

达肝清对小鼠免疫性肝损伤的保护作用

周小雷¹, 王 硕¹, 邓家刚², 范丽丽², 袁经权¹

(1. 广西壮族自治区药用植物园 南方药物研究检测中心, 南宁 530023; 2. 广西中医学院, 南宁 530001)

摘要: 采用卡介苗(BCG)+脂多糖(LPS)造成免疫性肝损伤动物模型, 观察达肝清对小鼠血清 ALT、AST 活性及肝组织匀浆 SOD、MDA、GSH-PX 水平的影响, 并观察肝组织病理学改变。结果表明: 达肝清可明显降低小鼠血清中 ALT、AST 活性, 同时能减少肝匀浆 MDA 含量, 并能使降低的肝匀浆 SOD、GSH-PX 活性升高。该实验属首次报道。

关键词: 达肝清; 免疫性肝损伤; 保肝

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)06-0863-03

Protection of Daganqing on immunological liver injury of mouse

ZHOU Xiao-Lei, WANG Shuo, DENG Jia-Gang,
FAN Li-Li, YUAN Jing-Quan

(1. Southern Medicine Research Test Center, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China; 2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

Abstract: The models of hepatic damage of immunity were induced by BCG+LPS. The level of ALT, AST in serum, the activities of MDA, SOD, GSH-PX in liver homogenate, and the coefficient of liver were assayed. In addition, dimensions of hepatic damage in the histopathology were observed. We found that Daganqing could significantly decrease the serum transaminase activities and MDA content, and prevent the reduction of SOD, GSH-PX activities in liver homogenate. These experiments of the article were the first report for Daganqing.

Key words: Daganqing; immunological liver injury; hepatoprotection

肝炎是一种常见的严重危害人类健康的疾病, 肝炎损伤的病理生理过程, 不仅包括病毒的直接作用, 机体内免疫功能紊乱也起到关键作用, 因此调节肝炎患者异常的免疫功能, 将有助于改善病情, 阻止向慢性化发展。卡介苗(BCG)和脂多糖(LPS)尾静脉联合注射制造免疫性肝损伤模型, 是探讨肝炎免疫机制理想的模型, 近些年已被广泛采用(叶维法等, 1997)。达肝清是具广西特色的抗慢性乙型病毒性肝炎复方之一, 由三姐妹等药物组成, 有清热解毒、益气健脾、利湿等作用, 对 2215 细胞分泌的乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)有抑制作用, 对大、小鼠肝损伤具保护作用, 临床观察

达肝清对慢性乙型肝炎患者具有保肝降酶、抗乙肝病毒、提高免疫功能的作用(邓家刚等, 2004, 2007a, b, 2008)。本研究采用卡介苗(BCG)+脂多糖(LPS)造成免疫性肝损伤动物模型, 观察达肝清对小鼠免疫性肝损伤的影响, 为进一步研究抗乙肝病毒药物和其临床应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

(1)实验药物: 达肝清由三姐妹等药物组成(饮片由广西中医学院药学院鉴定室蔡毅副教授鉴定),

收稿日期: 2009-06-09 修回日期: 2009-10-20

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0235023-1); 广西科技创新能力与条件建设项目(桂科能 0630006-5A)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi(0235023-1); Scientific and Technological Innovation Capacity and Condition Development Program of Guangxi(0630006-5A)]

作者简介: 周小雷(1973-), 男, 河南邓州人, 硕士, 研究方向为天然药物活性成分研究与新药研发, (E-mail)zhouxilei123@163.com。

经水提(分2次提,第一次10倍量水,第二次8倍量水,合并提液,浓缩至比重约1.05),醇沉(水提液:95%乙醇=1:2,醇沉24h,弃去沉淀,回收乙醇),残液浓缩成浸膏(每1mL相当生药材4.17g,低温贮藏,用时用水稀释);联苯双酯,广州星群(药业)股份有限公司生产,批号CF40033。(2)动物:昆明种小鼠,体重(24±2)g,雌雄各半,清洁级,购于广西医科大学实验动物中心。(3)试剂:卡介苗(BCG),中国生物技术集团公司上海生物制品研究所生产,批号:2004060501;大肠杆菌脂多糖(LPS),Sigma公司产品;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。(4)仪器:CHEM300半自动生化分析仪(德国豪迈克公司),LG16-W离心机(北京医用离心机厂),JY92-2D超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究院),Agilent8453紫外可见分光光度计。

1.2 方法

(1)动物分组与处理:取昆明种小鼠60只,随机分组,设空白组、模型组、阳性对照组即联苯双酯组(600mg/kg水溶混悬液)、药物高、中、低剂量组(17.0、8.5、4.3g/kg)共6个组,每组10只。(2)用药方案:从造模后第1天起,按0.2mL/10g体重分别用联苯双酯和不同剂量的药物灌胃,每天1次,正常组与模型组每天灌服等体积的水,连续12d。(3)小鼠免疫性肝损伤动物模型的建立:除空白对照组外,其余5组小鼠均尾静脉每只注射0.2mL卡介苗(BCG)溶液(用生理盐水配置卡介苗溶液,每1mL约含 10^8 个活菌),12d后经尾静脉注射7 μ g脂多糖(LPS)生理盐水溶液,空白对照组同法尾静等量的生理盐水,禁食(自由饮水)10h后各组经眼球后静脉丛取血,处死小鼠后,取肝脏作有关检测(徐叔云等,2002;邓家刚等,2006,2007c)。(4)检测指标及方法:常规分离血清,按试剂盒所述方法用CHEM300半自动生化分析仪测定血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)(赖氏法)。取肝脏约0.5g,用冰冷的生理盐水漂洗,除去血液,滤纸拭干,称重,在冰浴的平皿上剪碎,用生理盐水配10%肝组织,用超声波细胞粉碎机匀浆,低温离心,按试剂盒说明书所述方法用Agilent8453紫外可见分光光度计测定肝匀浆中SOD、MDA、GSH-PX活性。另取肝左叶同一部位组织,10%甲醛固定,按常规方法制备切片,在光镜下进行病理学检查。(5)统计学

处理:各项数据均以 $\pm s$ 表示,组间差异用 t -检验。

2 结果

2.1 达肝清对免疫性肝损伤小鼠血清转氨酶的影响

模型组血清ALT、AST水平升高,与空白组相比较, $P<0.01$,说明模型建立成功;达肝清高、中、低剂量组均能显著降低小鼠血清中升高的ALT、AST活性,高、中剂量组与模型组比较, $P<0.01$;低剂量组与模型组比较, $P<0.05$;且高、中剂量组优于低剂量组,高、中剂量组与低剂量组比较, $P<0.05$,高、中剂量组间无统计学意义, $P>0.05$,其作用效果与联苯双酯相近,与阳性组比较, $P>0.05$ 。提示:达肝清各给药组对免疫性肝损伤小鼠肝脏均有一定的保护作用,使血清中ALT、AST活性向正常水平恢复,其中高、中剂量组作用较佳,明显优于低剂量组(表1)。

2.2 对免疫性肝损伤小鼠肝匀浆SOD、MDA、GSH-PX水平的影响

模型组肝匀浆MDA水平升高,同时SOD、GSH-PX活性降低,与空白组比较, $P<0.01$ 。达肝清高、中、低剂量组可以明显降低小鼠肝匀浆MDA的水平。均可以明显升高小鼠肝匀浆SOD、GSH-PX活性,高、中剂量组与模型组比较, $P<0.01$,低剂量组与模型组比较, $P<0.05$,提示:达肝清各给药组能减少免疫性肝损伤小鼠肝匀浆MDA含量,并能使降低的肝匀浆SOD、GSH-PX活性升高,达肝清有很好的抗脂质氧化作用,其护肝作用与抗脂质氧化有关(表2)。

2.3 小鼠肝脏病理组织学检查结果

小鼠肝脏组织病理形态学观察结果显示,空白组肝小叶结构正常,无肿胀,无明显水肿、脂肪变性;亦无坏死;肝小叶内及汇管区无炎细胞浸润、无纤维结缔组织增生(图版I:A);与正常组相比,模型组肝小叶结构紊乱不清,肝细胞明显肿胀,体积增大,广泛水肿变性及气球样变性,小区出现肝细胞片状坏死伴多量炎细胞浸润,汇管区大量炎细胞浸润及明显纤维结缔组织增生,说明模型建立成功(图版I:B);联苯双酯组和达肝清高、中剂量组均无明显坏死,高剂量组肝细胞稍有轻微水肿外,大部分肝细胞结构正常(图版I:C,D,E),低剂量组肝细胞仍见肿胀,大片水肿变性、胞浆疏松,偶见气球样变性,灶性坏死及炎细胞浸润(图版I:F)。提示:达肝清对免

表 1 达肝清对免疫性肝损伤小鼠血清 ALT、AST、匀浆 SOD、MDA、GSH-PX 的影响
Table 1 Effects of daganqing on serum ALT,AST and on liver homogenate SOD,MDA,GSH-PX of immunological liver injured mice ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	n	剂量 Dose (g/kg)	ALT (KarU)	AST (KarU)	SOD (U/mg. prot)	MDA (nmol/mg. prot)	GSH-PX (U/mg. prot)
空白组 Blank	10	—	39.092±5.950	45.349±8.822	168.708±13.008	8.192±2.239	227.699±27.070
模型组 Model	10	—	66.573±7.477**	88.900±18.123**	69.506±9.838**	21.676±4.904**	159.968±20.636**
联苯双酯组 Bifendate	10	0.6	45.122±8.649▲▲	58.839±9.750▲▲	133.650±12.586▲▲	12.146±2.805▲▲	214.455±14.524▲▲
高剂量组 High-dose	10	17.0	44.967±5.285▲▲*	64.941±8.890▲▲*	114.683±37.527▲▲	14.662±2.355▲▲	187.091±15.239▲▲
中剂量组 Moderate-dose	10	8.5	47.711±6.692▲▲*	65.583±6.502▲▲*	95.745±19.699▲▲	14.436±4.615▲▲	183.862±15.163▲▲
低剂量组 Low-dose	10	4.3	59.423±3.618▲△	71.621±14.256▲△	84.567±15.041▲	14.912±4.843▲	177.280±13.947▲

与空白组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$; ▲▲ $P < 0.01$; 与高、中剂量组比较 ▲ $P < 0.05$; 与联苯双酯组比较: * $P > 0.05$ 。

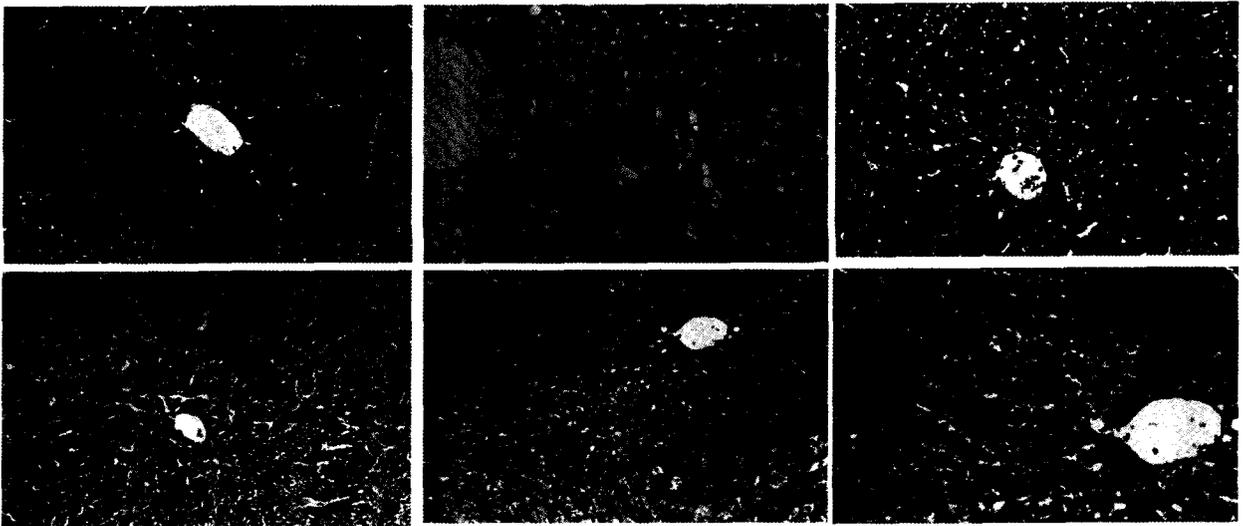


图 1 达肝清对小鼠免疫性肝损伤的组织学观察 A. 空白对照组($\times 20$); B. 模型组($\times 20$); C. 联苯双酯组($\times 20$); D. 高剂量组($\times 20$); E. 中剂量组($\times 20$); F. 剂量组($\times 20$)。

Fig. 1 Histological observation of the immunological liver injury in mice treated with Daganqing A. Control group($\times 20$); B. Model group($\times 20$); C. Bifendate group($\times 20$); D. High-dose group($\times 20$); E. Moderate-dose group($\times 20$); F. Low-dose group ($\times 20$)

疫性肝损伤有保护作用。

3 讨论

免疫性肝损伤动物模型,接近人类肝炎发生的病理生理过程,是筛选和研究保肝药物较为理想的模型之一,预先给小鼠注射卡介苗可使多核中粒细胞或巨噬细胞聚集于肝,继后再用低剂量大肠杆菌脂多糖攻击注射,可激发这些细胞释放对肝细胞有毒性作用的多种免疫效应分子(如自由基等),自由基过度释放,可导致肝细胞内脂质过氧化反应的发生,造成脂质过氧化产物的积累而损伤肝细胞,造成免疫性肝损伤

(陈琼仁,1993;Wang 等,1995;Zhang 等,2002)。

卡介苗(BCG)与脂多糖(LPS)联用可引起小鼠血清中 ALT、AST 明显升高,肝组织可见散在细胞变性坏死,说明本实验所建立的免疫性肝损伤模型成功;该模型肝细胞浆脂质过氧化产物 MDA 明显升高,表明肝细胞内脂质过氧化是本模型的重要终末肝损伤机制,达肝清各剂量组能减轻模型鼠肝脏的病理损伤;高、中剂量组能使血清中 ALT、AST 活性向正常水平恢复,其作用效果与联苯双酯组相近,明显优于低剂量组;能降低肝细胞浆 MDA,升高肝损伤小鼠肝细胞浆内 SOD、GSH-Px 的活性,可见抗肝细胞内脂(下转第 787 页 Continue on page 787)

- 甄汉深,莫缓恒,周燕园,等. 2007. 青天葵化学成分定性鉴别的实验研究[J]. 广西中医学院学报,10(1):53-55
- 朱华,傅鹏,黄秋洁,等. 2006. 青天葵与毛叶青天葵紫外光谱鉴别[J]. 广西中医药,29(5):59-60
- Du Q(杜勤), Wang JH(王俊华), Wang ZH(王振华), et al. 2005. Analysis of the constituents of volatile oil from *Nervilia fordii*(青天葵挥发油化学成分分析)[J]. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med*(广州中医药大学学报),22(3):225-227
- Du Q(杜勤), Ye MR(叶木荣), Wang ZH(王振华), et al. 2006. Pharmacological study on antitussive and antiasthmatic actions of *Nervilia fordii*(青天葵镇咳、平喘药理作用研究)[J]. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med*(广州中医药大学学报),23(1):45-47
- Hu TS(胡廷松), Li TZ(黎廷芝), He J(何俊). 1988. Research on *Nervilia fordii* from wild plant into domestic cultivation—I. Observation of the biological character(青天葵野生变家栽的探讨—I. 生物学特性的观察)[J]. *Guihaia*(广西植物),8(3):263-267
- Ling ZZ(凌征柱), Liang XJ(梁学金), Pan SF(潘素芬), et al. 1998. Study on inducing multiple corm and cespititious seedling of *Nervilia fordii*(青天葵诱导多球茎及丛生苗的研究)[J]. *Seed*(种子),5(5):35-36
- Ling ZZ(凌征柱). 2001. Survey on the cultivation and chemical composition study about *Nervilia fordii*(青天葵的栽培及其化学成分研究概况)[J]. *J Guangxi Acad Sci*(广西科学院学报),17(1):24-26
- Liu XC(刘心纯). 1996. Identification of 2 kinds of medicinal materials "Qing-tian-kui"(两种青天葵的鉴定研究)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材),19(12):612-615
- Liu Y(刘演), Ning SJ(宁世江). 2002. Status quo and evaluation of natural resources of emphasis protective wilding plants in Guangxi(广西重点保护野生植物资源的现状与评价)[J]. *Guangxi Sci*(广西科学),9(2):124-132
- Mei QX(梅全喜). 2008. Advance in the research of chemical constituents pharmacologic action and clinical application of *Nervilia fordii*(青天葵的化学成分药理作用与临床应用研究进展)[J]. *Chin Archives Trad Chin med*(中华中医药学刊),26(10):2239-2241
- Pan XF(潘学峰), Fu SQ(符式钦), Dai WD(戴卫端). 2001. In-vitro culture of *Nervilia fordii* leaves and plant regeneration(青天葵叶片离体培养及植株再生)[J]. *Nat Sci J Hainan Univ*(海南大学学报自然科学版),19(4):358-362
- Shen XL(沈晓琳), Huang YL(黄永林), Ruan J(阮俊). 2007. Investigation on the plant resources of genus *Uvaria* in Guangxi(广西紫玉盘属植物资源调查)[J]. *Guihaia*(广西植物),27(6):886-888
- Wu QH(吴庆华), Ling ZZ(凌征柱), Lu YM(陆永梅). 2001. Study on cultivation of tissue cultured corms Qingtiankui(中药青天葵组培球茎栽培的研究)[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药),12(10):958-959
- Zhen HS(甄汉深), Zhou YY(周燕园), Yuan YF(袁叶飞), et al. 2007. Studies on the chemical constituent of the ethyl acetate portion of *Nervilia fordii*(青天葵乙酸乙酯部位化学成分的研究)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材),30(8):942-945
- Zhen HS(甄汉深), Zhou YY(周燕园), Yuan YF(袁叶飞), et al. 2007. Study on anticancer effect *in vivo* of active fraction from *Nervilia fordii*(青天葵活性部位的体内抗肿瘤作用研究)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材),30(9):1095-1098

(上接第 865 页 Continue from page 865)

质过氧化是其抗免疫性肝损伤的重要机制之一。

参考文献:

- 邓家刚,覃文慧,涂燕云,等. 2007b. 达肝清抗乙肝病毒、降酶及调节免疫功能临床观察[J]. 广西中医药,30(1):13-15
- 叶维法,钟振义. 1997. 肝病免疫学[M]. 天津:天津科学技术出版社,109-110
- 陈琼仁. 1993. 自由基与肝损伤[M]//郑荣梁. 自由基生命科学进展(第1集). 北京:原子能出版社,14
- 徐叔云,卞如濂,陈修. 2002. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,1349
- Deng JG(邓家刚), Zheng ZW(郑作文), Wang Q(王勤), et al. 2004. Effects of eight different compound chinese medical prescriptions on HBsAg and HBeAg excreted by 2215 C(八个中药复方对 2215 细胞 HBsAg 和 HBeAg 分泌的影响)[J]. *Guangxi Trad Chin Med*(广西中医药),27(4):42-47
- Deng JG(邓家刚), Li XJ(李学坚), Qin ZL(覃振林). 2006. Effects of the extract from *Syzygium jambos* seeds on hypoglycemic model of mice(蒲桃仁提取物降血糖作用的实验研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),26(2):214-216
- Deng JG(邓家刚), Zheng ZW(郑作文), Wang Q(王勤), et al. 2007a. Protective effects of Daganqing on chronic liver injury by CCl₄ in rats(达肝清对四氯化碳所致大鼠慢性肝损伤的保护作用)[J]. *Pharm Clinics Chin Mat Medica*(中药药理与临床),23(2):54-57
- Deng JG(邓家刚), Zheng ZW(郑作文), Wang Q(王勤), et al. 2008. Protective effects of Daganqing on chronic liver injury by CCl₄ in rats(达肝清对小鼠急性肝损伤的保护作用)[J]. *Pharm Clinics Chin Mat Medica*(中药药理与临床),24(3):98-99
- Deng JG(邓家刚), Zhou CY(周程燕), Zheng ZW(郑作文). 2007c. Acute toxicity and protective effects of alcohol extract from *Prismatomeris tetrandra* on experimental liver injury in mice(黄根醇提取物对小鼠实验性肝损伤保护作用的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),27(6):941-943
- Wang GS, Liu GT. 1995. Role of nitric oxide in immunological liver damage in mice[J]. *Biochem Pharmacol*,49:1271
- Zhang GL, Wang YH, Ni W, et al. 2002. Hepatoprotective role of ganoderma lucidum polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice[J]. *World Gastroenterol*,8(4):728-733