

绞股蓝多糖对四氯化碳所致大鼠肝损伤的保护作用

张丛梅*

(广西梧州市中医院, 广西梧州 543000)

[摘要] 目的:研究绞股蓝多糖对四氯化碳诱导大鼠肝损伤的保护作用。方法:大鼠以50% CCl₄花生油溶液按1 mL·kg⁻¹ ig,连续4周建立实验性肝损伤模型。随机分为4组:模型对照组、联苯双酯组、绞股蓝多糖低、高剂量组,并设正常对照组。ig 绞股蓝多糖40,80 g·kg⁻¹,联苯双酯40 mg·kg⁻¹,正常对照组及模型组 ig 给予等量生理盐水,连续ig 30 d。末次给药24 h后取材,检测大鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的含量,逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定肝组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA的表达,Western blot法测定肝组织中B细胞淋巴瘤/白血病-2基因(Bcl-2)/Bcl-2相关X蛋白(Bax)凋亡相关蛋白的表达,并观察肝组织病理学变化。结果:与模型组比较,绞股蓝多糖低、高剂量给药组有效降低肝损伤大鼠血清中AST(85.28 ± 4.09, 72.49 ± 3.62) U·L⁻¹, ALT(75.31 ± 3.95), (58.26 ± 4.83) U·L⁻¹水平(P < 0.05),下调组织中iNOS mRNA的表达(P < 0.05)。治疗后大鼠肝组织中Bcl-2/Bax蛋白水平均有所升高(P < 0.05),并减轻肝损伤病情。结论:绞股蓝多糖对CCl₄诱导的大鼠肝损伤具有一定保护作用,其机制可能与其抑制细胞毒作用以及抗凋亡途径有关。

[关键词] 绞股蓝多糖; 肝损伤; 诱导型一氧化氮合酶; 抗凋亡作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0244-04

Protective Effect of *Gynostemma pentaphyllum* Polysaccharide on Liver Injure Induced by Carbon Tetrachloride in Rats

ZHANG Cong-mei*

(Traditional Chinese Medicine Hospital of Wuzhou, Wuzhou 543000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of the *Gynostemma pentaphyllum* polysaccharide on the CCl₄-induced liver injure in rats. **Method:** The liver injure was induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats, rats were divided into four groups randomly: model group, Bifendate group (40 mg·kg⁻¹), low-and high-dose groups of *G. pentaphyllum* polysaccharide (40, 80 g·kg⁻¹), as well as normal group was set up for 30 consecutive days. At the end of 30 days, the blood was collected and the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were examined, the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in liver were examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. The expression of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) /Bcl-2 associated X protein (Bax) in hepatic tissue was determined by Western blot analysis, and the changes of hepatic histopathology was observed by HE-staining. **Result:** Compared with model control group, *G. pentaphyllum* polysaccharide significantly decreased the levels of AST and ALT in liver injure induced by CCl₄ in rats (P < 0.05), while the iNOS mRNA expression in hepatic tissue was down-regulated (P < 0.05). The level of Bcl-2/Bax was elevated in hepatic tissue (P < 0.05), and liver injure was alleviated. **Conclusion:** The results disclose that *G. pentaphyllum* polysaccharide has protective effect on the CCl₄-induced liver injure in rats, mechanism of which may be related to inhibiting the cytotoxicity and anti-apoptotic pathways.

[Key words] *Gynostemma pentaphyllum* polysaccharide; liver injure; iNOS; anti-apoptotic effects

[收稿日期] 20120625(022)

[通讯作者] * 张丛梅, 主管药师, 从事肝损伤研究, Tel: 13977492804, E-mail: zhangcongmei2012@163.com

现代医药学研究表明:绞股蓝主要有效成分为多糖类、黄酮类、皂苷类等活性物质^[1]。广泛应用于高血脂、脂肪肝、肥胖、失眠、肝炎的治疗与保健功能^[2]。

本实验拟建立四氯化碳(CCl_4)诱导肝损伤大鼠模型,探讨绞股蓝多糖对 CCl_4 致肝损伤大鼠的保护作用及其可能的机制,为开发丰富的绞股蓝资源提供依据。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,SPF级,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,动物许可证号SCXK(桂)2009-0002,由广西医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂 CCl_4 (成都市科龙化工试剂厂,分析纯,批号20120125);联苯双酯滴丸(浙江医药股份有限公司新昌制药厂,批号120116);丙氨酸转氨酶(ALT)测定试剂盒(批号20120436),天冬氨酸转氨酶(AST)测定试剂盒(批号20120438),(均由南京建成生物工程研究所提供);cDNA合成试剂盒(上海东洋纺生物科技有限公司,批号DY120456);总RNA提取试剂盒(上海拜力生物科技有限公司,批号BL201204);RT-PCR试剂盒(深圳市康百得生物科技有限公司,批号20120428);预染蛋白Marker(Fermentas公司,批号QD120431);多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology,批号SM-1267);HRP标记的兔抗羊IgG抗体(Santa Cruz Biotechnology,批号SM-1268);SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术研究所,批号BC12046)。

1.3 仪器 WBZ-2微波真空干燥机(贵阳新奇微波工业有限责任公司),DDL-5高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),722S紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),DFM-96型多管放射免疫计数器(众成机电技术公司),Gel doc 2000低温高速离心机(德国西门子公司),9602A酶标仪(北京艾普生物设备有限公司),ABI Stepone Plus型实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司),酶免分析仪(美国Thermo Forma公司),垂直电泳仪、转膜及显影设备(BIO-RAD公司)。

2 方法

2.1 绞股蓝多糖制备 绞股蓝多糖提取采用水提醇沉法:取500g绞股蓝粉碎成粗粉,加入5000mL蒸馏水后加热提取3h,纱布过滤后合并滤液,10000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心4次,然后采用微波真空干燥器浓缩直至250mL浓缩液。加入98%乙醇沉淀,再经梯度极性不同溶剂相继洗涤后,低温干燥得绞股

蓝多糖,经三氟三氯乙烷法除去少量存在的蛋白质,经苯酚-硫酸法鉴别为多糖类化合物即可,并定性测定多糖含量为26.8g。

2.2 大鼠肝损伤模型建立^[3] 造模前禁食不禁水6h,以50% CCl_4 花生油溶液按 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,连续灌胃4周。

2.3 分组及给药 SD大鼠四氯化碳(CCl_4)连续灌胃4周,建立实验性肝损伤大鼠模型。随机分为4组:模型对照组、联苯双酯组、绞股蓝多糖低、高剂量组,并设正常对照组。ig给予绞股蓝多糖 $40, 80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,联苯双酯 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,正常对照组及模型组给予等量生理盐水,连续ig30d。末次给药24h后取材,检测大鼠血清中ALT,AST的含量和RT-PCR法测定肝组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA的表达。Western blot法测定肝组织中Bcl-2/Bax凋亡相关蛋白的表达,并观察肝组织病理学变化。依据2000年西安全国肝病会议通过的标准,将肝炎病变依纤维化程度分为4期,见表1。

表1 肝纤维化程度分期标准

分期	纤维化程度
S0	无
S1	汇管区纤维化扩大,限局窦周及小叶内纤维化
S2	汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留
S3	纤维间隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化
S4	早期肝硬化

2.4 统计学方法 采用SPSS 13.0软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对肝损伤大鼠肝功能的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中ALT,AST水平升高($P < 0.05$)。与模型组相比,联苯双酯组和绞股蓝多糖给药组大鼠的血清中ALT,AST水平降低($P < 0.05$)。见表2。

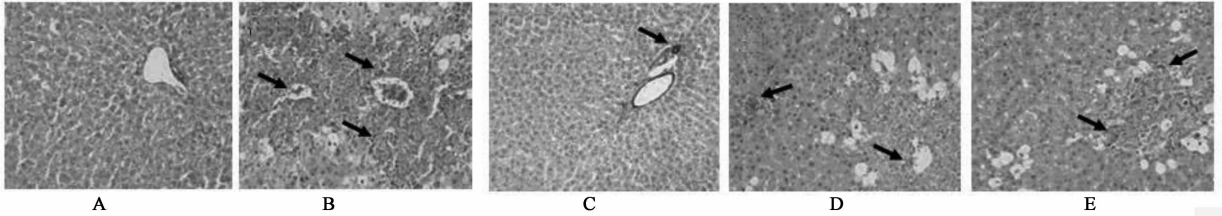
表2 绞股蓝多糖对肝损伤大鼠肝功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	
		ALT	AST
正常	-	45.83 ± 3.27	67.93 ± 4.81
模型	-	$92.17 \pm 5.73^{(1)}$	$94.44 \pm 4.70^{(1)}$
联苯双酯	0.04	$54.92 \pm 3.52^{(1,2)}$	$69.76 \pm 3.73^{(2)}$
绞股蓝多糖	40	$75.31 \pm 3.95^{(1,2)}$	$85.28 \pm 4.09^{(1,2)}$
	80	$58.26 \pm 4.83^{(1,2)}$	$72.49 \pm 3.62^{(1,2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 大鼠肝组织病理学观察 正常组肝细胞排列整齐,肝小叶为类圆形,结构完整,并以中央静脉为中心,放射状分布。模型组肝小叶发生损伤,表现为肝细胞变性或坏死,代以汇管区有纤维组织增生,并有炎细胞浸润等病理改变。绞股蓝多糖高剂量组肝

细胞排列有序,肝小叶结构恢复完整,汇管区有纤维化不明显,未见有肝细胞变性或坏死。阳性对照组与绞股蓝多糖低剂量组肝小叶结构有一定程度的恢复,肝细胞排列较紊乱,结节周围存在部分纤维组织增生,有少量炎症浸润。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 绞股蓝多糖 80 mg·kg⁻¹组;D. 联苯双酯 40 mg·kg⁻¹组;
E. 绞股蓝多糖 40 mg·kg⁻¹组(图 2~3 同);箭头所指为坏死肝细胞

图 1 大鼠肝组织病理组织学观察 (HE 染色 ×100)

根据该标准对大鼠肝组织 HE 染色结果进行分级,经秩和检验进行统计比较。与模型对照组比较,联苯双酯组和绞股蓝多糖组均存在统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 3。

表 3 肝纤维化大鼠病理检查结果 ($n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	各期动物数/只					P
		S0	S1	S2	S3	S4	
正常对照	-	12	0	0	0	0	<0.01
模型对照	-	0	0	2	8	2	-
联苯双酯	0.04	1	7	2	2	0	<0.01
绞股蓝多糖	40	1	6	3	2	0	<0.01
	80	1	4	4	3	0	<0.05

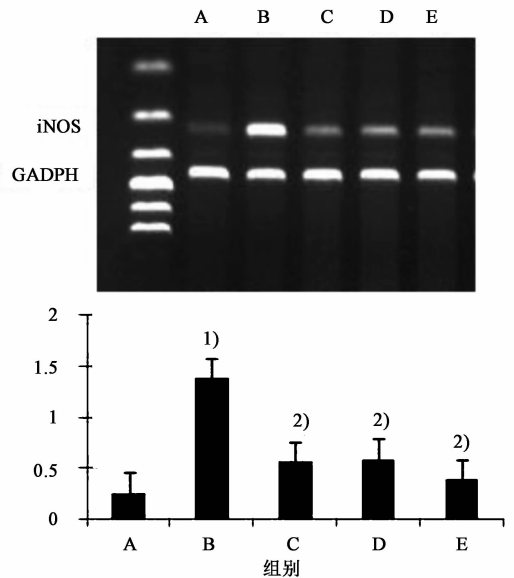
注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对肝损伤大鼠肝脏中 iNOS mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果表明,模型组大鼠肝脏组织中 iNOS mRNA 表达上调,与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。经治疗后,联苯双酯组和绞股蓝多糖治疗组逐渐地下调肝损伤大鼠中 iNOS mRNA 表达水平,与模型组比较差别有统计意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

3.4 对肝损伤大鼠肝脏中 Bcl-2/Bax 表达的影响 Western blot 结果表明,肝损伤模型组大鼠肝脏组织中 Bcl-2/Bax 下降,与正常组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。给药后,联苯双酯组和绞股蓝多糖治疗组有效地升高肝损伤大鼠的肝脏中 Bcl-2/Bax 的表达 ($P < 0.05$),表现为一定的剂量依赖性。见图 3。

4 讨论

肝病是严重威胁人类健康的重大疾病之一,具



与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (图 3 同)。

图 2 绞股蓝多糖对肝损伤大鼠肝脏中 iNOS mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

有发病率高、难以根治的特点^[4]。肝损伤涉及多因素的复杂病理过程,其中体内多种酶的生化代谢途径均有较大的紊乱^[5-6]。血清转氨酶是肝细胞损害的临床分析指标,可反映肝细胞损伤或坏死的程度,其中 ALT 和 AST 值异常升高更是肝脏受损的特异性标志^[7]。在本实验中,联苯双酯、绞股蓝多糖给药组能有效降低血清转氨酶的水平,对 ALT 水平的降低最明显,提示绞股蓝多糖能稳定肝细胞膜,有效防止胞浆内容物外漏。

国外研究表明,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)通过在肝脏组织中的表达生成 NO 介导肝损伤^[8]。NO 致肝损伤表现为,破坏肝细胞 DNA 双链完整性

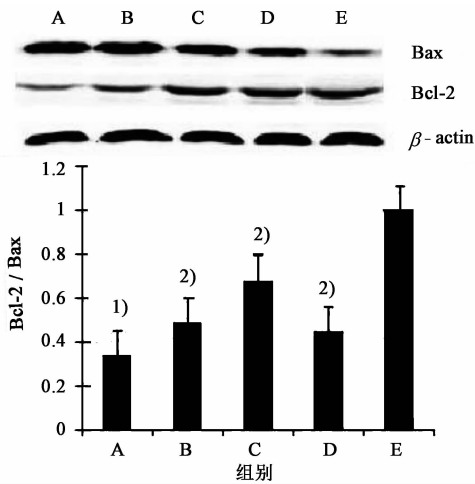


图3 绞股蓝多糖对肝损伤大鼠肝脏中 Bcl-2/Bax 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

造成细胞坏死,以及触发超氧化自由基对肝细胞的杀伤,同时还具有直接激活环氧化酶诱发级联炎症反应^[9]。因此,保护肝细胞免遭 NO 的细胞毒作用对改善肝功能有积极防治意义。实验结果表明,模型组大鼠肝脏组织中内源性 iNOS 蛋白表达显著上调,提示其高表达是介导肝损伤的重要因素之一,作用结果与免疫攻击以及肝功能降低实验一致。而联苯双酯和绞股蓝多糖干预组能有效控制肝脏组织中 iNOS 的表达,逆转细胞毒性因子对肝细胞的损伤,从而有效恢复肝功能。

实验发现, Bcl-2 具有抗氧化效应,保护细胞线粒体膜结构,并防止细胞色素 C 释放进胞浆。同时它可抑制细胞凋亡,延迟细胞周期^[10]。当机体过度表达 Bax 时,其介导细胞凋亡,并诱发级联死亡信号。 Bcl-2 和 Bax 形成的异二聚体发挥抑制凋亡作用^[11]。因此, Bcl-2/Bax 的比值可视为抗细胞凋亡的重要指示之一。本实验表明,绞股蓝多糖给药组中 Bcl-2 蛋白水平明显增多, Bax 蛋白表达显著下调, Bcl-2/Bax 明显升高。提示绞股蓝多糖通过调节 Bcl-2/Bax 的表达抑制受损肝脏细胞的凋亡,表现为抗凋亡效应。

[参考文献]

- [1] 杨东晖,陈浪. 葛根化学成分的研究[J]. 华南师范大学学报:自然科学版,2002,(4):94.
- [2] 焦豪妍. 葛根的研究概况[J]. 海峡药学,2010,22(8):47.
- [3] 陈小伍,李利红,朱达坚,等. 大鼠肝损伤动物模型的建立[J]. 中华实验外科杂志,2009,(12):1723.
- [4] Morgan M, Keeffe E B. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B: 2009 update [J]. Minerva Gastroenterol Dietol,2009,55(1):5.
- [5] 许金鹏,张慧慧,李朝品,等. 原卟啉钠对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):168.
- [6] 陈文丽,曾贵荣,陈志,等. 肝康片对四氯化碳致动物肝损伤的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):200.
- [7] Kem M C. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage[J]. Lancet, 2000, 355(204): 591.
- [8] Trocha M, Merwid-Lad A, Szuba A, et al. Effect of simvastatin on nitric oxide synthases (eNOS, iNOS) and arginine and its derivatives (ADMA, SDMA) in ischemia/reperfusion injury in rat liver[J]. Pharmacol Rep, 2010,62(2):343.
- [9] Farombi E O, Shrotiya S, Surh Y J. Kolaviron inhibits dimethyl nitrosamine-induced liver injury by suppressing COX-2 and iNOS expression via NF-kappaB and AP-1 [J]. Life Sci, 2009,84(5/6):149.
- [10] Li A, Ojogho O, Escher A. Saving death: apoptosis for intervention in transplantation and autoimmunity [J]. Clin Dev Immunol, 2006,13(4):273.
- [11] Tagami S, Eguchi Y, Kinoshita M, et al. A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity[J]. Oncogene, 2000,19(50):5736.

[责任编辑 聂淑琴]