

乙肝清对小鼠急性肝损伤的保护作用

吕纪华, 邓聿胤, 刘瑛, 王丽, 覃良
(广西中医药研究院, 南宁 530022)

[摘要] 目的:研究乙肝清对小鼠急性肝损伤的保护作用。方法:健康小鼠随机分为正常对照组、模型组、联苯双酯组(200 mg·kg⁻¹)、乙肝清高、中、低剂量组生药(30, 15, 7.5 g·kg⁻¹), 每组10只, 分别灌胃给药, 每天1次, 连续10 d。分别采用四氯化碳(CCl₄)和D-氨基半乳糖(D-GalN)致小鼠急性肝损伤模型, 检测各组动物血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的活性, 观察肝组织的病理改变。结果:在CCl₄肝损伤实验中, 乙肝清中、高剂量能显著降低血清ALT水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 乙肝清高剂量还可降低血清AST水平($P < 0.05$), 明显地改善肝脏的病理损伤;在D-GalN肝损伤实验中, 乙肝清高剂量能显著降低血清ALT, AST水平($P < 0.05$), 显著改善肝脏病理损伤。结论:乙肝清对小鼠急性肝损伤有明显的保护作用。

[关键词] 乙肝清; 急性肝损伤; 四氯化碳; D-氨基半乳糖; 丙氨酸氨基转移酶; 天门冬氨酸氨基转移酶
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0253-04

Protective Effects of Yiganqing on Acute Hepatic Injury in Mice

LV Ji-hua, DENG Yu-yin, LIU Ying, WANG Li, QIN Liang

(Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China)

[收稿日期] 20120811(001)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划课题(桂科攻0815005-1-14)

[第一作者] 吕纪华, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理研究, Tel:0771-5869102, E-mail:ljhhappy@yahoo.com.cn

HA与Col IV, 还有其他机制参与, 尚待研究。

[参考文献]

- [1] 陈华圣, 许爱华, 项晓人, 等. 扶正抗癌冲剂抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 1995, 6(1):27.
- [2] 翟范, 陈华圣. 中药扶正抗癌方治疗中、晚期消化道肿瘤160例临床观察[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 1997, 5(2):67.
- [3] 陈华圣, 许爱华, 王正兵, 等. 双苓扶正抗癌胶囊对小鼠肝癌的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(1):45.
- [4] 陈华圣, 许爱华, 任莉, 等. 双苓扶正抗癌制剂对HL-60细胞的体外实验研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12):2426.
- [5] 陈华圣, 陈钢, 许爱华, 等. 双苓扶正抗癌制剂对胃癌细胞端粒酶活性及P53蛋白表达的研究[J]. 中药材, 2006, 29(12):1326.
- [6] Chen H S, Chen J, Cui D L, et al. Effects of a Shuangling Fuzheng anticancer preparation on the proliferation of SGC-7901 cells and immune function in a

cyclophosphamide-treated murine model [J]. World J Gastroenterology, 2007, 13(48):6575.

- [7] 杜琴, 胡兵, 沈克平. 抗癌中药配伍研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):232.
- [8] 郭炜, 董文亮, 李坤星. 桑黄云芝胶囊对Lewis肺癌自发肺转移模型小鼠的抑瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4):128.
- [9] 陈华圣, 许爱华, 崔德利, 等. 抗肿瘤中医治法与方药现代研究[M]. 北京:中国中医药出版社, 2007:330.
- [10] 聂建华, 孙世发. 基于方剂数据分析的“脾气虚证”与“脾胃气虚证”方药配伍规律比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):253.
- [11] 堀井明范. 尿道恶性肿瘤的生物反应调节剂(第4报):汉方方剂, 尤其是六君子汤引起荷瘤机体免疫功能的变化[J]. 日本东洋医学杂志, 1993, 43(5):105.
- [12] 苏延峰, 马景德, 胡国友. 六神丸与六君子汤对荷瘤小鼠的抑瘤效果及鼠存活时间的影响[J]. 实用医药杂志, 2004, 21(5):442.

[责任编辑 李玉洁]

[Abstract] **Objective:** To study the protective effects of Yiganqing on acute hepatic injury in mice. **Method:** The healthy mice were divided into six groups at random, ten in each group; normal control group, model group, Bifendate group, Yiganqing high, middle and low dose group ($30, 15, 7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of crude drug, respectively). The mice in treatment groups were intragastric administration respectively, meanwhile, the mice in normal control and model groups were treated with the same dose of distilled water, once a day for ten days. The models of liver injury induced by Carbon tetrachloride and *D*-galactosamine in mice were used. The activities of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined, and the pathological change of liver tissue was observed. **Result:** In the mouse models induced by Carbon tetrachloride, the level of ALT in serum of rats in the middle dose group and the high dose group of Yiganqing was reduced significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The level of AST in serum of rats in the high dose group of Yiganqing was reduced significantly ($P < 0.05$). And the liver pathological injury was alleviated obviously. In the mouse models induced by *D*-galactosamine, the levels of ALT and AST in serum ($P < 0.05$) could be reduced significantly in the high dose group of Yiganqing and protect the liver from pathological injury. **Conclusion:** Yiganqing has protective effects on acute hepatic injury in mice.

[Key words] Yiganqing; acute hepatic injury; Carbon tetrachloride; *D*-galactosamine; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase

乙肝清是根据广西壮族民间验方经筛选后进行研制的中药制剂,由鬼针草、虎杖、赤芍、广金钱草等中草药组成,具有清热利湿解毒、活血散瘀定痛的功效,用于急、慢性乙型肝炎(湿热熏蒸证)。临床研究结果表明,本品使用安全,疗效确切。本研究采用四氯化碳(CCl_4)和 *D*-氨基半乳糖(*D*-GalN)致小鼠急性肝损伤模型,研究乙肝清对小鼠急性肝损伤的保护作用,为进一步开发乙肝清提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,体重(20 ± 2)g,雌雄各半,广西医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(桂)2009-0002。

1.2 药物与试剂 将方中中药用水煎煮提取 2 次,合并滤液,浓缩干燥得浸膏,备用;联苯双酯滴丸,广州星群(药业)股份有限公司,批号 IF40072。 CCl_4 ,北京化工厂出品;*D*-GalN, Sigma 公司,丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒,长春汇力生物技术有限公司,批号 2011051。天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒,长春汇力生物技术有限公司,批号 2011026。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 722 型分光光度计(上海分析仪器厂);sw-261-79 型电热恒温水浴箱(上海医疗器械厂);DP-20 数码摄像系统(日本奥林巴斯株式会社)。

2 方法

2.1 对 CCl_4 致小鼠急性肝损伤的影响^[1] 取健康小鼠 60 只随机分为 6 组,每组 10 只,分别为正常对照组、模型组、联苯双酯组($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、乙肝清

高、中、低剂量组(含生药)($30, 15, 7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),分别灌胃给药,1 次/d,给药体积 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,正常对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水,连续 10 d。于末次给药 1 h 后,除正常对照组腹腔注射 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的花生油以外,其余各组均腹腔注射 0.1% CCl_4 花生油溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,禁食不禁水 16 h 后全部小鼠摘眼球取血,离心,分离血清,按试剂盒方法检测 ALT 和 AST 活性。取肝左叶相同部位的一小块肝组织固定于 10% 福尔马林溶液中,进行常规病理切片,HE 染色,镜下观察病理改变。

2.2 对 *D*-GalN 致小鼠急性肝损伤的影响^[2] 分组及给药方法同 2.1,于末次给药 1 h 后,除正常对照组给予等体积生理盐水外,其余各组均腹腔注射 *D*-GalN $700 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,禁食不禁水,24 h 后小鼠摘眼球取血,离心,分离血清,按试剂盒方法检测 ALT 和 AST 活性。采血后剖取肝左叶相同部位的一小块肝组织于 10% 福尔马林液中固定,常规切片,HE 染色,镜下观察病理改变。

2.3 统计学处理 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, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 对 CCl_4 致小鼠急性肝损伤的影响 由表 1 可知, CCl_4 模型组小鼠血清 ALT,AST 活性明显高于正常对照组($P < 0.01$),表明造模成功。乙肝清中、高剂量组、联苯双酯组 ALT 较模型组均有显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),乙肝清高剂量组、联苯双酯

组 AST 较模型组显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示乙肝清对 CCl_4 造成的急性肝损伤有一定的保护作用。

表 1 乙肝清对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠血清 ALT,AST 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT	AST
正常对照	-	57.41 \pm 10.85 ²⁾	89.63 \pm 11.03 ²⁾
模型	-	203.66 \pm 24.56	235.15 \pm 20.76
乙肝清	7.5	191.60 \pm 19.43	227.96 \pm 14.52
	15	175.48 \pm 22.61 ¹⁾	220.18 \pm 18.20
	30	160.86 \pm 27.02 ²⁾	211.65 \pm 15.60 ¹⁾
联苯双酯	0.2	147.37 \pm 29.31 ²⁾	204.72 \pm 20.46 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对 D -GalN 致小鼠急性肝损伤的影响 由表 2 可知, D -GalN 模型组小鼠血清 ALT,AST 活性明显高于正常对照组 ($P < 0.01$),表明造模成功。乙肝清高剂量、联苯双酯可明显降低小鼠血清 ALT,AST 的水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示乙肝清对 D -GalN 造成的急性肝损伤有一定的保护作用。

3.3 病理组织学观察

3.3.1 对 CCl_4 致肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响 光镜下可见正常对照组小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞未见明显异常。 CCl_4 模型组小鼠肝小叶结构破坏,中央静脉周围大量肝细胞变性,肝细胞点状坏死、碎屑样坏死多见,炎性细胞浸润严重。乙肝清高剂量组和联苯双酯组少数肝细胞变性,少量炎性细胞浸润,肝小叶内少数点状坏死,偶见碎屑状坏死,病变程度与模型组比较明显减轻。乙肝清中剂

量组部分肝细胞变性,可见炎性细胞浸润,散在点状坏死及碎屑状坏死。乙肝清低剂量组大量肝细胞变性,点状坏死及碎屑状坏死较多,炎性细胞浸润明显。见图 1。

3.3.2 对 D -GalN 致肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响 光镜下可见正常对照组小鼠肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝小叶结构完整,肝细胞未见变性、坏死。 D -GalN 模型组小鼠肝小叶内大量肝细胞水肿,局部出现点状坏死,伴有炎性细胞浸润。乙肝清高剂量组和联苯双酯组部分肝细胞水肿,偶见炎性细胞浸润,未见点状坏死灶。乙肝清中、低剂量组肝细胞水肿明显,散在点状坏死灶,伴有炎性细胞浸润。见图 2。

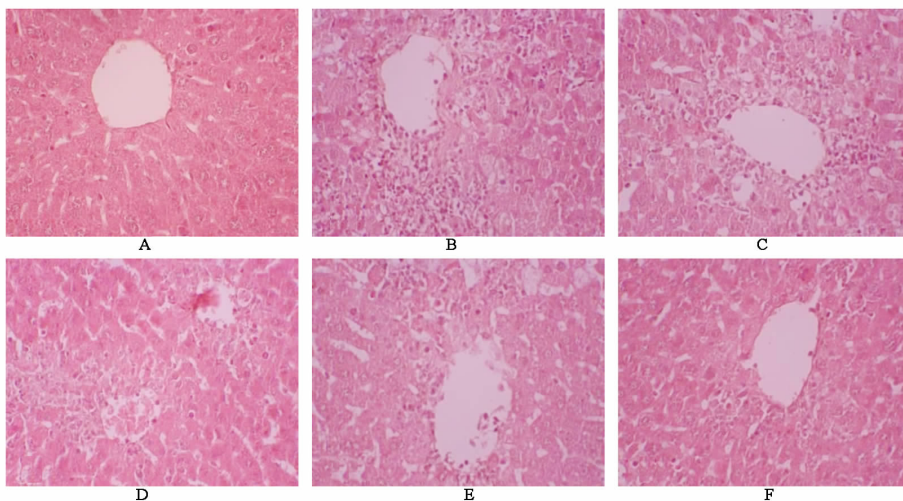
表 2 乙肝清对 D -GalN 致急性肝损伤小鼠血清

ALT,AST 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT	AST
正常对照	-	45.83 \pm 10.34 ²⁾	67.38 \pm 8.37 ²⁾
模型	-	151.54 \pm 23.17	160.07 \pm 20.39
乙肝清	7.5	142.45 \pm 25.06	156.25 \pm 17.43
	15	134.21 \pm 18.89	145.92 \pm 17.71
	30	122.00 \pm 22.25 ¹⁾	140.09 \pm 18.57 ¹⁾
联苯双酯	0.2	107.91 \pm 24.43 ²⁾	134.41 \pm 16.51 ²⁾

4 讨论

肝损伤是指在一系列理化因素的作用下,肝细胞发生不同程度的肿胀、变性、坏死和凋亡,是各种肝病发生发展的最基本的病理状态^[3]。 CCl_4 诱导的肝损伤模型是经典的化学性肝损伤动物模型。本实验结果显示, CCl_4 模型组血清 ALT 和 AST 水平较正



A. 对照组;B. 模型组;C. 乙肝清 7.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. 乙肝清 15 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. 乙肝清 30 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;F. 联苯双酯 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 乙肝清对 CCl_4 致肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响(HE 染色, $\times 400$)

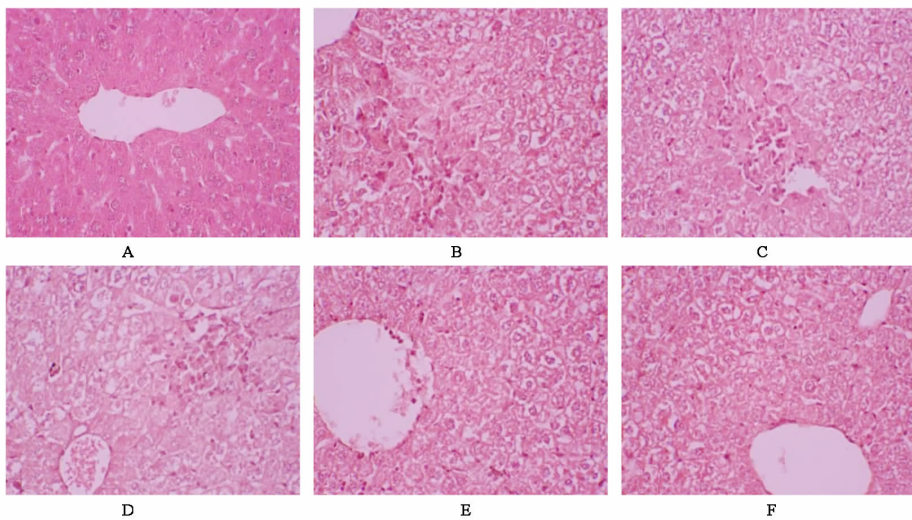


图 2 乙肝清对 *D*-GalN 致肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响(HE 染色, $\times 400$)

常对照组均显著增高 ($P < 0.01$), 表明肝细胞受损严重, 造模成功, 而乙肝清中、高剂量可显著降低 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤血清 ALT 水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 乙肝清高剂量还可降低血清 AST 水平 ($P < 0.05$), 表明乙肝清对肝细胞有一定的保护作用, 可减轻肝细胞的损伤。

D-GlaN 致肝损伤模型的病理改变与人类病毒性肝炎的病理改变较为接近, 其损伤肝脏的机制是 *D*-GlaN 进入体内后, 与磷酸尿苷 (UDP) 结合形成 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、糖蛋白、脂糖等物质合成受抑制, 细胞器受损、膜损害、钙离子内流入细胞; 此外, *D*-GlaN 还可通过产生自由基引起脂质过氧化, 造成肝细胞损伤; 还可使肥大细胞脱颗粒释放组胺, 造成结肠水肿, 使肠源性内毒素吸收增加, 引起内毒素中毒损伤肝脏^[4]。本实验 *D*-GlaN 模型组小鼠血清 ALT 和 AST 水平均显著高于正常对照组 ($P < 0.01$), 给予乙肝清高剂量后 ALT 和 AST 水平明显降低 ($P < 0.05$), 提示乙肝清具有保护肝细胞膜、抑制细胞内酶释放从而改善肝损伤的作用。

病理组织学检查是衡量肝损伤的一个较为直观的指标, 能客观地反映肝损伤的程度^[5]。乙肝清可明显改善 CCl_4 和 *D*-GlaN 致小鼠肝细胞变性、坏死

的范围和程度, 减轻炎症细胞浸润程度, 进一步说明乙肝清对 CCl_4 和 *D*-GlaN 所致的肝损伤具有保护作用。

综上所述, 乙肝清对 CCl_4 和 *D*-GlaN 所致的急性肝损伤具有一定的保肝降酶作用, 其肝保护机制可能是多环节的, 尚需进一步深入的研究。

[参考文献]

- [1] 刘森泉, 高秋萍, 阮红, 等. 紫心甘薯多糖对四氯化碳肝损伤小鼠的保护作用[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2010, 37(5): 572.
- [2] 梁莉, 乔华, 王婷, 等. 南沙参多糖对 CCl_4 及 *D*-氨基半乳糖致急性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(4): 38.
- [3] 黄晓菡, 曾文铤, 朱科伦, 等. 丹芪活肝胶囊对 *D*-氨基半乳糖致大鼠肝损伤的保护作用[J]. 广州医药, 2009, 40(5): 44.
- [4] 李丽, 莫遗盛, 王冬梅, 等. 复方护肝口服液对小鼠急性化学性肝损伤的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2363.
- [5] 闵光涛, 冯颖, 闵光宁, 等. 蕨麻提取物保护小鼠四氯化碳急性肝损伤的作用机制[J]. 兰州大学学报: 医学版, 2012, 38(1): 49.

[责任编辑 李玉洁]