

# 博落回提取物对实验性肝纤维化的防治作用

曾建国<sup>1,2,3\*</sup>, 肖俐<sup>2,3</sup>, 王宇红<sup>2</sup>, 刘林<sup>2</sup>, 钟明<sup>3</sup>, 贺晓华<sup>3</sup>, 柳亦松<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学, 长沙 410128; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208;  
3. 湖南省中药提取工程研究中心, 长沙 410331)

**[摘要]** 目的:观察博落回提取物(*Macleaya cordata extract*, MCE)对实验性肝纤维化的防治作用。方法:采用 CCl<sub>4</sub> 复合因素诱导的大鼠肝纤维化和小鼠血吸虫肝纤维化 2 种模型,观测 MCE 干预后肝指数、肝功能生化指标[丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)]、血清纤维化指标[Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、层黏连蛋白(LN)、透明质酸(HA)]、脂质过氧化指标[谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)],肝组织Ⅰ型胶原(CoⅠ)、Ⅲ型胶原(CoⅢ)及羟脯氨酸(Hyp)表达的变化,并做肝脏病理学检查。结果:在 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化大鼠模型中,MCE 各剂量预防组肝指数,AST 含量及 CoⅠ 表达明显降低,高剂量预防组 LN 及 CoⅢ 表达明显降低;中剂量预防组 MDA 含量及 CoⅢ 表达明显降低;MCE 治疗组肝指数、HA,MDA 含量及 CoⅢ 表达明显降低;经 MCE 防治后大鼠肝纤维化程度有不同程度减轻。在小鼠血吸虫肝纤维化模型中,MCE 预防组小鼠 Hyp 及 CoⅠ 表达明显降低;高剂量治疗组小鼠肝指数、PCⅢ, LN, HA, AST, ALT 含量及 CoⅠ 表达显著降低,中剂量治疗组 PCⅢ, HA, AST, ALT 含量明显降低;MCE 治疗给药能明显改善模型小鼠肝脏病变。结论:MCE 对实验性肝纤维化有一定的防治作用,其机制可能与其保护肝细胞膜、减轻肝脏炎症及抗脂质过氧化作用有关。

**[关键词]** 博落回提取物;四氯化碳;血吸虫;肝纤维化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0134-07

**[收稿日期]** 20110518(015)

**[基金项目]** 科技部国际科技合作计划(2009DFA31270)

**[通讯作者]** \* 曾建国,博士,教授,硕士生导师,从事天然产物的开发及应用研究, Tel:13808453398, Fax:0731-84673824, E-mail:ginkgo@world-way.net

(dummy variable),又称为哑变量、二进制变量。若某定性变量有  $d$  个水平,它可以用通常因素水平的安排法进行设计。但在分析时,它不是对应 1 个连续变量,而是对应  $(d - 1)$  个相对独立的虚拟变量。这样就导出了含有定性状态因素均匀设计分析的特殊性。

**4.2 定性均匀设计与本实验** 当归补血汤作为补气生血代表方<sup>[4]</sup>,方中虽仅含 2 味药,但组方原则较严谨、临床疗效确切,其基础药效与临床研究积累较多。因此本实验选择确有疗效的小复方作为配伍研究的介入点,对其他的补气生血药对进行最佳配伍的研究。首先测定造模后不同时间外周血液指标的变化,确定药效变化最明显的时间点,然后运用主成分分析分析法找出主因子,进一步建立定性均匀设计的线性逐步回归方程,得出补气生血方剂的最佳配伍,充分证明了定性均匀设计用于中医方剂最佳配伍的研究可行性。在实验过程中,必须保证造模前组与组之间的外周血象值没有差异,如存在差异,需重新分组消除差异,否则会影响后面实验结果的准确性。

## [参考文献]

- [1] 王柱,方开泰. 含有定性因素的均匀设计[J]. 数理统计与管理,1999,18(5):11.
- [2] 王柱,方开泰. 带有定性因素的均匀设计的均匀性度量准则[J]. 数理统计与管理,2000,19(3):28.
- [3] 陈艳云,胡卓炎,余小林,等. 微波加热下美拉德反应条件的优化研究[J]. 研究与探索,2005,26(8):62.
- [4] 郑中甲. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社,2005:163.
- [5] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2006:674.
- [6] 温建华,束彤,王茜,等. 主成分分析用于中药小蓟不同部位元素的研究[J]. 微量元素与健康研究,2010,27(3):26.
- [7] 章晓英. 虚拟变量在线性回归模型中的应用[J]. 重庆工业管理学院学报,1998,12(2):86.
- [8] 胡占嵩,乔卫,金桂红,等. 均匀设计法优选酸枣仁合欢方抗抑郁作用的最佳配伍[J]. 中药材,2010,33(4):603.
- [9] 倪永年. 化学计量学在分析化学中的应用[M]. 北京:科学出版社,2004.

[责任编辑 聂淑琴]

## Experimental Study on Antagonizing Liver Fibrosis of *Macleaya cordata* Extract

ZENG Jian-guo<sup>1,2,3\*</sup>, XIAO Li<sup>2,3</sup>, WANG Yu-hong<sup>2</sup>, LIU Lin<sup>2</sup>, ZHONG Ming<sup>3</sup>, HE Xiao-hua<sup>3</sup>, LIU Yi-song<sup>1</sup>

(1. Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. Hunan Engineering Research Center of Botanical Extract, Changsha 410331, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the preventive and therapeutic effects of *Macleaya cordata* extract (MCE) on experimental liver fibrosis. **Method:** Experimental liver fibrosis models were induced by injection of carbon tetrachloride in combination with the drinking of 5% alcohol on rats and *Schistosoma japonicum* infection in mice. The effect of MCE on anti-hepatic fibrosis was evaluated by comparing the liver index, tissue biochemical indices (ALT, AST), lipid peroxidation indices (GSH-Px, MDA, SOD), serum fibrosis indices (HA, PC III, LN), the expression levels of Hyp and collagen type I, III (Co I, Co III), the liver pathology before and after MCE intervention. **Result:** In CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis model in rats, Compared with model group, the liver index, the level of AST, the expression of Co I were obviously decreased in MCE preventive groups, and high-dose preventive MCE could significantly reduce the content of LN and the expression of Co III, middle-dose preventive MCE could significantly reduce the content of MDA and the expression of Co III. The liver index, the contents of HA, MDA, the expression of Co III were significantly decreased in MCE therapeutic group; in *S. japonicum*-induced liver fibrosis model in mice, preventive MCE could significantly reduce the content of ALT, the expression of Hyp and Co I; the liver index, the contents of PC III, LN, HA, AST, ALT in serum and the expression of Co I were significantly decreased in high-dose MCE therapeutic group, and middle-dose therapeutic MCE could significantly reduce the levels of PC III, HA, AST, ALT. In addition, the hepatic histopathology were also improved in varying degrees after MCE intervention. **Conclusion:** MCE has preventive and therapeutic effects on experimental liver fibrosis by inhibiting hepatic lipid peroxidation and alleviating the inflammation.

**[Key words]** *Macleaya cordata* extract (MCE); carbon tetrachloride; *Schistosoma japonicum*; liver fibrosis

博落回 *Macleaya cordata* (Wild.) R. Br 为罂粟科博落回属植物,药用其带根全草,味辛、苦,性温<sup>[1]</sup>,具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、杀虫杀蛆、增强免疫力等多种功效<sup>[2-5]</sup>。博落回提取物 (*Macleaya cordata* extract, MCE) 的主要成分为血根碱与白屈菜红碱,已有文献报道,对多种药物所致的急性肝损伤,博落回显示出良好的改善肝功能,保护细胞膜的作用<sup>[6]</sup>;有研究者发现白屈菜红碱能明显降低肝纤维化大鼠肝脏中羟脯氨酸含量<sup>[7]</sup>及 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA 的表达水平<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究显示低浓度的血根碱及白屈菜红碱对日本血吸虫尾蚴有一定的杀灭作用<sup>[9-10]</sup>,在此基础上,本实验通过 CCl<sub>4</sub>复合因素诱导的大鼠肝纤维化与小鼠血吸虫肝纤维化 2 种模型,观察 MCE 对实验性肝纤维化的防治作用,并探讨其可能的作用机制。

### 1 材料

**1.1 药品与试剂** MCE(总生物碱含量 > 60%)由湖南省中药提取工程研究中心提供,批号 MCE080906;秋水仙碱由云南昊邦制药有限公司出品,批号 080709;吡嗪酮由南京制药厂有限公司生产,批号 20070606。CCl<sub>4</sub>由长沙湘科精细化工厂生产,批号 20070515;碘透明质酸(HA)、碘层粘连蛋白(LN)、碘Ⅲ型胶原 N 端肽放射免疫分析药盒、谷胱甘肽-S 转移酶(GSH-Px)、考马斯亮蓝蛋白均由北京科美东雅生物技术有限公司提供,批号分别为 20081225, 20090125, 20081225, 20081224, 20090114;丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒均由长春汇丽生物技术有限公司提供,批号分别为 080951, 080421;羟脯氨酸(Hyp)试剂盒由 santa Cruz 公司提供;兔抗鼠 I 型胶原(Co

I) 及 III 型胶原 (Co III) 抗体, SABC 试剂盒, DAB 显色试剂盒均由武汉博士得生物工程有限公司提供; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 均由南京建成生物工程研究所提供, 批号均为 20081224。

**1.2 动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 136 只, 体重 (180 ± 20) g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 合格证号 0047485; SPF 级 ICR 小鼠 224 只, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22 g, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 0047461。

**1.3 仪器** TG16-WS 台式高速离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; RT-1904C 半自动生化分析仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司; LEICA DM LB2 型双目显微镜, 德国 LEICA 公司; Shandon325 型石蜡切片机, 英国 Shandon 公司; MIAS 医学图像分析系统, 北航公司; Motic B5 显微摄像系统, 麦克奥迪实业集团公司。

## 2 方法

### 2.1 MCE 对 CCl<sub>4</sub> 致大鼠肝纤维化模型的影响

**2.1.1 分组、造模及给药** 136 只大鼠按体重分层, 随机分成 7 组: 正常组, 模型组, 秋水仙碱组 (0.2 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), MCE 高、中、低剂量 (60, 30, 15 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) 预防组, MCE 治疗组 (30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。模型组 40 只大鼠, 其余各组均 16 只。除正常组外, 其余各组大鼠首次背部 sc 40% 的 CCl<sub>4</sub> 油剂 (V<sub>CCl<sub>4</sub></sub>/V<sub>花生油</sub>) 5 mL·kg<sup>-1</sup>, 以后按 3 mL·kg<sup>-1</sup> 剂量 sc 40% CCl<sub>4</sub> 油剂, 每周 2 次, 连续 8 周, 建立肝纤维化模型。秋水仙碱组与 MCE 预防组于造模的同时 ig 给药至第 8 周末; MCE 治疗组先造模 8 周后 ig 给药至第 12 周末。除正常组给予蒸馏水外, 其余各组以 5% 乙醇为饮水 (注射 CCl<sub>4</sub> 前 1 d 把乙醇换成清水)。

**2.1.2 取材及指标观测** MCE 治疗组于第 12 周末, 其余各组于第 8 周末处死动物 (模型组于第 8 周末随机处理 6 只大鼠, 剩余大鼠继续造模至第 12 周末处理)。处理前, 各大鼠禁食不禁水 12 h, 称重, 用水合氯醛麻醉, 取血, 分离血清, 放免法检测血清 PC III, LN, HA 水平; 用半自动生化分析仪检测血清 ALT, AST 含量; 取肝脏称量, 计算肝指数; 取肝组织, 4% 多聚甲醛的 PBS 溶液固定, 免疫组化染色观察肝组织中 Co I, Co III 及 Hyp 表达, 用 MIAS 医学图像分析系统检测 Co I, Co III 的表达与 Hyp 的目标总面积; 取肝组织匀浆, 按试剂盒说明检测肝组织 GSH-Px, MDA, SOD 水平; 取肝左叶, 10% 甲醛固定, 乙醇逐级脱水, 石蜡包埋, 常规 HE 染色, 光镜下观察病理改变, 并参照 2000 年西安全国肝病会议通过

的标准<sup>[11]</sup>进行肝纤维化病理学分级: 0 级: 正常肝脏, 未见肝纤维化; 1 级: 包括汇管区、汇管区周围纤维化和局限窦周纤维化或小叶纤维瘢痕, 二者均不影响小叶结构的完整性; 2 级: 可见纤维间隔即桥接纤维化, 虽有纤维间隔形成, 但小叶结构大部仍保留; 3 级: 大量纤维间隔, 分隔并破坏肝小叶, 致小叶结构紊乱, 但尚无肝硬化; 4 级: 早期肝硬化, 肝实质广泛破坏, 弥漫性纤维增生, 被分隔的肝细胞团呈不同程度的再生及假小叶形成。

### 2.2 MCE 对小鼠血吸虫纤维化模型影响

**2.2.1 分组、造模及给药** 从 224 只小鼠按体重随机抽取 28 只, 雌雄各半, 不做任何处理, 正常方法饲养 14 周, 作为正常对照组。余下小鼠经腹部皮肤感染血吸虫尾蚴 (24 条/只) 6 周后, 按体重分层, 随机分成 7 组: 模型组、吡喹酮组 (200 mg·kg<sup>-1</sup>)、秋水仙碱组 (0.2 mg·kg<sup>-1</sup>)、MCE 预防组 (30 mg·kg<sup>-1</sup>)、MCE 高、中、低剂量 (30, 15, 7.5 mg·kg<sup>-1</sup>) 治疗组, 各 28 只。处理方法如下: 模型组于感染 6 周后, 按 20 mL·kg<sup>-1</sup> 用生理盐水 ig; 吡喹酮组于感染 6 周后, 按 200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 用吡喹酮 ig 3 d, 杀灭成虫, 之后改为生理盐水, 剂量为 20 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 直至第 14 周; MCE 预防组于感染后第 1 天开始 ig 相应剂量的 MCE, 直至第 8 周; MCE 各治疗组及秋水仙碱组于感染 6 周后, 按 200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 用吡喹酮 ig 3 d, 之后给予相应剂量的 MCE 与秋水仙碱, 直至第 14 周。

**2.2.2 取材及指标观测** MCE 预防组于第 8 周末, 其余各组于第 14 周末将小鼠称重后处死 (模型组于第 8 周末随机处理 4 只小鼠), 取血, 分离血清, 检测 PC III, LN, HA, ALT, AST 含量; 取肝脏称量, 计算肝指数; 取肝组织, 检测 Co I, Co III 及 Hyp 表达, HE 染色, 光镜下观察病理改变, 并参考文献<sup>[12]</sup>进行肝组织病理程度分级: 0 级肝小叶结构正常, 肝细胞形态规则, 无明显变性、坏死, 未见纤维组织增生; I 级肝细胞水肿, 形态欠规则, 少量炎症细胞浸润, 虫卵肉芽肿形成, 密度 1 ~ 2 个/低倍镜, 肉芽肿周围和汇管区纤维组织增生不明显; II 级肝细胞形态不规则, 虫卵肉芽肿数量明显增多, 密度 3 ~ 5 个/低倍镜, 虫卵周围包裹梭形细胞和胶原纤维, 较多炎症细胞浸润; III 级肝内布满大小不等的类圆形虫卵肉芽肿, 虫卵周围大量的炎症细胞浸润, 纤维组织增生明显; IV 级肝内布满大小不等的类圆形虫卵肉芽肿, 虫卵周围大量炎症细胞浸润, 部分相邻的虫卵肉芽肿彼此相互融合成团, 周围纤维组织显著增生。取材及指标观测同 2.1.2。

**2.3 统计学处理** 以 SPSS 15.0 进行统计,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料组间差异性用  $t$  检验,等级资料采用秩和检验。 $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化模型大鼠的影响** 经 MCE 干预后,各考察指标的变化见表 1~2。结果显示,第 8 周末模型组大鼠脏器指数、血清纤维化指标,

ALT,AST 含量,Hyp 与胶原表达显著升高,GSH-Px 活性显著降低。与之相比,MCE 各剂量预防组肝指数,AST 含量及 Co I 表达显著降低;高剂量组 LN 含量及 Co III 表达明显降低;中剂量组 MDA 含量,Co III 表达明显降低。而 MCE 治疗组相比第 12 周末模型组大鼠,肝指数,HA,MDA 含量及 Co III 表达明显降低。

表 1 MCE 对 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化模型大鼠肝功能及生化指标的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	肝指数 /mg·g <sup>-1</sup>	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>	PCⅢ /μg·L <sup>-1</sup>	LN /μg·L <sup>-1</sup>	HA /μg·L <sup>-1</sup>
模型(第 8 周末)	-	4.15 ± 0.54	50.42 ± 6.46	199.28 ± 27.60	16.70 ± 4.41	45.32 ± 8.76	317.01 ± 136.58
正常	-	2.37 ± 0.04 <sup>2)</sup>	37.22 ± 9.30 <sup>1)</sup>	132.06 ± 22.39 <sup>2)</sup>	9.75 ± 1.33 <sup>2)</sup>	23.66 ± 6.42 <sup>2)</sup>	168.58 ± 35.12 <sup>1)</sup>
秋水仙碱	0.2	3.06 ± 0.38 <sup>2)</sup>	39.04 ± 10.96	137.49 ± 38.34 <sup>2)</sup>	11.95 ± 1.90 <sup>1)</sup>	30.20 ± 9.52 <sup>1)</sup>	171.97 ± 71.12 <sup>1)</sup>
MCE 预防	60	2.97 ± 0.38 <sup>2)</sup>	40.21 ± 10.05	121.81 ± 43.49 <sup>2)</sup>	12.91 ± 2.84	30.27 ± 9.40 <sup>1)</sup>	198.70 ± 43.89
	30	3.01 ± 0.22 <sup>2)</sup>	42.68 ± 7.25	124.55 ± 32.68 <sup>2)</sup>	14.34 ± 3.41	33.22 ± 11.64	224.33 ± 51.87
	15	2.99 ± 0.33 <sup>2)</sup>	43.32 ± 5.63	150.17 ± 23.02 <sup>2)</sup>	15.89 ± 4.64	35.66 ± 9.40	246.26 ± 41.11
模型组(第 12 周末)	-	3.99 ± 0.47	49.74 ± 6.07	127.60 ± 26.43	17.85 ± 5.65	35.15 ± 9.13	324.62 ± 42.62
MCE 治疗组	30	2.77 ± 0.12 <sup>2)</sup>	40.59 ± 15.40	97.18 ± 23.37	13.26 ± 1.87	24.23 ± 7.84	253.15 ± 60.82 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ,其中,秋水仙碱、MCE 各预防组与模型组(第 8 周末)进行比较,MCE 治疗组与模型组(第 12 周末)进行比较(表 2~3 同)。

表 2 MCE 对 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化模型大鼠抗氧化指标及肝纤维化指标的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

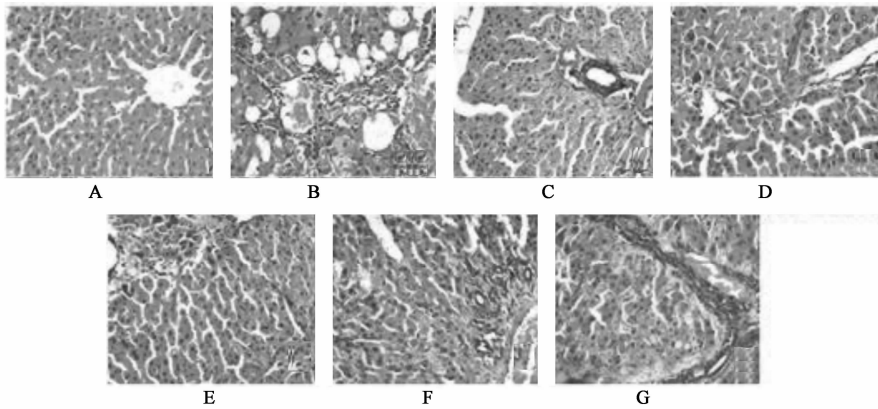
组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	GSH-Px /U·mg <sup>-1</sup>	SOD /U·mg <sup>-1</sup>	MDA /nmol·mg <sup>-1</sup>	Co I/A	Co III/A	Hyp 总面积 /μm <sup>2</sup>
模型(第 8 周末)	-	391.68 ± 131.69	325.78 ± 72.68	1.81 ± 0.66	105.08 ± 31.92	64.02 ± 17.26	537 839 ± 183 553
正常	-	551.90 ± 122.53 <sup>1)</sup>	394.57 ± 53.33	1.21 ± 0.26	14.90 ± 9.32 <sup>2)</sup>	13.11 ± 8.00 <sup>2)</sup>	252 270 ± 110 907 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	0.2	438.33 ± 133.26	389.12 ± 191.57	1.47 ± 0.98	32.72 ± 15.60 <sup>2)</sup>	28.92 ± 13.49 <sup>2)</sup>	326 465 ± 126 316 <sup>1)</sup>
MCE 高剂量预防	60	382.01 ± 154.24	377.20 ± 111.05	1.67 ± 0.81	36.71 ± 12.00 <sup>2)</sup>	36.05 ± 25.08 <sup>1)</sup>	340 984 ± 159 334
	30	381.51 ± 88.87	405.44 ± 224.96	1.19 ± 0.02 <sup>1)</sup>	41.82 ± 22.15 <sup>2)</sup>	38.24 ± 11.97 <sup>1)</sup>	390 014 ± 252 475
	15	377.16 ± 110.43	401.53 ± 211.86	1.47 ± 0.82	48.77 ± 37.86 <sup>1)</sup>	56.57 ± 36.92	481 821 ± 146 910
模型(第 12 周末)	-	401.98 ± 160.09	418.50 ± 66.73	3.92 ± 1.65	121.83 ± 93.59	127.53 ± 62.55	538 622 ± 242 794
MCE 治疗	30	467.07 ± 136.14	431.05 ± 92.67	2.15 ± 0.88 <sup>1)</sup>	45.45 ± 38.34	34.48 ± 10.91 <sup>2)</sup>	356 364 ± 274 197

MCE 对 CCl<sub>4</sub> 大鼠肝脏病理改变的影响见图 1,肝纤维化分级评定结果见表 3。结果表明,模型组大鼠肝小叶结构严重破坏,肝细胞脂肪变性、坏死,

门区大量纤维组织增生,肝组织中大量炎性细胞浸润,经 MCE 防治后大鼠肝组织病理损伤有不同程度的减轻,尤以高剂量组病理学改善较为突出。

表 3 MCE 对 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化模型大鼠肝脏病理改变的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	肝组织病变程度/例数					平均分
		0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级	
正常	-	6	0	0	0	0	0
模型(第 8 周末)	-	0	0	0	1	5	3.83 ± 0.41
秋水仙碱	0.2	1	4	1	0	0	1.00 ± 0.63 <sup>2)</sup>
MCE 预防	60	0	5	1	0	0	1.17 ± 0.41 <sup>2)</sup>
	30	0	4	1	1	0	1.50 ± 0.84 <sup>2)</sup>
	15	0	1	1	3	1	2.67 ± 1.03 <sup>1)</sup>
模型(第 12 周末)	-	0	0	1	2	3	2.33 ± 0.82
MCE 治疗	30	0	1	4	1	0	2.00 ± 0.63 <sup>2)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. 秋水仙碱  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; D. MCE  $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  治疗组; E. MCE  $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  预防组;  
F. MCE  $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  预防组; GMCE  $15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量预防组

图 1 博落回提取物对肝纤维化大鼠肝组织病理形态的影响(HE,  $\times 400$ )

**3.2 对小鼠血吸虫肝纤维化模型的影响** 第 14 周末模型组小鼠肝指数、血清纤维化指标、AST, ALT 含量、Hyp 与胶原表达明显升高。与之相比, MCE 高剂量治疗组肝指数、血清 PC III, LN, HA, AST, ALT 含量及 Co I 表达明显降低, 中剂量组血清 PC III, HA, AST, ALT 含量明显降低。而 MCE 预防组相比第 8 周末模型组小鼠 ALT 含量, Hyp 与 Co I 表达明显降低。见表 4。

MCE 对血吸虫肝纤维化小鼠肝脏病理改变的影响见图 2, 肝纤维化分级评定结果见表 5。结果表明, 模型组肝内汇管区及虫卵肉芽肿周围纤维增生明显, 大部分虫卵肉芽肿出现坏死病灶及纤维化, 肝细胞变性, 大量炎性细胞浸润, MCE 高、中剂量治疗组肝脏病变较模型组明显减轻, MCE 预防组病理切片形态与模型组不具明显差异。

表 4 MCE 对小鼠血吸虫肝纤维化模型的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 $/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	n	肝指数 $/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	PC III $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LN $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	HA $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	AST $/\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALT $/\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	Co I/A	Co III/A	Hyp 总面积 $/\mu\text{m}^2$
正常	-	6	$4.29 \pm 0.37^{2)}$	$19.88 \pm 8.30^{2)}$	$37.04 \pm 10.75^{2)}$	$119.04 \pm 43.11^{2)}$	$231.1 \pm 38.2^{2)}$	$59.9 \pm 19.9^{2)}$	$15.67 \pm 4.67^{2)}$	$22.85 \pm 14.74^{1)}$	$98.855 \pm 82.208^{2)}$
模型(第 14 周末)	-	6	$6.60 \pm 1.04$	$52.32 \pm 12.39$	$79.89 \pm 19.15$	$1343.88 \pm 382.12$	$346.7 \pm 63.8$	$130.5 \pm 42.7$	$60.38 \pm 22.00$	$54.65 \pm 25.82$	$692.009 \pm 438.072$
吡嗪酮	200	6	$5.75 \pm 0.86$	$46.22 \pm 8.40$	$72.16 \pm 10.25$	$1210.50 \pm 354.97$	$315.4 \pm 53.5$	$99.9 \pm 38.1$	$43.89 \pm 18.90$	$40.38 \pm 22.15$	$594.040 \pm 338.355$
秋水仙碱	0.2	6	$5.36 \pm 0.46^{1)}$	$30.68 \pm 8.87^{2)}$	$58.14 \pm 9.58^{1)}$	$768.60 \pm 208.72^{2)}$	$262.9 \pm 32.2^{1)}$	$62.4 \pm 23.0^{2)}$	$24.62 \pm 8.59^{2)}$	$27.94 \pm 8.27^{1)}$	$250.251 \pm 153.564^{1)}$
MCE 治疗	30	6	$5.27 \pm 0.61^{1)}$	$31.73 \pm 6.15^{2)}$	$59.15 \pm 11.24^{1)}$	$821.18 \pm 300.42^{1)}$	$276.15 \pm 33.4^{1)}$	$81.4 \pm 14.7^{1)}$	$33.66 \pm 13.78^{1)}$	$30.56 \pm 6.96$	$331.751 \pm 19.570$
	15	6	$5.42 \pm 1.10$	$34.75 \pm 7.02^{1)}$	$62.02 \pm 9.99$	$907.94 \pm 140.60^{1)}$	$278.8 \pm 33.7^{1)}$	$84.2 \pm 18.6^{1)}$	$44.46 \pm 22.43$	$38.00 \pm 17.65$	$411.178 \pm 182.022$
	7.5	6	$5.64 \pm 0.78$	$36.12 \pm 13.61$	$63.83 \pm 11.94$	$933.92 \pm 372.73$	$286.0 \pm 57.0$	$91.2 \pm 18.2$	$47.08 \pm 26.15$	$46.87 \pm 20.61$	$451.326 \pm 213.219$
模型(第 8 周末)	-	4	$8.31 \pm 0.90$	$57.87 \pm 19.31$	$68.48 \pm 8.70$	$931.90 \pm 206.63$	$280.68 \pm 41.58$	$132.32 \pm 24.12$	$60.38 \pm 21.99$	$54.65 \pm 25.82$	$525.775 \pm 270.205$
MCE 预防	30	6	$8.32 \pm 1.43$	$44.79 \pm 9.05$	$62.56 \pm 12.46$	$871.40 \pm 88.03$	$235.80 \pm 79.98$	$77.96 \pm 29.55^{1)}$	$33.61 \pm 12.33^{1)}$	$43.32 \pm 11.61$	$234.428 \pm 107.700^{1)}$

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , 其中,秋水仙碱、MCE 各治疗组与模型组第 14 周末进行比较, MCE 预防组与模型组第 8 周末进行比较(表 5 同)。

#### 4 讨论

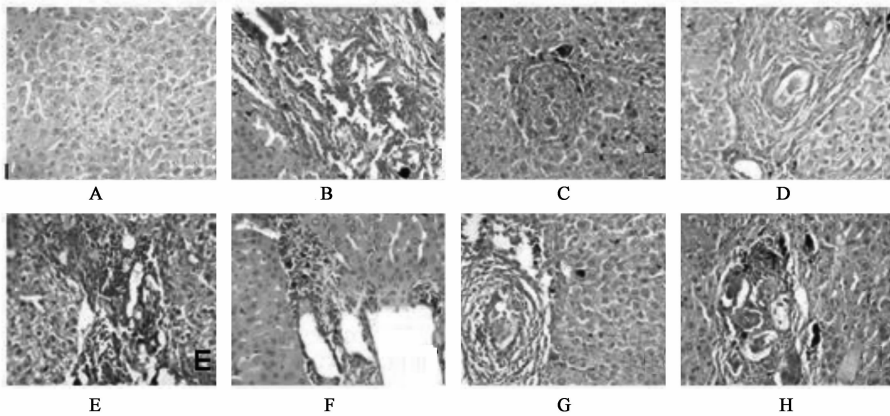
肝纤维化是多种病因引起的慢性肝病的共同病理基础, 其中肝星状细胞(HSC)的激活及随后的增殖、迁移、收缩和细胞外基质(ECM)分泌的增加是引起肝纤维化的关键所在<sup>[13]</sup>。已证实肝纤维化是可逆病变<sup>[14]</sup>, 因而治疗肝纤维化具有极为重要的临床意义。近年来中医药防治慢性肝病显示了光明的前景, 部分中药具有较好的抗纤维化效果<sup>[15]</sup>。博落

回是一种具多种药理活性的中草药, 野生资源丰富, 在我国分布广泛且易于栽培, 在临床、兽医兽药、生物农药等方面已有广泛应用。本课题组通过酸提碱沉、乙醇精制、硫酸成盐析晶后得到 MCE, 进而采用  $\text{CCl}_4$  诱导的大鼠肝纤维化和小鼠血吸虫肝纤维化双模型, 分别进行 MCE 预防给药和治疗给药研究, 来观察 MCE 对实验性肝纤维化的防治作用。

$\text{CCl}_4$  是诱导大鼠肝纤维化模型最广泛应用的肝

表5 MCE对血吸虫肝纤维化模型小鼠肝脏病理改变的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	n	肝组织病变程度/n					平均分
			0级	I级	II级	III级	IV级	
正常	-	6	6	0	0	0	0	0
模型(第14周末)	-	6	0	0	0	2	4	3.67 ± 0.52
吡喹酮	200	6	0	0	4	1	1	2.50 ± 0.84 <sup>2)</sup>
秋水仙碱	0.2	6	1	5	0	0	0	0.83 ± 0.41 <sup>2)</sup>
MCE治疗	30	6	0	4	2	0	0	1.33 ± 0.52 <sup>2)</sup>
	15	6	0	1	4 <sup>1)</sup>	1	0	2.00 ± 0.63 <sup>2)</sup>
	7.5	6	0	1	1	3	1	2.33 ± 0.82 <sup>2)</sup>
模型(第8周末)	-	4		0	0	1	3	3.75 ± 0.50
MCE预防	30	6	0	0	3	1	2	2.67 ± 0.82 <sup>1)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. 秋水仙碱 0.2 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>组; D. 吡喹酮 200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>组; E. MCE 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>预防组;  
F. MCE 30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>; G. MCE 15 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>治疗组; H. MCE 7.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>治疗组

图2 博落回提取物对肝纤维化小鼠肝组织病理形态的影响(HE, ×400)

毒性物质,在体内生成三氯甲基游离基,能与细胞大分子反应,导致脂质过氧化,损伤肝细胞,引起细胞结构和功能的破坏,大量肝内酶(ALT,AST等)释放入血,并加速清除自由基酶(SOD,GSH等)的耗竭,肝功能异常,脂质代谢紊乱,肝组织脂肪样和空泡样变性<sup>[16]</sup>。本实验采用CCl<sub>4</sub>复合因素诱导大鼠后,经肝组织胶原表达、脂质过氧化指标、肝组织形态学等均证实造模成功。MDA是脂质氧化的最终产物,可严重破坏细胞膜的结构,导致细胞肿胀、坏死,其含量能反映组织过氧化的损伤程度<sup>[17]</sup>,经MCE中剂量(30 mg·kg<sup>-1</sup>)防治后,MDA含量明显降低,提示MCE有一定的清除活性氧及抗脂质过氧化作用,能够拮抗CCl<sub>4</sub>的毒性。另外,MCE各剂量预防组血清中AST水平明显降低,预防及治疗给药组大鼠肝指数、Co I与Co III表达水平明显降低。Co I,Co III是ECM中的主要成分,其水平可反映肝纤维化的程度,并与病变程度呈正相关<sup>[18]</sup>。由此说明,MCE对CCl<sub>4</sub>诱导的慢性肝细胞损伤有保护作用,可改善肝

脏充血肿大,减轻肝脏炎症反应,具有抗脂质过氧化作用,能一定程度抑制或逆转肝纤维化。

血吸虫尾蚴感染小鼠后,沉积于肝组织内大量的成熟虫卵刺激机体,宿主对其释放的可溶性抗原产生病理性免疫应答,使结缔组织大量增生,引起肉芽肿的形成和肝脏胶原蛋白的沉积而至肝纤维化<sup>[19]</sup>。本实验中,小鼠感染尾蚴第6周后,模型组各考察指标较正常组产生显著变化,肝组织病理表现为有较多的虫卵沉积,虫卵肉芽肿形成、肝内汇管区及虫卵肉芽肿周围纤维显著增生,证实肝纤维化已经形成。经吡喹酮杀虫,MCE治疗给药后小鼠血清PC III,HA,AST,ALT含量明显降低,肝纤维化小鼠肝脏病变有显著改善;而预防组小鼠病理切片形态上与模型组不具明显差异。PC III为Co III的前体主要在活化的HSC合成与释放,HA是主要由HSC产生的一种大分子糖胺多糖,是结缔组织基质的重要成分,LN是基底膜成分中的主要大分子糖蛋白,其含量与肝纤维化程度成正相关<sup>[20]</sup>。本实验结果

说明, MCE 治疗给药能不同程度地抑制 HSC 活性, 从而减少 ECM 沉积, 具有一定的逆转肝纤维化作用, 其中高、中剂量效果优于低剂量。MCE 预防效果不明显的原因可能是由于 MCE 对血吸虫成虫的杀灭作用较弱, 造成其持续排卵, 从而持续刺激肝脏, 造成进一步的纤维化病变。

综上所述, 本实验表明 MCE 有一定的肝脏保护作用, 能改善肝功能, 抗肝纤维化, 其作用机制可能与其保护肝细胞膜、抑制 HSC 活性、减轻肝脏炎症及抗脂质过氧化作用等有关。

**[致谢]** 本实验在湖南中医药大学第一附属医院中药药理(心血管)实验室完成, 中南大学湘雅医学院陶立坚教授在本研究中给予大力支持。

### [参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 32.
- [2] 邓敦, 邓跃林. 博落回生物碱的研究进展[J]. 家畜生态学报, 2009, 30(4): 6.
- [3] 曾建国. 别隐品碱在农药杀菌剂中的应用[P]. 中国专利: CN101401579A, 2009-04-08.
- [4] Pavel Kosina, Jana Gregorova, Jiri Gruz, et al. Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(8): 1006.
- [5] 庞建新, 马仁强. 博落回总碱对肝癌细胞的毒性作用和体内抗肿瘤作用[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(3): 325.
- [6] 杨军, 王静, 刘信顺. 博落回的药效研究[J]. 中药材, 1999, 22(2): 88.
- [7] 李映菊, 汪煜华, 刘玉美, 等. 白屈菜红碱对肝纤维化大鼠肝脏病理学和肝脏羟脯氨酸含量的影响[J]. 实用肝病杂志, 2009, 12(3): 167.
- [8] 李映菊, 汪煜华, 刘玉美, 等. 白屈菜红碱对肝脏 TGF- $\beta_1$  与  $\alpha$ -SMA 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(18): 1821.
- [9] 曾建国, 钟明, 姚利. 血根碱或白屈菜红碱在血吸虫病防治上的应用[P]. 中国专利: CN101209043A, 2008-07-02.
- [10] 曾建国, 钟明, 姚利. 博落回总生物碱或其盐在抗血吸虫致肝纤维化治疗中的应用[P]. 中国专利: CN101297870A, 2008-11-05.
- [11] 2000 年西安第六次全国传染病寄生虫病学术会议. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56.
- [12] 蔡悦, 李珊, 伍参荣, 等. 中药加味四逆散对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织 I 型胶原、III 型胶原的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 178.
- [13] Shigeki Tsukada, Chritopher J Parsons. Mechanisms of liver fibrosis [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 364(1/2): 33.
- [14] 钱绍诚. 肝纤维化的可逆性[J]. 中华消化杂志, 1995, 15(5): 251.
- [15] 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.
- [16] 周贤, 刘翼, 夏国栋, 等. 肝纤维化动物模型探讨[J]. 四川动物, 2010, 20(1): 114-119.
- [17] Xu J, Fu Y, Chen A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  contributes to the inhibitory effects of curcumin on rat hepatic stellate cell growth [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 285(1): 20.
- [18] Li C H, Piao D M, Xu W X, et al. Morphological and serum hyaluronic acid, laminin and type IV collagen changes in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis of rat [J]. *World J Gastroenterology*, 2005, 11(48): 7620.
- [19] 景英霞, 邵筱. 血吸虫病肝纤维化的发病机理与治疗进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(4): 304.
- [20] Massart C, Bendavid C, Gibassier J, et al. Importance of the functional sensitivity determination of a serum hyaluronic acid assay for the prediction of liver fibrosis in patients with features of the metabolic syndrome [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2006, 44(4): 505.

[责任编辑 聂淑琴]