

# 基于黄疸模型的栀子根与栀子果实保肝作用探讨

肖日传<sup>1</sup>, 罗光明<sup>1,2\*</sup>, 董丽华<sup>1</sup>, 张风波<sup>1</sup>, 朱继孝<sup>1,2</sup>, 伍珊娜<sup>1</sup>, 李波<sup>1</sup>, 谢晶<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004;

2. 江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新中心, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**基于黄疸模型比较栀子根与栀子果实的保肝作用,为扩大栀子的药用部位提供药理学依据,为其资源的综合利用提供理论支撑。**方法:**将KM小鼠随机分为9组,每组10只,分别为正常组,模型组,阳性药联苯双酯组(150 mg·kg<sup>-1</sup>),栀子果实和根部位不同剂量给药组(各设高、中、低3个剂量),提前灌胃给药5 d后采用 $\alpha$ -萘异硫氰酸酯(ANIT)复制小鼠黄疸型肝炎模型,继续给药,造模48 h后处理动物测定血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST), $\gamma$ -谷氨酰转移酶( $\gamma$ -GT),总胆红素(TBIL),总胆汁酸(TBA),肝脏中超氧化物歧化酶(SOD),还原型谷胱甘肽(GSH),谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)水平,苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肝脏组织病理学变化,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术测定肝组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-6(IL-6),转运体胆盐输出泵(BSEP),钠离子-牛磺胆酸协同转运多肽(NTCP)和胆固醇12 $\alpha$ 羟化酶(Cyp8b1) mRNA的表达。**结果:**与正常组比较,模型组血清中ALT,AST, $\gamma$ -GT,TBIL,TBA水平显著升高,组织中SOD,GSH-Px,GSH的活性显著降低,NTCP,Cyp8b1 mRNA的表达显著降低,TNF- $\alpha$ ,IL-6,BSEP mRNA的表达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,栀子果实与根提取物中、高剂量组均能明显降低血清中ALT,AST, $\gamma$ -GT,TBIL,TBA,明显增强肝组织中SOD,GSH-Px,GSH的活性,对肝脏病理损伤有减轻作用,且能明显增加NTCP,Cyp8b1 mRNA的表达,明显降低TNF- $\alpha$ ,IL-6,BSEP mRNA的表达( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );而低剂量组仅对单项指标或几项指标有一定的改善作用。**结论:**栀子果实和根部位对ANIT诱导的黄疸模型小鼠有一定的保护作用,2个部位各剂量对不同指标有不同影响,栀子果实保肝机制可能主要与抗氧化作用和抑制炎症反应有关,而栀子根保肝作用可能主要与胆汁酸代谢有关。

**[关键词]** 栀子根; 栀子果实; 黄疸模型; 保肝

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0101-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20180724

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180111.0919.015.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-12 9:39

## Investigation of Liver Protection Effect of Fruit and Root of *Gardenia jasminoides* Based on Jaundice Model

XIAO Ri-chuan<sup>1</sup>, LUO Guang-ming<sup>1,2\*</sup>, DONG Li-hua<sup>1</sup>, ZHANG Feng-bo<sup>1</sup>,

ZHU Ji-xiao<sup>1,2</sup>, WU Shan-na<sup>1</sup>, LI Bo<sup>1</sup>, XIE Jing<sup>1</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Collaborative Innovation Center of Modern Science and Technology and Industrial Development of Jiangxi Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare the hepatoprotective effects between the fruit and root of *Gardenia jasminoides* based on jaundice model, provide pharmacological basis for extending the medicinal parts of *G. jasminoides*, and provide theoretical support for its comprehensive utilization. **Method:** KM mice were randomly divided into 9 groups ( $n = 10$  in each group): normal group, model group, positive bifendate group

**[收稿日期]** 20171113(016)

**[基金项目]** 国家公益性行业科研专项(201507002);江西省研究生创新专项(YC2017-B083)

**[第一作者]** 肖日传,在读硕士,从事中药资源开发与利用工作,Tel:0791-87118982,E-mail:109001936@qq.com

**[通信作者]** \*罗光明,博士,教授,博士生导师,从事中药资源开发与利用工作,Tel:0791-87118982,E-mail:jzlgm88@163.com

(150 mg·kg<sup>-1</sup>), high, middle and low dose *G. jasminoides* fruit groups, as well as high, middle and low dose *G. jasminoides* root groups. After 5 days of intragastric administration,  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT) was used to establish icteric hepatitis models of mice. Meanwhile, the treatment was given. 48 h later, the alanine aminotransferase (ALT), aspartic transaminase (AST),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT), total bilirubin (TBIL), total bile acid (TBA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), and glutathione peroxidase (GSH-Px) levels were detected in serum and liver, and pathological changes were observed in mouse liver by hematoxylin-eosin (HE) staining; the mRNA expression levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), bile salt export pump (BSEP), sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and cholesterol 12 $\alpha$ -hydroxylase (Cyp8b1) were detected in liver tissue by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** As compared with the normal group, the levels of ALT, AST,  $\gamma$ -GT, TBIL, TBA in serum were significantly increased; SOD, GSH-Px, GSH activities in tissues were significantly decreased; NTCP and Cyp8b1 mRNA expression levels were significantly decreased; and TNF- $\alpha$ , IL-6 and BSEP mRNA expression levels were significantly increased in model group ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the middle and high dose group of both fruit and root of *G. jasminoides* significantly reduced the levels of ALT, AST,  $\gamma$ -GT, TBIL, and TBA in serum, significantly enhanced the activities of SOD, GSH-Px and GSH in liver tissue, alleviated the pathological damage of liver, increased the mRNA expressions of NTCP and Cyp8b1, and decreased the mRNA expressions of TNF- $\alpha$ , IL-6 and BSEP ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); while the low dose groups only improved the single index or several indexes. **Conclusion:** The fruit and root of *G. jasminoides* had protective effect on ANIT induced jaundice model mice, and each dose of two sites had different effects on different indexes. The hepatoprotective mechanism of *G. jasminoides* fruit may be mainly related to the antioxidant activity and the inflammatory reaction, while the hepatoprotective effect of *G. jasminoides* root may be related to the metabolism of bile acid.

**[Key words]** Gardeniae Fructus fruit; *Gardenia jasminoides* root; jaundice hepatitis; liver protection

梔子作为江西传统的道地药材,自古以来其清热泻火、凉血解毒、利湿除烦的功效便在临床上得到广泛应用,具有保肝利胆、镇痛抗炎等活性<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明,梔子对多种不同类型的肝炎有较好的改善作用,如四氯化碳诱导的化学性肝损伤模型<sup>[2-4]</sup>, $\alpha$ -萘异硫氰酸酯诱导的黄疸型肝炎模型<sup>[5-7]</sup>,D-氨基半乳糖或对乙酰氨基酚诱导的药物性肝损伤模型<sup>[8-9]</sup>,二锅头白酒诱导的酒精性肝损伤模型<sup>[10]</sup>,此外以梔子为君药的中药复方如梔子柏皮汤对刀豆蛋白诱导的动物免疫性肝损伤也有一定的保护作用<sup>[11]</sup>,可见梔子护肝作用的临床研究已趋于成熟;而梔子非传统用药部位根部的应用多体现在民间和少数民族畲族,畲族医称之为“山里黄根”,用于治疗黄疸型肝炎、病毒性肝炎、肾炎水肿、感冒高热等病证<sup>[12]</sup>,其民间临床用药的历史由来已久,早期福建厦门市中医院、广西中医学院、浙江丽水市人民医院相关学者及名老中医运用梔子根或其复方治疗肝炎疾病取得良好的效果<sup>[13-15]</sup>,并进一步开发了其他相关中成药,可见其潜在的药用价值。梔子根的现代药理学研究则报道较少,仅有文献研究梔子

根水提液对四氯化碳致急性肝损伤<sup>[16]</sup>和脂多糖联合卡介苗致免疫性肝损伤<sup>[17]</sup>的动物模型,结果表明对肝炎均有一定的保护作用,但其具体的药理作用机制未能阐明。

目前,国内外学者对梔子药材的研究普遍集中在梔子果实部位,且药材市场上流通的也多为梔子果实,而根部研究较少,更无两者保肝作用差异的研究报道,既然梔子非传统用药部位根部的药用在地方法标准、畲族药处方与民间验方中均有记载,且已有临床应用,那么其保肝作用机制和药效成分是否与果实一致则需进行探讨研究。基于前期课题组对梔子果实和梔子根化学成分含量差异研究基础上,同时结合梔子根醇提物保肝作用的现代药理研究<sup>[18]</sup>,本实验采用 $\alpha$ -萘异硫氰酸酯复制小鼠黄疸模型,考察小鼠血清和肝组织中多项生化指标的变化情况,首次系统地比较梔子果实和梔子根的保肝作用,并从分子水平阐明两者药理作用机制的异同,以期为梔子药材的质量控制和临床用药提供药理学依据,为挖掘梔子新的药用部位和扩大药源提供实验基础,为充分利用梔子资源和保肝新药物的开发提供

新的思路和方法。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 KM 小鼠,体质量 18 ~ 22 g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,小鼠合格证号为 SCXK(鲁)2014-0007。动物饲料,由江西中医药大学动物科技中心提供,合格证号 SCXK(鄂)2011-0011,自由饮水,正常适应。动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(编号 JZLLSC2017016)。

**1.2 药物及试剂** 梔子果实和根部位药材于 2016 年 10 月采自九江湖口县顺昌中药材种植基地,经江西中医药大学药学院罗光明教授鉴定为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* 的干燥成熟果实和干燥根。联苯双酯滴丸(万邦德制药集团股份有限公司,批号 A020151219);5S 压榨一级花生油(山东鲁花集团有限公司,批号 XC20160913);无水乙醇(天津市恒星化学试剂制造有限公司,批号 20160510); $\alpha$ -萘异硫氰酸酯(ANIT,阿拉丁化学试剂有限公司,批号 k1424065);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总蛋白(TP),总胆汁酸(TBA),总胆红素(TBIL), $\gamma$ -谷氨酰转移酶( $\gamma$ -GT),超氧化物歧化酶(SOD),还原型谷胱甘肽(GSH),谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)酶联免疫吸附测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170224, 20170222, 20170314, 20170321, 20170321, 20170224, 20170316, 20170316, 20170320);总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号 DP412);逆转录试剂盒(北京普洛麦格生物技术有限公司,批号 0000228426);*Taq* PCR Master Mix(生工生物工程股份有限公司,批号 D419KAC717);D2000 DNA ladder,6 × DNA Loading Buffer(索莱宝生物科技有限公司,批号分别为 20160929,20160922);Agarose(美国 Genview 公司,批号 46030201536);GelRed™ 10000X in water(美国 Biotium 公司,批号 13G0306)。

**1.3 仪器** 224s 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);MULTISKAN GO 型酶标仪(美国默赛飞世尔科技公司);UV-1800 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);Allegra™64R 型高速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司);DFY-400 型摇摆式中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司);QL-901 型涡旋混匀器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵(巩义市予

华仪器有限公司);GZX-9070 MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);HH-4 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);T10standard 型分散机(德国 IKA 公司);Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ 型凝胶成像仪,Powerpac™ Basic 型凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 总提取物的制备** 取梔子果实和根部位药材,切块粉碎干燥,取果实粗粉 12 g,根粗粉 60 g,分别以 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,过滤后合并滤液,减压浓缩定容至 100 mL,使果实和根的生药量分别为 1.8,9 g·kg<sup>-1</sup>,即为高剂量组。各取其中 30 mL 稀释 1.5 倍,即为中剂量组(1.2,6 g·kg<sup>-1</sup>),再取 15 mL 稀释 3 倍即为低剂量组(0.6,3 g·kg<sup>-1</sup>)。小鼠给药剂量按正常人用量等效换算。

**2.2 分组、造模及给药** 将 KM 小鼠随机分为 9 组,每组 10 只,分别为正常组,模型组,阳性药联苯双酯组(150 mg·kg<sup>-1</sup>),梔子果实和根部位不同剂量给药组(各设高、中、低 3 个剂量),适应性饲养 5 d 后,阳性组给予 150 mg·kg<sup>-1</sup> 的联苯双酯混悬液(0.6 g 溶解于 60 mL 花生油),给药组分别给予 2 个部位给药溶液,灌胃容积为 15 mL·kg<sup>-1</sup>,正常组和模型组给予等量双蒸水,连续 7 d,每天 1 次。第 5 天给药 2 h 后,除正常组小鼠灌胃花生油外,其余组均以 80 mg·kg<sup>-1</sup> 的 ANIT 花生油溶液灌胃造模<sup>[19-20]</sup>,灌胃前禁食不禁水 16 h,灌胃后禁食不禁水 4 h,处理前 12 h 禁食不禁水,造模后 48 h 处理,摘眼球取血,剖腹取肝脏,全血 3 000 r·min<sup>-1</sup>,4 ℃ 离心 10 min,取上清液冷藏备用。摘取小鼠左叶完整肝脏于 10% 甲醛溶液固定,用于病理学分析。取相同部位肝组织置离心管,加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴制备肝匀浆,以 2 500 r·min<sup>-1</sup>,4 ℃ 离心 10 min,取上清液冷藏备用,另再取相同肝组织置于 -80 ℃ 冰箱冷冻保存,用于逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)分析。

**2.3 生化指标检测** 酶标仪法测定小鼠血清中 ALT,AST,TBA,TBIL, $\gamma$ -GT 的活性和肝组织中 SOD,GSH,GSH-Px 的水平,各指标详细测定步骤按试剂盒说明书进行。

**2.4 肝脏病理学观察** 取出用 10% 甲醛固定好的肝组织,切成小块,置包埋盒中,用纱布包好,流水冲洗 1 晚,再进行常规脱水,透明,浸蜡,包埋,切片(厚度调整为 4  $\mu$ m),展片,烤片(60 ℃ 恒温

箱中烘烤 3 h), 苏木素-伊红 (HE) 染色, 中性树胶覆盖封片。200 倍显微镜下观察小鼠肝组织形态学改变。

**2.5 RT-PCR 测定胆固醇 12 $\alpha$  羟化酶 (Cyp8b1), 钠离子-牛磺胆酸协同转运多肽 (NTCP), 转运体胆盐输出泵 (BSEP), 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-6 (IL-6) mRNA 表达** 取出 -80  $^{\circ}$ C 冰箱保存的肝组织, 每个样称取 15 mg 分别加入裂解液 RL 匀浆处理, 用总 RNA 提取试剂盒按操作说明提取 RNA, 检测总 RNA 的纯度, 确认无降解后保存于 -70  $^{\circ}$ C 冰箱。取总 RNA 样品 4  $\mu$ L 于小 PCR 管中, 加 Oligold 1  $\mu$ L 后在 70  $^{\circ}$ C 热水浴 5 min, 后立即于冰上冷却 5 min, 加入配制好的混合液 (5  $\times$  Reaction Buffer 4  $\mu$ L, Mgcl 4  $\mu$ L, RT-PCR Nuc Mix

1  $\mu$ L, 0.5  $\mu$ L YRNasin<sup>®</sup> Inhibitor, 1  $\mu$ L Reverse Traiscipate, 4.5  $\mu$ L DEPC 水) 组成 20  $\mu$ L 反应体系于 PCR 仪上反转录得到 cDNA, 保存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱。取 cDNA 2  $\mu$ L 模板, 加入配制好的混合液 (引物上游和下游各 1.2  $\mu$ L, 2  $\times$  PCR MIX 25  $\mu$ L), 再加入 DEPC 水 20.6  $\mu$ L 组成反应体系 50  $\mu$ L 于 PCR 仪中预变性、变性、退火、延伸得到扩增产物, 所得扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳 (90 V, 20 min) 后分析采集图像, 以内参基因为基准, 计算扩增目的基因与内参基因的灰度比值, 以此表示所扩增目的基因片段的相对表达水平, 重复 3 次。所有引物序列均由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 具体引物序列和 PCR 反应条件。见表 1, 2。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游序列 (5'-3')	下游序列 (5'-3')	产物长度/bp
$\beta$ -actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	315
Cyp8b1	CCTCTGGACAAGGGTTTTGTG	GCACCGTGAAGAGATCCCC	332
NTCP	CAAACCTCAGAAGGACCAAACA	GTAGGAGGATTATCCCCTTGTG	335
BSEP	CTGATGCTTATGGGAGGCGTAT	TCTGGTGAAGGAGCTGTTGATC	357
TNF- $\alpha$	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC	ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG	300
IL-6	CTAGGAAGAACTGGCAATATG	AAACCATCTGGCTAGGTAAGA	325

表 2 PCR 反应条件

Table 2 PCR reaction conditions

基因	预变性	变性	退火	延伸	终止	循环次数
$\beta$ -actin	95 $^{\circ}$ C 30 s	95 $^{\circ}$ C 5 s	51 $^{\circ}$ C 20 s	72 $^{\circ}$ C 1 min	72 $^{\circ}$ C 10 min	40
Ntcp, Bsep, Cyp8b1	95 $^{\circ}$ C 30 s	95 $^{\circ}$ C 5 s	60 $^{\circ}$ C 20 s	72 $^{\circ}$ C 1 min	72 $^{\circ}$ C 10 min	40
TNF- $\alpha$	94 $^{\circ}$ C 3 min	94 $^{\circ}$ C 45 s	60 $^{\circ}$ C 45s	72 $^{\circ}$ C 1 min	72 $^{\circ}$ C 10 min	34
IL-6	94 $^{\circ}$ C 3 min	94 $^{\circ}$ C 45 s	55 $^{\circ}$ C 30s	72 $^{\circ}$ C 1 min	72 $^{\circ}$ C 10 min	35

**2.6 统计学分析** 采用 Graphpad Prism 6.0 软件分析数据, 计量资料均以  $\bar{x} \pm s$ , 多组比较采用 One-way ANOVA 单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 栀子果实和根部位对黄疸模型小鼠血清 ALT, AST,  $\gamma$ -GT, TBIL 和 TBA 水平的影响** 与正常组比较, 模型组小鼠 ALT, AST,  $\gamma$ -GT, TBIL 和 TBA 水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 说明黄疸模型复制成功; 与模型组比较, 联苯双酯组小鼠血清 ALT, AST,  $\gamma$ -GT, TBIL 和 TBA 水平下降 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 栀子果实和根部位高、中、低剂量对 ALT,

AST,  $\gamma$ -GT, TBIL 和 TBA 水平有不同程度的下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 其中栀子果实高、中、低剂量组效果相对于栀子根高、中、低剂量组效果较好, 且根部位指标值的下降情况相对于果实部位要好。见表 3。

**3.2 栀子果实和根部位对黄疸模型小鼠肝脏中 SOD, GSH, GSH-Px 水平的影响** 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织中 SOD, GSH, GSH-Px 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 栀子果实和根 2 个部位高、中、低剂量对 SOD 活性有不同程度的升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 2 部位中、高剂量明显升高 GSH, GSH-Px 水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4。

表 3 栀子果实和根部位对黄疸模型小鼠血清 ALT,AST, $\gamma$ -GT,TBIL 和 TBA 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of fruit and root of *Gardenia jasminoides* on ALT,AST, $\gamma$ -GT,TBIL and TBA level in serum of mice with jaundice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	$\gamma$ -GT/U·L <sup>-1</sup>	TBIL/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	TBA/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>
正常	-	24.51 ± 7.73	16.16 ± 1.16	15.21 ± 2.24	2.12 ± 0.19	4.36 ± 0.16
模型	-	237.84 ± 19.86 <sup>1)</sup>	181.20 ± 13.63 <sup>1)</sup>	40.28 ± 8.62 <sup>1)</sup>	94.50 ± 12.45 <sup>1)</sup>	41.67 ± 3.75 <sup>1)</sup>
联苯双酯	0.15	114.82 ± 21.99 <sup>3)</sup>	91.02 ± 9.16 <sup>3)</sup>	22.09 ± 6.59 <sup>3)</sup>	38.95 ± 5.19 <sup>3)</sup>	18.83 ± 3.25 <sup>3)</sup>
栀子果实	0.6	166.57 ± 13.06 <sup>2)</sup>	122.14 ± 13.95 <sup>2)</sup>	34.29 ± 9.50	64.05 ± 10.47	29.28 ± 5.25
	1.2	145.41 ± 10.93 <sup>3)</sup>	112.24 ± 16.38 <sup>3)</sup>	30.20 ± 4.72 <sup>2)</sup>	61.92 ± 8.45 <sup>2)</sup>	26.68 ± 5.16 <sup>2)</sup>
	1.8	139.04 ± 15.45 <sup>3)</sup>	107.52 ± 9.99 <sup>3)</sup>	25.75 ± 3.62 <sup>3)</sup>	48.40 ± 5.09 <sup>3)</sup>	24.71 ± 5.55 <sup>2)</sup>
栀子根	3	170.08 ± 12.85 <sup>2)</sup>	124.72 ± 15.04 <sup>2)</sup>	28.49 ± 7.03 <sup>2)</sup>	58.64 ± 9.42 <sup>2)</sup>	28.40 ± 3.82
	6	161.15 ± 18.78 <sup>2)</sup>	119.85 ± 11.85 <sup>3)</sup>	26.64 ± 7.14 <sup>3)</sup>	60.82 ± 7.32 <sup>2)</sup>	25.68 ± 2.46 <sup>2)</sup>
	9	140.09 ± 16.26 <sup>3)</sup>	113.80 ± 16.18 <sup>3)</sup>	24.84 ± 3.07 <sup>3)</sup>	46.97 ± 5.61 <sup>3)</sup>	22.04 ± 1.75 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ (表 4,5 同)。

表 4 栀子果实和根部位对黄疸模型小鼠肝脏中 SOD,GSH,GSH-Px 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of fruit and root of *Gardenia jasminoides* on SOD,GSH,GSH-Px level in liver tissue of mice with jaundice( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>	GSH/mg·g <sup>-1</sup>	GSH-Px/mg·g <sup>-1</sup>
正常	-	312.14 ± 24.23	21.61 ± 2.23	125.62 ± 7.94
模型	-	172.55 ± 10.74 <sup>1)</sup>	8.65 ± 1.56 <sup>1)</sup>	75.81 ± 9.59 <sup>1)</sup>
联苯双酯	0.15	254.72 ± 19.43 <sup>3)</sup>	18.22 ± 3.16 <sup>3)</sup>	108.34 ± 6.68 <sup>3)</sup>
栀子果实	0.6	226.41 ± 14.90 <sup>2)</sup>	10.68 ± 1.87	92.28 ± 14.10
	1.2	238.83 ± 7.55 <sup>3)</sup>	14.39 ± 2.58 <sup>2)</sup>	97.63 ± 7.51 <sup>3)</sup>
	1.8	241.10 ± 17.27 <sup>3)</sup>	17.38 ± 3.64 <sup>3)</sup>	104.78 ± 13.86 <sup>3)</sup>
栀子根	3	225.85 ± 14.30 <sup>2)</sup>	10.59 ± 2.66	88.41 ± 11.75
	6	230.05 ± 8.12 <sup>2)</sup>	14.68 ± 2.91 <sup>2)</sup>	95.39 ± 14.67 <sup>2)</sup>
	9	237.83 ± 10.53 <sup>3)</sup>	15.36 ± 3.12 <sup>2)</sup>	98.68 ± 10.20 <sup>3)</sup>

3.3 栀子果实和根部位提取物对黄疸模型小鼠肝脏中 Cyp8b1,NTCP,BSEP,TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝脏中 Cyp8b1,NTCP mRNA 表达显著降低,BSEP,TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,栀子果实和根部位高、中、低剂量明显升高小鼠肝脏中 Cyp8b1,NTCP mRNA 的表达( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),栀子果实和根部位高、中剂量明显降低 BSEP,TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 的表达( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。其中以栀子果实高剂量组改善 ANIT 所致黄疸肝炎的效果最佳。见图 1 和表 5。

3.4 栀子果实和根部位对黄疸型肝炎小鼠肝脏病理改变的影响 正常组小鼠肝脏外观形态轮廓清楚,颜色正常,肝小叶和中央静脉结构清晰,染色物质丰富,未见肝细胞实质病变;模型组给予 ANIT 后外观明显肿胀,结构轮廓不清,中央静脉周围成块状、灶状肝细胞坏死,坏死区气球样变性并伴有炎症细胞浸润、胆管增生、肝血窦扩张等其他病理变

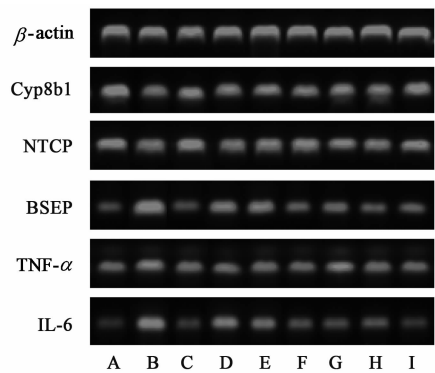


Fig.1 Gel electrophoresis map of Cyp8b1,NTCP,BSEP,TNF- $\alpha$ ,IL-6 mRNA involved in mice livers

图 1 各组小鼠肝组织 Cyp8b1,NTCP,BSEP,TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 凝胶电泳

Fig.1 Gel electrophoresis map of Cyp8b1,NTCP,BSEP,TNF- $\alpha$ ,IL-6 mRNA involved in mice livers

化;联苯双酯组肝细胞结构基本完整,形态清晰,未见成片状变性、坏死细胞;栀子果实和根部位低

表 5 栀子果实和根部位提取物对黄疸模型小鼠肝脏中 Cyp8b1, NTCP, BSEP, TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effect of fruit and root of *Gardenia jasminoides* on Cyp8b1, NTCP, BSEP, TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA expressions in liver tissue of mice with jaundice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Cyp8b1/ $\beta$ -action	NTCP/ $\beta$ -action	BSEP/ $\beta$ -action	TNF- $\alpha$ / $\beta$ -action	IL-6/ $\beta$ -action
正常	-	1.65 $\pm$ 0.13	0.64 $\pm$ 0.06	0.52 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.02
模型	-	0.40 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>	0.22 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	1.86 $\pm$ 0.22 <sup>1)</sup>	0.94 $\pm$ 0.15 <sup>1)</sup>	0.66 $\pm$ 0.13 <sup>1)</sup>
联苯双酯	0.15	1.52 $\pm$ 0.20 <sup>3)</sup>	0.60 $\pm$ 0.10 <sup>3)</sup>	0.59 $\pm$ 0.09 <sup>3)</sup>	0.36 $\pm$ 0.06 <sup>3)</sup>	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>3)</sup>
栀子果实	0.6	0.89 $\pm$ 0.16 <sup>2)</sup>	0.35 $\pm$ 0.05	1.65 $\pm$ 0.15	0.48 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	0.47 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>
	1.2	1.27 $\pm$ 0.23 <sup>2)</sup>	0.28 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	1.57 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	0.42 $\pm$ 0.09 <sup>3)</sup>	0.40 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>
	1.8	0.94 $\pm$ 0.15 <sup>3)</sup>	0.45 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	0.91 $\pm$ 0.10 <sup>3)</sup>	0.39 $\pm$ 0.06 <sup>3)</sup>	0.28 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup>
栀子根	3	1.16 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>	0.43 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	1.04 $\pm$ 0.13	0.75 $\pm$ 0.14	0.52 $\pm$ 0.10
	6	0.98 $\pm$ 0.18 <sup>2)</sup>	0.48 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	0.78 $\pm$ 0.11 <sup>3)</sup>	0.62 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	0.57 $\pm$ 0.11
	9	1.34 $\pm$ 0.22 <sup>3)</sup>	0.54 $\pm$ 0.12 <sup>3)</sup>	0.62 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup>	0.58 $\pm$ 0.10 <sup>3)</sup>	0.42 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>

剂量组肝细胞轻度肿胀,变性坏死区有较小的改善,而中高剂量组对肝组织损伤有较大幅度的减轻,炎性细胞浸润减少,肝小叶结构较清晰,与模型组比较有较大的改善。见图 2。

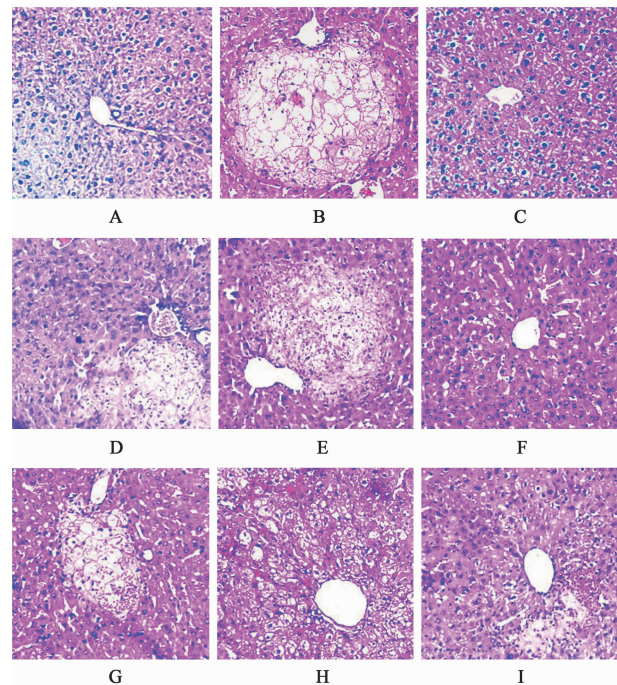


图 2 栀子果实和根部位对黄疸型肝炎小鼠肝脏病理改变的影响 (HE,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of fruit and root of *G. jasminoides* on liver pathological changes of mice with jaundice (HE,  $\times 200$ )

#### 4 讨论

黄疸型肝炎模型,也称黄疸模型,由 ANIT 间接诱导所致, TBIL, DBIL, TBA,  $\gamma$ -GT 等指标伴随黄疸模型有明显的升高,是判断黄疸模型肝损伤程度的关键指标,造模后各指标值在 48 h 达到最大,肝内

胆管上皮细胞损伤,引起胆管增生及周围炎症反应,造成胆管阻塞,形成黄疸模型,伴随胆汁分泌减少及相关病理和血液生化的改变。

本实验提取了各组小鼠的总 RNA,试图从分子水平说明各组小鼠基因表达情况和药物保肝作用机制的差异。提取 RNA 过程中,按试剂盒说明书操作,各试剂按需配制,为保证 RNA 活性、完整度且不受外界环境影响,实验需在无菌超净台进行。提取所得 RNA 均要进行凝胶电泳成像检测其纯度,经过多次条件的摸索,发现以 1.2% 的琼脂糖制作凝胶且以 90 V 电压,400 mA 电流电泳 15 min 最终所得条带成像效果最佳,以此条件检测 RNA 纯度,各组小鼠 RNA 完整度均较好,符合下一步实验要求。NTCP 和 BSEP 是胆汁酸代谢中吸收与外排重要的转运蛋白,Cyp8b1 是重要的合成酶,给予 ANIT 后,NTCP 和 Cyp8b1 表达量下降,而 BSEP 表达量增加,表明造成黄疸模型后,胆汁淤积,胆汁酸合成减少,肝细胞对胆汁酸的吸收减少,排泄增加。TNF- $\alpha$  与 IL-6 是产生炎症反应时释放的常见炎症因子,炎症的发生与体内多种疾病有关,其中多数肝损伤常伴随炎症反应,给予 ANIT 后,小鼠肝脏组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达量均有显著升高,进一步刺激其他炎症因子,结合到肝或胆管相关细胞受体,通过相应信号介导通路干扰蛋白表达,造成组织坏死、细胞凋亡,肝脏功能受损。

栀子作为传统大宗中药材之一,随着药材需求量的增加,其资源化利用和新产品的开发极具意义。除果实部位具有保肝退黄的药理作用外,根部位同样被民间用于治疗黄疸型肝炎。本研究基于黄疸模型初步说明了栀子果实和根部位均有较好的保肝退

黄作用,在胆汁酸代谢相关生化指标和基因表达方面,栀子根效果要好于栀子果实,究其根源,一方面可能与急慢性肝炎的选择有关,急性肝炎模型常规给药1周左右即处理,而此时栀子果实中黄色素未完全沉积,影响实际的保肝药效,另一方面根据国内外学者近年来对栀子肝毒性的研究<sup>[19-23]</sup>,发现栀子中栀子苷成分若剂量控制不当则对肝肾有一定损伤,不能反映栀子果实保肝的真实情况。为此,本课题组还将继续采用慢性肝炎模型探讨栀子果实和根的保肝作用,考虑到栀子果实临床用药的安全性和稳定性,对栀子苷剂量与毒性关系的研究也变得尤为重要。本实验首次对栀子果实和栀子根的保肝作用进行系统比较,并从普通生化指标、肝脏病理学变化和分子学水平多个方面阐明两者保肝作用机制的差异,对栀子果实治疗黄疸型肝炎的药理机制进行了进一步补充,同时弥补栀子根有实际临床应用而无现代药理研究的空白,为两者临床用药提供实验依据,为栀子果实和栀子根保肝药效物质基础的深入研究提供理论基础,为扩大栀子药用部位和开发更稳定、更安全、更有效的护肝产品提供思路和参考。

[参考文献]

[1] 肖日传,苗琦,罗光明,等. 栀子药材商品规格等级标准研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(4):663-668.

[2] 邵坚,罗光明,朱继孝,等. 栀子不同炮制饮片对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用[J]. 中药材,2016,39(7):1521-1524.

[3] 魏春华,邵坚,罗光明. 栀子生品及炮制品对CCl<sub>4</sub>致大鼠急性肝损伤保护作用的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(17):7-10.

[4] CHEN P, CHEN Y, WANG Y, et al. Comparative evaluation of hepatoprotective activities of geniposide, crocins and crocetin by CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in mice [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016,2(24):156-162.

[5] 肖小华,徐丽瑛,周艳艳,等. 栀子苷和西红花苷I对ANIT致小鼠肝损伤的保肝作用研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(7):1600-1601.

[6] WANG L, WU G, WU F, et al. Geniposide attenuates ANIT-induced cholestasis through regulation of transporters and enzymes involved in bile acids homeostasis in rats [J]. *Ethnopharmacol*, 2016, 196: 178-185.

[7] CHEN H, HUANG X T, MIN J B, et al. Geniposidic acid protected against ANIT-induced hepatotoxicity and acute intrahepatic cholestasis, due to Fxr-mediated

regulation of Bsep and Mrp2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016,179:197-207.

[8] 陈明,龙子江,王靛. 栀子提取物保肝利胆作用的实验研究[J]. 中医药临床杂志,2006,18(6):610-612.

[9] 彭婕,钱之玉,刘同征,等. 京尼平苷和西红花酸保肝利胆作用的比较[J]. 中国新药杂志,2003,12(2):105-108.

[10] 付田,蒲嵩,谭健,等. 栀子京尼平苷对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2007,23(3):25-27.

[11] 杨扬,吴小琴,李小枫,等. 栀子柏皮汤及含栀子配伍组对免疫性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国药理学通报,2015,31(12):1764-1769.

[12] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药饮片炮制规范[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,2010:457.

[13] 康良石,康明焜,林庆祥,等. 水边黄栀子根治疗传染性肝炎三十例[J]. 福建中医药,1964,9(2):44.

[14] 伍绍歧. 板蓝根栀子根汤治疗急性黄疸型肝炎53例报告[J]. 广西中医药,1980,3(3):13.

[15] 郑宋明,李慧珍,刘丽仙,等. 肝积合剂治疗慢性乙型肝炎52例临床观察[J]. 中国中医药科技,2009,16(6):490-491.

[16] 黄思斯,黄真,汪小玉. 畚药山里黄根水提液对CCl<sub>4</sub>所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 浙江中医杂志,2015,50(10):774-775.

[17] 陈梦静,汪小玉,沈炜,等. 畚药山里黄根水提物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学,2016,33(6):708-711.

[18] 肖日传,罗光明,张风波,等. 栀子根醇提物对CCl<sub>4</sub>致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2017,33(3):114-117.

[19] WEI J Y, ZHANG F B, ZHANG Y, et al. Proteomic investigation of signatures for geniposide-induced hepatotoxicity [J]. *J Proteome Res*, 2014, 12(13): 5724-5733.

[20] 程生辉,张妍妍,李会芳,等. 基于黄疸模型大鼠的栀子苷急性肝肾毒性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):174-178.

[21] 林庆勋. 栀子对小鼠的肝毒性作用及预防[C]//中国中西医结合学会肝病专业委员会. 第十七次全国中西医结合肝病学术会议论文汇编,2008:119.

[22] 杨洪军. 栀子对大鼠肝毒性的实验研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(13):1091-1093.

[23] 田婧卓. 栀子苷对大鼠的肝毒性以及作用机制研究[C]//中国毒理学会、湖北省科学技术协会. 中国毒理学会第七次全国毒理学大会暨第八届湖北科技论坛论文集,2015:116.

[责任编辑 周冰冰]