

人参皂苷 Rg₁ 通过 Sirt5 改善大鼠胆汁淤积的作用研究

齐密霞¹ 刘柯伶² 贺敬波¹ (深圳市宝安区人民医院 1. 中医科; 2. 妇产科 广东深圳 518100)

摘要 目的: 基于 Sirt5 通路探讨人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积的保护作用。方法: 将 SD 大鼠随机分成正常对照组、模型组、阳性对照组(熊去氧胆酸, 100 mg · kg⁻¹)以及人参皂苷 Rg₁低(10 mg · kg⁻¹)、中(20 mg · kg⁻¹)、高(40 mg · kg⁻¹)剂量组, 每组 6 只; 各组大鼠连续灌胃相应药物 5 d, 第 3 天除正常对照组外, 其他各组灌胃 α-萘异硫氰酸酯(ANIT, 80 mg · kg⁻¹)建立胆汁淤积大鼠模型。造模 48 h 后, 取肝脏记录肝重和肝重/体质量比, 腹主动脉取血检测血清肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(AKP), 黄疸指标总胆汁酸(TBA)及肝脏抗氧化应激因子谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)和氧化应激产物丙二醛(MDA)水平; 采用酶联免疫吸附剂测定(ELISA)试剂盒检测血清炎症细胞因子肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1β(IL-1β); 采用苏木精-伊红(HE)染色检测肝脏病理变化; Western blotting 检测肝组织沉默调节蛋白 5(SIRT5)、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)和核因子 κB(NF-κB)表达。结果: 与正常对照组大鼠相比, 模型组大鼠的肝质量和肝质量比显著升高; 肝脏病理损伤加重, 肝细胞出现变性坏死, 血清中 ALT、AST、AKP、TBA、MDA、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平显著增加, 而 GSH 和 SOD 水平显著降低; 蛋白 NF-κB 水平显著增加, 而 SIRT5 和 Nrf2 水平显著减少, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比, 阳性对照组和人参皂苷 Rg₁ 中、高剂量组大鼠基本指标改善, 肝组织病理损伤减轻, 血清中 ALT、AST、AKP、TBA、MDA、TNF-α、IL-6 和 IL-1β 水平显著减少, 而 GSH 和 SOD 水平显著升高; 人参皂苷 Rg₁、高剂量组蛋白 NF-κB 水平显著减少, 而 SIRT5 和 Nrf2 水平显著增加, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论: 人参皂苷 Rg₁ 对 ANIT 诱导的胆汁淤积大鼠具有明显的肝保护作用, 该作用可能与激活 Sirt5/Nrf2 通路及下调 NF-κB 蛋白的表达有关。

关键词 人参皂苷 Rg₁; 胆汁淤积; 沉默调节蛋白 5; 核因子 E2 相关因子 2; 核因子 κB

中图分类号: R965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-049X(2022)10-1718-06

DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.10.005

Alleviation Effect of Ginsenoside Rg₁ in Rats with Cholestasis by Sirt5 Pathway

Qi Mixia¹, Liu Keling², He Jingbo¹ (1. Department of Traditional Chinese Medicine; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Shenzhen Bao'an People's Hospital, Shenzhen 518100, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect of ginsenoside Rg₁ on cholestasis via Sirt5 pathway. **Methods:** SD rats were randomly divided into normal control group, model group, positive control group (ursodeoxycholic acid, 100 mg · kg⁻¹) and ginsenoside Rg₁ low-dose (10 mg · kg⁻¹), medium-dose (20 mg · kg⁻¹) and high-dose (40 mg · kg⁻¹) groups with 6 rats in each group. The rats were given corresponding drug for 5 days continuously in each group. On the third day, except the normal control group, other groups were given α-naphthalene isothiocyanate (ANIT, 80 mg · kg⁻¹) to establish cholestatic rat model. At 48 h after modeling, liver weight and liver weight/body weight ratio were recorded. Blood was taken from abdominal aorta to detect liver function indexes including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (AKP), jaundice index total bile acid (TBA), liver antioxidative stress factors glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD), and oxidative stress product malondialdehyde (MDA). Plasma inflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1β) were detected by ELISA kits. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes of liver severity. The expression of Sirt5, Nrf2 and NF-κB in liver tissue was detected by Western blotting. **Results:** Compared with those in the normal control group, the liver weight and liver weight ratio of the model group were significantly increased; the pathological injury of liver was aggravated; the liver cells showed degeneration and necrosis; the levels of ALT, AST, AKP, TBA, MDA, TNF-α, IL-6 and IL-1β in plasma were significantly increased, while the levels of GSH and SOD were significantly decreased; NF-κB expression in ginsenoside Rg₁ high-dose group was obviously increased, while Sirt5 and Nrf2 expression were significantly decreased; all the index differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with those in the model group, the basic indexes of rats in the positive control group and ginsenoside Rg₁ groups were improved, the pathological damage of liver tissue was relieved, the levels of ALT, AST, AKP, TBA, MDA, TNF-α, IL-6 and IL-1β in plasma were significantly decreased, while the levels of GSH and SOD were significantly increased; NF-κB expression in ginsenoside Rg₁ high-dose group was significantly decreased, while Sirt5 and Nrf2 expression was obviously increased; all the index differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** Ginsenoside Rg₁ shows significant hepatoprotective activity in ANIT-induced cholestatic rats, which may be related to the activation of Sirt5/Nrf2 pathways and the down-regulation of NF-κB protein expression.

KEY WORDS Ginsenoside Rg₁; Cholestasis; Sirt5; Nrf2; NF-κB

通信作者: 贺敬波 Tel:(0755)27788311 E-mail:1193932026@qq.com

胆汁淤积是指多因素引起的肝内外胆汁生成、分泌和排泄发生障碍,导致胆汁不能正常流入肠道而重回血液循环的一种病理状态^[1]。胆汁淤积严重影响人们的生活水平,是肝功能衰竭和肝硬化的重要诱发因素,因其高发病率日益受到重视^[2]。目前,临床治疗胆汁淤积的一线药物熊去氧胆酸(UDCA)可治疗原发性胆汁性胆管炎(PBC),但仍有40%的患者疗效不佳,其疗效仅限于PBC的早期治疗^[3]。奥贝胆酸(OCA)可改善PBC患者的存活率和治疗UDCA不敏感的患者,但目前发现OCA存在皮肤瘙痒等不良反应^[3]。因此,寻找新的治疗胆汁淤积药物一直是近年来研究的热点。

我国传统中药材在治疗肝胆慢性疾病方面具有显著的优势。文献报道人参皂苷可以通过改善肝脏炎症和病理损伤,调控肝脏转运体,从而有效缓解胆汁淤积性肝损伤^[4],但具体的物质基础和药理机制尚未阐明。人参皂苷Rg₁是一种提取于人参属药材的四环三萜类皂苷。先前的研究发现,人参皂苷Rg₁具有抗氧化、抗凋亡和抗炎等作用,并且对药物性肝损伤、脂肪肝等肝脏疾病有显著的治疗效果^[5,6]。此外,人参皂苷Rg₁在四氯化碳(CCl₄)、脂多糖(LPS)等诱导的体内外模型中都具有明显的肝保护作用^[7,8]。然而其是否为人参皂苷缓解胆汁淤积性肝损伤的主要成分,以及如何发挥肝保护作用,目前仍未明确。

本研究采用α-萘异硫氰酸酯(ANIT)诱导胆汁淤积大鼠模型,通过给予人参皂苷Rg₁评价其对胆汁淤积的治疗作用,同时考察对沉默调节蛋白5(SIRT5)表达的影响,以期为人参皂苷Rg₁治疗胆汁淤积的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

DYY-6C型电泳仪(北京六一公司);Microfuge 26型高速离心机(Beckman Coulter公司);Enspire 13型酶标仪(PerkinElmer公司);TY-80A/S型脱色摇床(常州润华公司);AX-II型暗匣(广东粤华医疗器械厂有限公司);CP124C型电子天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司]。

人参皂苷Rg₁(西安汇林生物科技有限公司,批号:R-015-211014,纯度≥98%);ANIT(批号:STBV5588V)、UDCA(批号:20190612)购自阿拉丁试剂公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(批号:20190742)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(批号:20190722)、碱性磷酸酶(AKP)试剂盒(批号:20190713)、总胆汁酸(TBA,批号:120323)、谷胱甘肽

(GSH)试剂盒(批号:20190715)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号:20190645)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号:20190412)等均购自南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子(TNF-α)酶联免疫吸附剂测定(ELISA)试剂盒(批号:B16011350)、白细胞介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(批号:A22012489)和白细胞介素-1β(IL-1β)ELISA试剂盒(批号:L21021041)购自武汉华美生物工程有限公司;一抗:SIRT5(美国Abcam公司,批号:ab179677);核因子E2相关因子2(Nrf2,批号:L1612177)和核因子κB(NF-κB,批号:10443R)购自美国Affinity公司;β-actin(批号:T0012)和二抗Anti-rabbit IgG(批号:T7074)购自美国Cell Signaling Technology;4%多聚甲醛组织固定液(碧云天公司,批号:P0099)。

1.2 动物

SPF级SD大鼠,36只,雄性,体质量(200±10)g,由广东省实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2019-0035;适应性饲养1周,光照和黑暗各12 h交替进行,自由饮水。

1.3 方法

1.3.1 动物分组、建模及给药 将36只雄性SD大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组(UDCA,100 mg·kg⁻¹)及人参皂苷Rg₁低(10 mg·kg⁻¹)、中(20 mg·kg⁻¹)、高(40 mg·kg⁻¹)剂量组。各药物组分别灌胃给药,正常对照组和模型组给予等体积生理盐水,1次/d,连续给药5 d。实验第3天除正常对照组外,其余各组灌胃ANIT(80 mg·kg⁻¹)造模,正常对照组灌胃等量溶媒橄榄油。造模48 h后,记录大鼠体质量,收集血清和肝脏组织,进行后续指标检测。肝脏组织擦拭表面水分,称取质量,记录肝质量,计算肝质量比[肝质量(g)/大鼠体质量(kg)]。

1.3.2 血清生化指标检测 腹主动脉取血后,在4℃条件下以1360×g离心10 min,取上清液。采用酶标仪微板法测定血清中ALT、AST、AKP、TBA、GSH、SOD和MDA的含量。

1.3.3 ELISA检测炎症相关指标 按照说明书进行操作,采用酶标仪分析检测大鼠血清TNF-α、IL-6和IL-1β的水平。

1.3.4 HE染色 大鼠肝脏选取2 mm×2 mm大小部位,用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,4~6 μm切片,进行常规HE染色,正置白光显微镜下观察肝组织病理形态。

1.3.5 Western blot检测 称取大鼠肝组织约100 mg,加入RIPA细胞裂解液,提取总蛋白,按照

BCA 蛋白浓度检测试剂盒要求测定蛋白浓度。取等量蛋白(20 μg)经 SDS-PAGE 电泳分离,随后转移到 PVDF 膜。快速封闭液封闭 15 min,加入 SIRT5、Nrf2、NF-κB 和 β-actin(1:1 000)一抗,4℃过夜孵育,TTBS 洗膜后,使用二抗(1:2 500)孵育 1 h,洗膜后,使用 ELC 增强发光试剂显色,放置凝胶成像系统曝光,显影后观察结果。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 版软件对所有实验数据进行统计学分析,数据结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素分析(one-way ANOVA),组间两两比较均值应用 LSD-t 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,应用 GraphPad Prism 8.0 版软件绘制统计图。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠肝质量以及肝质量比的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠肝质量和肝质量比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,人参皂苷 Rg₁ 低剂量组大鼠肝质量和肝质量比变化不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$),中、高剂量组和阳性对照组大鼠肝质量和肝质量比明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);人参皂苷 Rg₁ 各剂量组和阳性对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠肝质量和肝质量比的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 (mg·kg ⁻¹)	肝质量(g)	肝质量比 (g·kg ⁻¹)
正常对照组	—	4.89±1.21	27.09±6.14
模型组	—	9.01±1.91 ^a	59.16±8.34 ^a
人参皂苷 Rg ₁ 低剂量组	10	8.14±1.39	51.31±4.97
人参皂苷 Rg ₁ 中剂量组	20	6.53±1.08 ^b	41.05±5.07 ^b
人参皂苷 Rg ₁ 高剂量组	40	5.53±0.98 ^b	36.12±7.64 ^b
阳性对照组	100	5.98±1.99 ^b	33.80±9.08 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠肝脏组织的形态结构的影响

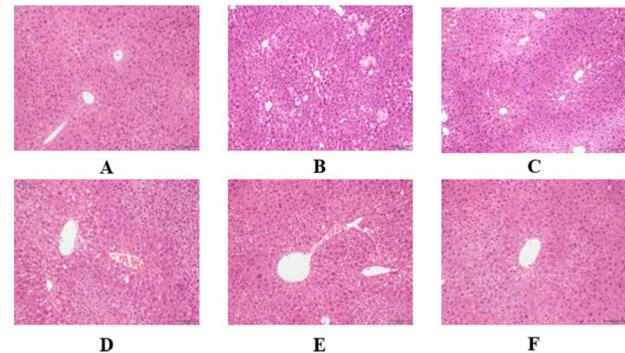
正常对照组大鼠肝细胞排列正常呈索状,无变性死亡,无炎性细胞浸润;与正常对照组比较,模型

表 2 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠血清 AST、ALT、AKP 和 TBA 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量(mg·kg ⁻¹)	ALT(U·L ⁻¹)	AST(U·L ⁻¹)	AKP(U·L ⁻¹)	TBA(μmol·L ⁻¹)
正常对照组	—	48.12±9.31	47.39±4.74	89.69±9.74	10.33±2.81
模型组	—	179.21±6.01 ^a	189.64±13.64 ^a	200.78±19.85 ^a	100.31±9.82 ^a
人参皂苷 Rg ₁ 低剂量组	10	161.47±10.14	159.46±10.27	179.85±11.23	90.58±9.21
人参皂苷 Rg ₁ 中剂量组	20	122.43±7.82 ^b	134.95±9.77 ^b	120.98±10.98 ^b	65.33±4.69 ^b
人参皂苷 Rg ₁ 高剂量组	40	91.23±5.48 ^b	89.12±8.44 ^b	85.96±8.02 ^b	20.89±5.26 ^b
阳性对照组	100	108.68±10.39 ^b	99.58±10.78 ^b	100.87±7.91 ^b	30.89±5.24 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

组大鼠肝细胞肝小叶结构紊乱,肝细胞出现脂肪变性,可见脂肪空泡形成,有明显炎性细胞浸润,出现变性死亡;与模型组比较,人参皂苷 Rg₁ 低剂量组大鼠仍可见脂肪变性和炎性浸润的肝细胞,人参皂苷 Rg₁ 中、高剂量组和阳性对照组大鼠肝细胞排列正常,肝小叶结构基本正常,无明显炎性浸润的肝细胞。见图 1。



A.正常对照组 B.模型组 C. 人参皂苷 Rg₁ 低剂量组
D. 人参皂苷 Rg₁ 中剂量组 E. 人参皂苷 Rg₁ 高剂量组
F.阳性对照组

图 1 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠肝脏组织病理学的影响(HE,200×)

2.3 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠血清生化指标的影响

与正常对照组比较,模型组的大鼠血清中肝功能酶学指标(AST、ALT 和 AKP)以及黄疸指标(TBA)均显著升高($P < 0.05$),表明 ANIT 诱导的胆汁淤积大鼠造模成功。与模型组比较,人参皂苷 Rg₁ 低剂量组的上述指标有下降的趋势,差异无统计学意义($P > 0.05$),人参皂苷 Rg₁ 中、高剂量组和阳性对照组上述指标均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);人参皂苷 Rg₁ 各剂量组与阳性对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.4 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠血清氧化损伤指标的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠血清抗氧化因子水平(GSH 和 SOD)明显下降,氧化应激产物MDA 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,人参皂苷 Rg₁ 低剂量组无明显变化,

差异无统计学意义($P>0.05$)，人参皂苷 Rg₁ 中、高剂量组和阳性对照组 GSH 和 SOD 水平升高，MDA 水平减少，差异有统计学意义($P<0.05$)；人参皂苷 Rg₁ 低剂量组 MDA 水平与阳性对照组相比，差异有统计学意义($P<0.05$)，其余各组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠血清 GSH、SOD 和 MDA 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 (kg·ml ⁻¹)	GSH (U·ml ⁻¹)	SOD (U·ml ⁻¹)	MDA (nmol·ml ⁻¹)
正常对照组	—	8.12±1.21	230.75±31.91	0.33±0.09
模型组	—	1.96±0.41 ^a	150.11±12.91 ^a	0.91±0.12 ^a
人参皂苷 Rg ₁ 低剂量组	10	4.93±1.02	171.02±13.42	0.81±0.11 ^c
人参皂苷 Rg ₁ 中剂量组	20	6.33±1.31 ^b	199.23±19.21 ^b	0.63±0.59 ^b
人参皂苷 Rg ₁ 高剂量组	40	7.06±2.18 ^b	210.36±20.08 ^b	0.39±0.16 ^b
阳性对照组	100	6.28±1.23 ^b	208.88±19.03 ^b	0.41±0.24 ^b

注：与正常对照组比较，^a $P<0.05$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$ ；与阳性对照组比较，^c $P<0.05$ 。

2.5 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠血清炎性因子的影响

与正常对照组比较，模型组大鼠血清炎性细胞因子(TNF-α、IL-6 和 IL-1β)的含量显著增加，差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较，人参皂苷 Rg₁ 低剂量组上述炎性因子含量差异无统计学意义($P>0.05$)，人参皂苷 Rg₁ 中、高剂量组和阳性对照组大鼠血清炎性因子 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量显著降低，差异有统计学意义($P<0.05$)；人参皂苷 Rg₁ 各剂量组与阳性对照组相比，差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 4 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠血清炎性细胞因子的影响(pg·ml⁻¹, $\bar{x}\pm s, n=6$)

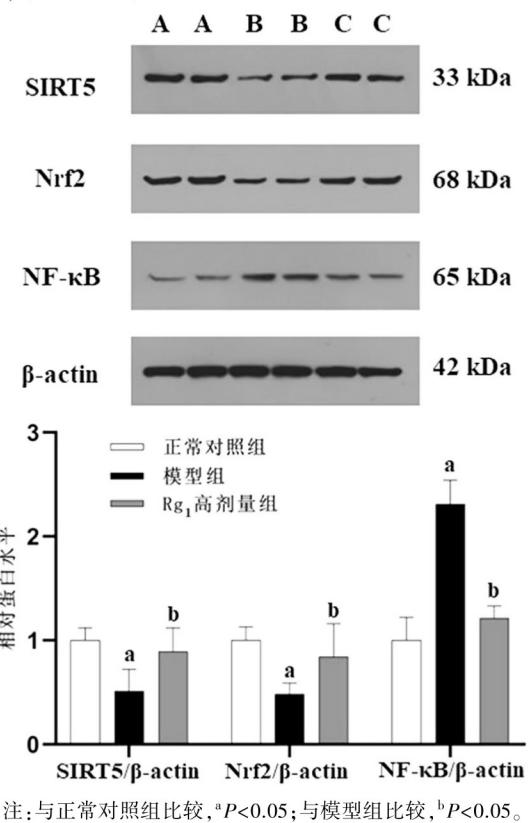
组别	剂量 (kg·ml ⁻¹)	TNF-α	IL-6	IL-1β
正常对照组	—	388.95±20.41	37.09±5.04	241.39±18.31
模型组	—	902.31±49.87 ^a	85.04±12.14 ^a	500.28±49.05 ^a
人参皂苷 Rg ₁ 低剂量组	10	700.96±80.24	75.26±10.07	429.75±31.36
人参皂苷 Rg ₁ 中剂量组	20	680.28±74.92 ^b	61.12±8.07 ^b	350.28±30.18 ^b
人参皂苷 Rg ₁ 高剂量组	40	511.23±89.08 ^b	49.02±5.14 ^b	295.06±12.92 ^b
阳性对照组	100	578.78±99.09 ^b	52.98±11.08 ^b	312.07±15.01 ^b

注：与正常对照组比较，^a $P<0.05$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$ 。

2.6 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠肝脏组织中 SIRT5、Nrf2 以及 NF-κB 蛋白表达的影响

与正常对照组比较，模型组大鼠肝组织 SIRT5 和 Nrf2 表达减少，而 NF-κB 表达增加，差异有统计

学意义($P<0.05$)；与模型组比较，人参皂苷 Rg₁ 高剂量组大鼠肝组织 SIRT5 和 Nrf2 表达明显增加，且 NF-κB 表达显著降低，差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。



注：与正常对照组比较，^a $P<0.05$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$ 。
A. 正常对照组 B. 模型组 C. 人参皂苷 Rg₁ 高剂量组

图 2 人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积大鼠肝组 SIRT5、Nrf2 和 NF-κB 蛋白表达的影响($n=6$)

3 讨论

胆汁淤积性肝损伤是由于多种因素导致的胆汁生成、代谢和流动障碍。活性氧和炎症细胞因子可破坏肝细胞和胆管细胞的分泌功能，可使胆汁生成障碍，最终导致胆汁淤积的发生^[9, 10]。中医学认为，胆汁淤积属“黄疸”范畴，具有“火热瘀滞”的特点，火热邪气熏肝胆致肝失疏泄，瘀热阻滞，胆汁不通而发黄。因此，中医常用清热利湿，活血化瘀、补血益气法治疗胆汁淤积^[11]。

人参是我国传统中药，现代医学发现人参可以增强肝脏的解毒和抗肝细胞损伤的作用。人参皂苷 Rg₁ 是人参的药效成分，具有造血、抗衰老和抗肿瘤等作用^[12]。有研究发现，人参皂苷 Rg₁ 可以改善酒精性肝病小鼠细胞凋亡水平，通过抑制氧化应激和炎症因子水平^[12]。此外，在肝纤维化小鼠模型中，人参皂苷 Rg₁ 通过抑制 NLRP3 炎症小体下调炎症水平，从而缓解肝细胞损伤^[13]。基于前期文献报道人参皂苷具有缓解胆汁淤积的效果，本文进一步考

察了人参皂苷 Rg₁对胆汁淤积大鼠的药效学和作用机制。

当肝脏功能异常时,会引起肝细胞破裂,从而增加细胞膜通透性,导致胞内大量 ALT、AST 和 AKP 进入血液循环,增加其在血液中的浓度^[14]。此外,TBA 在血液含量的升高是胆汁淤积肝损伤最直接指标^[15]。本研究结果表明,在 ANIT 处理 48 h 后,大鼠血清中 ALT、AST、AKP 和 TBA 水平显著上升,同时 HE 染色结果显示,肝细胞出现明显脂肪空泡、炎性浸润和细胞坏死,以上结果表明了 ANIT 诱导的胆汁淤积模型成功。而给予人参皂苷 Rg₁ 中、高剂量大鼠有效降低血清中上述 4 个指标的水平,与胆汁淤积一线药物 UDCA 效果相似,且肝组织病理结果也反映了人参皂苷 Rg₁ 中、高剂量组显著改善 ANIT 所致肝质量和肝质量比升高的现象,减少了肝细胞脂肪空泡、炎性浸润和细胞坏死的情况,与 UDCA 作用一致。因此判断人参皂苷 Rg₁ 是人参皂苷治疗胆汁淤积的重要物质基础之一。

氧化应激与胆汁淤积的发生发展密切相关,当体内活性氧水平失衡,产生过多氧自由基,会损伤肝细胞和胆管细胞分泌胆汁的功能^[16]。GSH 和 SOD 属于抗氧化酶体系,其水平减少表明机体受到氧化应激反应^[17]。本研究结果表明,ANIT 刺激后,血清中 GSH 和 SOD 水平明显减少,而给予人参皂苷 Rg₁ 中或高剂量后,两者水平逆转,表明人参皂苷 Rg₁ 具有抗氧化的作用。MDA 是非酶系统产生的氧化产物,其含量增加会引发脂质过氧化,通过反映体内脂质过氧化程度,间接表明机体遭自由基损伤的严重水平^[17]。本研究中,模型组中 MDA 水平显著升高,给予中或高剂量人参皂苷 Rg₁ 后 MDA 水平降低,进一步证明人参皂苷 Rg₁ 具有抗氧化功能。此外,Nrf2 是机体抗氧化应激的关键转录因子,当其被激活在细胞内积累并转入细胞核后,可诱导下游抗氧化基因的表达^[18]。本研究发现,给予人参皂苷 Rg₁ 高剂量可显著逆转 ANIT 所致 Nrf2 蛋白表达降低的现象。基于以上实验结果可说明人参皂苷 Rg₁ 保护胆汁淤积肝损伤可能与其抗氧化有关,但具体的机制还需进一步探讨。

炎症是胆汁淤积肝损伤的一个重要因素^[19]。其中 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 是主要的促炎细胞因子^[20]。先前有研究发现,人参总皂苷可以降低胆汁淤积大鼠肝组织中 TNF-α 等炎症因子水平^[4]。本研究发现中或高剂量人参皂苷 Rg₁ 组与模型对照组相比,可显著降低 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 含量。NF-κB 是与炎症直接相关的信号通路,可调控多种炎症

细胞因子的分泌^[21]。本研究发现,模型组 NF-κB 蛋白表达水平显著增加,给予人参皂苷 Rg₁ 高剂量后,可下调 NF-κB 的表达水平,说明人参皂苷 Rg₁ 可能通过减轻炎症水平,缓解肝损伤。

SIRT5 是 Sirtuin 家族的一员,具有多种酶促活性,其中包括 NAD⁺ 依赖性组蛋白脱乙酰基酶活性^[22]。有研究发现,在人类原发性肝细胞癌中 SIRT5 表达下调,SIRT5 缺乏的小鼠会导致体内胆汁酸水平大量增加,胆汁淤积的出现进一步促进了肿瘤的生长^[23]。本研究中发现,模型组中 SIRT5 表达显著降低,而给予人参皂苷 Rg₁ 后明显升高,说明人参皂苷 Rg₁ 可以调控 SIRT5 的表达。此外,有研究报道,Nrf2 与 NF-κB 的功能水平会受到 SIRT5 家族的调控^[24, 25]。亦文献证明,SIRT5 可以调控 Nrf2 的表达,激活 SIRT5 可以上调 Nrf2 的水平^[26]。综上表明,人参皂苷 Rg₁ 可能通过上调 SIRT5,从而增加 Nrf2 的表达并减少 NF-κB 表达,最终发挥对胆汁淤积性肝损伤的保护作用。

综上所述,人参皂苷 Rg₁ 对 ANIT 诱导的胆汁淤积大鼠具有良好的肝保护作用,该作用可能与激活 SIRT5 信号通路有关。深入研究人参皂苷 Rg₁ 对胆汁淤积的肝保护作用将为临床防治胆汁淤积肝损伤提供新的治疗思路。

参 考 文 献

- 汪佩文,董育玮. 胆汁淤积的定义、病因及分类[J]. 内科理论与实践,2022,17(1):15-23
- Teng J, Wickman L, Reilly M, et al. Population-based incidence and risk factors for cholestasis in hemolytic disease of the fetus and newborn[J]. J Perinatol, 2022, 42(6):702-707
- Farooqui N, Elhence A, Shalimar. A current understanding of bile acids in chronic liver disease[J]. J Clin Exp Hepatol, 2022, 12(1): 155-173
- Xu Y, Yu Z, Zhang C, et al. Protective effects of ginsenosides on 17α-ethynodiol-induced intrahepatic cholestasis via anti-oxidative and anti-inflammatory mechanisms in rats[J]. Am J Chin Med, 2017, 45(8):1613-1629
- Li G, Xie H, Cao X, et al. Ginsenoside Rg₁ exerts antiapoptotic effects on nonalcoholic fatty liver cells by downregulating the expression of SGPL1[J]. Mol Med Rep, 2022, 25(5): 178
- Zhang Z, Song Z, Shen F, et al. Ginsenoside Rg₁ prevents PTSD-like behaviors in mice through promoting synaptic proteins, reducing Kir4.1 and TNF-α in the hippocampus[J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(4): 1550-1563
- Yao Y, Li C, Qian F, et al. Ginsenoside Rg₁ inhibits microglia pyroptosis induced by lipopolysaccharide through regulating STAT3 signaling[J]. J Inflamm Res, 2021, 14:6619-6632
- Mo C, Xie S, Zeng T, et al. Ginsenoside-Rg₁ acts as an IDO1 inhibitor, protects against liver fibrosis via alleviating IDO1-mediated the

- inhibition of DCs maturation [J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153524
- 9 Zheng S, Cao P, Yin Z, et al. Apigenin protects mice against 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidin-induced cholestasis [J]. *Food Funct*, 2021, 12(5): 2323-2334
- 10 Irububieta P, Goikoetxea-Usandizaga N, Barbier-Torres L, et al. Boosting mitochondria activity by silencing MCJ overcomes cholestasis-induced liver injury [J]. *JHEP Rep*, 2021, 3(3): 100276
- 11 余丰, 梁飞立, 邓梅花, 等. 肝内胆汁淤积性肝病的中西医论治 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(9): 1019-1022
- 12 Yang C, He X, Zhao J, et al. Hepatoprotection by Ginsenoside Rg₁ in alcoholic liver disease [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92: 107327
- 13 Li Y, Zhang D, Li L, et al. Ginsenoside Rg₁ ameliorates aging-induced liver fibrosis by inhibiting the NOX4/NLRP3 inflammasome in SAMP8 mice [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(5): 801
- 14 Huang X, Chen S, Chen H, et al. ROC curve analysis of the sensitivity and specificity of biochemical detection of intrahepatic cholestasis during pregnancy [J]. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 2021, 225(4): 327-332
- 15 Xiong X, Ren Y, Cui Y, et al. Obeticholic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced liver injury and inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 1292-1298
- 16 Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review [J]. *CEBP*, 2008, 17(12): 3298-3305
- 17 Poprac P, Jomova K, Simunkova M, et al. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(7): 592-607
- 18 Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional regulation by Nrf2 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(17): 1727-1745
- 19 丁洁. 龙胆苦苷抗α-异硫氰酸萘酯所致大鼠急性肝损伤的作用机制研究 [J]. 中国药师, 2020, 23(11): 2133-2137
- 20 武小杰, 陈菁. N-乙酰半胱氨酸对慢性阻塞性肺疾病患者体内炎症水平的影响 [J]. 医药导报, 2019, 38(9): 1183-1187
- 21 Fernandez-Gonzalez A. TGF-β and NF-κB cross-talk: Unexpected encounters in the developing lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 64(3): 275-276
- 22 Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, et al. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle [J]. *Cell*, 2009, 37(3): 560-570
- 23 Sun RQ, Zhang ZY, Bao RX, et al. Loss of SIRT5 promotes bile acid-induced immuno [J]. *J Hepatol*, 2022, 77(2): 453-466
- 24 Arioz BI, Tastan B, Tarakcioglu E, et al. Melatonin attenuates LPS-induced acute depressive-like behaviors and microglial NLRP3 inflammasome activation through the SIRT1/Nrf2 pathway [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1511
- 25 Bagul PK, Deepthi N, Sultana R, et al. Resveratrol ameliorates cardiac oxidative stress in diabetes through deacetylation of NFκB-p65 and histone 3 [J]. *JNB*, 2015, 26(11): 1298-1307
- 26 Sun J, Cai J, Chen J, et al. Krüppel-like factor 6 silencing prevents oxidative stress and neurological dysfunction following intracerebral hemorrhage via sirtuin 5/Nrf2/HO-1 axis [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 646729

(2022-06-01 收稿 2022-06-16 修回)

基于 HPLC 指纹图谱和含量测定的菟丝子药材质量评价研究

王瑜婷 汪梅 何荣荣 黄醒鹏 许锦虎 余欣彤 张正 (广东一方制药有限公司 广东省中药配方颗粒企业重点实验室 广东佛山 528244)

摘要 目的: 建立菟丝子药材 HPLC 指纹图谱及绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷含量测定方法, 并结合化学计量学对不同产地菟丝子药材的质量进行全面评价。方法: 色谱柱: Waters Xselect HSS T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 360 nm; 柱温: 30 °C; 体积流量: 1.0 ml·min⁻¹。采用相似度评价、聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对24批菟丝子药材的HPLC指纹图谱进行研究, 并同时测定绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷的含量。结果: 建立了菟丝子药材 HPLC 指纹图谱, 24 批菟丝子药材的相似度均大于 0.9, CA 和 PCA 均将 24 批菟丝子药材聚为 5 类, OPLS-DA 将样品分为 4 类, 分别对应 4 个不同的产地, 并筛选出 3 个 VIP 值大于 1 的差异性成分; 内蒙古产地的两个酚酸类成分和两个黄酮类成分含量均值均最高。结论: 该方法能有效地分析不同产地菟丝子药材质量的差异性, 可为菟丝子药材的质量评价提供参考。

关键词 菟丝子; 高效液相色谱指纹图谱; 含量测定; 化学计量学; 酚酸类; 黄酮类

中图分类号: TQ460.7² **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-049X(2022)10-1723-06

DOI: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2022.10.006

Study on Quality Evaluation of Cuscutae Semen Based on HPLC Fingerprints and Content Determination

Wang Yuting, Wang Mei, He Rongrong, Huang Xingpeng, Xu Jinhu, Yu Xintong, Zhang Zheng (Guangdong Yi Fang Pharmaceutical Co Ltd, Guangdong Provincial Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Guangdong Foshan 528244, China)

ABSTRACT Objective: To establish the HPLC fingerprints and the content determination method for chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, hyperoside and isoquercitrin of Cuscutae Semen, and evaluate the quality of Cuscutae Semen from different producing areas.

基金项目: 广东省省级科技计划项目(编号:2018B030323004)

通信作者: 张正 Tel:17727303709 E-mail:524928277@qq.com