

三七总皂苷对免疫性肝损伤小鼠的保护作用

汪永忠*, 姜辉, 张家富, 孙文静

(安徽中医学院第一附属医院, 合肥 230031)

[摘要] 目的:观察三七总皂苷(saponins of *Panax notoginseng*, PNS)对卡介苗(*Bacillus calmette guerin*, BCG)联合脂多糖(lipoxygenase, LPS)所致免疫性肝损伤小鼠的保护作用。方法:昆明种小鼠随机分为正常组、模型组、PNS 低剂量组($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、PNS 中剂量组($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、PNS 高剂量组($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、联苯双酯($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组。采用 BCG 2.5 mg/只 iv 致敏小鼠,第 10 天给予 LPS $7.5 \mu\text{g}/\text{只}$ iv 攻击,复制小鼠免疫性肝损伤模型,连续给药 10 d。分光光度法测定血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST),肝匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量;HE 染色法观察肝组织病理学变化;RT-PCR 技术观察肝组织肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α mRNA 的表达情况。结果:PNS 能降低免疫性肝损伤小鼠脾脏、肝脏指数,ALT,AST,MDA 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),抑制 TNF- α mRNA 表达,减轻肝组织病理损伤程度,升高 SOD, GSH-Px 活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:PNS 对免疫性肝损伤小鼠具有一定的保护作用。

[关键词] 三七总皂苷;免疫性肝损伤;卡介苗;脂多糖

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0159-04

Protective Effect of Saponins of *Panax notoginseng* on Immunological Liver Injury in Mice

WANG Yong-zhong*, JIANG Hui, ZHANG Jia-fu, SUN Wen-jing

(The First Affiliated Hospital, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective action of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on immunological liver injury in mice. **Method:** Mice were randomly divided into five groups, control group, model group, low-dose ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) of PNS, middle-dose ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) of PNS, high-dose ($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) of PNS and bifendate ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group. The model of mouse with immunological liver injury was induced by injection of BCG and LPS from tail vein. The ALT, AST, MDA content, SOD and GSH-Px activities were assayed by spectrophotometry, hepatic tissues stained with hematoxylin and eosin (HE) were prepared for histological analysis to liver injury. Moreover TNF- α mRNA expression in liver tissue was detected by RT-PCR technology. **Result:** PNS could decrease the enlarged liver, spleen index, ALT, AST and MDA content ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), prevented the reduction of SOD and GSH-Px activities in liver homogenate ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Meanwhile, the pathological injury of hepatic tissues was alleviated and the expression of TNF- α mRNA in liver tissue was inhibited. **Conclusion:** PNS showed significant protective action on immunological liver injury in mice.

[Key words] saponins of *Panax notoginseng*; immunological liver injury; bacille calmette guerin; lipopolysaccharide

[收稿日期] 20100919(008)

[基金项目] 安徽中医学院青年基金项目(2010qn009)

[通讯作者] *汪永忠,副主任药师,硕士生导师,主要从事中药药剂与药理相关研究, Tel:0551-2838557, E-mail: wyzmail@126.com

三七总皂苷 (saponins of *Panax notoginseng*, PNS) 是三七主要有效成分, 研究表明其具有调节免疫、抗炎、抗纤维化、抗衰老等药理学作用^[1]。本实验以卡介苗 (*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG) 联合脂多糖 (lipoxigenase, LPS) 诱导小鼠免疫性肝损伤模型, 观察 PNS 对其的保护作用。

1 材料

1.1 药品及试剂 三七总皂苷, 含量 >98%, 批号 20090321, 南京泽朗医药科技有限公司; 联苯双酯 (BP), 批号 20090110, 北京协和药厂; 医用卡介苗 (BCG), 卫生部上海生物制品研究所; 脂多糖 (LPS), 美国 Sigma 公司; 超氧化物歧化酶 (SOD), 丙二醛 (MDA), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒, 批号 20090417, 南京建成生物工程研究所; TRIZOL Reagent 试剂, 批号 14101, Introgen life technologies 公司; Reverse Transcription System 逆转录试剂盒, 批号 00125628, PCR 试剂盒, 批号 00058996, Fermentas 公司。

1.2 动物 昆明种小鼠, 雄性, 体重 18 ~ 22g, 普通级。由南京医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(苏)2008-0004。

1.3 仪器 722S 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 电子显微镜 XDS-1B, 重庆光电仪器总公司; Hema18R 冷冻离心机、压缩机制冷式基因扩增仪、GSG2000 核酸/蛋白凝胶图像分析管理系统, 珠海黑马医学仪器有限公司。

2 方法

2.1 模型制备^[2] 昆明种小鼠随机分为正常组、模型组、PNS 100, 200, 400 mg·kg⁻¹ 组、联苯双酯 (150 mg·kg⁻¹) 组, 每组 15 只, 造模第 1 天除正常组外, 其余各组每只小鼠尾部 iv BCG 2.5 mg/只 0.2 mL, 约含 5 × 10⁷ 个活菌数, 各治疗组 ig 给予相应药物, 正常组和模型组给予等容积溶媒, 连续 10 d。第 10 天, 除正常组给予等容积溶媒外, 其余各组每只小鼠 iv LPS 7.5 μg/只 (0.2 mL)。禁食 16 h, 自小鼠后眼眶静脉丛采血, 颈椎脱臼处死小鼠, 称取脾脏、肝脏质量计算脏器指数。

脏器指数 = 脏器质量 (mg) / 体质量 (g)

2.2 血清 ALT, AST 含量测定 常规制备血清标本, 按照试剂盒说明书测定 ALT, AST 含量。

2.3 肝组织匀浆 MDA, SOD, GSH-Px 含量测定 取肝左叶相同部位, 常规制备肝组织匀浆, 蛋白定量采

用考马斯亮蓝法, 按照试剂盒说明书测定 SOD, MDA, GSH-Px 含量。

2.4 肝组织病理学检查 取肝右叶相同部位, 放入 10% 甲醛溶液中固定, 常规 HE 染色, 光镜下观察组织病理学变化。

2.5 RT-PCR 测定肝组织 TNF-α mRNA 表达 取 100 mg 小鼠肝脏组织, 采用 TRIZOL 法抽提 RNA, 总反应体系 20 μL, 42 °C 水浴 1 h, 合成第一链 cDNA。取上述逆转录产物 1 μL 作为反应模板, 反应体系为 25 μL。TNF-α Forward: 5'-CTAGTACCGAGATGTGG-AACTGGC-3'; Reverse: 5'-CTGGCTCAGCCACTCC-AGC-3'。扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 33 个循环, 再 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。同法扩增 β-action 作为内参。以 5 μL PCR 产物在凝胶上电泳, 摄像, 存入计算机, 并作图像分析。

3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。P < 0.05 有统计学意义。

4 结果

4.1 三七总皂苷对小鼠脏器指数的影响 与正常组相比, 模型组小鼠肝、脾系数明显高于正常组 (P < 0.01); 三七总皂苷高、中剂量组和联苯双酯组均有抑制肝脾增大的作用, 与模型组对比差异显著 (P < 0.05 或者 P < 0.01), 结果见表 1。

表 1 三七总皂苷对小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肝指数/mg·g ⁻¹	脾指数/mg·g ⁻¹
正常	-	55.135 ± 6.040	5.395 ± 0.495
模型	-	70.472 ± 9.094 ²⁾	10.164 ± 1.927 ²⁾
三七总皂苷	100	62.913 ± 8.305	8.912 ± 2.224
	200	61.249 ± 8.918 ¹⁾	8.470 ± 1.345 ¹⁾
	400	60.013 ± 10.910 ²⁾	8.164 ± 1.575 ²⁾
联苯双酯	150	60.372 ± 7.478 ¹⁾	8.358 ± 1.617 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01 (表 2 ~ 3 同)。

4.2 三七总皂苷对小鼠血清 ALT, AST 含量的影响 与正常组相比较, 模型组小鼠血清 ALT, AST 水平明显升高 (P < 0.01); 三七总皂苷各剂量组和联苯双酯组均能显著降低小鼠血清中 ALT, AST 活性, 与模型组比较有显著性差异 (P < 0.05 或 P < 0.01), 提示三七总皂苷对免疫性肝损伤小鼠具有保护作用, 结果见表 2。

表2 三七总皂苷对小鼠血清 ALT,AST 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
正常	-	44.65 ± 10.99	50.55 ± 8.38
模型	-	81.85 ± 22.59 ²⁾	99.15 ± 20.50 ²⁾
三七总皂苷	100	64.35 ± 17.21 ¹⁾	80.50 ± 18.33 ¹⁾
	200	62.65 ± 21.41 ¹⁾	79.35 ± 24.63 ¹⁾
	400	59.80 ± 13.76 ²⁾	76.80 ± 20.27 ¹⁾
联苯双酯	150	57.55 ± 18.61 ²⁾	74.70 ± 19.28 ²⁾

4.3 三七总皂苷对小鼠肝组织 MDA, SOD, GSH-Px 的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织 MDA 水平均显著升高, SOD, GSH-Px 水平显著下降;与模型组比较,三七总皂苷低、中、高剂量组能显著降低免疫性肝损伤小鼠 MDA 水平,升高 SOD, GSH-Px 水平,表明三七总皂苷通过提高机体抗脂质过氧化能力对免疫性肝损伤小鼠起保护作用,结果见表 3。

表3 三七总皂苷对小鼠肝组织 MDA, SOD, GSH-Px 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

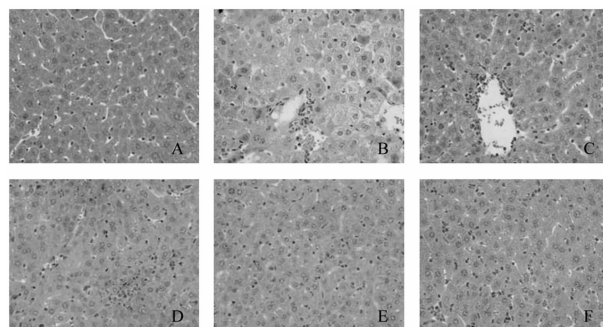
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹
正常	-	144.81 ± 19.39	5.93 ± 1.57	242.34 ± 32.36
模型	-	100.87 ± 24.07 ²⁾	9.64 ± 2.47 ²⁾	161.64 ± 19.53 ²⁾
三七总皂苷	100	124.28 ± 22.23 ¹⁾	7.79 ± 2.11 ¹⁾	192.40 ± 36.31 ¹⁾
	200	125.98 ± 24.44 ¹⁾	7.69 ± 1.58 ¹⁾	197.19 ± 20.77 ¹⁾
	400	132.32 ± 25.66 ²⁾	7.29 ± 2.40 ¹⁾	205.80 ± 36.19 ²⁾
联苯双酯	150	129.05 ± 27.96 ¹⁾	7.45 ± 1.77 ¹⁾	216.87 ± 39.36 ²⁾

4.4 三七总皂苷对小鼠肝组织病理学的影响 正常组肝细胞结构清晰,肝细胞核大而圆,核膜清晰,核仁明显,胞质丰富,汇管区无炎细胞浸润,结构清晰可见;模型组肝细胞呈较广泛的嗜酸性坏死,肝细胞肿胀较明显,有炎细胞浸润;PNS 各剂量组可明显减轻肝脏炎症细胞浸润和坏死程度,结果见图 1。

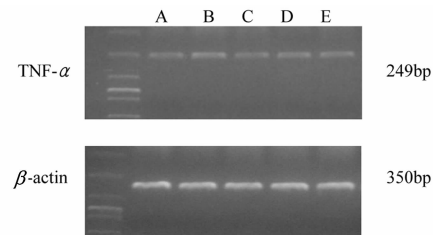
4.5 三七总皂苷对肝组织 TNF- α mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示,与正常组相比,模型组小鼠肝组织 TNF- α mRNA 的表达显著增高;与模型组相比,三七总皂苷干预组 TNF- α mRNA 的表达明显下降,结果见图 2。

5 讨论

BCG + LPS 联合诱导小鼠产生免疫性肝损伤的动物模型是研究临床肝炎发病和治疗较理想的动物模型^[3]。预先给小鼠注射 BCG 可使多核中粒细胞

图1 三七总皂苷 ig 10 d 对免疫性肝损伤小鼠肝组织病理学的影响 (HE, $\times 100$)

- A. 正常组; B. 模型组; C. 三七总皂苷 100 mg·kg⁻¹组; D. 三七总皂苷 200 mg·kg⁻¹组; E. 三七总皂苷 400 mg·kg⁻¹组; F. 联苯双酯 150 mg·kg⁻¹组

图2 三七总皂苷对免疫性肝损伤小鼠肝组织中 TNF- α mRNA 表达的影响

- A. 正常组; B. 模型组; C. 三七总皂苷 100 mg·kg⁻¹组; D. 三七总皂苷 200 mg·kg⁻¹组; E. 三七总皂苷 400 mg·kg⁻¹组

或巨噬细胞聚集于肝,继后再用低剂量 LPS 攻击注射,可激发这些细胞释放对肝细胞有毒性作用的多种免疫效应分子,如氧自由基、细胞因子等,引发免疫性肝损伤^[4]。

肝脏是含酶丰富的脏器,肝脏出现任何原因导致的肝组织损伤或细胞破坏、坏死时,酶从细胞内逸出进入血液,血清中 ALT,AST 活性将明显升高。因此,血清 ALT,AST 的升高是肝损伤的重要标志^[5]。实验结果显示 PNS 各剂量组均能显著降低肝损伤小鼠血清 AST,ALT 水平。同时,HE 结果显示模型组小鼠肝脏组织出现充血、肿大,炎性细胞浸润,肝细胞出现大片嗜酸性变,表明免疫性肝损伤模型复制成功;PNS 各剂量组可明显减轻肝脏炎症细胞浸润和坏死程度,提示 PNS 对免疫性肝损伤小鼠具有一定的保护作用。

脂质过氧化在免疫性肝损伤的发生发展过程中起重要作用^[6]。MDA 是脂质过氧化的最终产物,其含量与脂质过氧化反应呈正比;SOD 活性的高低反映了机体清除氧自由基的能力;GSH-Px 是机体内广

泛存在的一种重要的过氧化物分解的酶,一般认为它在细胞内能清除有害的过氧化物代谢产物,阻断脂质过氧化链锁反应,从而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用^[7]。实验结果显示三七总皂苷可明显降低免疫性肝损伤小鼠 MDA 水平,升高肝脏中 SOD, GSH-Px 活力,表明 PNS 通过提高机体抗脂质过氧化能力对免疫性肝损伤小鼠起保护作用。

TNF- α 是由肝枯否细胞释放的主要细胞因子,不仅能直接损伤肝细胞,亦是介导肝损伤的主要介质^[8]。作为肝损伤的第一介质,它的出现将引起许多与肝坏死有关的第二介质,如 NO, IL-1, IL-6, IL-8, IL-2R 等的产生,而第二介质又有增强 TNF- α 的肝损伤作用。因此,即使少量 TNF 存在,宿主也会发生组织损伤^[9]。实验结果表明,与模型组相比, PNS 可抑制免疫性肝损伤小鼠肝脏 TNF- α 表达,可能与其发挥保护作用有关。

综上,三七总皂苷对免疫性肝损伤小鼠具有一定保护作用,其机制可能与抗脂质过氧化、调节 TNF- α 的产生有关。

[参考文献]

[1] 甘雨, 徐惠波, 孙晓波. 三七总皂苷的药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(5): 1251.
[2] 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: 1346.

[3] Yajima T, Nishimura H, Saito K, et al. Overexpression of Interleukin-15 increases susceptibility to lipopolysaccharide-induced liver injury in mice primed with mycobacterium bovis bacillus Calmette-guerin [J]. Infect Immun, 2004, 72 (7): 3855.
[4] 邓家刚, 郑作文, 王勤, 等. 复方黄根对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(5): 37.
[5] 马龙, 刘涛, 丁玉松, 等. 葡萄籽提取物对免疫性肝损伤的保护作用[J]. 毒理学杂志, 2009, 23(3): 181.
[6] 胡德坤, 沈业寿. 天麻多糖 GEP-2 对 BCG + LPS 致小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(10): 912.
[7] 孙延鹏, 李露露, 刘震坤. 山药多糖对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(1): 26.
[8] Tukov F F, Luyendyk J P, Ganey P E, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide / ranitidine-induced inflammatory liver injury [J]. Toxicol Sci, 2007, 100 (1): 267.
[9] Liu D F, Wei W, Song L H, et al. Up regulation of TNF- α and IL-6 mRNA in mouse liver induced by bacille Calmette-Guerin plus lipopolysaccharide [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27 (4): 460.

[责任编辑 聂淑琴]

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿,请登录本刊网站 [www. syfjxzz. com](http://www.syfjxzz.com) 注册会员,登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后,如录用,请按通知要求交纳论文发表费。详见本刊稿约第 7 条:投稿及缴费。