

18 α -甘草酸固体脂质纳米粒抗大鼠急性肝损伤作用研究

王维¹, 潘旭旺^{2*}, 邵益丹², 席建军², 庄让笑²(1.浙江省人民医院, 杭州 310014; 2.杭州市西溪医院, 杭州 310023)

摘要: 目的 研究 18 α -甘草酸固体脂质纳米粒(18 α -glycyrrhizic acid solid lipid nanoparticles, 18 α -GL-SLN)的抗大鼠急性肝损伤作用。方法 用 CCl₄ 致大鼠急性肝损伤, 以生化指标和病理变化评价 18 α -GL-SLN 的抗肝损伤作用。结果 与模型组比较, 18 α -GL-SLN 各剂量组和 18 α -GL 组 ALT、AST、TBil、 γ -GT、ALP 水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$),

基金项目: 杭州市医药卫生科技计划项目(2008A019)

作者简介: 王维, 男, 硕士, 主管中药师 Tel: (0571)85893129 E-mail: welwangwei@163.com *通信作者: 潘旭旺, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0571)85463955 E-mail: pxuwang@163.com

提示对大鼠急性肝损伤均有一定的治疗作用,尤其是18 α -GL-SLN中、高剂量组,效果优于18 α -GL组($P<0.05$);病理切片显示各给药组肝组织损伤明显减轻。结论 18 α -GL-SLN有抗CCl₄致大鼠急性肝损伤作用,并且其作用优于18 α -GL。

关键词: 18 α -甘草酸; 固体脂质纳米粒; 急性肝损伤; 四氯化碳

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)07-0798-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.006

Protective Effect of 18 α -Glycyrrhizic Acid Solid Lipid Nanoparticles on Acute Liver Injury in Rats

WANG Wei¹, PAN Xuwang^{2*}, SHAO Yidan², XI Jianjun², ZHUANG Rangxiao²(1.Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China; 2.Hangzhou Xixi Hospital, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect of 18 α -glycyrrhizic acid solid lipid nanoparticles (18 α -GL-SLN) on acute liver injury in rats. **METHODS** Acute liver injury in rats was caused by CCl₄, and the protective effect of 18 α -GL-SLN was evaluated with biochemical indicator and pathological change. **RESULTS** Compared with model group, different dosages groups of 18 α -GL-SLN and 18 α -GL group all obviously degraded the level of ALT, AST, TBil, γ -GT and ALP, it had statistical significance($P<0.05$). This showed that the three groups of 18 α -GL-SLN and the group of 18 α -GL all had protective effect on acute liver injury in rats, and the effect of middle and high dose groups of 18 α -GL-SLN were even better than group of 18 α -GL($P<0.05$). The pathological changes revealed that liver injury was relieved in all treated groups. **CONCLUSION** 18 α -GL-SLN has the protective effect on acute liver injury in rats, and it resulted a better effect than 18 α -GL. **KEY WORDS:** 18 α -GL; solid lipid nanoparticles; acute liver injury; carbon tetrachloride

18 α -甘草酸(18 α -glycyrrhizic acid, 18 α -GL)是天然甘草酸(β 体)的差相异构体,是甘利欣的主药,临床大规模应用已有十多年,是目前治疗肝病的最有效药物之一^[1]。但甘草酸在体内水解为甘草次酸而产生类醛固酮作用,导致高血压、低血钾、水肿等不良反应;另由于甘草酸为高极性、亲水性大分子(分子量>800),肠道吸收很少,血药浓度很低,而静脉给药虽有效,但因高极性大分子不易与细胞膜上受体结合,需大剂量才能产生高效,这样势必加重不良反应^[2-3]。纳米药物的主要靶向器官之一是肝脏,将抗肝损伤药物制成纳米制剂,可以降低用量,提高疗效,减少不良反应。因此,本实验将18 α -GL制成固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN),研究18 α -GL-SLN在抗大鼠急性肝损伤方面的作用。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与设备

Leica2235 轮转式切片机(德国徕卡); 7060 型全自动生化分析仪(日本日立); Biofuge 28RS 低温高速离心机(德国 Heraeus 公司); OlympusB41 显微镜(日本 Olympus)。

1.2 药品与试剂

18 α -GL(武汉市铭业科技发展有限公司,批号: 121008); 18 α -GL-SLN(自制); 乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司); CCl₄(上海凌峰化学试剂,批号: 091120); 橄榄油(国药集团化学试剂,批号:

F20100512); 血清总胆红素(total bilirubin, Tbil,批号: 20121112)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT,批号: 20121112)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST,批号: 20121112)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP,批号: 20120915)、谷酰转移酶(γ -glutamyl transferase, γ -GT,批号: 20121012)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; HE 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号: C0105)。

1.3 动物

SD 大鼠, δ , 体质量(250 \pm 20)g, 浙江省实验动物中心提供,许可证号: SCXK(浙)2008-0033。动物饲养条件: 温度(25 \pm 5) $^{\circ}$ C, 分笼饲养,自由饮食饮水,饲养室维持自然光暗周期,实验前晚禁食不禁水。

2 方法^[4]

2.1 动物分组及给药

SD 大鼠 60 只,适应性饲养 1 周后,随机分为 6 组,每组 10 只,即正常对照组、模型组、18 α -GL 组(13.5 mg \cdot kg⁻¹)、18 α -GL-SLN 低、中、高剂量组(分别为 3.4, 6.7, 13.5mg \cdot kg⁻¹)。正常对照组和模型组分别给予等体积的生理盐水,剂量 1 次 \cdot d⁻¹。各组大鼠均尾静脉注射给药,连续 3 周。模型组及各给药组大鼠于第 19 天起在给药 1 h 后腹腔注射 40%CCl₄ 玉米油溶液 3.5 mL \cdot kg⁻¹,隔日 1 次,共 2 次;正常对照组给予等量玉米油。

2.2 标本采集

在第 21 天当晚大鼠禁食不禁水, 次日晨空腹 3%戊巴比妥钠 $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉, 心脏采血并处死, 分离血清, -20°C 保存, 用于测定血液生物化学指标; 迅速分离整个肝脏并称重, 取右叶肝组织 $3 \text{ mm}\times 3 \text{ mm}\times 6 \text{ mm}$ 大小, 用 4%多聚甲醛(以 pH7.4 的 PBS 配制)固定, 作病理检查。

2.3 观测指标和方法

2.3.1 一般情况 大鼠每天称重 1 次, 并观察体质量、食欲行为、状态、毛发、动物死亡情况。

2.3.2 血清学指标检测方法 Tbil、ALT、AST、ALP、 γ -GT 用日立 7020 全自动生化仪测定。数据结果使用 SPSS 13.0 进行分析, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 以 t 检验作统计分析。

2.3.3 肝组织病理学检查 大鼠肝脏行常规 HE 染色, 光镜下观察病理学变化, 肝组织病理学检查参照《保健食品评价规范》2003 年版, 由经验丰富的病理科医生在不知分组的情况下作出判断, 并按以下标准进行炎症分级: G_0 , 汇管区及周围无炎症, 小叶内无炎症; G_1 , 汇管区炎症, 小叶内变性及少数点灶状坏死; G_2 , 汇管区及周围轻度碎屑样坏死(PN), 小叶变性, 点灶状坏死或嗜酸性小体; G_3 , 汇管区及周围中度 PN, 小叶变性、融合坏死或见桥接坏死(BN); G_4 , 汇管区及周围中度 PN, 小叶 BN 广泛, 多小叶坏死。

2.3.4 统计方法 实验结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 假定检验水平定为 0.05。各组处理前后检测指标的比较用配对 t 检验, 两两比较用成组 t 检验法, 病理分级用非参数等级资料秩和检验。

3 结果

3.1 一般行为状态

实验期间各组大鼠精力充沛, 灵活, 饮食正常, 毛色有光泽, 尿液浅黄色; 造模后, 除正常对照组外, 其余各组大鼠的活动明显下降, 饮水、进食明显减少, 体质量增长减缓, 毛色黯淡, 尿液深黄色, 18α -GL-SLN 高剂量组较模型组稍好, 尿色较模型组略淡。

3.2 生化测定结果

给予 CCl_4 后, 模型组大鼠血清 ALT、AST、TBil、 γ -GT、ALP 水平明显高于正常对照组, 肝指数明显增加, 而受试药物各剂量组能明显拮抗 CCl_4 致小鼠血清 ALT、AST 水平及肝指数的升高

作用, 与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$), 提示 18α -GL-SLN 和 18α -GL 对于大鼠急性肝损伤均有一定的治疗作用, 尤其是 18α -GL-SLN 中、高剂量组对于 ALT、AST、Tbil 有显著的降低作用, 其效果也优于 18α -GL 组($P<0.05$)。结果见表 1 和表 2。

表 1 18α -GL-SLN 对 CCl_4 肝损伤大鼠血清转氨酶活性的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Effect of 18α -GL-SLN to serum transaminase in hepatic injury rat by CCl_4 ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	ALT/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
正常对照组	217.3 \pm 156.1	570.7 \pm 469.5
模型组	3 695.6 \pm 627.9 ¹⁾	4 688.0 \pm 958.9 ¹⁾
18α -GL-SLN		
低剂量组	3 290.8 \pm 563.5 ²⁾	3 375.1 \pm 1223.3 ²⁾
中剂量组	2 608.0 \pm 1001.7 ²⁾³⁾	2 091.3 \pm 1002.6 ²⁾³⁾
高剂量组	2 381.2 \pm 1100.5 ²⁾³⁾	1 874.1 \pm 841.8 ²⁾³⁾
18α -GL 组	3 171.7 \pm 539.8 ²⁾	2 827.8 \pm 1120.8 ²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与 18α -GL 组比较, ³⁾ $P<0.05$

Note: Compared with the normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with 18α -GL group, ³⁾ $P<0.05$

表 2 18α -GL-SLN 对 CCl_4 肝损伤大鼠血液生化指标的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Effect of 18α -GL-SLN to blood biochemical indicator in hepatic injury rat by CCl_4 ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	肝指数	Tbil/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	γ -GT/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALP/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
正常对照组	4.28 \pm 0.26	2.9 \pm 1.1	3.6 \pm 1.2	201.7 \pm 78.1
模型组	6.97 \pm 0.49 ¹⁾	24.5 \pm 2.5 ¹⁾	11.8 \pm 3.1 ¹⁾	406.4 \pm 98.4 ¹⁾
18α -GL-SLN				
低剂量组	5.80 \pm 0.68 ²⁾	18.1 \pm 2.9 ²⁾	7.7 \pm 2.8 ²⁾	352.6 \pm 49.5 ²⁾
中剂量组	5.38 \pm 0.20 ²⁾³⁾	12.7 \pm 2.2 ²⁾³⁾	5.9 \pm 2.7 ²⁾	283.7 \pm 52.7 ²⁾³⁾
高剂量组	5.10 \pm 0.53 ²⁾³⁾	10.4 \pm 2.6 ²⁾³⁾	4.7 \pm 2.2 ²⁾³⁾	234.6 \pm 78.2 ²⁾³⁾
18α -GL 组	5.57 \pm 0.14 ²⁾	16.3 \pm 1.8 ²⁾	6.4 \pm 2.7 ²⁾	322.8 \pm 54.2 ²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与 18α -GL 组比较, ³⁾ $P<0.05$

Note: Compared to the normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared to the model group, ²⁾ $P<0.01$; compared to the group of 18α -GL, ³⁾ $P<0.05$

3.3 病理组织学结果

肉眼可见 CCl_4 模型组大鼠的肝脏肿大, 淤血明显, 肝脏表面有点状出血, 18α -GL-SLN 给药组和 18α -GL 组大鼠的肝脏大部分轻度肿大、淤血、无点状出血。光镜下可见正常对照组肝小叶结构正常, 肝索排列整齐, 结构清晰可辨, 未见肝细胞变性、淋巴细胞浸润及肝脏组织坏死等病理变化; 模型组大部分肝小叶结构破坏, 部分气球样变、嗜酸性变, 有大灶性坏死, 散在点灶状坏死、桥接坏死, 残存汇管区见少量淋巴细胞浸润, 肝

细胞再生不明显; 18 α -GL 组、各给药组与模型组比较上述改变有一定减轻。18 α -GL-SLN 给药高、中剂量组和 18 α -GL 组与模型组比较上述改变有一定减轻($P<0.05$), 且高剂量给药组肝细胞变性明显

好转, 汇管区少量炎细胞浸润, 正常肝细胞数目增多, 其效果优于 18 α -GL 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。低剂量给药组效果不明显。结果见表 3 和图 1。

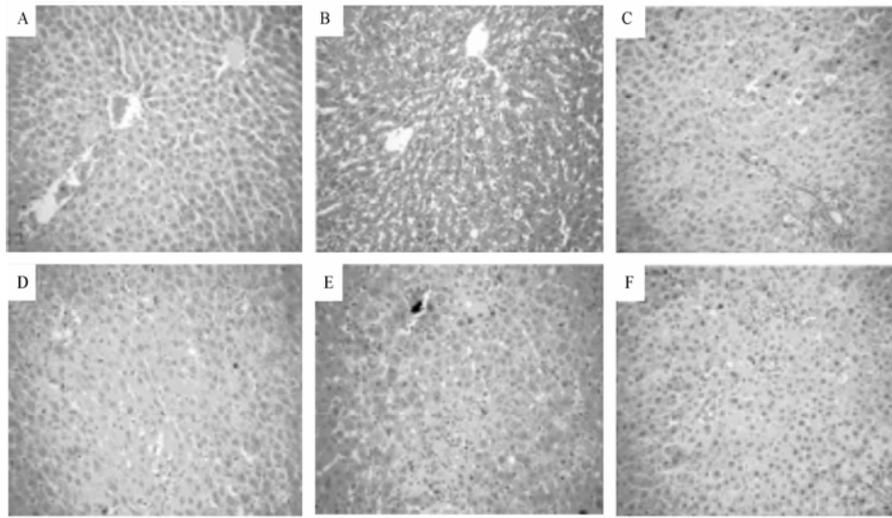


图 1 大鼠肝组织病理切片(100 \times)

A-正常对照组; B-模型组; C-18 α -GL 组; D-18 α -GL-SLN 低剂量组; E-18 α -GL-SLN 中剂量组; F-18 α -GL-SLN 高剂量组

Fig. 1 Pathological section of rats liver tissue(100 \times)

A-normal group; B-model group; C-18 α -GL group; D-18 α -GL-SLN low dose group; E-18 α -GL-SLN middle dose group; F-18 α -GL-SLN high dose group

表 3 CCl₄ 肝损伤大鼠炎症分级($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Fractionation of inflammation in hepatic injury rat by CCl₄($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	炎症分级				
	G ₀	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄
正常对照组	10	0	0	0	0
模型组	0	0	3	4	3
18 α -GL-SLN 低剂量组	0	1	4	4	1
18 α -GL-SLN 中剂量组 ¹⁾	0	3	4	3	0
18 α -GL-SLN 高剂量组 ¹²⁾	0	5	4	1	0
18 α -GL 组 ¹⁾	0	4	4	2	0

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 18 α -GL 组比较, ²⁾ $P<0.05$

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with 18 α -GL group, ²⁾ $P<0.05$

4 讨论

CCl₄ 为经典的肝毒物, 在肝内经混合功能氧化酶作用形成三氯甲基自由基, 导致脂质过氧化反应而损伤肝细胞。AST 存在于线粒体内, 细胞受损后释放入血, 是组织坏死的重要标志。各给药组 AST 水平均显著低于病理模型组, 表明 18 α -GL-SLN 能降低 CCl₄ 所致的急性肝损伤时 AST 的活性。ALT 是重要的炎症指标, 18 α -GL-SLN 能降低 ALT 值的升高, 表明其对 CCl₄ 所致的大鼠急性肝损伤有明显的抗炎作用。肝细胞炎症或坏死导致胆红素水平升高, 因而 Tbil 也是肝脏病变

的重要指标。本实验中各给药组 Tbil 水平较病理模型组有明显下降, 说明 18 α -GL-SLN 对 CCl₄ 所致的急性肝损伤有保护作用。

病理组织学揭示的损伤变化与生化测定指标一致, 18 α -GL-SLN 的病变程度与模型组比较明显减轻。

结果表明, 将 18 α -GL 制成 18 α -GL-SLN 后对大鼠急性肝损伤具有较好的治疗作用, 且疗效可能优于 18 α -GL 对照组。

REFERENCES

- [1] YAN M, FANG P F, LI H D, et al. Effect of 18 α -glycyrrhetic acid and 18 β -glycyrrhetic acid on outward transport of talinolol in Caco-2 cell monolayers [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2012, 32(6): 405-409.
- [2] SUN H W, CUI L. The two cases adverse reaction of Compound Glycyrrhizin injection [J]. Clin Misdiagn Misther(临床误诊误治), 2007, 20(6): 104.
- [3] CHU R Q, WANG Y M. Document analysis on side effect of three kinds of Compound Glycyrrhizin injection [J]. Chin J Dermatovenereol(中国皮肤性病学杂志), 2006, 20(1): 33-34.
- [4] TIAN J, JIANG X Q, PAN X W, et al. Protective action of Complex Prescription Yinbai granule on acute liver injury and its effect on bile secretion in rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2012, 30(12): 2761-2763.

收稿日期: 2013-12-09