

## 茯苓多糖退黄疸作用的实验研究

刘成<sup>1,2</sup>, 杨宗国<sup>1</sup>, 陆云飞<sup>1,3</sup>, 吕震<sup>1</sup>, 徐庆年<sup>1</sup>,  
潘奇<sup>1</sup>, 汤伯宗<sup>1</sup>, 吕莹<sup>1</sup>, 孙媛<sup>1</sup>, 陆玲庆<sup>1</sup>, 陈晓蓉<sup>1,3\*</sup>

- [1. 上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心, 中医科, 上海 201508;  
2. 上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心, 科研中心, 上海 201508;  
3. 国家中医药管理局中医药防治传染病重点研究室(临床基地), 上海 201508]

**[摘要]** 目的:以异硫氰酸- $\alpha$ -萘酯(alpha-naphthylisothi, ANIT)大鼠黄疸模型为载体,探索茯苓多糖退黄作用。方法:Wistar 雄性大鼠 50 只随机分为正常组(10 只)和 ANIT 处理组(40 只),2% 的 ANIT 按照  $6 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  ig,48 h 后 ANIT 处理组大鼠随机分为模型对照组及茯苓多糖低、中、高剂量( $5, 50, 500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),每组 10 只。模型大鼠每天 ig 给予生理盐水。茯苓多糖组 ig 给药 1 周,实验结束处死全部大鼠,检测大鼠肝功能及实时定量(real-time PCR)方法检测白介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ )及肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )水平。结果:ANIT 处理组大鼠肝功能紊乱,与正常组相比,血清总胆红素(TBil)含量显著升高( $P < 0.01$ ),为正常组的 52.7 倍,谷丙转氨酶(ALT)活性显著升高( $P < 0.01$ ),为正常组的 6.31 倍,天冬氨酸转氨酶(AST)活性显著升高( $P < 0.01$ ),为正常组的 8.31 倍。茯苓多糖退黄疸保肝作用呈剂量依赖型增高,中剂量组退黄有一定作用,高剂量组退黄作用最为显著。ANIT 造模组 IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$  mRNA 促炎症因子显著升高( $P < 0.01$ ),分别为正常组的 14.24,10.65 倍;而模型组 IL-4 mRNA 表达仅为正常组的 0.33( $P < 0.01$ );与模型组相比,高剂量茯苓多糖显著抑制 IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达( $P < 0.01$ ),茯苓多糖高剂量组显著提高 IL-4 mRNA 表达( $P < 0.01$ )。结论:高剂量茯苓多糖可能通过免疫调节发挥退黄作用。

**[关键词]** 茯苓多糖; 异硫氰酸- $\alpha$ -萘酯; 黄疸

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0195-04

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20120313.1302.008 **[网络出版时间]** 2012-03-13 13:02

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120313.1302.008.html>

## Effects of Pachymaran on Alpha-naphthylisothi-induced Jaundice in Rats

LIU Cheng<sup>1,2</sup>, YANG Zong-guo<sup>1</sup>, LU Yun-fei<sup>1,3</sup>, LV Zhen<sup>1</sup>, XU Qing-nian<sup>1</sup>,  
PAN Qi<sup>1</sup>, TANG Bo-zong<sup>1</sup>, LV Ying<sup>1</sup>, SUN Yuan<sup>1</sup>, LU Ling-qing<sup>1</sup>, CHEN Xiao-rong<sup>1,3\*</sup>

- [1. Department of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai Public Clinical Health Center, Shanghai 201508, China; 2. Scientific Research Center, Shanghai Public Clinical Health Center, Shanghai 201508, China; 3. Key Laboratory of Infections Diseases of State Administration of TCM (Clinical Base), Shanghai 201508, China]

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of pachymaran on elimination of jaundice. **Method:** Fifty male Wistar rats were randomly divided into normal group (10) and alpha-naphthylisothi (ANIT) -induced (40) model group. After 48 h of ANIT treatment, ANIT-treated rats were randomly divided into model group,

**[收稿日期]** 20111031(005)

**[基金项目]** 国家“十一五”科技重大专项子课题(2009ZX10005-019);上海市科学技术委员会项目(25382);上海市科委引导类项目(10411963000)中央高校基本科研业务费专项资金(10F115)。

**[第一作者]** 刘成,博士,助理研究员,从事中医药防治慢性肝病、传染病临床与实验研究, Tel: 18916095285, E-mail: liucheng0082010@163.com

**[通讯作者]** \*陈晓蓉,主任医师,硕士生导师,从事中医药防治传染病、肝病临床及实验研究, Tel: 021-37990333-3289, Fax: 021-57248762, E-mail: xiaorong3chen@yahoo.com.cn

pachymaran low-dose, medium-dose and high-dose groups (10 rats each group). At the end of the experiment all rats were sacrificed. Liver function, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in liver were determined using real-time PCR analysis. **Result:** Compared with normal group: the activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the serum increased 6.31-fold and 8.31-fold, respectively ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The content of total bilirubin (TBil) increased 52.7-fold ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ) in ANIT-treated rats. Compared with the model group, pachymaran high-dose reduced significantly TBil content ( $P < 0.01$ ). Compared with normal group, interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) mRNA levels increased significantly ( $P < 0.01$ ) and IL-4 was decreased remarkably ( $P < 0.05$ ) in ANIT-treated rats, while the pachymaran high-dose reduced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), elevated liver IL-4 expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Could be one important mechanism for pachymaran can reduce jaundice by regulating immunologic function in rats.

[**Key words**] pachymaran; alpha-naphthylisothi; jaundice

消黄方是我院中医科 20 多年来治疗黄疸取得良好疗效的中药复方,该方由茵陈,栀子,赤芍,茯苓,生甘草 5 味中药,基本是茵陈蒿汤化裁而成,前期研究表明消黄方显著改善临床难治性黄疸患者症状及 ANIT 黄疸大鼠肝功能及组织病理<sup>[1-2]</sup>。明确复方何种成分发挥作用是中药现代化中亟待解决的问题<sup>[3-4]</sup>。茯苓是消黄方的主要组成成分,茯苓多糖是茯苓的主要有效成分之一,前期大量研究表明茯苓多糖具有显著免疫调节作用<sup>[5-7]</sup>。然而,茯苓多糖是否能够退黄疸罕有报道。基于以上认识,我们选择茯苓多糖为研究对象,以 ANIT 大鼠黄疸模型为载体,研究茯苓多糖的退黄作用,进而以实时定量 PCR 为主要技术手段,探讨茯苓多糖的退黄作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** Wistar 雄性大鼠 50 只,体重(200 ± 20) g,SPF 级,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,生产许可证号 SCXK(沪)2007-0006。上海市公共卫生临床中心实验动物中心恒温饲养,自由饮食。

**1.2 药物与试剂** 茯苓多糖购自上海融禾医药科技有限公司,纯度为 80%,批号 111020。ANIT 购自北京恒业中远化工有限公司,批号 09229。RNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司,批号 21010A,反转录试剂盒购自 Fermentas,批号 K1621,SYBR 是 Takara 公司产品,批号 BKA2702。

**1.3 仪器** ASP300 型自动脱水机,EG1160 型石蜡包埋机,RM2035 型轮转切片机,HH1220 烤片机,HH1210 捞片机,均为德国 Leica 公司; -80 °C 超低温冰箱(美国 Forma Scientific 公司产品);BX40 型光学显微镜,IX70 型倒置光学显微镜及 PM-30 型曝光控制系统(均为 Olympus 公司产品);定量 PCR

仪,Rotor-Gene RG-6000,Corbett Research,基因公司产品;PCR 分析软件;逆转录仪,My Cycler™ thermal cycler,BioRad。

## 2 方法

**2.1 模型制备与药物治疗** 50 只大鼠随机分为正常组(10 只)和模型组(40 只)。ANIT 造模按照 Schaffner 方法稍作修改,以 2% ANIT 色拉油溶液剂量为 6 mL·kg<sup>-1</sup>ig 制备大鼠黄疸模型<sup>[8]</sup>,ANIT ig 48 h 后,模型大鼠随机分为模型组(10 只)、茯苓多糖低、中、高剂量(5,50,500 mg·kg<sup>-1</sup>,每组 10 只)。每日 ig 给药 1 次,连续 1 周;模型组每天 ig 给予等量的生理盐水。

**2.2 样品采集和处理** 实验第 9 天处死全部大鼠,大鼠用 7% 水合氯醛 ip 麻醉后,仰卧位固定,打开腹腔,观察肝脾的色、质、形态等情况。经下腔静脉采血,摘取肝脾,称重,自肝右叶切取 1.0 cm × 0.8 cm × 0.3 cm 肝组织 1 块,10% 中性甲醛固定,脱水、包埋。血液 4 °C 静置 2 h 后,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,分离血清,检测肝功能指标。

## 2.3 观察指标

**2.3.1 一般情况** 包括大鼠的死亡情况,体重、肝脏大体形态、肝脏质量等。计算肝指数(肝/体比)。

**2.3.2 血清肝功能检测** 肝功能指标 ALT,AST 活性及 TBil 含量均由上海市公共卫生临床中心检验科检测。

**2.3.3 肝脏组织病理 HE 染色** 观察肝脏组织病理情况。

**2.3.4 肝组织实时定量 PCR 检测 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 的 mRNA 表达** 总 RNA 抽提采用华舜生物公司的试剂盒,反转录采用 Fermentas 反转录试剂盒,2  $\mu$ g 总 RNA 用于反转录,反转录后产物用超纯水 1:9

稀释后用于 mRNA 表达检测,mRNA 表达检测参考 Liu C 等的方法<sup>[9]</sup>,采用 SYBR 三步法试剂盒 (Takara, Ohtsu, Japan),用 roto-gene6000 扩增,双  $\Delta CT$  法分析其表达,每一结果是相对所设定的正常组的某一个结果比较得出的。引物由 Takara 公司设计,引物由上海生工合成(表 1)合成。

**2.4 统计方法** 计量资料以 SPSS 18.0 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为有显著性差异。

**3 结果**

**3.1 大鼠一般状况** 药物干预过程中,模型组死亡 2 只,死亡率为 20%,茯苓多糖低剂量组死亡 1 只,茯苓多糖中、高剂量组大鼠无死亡。与正常大鼠比,模型对照组大鼠体重显著减轻,见表 2( $P < 0.01$ ),模型对照组的肝重及肝体比显著升高( $P < 0.05$  或  $0.01$ ),与模型对照组相比,茯苓多糖显著升高大鼠体重,降低肝脏质量及肝体比( $P < 0.01$ )。

表 1 实验中所用引物

| 基因            | 正向引物                           | 反向引物                         | 基因库序号     |
|---------------|--------------------------------|------------------------------|-----------|
| TNF- $\alpha$ | 5'-GGCAGCCTTGTCCTGAAGAG-3'     | 5'-GTAGCCCACGTCGTAGCAAACC-3' | X6659     |
| IL-4          | 5'-TTGCAGAGCACCCTGGAAG-3'      | 5'-TGCACCGAGATGTTGTACCAGA-3' | NM_201207 |
| IL-1 $\beta$  | 5'-GCTGTGGCAGCTACCTATGCTTTG-3' | 5'-AGGTCGTCATCATCCCACGAG-3'  | NM_031512 |
| 18SrRNA       | 5'-GTAACCCGTTGAACCCGATT-3'     | 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'   | X0117     |

表 2 茯苓多糖给药 1 周对 ANIT 黄疸模型大鼠体重、肝重的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

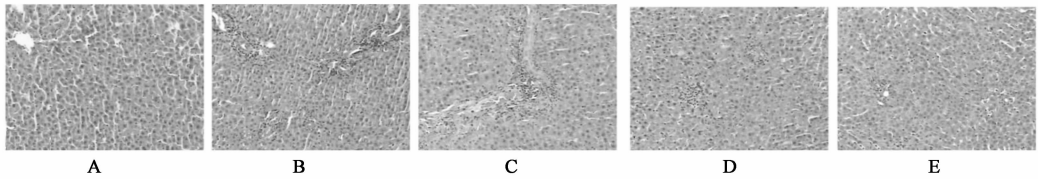
| 组别   | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | 体重/g                            | 肝重/g                           | 肝体比/%                         |
|------|------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 正常   | -                      | 257.00 $\pm$ 7.52 <sup>4)</sup> | 8.75 $\pm$ 0.22 <sup>3)</sup>  | 3.41 $\pm$ 0.10 <sup>4)</sup> |
| 模型   | -                      | 233.4 $\pm$ 6.80 <sup>2)</sup>  | 10.07 $\pm$ 1.00 <sup>1)</sup> | 4.32 $\pm$ 0.46 <sup>2)</sup> |
| 茯苓多糖 | 5                      | 235.80 $\pm$ 2.86               | 8.76 $\pm$ 1.00 <sup>3)</sup>  | 3.71 $\pm$ 0.43 <sup>4)</sup> |
|      | 50                     | 239.80 $\pm$ 3.71               | 8.55 $\pm$ 0.79 <sup>3)</sup>  | 3.56 $\pm$ 0.31 <sup>4)</sup> |
|      | 500                    | 242.40 $\pm$ 4.78 <sup>3)</sup> | 8.61 $\pm$ 0.58 <sup>4)</sup>  | 3.49 $\pm$ 0.21 <sup>4)</sup> |

注:与正常组相比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组相比<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

**3.2 肝脏形态观察** 正常大鼠肝脏红润柔软;模型对照组肝脏充血、色泽暗黄,脾脏无明显增大。与模型大鼠比较,茯苓多糖高剂量组大鼠肝脏色泽较红润,暗黄程度有所减轻。

**3.3 病理组织学 HE 染色观察** 正常大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排

列,汇管区及肝小叶间可见少量炎症细胞,这些细胞较小,形态观察不清。与正常大鼠比较,模型对照组大鼠肝细胞肿胀,坏死。肝小叶部分有团块状坏死区域,坏死区有大量的炎性细胞浸润和肝细胞肿着。茯苓多糖高剂量组明显改善炎性浸润及坏死区域的数量及程度。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C 茯苓多糖 5 mg·kg<sup>-1</sup>组;D. 茯苓多糖 50 mg·kg<sup>-1</sup>组;E. 茯苓多糖 500 mg·kg<sup>-1</sup>组

图 1 茯苓多糖对 ANIT 大鼠黄疸模型肝脏病理的影响(HE,  $\times 200$ )

**3.4 大鼠肝功能变化** 造模后大鼠肝功能与正常组相比,AST,ALT 活性及 TBil 含量显著升高( $P < 0.01$ ,表 3)。与模型组比,茯苓多糖高剂量组明显减轻黄疸大鼠血清 ALT 和 AST 活性及 TBil 含量( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。中、低剂量组可以改善黄疸大鼠肝功能状况( $P < 0.05$ ),但效果没有高剂量组显著。

**3.5 各组大鼠肝组织炎症因子 mRNA 表达情况**

与正常组比较,模型大鼠肝组织 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  mRNA 表达显著升高,分别为正常组的 14.24 和 10.65 倍( $P < 0.01$ );与模型组相比,茯苓多糖中、高剂量均有显著降低炎症因子表达( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。其中以高剂量最为显著。与正常大鼠相比,模型大鼠肝脏 IL-4 mRNA 水平显著下降( $P < 0.01$ );与模型组相比,茯苓多糖中、高剂量 IL-4 水平显著升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。

表 3 茯苓多糖对 ANIT 黄疸模型肝功能相关指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别   | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | TBil/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | ALT/U·L <sup>-1</sup>        | AST/U·L <sup>-1</sup>        |
|------|------------------------|---|------------------------------|------------------------------|
| 正常   | -                      | 2.82 ± 0.89 <sup>4)</sup>               | 26.40 ± 4.93 <sup>4)</sup>   | 49.60 ± 3.13 <sup>4)</sup>   |
| 模型   | -                      | 148.80 ± 21.94 <sup>2)</sup>            | 166.60 ± 8.64 <sup>2)</sup>  | 412.20 ± 31.38 <sup>2)</sup> |
| 茯苓多糖 | 5                      | 134.40 ± 21.41                          | 160.80 ± 26.37               | 382.20 ± 19.68               |
|      | 50                     | 110.00 ± 29.63 <sup>3)</sup>            | 146.00 ± 16.51 <sup>3)</sup> | 361.00 ± 31.90               |
|      | 500                    | 44.40 ± 11.80 <sup>4)</sup>             | 111.60 ± 5.03 <sup>4)</sup>  | 300.20 ± 16.07 <sup>3)</sup> |

表 4 茯苓多糖对 ANIT 黄疸模型大鼠细胞因子 mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别   | 剂量/mg·kg <sup>-1</sup> | TNF- $\alpha$              | IL-1 $\beta$               | IL-4                      |
|------|------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 正常   | -                      | 1.12 ± 0.13 <sup>4)</sup>  | 1.15 ± 0.12 <sup>4)</sup>  | 1.13 ± 0.19 <sup>4)</sup> |
| 模型   | -                      | 10.65 ± 1.63 <sup>2)</sup> | 14.24 ± 1.03 <sup>2)</sup> | 0.33 ± 0.04 <sup>2)</sup> |
| 茯苓多糖 | 5                      | 9.18 ± 1.12                | 11.81 ± 1.14               | 0.40 ± 0.14               |
|      | 50                     | 8.44 ± 1.08 <sup>3)</sup>  | 9.58 ± 1.71                | 0.55 ± 0.04 <sup>3)</sup> |
|      | 500                    | 5.14 ± 1.01 <sup>4)</sup>  | 4.36 ± 1.47 <sup>4)</sup>  | 0.69 ± 0.07 <sup>4)</sup> |

#### 4 讨论

ANIT 诱导的大鼠肝损伤是较为经典的黄疸模型, ANIT 对肝实质细胞损伤明显, 引起血液中胆红素和转氨酶急剧升高, 模型组与正常组比较血清 ALT, AST 活性, TBil 含量均极显著升高, 肝组织病理切片可见毛细胆管大量增生, 胆管上皮坏死, 大量炎症细胞浸润, 表明造模成功。茯苓多糖干预后改善肝功能以茯苓多糖高剂量组最为显著。在此基础上, 我们对茯苓多糖的作用机制做了探讨。茯苓多糖一个重要的作用就是免疫调节。炎症与机体免疫系统关系密切, 是肝损伤起始因素, 因此, 我们研究 ANIT 模型中的炎症因子的变化。结果表明免疫功能紊乱明显。在模型进展过程中促炎症因子升高非常明显, 为正常组的 10 多倍, 相对促炎症因子相比, 抗炎症的因子变化不明显。结合模型实际, 本模型形成较快, 模型时间较短, 所以促炎症因子的变化较抗炎症因子变化明显的多。同时也提示, 对 ANIT 大鼠黄疸模型来说, 炎症是本模型重要的病理变化, 而促炎症则是重中之重, 因此, 选择具有免疫抑制的药物可能是本模型较理想的药物。

基于复方的临床疗效, 进行实验水平药物复方的筛选, 进而明确起作用的有效组分是中药现代化的重要研究方法; 应用成分明确、作用又确切的有效组分于未知的疾病, 可以发现药物的新的用途, 扩大了药物的应用范围, 是新药研发的一个重要方法之一, 也为临床应用提供了基础依据<sup>[10-11]</sup>。

#### [参考文献]

[1] 陆云飞, 慕永平, 陈晓蓉. 消黄方对异硫氰酸- $\alpha$ -萘酯诱导大鼠急性肝的干预作用研究[J]. 甘肃中医,

2009, 22(8):68.

[2] 陆云飞, 陈晓蓉, 慕永平, 等. 消黄方联合西药治疗难治性黄疸 51 例临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(5):60.

[3] 贺福元, 邓凯文, 刘文龙, 等. 中药复方对人体作用本质: “网通虹势”的多重遗传谱效动力学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2):240.

[4] 陈燕, 李世刚. 中药多糖防治类风湿性关节炎的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):202.

[5] 邵祥龙, 苏日娜, 李伟立, 等. 茯苓多糖抗肿瘤作用研究进展[J]. 北京中医药, 2009, 28(4):315.

[6] 谢国秀, 王英艳, 杨忠东, 等. 茯苓多糖对流感灭活疫苗的免疫增强作用[J]. 生命科学研究, 2009, 13(6):246.

[7] 潘国辉, 梁世香, 谢和平. 中药致药源性肝损伤的氧化应激机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):247.

[8] Schaffner F, Scharnbeck H H, Hutterer F, et al. Mechanism of cholestasis. VII-Naphthylisothiocyanate-induced jaundice[J]. Lab Invest, 1973, 28(3):321.

[9] Cheng Liu, Qing Tao, Ping Liu, et al. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats[J]. Lab Invest, 2010, 90(12):1805.

[10] 王君明, 崔瑛, 沈玲玲, 等. 中药致药源性肝损伤的氧化应激机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):247.

[11] 郑帅, 李忠廉. 大柴胡汤对阻塞性黄疸患者术后血清 TBil, ALT, AST 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23):231.

[责任编辑 聂淑琴]