

狗蚁草乙酸乙酯提取物对 CCl₄ 所致肝纤维化小鼠的保护作用

曹思思, 郑作文*

(广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**探究狗蚁草乙酸乙酯提取物对四氯化碳(CCl₄)所致肝纤维化小鼠的保护作用。**方法:**将昆明种小鼠 90 只随机分为正常组, 模型组, 秋水仙碱组(0.2 mg·kg⁻¹), 狗蚁草乙酸乙酯提取物高剂量组(40 g·kg⁻¹), 中剂量组(20 g·kg⁻¹), 低剂量组(10 g·kg⁻¹)。除正常组外, 给予各组小鼠 *ih* 四氯化碳(CCl₄), 1 次/3 d, 连续 8 周, 造成小鼠肝纤维化模型, 造模同时, 给予各组小鼠相应药物 *ig* 给药, 1 次/d, 连续 8 周。第 8 周末, 检测各组小鼠血清丙氨酸氨基-转氨酶(ALT), 天门冬氨酸氨基转氨酶(AST)活性和肝组织丙二醛(MDA), 羟脯氨酸(Hyp), I 型胶原蛋白(Col I), III 型胶原蛋白(Col III), IV 型胶原蛋白(Col IV), 转化生长因子-β₁(TGF-β₁), 血小板衍生因子(PDGF)含量, 制作肝组织 HE 染色和 MASSON 染色病理切片, 观察切片并进行评分。**结果:**与正常组比较, 模型组小鼠血清 ALT, AST 活性和肝组织 MDA, Hyp, Col I, Col III, Col IV, TGF-β₁, PDGF 含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 肝组织炎症、坏死明显, 肝脏胶原蛋白增多; 与模型组比较, 狗蚁草乙酸乙酯提取物可降低 CCl₄ 所致肝纤维化小鼠血清 ALT, AST 活性和肝组织 MDA, Hyp, Col I, Col III, Col IV, TGF-β₁, PDGF 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$), 减轻肝组织炎症、坏死等病理改变, 减少肝脏胶原蛋白的增生。**结论:**狗蚁草乙酸乙酯提取物对 CCl₄ 所致的肝纤维化小鼠有保护作用。

[关键词] 狗蚁草; 肝纤维化; 四氯化碳

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0119-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015240119

Protective Effect of Ethyl Acetate Extract of *Alysicarpus vaginalis* on CCl₄-induced Hepatic Fibrosis in Mice

CAO Si-si, ZHENG Zuo-wen* (Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of ethyl acetate extract of *Alysicarpus vaginalis* DC on CCl₄-induced hepatic fibrosis in mice. **Method:** The 90 Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, Colchicine group (0.2 mg·kg⁻¹), high-, mid-, and low-dose (the equivalent crude drug dosage were 40, 20, 10 g·kg⁻¹) ethyl acetate extract of *A. vaginalis* groups. Except the normal group, mice in other groups received CCl₄, once every 3 d for continuous 8 weeks to establish hepatic fibrosis models. The mice were also treated by the corresponding drug once everyday for 8 weeks through intragastric administration. At the end of week 8, levels of ALT, AST in serum and the content of MDA, Hyp, Col I, Col III, Col IV, TGF-β₁, and PDGF were detected. HE staining in liver tissues and MASSON pathological sections were done to observe and evaluate the sections. **Result:** Compared with the normal group, ALT and AST in serum and the content of MDA, Hyp, Col I, Col III, Col IV, TGF-β₁, and PDGF in liver tissues were significantly higher in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and liver tissue inflammation, necrosis, hepatic collagen were increased. Compared with the model group, the ethyl acetate extract of *A. vaginalis* decreased ALT and AST in serum and the content of MDA, Hyp, Col I, Col III, Col IV, TGF-β₁, and PDGF in liver tissues in CCl₄-induced hepatic fibrosis mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The ethyl acetate extract of *A. vaginalis* has protective effect on CCl₄-induced hepatic fibrosis in mice.

[Key words] *Alysicarpus vaginalis*; hepatic fibrosis; CCl₄

[收稿日期] 20150122(021)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2013GXNSFAA019112)

[第一作者] 曹思思, 硕士, 从事中药药理研究, Tel:15871447338, E-mail:494143413@qq.com

[通讯作者] * 郑作文, 教授, 主要从事中药药理研究, E-mail: zzw_nn@163.com

狗蚁草为豆科植物链荚豆的全草,别名山土豆、假花生、大青叶等,狗蚁草味甘、苦,性凉,具有活血通络,接骨消肿,清热解毒功效。主治跌打骨折,筋骨酸痛,外伤出血,疮疡溃烂久不收口,腮腺炎,慢性肝炎。肝纤维化是各种致病因素作用于肝脏,导致肝细胞损伤,引起一系列应答反应,致使肝脏细胞外基质(ECM)合成增加与降解减少,细胞外基质过度沉积,进而出现肝脏纤维化^[2-3]。本项目前期研究表明狗蚁草乙酸乙酯提取物含药血清能抑制肝纤维化细胞模型肝星状细胞(HSC-T6)的增殖,提示其可能有抗肝纤维化活性^[1],本实验进一步研究狗蚁草乙酸乙酯提取物体内的抗肝纤维化作用。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雌雄兼用,体重(20±2)g,由广西中医药大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(桂)2014-0004。

1.2 药物及试剂 狗蚁草由广西中医药大学药用植物教研室韦松基教授鉴定为豆科植物链荚豆 *Alysicarpus vaginalis* 的全草。秋水仙碱(北京索莱宝科技有限公司,批号 C8190),四氯化碳(CCl₄,分析纯,广东西陇化工厂,批号 20111130),丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(南京建成试剂有限公司,批号 20140303),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(南京建成试剂有限公司,批号 20140303),甲醛溶液(分析纯,成都市科龙化工试剂厂,批号 2013112201),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20140722),羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20140724),小鼠 I 型胶原(Col I),Col II,Col III,Col IV 试剂盒(美国 R&D 公司,批号 20140502B),小鼠 TGF-β₁ 试剂盒(美国 R&D 公司,批号 20140502B),小鼠血小板源性生长因子(PDGF)试剂盒(美国 R&D 公司,

批号 20140502B)。

1.3 仪器 EPOCH 型酶标仪(美国 BIO-TEK 公司),Sorval ST16 型离心机(美国 Thermo Fisher 公司),BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司),UV-1800 型紫外分光光度计(日本岛津公司),明澈-D 24 UV 型超纯水仪(法国默克密理博公司)。

2 方法

2.1 狗蚁草乙酸乙酯提取物对 CCl₄ 所致的肝纤维化小鼠的保护作用 取小鼠 90 只,随机分为 6 组,分别为正常组、模型组、秋水仙碱组(0.2 mg·kg⁻¹)、狗蚁草乙酸乙酯提取物高、中、低剂量(相当于生药量 40,20,10 g·kg⁻¹),模型组 20 只小鼠,其余每组 14 只。除正常组外,其余各组小鼠背部 *ih* 25% CCl₄ 花生油溶液,2 mL·kg⁻¹,1 次/3 d,连续 8 周^[4]。造模同时正常组和模型组小鼠给予蒸馏水 *ig*,其余各组小鼠给予相应药物 *ig* 给药,给药体积为 20 mL·kg⁻¹,1 次/1 d,连续 8 周。末次给药 1 h 后摘眼球取血,分离血清,取小鼠肝脏,按试剂盒方法测定血清 ALT,AST 和肝组织 MDA,Hyp,Col I,Col III,Col IV,TGF-β₁,PDGF 含量,另取肝脏右叶浸入 4% 甲醛溶液中,制作 HE 染色和 MASSON 染色病理切片。显微镜下观察病理切片。

2.2 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AST,ALT 活性和肝组织 MDA,Hyp 含量的影响 狗蚁草乙酸乙酯提取物高、中剂量组小鼠血清 AST,ALT 活性和肝组织 MDA,Hyp 含量低于模型组($P < 0.05, P < 0.01$);狗蚁草乙酸乙酯提取物低剂量组小鼠血清 AST,ALT 活性和肝组织 Hyp 含量低于模型组($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 狗蚁草乙酸乙酯提取物对肝纤维化小鼠血清 AST,ALT 活性和肝组织 MDA,Hyp 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

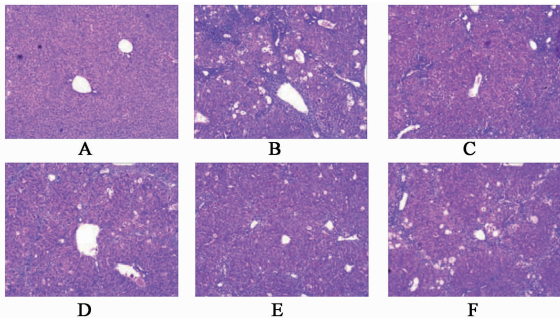
Table 1 Effects of ethyl acetate extract of *Alysicarpus vaginalis* on activity of ALT and AST in serum and content of MDA, Hyp of liver of mice with CCl₄-induced hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	MDA/nmol·g ⁻¹	Hyp/mg·g ⁻¹
正常	-	14	29.8±4.5	31.5±4.5	186.1±9.5	0.93±0.12
模型	-	16	539.7±41.4 ⁴⁾	277.3±42.6 ⁴⁾	225.7±30.1 ⁴⁾	1.15±0.15 ⁴⁾
秋水仙碱	0.000 2	14	489.6±32.5 ²⁾	149.1±20.2 ²⁾	187.5±18.1 ²⁾	0.95±0.13 ²⁾
狗蚁草乙酸乙酯提取物	40	14	496.0±32.4 ²⁾	166.7±23.9 ²⁾	197.2±21.3 ²⁾	0.98±0.12 ²⁾
	20	13	498.5±38.9 ¹⁾	175.4±23.6 ²⁾	201.8±21.3 ¹⁾	1.00±0.14 ¹⁾
	10	12	510.1±25.4 ¹⁾	212.4±38.7 ²⁾	216.0±24.4	0.99±0.11 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 1~2 同)。

3.2 对肝组织病理学改变的影响

3.2.1 肝脏组织 HE 染色病理切片观察结果 正常组肝小叶结构清晰完整,肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列,汇管区结构正常,只有一只小鼠出现少量点状坏死。模型组肝小叶结构破坏严重,肝索和肝窦结构不清晰,门管区界板炎症和门管区炎症严重,出现多发性门管区-中心静脉(P-C)桥接。秋水仙碱阳性组肝小叶和汇管区结构完整,部分区域出现 3 区坏死但并未见门管区-中心静脉(P-C)桥接,部分门管区出现轻度炎症,整体病变程度明显轻于模型组。乙酸乙酯提取物高剂量组肝小叶汇轻度紊乱,大多数区域出现 3 区坏死,门管区界板出现轻微碎片状坏死,整体病变程度明显轻于模型组。乙酸乙酯提取物中剂量组肝小叶结构紊乱,大多数区域出现 3 区坏死,部分门管区出现中等炎症,整体病变程度轻于模型组。乙酸乙酯提取物低剂量组肝小叶结构严重紊乱,门管区界板炎症和门管区炎症严重,并出现门管区-中心静脉(P-C)桥接,整体病变程度与模型组接近。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 秋水仙碱组; D. 狗蚁草乙酸乙酯提取物 40 g·kg⁻¹组; E. 狗蚁草乙酸乙酯提取物 20 g·kg⁻¹组; F. 狗蚁草乙酸乙酯提取物 10 g·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 狗蚁草乙酸乙酯提取物对 CCl₄ 所致肝纤维化小鼠肝组织病理改变的影响(HE, ×160)

Fig. 1 Effects of ethyl acetate extract of *Alysicarpus vaginalis* on pathological sections of liver in mice with CCl₄-induced hepatic fibrosis (HE, ×160)

3.2.2 肝脏组织 Masson 染色病理切片观察结果 正常组中央静脉和导管内皮有少量正常结构纤维,其他地方无异常纤维增生。模型组门管区纤维增生严重,门管与门管之间及门管与中央静脉之间出现明显的纤维桥连。秋水仙碱阳性组部分肝小叶内存在少量分散的增生纤维。狗蚁草乙酸乙酯提取物高、中剂量组在界板区存在少量纤维,纤维增生程度明显轻于模型组。狗蚁草乙酸乙酯低剂量组门管区出现严重的纤维增生,门管与门管之间及门管与

中央静脉之间有明显的纤维桥连,纤维增生程度与模型组接近。见图 2。

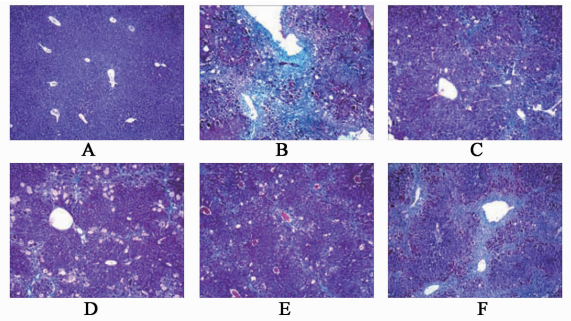


图 2 狗蚁草乙酸乙酯提取物对 CCl₄ 所致肝纤维化小鼠肝组织胶原蛋白增生的影响(Masson, ×160)

Fig. 2 Effects of ethyl acetate extract of *Alysicarpus vaginalis* on collagen boosting complex of liver in mice with CCl₄-induced hepatic fibrosis (Masson, ×160)

3.3 对 Col I, Col III, Col IV, TGF-β₁, PDGF 含量的影响 与模型组比较,狗蚁草乙酸乙酯提取物高剂量组肝脏组织 Col I, Col III, Col IV, TGF-β₁, PDGF 含量低于模型组(P < 0.05, P < 0.01),狗蚁草乙酸乙酯提取物中剂量组肝脏组织 Col I, Col IV, TGF-β₁, PDGF 含量低于模型组(P < 0.05, P < 0.01),狗蚁草乙酸乙酯提取物低剂量组肝脏组织 Col I, Col III, Col IV, TGF-β₁, PDGF 含量与模型组比较无统计学差异。见表 2。

4 讨论

选择一种与人类肝纤维化发病相似的动物模型是研究肝纤维化以及筛选防治肝纤维化药物的重要基础。CCl₄ 是一种细胞毒性物质,对肝脏具有选择性,进入体内后,被肝脏细胞中的微粒体氧化酶代谢成氯自由基和三氯甲基自由基,可以与细胞内的生物大分子和细胞膜反应,造成肝细胞损伤和坏死,长期反复的损伤诱导肝纤维化的产生^[5]。CCl₄ 造成的肝纤维化模型与人类肝纤维化疾病特征相似,呈现出阶段性的病理改变,具有很好重复性,而且简单、易行、耗时短,所以被广泛使用^[6]。CCl₄ 经肝脏代谢生成的自由基使细胞膜脂质发生过氧化生成 MDA,MDA 会使生命大分子产生交联聚合,导致细胞变性坏死,加重肝脏损伤,促使肝脏进一步纤维化^[7]。Hyp 是人体中的一种非必需氨基酸,除少量(约 1%)存在于弹性蛋白中外,其余所有的 Hyp 都在胶原蛋白中,所以 Hyp 可以反映胶原蛋白的含量,进而反映肝脏纤维化的程度^[8]。肝脏内主要含有 I, III 和 IV 型胶原蛋白,这 3 种胶原蛋白的含量反映着肝纤维化的病情发展^[9-11]。PDGF 可以促进

表 2 狗蚁草乙酸乙酯提取物对 CCl₄ 所致肝纤维化小鼠肝脏组织 Col I, Col III, Col IV, TGF-β₁, PDGF 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of ethyl acetate extract of *Alysicarpus vaginalis* on activity of Col I, Col III, Col IV, TGF-β₁, PDGF in liver of mice with CCl₄-induced hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	Col I/μg·g ⁻¹	Col III/μg·g ⁻¹	Col IV/μg·g ⁻¹	TGF-β ₁ /μg·g ⁻¹	PDGF/ng·g ⁻¹
正常	-	14	8.5 ± 0.9	3.49 ± 0.15	13.3 ± 0.8	25.4 ± 2.2	6.1 ± 0.6
模型	-	16	9.2 ± 0.8 ³⁾	3.70 ± 0.17 ⁴⁾	14.3 ± 0.7 ⁴⁾	27.3 ± 2.9 ³⁾	6.9 ± 0.3 ⁴⁾
秋水仙碱	0.000 2	14	8.7 ± 0.7 ¹⁾	3.59 ± 0.12 ¹⁾	13.6 ± 0.7 ¹⁾	25.2 ± 2.6 ¹⁾	6.2 ± 0.5 ²⁾
狗蚁草乙酸乙酯提取物	40	14	8.6 ± 0.7 ¹⁾	3.56 ± 0.20 ¹⁾	13.7 ± 0.7 ¹⁾	25.1 ± 2.5 ¹⁾	6.5 ± 0.3 ²⁾
	20	13	8.3 ± 1.0 ²⁾	3.54 ± 0.24	13.6 ± 0.8 ¹⁾	23.7 ± 2.2 ²⁾	6.4 ± 0.3 ²⁾
	10	12	8.9 ± 0.8	3.64 ± 0.12	14.0 ± 0.9	26.6 ± 2.9	6.8 ± 0.4

肝星状细胞的活化、增殖,促进 I 型, III 型胶原蛋白的分泌,还可以影响 MAPK, PI3-K, Ras/ERK, JAK/STAT 等肝纤维化信号通路从而促进肝纤维化的发展^[12-13]。TGF-β₁ 是激活肝星状细胞的细胞因子之一, TGF-β₁ 促进肝星状细胞分泌胶原蛋白,抑制金属蛋白酶的活性从而减少 ECM 的降解,还通过调节细胞周期和影响其他细胞因子的表达使肝纤维化进一步加重^[14]。实验结果表明狗蚁草乙酸乙酯提取物可以通过降低 CCl₄ 所致肝纤维化小鼠肝组织细胞因子 TGF-β₁, PDGF 含量,降低肝组织 Col I, Col III, Col IV 含量,减少胶原蛋白增生,减轻肝脏炎症、坏死,从而对 CCl₄ 所致的肝纤维化小鼠产生保护作用。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草第 4 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:4. 326.
 [2] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis[J]. J Hepatol, 1995,22(6):696-699.
 [3] Aleolado R, Arthur M J, Iredale J P. Pathogenesis of liverfibrosis[J]. Clin Sci,1997,92(2):103-109.
 [4] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2006:1135.
 [5] Vogel H G, Vogel W H. Carbon tetrachloride induced fibrosis in rats[J]. Pharmacological Assays, 1997:531-532.

[6] 姜辉,夏伦祝,李颖,等. 三七总皂苷对肝纤维化大鼠基质金属蛋白酶-13 及其抑制因子-1 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2013,38(8):1206-1210.
 [7] Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis; role of oxidative stress[J]. Mol Aspects Med, 2000, 21(3):49-98.
 [8] Okuno H, Hazama H, Murase T, et al. Drug metabolizing activity in rats with chronic liver injury induced by carbon tetrachloride; Relationship with the content of hydroxyproline in the liver[J]. Jpn J Pharmacol, 1986, 41:363-371.
 [9] 赵雪梅,曹学征. IV 型胶原蛋白和层黏蛋白及透明质酸对肝纤维化的诊断价值[J]. 实用医技杂志,2006, 13(17):3012-3013.
 [10] 朱净,潘亮,许晶,等. 瘦素及 I 和 III 型胶原蛋白在肝纤维化大鼠肝组织中的变化[J]. 基础医学与临床, 2012,32(10):1224-1225.
 [11] 康丽华. 胶原蛋白与肝纤维化[J]. 中国疗养医学, 2006,15(6):417-419.
 [12] 陈莲香,舒建昌. PDGF 与肝纤维化关系的研究新进展[J]. 胃肠病学和肝脏病学,2011,20(1):95-98.
 [13] Knittel T, Mehde M, Grundmann A, et al. Expression of matrix Metallo-proteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat [J]. Histochem Cell Biol, 2000,113:443-453.
 [14] 党宝宝,张杰,褚筱玫. TGF-β₁ 在肝纤维化发生发展中作用的研究进展[J]. 青海医学院学报,2011,32(3):211-214.

[责任编辑 周冰冰]