百合花花青素对改善 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化作用研究

熊英[1]，王玉婷[2]，王诗[3]
（1.武汉市第五医院药学部，湖北武汉 430050）（2.武汉大学药学院，湖北武汉 430072）
（3.湖北科技学院药学院，湖北咸宁 437100）

摘要：为探究百合花醇提物花青素对 CCl_4 所致的大鼠肝纤维化的预防、改善作用及可能机制。将 32 只大鼠随机分为对照组（Sham）、肝纤维化模型组（M）、百合花花青素低剂量组（LFF 0.5 g/mL）和高剂量组（LFF 1.0 g/mL）。M 组、LFF 组大鼠背部皮下注射 50% CCl_4 造模，每周 2 次，连续 8 周。LFF 组大鼠给予不同剂量的百合花花青素提取物灌胃，Sham 组和 M 组给予等体积的生理盐水，每天 1 次。8 周后处理动物，采集血清检测 ALT、AST；肝组织匀浆测定 SOD、CAT、GSH-Px 活力和 MDA 含量；Western-blot 测定肝组织 TGF-β_1 和 α-SMA 的表达。实验结果表明，与模型 M 组比较，百合花花青素能明显降低大鼠血清中 ALT、AST 水平；使肝组织抗氧化酶活力 SOD、CAT、GSH-Px 显著上升，脂质过氧化物 MDA 生成减少，进而诱导肝组织纤维化相关物质 TGF-β_1、α-SMA 表达下调。百合花花青素具有良好的抗氧化活性，改善大鼠肝损伤，并逆转 CCl_4 诱导的肝纤维化，其机制可能与抗脂质过氧化物损伤及下调细胞外纤维组织增生有关。

关键词：百合花花青素；肝纤维化；CCl_4；抗氧化
文章篇号：1673-9078(2018)02-1-5 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.001

The Effect of *Lilium lancifolium* Anthocyanin on the Improvement of Liver Fibrosis Induced by CCl_4 in Rats

XIONG Ying[1], WANG Yu-ting[2], WANG Shi[3]
(1.Department of Pharmacy, Wuhan No.5 Hospital, Wuhan 430050, China)
(2.Department of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China)
(3.School of Pharmacy, Hubei Xianning University of Science and Technology, Xianning 437100, China)

Abstract: In order to explore the prevention, improvement and possible mechanism of alcohol extract anthocyanin from *Lilium lancifolium* on the liver fibrosis induced by CCl_4 in rats, thirty-two rats were randomly divided into control group (Sham), liver fibrosis model group (M), low dose *lancifolium* anthocyanin group (LFF 0.5 g/mL) and high dose *lancifolium* anthocyanin group (LFF 1.0 g/mL). Rats in M group and LFF group were subcutaneously injected with 50% CCl_4 on the back, twice a week for 8 weeks. The rats in M group and LFF group were subcutaneously injected with 50% CCl_4 on the back twice a week for 8 weeks. The rats in LFF group were given different doses of alcohol extract anthocyanin from *Lilium lancifolium*. Sham group and M group were given the same volume of physiological saline once a day. After eight weeks, the animals were sacrificed and serum was collected for detecting alanine amiotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-px) and the content of malondialdehyde (MDA) in the liver homogenate were measured. Western blot was employed to examine the expression of transforming growth factor-β 1 (TGF-β_1) and alpha-smooth muscle actin (α-SMA) in the liver tissue. The results showed that compared with M group, *Lilium lancifolium* anthocyanins could obviously reduce the ALT and AST levels in rat serum, and significantly increase the activities of SOD, CAT and GSH-Px in liver tissue, decrease the lipid peroxideMDA, and then down-regulate the expression of liver fibrosis related materials such as TGF-β1 and α-SMA. *Lilium lancifolium* anthocyanins had good antioxidant activity, which could significantly reverse the liver fibrosis induced by CCl_4. The mechanism might be related to resist the damage of lipid peroxide and reduce the proliferation of extracellular fibrous tissue.

收稿日期：2017-09-04
基金项目：湖北科技学院校级基金项目（2016-18XZY03）
作者简介：熊英（1975-），女，本科，主管药师，研究方向：药理学
通讯作者：王诗（1984-），女，博士，副教授，研究方向：药理学

Key words: *Lilium lancifolium* anthocyanins; liver fibrosis; CCl_4; antioxidant

世界卫生组织(WHO)报道全球每年肝病死亡人数达到 100 万，其中肝纤维化（hepatic fibrosis）是肝脏疾病中最为常见的环节。肝纤维化是许多慢性致病因子如酒精、化学物质四氯化碳、药物扑热息痛等对直接作用于肝脏造成损伤而引起肝内纤维结缔组织广泛增生并沉积的病理过程，其主要的特征是肝脏细胞外基质（extra cellular matrix）合成与降解失去平衡，最终导致肝脏正常结构被破坏肝功能发生紊乱[1,2]。大量实验研究证实[3,4]，肝纤维化的病理病变是可以预防并治疗的。如何预防、阻断及逆转肝纤维化是当今肝病研究领域的重要内容。国内外诸多学者发现，许多天然产物具有清除自由基、抗氧化、抗炎等多种生物活性，通过下调氧化应激产生的脂质过氧化物、炎症因子的表达而减少纤维组织的增生沉积，从而逆转肝纤维化[4,5]。因此，人们将目光聚焦于天然产物的开发与利用，希望寻找到治疗肝损伤，逆转肝纤维化的有效单体物质。

近年来，有相关研究报道了百合鳞片的部分生理功效，包括抗氧化、抗炎和抗癌等药理活性，但是百合花花瓣的抗氧化活性、对肝损伤的保护作用及其可能的机制尚未有人研究。本实验参照文献方法[6,7]从卷丹百合花（*Lilium lancifolium*）花瓣中提取花青素，通过建立 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化模型，检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶 ALT、氨酸氨基转移酶 AST 活力值及肝组织匀浆超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶 CAT、谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px 的活力、丙二醛 MDA 的含量，研究卷丹百合花花青素的抗氧化活性，探讨其对 CCl_4 诱导的肝纤维化大鼠是否有保护机预防作用。于此同时，本实验还采用 Western Blot 的方法初步分析了卷丹百合花花青素对肝保护效应的可能机制，为后续进一步深入研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠，体重 220~250 g，购自武汉大学动物实验中心，实验动物生产许可证：SCXK(鄂)2008-0004。

1.2 药物与试剂

卷丹百合花花瓣（江苏南京艺馨花卉有限公司）；四氯化碳 CCl_4（天津市恒兴化学试剂制造有限公司）；食用油；无水乙醇（上海生化）；天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）、超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、过氧化氢酶（CAT）试剂盒均购买于南京建成生物工程研究所；小鼠抗大鼠 α-SMA 单克隆抗体（美国 Abcom），小鼠抗大鼠 TGF-β_1 单克隆抗体（美国 Abcom）。其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

离心机（飞鸽牌系列）；分析天平，HANGPING FA1004；超声仪，厦门华益通超声设备有限公司；恒温水浴装置，TB-85 型，日本岛津公司；酶标仪，KHB ST-360，上海科华；免疫印迹电泳系统（Bio-Rad）。

1.4 方法

1.4.1 百合花花青素提取

根据文献方法略微调整后提丹百合花花青素[8,9]，步骤如下：将卷丹百合花花瓣粉碎，80%乙醇 75 ℃回流提取 3 次，提取液合并后旋转蒸发至无乙醇至无醇味，用蒸馏水配成 1 g/mL 的百合花醇提物。混合液经 101 大孔树脂分离得到花青素溶液，收集后经武汉大学分析实验中心 HPLC 检测为花青素类物质。提取样品回收乙醇，浓缩干燥成膏，水溶解制成高低两个浓度，即 1 g/kg 和 0.5 g/kg。

1.4.2 动物实验及检测

1.4.2.1 动物分组

随机将 32 只大鼠随机分为空白对照组（Sham）、肝纤维化模型组（M）、百合花花青素低剂量组（LFF，0.5 g/kg）和百合花花青素高剂量组（LFF，1 g/kg），每组各 8 只。除 Sham 组外，其余三组大鼠皮下注射 50% CCl_4 花生油溶液 2.5 mL/kg 进行造模，每周 2 次，连续造模 8 周，首次造模 CCl_4 花生油剂量加倍，正常大鼠皮下注射等量生理盐水。造模同时，给药组大鼠分别给予 1 g/kg 和 0.5 g/kg 的百合花花青素灌胃，Sham 组和 M 组以等体积生理盐水灌胃，每日 1 次，连续 8 周。末次给药 24 h 后，10%水合氯醛麻醉大鼠，下腔静脉采血后 4500 r/min 离心 10 min，分离得到血清，同时采集肝脏等脏器组织-80 ℃冻存备用。

1.4.2.2 检测指标

（1）血清生化指标：取血清上清液，按试剂盒操作步骤 ALT、AST 活力值。

（2）肝组织匀浆生化指标：制备 10%肝组织匀浆（生理盐水）样本，取上清液按照试剂盒操作步骤，测得 SOD、CAT、GSH-Px 的活力和 MDA 的含量。

（3）免疫印迹 Western-blot 检测肝组织 TGF-β1 和 α-SMA 的表达：蛋白裂解液提取蛋白样品，BCA 法检测样品蛋白含量并调节蛋白浓度至相同，加入 5× 上样缓冲液沸水浴 10 min，-80 ℃保存备用。取样 15 μL 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，湿转法转膜结束后脱脂奶粉封闭 PVDF 膜。剪下不同区域的 PVDF 膜，分别加小鼠抗大鼠的 TGF-β1、α-SMA 和 β-actin 抗体，4 ℃孵育过夜，TBST 摇床震荡漂洗 8 min×4 次；加入 1:4000 的二抗室温孵育 1 h，TBST 摇床震荡漂洗 8 min×4 次；ECL 法曝光显色。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行处理，先进行数据的正态分布检验，方差齐性检验，计量数据用 x±s 表示，组间差异用单因素方差分析，p<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 百合花花青素对肝纤维化大鼠肝功能的影响

当肝组织受损时，血清中 ALT、AST 这两种酶活性的增高反映了肝细胞的损害程度。由表 1 中的实验结果可知，模型 M 组大鼠血清中 ALT、AST 水平分别升高至 257.64±23.53 U/L 和 384.36±32.68 U/L，约是正常 Sham 组的 6 倍（p<0.05 或 p<0.01）。

表 1 百合花花青素对肝纤维化大鼠血清中 ALT 和 AST 含量影响

Table 1 The effect of *Lilium lancifolium* anthocyanins on the ALT and AST content in serum of liver fibrosis rats

分组	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
Sham	44.75±7.36	63.54±8.46
M	257.64±23.53**	384.36±32.68**
LFF (0.5 g/kg)	123.42±12.56$^{\#}$	155.63±20.14$^{\#}$
LFF (1.0 g/kg)	65.67±17.38$^{\#\#}$	85.58±13.68$^{\#\#}$

注：* p<0.05，** p<0.01vs Sham；$^{\#}$ p<0.05，$^{\#\#}$ p<0.01vs M。

这一实验结果证实，模型 M 组大鼠在 CCl_4 连续造模 8 周后血清中的 ALT、AST 显著升高，造成了肝损伤。给予百合花花青素 LFF 灌胃治疗后，低剂量组大鼠血清中 ALT、AST 水平下降至 M 组的一半（p<0.05），而高剂量组大鼠血清中 ALT、AST 明显降低至 65.67±17.38 U/L 和 85.58±13.68 U/L（p<0.01），接近正常水平。肝损伤大鼠在给予百合花花青素治疗后，血清中 ALT、AST 较 M 组明显下降，且百合花花青素对大鼠肝脏的保护作用呈现剂量依赖性，对肝功能的改善作用随浓度的增加而增加。本研究这一结果和 Al-Dbass 等人的研究相似，中药醇提物抗肝损伤呈现剂量依赖性[4]，首次发现百合花花青素具有良好的肝功能改善作用。

2.2 百合花花青素对肝纤维化大鼠肝组织中 SOD、CAT、GSH-Px 及 MDA 的影响

肝纤维化中，超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）能清除自由基及过氧化物，从而避免氧化应激对肝细胞造成的损伤，保护肝脏。丙二醛（MDA）是脂质过氧化的终产物，肝纤维化程度越重，肝组织释放的 MDA 也越多。

从表 2 中可知，模型 M 组大鼠肝组织 SOD、CAT、GSH-Px 活力分别下降至 109.54±28.38 U/mg pro、13.56±6.37 U/mg pro 和 435.23±108.95 U/mg pro，而 MDA 升高至 14.84±2.37 nmol/mg pro，与空白 Sham 组比较，结果有统计学差异（p<0.05 或 p<0.01）。给予百合花花青素 LFF 干预治疗后，低剂量组大鼠 SOD、CAT、GSH-Px 活力较 M 组均有明显上升，分别增加至 175.78±21.74 U/mg pro、27.46±8.57 U/mg pro 和 496.96±115.64 U/mg pro（p<0.05）；高剂量组大鼠上述指标进一步回升接近正常水平，分别为 215.87±23.78 U/mg pro、35.86±6.03 U/mg pro 和 568.63±94.58 U/mg pro 和 M 组比较结果有统计学差异（p<0.05 或 p<0.01）。低剂量和高剂量给药组 MDA 含量较 M 组明显降低，分别下降至 9.25±2.51 nmol/mg pro 和 6.79±2.38 nmol/mg pro（p<0.05 或 p<0.01）。SOD、CAT、GSH-Px 在肝纤维化病理发展中，对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用，其活性反映了机体清除氧自由基和过氧化物的能力。

机体防御体系抗氧化能力越强，则可避免细胞膜受到攻击产生脂质过氧化物 MDA，从而逆转有害物质对肝细胞的损伤[8]。本研究给药干预后，大鼠肝组织抗氧化酶活力 SOD、CAT、GSH-Px 显著上升，脂质过氧化物 MDA 生成减少。这表明百合花花青素具有良好的体内抗氧化活性，能抵御氧化应激造成的肝损伤。百合花花青素通过增强肝脏的抗氧化功能对肝纤维化有一定的治疗和保护作用，且疗效与百合花花青素所用剂量正相关。这和李晓斐等人的研究色素抗肝损伤的结果一致[10]，百合花花青素具由较强的抗氧化能力，治疗肝损伤效果优于红花红色素。

表 2 百合花花青素对肝纤维化大鼠肝组织中抗氧化物指标的影响

Table 2 The effect of *Lilium lancifolium* anthocyanins on the antioxidant indexes in liver tissue of liver fibrosis rats

分组	SOD/(U/mg pro)	CAT/(U/mg pro)	GSH-Px/(U/mg pro)	MDA/(nmol/mg pro)
Sham	254.35±19.57	43.84±5.74	646.42±54.62	5.67±1.05
M	109.54±28.38**	13.56±6.37**	435.23±108.95*	14.84±2.37**
LFF（0.5 g/kg）	175.78±21.74$^{\#}$	27.46±8.57$^{\#}$	496.96±115.64	9.25±2.51$^{\#}$
LFF（1.0 g/kg）	215.87±23.78$^{\#\#}$	35.86±6.03$^{\#\#}$	568.63±94.58$^{\#}$	6.79±2.38$^{\#\#}$

注：* p<0.05，** p<0.01vs Sham；# p<0.05，## p<0.01vs M。

2.3 百合花花青素对肝纤维化大鼠肝组织中 TGF-β1 和 α-SMA 表达的影响

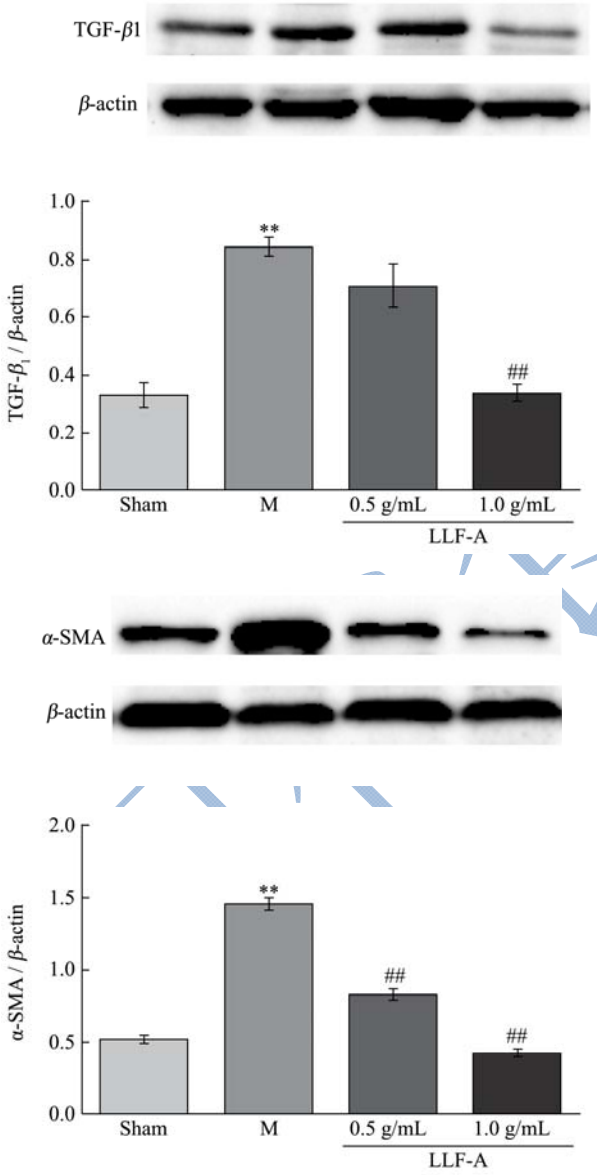


图 1 百合花花青素对肝纤维化大鼠肝组织中 TGF-β1 和 α-SMA 表达的影响

Fig.1 Effects of *Lilium lancifolium* anthocyanins on the expression of TGF-β_1 and α-SMA in liver of liver fibrosis rats

注：* p<0.05，** p<0.01vs Sham；# p<0.05，## p<0.01vs M。

从图 1 中可知，与空白 Sham 组比较，模型 M 组大鼠肝组织中 TGF-β1 和 α-SMA 表达增加了近 2 倍，结果有统计学差异（p<0.05 或 p<0.01）。百合花花青素能明显减少肝组织 TGF-β1、α-SMA 的表达，给药组大鼠肝纤维化相关指标降低。尤其是低剂量组和高剂量组大鼠肝组织 α-SMA 表达显著下调，结果呈现剂量依赖性。

CCl_4 在肝组织富集可启动氧化应激反应释放脂质过氧化物，进而诱导 Kuffer 大量表达 TGF-β1。TGF-β1 激活肝星状细胞后作用于细胞上的 I 型受体，刺激胶原纤维的前体物质大量释放。α-SMA 是肝星状细胞活化的标志物，也是胶原纤维合成的相关物质。TGF-β1 和 α-SMA 的大量表达使得细胞外基质金属蛋白酶及胶原纤维的分泌释放失衡，加剧了肝纤维化程度[9,10]。本实验结果显示，给药组大鼠肝组织中 TGF-β1、α-SMA 表达量较模型组显著降低，表明百合花花青素能有效的对抗 CCl_4 引起的肝星状细胞活化，逆转肝纤维化进程，改善肝功能。

3 结论

3.1 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化模型是研究药物护肝活性的经典方法，其肝脏病理变化类似临床肝纤维化。肝纤维化的发生和发展受诸多因素的影响，如氧化应激、炎症联级反应、细胞因子的激活与释放等[8]。这些因素相互影响相互促进，最终导致肝脏细胞外基质结缔组织增生发生肝纤维化。因此，人们认为抗氧化减少氧化应激过程中相关细胞因子的释放、下调纤维化物质的表达，是治疗、预防肝纤维化的重要靶点之一[9,11]。百合是中医领域传统的中药药材，研究表明百合提取物中的有效成分具有一定的抗氧化、抗炎、抗肿瘤等生理活性。基于这一观点，本实验就百合花提取物花青素改善 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化及其可能的作用机制进行了探讨。

3.2 本文研究结果首次证实，百合花花青素能通过降低大鼠血清中 ALT、AST 水平平，增加肝组织抗氧化酶活力 SOD、CAT、GSH-Px，减少脂质过氧化物 MDA

的生成，起到保护肝脏的作用。百合花花青素可以清除机体内的氧自由基和过氧化物，具有良好的抗氧化能力，进而显著改善大鼠地肝损伤。百合花花青素通过下调肝组织 TGF-β_1、α-SMA 的表达，实现逆转 CCl_4 诱导的肝纤维化形成。百合花花青素的护肝效应机制可能与抗脂质过氧化物损伤及下调细胞外纤维组织增生有关。

3.3 综上所述，百合花花青素具有抗氧化、保护肝细胞、逆转肝纤维化的作用，其可能的机制是通过抗氧化介导了氧化应激反应，使 TGF-β1 和 α-SMA 表达下调，最终导致肝星状细胞活性受到抑制，细胞外间质增生沉积减少，纤维化程度减轻。

参考文献

[1] B S da Silva, G B Rodrigues, S W Rocha, et al. Inhibition of NF-kappaB activation by diethylcarbamazine prevents alcohol-induced liver injury in C57BL/6 mice [J]. Tissue & Cell, 2014, 46(5): 363-371

[2] Y Ijiri, R Kato, M Sadamatsu, et al. Chronological changes in circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in rats with carbon tetrachloride-induced liver injury [J]. Toxicology, 2014, 316: 55-60

[3] G L Tipoe, T M Leung, E C Liong, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces liver inflammation, oxidative stress and fibrosis in carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injury in mice [J]. Toxicology, 2010, 273(1-3): 45-52

[4] A M Al-Dbass, S K Al-Daihan, R S Bhat. Agaricus blazei Murill as an efficient hepatoprotective and antioxidant agent against CCl_4-induced liver injury in rats [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2012, 19(3): 303-309

[5] M Vuda, R D'Souza, S Upadhya, et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of aqueous extract of Hybanthus enneaspermus against CCl4-induced liver injury in rats [J]. Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie, 2012, 64 (7-8): 855-859

[6] B Shen, H Chen, C Shen, et al. Hepatoprotective effects of lignans extract from Herpetospermum caudigerum against CCl_4-induced acute liver injury in mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 164: 46-52

[7] B Lu, Y Xu, L Xu, et al. Mechanism investigation of dioscin against CCl_4-induced acute liver damage in mice [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2012, 34(2): 127-135

[8] W Peng, C Zhang, H Lv, et al. Comparative evaluation of the protective potentials of human paraoxonase 1 and 3 against CCl_4-induced liver injury [J]. Toxicology Letters, 2010, 193 (2): 159-166

[9] R Jeyadevi, T Sivasudha, A Rameshkumar, et al. Phenolic profiling by UPLC-MS/MS and hepatoprotective activity of Cardiospermum halicacabum against CCl_4 induced liver injury in Wistar rats [J]. Journal of Functional Foods, 20113, 5: 289-298

[10] Y Xie, H Hao, H Wang, et al. Reversing effects of lignans on CCl_4-induced hepatic CYP450 down regulation by attenuating oxidative stress [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 155: 213-221

[11] 李晓斐,李志珂,武双婵,等.红花红色素对小鼠急性 CCl_4 性肝损伤的作用[J].现代食品科技,2013,29(7):1569-1573
LI Xiao-fei, LI Zhi-ke, WU Shuang-chan, et al. Effect of safflower red pigment on acute liver injury induced [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(7): 1569-1573

现代食品科技