

保肝 I 号对急慢性肝损伤的保护作用

何莘莘¹, 宋从从¹, 孟薇薇^{1*}, 邓玉林^{1*}, 戴荣继¹, 林凡凯¹, 陈艳², 赵应红³, 黄钰娟¹

(1. 北京理工大学生命学院, 北京 100081; 2. 北京理工巨元医药技术开发中心有限公司, 北京 100081;
3. 云南西双版纳州民族医药研究所, 云南 景洪 666100)

【摘要】 目的: 探讨傣药保肝 I 号(BGYH)对急慢性肝损伤的保护作用。方法: 采用 iv 卡介苗(BCG, 1.5×10^7 个活菌数/只) + 脂多糖(LPS, $10 \mu\text{g}/\text{只}$)造成小鼠急性免疫性肝损伤模型, 后连续 ig 保肝 I 号低、中、高($5.1, 10.2, 20.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量 12 d; 采用 iv 刀豆蛋白(Con A, $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)造成小鼠急性免疫性肝损伤模型, 后连续 ig 保肝 I 号低、中、高($5.1, 10.2, 20.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量 7 d; 采用 sc CCl_4 (40%)大豆油溶液建立大鼠慢性肝纤维化模型, 后连续 ig 保肝 I 号低、中、高($0.14, 0.28, 0.56 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量 8 周。各组动物取血, 测定血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活力, 并取肝脏做病理切片, 观察肝组织病变, 测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白蛋白(Alb), 测肝组织中羟脯氨酸(Hyp)含量。结果: 在 BCG + LPS 模型中, 保肝 I 号能显著降低 ALT, AST 活力和肝脏指数(HI); 在 ConA 模型中, 保肝 I 号能显著降低 AST, ALT, TNF- α 的活力; 在 CCl_4 复合因素诱导的大鼠慢性肝损伤模型中, 保肝 I 号能显著降低 AST, ALT, 升高 Hyp, 能显著升高 Alb 含量, 且保肝 I 号能减轻各模型动物肝脏病变。结论: 保肝 I 号对急慢性肝损伤具有较好的保护作用。

【关键词】 保肝 I 号; 免疫性肝损伤; 肝纤维化; 保肝作用

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2012)02-0195-04

Protective Effect of Baogan Yihao on Acute and Chronic Hepatic Injury

HE Ping-ping¹, SONG Cong-cong¹, MENG Wei-wei^{1*}, DENG Yu-lin^{1*}, DAI Rong-ji¹,
LIN Fan-kai¹, CHEN Yan², ZHAO Ying-hong³, HUANG Yu-mei¹

(1. School of Life Science, Beijing Institute of Technology (BIT), Beijing 100081, China;
2. Beijing BIT & Gen Yuan Pharmaceutical R & D Co., LTD., Beijing 100081, China;
3. Dai Medicine Research Institute of Xishuang Banna, Jinghong 666100, China,)

【Abstract】 **Objective:** To investigate the protective effect of Dai medicine Baogan Yihao (BGYH) on acute and chronic liver injury. **Method:** Three kinds of animal model were established in this study. Acute model of immunological hepatic injury was established by iv Bacillus Calmette-Guerin (BCG) + Lipopolysaccharide (LPS) in mouse, and ConA respectively. Rat model of chronic hepatic fibrosis was developed by ih of (CCl_4). BGYH with high, medium and low doses were orally administrated. Activity of alanine aminotransferase (ALT) and spartate aminotransferase (AST) in serum was determined, and pathological changes in liver were also examined. **Result:** BGYH at the concentration of $20.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ showed significantly inhibition on the acute immunological liver injury in mice induced by BCG + LPS and ConA; BGYH at the concentration of $0.56 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ also inhibited the chronic hepatic fibrosis induced by CCl_4 in rat model. And BGYH showed protection for hepatic lesions in animal models. **Conclusion:** BGYH can obviously protect acute and chronic liver injuries.

【Key words】 Baogan Yihao; immunological liver injury; liver fibrosis; hepatoprotective effect

【收稿日期】 20110902(007)

【第一作者】 何莘莘, 硕士研究生, E-mail: pingguo1988@yahoo.com.cn

【通讯作者】 * 孟薇薇, 副教授, Tel: 01068918082, E-mail: mww919@bit.edu.cn

* 邓玉林, Tel: 13501125130, E-mail: deng@bit.edu.cn

保肝 I 号(BGYH)是西双版纳州民族医药研究所临床医师以傣医理论为基础,从传统经验处方中筛选出的复方制剂,主要含有丹参、五味子、柴胡和山楂等药物,具有健脾舒肝、活血止痛、保肝利胆等功能,临床上对病毒性肝炎和肝损伤具有独特的疗效。本文以保肝 I 号为研究对象,利用卡介苗 + 脂多糖(BCG + LPS),ConA 诱导小鼠急性免疫性肝损伤模型和 CCl₄ 复合因素诱导大鼠慢性肝纤维化模型,针对保肝 I 号对急慢性肝损伤的保护作用开展实验性研究,为临床应用及该药物的进一步开发提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 保肝 I 号(主要含丹参、五味子、柴胡和山楂等),药材购自西双版纳州民族医药研究所,后经实验室水提所得,实验时用蒸馏水溶解;联苯双酯滴丸,北京协和药厂产品,批号 09040101;复方鳖甲软肝片,内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司出品,批号 20081001。

1.2 动物 ICR 雄性小鼠,体重 20 ~ 22 g; SD 雄性大鼠,体重 180 ~ 200 g,清洁级,均由北京大学医学部实验动物科学部提供,合格证号 SCXK(京)2006-0008。

1.3 试剂 谷丙转氨酶(ALT)试剂盒、谷草转氨酶(AST)试剂盒、白蛋白(ALB)试剂盒、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒,均为南京建成生物工程研究所产品,批号 20100513;刀豆蛋白 A(ConA),北京拜尔迪生物技术有限公司产品;四氯化碳(CCl₄,分析纯)为天津市福晨化学试剂厂产品;卡介苗原浆注射液(60 mg/支),北京生物制品研究所产品,批号 20100413;脂多糖为 Sigma 公司产品。

1.4 仪器 TU-1810 紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司产品;SL202N 电子天平,上海民桥精密科学仪器有限公司产品。

2 方法

2.1 对 BCG + LPS 诱导小鼠免疫性肝损伤的影响 取 ICR 小鼠 60 只,随机分为正常组、模型组、BGYH 高、中、低剂量给药组、阳性对照组,共 6 个组。BGYH 给药组按照 20.4, 10.2, 5.1 g·kg⁻¹ 剂量,阳性对照组以联苯双酯 3.12 g·kg⁻¹ ig,正常组、模型组以等体积蒸馏水 ig,20 mL·kg⁻¹,共 12 d;第 1 天,模型组和给药组按 0.2 mL/只 iv 卡介苗(每毫升含 1.5 × 10⁷ 个活菌数),致敏 12 d 后,iv 脂多糖 10 μg/只,正常对照组每只小鼠 iv 等容积生理盐水。禁食不禁水,14 h 后,摘眼球取血,所得血液离

心后取上清,比色法测定血清 ALT,AST 活性,计算肝脏指数(HI, g·100 g 体重),取肝组织左叶,用 10% 甲醛溶液固定,进行 HE 染色,光镜下观察。组织病理检查结果按肝细胞变性、坏死和炎细胞浸润等主要病理变化的程度综合判断分级,分级后作权重评分。评分标准:出现肝细胞变性、坏死及炎细胞浸润,平均每个低倍视野病灶小于 5 个,计 1 分;平均每个低倍视野病灶 5-10 个,计 2 分;平均每个低倍视野病灶大于 10 个,计 3 分。

2.2 对 ConA 诱导小鼠免疫性肝损伤的影响 实验分组、给药同 2.1,共给药 7 d。末次给药后 2 h,模型组及各给药组 1 次性 iv ConA 15 mg·kg⁻¹,正常对照组则每只小鼠 iv 10 mL·kg⁻¹ 生理盐水。禁食不禁水,8 h 后,摘眼球取血,所得血液离心后取上清,ELISA 法测定 TNF- α 活性;其他指标检测同 2.1。

2.3 对 CCl₄ 复合因素诱导大鼠肝纤维化的影响 实验分组同 2.1。BGYH 给药组按照 0.56, 0.28, 0.14 g·kg⁻¹ 剂量 ig,阳性对照组以复方鳖甲软肝片 0.56 g·kg⁻¹ ig,正常组、模型组以等体积(10 mL·kg⁻¹)蒸馏水 ig。模型组及给药组按照 3 mL·kg⁻¹ (首次量 5 mL·kg⁻¹) sc 40% CCl₄ 的大豆油溶液,每周 2 次,持续 8 周。模型组及给药组大鼠皆用高脂低蛋白饲料(79.5% 玉米粉 + 20% 猪油 + 0.5% 胆固醇)喂养,正常对照组给予普通饲料。末次给药后,大鼠禁食不禁水 12 h。各组大鼠心脏取血,所得血液离心后取上清,取部分肝脏组织于液氮中保存,按照试剂盒说明检测肝组织中的 Hyp 含量。其他指标检测同 2.1。

2.4 统计方法 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 BCG + LPS 诱导小鼠免疫性肝损伤的影响 小鼠 iv LPS 后,ALT,AST 活力和肝脏指数明显升高;小鼠灌服 BGYH 后,ALT,AST 活力和肝脏指数明显下降。病理学结果显示,正常组小鼠肝小叶结构清晰,索窦比例正常,汇管区未见纤维组织增生及炎细胞浸润。与正常组相比,模型组小鼠出现灶性肝细胞坏死和炎细胞浸润现象。与模型组相比,各给药组小鼠的肝脏病变均有显著减轻,结果见表 1,图 1。

3.2 对 ConA 诱导小鼠免疫性肝损伤的影响 小鼠 iv ConA 后,血清中 ALT,AST 活力和 TNF- α 水平均显著升高;小鼠灌服 BGYH 后,ALT,AST 活力和 TNF- α 水平明显下降。病理学结果显示,与正常组

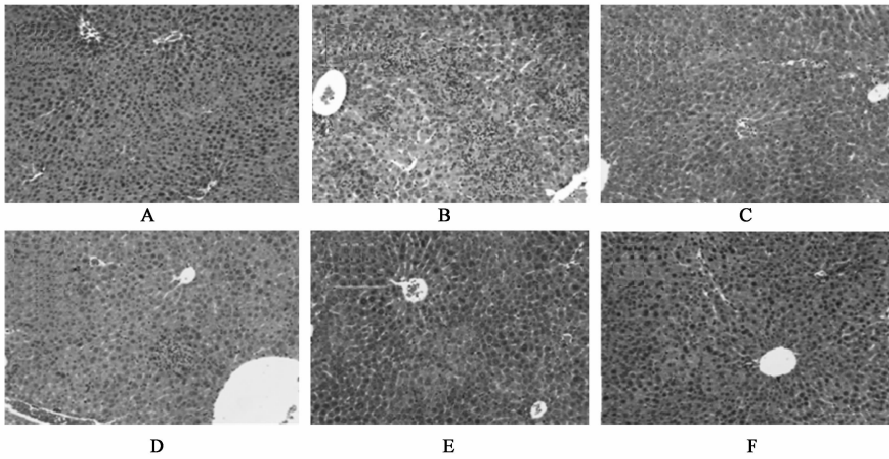
表 1 保肝 I 号对 BCG + LPS 诱导免疫性肝损伤模型小鼠的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	HI/g·(100 g) ⁻¹	权重评分
正常	-	8.39 ± 0.35 ²⁾	22.51 ± 1.92 ²⁾	4.67 ± 0.10 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾
模型	-	68.94 ± 13.50	66.85 ± 13.69	6.61 ± 0.14	1.89 ± 0.22
联苯双酯	0.6	24.21 ± 3.00 ²⁾	32.84 ± 2.30 ²⁾	6.35 ± 0.14	1.07 ± 0.16 ²⁾
保肝 I 号	5.1	33.60 ± 4.98 ²⁾	37.11 ± 2.33 ²⁾	6.07 ± 0.12 ²⁾	1.40 ± 0.13 ¹⁾
	10.2	36.25 ± 5.35 ²⁾	35.68 ± 2.77 ²⁾	6.13 ± 0.08 ²⁾	1.36 ± 0.17 ¹⁾
	20.4	28.85 ± 3.00 ²⁾	30.22 ± 1.88 ²⁾	6.21 ± 0.13 ¹⁾	1.27 ± 0.21 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

相比,模型组出现肝细胞变性,可见明显的点状坏死及局部灶性肝细胞凝固性坏死,肝窦扩张充血。与模型组相比,阳性药联苯双酯组和 BGYH 中、低剂

量组的小鼠肝脏未出现显著病理改善情况。BGYH 高剂量组小鼠的灶性肝细胞变性情况则有所减轻。见表 2。



A. 正常组; B. 模型组; C. 联苯双酯 0.6 g·kg⁻¹组; D, E, F. 保肝 I 号 5.1, 10.2, 20.4 g·kg⁻¹组

图 1 保肝 I 号对 BCG + LPS 诱导免疫性肝损伤模型小鼠肝脏病理的影响 (HE, × 100)

表 2 保肝 I 号对 ConA 诱导免疫性肝损伤模型小鼠的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	权重评分
正常	-	26.12 ± 11.33 ²⁾	86.75 ± 17.54 ²⁾	30.38 ± 3.94 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾
模型	-	248.72 ± 82.47	171.72 ± 56.31	113.41 ± 9.57	1.32 ± 0.33
联苯双酯	0.6	151.82 ± 68.47	149.22 ± 84.26	97.83 ± 3.81 ¹⁾	1.13 ± 0.20
保肝 I 号	5.1	121.84 ± 56.52 ¹⁾	132.98 ± 36.99	102.36 ± 7.92	1.25 ± 0.12
	10.2	120.96 ± 37.41 ¹⁾	99.07 ± 37.13 ¹⁾	100.57 ± 3.45	1.14 ± 0.22
	20.4	110.54 ± 28.89 ¹⁾	96.4 ± 33.41 ¹⁾	97.23 ± 2.39 ¹⁾	0.87 ± 0.19 ¹⁾

3.3 对 CCl₄ 复合因素诱导大鼠肝纤维化的影响
 生化学指标表明,与正常组相比,模型组大鼠血清 ALT,AST 活力和肝组织中 Hyp 含量显著升高,Alb 含量明显降低,大鼠灌服 BGYH 后,ALT,AST 活力和 Hyp 含量有所下降,Alb 含量有所升高。病理结果显示,正常组大鼠肝组织未见肝细胞脂肪变性、肝细胞坏死、肝纤维组织增生及炎细胞浸润。与正常组相比,模型组大鼠肝脏出现极重度肝细胞脂肪变

性的情况,肝脏纤维组织增生严重,大量纤维条索形成,假小叶形成,各大鼠肝脏均有炎细胞浸润。与模型组相比,阳性药复方鳖甲软肝片组和 BGYH 中、低剂量组的大鼠肝脏未出现显著病理改善情况。BGYH 高剂量组大鼠可见部分肝细胞结构完整,肝小叶结构可见,肝细胞气球样变及炎细胞浸润均有一定程度减轻,纤维细胞增生程度减轻,肝脏病变显著改善。见表 3。

表 3 保肝 1 号对 CCl₄ 复合因素致肝纤维化大鼠的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Alb/g·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	Hyp/μg·mg ⁻¹	权重评分
正常	-	35.09 ± 3.25 ²⁾	13.36 ± 3.75 ²⁾	26.96 ± 9.17 ¹⁾	29.29 ± 4.09 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾
模型	-	24.15 ± 1.6	26.62 ± 9.13	46.45 ± 11.59	63.11 ± 5.79	1.67 ± 0.45
联苯双酯	0.56	28.42 ± 4.15 ¹⁾	22.28 ± 6.61	34.36 ± 6.64 ¹⁾	45.19 ± 8.52 ¹⁾	1.35 ± 0.29
保肝 I 号	0.14	25.23 ± 3.45	24.56 ± 5.43	42.12 ± 8.76	58.23 ± 7.33	1.54 ± 0.36
	0.28	26.02 ± 3.92	22.98 ± 4.56	39.24 ± 6.78	56.36 ± 8.78	1.37 ± 0.28
	0.56	28.88 ± 1.89 ¹⁾	15.88 ± 4.42 ¹⁾	32.60 ± 7.63 ¹⁾	44.65 ± 3.41 ¹⁾	1.12 ± 0.21 ¹⁾

4 讨论

采用 BCG 联合 LPS 诱导及 ConA 单独诱导小鼠产生免疫性肝损伤的方法已有较多报道,其病理改变与肝损伤机制均与乙型病毒性肝炎相类似,主要与机体免疫应答有关^[1-4]。在本实验中, BGYH 能显著降低 BCG + LPS 及 ConA 诱导的急性免疫性肝损伤小鼠升高的血清转氨酶活力,使形态学上的肝细胞变性及坏死得到明显改善和恢复,且能降低 ConA 诱导的急性免疫性肝损伤炎症介质 TNF-α 水平,表明 BGYH 对免疫性肝损伤具有明显的保护作用,作用机制可能与调节机体免疫功能,抑制炎症因子产生有关。

肝纤维化是多种慢性肝病在疾病发展过程中共同的病理基础,是肝细胞外基质合成与降解失衡从而导致其过度沉积的结果。胶原蛋白是细胞外基质的主要组成成分,而羟脯氨酸(Hyp)是胶原蛋白中独特的氨基酸成分,其在肝脏中的含量可反映肝细胞外基质合成情况^[5-9]。在 CCl₄ 复合因素诱导大鼠肝纤维化模型中, BGYH 能降低转氨酶活力和羟脯氨酸(Hyp)含量,提高 ALB 含量,并能改善肝细胞脂肪变性及炎细胞浸润,减轻纤维细胞增生程度,改善肝功能,表明 BGYH 对肝纤维化具有明显的保护作用,作用机制可能是通过抗脂质过氧化,抑制肝细胞外基质合成而产生抗肝纤维化作用。

综上所述, BGYH 在 BCG + LPS 联合诱导及 ConA 单独诱导小鼠急性免疫性肝损伤实验及 CCl₄ 复合因素致大鼠慢性肝纤维化实验中表现出较好的肝脏保护作用,前期实验与临床研究表明, BGYH 具有降低转氨酶、保护肝脏以及改善肝炎症状的作用,

且停药后并不反跳,对于肝脏的保护作用较持久。但目前对 BGYH 抗肝损伤的作用机制尚不清楚,因此其作用机制还需进行深入的研究。

[参考文献]

- [1] 何景华, 张慧娜, 林志彬. FTY720 对免疫性肝损伤保护作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(1): 101.
- [2] Marcel L, Albrecht W. A novel mechanism of murine hepatocyte death inducible by Concanavalin A [J]. J Hepatology, 1996, 25: 948.
- [3] 王根生. 一氧化氮和肿瘤坏死因子在小鼠免疫性肝损伤中的作用及抗肝炎新药 SY801 和 SY640 的影响[J]. 生理科学进展, 1996, 27(1): 47.
- [4] 刘光伟, 王春芳, 王灵台, 等. 健脾清化方抗刀豆蛋白 A 诱导的肝损伤免疫学机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 164.
- [5] 宋军, 王晓东, 赵军宁. 芍药甘草汤提取物(芍甘多昔)对实验性肝损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(2): 40.
- [6] 马骏, 夏仁福, 朱书强. 肝纤胶囊对急性慢性肝损伤的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(2): 70.
- [7] Scott L, Friedman. Liver fibrosis-from bench to bedside [J]. Hepatology, 2003, 38(5): 36.
- [8] 欧贤红, 吕林艳, 郑作文. 藤茶提取物抗慢性肝纤维化作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 132.
- [9] 徐晶晶, 彭蕴茹, 沈明勤, 等. 藏药朗庆阿塔对四氯化碳所致肝纤维化大鼠的治疗作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1145.

[责任编辑 聂淑琴]