

佛甲草对实验性肝纤维化大鼠脂质过氧化的影响

周俐, 曹性玲, 熊小琴, 周青*

(赣南医学院机能实验室, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的: 探讨佛甲草提取液(SLT)对实验性肝纤维化大鼠脂质过氧化的影响。方法: 雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性对照组(Col, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、SLT 低剂量组(SLT, $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、SLT 高剂量组(SLT, $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。采用 50% 的 CCl_4 花生油溶液灌服制备大鼠肝纤维化模型, 期间给予灌服 SLT($4, 8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、Col($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 进行干预, 共 9 周。9 周后处死大鼠取固定部位肝组织及血清标本, 光镜下观察肝细胞结构和肝纤维化程度, 分光光度法检测肝组织匀浆、血清中丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的变化。结果: 光镜下可见模型组大鼠肝细胞严重变性、坏死, 胶原纤维明显增加; 肝组织、血清中 MDA 含量增高, SOD、GSH-Px 活力显著下降。SLT 预防给药明显改善大鼠肝细胞结构, 减轻肝纤维化程度; 明显降低肝纤维化大鼠肝脏及血清 MDA 含量, 显著升高 SOD、GSH-Px 活性。结论: 佛甲草提取液对大鼠肝纤维化有一定的防治作用, 其机制可能与抗脂质过氧化损伤有关。

[关键词] 佛甲草; 肝纤维化; 脂质过氧化

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0174-04

Effect of *Sedum lineare* on Lipid Peroxidation in Rats with Liver Fibrosis

ZHOU Li, CAO Xing-ling, XIONG Xiao-qin, ZHOU Qing*
(Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of extract from *Sedum lineare* Thunb (SLT) on lipid peroxidation in rat with hepatic fibrosis. **Method:** Male SD rats were divided into six groups randomly. The hepatic fibrosis model was induced by intragastric administration with 50% carbon tetrachloride dissolved in peanut oil. Once the model was formed, the rat was administrated with various doses of SLT ($4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) or NS through intragastric pathway, and the process was lasted for 9 weeks. After the last administration, the rats blood and liver are taken under anesthesia. The cellular structure and grade of hepatic fibrosis were observed by histological method, as well as the content and activity of MDA, SOD, GSH-Px in serum and hepatic tissue were detected. **Result:** In the model group, severe degeneration and necrosis of hepatic cells, significant accumulation of collagen fibers was observed, the level of MDA in hepatic tissue and serum was increased, and the activity of SOD and GSH-Px was decreased obviously. After treated with SLT, degeneration and necrosis of hepatic cells and the grade of hepatic fibrosis were inhibited, the level of MDA was descended, and the activity of SOD and GSH-Px was enhanced significantly. **Conclusion:** SLT has a therapeutic effect on hepatic fibrosis in rats, the mechanism is possibly related with alleviation of the injury induced by lipid peroxidation.

[Key words] *Sedum lineare*; hepatic fibrosis; lipid peroxidation

[收稿日期] 20100715(004)

[基金项目] 江西省卫生厅中医药科研基金(2006B37)

[第一作者] 周俐, 大专, 高级实验师, 从事中药药理研究, Tel: 0797-8169776, E-mail: zhoulili6099@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 周青, 大专, 高级实验师, 从事中药药理研究, Tel: 0797-8169776, E-mail: zhouqing4819@yahoo.com.cn

肝纤维化(liver fibrosis)是肝脏对多种慢性损伤的病理修复反应,以肝脏细胞外基质过度增生沉积为特征,以肝星状细胞(HSC)激活为其细胞学基础,在分子水平上除与细胞因子等有关外,也与氧化应激相关分子密切相关。目前研究表明实验性肝纤维化与氧化应激有关,而且抗氧化剂可以减慢或阻止肝纤维化的发展^[1]。佛甲草 *Sedum lineare* Thunb, SLT 是景天科植物佛甲草的全草,性味甘、寒、无毒,具有清热解毒、散瘀消肿及利胆等功效。前期研究表明,SLT 对 CCl₄ 诱导的小鼠实验性肝损伤、脂质过氧化均有显著的抑制作用^[2,3]。因此我们采用 CCl₄ 诱导大鼠形成肝纤维化模型,探讨其是否与抗脂质过氧化有关。

1 材料和方法

1.1 药品 SLT 制备:SLT 采自赣州,夏、秋季采集,晒干后粉碎至粗粉,取适量蒸馏水加热提取 2 次,每次 30 min,过滤,合并 2 次滤液并浓缩至适量,加入相当浓缩液 3 倍量 95% 乙醇,放置冰箱 48 h 后减压过滤,滤液回收乙醇至无醇味,用蒸馏水调整至含 4 g·mL⁻¹ 的生药液;秋水仙碱(Colchicine, Col), Serva 公司产品。

1.2 试剂 四氯化碳(CCl₄),分析纯,上海长江化工厂;丙二醛、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和考马斯亮兰蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所提供。

1.3 动物 SD 大鼠,雄性,清洁级,体重 220 ~250 g 江西中医学院实验动物中心提供。动物合格证号 JZDW 2009-0468。

1.4 仪器 722N 可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;KDC-2046 低速冷冻离心机,合肥科大创新股份有限公司中佳分公司;麦克奥迪病理图像分析系统,麦克奥迪公司。

1.5 动物模型与药物处理 雄性 SD 大鼠,随机分成 5 组,设正常对照组、模型组、阳性对照组(Col, 0.1 mg·kg⁻¹)、SLT 低剂量组(SLT, 4 g·kg⁻¹)、SLT 高剂量组(SLT, 8 g·kg⁻¹)。除正常对照组 ig 生理盐水外,其余 4 组 ig 50% CCl₄ (CCl₄-花生油, 1 : 1), 0.002 mL·g⁻¹ 体重,首剂加倍,每周两次。造模当日起,给药组每天分别 ig SLT 4, 8 g·kg⁻¹, 0.01 mL·g⁻¹ 体重,正常组、模型组 ig 等体积生理盐水。连续给药 9 周后,ip 10% 水合氯醛麻醉,打开腹腔,腹主动脉取血,制备血清, - 80 ℃ 保存待检;切取左叶肝

脏置体积分数 10% 甲醛固定用作光镜观察以及制备 10% 肝组织匀浆待检。

1.6 观测指标及方法

1.6.1 肝组织病理学检查 常规切片,HE 染色,光镜下观察病理改变。肝纤维化分级标准参考文献^[4-5]: 0 级:肝组织正常,无胶原纤维增生; Ⅰ 级:胶原纤维仅局限于汇管区或汇管区扩大,有向小叶发展的趋势; Ⅱ 级:胶原纤维增生进入肝小叶 2/3,多数中央静脉-中央静脉纤维间隔形成; Ⅲ 级:胶原纤维增生进入肝小叶达中央静脉周围,中央静脉-中央静脉、中央静脉-汇管区纤维间隔形成; Ⅳ 级:胶原纤维在全小叶多处弥漫性增生,假小叶形成,并有 Ⅲ 级同样改变; Ⅴ 级:肝小叶结构完全破坏。肝纤维化积分方法为纤维化 1 级 3 分,2 级 6 分……6 级 18 分,其中根据每一级大鼠肝纤维化程度不同依次记为 1, 2, 3……18 分。

1.6.2 左叶肝脏丙二醛含量和超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性的测定 取 150 mg 左叶肝脏组织,用 NS 在冰浴中制成 10% 组织匀浆, 4 ℃ , 3 500 r·min⁻¹, 离心 10 min, 取上清液按照试剂盒说明用硫代巴比妥酸(TBA)微量法测定肝组织 MDA 含量;用黄嘌呤氧化酶法测定肝组织 SOD 活性;用 DTNB 直接法测定肝组织 GSH-Px 的活力,组织 GSH-Px 活力单位,规定为每毫克组织总反应,每分钟扣除非酶反应后,使 GSH-Px 降低 1 μmol·L⁻¹ 为 1 个酶活力单位;蛋白定量采用考马斯亮兰法,以牛血清白蛋白为标准。

1.6.3 血清丙二醛含量和超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性的测定 大鼠腹主动脉取血,静止, 4 ℃ , 3 000 r·min⁻¹, 离心 15 min, 分离血清,按照试剂盒说明用硫代巴比妥酸(TBA)微量法测定血清 MDA 含量;用黄嘌呤氧化酶法测定血清 SOD 活性;用 DTNB 直接法测定血清 GSH-Px 的活力。

1.6.4 统计学处理 应用 Prism 4.0 统计学软件进行统计学分析。各测量指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间测定指标的总体比较采用单因素方差分析,组内各指标的多重比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SLT 对肝纤维化大鼠一般状况的影响 模型组大鼠毛质粗糙,厌食,精神萎靡,动作迟缓,体重明显减轻并有死亡,解剖肝脏花斑样改变,苍白、质硬,

有的有腹腔积液; 给药组有所改善。造模期间各动物均有死亡, 模型组死亡 6/15, 秋水仙碱组死亡 4/15, SLT 4 g·kg⁻¹ 组死亡 3/15, SLT 8 g·kg⁻¹ 组死亡 5/15。

2.2 SLT 对肝纤维化大鼠肝脏病理组织学影响
肝组织病理学检查采用 HE 染色。光镜下可见正常对照组大鼠肝小叶、汇管区结构正常, 肝索排列清

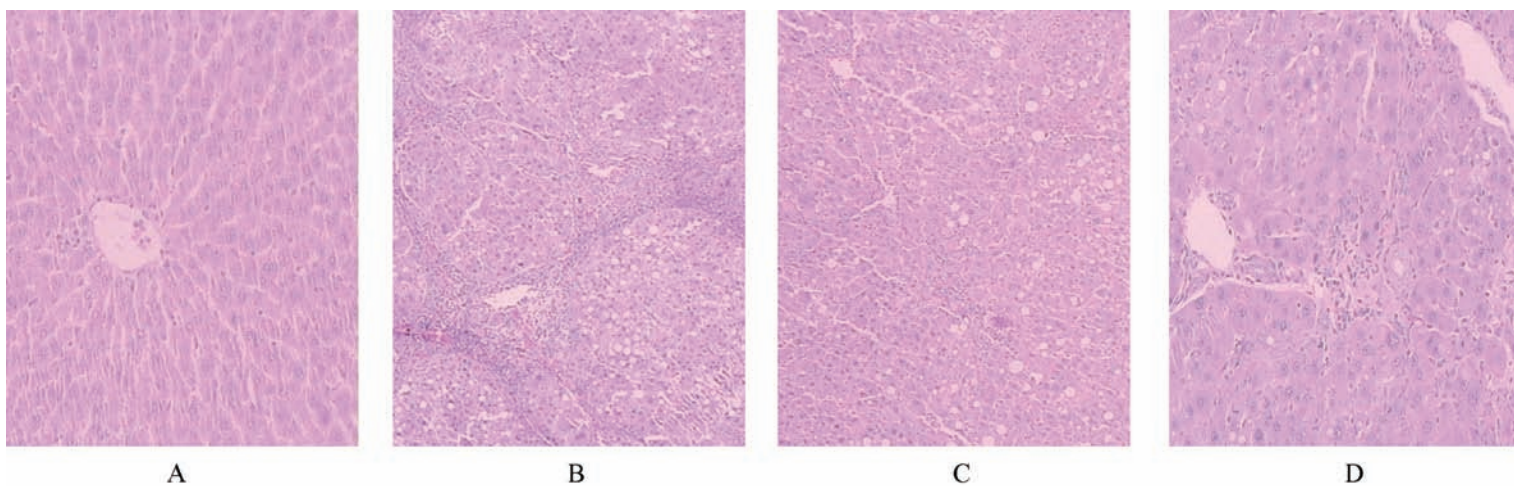


图 1 各组大鼠肝脏光镜下病理变化(HE ×100)

A. 生理盐水对照组; B. CCl₄ 对照组; C. 秋水仙碱组; D. SLT8 g·kg⁻¹ 组

表 1 SLT 对大鼠肝纤维化增生程度的影响(柳士s)

组别	给药剂量 /g·kg ⁻¹	n	肝纤维化分级							肝纤维化 积分值
			0	1	2	3	4	5	6	
正常对照	-	10	10	0	0	0	0	0	0	
模型	-	9	0	0	1	3	4	1		10.67 ±2.65
SLT I	4	12	0	1	4	4	3	0		8.25 ±2.90
SLT	8	10	0	3	3	3	1	0		6.60 ±3.10 ¹⁾
秋水仙碱	10-4	11	0	2	4	3	2	0		7.36 ±3.11 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ P < 0.05。

2.3 SLT 对肝纤维化大鼠左叶肝脏组织 MDA 含量, SOD, GSH-Px 活性的影响 实验结果见表 2。与正常对照组大鼠比较, 模型组大鼠左叶肝脏组织 MDA 的含量显著升高 (P < 0.01), SOD, GSH-Px 活力明显降低 (P < 0.05); 与模型组比较, SLT 低剂量 (SLT, 4 g·kg⁻¹)、SLT 高剂量 (SLT, 8 g·kg⁻¹) 治疗组大鼠左叶肝脏组织 MDA 的含量明显降低 (P < 0.05), SOD, GSH-Px 活力显著升高 (P < 0.05)。提示 SLT 可降低大鼠肝脏组织氧自由基的产生。

2.4 SLT 对肝纤维化大鼠血清 MDA 含量, SOD, GSH-Px 活性的影响 实验结果见表 3。与正常对照组大鼠比较, 模型组大鼠血清 MDA 含量显著升高 (P < 0.001), SOD, GSH-Px 的活性显著降低 (P < 0.001); 与模型组比较, SLT 低剂量 (SLT, 4 g·kg⁻¹)、SLT 高剂量 (SLT, 8 g·kg⁻¹) 治疗组大鼠血清 MDA 含量明显降低 (P < 0.001, P < 0.05), SOD,

无变性、坏死, 无急慢性炎细胞浸润及纤维间隔和假小叶形成等病理改变; 模型组大鼠肝脏纤维组织增生, 肝小叶、汇管区结构紊乱, 有数量不等的炎性细胞浸润, 肝索排列混乱, 纤维间隔明显增宽, 并形成假小叶; SLT 组大鼠肝脏总体病变程度较模型组轻, 可见少量的炎性细胞浸润, 无假小叶形成。见图 1; 各组大鼠肝脏纤维化分级情况见表 1。

GSH-Px 的活性显著升高 (P < 0.05, P < 0.01), 提示 SLT 可降低大鼠血清氧自由基的产生。

表 2 SLT 对肝纤维化大鼠左叶肝脏组织 MDA 含量, SOD, GSH-Px 活性的影响(柳士s)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	MDA /nmol·mg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	GSH-Px /U·mg ⁻¹
对照	-	10	12.75 ±5.63	45.56 ±8.51	138.27 ±49.38
模型	-	9	35.06 ±26.79 ²⁾	33.13 ±7.97 ¹⁾	89.18 ±37.92 ¹⁾
SLTI	4	12	19.42 ±12.26 ³⁾	42.05 ±9.75 ³⁾	126.79 ±34.28 ³⁾
SLT	8	10	16.79 ±6.84 ³⁾	44.55 ±6.01 ³⁾	145.36 ±36.54 ³⁾
Col	10-4	11	16.96 ±7.52 ³⁾	44.78 ±7.99 ³⁾	133.71 ±33.29 ³⁾

注: 与对照组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与模型组比较³⁾ P < 0.05。

表 3 SLT 对肝纤维化大鼠血清 MDA 含量, SOD, GSH-Px 活性的影响(柳士s)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	MDA /nmol·mg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	GSH-Px /U·mg ⁻¹
对照	-	10	3.94 ±1.10	167.79 ±11.67	102.68 ±5.64
模型	-	9	8.70 ±1.51 ¹⁾	124.70 ±25.90 ¹⁾	86.52 ±13.08 ¹⁾
SLT I	4	12	7.35 ±1.65 ²⁾	145.24 ±20.39 ²⁾	96.28 ±6.14 ²⁾
SLT	8	10	5.89 ±1.42 ⁴⁾	152.09 ±18.61 ²⁾	100.17 ±4.82 ³⁾
Col	10-4	11	6.14 ±1.46 ⁴⁾	148.73 ±12.87 ²⁾	104.64 ±9.8 ⁴⁾

注: 与对照组比较¹⁾ P < 0.001; 与模型组比较²⁾ P < 0.05, ³⁾ P < 0.01, ⁴⁾ P < 0.001。

3 讨论

目前研究认为, 肝纤维化病理改变是细胞外基质 (ECM) 的增生和降解失衡所致, 而病理情况下

ECM的主要细胞来源是肝星状细胞(HSC),其激活和增生在肝纤维化过程中起主要作用^[6]。细胞外基质主要成分包括蛋白多糖、黏连蛋白、胶原蛋白3大类,血清HA, LN, PC, C 分别为3种基质成分的代表,其水平可反映肝纤维化程度,并与病变程度呈正相关^[7]。CCl₄诱导的大鼠肝纤维化模型是研究肝纤维化的经典模型,脂质过氧化在肝纤维化过程中发挥重要作用。CCl₄致肝纤维化的主要机制就是活性氧自由基的产生及其引发的脂质过氧化,损伤肝细胞,产生脂质过氧化的终产物MDA等,MDA可以激活静息状态的肝星型细胞(hepatic stellate cells, HSCs),促进HSC转化、增殖和合成ECM,同时抑制ECM降解,最终导致肝纤维化的形成^[8];而脂质过氧化被认为是肝脏炎性损伤发展至肝纤维化的桥梁,抗氧化剂治疗可预防(减轻)肝纤维化^[9];因此,抑制HSCs的活化,减少其增殖和ECM的生成,在防治肝纤维化中有重要意义,并可通过抗脂质过氧化来达到抗肝纤维化的目的^[10]。MDA是自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸而引发的脂质过氧化作用的最终分解产物,其含量水平可反映机体内细胞脂质过氧化的程度^[11-12]。SOD能将氧自由基歧化为H₂O₂,进一步在CAT(过氧化氢酶),GSH-Px的催化下被清除,从而保护细胞免受损伤^[13]。本实验联合检测血清及肝组织中MDA含量和SOD,GSH-Px活性,能反映机体脂质过氧化反应对组织的损伤程度。

本研究显示,病理组织学HE染色发现模型组大鼠肝细胞损伤严重,肝纤维化程度严重,在采用CCl₄诱导制备大鼠肝纤维化模型的同时,给予不同浓度的SLT干预,从组织切片发现2个不同剂量组的大鼠肝脏纤维组织增生、脂肪变性、炎性细胞浸润均低于模型组,肝纤维化病理改变明显得到改善,说明SLT对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化有较好的预防保护作用。同时,模型组大鼠血清及肝组织中MDA含量,SOD,GSH-Px活性与正常对照组比较,有显著性差异;SLT组与模型组比较,均能显著降低大鼠血清及肝组织中MDA含量,升高SOD,GSH-Px活性,有显著性差异。各组MDA在血清和肝组织中反映的增强程度与病理上肝纤维化严重程度相平行,模型组MDA含量明显增加,说明脂质过氧化在实验性肝纤维化的发生、发展过程中可能起重要作用。SLT能显著升高大鼠型血清和肝组织SOD,GSH-Px的活性、降低MDA的含量,说明SLT能提高机体的抗氧化

酶活性,抑制自由基的产生及其引起的脂质过氧化反应,并清除氧自由基,使大鼠肝纤维化程度减轻;提示抗脂质过氧化损伤作用可能是SLT抗肝纤维化的作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 刘诗权,于皆平,冉宗学.银杏叶提取物对大鼠慢性肝损伤的保护作用[J].中国药科大学学报,2003,34(1):61.
- [2] 周青,刘建新,周俐,等.佛甲草对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J].时珍国医国药,2005,16(12):1228.
- [3] 周青,许庆林,周俐,等.佛甲草对四氯化碳中毒小鼠的抗脂质过氧化作用研究[J].赣南医学院学报,2003,23(2):128.
- [4] Havasakv A, Saiaho. Serum markers as tools to monitor liver fibrosis[J]. Digestion, 1998, 59(4):381.
- [5] Scheuer P J. Scoring of liver biopsies: are we doing it right[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996, 8: 1141.
- [6] Sakata R, Ueno T, Nakamura T, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet derived growth factor induced proliferation human hepatic stellate cell line 1/90[J]. J Hepatol, 2004, 40(1):52.
- [7] Li C H, Piao D M, Xu W X, et al. Morphological and serum hyaluronic acid, laminin and type collagen changes in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis of rats[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(48):7620.
- [8] Isono M, Soda M, Inoue A, et al. Reverse translocation of hepatic myofibroblast-like cells by TGFβ1/IAP[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311(4):959.
- [9] 和水祥,王艳丽,符寒,等.银杏叶提取物防治肝纤维化的实验研究[J].西安交通大学学报:医学版,2004,25(6):594.
- [10] 包晗,陈亚冬,王坚.肝纤维化与脂质过氧化的关系及其对中药治疗肝纤维化的指导意义[J].传染病学,2000,10(4):23.
- [11] 齐宝宁,易建华,唐国慧,等.正己烷致大鼠脂质过氧化及肝细胞DNA损伤的实验研究[J].西安交通大学学报:医学版,2007,28(2):145.
- [12] 马兰军,毛雁,熊正英.沙苑子对运动训练大鼠肝脏自由基代谢的影响[J].西安交通大学学报:医学版,2007,28(4):409.
- [13] 江海艳,王春妍,杨世忠.化痰通络解毒法对肝纤维化大鼠血清超氧化物歧化酶、丙二醛和转化生长因子1的影响[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(6):59.

[责任编辑 邹晓翠]