

黄芪提取物对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用

李成浩¹, 张红英^{2*}

(1. 延边大学附属医院消化内科, 吉林 延吉 133002; 2. 基础医学院机能学实验中心, 吉林 延吉 133002)

[摘要] 目的: 研究黄芪提取物对四氯化碳(CCl₄)致大鼠肝纤维化的保护作用及其机制。方法: 取一批大鼠, 其中 10 只为正常组, 除正常组 sc 等体积生理盐水外, 其他大鼠均从第 1 d 开始颈背部 sc CCl₄ 原液(5 mL·kg⁻¹)。以后每周 2 次 sc 40% CCl₄ 花生油(3 mL·kg⁻¹) 7 周, 以复制大鼠肝纤维化模型。选造模好的肝纤维化大鼠, 随机分为黄芪提取物(4, 2 g·kg⁻¹) 组, CCl₄ 模型组, 每组 10 只。造模结束第 2 d 开始给药。正常组和 CCl₄ 模型组 ig 蒸馏水, 药物组 ig 黄芪提取物(4, 2 g·kg⁻¹), 每天 1 次, 连续 ig 给药 30 d。用赖氏法测定大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)的活性, 用放免法测定大鼠血清透明质酸(HA)和肿瘤坏死因子(TNF-α)的含量, 并观察肝脏病理变化。结果: 黄芪提取物(4, 2 g·kg⁻¹) 组 ALT 和 AST 活性为(36. 82 ± 7. 25), (48. 83 ± 17. 55) U·L⁻¹, (75. 87 ± 15. 04), (96. 69 ± 34. 56) U·L⁻¹ 与模型组相比, 黄芪提取物可明显降低 CCl₄ 致大鼠肝纤维化血清 ALT 和 AST 活性; HA 和 TNF-α 含量为(211. 88 ± 72. 77), (300. 00 ± 142. 83) μg·L⁻¹, (0. 91 ± 0. 20), (1. 00 ± 0. 11) μg·L⁻¹ 与模型组相比, 黄芪提取物可明显降低 HA 和 TNF-α 含量; 黄芪提取物可明显减轻大鼠肝纤维化的程度。结论: 黄芪提取物有明显地保肝和抗肝纤维化作用, 其作用机制可能与降低 HA 和 TNF-α 含量有关。

[关键词] 黄芪; 肝纤维化; 四氯化碳; 透明质酸; 肿瘤坏死因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0217-04

[收稿日期] 20110329(003)

[第一作者] 李成浩, 硕士, 主治医师, Tel: 15526770468, E-mail: yjch2003@yahoo. com. cn

[通讯作者] * 张红英, 高级实验师, 从事心脑血管药理研究, Tel: 0433-13843366516, E-mail: zhanghongying52@163. com

mRNA 表达, 至 6 周出现 AS 病灶时 VCAM-1 mRNA 表达更加丰富, 提示在高血脂促进 AS 形成的过程中, VCAM-1 基因很早就被激活并持续表达^[9]。

本研究结果显示, 模型组主动脉有明显的动脉硬化斑块, LDL-R mRNA 表达降低, VCAM-1 mRNA 表达增高。脂脉宁可明显减轻 AS 斑块, 增强 LDL-R mRNA 的表达, 降低 VCAM-1 的表达, 可调控 LDL-R 及 VCAM-1 的表达, 加速血浆中 LDL 及胆固醇的清除, 防止在细胞内过度积聚, 提示脂脉宁抗动脉粥样硬化作用与其调整脂质代谢、清除氧自由基、调控 LDL-R mRNA, VCAM-1 的表达等作用有关。

[参考文献]

[1] 刘应柯. 脂脉宁胶囊对高脂血症患者脂质代谢、抗氧化及血液流变学影响的临床研究[J]. 新中医, 2005, 37(10): 30.

[2] 谢磊, 刘应柯, 宫瑾瑜. 脂脉宁对 H₂O₂ 诱导 VEC-304 细胞表达 NF-κB 及 HSP-70 的影响[J]. 实用医药杂志, 2009, 26(8): 48.

[3] 刘建文. 药理实验方法学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 258.

[4] Lee Y J, Kang I J, Bungler R, et al. Mechanisms of pyruvate inhibition of oxidant-induced apoptosis in human endothelial cells[J]. Microvasc Res, 2003, 66(2): 91.

[5] Lecras T D, Gherardi E, Bowyer D E. A sensitive Rnase protection assay for the quantitation of the mRNAs for the LDL receptor and HMG-CoA reductase in human total RNA[J]. Atherosclerosis, 1991, 90: 81.

[6] Gebhardt A, Petersa, Gerdingd, et al. Rapid quantitation of mRNA species in ethidium bromide stained gel of competitive RT-PCR products[J]. J lipid Res, 1994, 35(6): 976.

[7] Rudlingm, Hepatic mRNA level for the LDL receptor and HMG Co A reductase show coordinate regulation *in vivo* [J]. J lipid Res, 1992, 33(4): 493.

[8] Weidingerff, Mclenachanjm, Cybulskymi, et al. Hypercholesterolemia enhances macrophage recruitment and dysfunction of regenerated endothelium after balloon injury of the rabbit aorta[J]. Circulation, 1991, 84(2): 755.

[9] 徐荣良, 张国元, 秦永文, 等. 高脂血症兔主动脉黏附分子 VCAM-1 基因表达的研究[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(12): 950.

[责任编辑 何伟]

Protective Effect of Extracts from Astragali Radix on Liver Fibrosis Induced by CCl₄ in Rats

LI Cheng-hao¹, ZHANG Hong-ying^{2*}

(1. Digestive Department of Affiliated Hospital, Yanbian University; 2. Test Center of Function, Yanbian University College of Basic Medicine, Yanji 133002, China)

[Abstract] Objective: To study protective effect of extracts from Astragalus Radix on liver fibrosis induced by CCl₄ in rats and its mechanisms. **Method:** Liver fibrosis model was established by CCl₄. Rats were randomly divided into normal group, model group and extracts from Astragali Radix group. Activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) was determined by Reitman-Franke's method. Serum levels of hyaluronic acid (HA) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were detected by radio-immunity method. Pathological changes of liver were observed. **Result:** Extracts from Astragali Radix significantly decreased the activity of ALT and AST in rats with liver fibrosis. Compared with model group, extracts from Astragalus Radix could obviously alleviated liver fibrosis injury and reduce HA and TNF- α level in rats. **Conclusion:** The extracts from Astragali Radix had significantly protective effect on liver fibrosis in rats, and its mechanisms might be related to decreasing HA and TNF- α level.

[Key words] Astragali Radix; liver fibrosis; CCl₄; hyaluronic acid; tumor necrosis factor alpha

肝纤维化是多种慢性肝病发展为肝硬化的前期阶段。尽管肝硬化的病理改变具有不可逆性,但是研究表明肝纤维是一个相对可逆的病理过程。在肝纤维化阶段进行干预可能是防治肝硬化的有效途径^[1]。阻断肝纤维化的发生和发展,对防治肝硬化和慢性肝病具有重要意义。为此,寻找安全有效的抗肝纤维化药物是治疗慢性肝病的当务之急。在抗肝纤维化的众多药物中,中药黄芪及其复方制剂是一类有很大发展潜力的药物。以往的动物实验结果显示,黄芪具有抑制肝组织胶原沉积和防治肝纤维化的作用,还可改善肝脏微循环,增强网状内皮系统的吞噬功能,促进肝再生。然而有关其抗肝纤维化的机制还有待进一步研究^[2]。本实验用 CCl₄ 制备大鼠肝纤维化模型,观察了黄芪提取物对丙氨酸转氨酶 (ALT),天冬氨酸转氨酶 (AST),血清透明质酸 (HA) 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 及肝脏病理变化,来探讨抗肝纤维化的作用及其机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 黄芪购置延边大学附属医院中药局。黄芪提取物的制备:取黄芪 600 g 粉碎用蒸馏水 3 000 mL,冷水浸泡 24 h 后,加热煮沸 30 min,倾出上清液,以此方法煮沸共 3 次,合并 3 次上清

液,合并滤液冷却后过滤,浓缩为浸膏,干燥成粉末,放入冰箱备用,临用前配成所需浓度。TNF-2 试剂盒由北京东雅生物技术研究所提供;HA 试剂盒由上海海军医学研究所提供;ALT,AST 试剂盒购置南京建成生物工程研究所;CCl₄ 分析纯由天津市塘沽区新发化工有限公司批号 20030526;花生油(山东鲁花集团有限公司,批号 3700/16036);乙醇由北京化工厂生产。

1.2 动物 Wistar 大鼠,160 g ~ 200 g,雌雄各半,(延边大学医学部实验动物科提供,动物合格证号 10-1022)。

1.3 仪器 TDL-40B 型离心机,上海安亭科学仪器厂制造;HH-501 型超级恒温水浴,金坛市恒丰仪器厂制造;VIS-732 型可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司制造;FJ-2008P 型全自动 γ 放射免疫计数器(西安国营 262 厂生产);YP600 型电子称(上海精密仪器有限公司生产)。

2 方法

2.1 肝纤维化模型制备^[3] 除正常组外,其他各组大鼠均从第 1d 开始颈背部 sc CCl₄ 原液(5 mL·kg⁻¹),正常组 sc 等体积生理盐水。以后每周 2 次 sc 40% CCl₄ 花生油(3 mL·kg⁻¹)共 7 周,正常组 sc

等体积的生理盐水。

2.2 分组与给药 取 10 只大鼠为正常组(空白组),把造模好的肝纤维化大鼠,随机分为黄芪提取物(4,2 g·kg⁻¹)组,CCl₄ 模型组,每组 10 只。造模结束第 2 d 开始给药。正常组和 CCl₄ 模型组 ig 蒸馏水,药物组 ig 黄芪提取物(4,2 g·kg⁻¹),每天 1 次,连续 ig 给药 30 d。各组均饮用自来水,食用普通块状饲料。为维持刺激除正常组外,其他各组每周按(3 mL·kg⁻¹) sc 1 次 40% CCl₄ 花生油溶液,第 11 周末次给药 1 h 后用乙醚麻醉眼球采血取血清测 ALT,AST,HA,TNF-α,取肝脏做病理学检查。

2.3 指标测定 取大鼠血清用赖氏法测定 ALT,AST 活性;用放免法测定 HA,TNF-α 的含量;取大鼠肝左叶以 10% 甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,切片、HE 染色后,在光镜下观察肝纤维化,肝细胞变性 & 坏死等病变。

2.4 肝脏病理学检查 肝细胞变性、坏死、纤维组织增生程度分级标准参考有关文献^[4] 肝细胞脂肪变性:大量肝细胞(>50%)内出现空泡(卅),多数肝细胞(25~50%)内出现空泡(卅),部分肝细胞(<25%)内出现大小不等的圆形空泡,散在分布(+),无变化者为(0)。肝细胞坏死:肝细胞呈点灶状坏死,或见桥接坏死,弥散分布(卅);分布范围较广(卅),散在分布(+),无变化者为(0)。肝纤维组织增生:胶原纤维呈较宽的条索状分隔肝小叶,胶原纤维明显增加,表现为完全分隔成假小叶(卅),胶原纤维呈细条索状分隔肝小叶,散在分布,表现为不完全假小叶(卅),胶原纤维含量增加,很少形成条索分隔肝小叶,可见汇管区扩大,纤维化(+),无变化者为(0)。

2.5 统计学处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义,等级资料进行秩和检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化血清 ALT,AST 活性的影响 与正常组相比,模型组血清 ALT,AST 的活性明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,黄芪提取物(4,2 g·kg⁻¹)组血清 ALT,AST 活性明显降低($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化血清 HA,TNF-α 含量的影响 与正常组相比,模型组血清 HA 含量明显

表 1 黄芪提取物对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化血清 ALT,AST

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)	
		ALT	AST U·L ⁻¹
正常	-	24.99 ± 6.53	77.74 ± 15.46
模型	-	340.77 ± 28.96	295.59 ± 49.45
黄芪提取物	4	36.82 ± 7.25 ²⁾	75.87 ± 15.04 ²⁾
	2	48.83 ± 17.55	96.69 ± 34.56 ²⁾

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

升高($P < 0.01$),与模型组相比,黄芪提取物(4 g·kg⁻¹)组血清 HA 含量明显降低($P < 0.05$);与正常组相比,模型组血清 TNF-α 含量明显升高($P < 0.01$),与模型组相比,黄芪提取物(4,2 g·kg⁻¹)组血清 TNF-α 含量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 黄芪提取物对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化血清 HA 和 TNF-2 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	HA	TNF-α
		/g·L ⁻¹	/μg·L ⁻¹
正常	-	160.02 ± 71.18	0.87 ± 0.18
模型	-	318.21 ± 70.28	1.25 ± 0.26
黄芪提取物	4	211.88 ± 72.77 ¹⁾	0.91 ± 0.20 ²⁾
	2	300.00 ± 142.83	1.00 ± 0.11 ¹⁾

3.3 对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化肝脏病理变化的影响

①肉眼观察:正常组的大鼠肝脏颜色暗红,质软,模型组的大鼠肝脏色暗黄,灰,质韧,表面凹凸不平,有大小不等的颗粒状,药物组的大鼠肝脏色暗红,表面尚光滑。②光镜下:正常组的大鼠肝脏无明显病理改变,其他各组大鼠均有不同程度的肝细胞脂肪变性,点灶状及桥接坏死,肝间质纤维组织增生等形态改变。黄芪提取物能明显减轻 CCl₄ 致肝细胞脂肪变性($P < 0.01$);黄芪提取物能明显减轻 CCl₄ 致肝细胞坏死($P < 0.05$);黄芪提取物能明显减轻 CCl₄ 致纤维组织增生($P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

肝纤维化与肝细胞的损伤密切相关,各种肝细胞损伤都可导致肝星状细胞的激活,后者能够分泌以胶原纤维为主的细胞外基质,促进肝纤维化发展,所以肝细胞损伤是肝纤维化的启动因素^[5-6]。治疗肝纤维化是防治慢性肝病发展为肝硬化的重要手段。在抗纤维化研究中,中药已经显示出独特的优势。黄芪是一种补益中药,无论是单药、组方还

表 3 黄芪提取物对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化肝脏病理变化的影响 (n = 10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	不同等级肝细胞病理改变的动物数											
		肝细胞脂肪变性				肝细胞坏死				纤维组织增生			
		0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	+++
正常	-	2	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0
模型	-	0	0	2	8	0	1	4	5	0	1	5	4
黄芪提取物	4	3	7	0	0 ²⁾	0	9	1	0 ¹⁾	4	5	1	0 ²⁾
	2	5	5	0	0	0	6	4	0 ¹⁾	1	6	3	0 ²⁾

是一些有效提取成分, 均被证实有一定的抗肝纤维化作用。

实验采用 CCl₄ 制备肝纤维化模型。CCl₄ 诱导慢性肝损伤的机制是直接损害肝细胞, 破坏细胞的各种成分, 具有耗时短和病变典型的优点, 肝纤维化进展稳定。适合于肝纤维化发生发展过程的动态研究。本实验 CCl₄ 造模成功, CCl₄ 模型组的肝细胞膜改变明显, 从而使细胞内酶 ALT, AST 外漏入血, 血清 ALT, AST 活性升高, 其升高在一定程度上说明了肝脏受损的程度^[5], 它们是反映肝细胞损伤的灵敏指标。结果表明, CCl₄ 模型组可使血清 ALT 和 AST 活性明显升高, 与模型组相比, 黄芪提取物可明显降低 AST 和 ALT 活性, 说明, 黄芪提取物对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠有一定的保护作用。

CCl₄ 可以激活肝星状细胞, 使 HA 等细胞外基质合成增多, 促使肝纤维化的形成和加重^[7], 肝纤维化程度与 HA 指标升高程度成正比关系。HA 是反映肝活动性纤维化常用的定量指标, 在判断肝纤维化活动中有很重要的意义。CCl₄ 模型组可使 HA 的含量明显升高, 与模型组相比, 黄芪提取物可明显降低 HA 的含量。TNF-2 主要来源于单核细胞, 在肝脏有炎性损伤时, 也可来源于炎症区的肝细胞, 它能激活多种免疫细胞, 增强炎症活动度, 可直接损伤肝细胞^[8]。CCl₄ 模型组可使 TNF-2 的含量明显升高, 与模型组相比, 黄芪提取物可明显降低 TNF-2 的含量。结果表明, 黄芪提取物可降低血清 ALT, AST 活性, 使肝细胞损伤减轻, 肝功能明显得到改善; 黄芪提取物可降低血清 HA, TNF-α 的含量, 使肝纤维化程度明显减轻; 病理结果显示, 肝细胞脂肪变性, 肝细胞坏死, 纤维组织增生过程明显好于模型组。黄芪提取物可显著减轻 CCl₄ 致大鼠肝纤维化程度, 说明, 黄芪提取物抑制了肝细胞局部炎症反应, 减轻肝

细胞变性, 坏死, 增生。黄芪提取物具有一定的抗肝纤维化作用。

综上所述, 黄芪提取物可明显降低血清 ALT, AST 活性和 HA, TNF-α 含量; 改善肝功能, 清除肝脏炎症, 抗肝纤维化, 调节免疫功能, 病理结果也显示具有抗纤维化作用。黄芪提取物抗肝纤维化作用其机制可能与降低 HA 和 TNF-α 含量有关。

[参考文献]

- [1] 冯学欣, 冯腾, 王莉, 等. 黄芪对肝纤维化大鼠 NF-kB 的调节作用[J]. 潍坊医学院学报, 2008, 30(6): 528.
- [2] 王登妮, 徐军全, 宋维芳, 等. 黄芪对肝纤维化的防治作用[J]. 中国医药导报, 2010, 7(9): 15.
- [3] 杨彦芳, 刘成海, 王绵之, 等. 王氏抗肝纤方治疗肝纤维化的实验研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2000, 10(3): 19.
- [4] 马玉珍, 韩景田, 陈玮, 等. 四氯化碳皮下注射制备肝纤维化模型的新设计[J]. 四川动物, 2007, 26(3): 697.
- [5] Parsons C J, I ashima M, Rippe R A. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. J Gastroenterol Hepatol 2007, 22(Suppl 11): S79.
- [6] Vei Tna-Gandhu M, Peterson M R, Peterson T C. Effect of fetuin, a TGFβ antagonist and pentoxifylline, a cytokine antagonist on hepatic stellate cell function and fibrotic parameters in fibrosis [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 572(2/3): 220.
- [7] 毕红征, 薛敬礼, 黄国钧. 肝纤维化大鼠血清透明质酸、Ⅲ型前胶原、层粘连蛋白及羟脯氨酸水平与丹参、桃仁复方制剂的干预[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(8): 1519.
- [8] 马桂凤, 王莉, 季万剩, 等. 黄芪注射液对肝纤维化大鼠模型肝细胞胶原及 TGF-1 表达的影响[J]. 潍坊医学院学报, 2007, 6(29): 535.

[责任编辑 聂淑琴]