

决明子提取物对非酒精性脂肪肝大鼠的护肝、拮抗胰岛素抵抗和抗氧化糖基化作用

李博萍 陈依雨 潘竞锵 赵汝霞 郑琳颖 吕俊华

【摘要】 目的 探讨决明子乙醇提取物 (semen cassiae extract, SCE) 对高脂高糖诱导非酒精性脂肪肝大鼠血糖、血脂、胰岛素抵抗及肝功能和肝细胞脂肪变性病理改变以及氧化应激—糖基化作用。**方法** SD 大鼠 72 只,雌雄各半,随机分成正常对照组 (12 只) 和模型组 (60 只)。正常对照组给予普通饲料,饮用蒸馏水;模型组大鼠给予高脂饲料,饮用 10% 果糖水。饲养至第 6 周末,将模型组大鼠随机分为模型对照组 (蒸馏水 10 mL/kg)、二甲双胍组 (0.2 g/kg)、决明子乙醇提取物 (SCE) 高 (2 g/kg)、中 (1 g/kg)、低 (0.5 g/kg) 剂量组。连续灌胃给药 4 周后,测定大鼠血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 活性,测定血清一氧化氮 (nitric monoxide, NO)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、果糖胺 (fructosamine, FMN)、晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs)、葡萄糖含量 (fasting blood glucose, FBG)、血清胰岛素水平 (insulin, INS) 及胰岛素敏感度 (insulin sensitivity index, ISI)。测定大鼠肝脏组织 SOD、NOS 活性及 NO、MDA 含量。**结果** 与正常对照组相比,模型组大鼠血清 GSP-Px、SOD 和 NOS 活性降低,NO、MDA、FMN、AGEs、FBG 含量升高,INS 水平升高、ISI 下降;模型组大鼠肝脏组织中 SOD 和 NOS 活性降低,NO 和 MDA 含量明显升高 ($P<0.01$)。SCE 和二甲双胍处理 4 周后,明显提高模型大鼠血清 GSP-Px、SOD 和 NOS 活性,降低 NO、MDA、FMN、AGEs、FBG 水平,并降低 INS 水平,上调 ISI;同时,明显提高肝组织中 SOD 和 NOS 活性,降低 NO、MDA 含量 ($P<0.01$, $P<0.05$),尤以 SCE 高剂量组作用更为明显。**结论** 决明子提取物的护肝作用,与其拮抗胰岛素抵抗、增强抗氧化能力以及抑制氧化—糖基化反应有关。

【关键词】 决明子; 胰岛素抵抗; 非酒精性脂肪肝; 氧化应激; 糖基化
【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.10.005

The hepatoprotective effect of semen cassiae extract by antagonizing insulin resistance and inhibiting oxidative-glycation in rats with nonalcoholic fatty liver disease Li Bo-ping, CHEN Yi-yu, PAN Jing-qiang, et al. Department of Pharmacy, Guangzhou Traditional Chinese Medical Hospital, Guangzhou 510130, China
Corresponding author: LV Jun-hua, E-mail: yaolilv@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the pathological changes of blood glucose, serum lipid, insulin resistance, liver function, liver cell denaturalization, and the oxidative-glycation effects of Semen Cassiae Extract (SCE) in rats with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** 72 SD rats were randomly divided into normal group (12) and model group (60). The normal rats were raised by standard animal diet, while the model rats were fed with high-fat diet and 10% fructose for 6 weeks. Model rats were randomly divided into 5 groups, including fatty liver group, metformin group ($0.2\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), SCE high-dose group ($2\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), middle-dose group ($1\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and low-dose group ($0.5\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). All rats were

基金项目:广州市科技计划(2011Y1-C491)
作者单位:510130 广州市中医医院药剂科(李博萍、潘竞锵、郑琳颖);暨南大学药学院药理教研室[陈依雨(硕士研究生)、吕俊华、赵汝霞(硕士研究生)]
作者简介:李博萍(1971-),女,硕士,副主任中药师。研究方向:中药学及实验药理学。E-mail:328348287@qq.com
通讯作者:吕俊华(1954-),硕士,教授。研究方向:神经和心血管药理学。E-mail: yaolilv@163.com

treated for 4 weeks with drugs. The contents or activities of SOD, GSP-Px, NOS, NO, MDA, FMN, AGEs, FBG, INS in the serum and contents or activities of SOD, NOS, NO, MDA in the liver tissue were respectively measured, and ISI was counted. **Results** Compared with normal rats, the contents of or activities NOS, NO, MDA, FMN, AGEs, FBG, INS in the serum and contents or activities of NOS, NO, MDA in the liver tissue were increased ($P < 0.01$), but the activities of SOD, GSP-Px and ISI were decreased ($P < 0.01$) in model rats. After SCE treatment for 4 weeks, compared with model rats, The contents or activities of SOD, GSP-Px, NOS, NO, MDA, FMN, AGEs, FBG, INS in the serum and contents or activities of NOS, NO, MDA in the liver tissue were decreased respectively, but the activities of SOD, GSP-Px and ISI were increased. **Conclusion** SCE possess hepatoprotective effect on structures or functions by antagonizing insulin resistance, enhancing the antioxidant capacity and inhibiting oxidative-glycation in rats with NAFLD.

【Key words】 Cassiae Semen; Insulin resistance; Nonalcoholic fatty liver disease; Oxidative stress; Glycation

非酒精性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的发病机制可能与脂肪变性和氧化应激及脂质过氧化反应有关^[1]。决明子 (Cassiae Semen) 为豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 或小决明 *Cassia tora* L. 的干燥成熟种子, 性味甘、苦、咸、微寒, 归肝、大肠经, 具有清肝明目, 利水通便的作用。有研究证明, 决明子提取物具有较好的抗氧化作用^[2]。已知决明子含有多种植化成分, 作者以往研究表明, 决明子提取物能够改善脂肪肝所引起的脂质过氧化损伤, 增强眼晶状体抗氧化能力以及调节血糖和糖基化产物代谢^[3-4]。本研究采用高脂与果糖饮食建立脂肪肝动物模型, 探讨决明子提取物对该模型大鼠防治脂肪肝作用的抗氧化机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 72 只, 6 周龄, 雌雄各半, 体质量 150 ~ 180 g, 标准饲料喂养, 购于广东省医学实验动物中心。生产许可证号: SCXK (粤) 2008-0002。

1.1.2 试剂和药品 决明子提取物 (陕西浩洋生物科技有限公司); 盐酸二甲双胍片 (深圳市中联制药有限公司); 高脂饲料 (69.9% 普通饲料 + 20% 猪油 + 10% 蔗糖 + 0.1% 他巴唑) 和普通饲料 (广东省医学实验动物中心提供); 果糖 (Archer Daniels Midland Company); 戊巴比妥钠 (国药集团化学试剂有限公司); 糖化血红蛋白试剂盒、考马斯亮兰试剂盒、总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD) 检测试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒、一氧化氮

测试盒和一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 测定试剂盒, 均为南京建成生物工程研究所产品; 葡萄糖测定试剂盒 (上海荣盛生物药业有限公司); 胰岛素放免试剂盒 (北京华英生物技术研究所提供); 大鼠果糖胺 (fructosamine, FMN) 和大鼠晚期糖基化终产物 (advanced glycation end products, AGEs) 酶联免疫吸附法检测试剂盒, 均为美国 Assay 公司产品; 蒸馏水 (distilled water, DW)。

1.1.3 仪器设备 FHS-2A 可调高速组织匀浆机 (金坛市宏华仪器厂); DK-S22 型电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司); TGL-16C 型高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂); r-911 全自动放免计数仪 (中国科技大学实业总公司); 多功能全波长酶标仪 (BioTele USA, Synergy HT); Olympus 光学显微镜, 石蜡包埋机 (湖北欧美莱医疗科技有限责任公司); Slfe 手动旋转式石蜡切片机。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 参照文献方法^[4-7]造模 6 周, 成功复制大鼠 NAFLD 模型, 并分为正常对照组与模型组。模型组按体质量、性别随机分为: 模型对照组 (DW 10 mL/kg)、二甲双胍组 (0.2 g/kg)、决明子 (SCE) 高、中、低剂量组 (2 g/kg、1 g/kg、0.5 g/kg) 灌胃给药; 正常对照组与模型对照组均灌胃给予蒸馏水 (DW 10 mL/kg), 持续 4 周。

1.2.2 标本采集及指标测定 参照文献方法, 在第 10 周末, 给所有大鼠采血。离心取血清, 按照试剂盒方法要求测定大鼠血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、GSP-Px、NOS 活性, 血清一氧化氮 (nitric monoxide, NO)、MDA、FMN、AGEs、葡萄糖含量 (fasting blood glucose, FBG), 血清胰岛素水平 (insulin, INS), 并计算胰岛素敏感度 (insulin

sensitivity index, ISI), 以及 AGEs 的含量。取大鼠肝脏, 迅速称湿重, 用预冷的生理盐水冲洗, 按重量 1 : 9 加生理盐水, 匀浆器研磨制成 10% 组织匀浆, 用于测定肝脏 SOD、NOS 活性, 肝脏 NO、MDA 含量^[4,8]。解剖大鼠, 取肝脏用 10% 乙醛固定后, 切片, HE 染色, 光镜下(×200 倍)观察肝细胞病理改变^[8]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行实验数据分析, 数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用单因素方差分析, 组间差异采用 SNK 检验比较, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 决明子乙醇提取物 (semen cassiae extract, SCE) 对脂肪肝大鼠血清 AGEs、FMN、FBG、INS 以及 ISI 的影响

与正常组大鼠比较, 模型大鼠血清 AGEs、FMN、FBG、INS 水平明显升高($P<0.01$), ISI 加重, 提示出现胰岛素抵抗和血糖代谢紊乱; 二甲双胍和 SCE 处理后, 降低模型大鼠血清 AGEs、FMN、FBG、INS 含量, 并明显改善 ISI($P<0.01, P<0.05$), 但低剂量组对 INS 的降低作用不明显。高剂量组对 AGEs 和 FMN 的影响较中剂量组有显著差异($P<0.05, P<0.01$), 对 AGEs 和 ISI 的影响较低剂量组有显著差异($P<0.05, P<0.01$)。其他指标, 低、中、高剂量

组之间可见一定的量效关系, 但无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。

2.2 SCE 对脂肪肝大鼠血清抗氧化能力的影响

与正常组大鼠比较, 模型大鼠血清 SOD、GSH-Px 的活性明显降低($P<0.01$), MDA、NOS、NO 的含量明显增加($P<0.01$)。二甲双胍和 SCE 处理后, 可提高模型大鼠血清 SOD、GSH-PX 的活性($P<0.01$), 降低血清 MDA、NOS、NO 含量($P<0.01$), 但低剂量组作用较弱。高剂量组上述几个指标较低剂量组有显著差异($P<0.01$), 对 SOD、NO 和 NOS 的影响较中剂量组有显著差异($P<0.01$)。中剂量组对 GSH-PX、MDA 和 NO 的影响较低剂量组有显著差异($P<0.01$), 见表 2。

2.3 决明子提取物对脂肪肝大鼠肝脏抗氧化能力的影响

与正常组大鼠比较, 模型大鼠肝组织 SOD 的活性明显降低($P<0.01$), MDA、NOS、NO 的含量明显增加($P<0.01$)。二甲双胍和 SCE 处理后, 明显提高模型大鼠肝组织 SOD 活性($P<0.01$), 降低 MDA、NOS、NO 含量($P<0.01, P<0.05$), 而中、低剂量组的作用较弱。高剂量组对 SOD 和 NO 的影响较中剂量组有显著差异($P<0.05$), 对 NO 和 NOS 的影响较低剂量组有显著差异($P<0.01$)。其他指标, 低、中、高剂量组之间可见一定的量效关系, 但无统计学意义($P>0.05$), 见表 3。

表 1 决明子提取物对脂肪肝大鼠血清血清糖基化产物、FBG、INS 以及 ISI 的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

| 组别 | FMN/(nmol · mL ⁻¹) | AGEs/(ng · L ⁻¹) | FBG/(mmol · dL ⁻¹) | INS/(uIU · mL ⁻¹) | ISI |
|----------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| 正常组 | 42.02±4.30 | 95.2±20.8 | 5.89±1.49 | 11.14±2.10 | -1.70±0.09 |
| 模型组 | 60.50±10.42 ^a | 161.4±13.2 ^a | 11.30±2.19 ^a | 19.32±2.62 ^a | -2.24±0.05 ^a |
| 二甲双胍组 | 36.76±7.24 ^c | 96.1±32.7 ^c | 5.10±2.00 ^c | 12.89±2.86 ^c | -1.76±0.07 ^c |
| SCE 高剂量组 | 27.86±1.60 ^c | 94.1±17.7 ^c | 4.50±1.05 ^c | 11.12±4.6 ^c | -1.65±0.24 ^c |
| SCE 中剂量组 | 33.31±6.50 ^{ce} | 111.5±15.2 ^{cd} | 4.9±0.53 ^c | 14.16±6.59 ^b | -1.81±0.25 ^c |
| SCE 低剂量组 | 34.19±4.8 ^c | 118.0±35.9 ^c | 5.31±0.88 ^c | 17.08±7.60 | -1.90±0.22 ^{cd} |

注: 与正常组比较, ^a $P<0.01$; 与模型组比较, ^b $P<0.05, ^cP<0.01$; 与 SCE 高剂量组比较, ^d $P<0.05, ^eP<0.01$ 。

表 2 决明子提取物对血清 SOD、MDA、GSP-Px、NO、NOS 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

| 组别 | SOD/(U · mL ⁻¹) | GSH-Px/(umol · L ⁻¹) | MDA/(U · mL ⁻¹) | NO/(umol · L ⁻¹) | NOS/(IU · L ⁻¹) |
|----------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 正常组 | 87.32±5.39 | 516.0±20.4 | 9.31±1.53 | 3.43±2.08 | 3.94±0.33 |
| 模型组 | 52.61±6.97 ^a | 488.0±15.3 ^a | 13.82±3.98 ^a | 7.92±3.00 ^a | 5.87±1.40 ^a |
| 二甲双胍组 | 76.84±8.81 ^c | 545.4±8.8 ^c | 9.23±3.11 ^c | 3.23±0.99 ^c | 3.72±0.80 ^c |
| SCE 高剂量组 | 68.28±7.06 ^c | 536.9±24.1 ^c | 8.75±2.74 ^c | 2.25±1.18 ^c | 3.91±0.23 ^c |
| SCE 中剂量组 | 53.44±16.56 ^c | 533.1±37.5 ^c | 10.17±1.92 ^c | 6.97±4.80 ^{ce} | 4.53±0.54 ^{ce} |
| SCE 低剂量组 | 44.33±6.77 ^c | 497.2±10.5 ^{ef} | 12.58±1.62 ^{ef} | 13.98±4.11 ^{ef} | 4.76±0.41 ^{be} |

注: 与正常组比较, ^a $P<0.01$; 与模型组比较, ^b $P<0.05, ^cP<0.01$; 与 SCE 高剂量组比, ^d $P<0.05, ^eP<0.01$; 与 SCE 中剂量组比较, ^f $P<0.01$

表 3 决明子提取物对肝脏 SOD、MDA、NO、NOS 含量影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

| 组别 | SOD/(U·mgprot ⁻¹) | MDA/(nmol·mgprot ⁻¹) | NO/(umol·gprot ⁻¹) | NOS/(U·mgprot ⁻¹) |
|----------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 正常组 | 539.0±59.0 | 4.66±1.15 | 1.72±0.64 | 0.40±0.05 |
| 模型组 | 385.9±93.2 ^a | 7.75±3.82 ^a | 4.17±1.75 ^a | 0.68±0.14 ^a |
| 二甲双胍组 | 463.0±71.1 ^c | 4.88±1.77 ^b | 2.45±0.62 ^c | 0.55±0.08 ^c |
| SCE 高剂量组 | 527.3±81.2 ^b | 4.82±1.58 ^b | 1.95±0.36 ^c | 0.53±0.14 ^b |
| SCE 中剂量组 | 455.8±85.9 ^d | 5.34±1.78 ^b | 2.53±0.79 ^{cd} | 0.65±0.15 |
| SCE 低剂量组 | 453.4±107.0 | 5.94±1.51 | 2.94±1.16 ^e | 0.68±0.09 ^e |

注:与正常组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与 SCE 高剂量组比,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$

2.4 决明子提取物对脂肪肝大鼠肝脏组织病理学作用

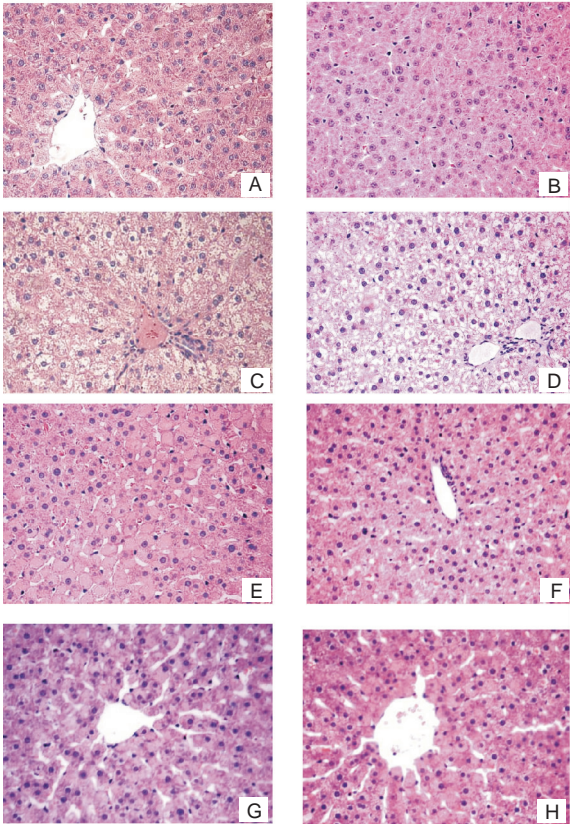
正常组大鼠肝细胞结构正常,肝索排列整齐,肝窦完整清晰,无明显的病理变化;模型组大鼠肝细胞明显肿胀呈圆形,细胞核被挤向一边,大量肝细胞出现颗粒、空泡变性,局部肝细胞出现坏死,胞浆内充满大小不等的脂滴,肝窦不清,肝索排列紊乱。决明子处理 4 周后,模型大鼠肝细胞脂滴浸润明显减少,肝窦清晰,肝索排列较整齐,见图 1。

3 讨论

脂肪肝是肝脏对各种代谢异常改变所引起的肝实质细胞脂肪样病变^[1]。根据病因,脂肪肝主要分为两大类:酒精性脂肪肝与非酒精性脂肪肝^[1,8]。其中,非酒精性脂肪肝的发病机理较为复杂,可由单一的病因引起,也可以是多种病因同时作用或先后参与病程。目前普遍接受的是“二次打击”学说,即将非酒精性脂肪性肝病的发生机制主要归结为两个打击^[1,8]。初次打击过程中,由于各种原因的代谢性疾病以及 IR 导致外周脂解增多,肝脏合成脂肪增多,从而 FFA 增多、TG 增多,过多的 FFA 和 TG 堆积在肝脏组织内,使得肝脏组织发生脂质沉积损伤,诱发脂肪肝;由于脂肪肝的持续发展,肝脏中的 ROS 持续增多,导致了二次打击的发生,脂质过氧化损伤使得肝细胞释放脂质过氧化物,它们与肝细胞释放的细胞因子进一步介导肝细胞死亡和肝纤维化形成、肝内炎症细胞浸润等改变,最终可能发生不可逆的肝硬化^[1,8]。

本研究中的脂肪肝模型大鼠,经过决明子不同剂量组的给药治疗后,与 NAFLD 模型对照组比较,各给药组大鼠血清 FBG、INS 含量降低,ISI 指标得到改善,说明决明子改善了模型大鼠的 IR 以及调节了其血糖代谢紊乱的症状,对脂肪肝的发生发展起到了控制的作用。

大量研究证明,二甲双胍能拮抗胰岛素抵抗,减少肝脏脂肪积蓄,并抑制炎症损伤和氧化-糖基化反应,从而改善脂肪肝及其并发症^[9-10],因此作为本组实验的阳性对照药。本组实验结果显示,经过二甲双胍或决明子给药治疗后的脂肪肝大鼠血清 SOD、GSH-Px 活性有不同程度的增高,血清和肝脏组织中 MDA、NOS、NO 含量显著降低,血糖、果糖胺和 AGEs 含量也显著降低,药效作用强度有一定的剂量依赖性关系,说明决明子可能通过抑制脂质过氧化损伤,防止“二次打击”的形成。糖基化终产物



A:6 周末正常组;B:10 周末正常组;C:6 周末模型组;D:10 周末模型组;E:二甲双胍组;F:SCE 高剂量组;G:SCE 中剂量组;H:SCE 低剂量组

图 1 决明子提取物对脂肪肝大鼠肝脏病理变化的影响(×200 倍)

及其受体可激活氧化应激及炎症反应产生级联反应^[11],二甲双胍或决明子可能对氧化应激-糖基化反应起到阻遏作用,遏制糖基化反应对氧化应激及炎症反应激活所产生的级联反应。

综上所述,决明子提取物中的有效成分的护肝作用,可能通过拮抗胰岛素抵抗、改善糖代谢紊乱、提高抗氧化能力、抑制脂质过氧化损伤和氧化应激-糖基化反应,从而达到保肝的作用。

参 考 文 献

- [1] Martín-Domínguez V, González-Casas R, Mendoza-Jiménez-Riduejo J, et al. Pathogenesis, diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Rev Esp Enferm Dig, 2013, 105(7): 409-420.
- [2] 雷嘉川,余建清,廖志雄. 决明子抗氧化作用的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(11): 41-42.
- [3] 罗先钦,徐晓玉,黄崇刚. 决明子总蒽醌对酒精性脂肪肝大鼠肝组织脂质过氧化与 PPAR- γ 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1654-1659.
- [4] 陈依雨,李博萍,赵汝霞,等. 决明子提取物对脂肪肝大鼠眼晶状体抗氧化能力的影响[J]. 广东药学院学报, 2013, 29(3): 288-291.
- [5] 郑琳颖,潘竞锵,杨以琳,等. 白芍总苷对非酒精性脂肪肝肝病大鼠 Apelin 和 Visfatin 表达的影响[J]. 中药新药与临床药

理, 2013, 24(1): 51-54.

- [6] Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, et al. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(8): 1166-1172.
- [7] de Castro UG, dos Santos RA, Silva ME, et al. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats[J]. Lipids Health Dis, 2013, (12): 136.
- [8] 郑琳颖,潘竞锵,吕俊华. 白芍总苷对脂肪肝大鼠增强胰岛素敏感性及抗脂肪肝作用[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(20): 2385-2390.
- [9] Razavizade M, Jamali R, Arj A, et al. The Effect of Pioglitazone and Metformin on Liver Function Tests, Insulin Resistance, and Liver Fat Content in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Double Blinded Clinical Trial[J]. Hepat Mon, 2013, 13(5): 9270.
- [10] LI Y, LIU L, WANG B, et al. Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis[J]. Biomedical Reports, 2013, 1(1): 57-64.
- [11] Younessi P, Yoonessi A. Advanced glycation end-products and their receptor-mediated roles: inflammation and oxidative stress[J]. Iran J Med Sci, 2011, 36(3): 154-166.

(收稿日期: 2014-09-04)

(本文编辑: 董历华)