

青蒿琥酯自微乳对 NAFLD 大鼠的保护作用及机制研究

潘金明, 席建军*, 张建康, 赵艳梅, 何若愚, 史婷婷, 庄让笑* (杭州市西溪医院, 杭州 310023)

摘要: 目的 探讨青蒿琥酯自微乳对非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)模型大鼠的保护作用及作用机制。方法 高脂饲料诱导 10 周建立大鼠 NAFLD 模型。SD 大鼠分为 7 组: 正常组, 模型组, 青蒿琥酯组, 多烯磷脂酰胆碱组, 青蒿琥酯自微乳高、中、低剂量组。给药 10 周后处死所有动物, 检测各组大鼠血清 ALT、AST、TG、TC、TNF- α 和 IL-10 指标水平。结果 与模型组比较, 各药物治疗组(除低剂量组外)均能明显改善血清 ALT、AST、TG、TC、TNF- α 和 IL-10 指标水平($P < 0.05$ 或 < 0.01)。结论 青蒿琥酯自微乳通过调节脂质代谢、抑制炎症细胞因子的释放, 减轻肝细胞的损伤, 从而对高脂饮食诱导的 NAFLD 模型大鼠具有一定的保护作用。

关键词: 青蒿琥酯; 自微乳; 非酒精性脂肪肝

中图分类号: R962 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)11-1680-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.11.019

引用本文: 潘金明, 席建军, 张建康, 等. 青蒿琥酯自微乳对 NAFLD 大鼠的保护作用及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(11): 1680-1683.

Protective Effect and Mechanism of Artesunate Self-microemulsions on NAFLD Rats

PAN Jinming, XI Jianjun*, ZHANG Jiankang, ZHAO Yanmei, HE Ruoyu, SHI Tingting, ZHUANG Rangxiao* (Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effect of the artesunate self-microemulsions on rats with non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD). **METHODS** The model of NAFLD was constructed by feeding rats with high fat diet for 10 weeks. SD rats were randomly divided into the normal group, the model group, the essential group, the artesunate group, the high, middle and low dose of artesunate self-microemulsions group. All the rats were sacrificed after 10 weeks of treatment. Serum sample were collected for the contents detection of ALT, AST, TG, TC, TNF- α and IL-10. **RESULTS** Compared with the model group, each drug treatment group (except low dose of artesunate self-microemulsions group) could significantly reduce ALT, AST, TG, TC, TNF- α and IL-10 levels in serum($P < 0.05$ or < 0.01). **CONCLUSION** The artesunate self-microemulsions has a better protective effect on NAFLD rats induced by high fat diet. The mechanisms may be related to inhibiting lipid peroxide, reducing the level of inflammatory mediator in the liver.

KEYWORDS: artesunate; self-microemulsions; non-alcoholic fatty liver disease(NAFLD)

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种病变主体在肝小叶, 以肝细胞脂肪变性、损伤及炎症细胞浸润为病理特征, 但无过量饮酒史的临床综合征。我国 NAFLD 发病率正逐年增高, 其中 25% 的患者可发展为肝纤维化, 并且约有 1.5%~8.0% 的患者可进展为肝硬化, 甚至肝癌。因此, 开发更多治疗 NAFLD 的药物是目前亟需解决的问题。

青蒿琥酯是一种具有倍半萜结构的抗疟药青蒿素的衍生物, 研究发现, 青蒿琥酯除抗疟疾^[1]和抗血吸虫^[2]等作用外, 还具有其他显著的药理作用, 如抗肝癌^[3]、抗肝纤维化^[4]、抗肿瘤^[5]、免疫调节^[6]等作用。王丽芳等^[6-7]以甲氨蝶呤为阳性对

照药物, 通过不同剂量的青蒿琥酯对大鼠佐剂性关节炎的抗免疫研究发现, 不同剂量的青蒿琥酯能显著降低血清 TNF- α 等指标的表达, 提示青蒿琥酯可以通过抑制炎症相关因子发挥抗炎和免疫调节作用。笔者前期将青蒿琥酯制备成自微乳制剂, 通过比较原料药和自微乳制剂在大鼠体内的药动学研究发现, 青蒿琥酯自微乳能够显著提高青蒿琥酯的生物利用度^[8]。本研究采用高脂饮食建立大鼠 NAFLD 模型, 进一步观察青蒿琥酯自微乳治疗 NAFLD 的效果, 并探讨其作用机制。

1 仪器与材料

1.1 仪器和试剂

7060 全自动生化分析仪(日本日立公司);

基金项目: 浙江省科技计划项目(2017C33233); 杭州市科技发展计划项目(20130633B09)

作者简介: 潘金明, 女, 药师 Tel: (0571)86481960 E-mail: 305200046@qq.com *通信作者: 席建军, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)86481960 E-mail: 360550573@qq.com 庄让笑, 男, 主任药师 Tel: (0571)86481960 E-mail: zhuangrangxiao@sina.com

Biofuge 28RS 低温高速离心机(德国 Heraeus 公司); B41 显微镜(日本 Olympus); BT25S 型分析天平(德国 Sartorius)。

血清学及生化试剂盒(南京建成生物工程研究所); 胆固醇(武汉圣天宇科技有限公司, 批号: 20150219); 胆盐(杭州微生物试剂有限公司, 批号: 20150410); 蛋黄粉(上海爱蝶实业有限公司, 批号: 20150401); 青蒿琥酯自微乳(处方组成为 Cremophor EL: 正丁醇: EO=55: 35: 10, 处方中青蒿琥酯的质量分数为 5%, 杭州市西溪医院制剂室, 批号: 20150525, 规格: 50 mg·g⁻¹); 多烯磷脂酰胆碱(赛诺菲北京制药有限公司, 批号: BJD048; 规格: 每粒 228 mg)。

1.2 动物

SD 大鼠 80 只, ♂, 体质量(200±20)g, 由浙江省医学科学院提供, 实验动物许可证号: SCXK(浙)2014-0001。饲养方法: 温度 18~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 自由饮水进食。

2 方法

2.1 动物模型的复制^[9]

80 只 SD 大鼠随机分为正常组($n=10$)和造模组($n=70$), 正常组以普通饲料喂养, 造模组以高脂饲料(82%基础饲料、10%猪油、2%胆固醇、1%胆盐和 5%蛋黄粉)喂养, 造模 10 周后处死 10 只造模组大鼠进行病理检查。根据肝脏的病理变化结果判断造模是否成功。

2.2 干预治疗

将成模后大鼠随机分为模型组, 青蒿琥酯组, 青蒿琥酯自微乳低、中、高剂量组和多烯磷脂酰胆碱组, 每组 10 只。低、中、高剂量组分别每天按剂量 20, 40, 80 mg·kg⁻¹ 灌服给药, 多烯磷脂酰胆碱组每天灌服多烯磷脂酰胆碱混悬液 100 mg·kg⁻¹, 青蒿琥酯组每天按剂量 80 mg·kg⁻¹ 灌胃给药, 正常组和模型组每天灌服等容量的生理盐水, 每天 1 次, 连续 10 周, 每周称重 2 次, 根据体质量调节给药体积。

2.3 标本采集

末次给药当晚禁食不禁水 16 h, 次日以 3%的戊巴比妥钠(2 mL·kg⁻¹)麻醉后腹腔静脉取血, 离心进行相关指标检测; 分离肝组织, 生理盐水冲洗干净擦干后称重, 计算肝指数; 后取右叶肝组织适量-80 °C 低温保存备用, 剩余部分以 4%多聚甲醛固定, 用于病理检查。

2.4 指标检测

2.4.1 血清学指标 取大鼠血液, 置于生化采血管中, 静止 30 min, 2 000×g 离心 10 min, 取血清, 采用全自动生化分析仪, 按试剂盒说明书对 ALT、AST、TG 和 TC 指标测定, 血清 IL-10 及 TNF- α 指标采用放射免疫法进行测定。

2.4.2 病理学检查 常规 HE 染色, 在光镜下观察肝组织切片的病理形态学变化, 脂肪肝病理组织学诊断参考中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学会“非酒精性脂肪肝诊断标准”^[10]。

2.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 以 one-way ANOVA 统计方法进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

实验期间, 由于灌胃操作失误, 导致模型组大鼠死亡 2 只, 中剂量组大鼠死亡 1 只, 其他组大鼠无伤亡情况发生。正常组大鼠活动敏捷、摄食量多、毛色光滑。而模型组大鼠毛色粗糙、行动迟缓, 体型较正常组明显肥胖。各给药治疗组大鼠毛色、体型等情况较模型组有不同程度改善。实验结束时, 模型组大鼠的体质量和肝指数较正常组明显增加($P < 0.01$), 高、中剂量组和多烯磷脂酰胆碱组大鼠体质量和肝指数较模型组降低($P < 0.05$ 或 < 0.01), 而且高剂量组、多烯磷脂酰胆碱组大鼠较青蒿琥酯组也明显下降($P < 0.05$), 而低剂量组体质量下降则不明显。结果见表 1。

表 1 各组大鼠肝重量及肝脏指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of body weight and liver coefficient in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ mg·kg ⁻¹	初始体 质量/g	终末体 质量/g	肝指数/%
正常组	10	-	207.4±7.14	406.4±23.20	4.48±0.36
模型组	8	-	200.5±4.07	543.2±31.70 ¹⁾	5.89±0.32 ¹⁾
青蒿琥酯自微乳					
低剂量组	10	20	202.8±5.18	521.8±22.17	5.51±0.25
中剂量组	9	40	205.4±5.54	481.7±15.66 ²⁾	5.15±0.21 ²⁾
高剂量组	10	80	206.1±4.68	454.5±10.23 ³⁾⁴⁾	4.78±0.29 ³⁾⁴⁾
多烯磷脂酰胆碱组	10	100	203.3±3.86	448.2±12.00 ³⁾⁴⁾	4.76±0.18 ³⁾⁴⁾
青蒿琥酯组	10	80	201.7±2.46	488.6±9.14 ²⁾	5.36±0.48 ²⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与青蒿琥酯组比较, ⁴⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; compared with artesunate group, ⁴⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 病理检查结果

正常组大鼠肝组织光镜下结构清晰完整, 肝小叶结构正常; 模型组肝细胞严重损伤, 可见弥

慢性肝细胞脂肪变, 并伴有气球样变, 汇管区有部分点状肝细胞坏死并伴有肝纤维化形成; 与模型组相比, 青蒿琥酯自微乳各治疗组病理状况有所好转, 尤其是高剂量组大鼠肝细胞的损伤程度

明显减轻, 肝细胞脂肪变和气球样变显著减少, 汇管区无明显炎细胞浸润及灶性坏死; 与模型组相比, 多烯磷脂酰胆碱组未见明显脂肪变性, 偶可见小泡性脂肪滴空泡, 结果见图 1。

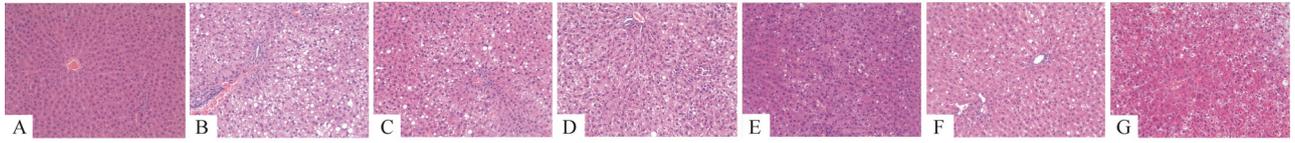


图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色结果(100×)

A-正常组; B-模型组; C-青蒿琥酯自微乳低剂量组; D-青蒿琥酯自微乳中剂量组; E-青蒿琥酯自微乳高剂量组; F-多烯磷脂酰胆碱组; G-青蒿琥酯组。

Fig. 1 HE staining results in rats of each group(100×)

A-normal group; B-model group; C-low dose of artesunate self-microemulsions group; D-medium dose of artesunate self-microemulsions group; E-high dose of artesunate self-microemulsions group; F-essentialia group; G-artesunate group.

3.3 青蒿琥酯自微乳对大鼠 ALT 和 AST 指标的影响

模型组大鼠血清 ALT、AST 与正常组相比, 明显升高($P<0.01$); 经过青蒿琥酯自微乳干预治疗后, 各组大鼠血清指标较模型组均有所下降, 尤其是中、高剂量组具有显著性差异($P<0.05$ 或 <0.01)。结果见表 2。

表 2 各组大鼠血清 ALT、AST 指标($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The ALT, AST in serum of each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
正常组	10	-	96.3±8.90	141.4±15.31
模型组	8	-	206.6±7.01 ¹⁾	312.3±23.13 ¹⁾
青蒿琥酯自微乳				
低剂量组	10	20	188.4±9.64	289.9±12.11
中剂量组	9	40	158.2±11.24 ²⁾	230.3±19.62 ²⁾
高剂量组	10	80	120.2±10.15 ³⁾⁴⁾	181.2±6.49 ³⁾⁴⁾
多烯磷脂酰胆碱组	10	100	140.1±12.94 ³⁾	212.3±16.80 ³⁾
青蒿琥酯组	10	80	168.1±10.24 ²⁾	225.1±10.88 ²⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; 与青蒿琥酯组比较, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; compared with artesunate group, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

3.4 青蒿琥酯自微乳对大鼠 TC 和 TG 指标的影响

模型组大鼠血清 TC 和 TG 均较正常组显著升高($P<0.01$)。经青蒿琥酯自微乳干预治疗后, 高、中、低剂量组较模型组有一定程度的改善, 且高、中剂量组具有显著性差异($P<0.01$ 或 <0.05)。结果见表 3。

3.5 青蒿琥酯自微乳对大鼠 IL-10 及 TNF- α 指标的影响

造模 10 周后, 模型组大鼠血清 TNF- α 指标较正常组显著升高($P<0.01$), 而 IL-10 指标明显下降($P<0.01$), 青蒿琥酯自微乳给药后, 高、中、低剂量组大鼠 IL-10 及 TNF- α 指标较模型组得到一定程

度的改善, 高、中剂量组具有显著性差异($P<0.05$ 或 <0.01)。结果见表 4。

表 3 各组大鼠血清 TC 和 TG 指标($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The TC, TG in serum of each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹
正常组	10	-	1.39±0.12	2.28±0.41
模型组	8	-	2.98±0.25 ¹⁾	3.97±0.15 ¹⁾
青蒿琥酯自微乳				
低剂量组	10	20	2.61±0.12	3.74±0.14
中剂量组	9	40	2.32±0.10 ²⁾	3.20±0.07 ²⁾
高剂量组	10	80	1.91±0.13 ³⁾⁴⁾	2.95±0.12 ³⁾⁴⁾
多烯磷脂酰胆碱组	10	100	1.82±0.07 ³⁾⁵⁾	2.85±0.08 ³⁾⁵⁾
青蒿琥酯组	10	80	2.12±0.22 ²⁾	3.13±0.21 ³⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; 与青蒿琥酯组比较, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; compared with artesunate group, ⁴⁾ $P<0.05$; ⁵⁾ $P<0.01$ 。

表 4 各组大鼠血清 IL-10 和 TNF- α 指标($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 The IL-10, TNF- α in serum of each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-10/ng·L ⁻¹	TNF- α / μ g·L ⁻¹
正常组	10	-	247.7±18.5	0.578±0.10
模型组	8	-	110.1±9.03 ¹⁾	1.435±0.24 ¹⁾
青蒿琥酯自微乳				
低剂量组	10	20	137.2±8.41	1.036±0.06
中剂量组	9	40	170.7±2.36 ²⁾	0.902±0.11 ²⁾
高剂量组	10	80	214.0±9.20 ³⁾⁴⁾	0.773±0.10 ³⁾⁴⁾
多烯磷脂酰胆碱组	10	100	202.1±8.83 ³⁾	0.790±0.08 ³⁾
青蒿琥酯组	10	80	182.1±7.43 ²⁾	0.915±0.18 ²⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; 与青蒿琥酯组比较, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; compared with artesunate group, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

4 讨论

NAFLD是指除酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征。其发病机制目前较为认可的

是 Day 和 James^[11]提出的以氧应激/脂质过氧化为核心的“二次打击”学说。各种状态所致胰岛素抵抗与肝内脂肪沉积是第 1 次打击；而氧应激/脂质过氧化是脂肪肝病进展中的第 2 次打击。

ALT、AST 指标的升高能够灵敏地反映肝损伤程度，尤其是 ALT，1%的肝细胞坏死可导致血清中酶浓度升高 1 倍，被世界卫生组织推荐为肝损伤最敏感的检测指标。在 NAFLD 的发病过程中，TNF- α 、IL-10 等炎性细胞因子也起着十分重要的作用，TNF- α 主要通过激活其他细胞因子和调节细胞的分化、增殖或凋亡，对脂肪代谢起一定作用。研究表明，高 TNF- α 是 NAFLD 的独立危险因素，与坏死性炎症和纤维化呈正相关，TNF- α 作为损害性因子在 NAFLD 的发生、发展中起着重要作用^[12]。IL-10 是一种主要由 Th2 细胞产生的免疫调节性细胞因子，是体内重要的抗炎因子，在转录水平抑制 TNF- α 的产生被认为是其发挥抗炎作用的重要机制之一^[13]。

本实验通过高脂饲料复制大鼠 NAFLD 模型，造模 10 周后模型组大鼠肝组织病理切片结果显示，模型组肝细胞损伤严重，可见大量弥漫性肝细胞脂肪变，并伴有气球样变；经各药物组治疗 10 周后，肝组织有明显好转，与模型组相比，肝细胞损伤明显减轻；升高的血清学指标 ALT 和 AST 明显下降；青蒿琥酯自微乳高、中剂量组能够使升高的 TC、TG 指标明显下降($P < 0.05$ 或 < 0.01)，提示青蒿琥酯能够调节 NAFLD 病变过程的脂质代谢；治疗后血清中 TNF- α 浓度下降和 IL-10 浓度升高，提示青蒿琥酯自微乳可通过抑制体内炎性细胞因子的分泌，减轻炎症反应，从而减轻肝细胞的损伤，各治疗组(除低剂量组外)与模型组相比较，具有显著性差异($P < 0.05$ 或 < 0.01)。

本实验采用不同剂量的青蒿琥酯自微乳进行 NAFLD 干预治疗后，能明显改善 NAFLD 大鼠血清 ALT、AST、TC、TG、TNF- α 和 IL-10 水平；且肝脏病理学结果显示经青蒿琥酯自微乳治疗后，各组大鼠肝组织脂肪变细胞减少，炎症减轻，提示青蒿琥酯自微乳在一定程度上能够通过改善

脂肪细胞变性和抑制体内炎症反应减轻肝细胞的损伤，从而起到保护肝细胞的作用，其对 NAFLD 的作用机制有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] BARRADELL L B, FITTON A. Artesunate. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of malaria [J]. *Drugs*, 1995, 50(4): 714-741.
- [2] JANSE C J, WATERS A P, KOS J, et al. Comparison of *in vivo* and *in vitro* antimalarial activity of artemisinin dihydroartemisinin and sodium artesunate in the plasmodium berghei rodent model [J]. *Int J Parasitol*, 1994, 24(4): 589-594.
- [3] MICHAELIS M, KLEINSCHMIDT M C, BARTH S. Anti-cancer effects of artesunate in a panel of chemoresistant neuroblastoma cell lines [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(2): 130-136.
- [4] LAI L N, YANG L X, GUO C H, et al. Effects and mechanisms of artesunate on immunological hepatic fibrosis in experimental rats [J]. *Chin Pharm Bull(中国药理学通报)*, 2011, 27(1): 125-129.
- [5] HUANG W W, NIU H J, LIU N, et al. Artesunate inhibiting invasion induced by human colon cancer HCT-8 cells and its mechanism [J]. *Chin Tradit Patent Med(中成药)*, 2011, 33(12): 2062-2064.
- [6] WANG L F, MO H Y, ZHANG L H. Study on the mechanisms of artesunate on anti-inflammatory in collagen-induced arthritis in rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志)*, 2012, 28(1): 46-48.
- [7] 莫汉有, 王丽芳, 周润华, 等. 青蒿琥酯对佐剂性关节炎大鼠血清白介素-17 及血管内皮细胞生长因子的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(2): 415-416.
- [8] XI J J, ZHANG J K, PAN X W, et al. Pharmacokinetics of artesunate self-microemulsion in rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2017, 34(3): 385-389.
- [9] XI J J, ZHUANG R X, WANG F G, et al. Study on effect of apigenin on non-alcoholic fatty liver in rats [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2013, 31(11): 2472-2474.
- [10] The Chinese National Workshop on Fatty Liver and Alcohol Liver Disease for the Chinese Liver Disease Association. Guidelines for management of nonalcoholic fatty liver disease: an updated and revised edition [J]. *Chin J Hepatol(中华肝脏病杂志)*, 2010, 18(3): 163-166.
- [11] DAY C P, JAMES O F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(4): 842-845.
- [12] 郭晓鹤, 李贞娟, 张彩凤, 等. 肿瘤坏死因子- α 与非酒精性脂肪肝的关系[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2011, 20(7): 655-658.
- [13] XI J J, ZHUANG R X, WANG F G, et al. Therapeutic efficacy and mechanisms of apigenin on non-alcoholic fatty liver in rats [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2014, 32(7): 1636-1638.

收稿日期: 2018-01-30

(本文责编: 曹粤锋)