

六月青多糖对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的影响

何巧玲, 罗秀, 吕鹏, 郭雪峰, 黄仁彬, 张士军*
(广西医科大学药理教研室, 南宁 530021)

[摘要] 目的:研究六月青多糖(LYQP)对四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)所致大鼠肝纤维化的干预作用及机制。
方法:SD 大鼠随机分成两组,模型组大鼠采用 50% CCl₄ 花生油溶液 1 mL·kg⁻¹ig 造模,每周 2 次,连续 7 周,正常组用生理盐水代替。将病理检查确认肝纤维化已形成的 SD 大鼠 60 只随机分为 LYQP(600,300,150 mg·kg⁻¹)组,秋水仙碱(0.2 mg·kg⁻¹)组,CCl₄ 模型对照组,每组 12 只。于造模的第 8 周开始给药。正常组和 CCl₄ 模型对照组 ig 生理盐水,药物组 ig LYQP 和秋水仙碱,每日 1 次,连续 ig 给药 4 周。检测大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)活性以及肝组织中羟脯氨酸(Hyp)的含量,采用 Masson 染色观察肝组织纤维化程度。**结果:**LYQP(600,300,150 mg·kg⁻¹)组 ALT 和 AST 活性为(13.53 ± 2.30), (19.89 ± 2.13), (26.31 ± 2.87) U·mL⁻¹, (17.14 ± 2.96), (24.85 ± 3.14), (33.63 ± 3.91) U·mL⁻¹,与模型对照组比较,LYQP 可明显降低 CCl₄ 致大鼠纤维化血清 ALT 和 AST 活性;GSH-Px 活性为(710.4 ± 35.98), (653.8 ± 25.36), (612.0 ± 27.96) U·mg⁻¹,Hyp 含量为(0.382 ± 0.017), (0.446 ± 0.022), (0.517 ± 0.024) mg·g⁻¹与模型对照组比较,LYQP 可明显增高 GSH-Px 活性和降低 Hyp 含量;Masson 染色显示各药物组干预的大鼠肝脏胶原纤维均有所减少。**结论:**六月青多糖可减轻 CCl₄ 诱导的肝纤维化。

[关键词] 六月青; 多糖; 四氯化碳; 肝纤维化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0194-04

Effect of Liuyueqing Polysaccharide on Liver Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats

HE Qiao-ling, LUO Xiu, LV Peng, GUO Xue-feng, HUANG Ren-bin, ZHANG Shi-jun*

[收稿日期] 20120327(008)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 10124008-6)

[第一作者] 何巧玲, 硕士研究生, 从事抗肝纤维化药物研究, Tel: 0771-5358272, E-mail: lingqiaohe.205@163.com

[通讯作者] * 张士军, 博士, 副教授, 从事抗肝纤维化药物研究, Tel: 0771-5358272, E-mail: gxykdxzsj@163.com

- [2] 柳润辉,王汉波,孔令义.地锦草化学成分的研究[J].中草药,2001,32(2):107.
- [3] 朱英.地锦草的研究进展[J].现代中药研究与实践,2003,17(5):62.
- [4] 褚小兰,廖万玉,楼兰英,等.地锦类中草药的药理作用研究[J].时珍国医国药,2001,12(3):193.
- [5] 李宝山,巴根那,张听原,等.地锦草总黄酮抗氧化作用研究[J].时珍国医国药,1998,9(4):328.
- [6] 李治建,古力娜·达吾提,斯拉甫·艾白,等.地锦草不同提取部位抗皮肤癣菌作用研究[J].石河子大学学报,2008,26(6):735.
- [7] 李治建,古力娜·达吾提,斯拉甫·艾白.地锦草提取物体外抗真菌作用研究[J].时珍国医国药,2008,19(12):2958.
- [8] 古力娜·达吾提,尤丽吐孜,艾则孜·亚森,等.维药地锦草软膏的体外抗真菌及其对豚鼠皮肤真菌感染的治疗作用研究[J].中药药理与临床,2007,23(5):1782.
- [9] 王玉良,向绍杰,杜佳林,等.大鼠阴道炎模型的改进与妇康液防治作用的实验研究[J].辽宁中医杂志,2003,30(11):948.
- [10] 刘云,马克韶.对家兔阴道粘膜刺激反应的评价方法[J].中国药检药理工作通讯,1990,2(1):4.
- [11] 李治建,古力娜·达吾提,肖威,等.地锦草提取物抗真菌作用研究及对真菌超微结构的影响[J].中草药,2009;40(5):758.
- [12] Kim H S, Choi E H, Khan J, et al. Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to Candida albicans[J]. Infect Immun, 2005, 73(6):3714.

[责任编辑 聂淑琴]

(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of the Liuyueqing polysaccharide against CCl_4 -induced liver fibrosis in rats and its mechanism. **Method:** SD rats were divided into two groups randomly: hepatic fibrosis model group and normal group. The model group of rats with hepatic fibrosis was established by $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ of 50% CCl_4 , ig, twice per week for continuous 7 weeks. The rats in the normal control group were given normal saline (NS). Sixty SD rats with hepatic fibrosis confirmed by the pathological inspection was randomly divided into LYQP (600, 300, 150 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups, colchicine ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group and model group. All rats were treated with drugs or NS for four consecutive weeks by ig, once a day. The activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and glutathione synthesis (GSH-Px) in serum of rats and the content of hydroxyproline (Hyp) in hepatic tissue were determined. The extent of liver fibrosis was observed by Masson staining. **Result:** LYQP significantly decreased the activity of ALT and AST in rats with liver fibrosis. Compared with model control group, the content of Hyp in hepatic tissue was decreased significantly. The activity of GSH-Px was significantly increased. Masson staining showed that the collagen fibers in every treated group were less than model control group. **Conclusion:** Liuyueqing polysaccharide can relieve liver fibrosis induced by CCl_4 .

[Key words] Liuyueqing; polysaccharide; carbon tetrachloride; liver fibrosis

六月青(LYQ)为广西民间特色草药,系爵床科肖鸡笼属植物肖鸡笼(顶花马兰)*Taraphochlamays affinis* (Giff) Bremekhu的干燥地上部分^[1]。本课题组已对六月青及其活性成分进行了大量的研究,我们研究发现,六月青皂苷对大鼠化学性肝损伤具有一定程度的治疗作用^[2],以六月青为君药的复方六月青具有明显的抗肝纤维化作用^[3]。此外,六月青药材中含有丰富的多糖类物质,本课题组已成功分离出六月青多糖(LYQP)^[4],并初步研究发现六月青多糖有明显的体外抗氧化作用^[5]。本实验拟在 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化模型上,观察LYQP对大鼠肝纤维化生化指标及组织学的影响,旨在进一步研究LYQP的抗肝纤维化作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性SD大鼠100只,SPF级,体重(180 ± 20)g,由广西医科大学实验动物中心提供。试验动物生产许可证SCXK(桂)2003-0003,试验动物使用许可证SCXK(桂)2003-0005。常规鼠饲料喂养,自由饮水。

1.2 药物及试剂 六月青多糖(LYQP)由本实验室自行提取完成,纯度为72.8%,批号20100713;四氯化碳(分析纯,成都市科隆化工试剂厂,批号20100925);秋水仙碱片(西双版纳药业有限责任公司,批号110403)。丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、羟脯氨酸(Hyp)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(均购于南京建成生物工程研究所,批号20111024)。

2 方法

2.1 动物造模 参照文献[6]方法,将SD大鼠随机分成两组:正常对照组及肝纤维化模型组。肝纤维化模型组,采用花生油配成体积分数为50%的 CCl_4 溶液,按 CCl_4 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 每周ig 2次,每周称体重1次,按实际体重调整给药剂量。正常对照组采用生理盐水ig,剂量同50% CCl_4 花生油溶液,每周2次。分别于造模后第5,6,7周抽取肝纤维化模型组大鼠2只及正常对照组大鼠1只,进行病理学检查,监测肝纤维化形成的情况。

2.2 动物分组及给药 将病理检查确认形成肝纤维化的SD大鼠60只,随机分为5组,加上正常对照组,共6组,分别为:正常对照组,给予生理盐水;模型对照组,给予生理盐水;阳性组,给予秋水仙碱 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;LYQP高、中、低剂量组,分别给予六月青多糖600,300,150 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。各药物组ig给予相应的药物,给药容积均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,正常对照组和模型对照组给予等体积的生理盐水。各组动物在同样条件下饲养,均以空腹ig给药,每日1次,连续4周。以上各组除正常对照组外,其余各组均继续给予50% CCl_4 花生油溶液,每周2次。每周称体重,并相应调整 CCl_4 造模剂量及用药剂量。

2.3 观察指标及检测方法 末次给药24 h后,戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,分离血清于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,取部分肝组织于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,用于ALT,AST,GSH-Px,Hyp的测定。各指标测定按照试剂盒说明书进行操作。

于肝左叶同一部位取肝组织约 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小,固定于 10% 中性福尔马林溶液,常规脱水,石蜡包埋,Masson 染色,光镜下观察肝组织纤维化程度。依据 2000 年西安全国肝病会议通过的标 准^[7],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 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计

表 2 LYQP 对肝纤维化大鼠血清 ALT,AST,GSH-Px 活性及肝组织 Hyp 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·mL ⁻¹	AST/U·mL ⁻¹	GSH-Px/U·mL ⁻¹	Hyp/mg·g ⁻¹
正常对照	-	7.80 ± 1.47	11.26 ± 1.77	803.0 ± 31.69	0.271 ± 0.008
模型对照	-	37.40 ± 3.45 ³⁾	49.04 ± 6.54 ³⁾	485.6 ± 28.26 ³⁾	0.591 ± 0.020 ³⁾
秋水仙碱	0.2	15.16 ± 2.68 ²⁾	19.85 ± 2.44 ²⁾	693.3 ± 42.94 ²⁾	0.389 ± 0.020 ²⁾
LYQP	600.0	13.53 ± 2.30 ²⁾	17.14 ± 2.96 ²⁾	710.4 ± 35.98 ²⁾	0.382 ± 0.017 ²⁾
	300.0	19.89 ± 2.13 ²⁾	24.85 ± 3.14 ²⁾	653.8 ± 25.36 ²⁾	0.446 ± 0.022 ¹⁾
	150.0	26.31 ± 2.87 ¹⁾	33.63 ± 3.91 ¹⁾	612.0 ± 27.96 ¹⁾	0.517 ± 0.024 ¹⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常对照组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 LYQP 对肝纤维化大鼠组织病理组织病变的影响 Masson 染色结果显示,空白对照组肝组织染色显示小叶间和汇管区基本无胶原纤维分布,中央静脉及肝窦内有轻微的胶原纤维分布,在显微镜下基本不见红黄及绿色的胶原纤维,肝小叶结构正常,未见纤维增生。模型对照组 Masson 染色下可见汇管区和小叶间有大量粗大增生的胶原纤维,肝小叶被重新分割,组织切片中有大量假小叶形成,胶原纤维呈宽带状,互相连接,细胞变性坏死明显。LYQP 高剂量组及秋水仙碱组肝组织胶原纤维明显减少,肝小叶结构也有所恢复,仍有部分点状细胞坏死。LYQP 中剂量及低剂量组肝组织胶原纤维明显减少,肝小叶结构也有所恢复,细胞坏死明显(图 1)。

根据该标准将大鼠肝组织病理结果进行分级,经秩和检验发现,与模型对照组比较,秋水仙碱组和六月青多糖高、中、低剂量组均存在统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 3。

4 讨论

肝纤维化是肝硬化、肝癌甚至肝功能衰竭的共同病理基础和必经途径,是影响慢性肝病的重要环

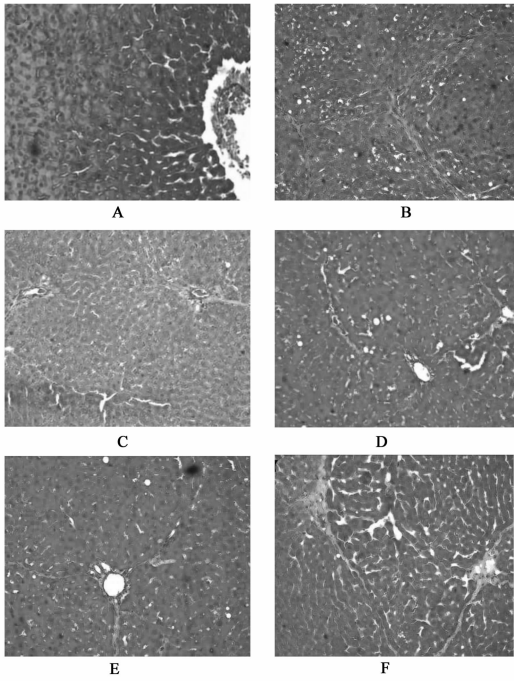
节。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性检验,方差齐者采用 t 检验,方差不齐者采用校正 t 检验进行统计处理。病理分级结果经秩和检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠血清 ALT,AST,GSH-Px,肝组织 Hyp 的变化 模型对照组大鼠血清 ALT,AST 的活性均显著升高,GSH-Px 活性显著下降,组织中 Hyp 含量显著升高,与正常对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$);阳性组、六月青多糖高、中、低剂量组血清 ALT,AST 活性均低于模型对照组,GSH-Px 活性升高,组织中 Hyp 含量降低,且与模型对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

节。肝纤维化的实质是由于胶原和其他细胞外基质 (ECM) 的合成与降解失衡,导致 ECM 在肝内过量沉积^[8]。在慢性炎症、机化和瘢痕形成中,可随病理过程的发展而出现胶原纤维。胶原纤维主要由胶原蛋白构成,Hyp 是胶原蛋白所特有的氨基酸成分,故胶原代谢的变化情况可由肝脏中 Hyp 的含量来反映,与肝纤维化程度相平行。在肝纤维化早期,HE 染色切片中胶原纤维和纤维蛋白较难鉴别,通过胶原纤维染色则可证实,因此本实验采用 Masson 染色来观察肝组织的纤维化病变。在肝脏中 ALT 主要分布于细胞浆内,AST 主要分布于线粒体和细胞浆中,当各种原因引起肝细胞损伤时,酶从肝细胞内外溢进入血液,使血液里的 ALT,AST 浓度升高,故 ALT,AST 是反映肝脏功能的重要指标。

本课题组多年来一直致力于广西特色中草药对肝纤维化防治的研究工作,前期研究证实以六月青为君药的复方六月青,对四氯化碳、对乙酰氨基酚、D-半乳糖胺等所致小鼠急性化学性肝损伤均有明显的保护作用^[9];复方六月青对肝纤维化大鼠肝脏 I 型胶原合成有抑制作用^[10];六月青多糖、玉郎伞



A. 正常对照组;B. 模型对照组;C. 秋水仙碱 0.2 mg·kg⁻¹组;
D. LYQP 600 mg·g⁻¹组;E. LYQP 300 mg·kg⁻¹组;
F. LYQP 150 mg·kg⁻¹组

图1 肝纤维化大鼠肝组织病理组织学的改变(Masson, ×100)

表3 肝纤维化大鼠病理检查结果(n=12)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	S0	S1	S2	S3	S4	P
正常对照	-	12	0	0	0	0	<0.01
模型对照	-	0	0	2	7	3	-
秋水仙碱	0.2	1	6	3	2	0	<0.01
LYQP	600.0	1	7	2	2	0	<0.01
	300.0	0	5	4	2	1	<0.01
	150.0	0	3	4	4	1	<0.05

注:与模型对照组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

黄酮与玉郎伞多糖联合用药可减轻 CCl₄ 诱导的肝纤维化^[11]。本课题组已成功分离出 LYQP,并且在药效学研究方面发现 LYQP 对 CCl₄ 诱导的急性化学性肝损伤小鼠具有良好的保护作用^[4]。本研究

结果表明,LYQP 能不同程度降低肝纤维化大鼠血清 ALT,AST 活性,提高 GSH-Px 活性,且明显减少肝组织中 Hyp 的含量。Masson 染色提示其可以抑制纤维增生,说明 LYQP 可抑制肝脏胶原纤维的合成和沉积,具有抗大鼠肝纤维化作用。本课题组将继续从分子及基因水平,进一步深入研究 LYQP 对肝纤维化治疗的作用及其机制。

[参考文献]

[1] 林兴,黄权芳,黄仁彬,等. 广西民间药六月青的性状与显微鉴定[J]. 中药材,2005(7): 541.
[2] 陈兆霓,张士军,黄仁彬,等. 六月青皂苷对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的影响[J]. 时珍国医国药,2010(8): 1911.
[3] 张士军. 复方六月青抗肝纤维化作用及其分子机制的实验研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2008.
[4] 刘曦. 六月青多糖的分离纯化及其抗肝损伤作用的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2009.
[5] 刘曦,黄仁彬,朱金芳,等. 六月青多糖体外抗氧化作用的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2008(23): 1983.
[6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1350.
[7] 成军,张玲霞,斯崇文,等. 第十次全国病毒性肝炎与肝病学术会议纪要[J]. 中华传染病杂志, 2001(1): 52.
[8] Lee U E, S L Friedman. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011,25(2): 195.
[9] 苏洁寒,荣延平,黄仁彬,等. 复方六月雪对急性化学性肝损伤的保护作用[J]. 广西医科大学学报, 2003, 20(4):497.
[10] 张士军,陈兆霓,黄仁彬,等. 复方六月青对肝纤维化大鼠肝脏 I 型胶原合成的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(17): 140.
[11] 吕鹏,陈兆霓,张士军,等. 3 种天然化合物联合对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(13): 149.

[责任编辑 聂淑琴]