

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00625

## 淫羊藿素通过抗氧化损伤延缓 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝硬化进程

钱海华<sup>1</sup>, 刘 鹏<sup>2</sup>, 李 晶<sup>1</sup>, 陈 磊<sup>1</sup>, 曹 璐<sup>1</sup>, 张瑞秀<sup>1</sup>, 殷正丰<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室, 上海 200438
2. 海军总医院肝胆外科, 北京 100048

**[摘要]** **目的** 探讨淫羊藿素延缓大鼠肝硬化进程的作用及可能机制。**方法** 用不同浓度淫羊藿素处理经 CCl<sub>4</sub> 损伤的体外培养大鼠原代肝细胞, 测定细胞培养液中 ALT、AST 和 MDA 浓度、细胞内 SOD 含量及凋亡细胞数量。建立 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝硬化模型, 用淫羊藿素处理后检测各组大鼠血清 ALT、AST、ALB、GLB 浓度, 并观察大鼠肝组织病理学变化和胶原蛋白 I 表达情况。**结果** CCl<sub>4</sub> 损伤可使原代大鼠肝细胞培养上清中 ALT、AST 活性和 MDA 含量以及细胞凋亡率升高, 细胞内 SOD 活性降低。用淫羊藿素预处理后, 其培养上清中 ALT、AST 活性和 MDA 含量以及细胞凋亡率均明显低于凋亡模型组和药物载体组, 细胞内 SOD 活性则明显高于模型组和药物载体组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。体内研究结果显示, 与模型组比较, 淫羊藿素处理可降低肝硬化模型大鼠血清 ALT、AST 水平, 改善肝功能指标 ( $P < 0.05$ ) 并减少胶原蛋白 I 沉积, 减轻肝硬化程度。**结论** 淫羊藿素可能通过抗氧化损伤延缓 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化向肝硬化发展的进程。

**[关键词]** 淫羊藿素; 肝损伤; 肝纤维化; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R 575.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)06-0625-05

## Icaritin delays CCl<sub>4</sub>-induced hepatic cirrhosis in rats by protecting hepatocytes from oxidative injury

QIAN Hai-hua<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>2</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, CHEN Lei<sup>1</sup>, CAO Lu<sup>1</sup>, ZHANG Rui-xiu<sup>1</sup>, YIN Zheng-feng<sup>1\*</sup>

1. Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Hepatobiliary Surgery, Navy General Hospital, Beijing 100048, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of icaritin in delaying the progression of liver cirrhotic process in rats and the related mechanism. **Methods** For *in vitro* study, primary rat hepatocytes were obtained by perfusing the liver of male Wistar rats; the cultured cells were exposed to the fresh medium containing CCl<sub>4</sub>, and then treated with various concentrations of icaritin. The activities of alanine transaminase (ALT) and glutamic-oxaloacetic transaminase (AST) in culture medium were measured with an automatic biochemical analyzer. The intracellular contents of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were determined by spectro-photometry; the apoptotic cells were detected by the TUNEL method. For *in vivo* study, CCl<sub>4</sub>-induced experimental rat hepatic fibrosis model was established and was treated with icaritin. Serum levels of ALT, AST, albumin (ALB), and globulin (GLB) were measured; the pathological changes and collagen I expression in livers were observed by HE staining and immunohistochemistry, respectively. **Results** CCl<sub>4</sub> significantly increased the activities of ALT, AST, and the contents of MDA in culture media of hepatocytes, and significantly decreased the SOD activity. More apoptotic cells were observed in CCl<sub>4</sub> group than that in icaritin group. The ALT, AST activities in culture supernatant and the intracellular MDA contents in icaritin group were significantly lower than those in both model group and drug carrier group, while intracellular SOD activity was much higher than that in other two groups ( $P < 0.05$ ). Icaritin also reduced the apoptotic ratios of hepatocytes induced by CCl<sub>4</sub> compared with model group ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ). In the *in vivo* experiment, icaritin treatment significantly reduced serum levels of ALT and AST compared with model group ( $P < 0.05$ ) and greatly improved CCl<sub>4</sub>-induced liver histopathological injuries and collagen I deposition in the liver tissues. **Conclusion** Icaritin treatment can attenuate CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis in rats, at least in part, by protecting the hepatocytes from peroxidation product.

**[Key words]** icaritin; liver injury; liver fibrosis; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(6): 625-629]

**[收稿日期]** 2011-03-22 **[接受日期]** 2011-05-29

**[作者简介]** 钱海华, 主管技师. E-mail: qhhb@yahoo.com.cn

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875352, E-mail: yinzfk@yahoo.com.cn

肝硬化是严重危害人类健康的常见病之一。目前认为,氧化应激是肝硬化发生发展的一个重要机制,它能导致肝细胞损伤、凋亡,进而引起肝组织中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成超过降解,ECM过度沉积则会导致肝纤维化。在亚洲国家中草药用于肝硬化治疗的历史悠久,具有明显价值和优势。淫羊藿是小檗科(Berberidaceae)淫羊藿属(Epimedium)植物的干燥地上部分。淫羊藿苷是淫羊藿的主要活性成分<sup>[1]</sup>,而淫羊藿素(icaritin)是淫羊藿苷在体内的主要代谢产物之一,属于黄酮类化合物<sup>[2]</sup>。已知黄酮类化合物具有抗氧化活性,并且其羟基化程度是影响抗氧化活性高低的重要因素<sup>[3]</sup>。从分子结构看,淫羊藿素酮环母体的两个羟基取代了淫羊藿苷中的糖苷元,因此具有更强的抗氧化能力。

本研究以 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝细胞损伤为模型,研究淫羊藿素对大鼠氧化损伤肝细胞的保护作用,并通过 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠急性肝损伤模型进一步观察淫羊藿素对大鼠肝硬化进程的影响及可能机制。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及实验动物 淫羊藿素(上海友思生物技术公司);CCl<sub>4</sub>(常州武卫试剂厂);丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所)。健康雄性 Wistar 大鼠,5~6 周龄,体质量 80~90 g,由中国科学院斯莱克实验动物中心(上海)培育提供,购自第二军医大学实验动物中心。

1.2 大鼠原代肝细胞制备、培养及分组处理 参照 Ichihara 等<sup>[4]</sup>的方法制备大鼠原代肝细胞,以每孔  $5 \times 10^5$ /ml 的密度接种于铺有鼠尾胶的 24 孔培养板,培养 24 h 后分为对照组、凋亡模型组、药物载体组、淫羊藿素处理组。其中对照组无任何处理。模型组用含 3 mmol/L CCl<sub>4</sub> 的培养基处理细胞 24 h<sup>[5]</sup>,药物载体组和药物处理组在此基础上分别加入药物载体二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)和淫羊藿素。淫羊藿素预处理包括 3 个不同浓度:0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L。处理方法是加入淫羊藿素培养 24 h 后,换含 3 mmol/L CCl<sub>4</sub> 的培养基培养 24 h,然后取样检测。实验重复 3 次,每组均设 3 个复孔。

1.3 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化模型建立及分组处理 采用 CCl<sub>4</sub> 腹腔注射建立肝硬化模型<sup>[5]</sup>,即腹腔内注射 0.025 ml CCl<sub>4</sub>(用橄榄油 1:6 稀释),每周 3

次,共 8 周。对照组以生理盐水及橄榄油(1:6, V/V)注射。间隔 1 周杀死 2 只大鼠,查看模型建立情况。如文献<sup>[6]</sup>报道,CCl<sub>4</sub> 腹腔注射 4 周后出现肝细胞坏死及炎症反应,并发生间隔纤维化。肝纤维化特征显现后进行实验。分为 3 组:对照组、药物载体组和淫羊藿素处理组,每组 8 只大鼠。对照组灌胃生理盐水,药物载体组灌胃橄榄油稀释的 DMSO,淫羊藿素处理组灌胃淫羊藿素。根据不同剂量淫羊藿素(0.1~10 mg/kg)处理的体内预实验结果,选用 1 mg/kg 淫羊藿素剂量给药,3 次/周,持续 4 周。

1.4 生化指标的测定 细胞培养液或大鼠血清 MDA、肝细胞 SOD 含量采用分光光度法检测。大鼠血清丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(glutamic-oxaloacetic transaminase, AST)、白蛋白(albumin, ALB)、球蛋白(globulin, GLB)采用 Hitachi 7600 型全自动生化分析仪检测。

1.5 TUNEL 法检测细胞凋亡 分离后的原代大鼠肝细胞(活力>90%)经培养后接种 24 孔板,密度为每孔  $5 \times 10^5$ /ml,培养 24 h 后分为空白对照组、CCl<sub>4</sub> 损伤模型组、药物载体组及 0.1、1.0、10.0 μmol/L 淫羊藿素处理组,每组设 3 复孔,重复 3 次。按照 TUNEL 试剂盒说明书处理细胞,荧光显微镜下观察结果。使用的激发波长为 550 nm,发射波长为 570 nm,此波长下调亡细胞呈红色荧光。结果判断:在荧光显微镜下,活细胞核呈弥散、微弱、均匀荧光,坏死细胞不被着色。凋亡细胞的胞核或胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光及明显的核型变化。每张染色图片观察 500 个细胞,并计算细胞凋亡率。

1.6 肝组织病理学和胶原蛋白 I 免疫组化检查 取肝左叶边缘部位的肝组织,10%甲醛固定、脱水、石蜡包埋,切片, H-E 染色,光镜下观察肝脏组织结构的变化。可反映肝纤维化程度的胶原蛋白 I 表达采用免疫组织化学 S-P 法检测,胶原蛋白 I 抗体(工作浓度 1:200)和辣根过氧化物酶复合试剂盒分别购自 Abcam 和福州迈新生物技术开发有限公司。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件处理数据,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,行单因素方差分析,检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 淫羊藿素处理可减少受损原代大鼠肝细胞释放 ALT、AST 经 CCl<sub>4</sub> 损伤的原代大鼠肝细胞用淫羊藿素预处理后,其培养上清中 ALT、AST 活性低于凋亡模型组,并且在 0.1~10 μmol/L 间呈剂量依

赖关系。如图1所示,0.1 μmol/L、1 μmol/L 淫羊藿素组 ALT、AST 活性与凋亡模型组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),10 μmol/L 淫羊藿素组与凋亡模型组间差异亦有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果说明淫羊藿素可减少 CCl<sub>4</sub> 损伤大鼠肝细胞释放 ALT、AST。

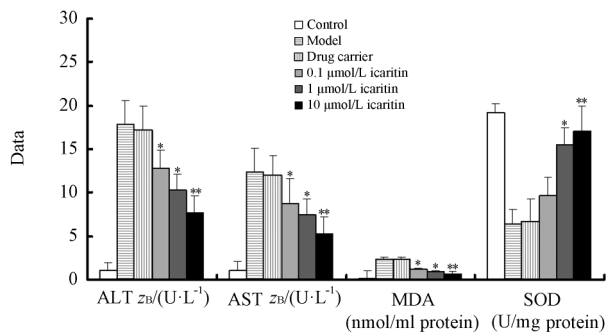


图1 淫羊藿素预处理对受损原代大鼠肝细胞 ALT、AST、MDA、SOD 含量的影响

Fig 1 Changes of ALT, AST, MDA, and SOD levels in primary rat liver cells pretreated with icaritin

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs model group;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 淫羊藿素处理可抑制受损原代大鼠肝细胞 MDA 升高,部分恢复 SOD 活性 结果(图1)表明:

与对照组相比,模型组和药物载体组肝细胞培养上清中 MDA 明显升高,细胞内 SOD 活性明显减低( $P < 0.05$ )。结果说明 CCl<sub>4</sub> 对大鼠肝细胞具有氧化损伤作用。但淫羊藿素(1~10 μmol/L)预处理后,其细胞培养上清中 MDA 含量低于模型组和药物载体组,细胞内 SOD 活性则高于模型组和药物载体组( $P < 0.05$  或 0.01)。这说明淫羊藿素对 CCl<sub>4</sub> 损伤大鼠肝细胞具有抗氧化损伤作用。

2.3 淫羊藿素处理可减轻受损原代大鼠肝细胞凋亡 TUNEL 法检测结果(图2)表明:CCl<sub>4</sub> 处理大鼠原代肝细胞可引起广泛的凋亡表现,如胞质减少、体积变小、核固缩、碎裂、荧光显微镜下反光增强等。而用淫羊藿素处理后凋亡特征明显减弱。模型组和药物载体组细胞凋亡率分别为 55.59%、59.73%,0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L 淫羊藿素组细胞凋亡率分别为 22.21%、19.94%、9.17%。结果提示:淫羊藿素(0.1、1 μmol/L)处理后肝细胞凋亡数量显著减少,凋亡率明显低于对照组和药物载体组( $P < 0.05$ ),而 10 μmol/L 淫羊藿素组与模型组和药物载体组比较,差异亦有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果表明:淫羊藿素处理可减轻 CCl<sub>4</sub> 导致的大鼠原代肝细胞凋亡。

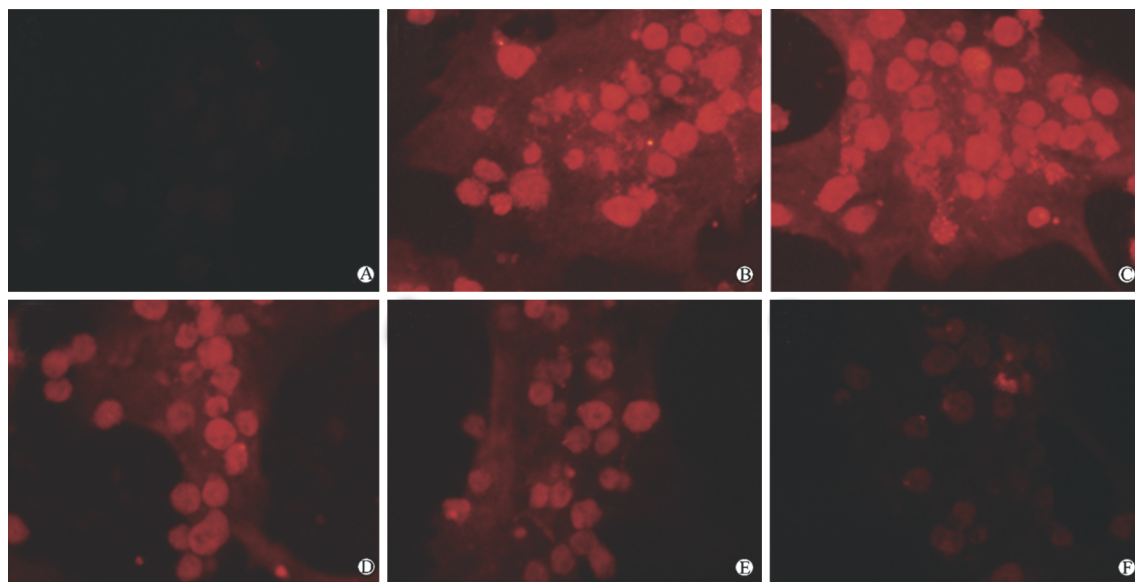


图2 荧光显微镜下观察大鼠原代肝细胞凋亡

Fig 2 Apoptosis in primary rat liver cells as observed by fluorescence microscope (TUNEL method)

A: Normal control; B: Model; C: Drug carrier; D: 0.1 μmol/L icaritin; E: 1 μmol/L icaritin; F: 10 μmol/L icaritin. Original magnification:  $\times 200$

2.4 淫羊藿素处理可改善 CCl<sub>4</sub> 诱导肝纤维化模型大鼠肝功能 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化模型经各种处理后,血清 ALT、AST、ALB、GLB 指标检测结果如图3。与正常组相比,模型组血清 ALT、AST 升高( $P < 0.05$ ),血清 ALB、GLB 含量则有小幅降低

( $P < 0.05$ )。淫羊藿素处理组肝功能指标较模型组下降( $P < 0.05$ )。淫羊藿素可缓解肝纤维化大鼠血清转氨酶水平升高,说明淫羊藿素能减轻大鼠肝纤维化过程中的肝脏损伤。

2.5 淫羊藿素处理可延缓 CCl<sub>4</sub> 诱导肝纤维化模型

大鼠肝硬化进程 光镜下对照组和药物载体组可见肝细胞片状坏死、凋亡,增生的胶原纤维形成纤维分隔,破坏正常肝小叶,分割、包绕肝小叶,形成明显的假小叶。淫羊藿素组可见多数肝细胞水肿、脂肪变性,肝细胞小片状坏死,增生的胶原纤维形成纤维分隔,与模型组和药物载体组给药前相比,肝组织纤维间隔明显减少,未见明显的假小叶形成(图4)。免疫组织化学检查结果显示,与模型组和药物载体组相比,淫羊藿素组胶原蛋白I沉积明显减少(图4)。结果说明,淫羊藿素处理可延缓 CCl<sub>4</sub> 诱导肝纤维化模型大鼠肝硬化进程。

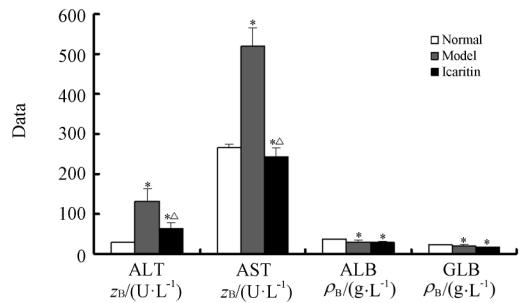


图3 淫羊藿素处理对 CCl<sub>4</sub> 诱导肝纤维化大鼠肝功能的影响

Fig 3 Effect of icaritin on liver function of rats treated by CCl<sub>4</sub>

\* P<0.05 vs normal, △P<0.05 vs model; n=8,  $\bar{x} \pm s$

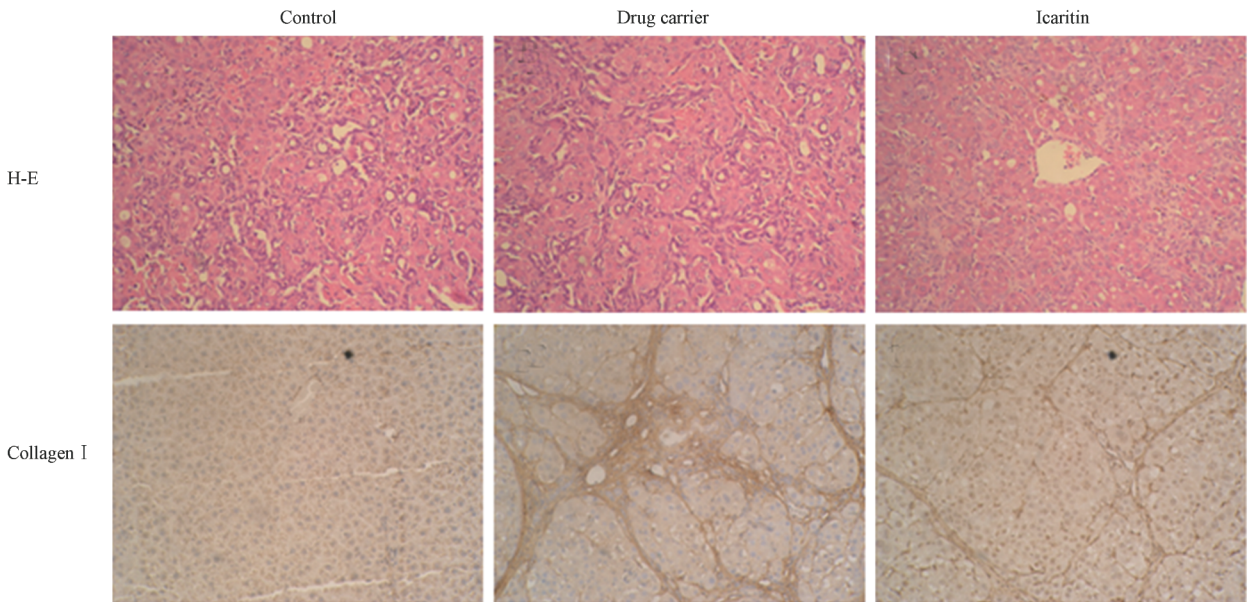


图4 大鼠肝组织切片 H-E 染色和胶原蛋白 I 染色

Fig 4 H-E staining and collagen I staining in liver tissues of rats

Original magnification: ×200

### 3 讨论

几乎所有肝病均具有炎症坏死,而炎症坏死可诱发肝纤维化。肝纤维化持续发展则促进肝小叶结构改建和假小叶形成,导致肝硬化。纤维组织压迫血管,引起门脉高压和肝缺血,进而加剧肝细胞坏死和炎症,如此形成恶性循环<sup>[8]</sup>。在整个过程中,氧自由基对肝细胞损伤起重要作用。氧自由基蓄积可引起严重的细胞功能障碍和死亡,它作用于细胞膜成分,不但引起相关结构的损伤及通透性改变,而且会进一步产生脂质自由基、脂质过氧自由基、脂质过氧化物等,由氧自由基和不饱和脂肪酸相互作用所引发的这种脂质过氧化反应最终导致细胞死亡或凋亡<sup>[9]</sup>。因此,自由基清除剂可保护肝细胞、延缓肝纤维化进程<sup>[10]</sup>。

黄酮类化合物基于其独特的结构特点具有清除

氧自由基的功能。在黄酮母核的3位上连有羟基或其他含氧基团,其中B环是黄酮类物质抗氧化、清除自由基的主要活性部位<sup>[11-12]</sup>。淫羊藿素属于黄酮类化合物,具有多酚羟基的化学结构。而酚羟基有很强的去除自由基的能力,并且在甲氧基存在的情况下更加明显。淫羊藿素的分子结构恰好符合这一特点,因此具有较强清除自由基的能力。MDA是肝细胞脂质过氧化的敏感指标,SOD是体内清除氧自由基的主要酶,具有超强的抗氧化作用。因此,MDA含量及SOD水平可以分别间接反映组织细胞氧化性损伤的程度和机体清除自由基的能力。实验结果显示,0.1~10 μmol/L淫羊藿素处理受损肝细胞可缓解细胞培养液ALT、AST及MDA含量升高,增加肝细胞内抗氧化酶SOD浓度。并且体内实验也证明淫羊藿素处理可明显改善受试动物的肝功能和肝组织中胶原蛋白I沉积。这说明淫羊藿素可增强

肝组织抗氧化酶活性,降低氧化应激的损害,通过调节肝组织氧化/抗氧化系统的平衡,缓解肝纤维化,对 CCl<sub>4</sub> 诱发的肝纤维化有一定的保护作用。AST、ALT 是肝功能重要指标,ALT 主要存在于胞质内,而 AST 主要存在于肝细胞线粒体内。当细胞膜受到脂质过氧化损伤时,胞质内酶类物质容易由内至外释放,因此通常 ALT 漏出比 AST 多。本实验淫羊藿素处理组的 ALT 降低趋势较 AST 更为明显。结果提示淫羊藿素可能对肝细胞膜也具有抗氧化损伤的保护作用。

目前认为,CCl<sub>4</sub> 致肝细胞损伤不仅与肝细胞坏死密切相关,而且与肝细胞凋亡有关<sup>[13-15]</sup>。本研究结果显示,淫羊藿素处理可使肝细胞凋亡数量显著减少,凋亡率明显低于未处理组和药物载体组。这表明淫羊藿素处理可抑制 CCl<sub>4</sub> 所致的大鼠原代肝细胞凋亡。体内实验发现,对照组与药物载体组可见肝细胞片状坏死、凋亡,增生的胶原纤维形成纤维分隔,破坏肝小叶结构,分割、包绕肝小叶,形成明显的假小叶。淫羊藿素组则可见多数肝细胞水肿、脂肪变性,肝细胞小片状坏死,增生的胶原纤维形成纤维分隔,与模型组与药物载体组相比,肝组织纤维间隔明显减少,未见明显的假小叶形成,并且胶原蛋白 I 沉积明显减少。因此,可以认为淫羊藿素可延缓大鼠肝纤维化及肝硬化的进程,甚至推测淫羊藿素可能具有逆转肝纤维化的药理作用。

综上所述,本研究分别从体内、体外实验证实了淫羊藿素对受损大鼠肝细胞的保护作用,它不仅可明显降低肝纤维化大鼠模型的血清转氨酶水平,而且可减缓肝纤维化向肝硬化发展的进程。其可能机制则包括增加肝细胞内抗氧化酶 SOD 含量、清除自由基、减轻肝细胞凋亡、改善肝功能等。淫羊藿素具有多种肝细胞损伤保护作用及可口服给药的便利,并且提取原料来源丰富,提取工艺较为简单。因此,其作为一种防治肝纤维化的候选药物值得深入研究。

## [参考文献]

- [1] 贾亮亮,袁 丁,王洪武,何毓敏,张长城. 淫羊藿苷药理作用的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2010,20: 3976-3979.
- [2] Huang J, Yuan L, Wang X, Zhang T L, Wang K. Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, dif-

- ferentiation and activity *in vitro* [J]. Life Sci, 2007, 81: 832-840.
- [3] 刘树兴,赵 芳. 从天然植物中开发抗氧化剂研究进展[J]. 食品研究与开发,2007,28:179-182.
- [4] Ichihara A, Nakamura T, Tanaka K. Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions[J]. Mol Cell Biochem, 1982, 43: 145-160.
- [5] Cai Y, Gong L K, Qi X M, Li X H, Ren J. Apoptosis initiated by carbon tetrachloride in mitochondria of rat primary cultured hepatocytes[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26: 969-975.
- [6] Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez J, Chagoya de Sánchez V. Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats[J]. Hepatology, 1990, 12: 242-248.
- [7] Iredale J P, Benyon R C, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors[J]. J Clin Invest, 1998, 102: 538-549.
- [8] Brenner D A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis[J]. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2009, 120: 361-368.
- [9] Burger D, Xiang F, Hammoud L, Lu X, Feng Q. Role of heme oxygenase-1 in the cardioprotective effects of erythropoietin during myocardial ischemia and reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296: H84-H93.
- [10] Ergün Y, Kuruta E B, Ozdil B, Güneşçar R, Ergün Y. Evaluation of nitrite/nitrate levels in relation to oxidative stress parameters in liver cirrhosis[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2011, 35: 303-308.
- [11] Amiç D, Davidović Amiç D, Beslo D, Rastija V, Lucić B, Trinajstić N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids [J]. Curr Med Chem, 2007, 14: 827-845.
- [12] Havsteen B H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids[J]. Pharmacol Ther, 2002, 96(2-3): 167-202.
- [13] Nakamoto N, Tada S, Kameyama K, Kitamura K, Kurita S, Saito Y, et al. A free radical scavenger, edaravone, attenuates steatosis and cell death via reducing inflammatory cytokine production in rat acute liver injury[J]. Free Radic Res, 2003, 37: 849-859.
- [14] Rutherford A E, Hynan L S, Borges C B, Forcione D G, Blackard J T, Lin W, et al. Serum apoptosis markers in acute liver failure: a pilot study[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007, 5: 1477-1483.
- [15] Yuan L P, Chen F H, Ling L, Dou P F, Bo H, Zhong M M, et al. Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116: 539-546.

[本文编辑] 贾泽军