

DLE 对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用

毛爱红^{1,2}, 唐德平¹, 王廷璞¹, 魏娟¹, 王勤^{*}

(1. 兰州大学生命科学学院, 甘肃兰州730000; 2. 甘肃省医学科学研究所, 甘肃兰州730050; 3. 天水师范学院, 甘肃天水741001)

摘要 [目的] 探讨秃疮花提取物(DLE)对四氯化碳(CCl_4)诱导的小鼠急性肝损伤的影响。[方法] 小鼠灌胃给予不同剂量的DLE, 连续10 d后腹腔注射 CCl_4 造成急性肝损伤, 16 h后测定血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性及肝组织匀浆中丙二醛(MDA)和抗氧化酶活性; 同时进行肝组织病理学观察。[结果] 与模型组相比, 不同剂量的DLE给药组血清ALT、AST活性显著降低, 肝组织匀浆MDA含量显著减少; 抗氧化酶SOD、GSH Px活性显著升高; 病理切片表明DLE作用后肝组织损伤不同程度地减轻, 其中剂量为2.0 g/kg时, 肝组织的损伤程度较轻。[结论] DLE对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤具有很好的保护作用。其作用机理可能与DLE抑制抗氧化酶活性降低和抗自由基活性有关。

关键词 秃疮花提取物; 四氯化碳; 急性肝损伤; 保肝作用

中图分类号 S865.1+3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)22-09547-03

Protective Effect of DLE on Acute Liver Injury in Mice Induced by CCl_4

MAO Ai-hong et al (College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000)

Abstract [Objective] The research aimed to discuss the effects of DLE on the acute liver injury in mice induced by CCl_4 . [Method] Different dosage of DLE was injected through stomach in mice and CCl_4 was given through intraperitoneal injection for 10 d continuously to cause the acute liver injury. After 16 hours, the activities of ALT and AST in the serum, and MDA content and antioxidant enzyme activity in the liver homogenate were determined. At the same time, the pathological observation of liver tissues was made. [Result] Compared with model group, the activities of serum AST and ALT and MDA content in the liver homogenate in drug group with different dosages of DLE increased significantly. And the activities of antioxidant enzymes SOD and GSH Px increased significantly. The pathological sections showed that liver injury was reduced to different extent after DLE treatment. When the dosage of DLE was 2.0 g/kg, the injury degree of liver tissues was slighter. [Conclusion] DLE has good protective effect on the acute liver injury in mice induced by CCl_4 . Its mechanism might be related with the inhibition of DLE on the decrease of antioxidant enzyme activities and the anti-radicals activity.

Key words *Dicranostiga leptodu* extract (DLE); Carbon tetrachloride; Acute liver injury; Liver protection

肝细胞损伤是各型肝炎的病理基础, 治疗与纠正肝细胞损伤是各型肝炎治疗的主要措施之一。大量研究证明, 中草药在抗肝细胞损伤和肝纤维化治疗中有良好的效果和独特的优势, 与其抗氧化和自由基活性有关^[1-3]。具有自由基和抗氧化活性的中草药有望在不久的将来成为临床上新的、高效的肝病用药。

秃疮花提取物中含有多种活性成分, 主要含有异紫堇碱、原阿片碱、紫堇啡碱及木兰碱等生物碱成分^[4-5]。魏怀玲报道紫堇中提出的紫堇灵、乙酰紫堇灵、原阿片碱对小鼠实验性肝损伤具有保护作用^[6]。该试验所用秃疮花提取物 [*Dicranostiga leptodu* (Maxim.) Fedde extraction, DLE] 由甘肃平凉肝病结核病研究所提供, 经兰州药检所、中科院兰州化物所测定分析, 样本中所含生物总碱以其雷氏盐计为1.3%。通过质谱分析技术对样本进行检测, 得2种生物碱组分: 原阿片碱和异紫堇啡碱。

已有研究表明: DLE具有激活小鼠机体免疫系统, 抑制肿瘤新血管形成和诱导其凋亡, 有效抑制 H_2O_2 诱导的红细胞溶血, 保护BCG和LPS诱导的小鼠免疫性肝损伤等作用, 且具有较低的毒性^[7-9]。笔者从DLE抗氧化的角度探讨DLE对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤影响及作用机理, 为临床开发新的肝病用药提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物。昆明系健康小鼠, 雌雄各半, 体重(20 ± 2) g, 由兰州大学实验动物中心提供。

1.1.2 药品。DLE, 生药含量2 g/ml, 甘肃平凉肝病结核病研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤模型的建立^[10]。健康小鼠随机分组, 每组12只。给药组小鼠灌胃分别给予剂量为1.0、2.0、4.0 g/kg体重的DLE, 连续10 d。正常组和模型组小鼠灌胃给予等剂量生理盐水。最后一次给药24 h后, 模型组和给药组腹腔注射0.1% CCl_4 , 0.2 ml/10 g, 造成小鼠肝损伤。正常组给予等量的生理盐水, 16 h后, 眼眶取血制备血清, 解剖肝脏制备肝组织匀浆, 进行各项指标观察。

1.2.2 血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性测定。小鼠眼眶取血, 放入1.5 ml的Eppendorf管中, 37℃水浴30~50 min, 1 000 r/min离心10 min, 分离血清。采用日立7060全自动生化分析仪测定ALT、AST活性。

1.2.3 肝组织匀浆抗氧化酶活性测定。制备10%的肝组织匀浆。按照南京建成公司的试剂盒说明书测定SOD、CAT、GSH Px活性。蛋白含量的测定采用Bradford法。SOD、CAT、GSH Px活性测定用每毫克蛋白中酶催化活性表示, 即U/ng蛋白。

1.2.4 采用TBA改进法^[11]测定肝组织匀浆MDA含量。

1.2.5 肝组织病理形态观察。制备肝组织病理切片, 采用OLYMPUS BH2显微镜观察照相。

2 结果与分析

2.1 DLE对 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠血清ALT、AST活性的影响 由表1可见, CCl_4 造成小鼠肝损伤后, 血清ALT、AST水平极显著升高($P < 0.05$); 各剂量的DLE均能够显著抑制小鼠血清ALT、AST水平的升高, 其中ALT水平分别降低71.2%、66.1%、57.2%; AST水平分别降低62.9%、57.6%、58.7%, 与模型组相比差异极显著($P < 0.05$)。

基金项目 甘肃省科技厅科研基金(03-1-23)。

作者简介 毛爱红(1978-), 女, 河南商水人, 硕士研究生, 研究方向: 免疫生化。* 通讯作者, 教授, E-mail: qwang@lzu.edu.cn。

收稿日期 2008-05-14

表1 DLE 对 CCl_4 诱导的肝损伤小鼠血清ALT、AST 活性的影响Table 1 Effects of DLE on the activities of ALT and AST in the serum of liver injury mice induced by CCl_4

组别 Group	剂量 Dosage g/kg	ALT U/L	AST U/L
对照组 Control group	-	15.69 ± 2.33	19.58 ± 4.53
模型组 Model group	-	249.00 ± 57.16 a	252.31 ± 20.90 a
药物组 Drug group	1.0	71.82 ± 18.87 b	93.68 ± 12.67 b
	2.0	84.45 ± 21.38 b	107.04 ± 12.93 b
	4.0	106.61 ± 18.80 b	104.34 ± 8.32 b

注:a. 与对照组相比, $P < 0.01$; b. 与模型组相比, $P < 0.05$ 。

Note: a. Compared with control group ($P < 0.01$); b. Compared with model group ($P < 0.05$).

表2 DLE 对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤组织匀浆中SOD、CAT、GSH Px 酶活性的影响Table 2 Effects of DLE on the activities of SOD, CAT and GSH Px in the homogenate of liver injury mice induced by CCl_4

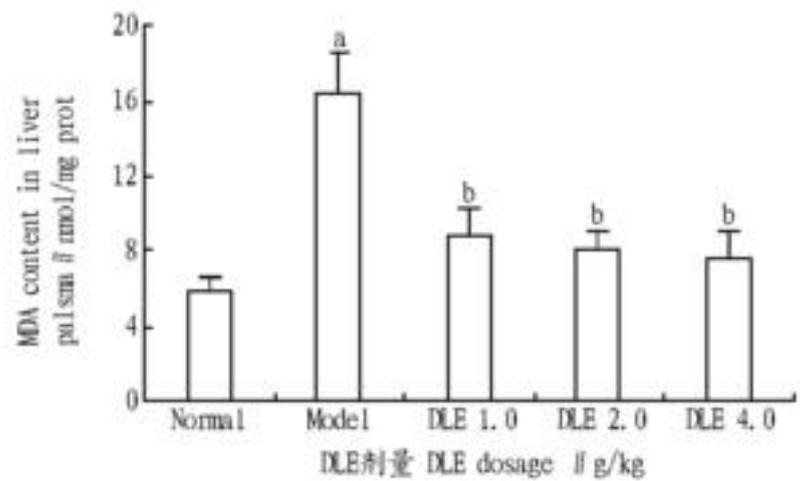
组别 Group	剂量 g/kg Dosage	SOD	CAT	GSH Px
对照组 Control group	-	246.28 ± 3.73	0.621 ± 0.053	3.64 ± 0.64
模型组 Model group	-	166.72 ± 19.93 a	0.459 ± 0.062 a	2.25 ± 0.53 a
药物组 Drug group	1.0	207.30 ± 13.53 b	0.572 ± 0.064	2.71 ± 0.83 b
	2.0	212.98 ± 9.99 b	0.644 ± 0.054 b	3.58 ± 0.76 b
	4.0	195.00 ± 9.45 b	0.542 ± 0.083	2.46 ± 0.39

注:a. 与对照组相比, $P < 0.01$; b. 与模型组相比, $P < 0.05$ 。

Note: a. Compared with control group ($P < 0.01$); b. Compared with model group ($P < 0.05$).

2.2 DLE 对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤组织匀浆中SOD、CAT、GSH Px 酶活性的影响 CCl_4 造成肝损伤后, 小鼠肝组织匀浆SOD、CAT、GSH Px 的活性极显著降低 ($P < 0.01$); 各剂量DLE 均不同程度地抑制SOD、CAT、GSH Px 活性的降低, 与模型组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 其中DLE 剂量为 2.0 g/kg 时, DLE 抑制效果最好(表2)。

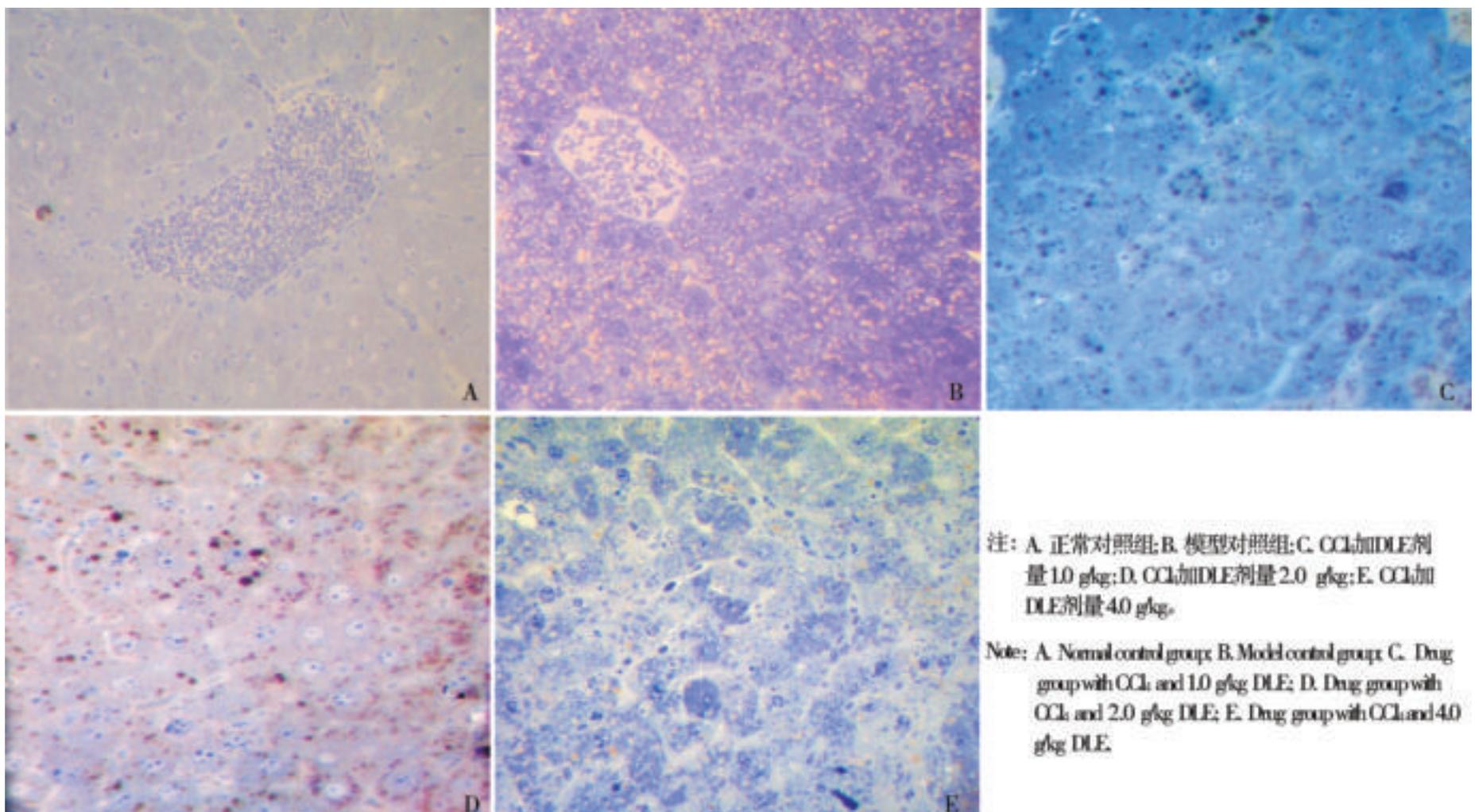
2.3 DLE 对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤组织匀浆MDA 含量的影响 图1 表明, CCl_4 造成肝损伤后小鼠肝组织匀浆MDA 极显著增加 ($P < 0.01$); DLE 给药组小鼠肝组织匀浆MDA 含量分别降低了47.3%、51.3%、53.7%, 与模型组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。表明DLE 能够显著降低脂质过氧化产物MDA 在组织中的积累。



注:a. 与对照组相比, $P < 0.01$; b. 与模型组相比, $P < 0.01$ 。

Note: a. Compared with control group ($P < 0.01$); b. Compared with model group ($P < 0.05$).

图1 DLE 对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤组织匀浆MDA 含量的影响
Fig.1 Effects of DLE on MDA content in liver tissue homogenate of liver injury mice induced by CCl_4



注: A. 正常对照组; B. 模型对照组; C. CCl_4 加DLE剂量1.0 g/kg; D. CCl_4 加DLE剂量2.0 g/kg; E. CCl_4 加DLE剂量4.0 g/kg。

Note: A. Normal control group; B. Model control group; C. Drug group with CCl_4 and 1.0 g/kg DLE; D. Drug group with CCl_4 and 2.0 g/kg DLE; E. Drug group with CCl_4 and 4.0 g/kg DLE.

图2 肝组织病理切片(台盼兰染色, $\times 40$)

Fig.2 Pathological sections of liver tissue (Typan blue staining, $\times 40$)

2.4 肝组织病理切片观察 如图2 所示, 正常组小鼠肝小叶结构完整, 肝细胞排列整齐, 无变形, 无炎症细胞浸润(图

2A); 与正常组相比, CCl_4 诱导急性肝损伤组小鼠的肝细胞肿胀并散乱分布, 胞浆疏松透亮, 呈水样变(图2B); DLE 给药组

小鼠肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐,有少许细胞胞浆疏松,肝细胞呈放射状排列,无变形(图2C、D),或肝小叶结构基本完整,有少许细胞胞浆疏松,间质有少许炎细胞浸润(图2E)。表明DLE作用后肝组织损伤有不同程度减轻;DLE剂量为2.0 g/kg时,肝组织的损伤程度较轻,表明DLE对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤具有很好的保护作用。

3 结论与讨论

CCl_4 诱导的急性肝损伤小鼠血清ALT、AST水平升高与肝细胞损伤程度呈粗略的平行关系^[12]。试验中,小鼠腹腔注射 CCl_4 色拉油溶液16 h后,模型组小鼠血清ALT水平升高了16.67倍,AST水平升高了约12.89倍,说明 CCl_4 肝损伤模型诱导成功;与急性肝损伤模型组小鼠相比,DLE给药组小鼠血清ALT、AST水平显著降低($P < 0.01$),根据临床疗效判定标准^[13],DLE给药组小鼠血清ALT、AST水平较未给药的模型组小鼠数值均下降50%,说明DLE对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤有很好的保护作用。

CCl_4 毒性依赖于 $CCl_3\cdot$ 的生成,在有氧的情况下,生成更具毒性的 $CCl_3O_2\cdot$ 。 CCl_4 中毒后由于自由基产物增加造成的氧胁迫在肝组织损伤中发挥更重要的作用^[13]。SOD、CAT和GSH Px是细胞内主要的抗氧化酶,可清除自由基,激活或调动机体中的内源性抗氧化系统,预防或减轻自由基损伤^[14]。Michels发现, CCl_4 作用后,脂质过氧化产物如MDA和HNE的含量显著增加^[15]。MDA与生物大分子结合形成加醛复合物,进一步破坏生物膜的结构和功能。因此MDA含量的多少可反映机体内脂质过氧化反应的程度,间接反映机体组织或细胞的损伤程度。该实验结果表明,各剂量的DLE均能通过提高细胞内主要抗氧化酶SOD、CAT、GSH Px活性来有效

(上接第9495页)

ng/L ABT 2个处理分别比对照提高了61.54%、34.62%,增量最大,且它们均与其他处理存在0.05水平显著差异。

(2) ABT和NAA在很大程度上促进了苗木根系的生长,提高了根系活力,增加了侧根数量。发达的根系可增强苗木抗旱、吸收水分和养分的能力,有利于苗木的高、地径生长^[7]。研究表明,ABT表现比NAA明显,尤以50 ng/L ABT处理最佳。有研究表明,苗木的根茎比越大,根系越发达,苗木质量越好;干鲜比则反映出苗木的木质化程度。该试验结果表明,NAA 50 ng/L、ABT 50 ng/L、ABT 100 ng/L处理的根茎比和干鲜比均大于对照,可有效促进根系生长。可见,合适的植物生长调节剂处理从整体上提高了苗木质量。

(3) 在适宜浓度范围内,ABT浓度越高,叶面积、叶绿素含量、含糖量等越大;而在NAA 3个浓度中,则以50 ng/L处理的影响较明显。这与刘立侠等的研究结果相似^[8-9]。由此可知,叶面积、叶绿素含量直接影响植物有机物质的积累,进而影响到苗木的生长。

(4) 2种生长调节剂不同程度地促进了大叶栎苗木的生

抑制自由基与膜脂的不饱和脂肪酸相互作用,阻止脂质过氧化链式反应的启动,使MDA在生物膜内的积累大大减少,减轻 CCl_4 对小鼠造成的急性肝损伤。

参考文献

- [1] GUOMZ,II XS,XUHR,et al. Rhininihibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloide in rats[J]. Acta Pharnacd Sn,2002,23(8):739-744.
- [2] HUY Y,IIUC,XUL M,et al. Actions of salvianic acid A on CCl_4 poisoned liver injury and fibrosis in rats[J]. Acta Pharnacd Sn,1997,18:478-480.
- [3] ZHANG J P,ZHANG M,ZHOU J P,et al. Antifibrotic effects of nature on in vitro and in vivo models of liver fibrosis in rats[J]. Acta Pharnacd Sn,2001,22:183-186.
- [4] 畅行若,王宏新,马广恩,等. 秃疮花化学成分的研究[J]. 药学通报,1981,2(16):52.
- [5] 畅行若,王宏新,周广治,等. 秃疮花化学成分及组织形态研究[J]. 药物分析杂志,1982,2(5):273-277.
- [6] 魏怀玲,刘耕涛. 紫堇灵、乙酰紫堇灵及原阿片碱对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 药学学报,1997,32(5):331-334.
- [7] 陈正山,王勤. 秃疮花注射液对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 上海免疫学杂志,2001,21(4):216-218.
- [8] 毛爱红,张昱,王勤,等. 秃疮花提取物对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2004,20(8):940-943.
- [9] 赵祁. 秃疮花提取物对红细胞氧化性溶血的抑制作用及其抗氧化机理的探讨[D]. 兰州:兰州大学,2004.
- [10] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,1994:494-495.
- [11] 向荣,王鼎年. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进[J]. 生化与生物物理进展,1990,17(13):241-243.
- [12] 张其兰. 肝药灵防治实验性肝损伤作用研究[J]. 中草药,1983,24(10):535-537.
- [13] 邹华忠,周昕兴,苏瑞福. 凯西莱治疗酒精性肝病患者肝功能异常的疗效观察[J]. 中国生化药物杂志,2000,21(6):303-304.
- [14] MELINA M,PERROMAT A,DELERIS G. Pharmacologic application of Fourier transform IR spectroscopy: in vivo toxicity of carbon tetrachloide on rat liver[J]. Bopdyners,2000,57(30):160-168.
- [15] MICHELS C,RAES M,TOUSSAINT O,et al. Importance of S-glutathione peroxidase,catalase,and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress[J]. Free Radc Bd Md,1994,7(NB):235-246.

长。在该试验浓度范围内,50 ng/L ABT处理对苗木生长的促进作用最明显,其处理的苗高、地径、根系总长、叶面积、叶绿素含量分别比对照提高了27.53%、61.54%、70.91%、64.23%、21.43%。但这2种调节剂在该试验浓度以外对苗木生长的效果以及大叶栎苗木对其他种类调节剂的反应,尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] 黄寿先,李耀斌. 广西苍梧县大叶栎生长量变异规律的初步研究[J]. 广西林业科学,2001,30(S):41-44.
- [2] 蒋x,王以红,黄荣林. 大叶栎优树选择标准的研究[J]. 西部林业科学,2006,35(3):18-21.
- [3] 余雪标,李维国. 桉树人工林的若干生态问题及其研究进展[J]. 热带农业科学,1997(4):60-68.
- [4] 陈云霞. 浅谈植物生长调节剂的应用[J]. 林副特产,2004,6(3):30.
- [5] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2007:72-75.
- [6] 王凌晖,韦源莲,陈历周,等. 生长调节剂对马占相思苗木影响的试验[J]. 广西林业科学,2002,30(4):191-194.
- [7] 王树才. 侧根的发生及其激素调控[J]. 植物学通报,2003(2):20-22.
- [8] LIUL X,XUS M,WOCK C. Influence of leaf angle on photosynthesis and the xanthophylls cycle in the tropical tree species *Acacia crassicaarpa*[J]. Tree Physiology,2003,23(18):1255-1261.
- [9] 张艳红,杨东霞,孙学东. 杜鹃花花芽分化期可溶性糖和叶绿素含量的变化[J]. 辽东学院学报,2007,14(2):65-67.