

# 狗肝菜不同相对分子质量多糖对 *D*-GlaN 致大鼠急性肝损伤的保护作用

赵沁元, 崔红花, 吴洁莹, 尹永芹, 沈志滨\*

(广东药学院中药学院, 广州 510006)

**[摘要]** 目的:探讨狗肝菜不同相对分子质量多糖对大鼠 *D*-半乳糖胺(*D*-GlaN)致急性肝损伤的保护作用。方法:采用透析的方法将狗肝菜多糖分为 <6 kD, >6 kD <10 kD(6 kD ~ 10 kD), >10 kD, 以及总多糖组。*D*-GlaN(500 mg·kg<sup>-1</sup>) ip 诱导大鼠急性肝损伤模型, 动物处死后测定血清中天冬氨酸转氨酶(AST), 丙氨酸转氨酶(ALT)活性, 制备肝组织匀浆测定其中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)含量, 取肝、脾脏称重, 计算脏器指数, 对数据进行统计分析, 并观察大鼠肝脏组织形态学变化。结果:与模型组比较, 狗肝菜总多糖和相对分子质量 <6 kD 给药组能显著降低大鼠血清中 AST, ALT 活性( $P < 0.01$ ); 各给药组均能降低肝匀浆 MDA 含量( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 均能有效升高肝组织匀浆中 GSH-Px 活性( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 降低肝脏指数( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 减轻肝脏病理损伤。结论:狗肝菜各多糖给药组均有一定保肝作用, 且以相对分子质量 <6 kD 效果最佳。

**[关键词]** 狗肝菜多糖; *D*-半乳糖胺; 急性肝损伤

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0261-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013130261

## Protective Effects of Different Molecule Weight Range of *Dicliptera chinensis* Polysaccharide against *D*-GlaN-induced Acute Liver Injury in Rats

ZHAO Qin-yuan, CUI Hong-hua, WU Jie-ying, YIN Yong-qin, SHEN Zhi-bin\*

(Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study evaluated the hepatoprotective activity of different molecule weight range of *Dicliptera chinensis* polysaccharide (DCP) against *D*-galactosamine (*D*-GlaN) -induced hepatotoxicity in SD rats. **Method:** DCP was divided into three parts according to the semipermeable membrane with different molecular weight cutoff (MWCO) using dialysis. Mw <6 kD, Mw 6 kD-10 kD, Mw >10 kD and DCP were studied on *D*-GlaN-induced (500 mg·kg<sup>-1</sup> intraperitoneally) hepatic damage in rats. Liver coefficient, serum enzymes as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), hepatic tissue index malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and histopathological Changes in liver architecture including necrosis and swelling of hepatic cells were detected. **Result:** Compared with the model group, pretreated with DCP and Mw <6 kD polysaccharide significantly prevented the increases of alanine ALT and AST level in serum, each group can prevented MDA accumulation, GSH-Px depletion in liver tissue, and hepatocyte swelling and necrosis. **Conclusion:** The results indicate that DCP can protect against *D*-GlaN-induced acute liver injury in rats, and the most active part is the range of molecular weight left than 6 kD.

**[Key words]** *Dicliptera chinensis* polysaccharide; *D*-galactosamine; acute liver injury

**[收稿日期]** 20130322(001)

**[基金项目]** 科技部“十二五”重大新药创制(2011ZX09102-007-03);广东省科技计划项目(2010B030700044, 2011A030100013);广州市科技计划项目(12A062131631);2010年广东省教育厅高层次人才项目

**[第一作者]** 赵沁元, 硕士, 主要从事中药药效物质基础及质量控制研究, Tel:13751704018, E-mail: qinyuanzhao0626@163.com

**[通讯作者]** \* 沈志滨, 教授, 博士, 主要从事中药药效物质基础、复方制剂质量控制研究和新药研发, E-mail: szb8113@126.com

狗肝菜来源于爵床科狗肝菜属植物狗肝菜 (*Dicliptera chinensis* L. Ness) 的干燥全草,主产于广东、广西、福建、台湾等我国南方地区,功能清热解毒、凉血止血、生津、利尿。常用于感冒发热,暑热烦渴、乳蛾、疔疮、便血、尿血、小便不利等症<sup>[1]</sup>。狗肝菜最早见载于民国时期萧步丹的《岭南采药录》:“梗青色、叶象杏仁、性寒凉、散热。有本地羚羊之称。凡觉热气盛,肝火重,服之甚有功效”<sup>[2]</sup>。之后各地方本草药物志均有记载,直至 2004 年,广东省食品药品监督管理局首次将狗肝菜编入《广东省中药材标准》,正式把狗肝菜列入地方中药标准。其主要含有多糖、有机酸、氨基酸等物质<sup>[3]</sup>。

张小玲等<sup>[4,5]</sup>研究表明狗肝菜多糖能减轻 D-GalN/LPS 诱导的肝损伤作用,对 D-半乳糖胺所致大鼠急性肝损伤具有保护作用。本实验采用半透膜透析的方法将狗肝菜多糖按照相对分子质量大小进行分组,采用 D-GlaN 致大鼠急性肝损伤,探索其有效部位。

## 1 材料

**1.1 动物** 70 只健康清洁级雄性 SD 大鼠,体重 (200 ± 20) g,由广东省实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(粤)2008-0002。

**1.2 药物** 狗肝菜购于广州市清平市场,经广东药学院刘基柱教授鉴定为正品。药材粉碎成粗粉,以 1:10 及 1:8 热水提取 2 次,醇沉,sevge 除蛋白,得总多糖。取适量自制狗肝菜总多糖,蒸馏水溶解,将截留相对分子质量为 6 kD 的半透膜制成透析袋,25 ℃,3 次 × 3 h,合并透析液,醇沉,真空干燥,即得相对分子质量 < 6 kD 多糖,得率为总多糖的 40%;按上述方法,制得相对分子质量 6 kD ~ 10 kD 部位,得率为总多糖的 30%;相对分子质量 < 10 kD 多糖,得率为总多糖的 30%。

**1.3 试剂** 联苯双酯滴丸(北京协和制药厂生产,批号 10120102);D-GlaN(南京嘉源医药科技有限公司,批号:2011112801);天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒,丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒,丙二醛(MDA)试剂盒,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒,总蛋白检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20111224, 20111228, 20111227, 20111227, 20111228)。

## 2 方法

**2.1 动物模型的建立** 各组大鼠灌胃给药 1 次/d,共 7 d,正常组与模型组给等体积蒸馏水。末次给药 1 h 后,除正常对照组腹腔注射等体积蒸馏水外,其

余各组分别 ip D-GlaN (500 mg·kg<sup>-1</sup>),造模后禁食不禁水。24 h 后处死大鼠取血清和肝组织,进行生化指标和病理组织检测。

**2.2 动物分组及给药** 70 只 SD 大鼠,随机分为 7 组,每组 10 只,分别为:正常组、模型组、联苯双酯组 (100 mg·kg<sup>-1</sup>)、狗肝菜总多糖(总多糖组,300 mg·kg<sup>-1</sup>)、相对分子质量 < 6 kD (< 6 kD 组,120 mg·kg<sup>-1</sup>)、相对分子质量 6 kD-10 kD (6 kD-10 kD 组,90 mg·kg<sup>-1</sup>) 和相对分子质量 > 10 kD (> 10 kD 组,90 mg·kg<sup>-1</sup>),各个给药组均相当于生药量 37.5 g。各组给药剂量按生药 g·kg<sup>-1</sup> 计算(给药体积 10 mL·kg<sup>-1</sup> 体重),连续给药 7 d,正常对照组和模型组给予等量的水。

## 2.3 指标检测

**2.3.1 血清 ALT,AST 活性测定** 各组大鼠处死后眼眶取血,3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 分离血清,收集上清,按照试剂盒标注的方法(赖氏法)测定 ALT,AST 活性。

**2.3.2 脏器系数测定** 取动物肝脏,脾脏,称重,计算脏器指数,脏器指数 = 脏器质量(mg)/体重(g)。

**2.3.3 肝组织中 GSH-Px 活力和 MDA 含量测定** 选肝脏右叶在冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,称重,加适量的冰生理盐水,制备 10% 组织匀浆,4℃ 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上清液,按试剂盒说明书测定待测肝组织 GSH-Px(嘌呤氧化酶法)和 MDA(硫代巴比妥酸法)。组织总蛋白含量用 BCA 法测定。

**2.4 肝脏病理性检查** 取新鲜肝脏右小叶置于 10% 中性福尔马林固定液中,脱水,包埋,切片,HE 染色,进行病理组织学检查。

**2.5 统计学分析** 统计学采用 SPSS 17.0 软件,实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 狗肝菜多糖对 D-半乳糖胺所致大鼠急性肝损伤血清的 AST 和 ALT 的影响** 与正常组比较,模型组大鼠血清 AST 及 ALT 活性显著升高,差异具有统计学意义 (*P* < 0.01)。与模型组比较,联苯双酯组、总多糖及 < 6 kD 组大鼠血清 AST 及 ALT 活性均显著降低 (*P* < 0.01),6 kD ~ 10 kD 和 > 10 kD 组大鼠血清 AST 及 ALT 活性与模型组比较无明显差异。见表 1。

**3.2 肝脾系数** 与正常组比较,模型组大鼠肝脾系数增加,并存在显著性差异 (*P* < 0.01),脾脏系数无

表 1 狗肝菜不同相对分子质量多糖对 D-GlaN 所致大鼠急性肝损伤血清的 AST 和 ALT 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>
正常	-	1.027 ± 0.37	6.35 ± 1.21
模型	-	3.54 ± 0.35 <sup>1)</sup>	14.02 ± 2.13 <sup>1)</sup>
联苯双酯	100	1.04 ± 0.24 <sup>3)</sup>	8.42 ± 1.78 <sup>2)</sup>
总多糖	300	1.53 ± 0.75 <sup>3)</sup>	8.25 ± 1.34 <sup>3)</sup>
<6 kD	120	1.47 ± 0.93 <sup>3)</sup>	6.98 ± 1.13 <sup>3)</sup>
6 kD ~ 10 kD	90	3.12 ± 0.47	13.25 ± 0.69
>10 kD	90	3.04 ± 0.80	8.73 ± 1.31 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型对照组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,  
<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

明显差异。与模型组比较,对照组及各给药组的肝脏系数均有统计学差异( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),其中总多糖组、<6 kD, >10 kD 组具有显著性差异( $P < 0.01$ ),各给药组脾脏系数无明显差异。见表 2。

表 2 狗肝菜不同相对分子质量多糖对 D-GlaN 所致大鼠急性肝损伤肝脾系数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	肝脏系数 /%	脾脏系数 /%
正常	-	3.01 ± 2.46	24.76 ± 0.34
模型	-	3.83 ± 3.91 <sup>1)</sup>	21.45 ± 0.39
联苯双酯	100	3.23 ± 3.6 <sup>2)</sup>	21.44 ± 0.28
总多糖	300	3.32 ± 2.78 <sup>3)</sup>	22.47 ± 0.31
<6 kD	120	3.23 ± 3.17 <sup>3)</sup>	20.69 ± 0.37
6 kD~10 kD	90	3.35 ± 2.79 <sup>2)</sup>	18.55 ± 0.27
>10 kD	90	3.14 ± 2.93 <sup>3)</sup>	20.83 ± 0.32

**3.3 狗肝菜不同相对分子质量多糖对 D-GalN 所致大鼠急性肝损伤肝组织 MDA 含量, GSH-Px 活力的影响** 腹腔注射 D-GlaN 后,模型组与正常对照组比较,大鼠肝匀浆中的 MDA 含量明显升高,有极显著差异( $P < 0.01$ ),GSH-Px 活力明显降低,有极显著差异( $P < 0.01$ )。与模型组相比,各给药组均能明显降低肝匀浆中的 MDA,升高肝匀浆中的 GSH-Px 活力( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结果见表 3。

**3.4 狗肝菜不同相对分子质量多糖对肝损伤大鼠肝脏病理组织学的影响** 光镜下可见正常对照组大鼠肝组织结构正常,肝索排列规则,肝小叶结构完整,未见肝细胞变性、坏死,无炎症细胞浸润(图 1 A)。模型组肝小叶结构模糊,肝索排列紊乱,胞浆疏松,可见肝细胞肿胀、汇管区周围细胞大量坏死(图 1 B)。阳性对照组肝小叶较完整,肝组织间可

表 3 狗肝菜多糖对 D-半乳糖胺所致大鼠急性肝损伤肝组织 MDA 含量, GSH-Px 活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	MDA /nmol·mg <sup>-1</sup>	GSH-Px /U·mg <sup>-1</sup>
正常	-	2.83 ± 0.54	329.60 ± 40.23
模型	-	4.97 ± 1.79 <sup>1)</sup>	216.84 ± 19.46 <sup>1)</sup>
联苯双酯	100	3.17 ± 0.75 <sup>3)</sup>	245.62 ± 17.32 <sup>3)</sup>
总多糖	300	2.96 ± 0.33 <sup>3)</sup>	275.27 ± 54.22 <sup>3)</sup>
<6 kD	120	2.79 ± 0.56 <sup>3)</sup>	259.00 ± 17.78 <sup>3)</sup>
6 kD ~ 10 kD	90	3.39 ± 0.52 <sup>2)</sup>	243.14 ± 30.30 <sup>2)</sup>
>10 kD	90	3.20 ± 0.55 <sup>3)</sup>	237.81 ± 24.91 <sup>2)</sup>

见炎性细胞浸润,肝细胞变性、坏死较模型组明显减轻(图 1 C)。各多糖给药组肝脏病理切片可见不同程度的炎性细胞浸润较少,肝细胞肿胀度下降,肝细胞变性、坏死及炎症反应均不同程度地轻于模型组(图 1 D ~ 1 G)。

#### 4 讨论

D-GlaN 所致中毒性肝损伤模型,动物肝组织病理学改变与人类病毒性肝炎相似,所以 D-GlaN 肝损伤模型是目前研究病毒性肝炎发病机制及保肝药物筛选的经典动物模型<sup>[6]</sup>。其中毒机制是 D-Gla 进入体内后与磷酸尿苷(UDP)结合以形成 UDP-半乳糖胺,致使磷酸尿苷耗竭,从而使依赖其生物合成的核酸、蛋白质、脂糖等物质合成受抑制,限制了细胞器及酶的生成和补充,细胞器受损、细胞膜损害、钙离子内流入细胞,从而造成肝细胞损伤<sup>[7]</sup>。

肝细胞损伤时,其胞质液成分 ALT,AST 释放,血清 ALT,AST 活性增高,且其活性的高低在一定范围内可反映肝细胞损伤程度的大小<sup>[8]</sup>。MDA 是脂质过氧化降解的主要产物,MDA 能使膜蛋白、酶发生交联反应,使膜通透性增加,导致细胞膜结构、功能和代谢发生改变,对机体造成损害,其含量反映了组织脂质过氧化损伤程度<sup>[9-10]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是存在于机体内的自由基清除系统,具有抗氧化能力,属于防御系统酶类,在维持机体活性氧代谢的平衡中起重要作用<sup>[11]</sup>。

实验结果表明,狗肝菜多糖能抑制肝损伤大鼠肝组织中 GSH-Px 活力以及肝脏指数的下降和 MDA 含量的升高,并能抑制肝损伤大鼠血清中 ALT,AST 活性的升高,改善肝组织损伤程度。表明狗肝菜多糖对 D-半乳糖胺诱导大鼠急性化学性肝损伤有明显的保护作用,其机制可能与抗脂质过氧化有关。

本研究将狗肝菜多糖按照相对分子质量分段,

