的口服给药干预大鼠NASH, 姜黄素和水飞蓟素对NASH均有较好的治疗效果, 均不同程度的干预了NASH疾病的发展。组织病理学观察结果表明经过姜黄素和水飞蓟素治疗后, 肝细胞炎性反应程度和脂肪变程度均较模型组低。但

是姜黄素和水飞蓟素干预NASH的作用机制不同. 姜黄素组的大鼠血清ALT、MDA、IL-6和TNF- α 水平显著降低, GSH含量和SOD活性显著升高. 说明姜黄素干预NASH的作用机制可能是通过增加GSH含量和SOD活性, 降低MDA的生成量, 同时减少IL-6和TNF- α 的表达来达到干预NASH的作用^[10-13]. 水飞蓟素组的大鼠血清AST、MDA水平显著降低, PPAR α mRNA的表达显著提高, 说明水飞蓟素干预NASH的作用机制可能是通过能降低病鼠血清AST活性和MDA含量, 提高肝细胞PPAR α mRNA的表达和SOD活性, 来达到干预NASH的作用^[14,15].

4 参考文献

- 1 周琦, 范建高. 非酒精性脂肪性肝炎的药物治疗. 胃肠病学和肝病杂志 2009; 18: 189-192
- 2 陈润花, 张海鹏, 李军祥. 非酒精性脂肪性肝病的中医证候研究进展. 中西医结合肝病杂志 2008; 18: 63-65
- 3 Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001; 121: 710-723 [PMID: 11522755 DOI: 10.1053/gast.2001.27126]
- 4 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845 [PMID: 9547102 DOI: 10.1016/S0016-5085(98)70599-2]
- 5 Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379 [PMID: 11826411 DOI: 10.1053/jhep.2002.30692]
- 6 李军祥, 陈润花, 苏冬梅, 李立. 中医药治疗非酒精性脂肪性肝病研究述评. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1443-1451
- 7 Tong XL, Zhao LH, Lian FM, Zhou Q, Xia L, Zhang JC, Chen XY, Ji HY. Clinical observations on the dose-effect relationship of gegen qin lian decoction on 54 out-patients with type 2 diabetes. *J Tradit Chin Med* 2011; 31: 56-59 [PMID: 21563509 DOI: 10.1016/S0254-6272(11)60013-7]
- 8 曹玉珍, 张秀英, 王鑫, 王媛媛. 非酒精性脂肪性肝炎动物模型的研究进展. 黑龙江畜牧兽医(科技版) 2011; 1: 17-20
- 9 Smith BW, Adams LA. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7: 456-465 [PMID: 21556019 DOI: 10.1038/nrendo.2011.72]
- 10 Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology* 2006; 49: 450-465 [PMID: 17064291 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02416.x]
- 11 Kashi MR, Torres DM, Harrison SA. Current and emerging therapies in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 396-406 [PMID: 18956296 DOI: 10.1055/s-0028-1091984]
- 12 Kim WS, Lee YS, Cha SH, Jeong HW, Choe SS, Lee MR, Oh GT, Park HS, Lee KU, Lane MD, Kim JB. Berberine improves lipid dysregulation in obesity by controlling central and peripheral AMPK activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E812-E819 [PMID: 19176354 DOI: 10.1152/ajpen-do.90710.2008]
- 13 Guo HX, Liu DH, Ma Y, Liu JF, Wang Y, Du ZY, Wang X, Shen JK, Peng HL. Long-term baicalin administration ameliorates metabolic disorders and hepatic steatosis in rats given a high-fat diet. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30: 1505-1512 [PMID: 19890358 DOI: 10.1038/aps.2009.150]
- 14 郑培永, 马赞颂, 柳涛, 邢练军, 季光. 葛根素对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏脂质的影响. 上海中医药杂志 2008; 42: 61-63
- 15 孙霞, 吴葆杰, 张岫美. 调血脂药物与肌病、横纹肌溶解症. 中国药理学通报 2003; 19: 130-133

同行评价

本文叙述清楚, 分析合理, 对姜黄素、水飞蓟素治疗NASH的机制进行了系统的研究, 对后续的研究有一定的指导意义。

编辑: 韦元涛 电编: 闫晋利

