

# 中药保肝解毒汤对欧鳗 (*Anguilla anguilla*) 实验性肝病保护作用的酶学机理研究

梅景良, 黄一帆\*

(福建农林大学动物科学学院, 福州 350002)

**摘要:** 研究了由茵陈、龙胆、甘草、大黄及栀子组成的中药制剂保肝解毒汤对实验性肝病欧鳗血清转氨酶、肝脏抗氧化酶活性的影响。健康组欧鳗养于清水中, 4个处理组先暴露于 0.12 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  溶液 4 d, 其中一组作为阳性空白对照组不治疗, 其余 3组为中药治疗组, 即保肝解毒汤治疗低剂量组(200 mg/L)、保肝解毒汤治疗高剂量组(400 mg/L)和降酶灵(所含成分为五味子)治疗对照组(100 mg/L), 分别在水和相应药液中处理 4 d。结果显示: 阳性空白对照组欧鳗与健康组相比, 血清转氨酶 AST、ALT 活性极显著升高( $P < 0.01$ ), 肝脏抗氧化酶 CAT、GSH-Px 活性受抑制( $P < 0.01$ ), SOD 活性受诱导( $P < 0.05$ )。各治疗组与阳性空白对照组相比, AST、ALT 活性回落明显( $P < 0.01$ ); CAT、GSH-Px 活性显著升高( $P < 0.01$ ), 并接近或超过健康组水平; SOD 活性则在已有明显升高的基础上, 得到进一步增强, 其中以治疗低剂量组和治疗对照组最为显著( $P < 0.01$ )。本研究表明该中药制剂具有良好的抗肝损伤及恢复肝功能作用, 可用于治疗欧鳗的中毒性肝病。

**关键词:** 保肝解毒汤; 欧鳗; 硫酸铜; 实验性肝病; 转氨酶; 抗氧化酶

中图分类号: S853.23; S853.74

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)12-1353-07

## Studies on Enzymatic Mechanism of the Liver-protective Effect of Baogan Jiedu Decoction on Experimental Hepatosis in *Anguilla anguilla*

MEI Jing-liang, HUANG Yi-fan\*

(College of Animal Science,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The effect of a traditional chinese medicine preparation (TCMP) on the change of enzyme activities, such as serum transaminase, hepatic antioxidant enzyme in eel (*Anguilla anguilla*) was evaluated in this study. Six eels, acting as Cu-poisoned control fish, were exposed to waterborne Cu (0.12 mg/L) in moderately hard water for 4 days and kept at background Cu levels (0.004 mg/L) in the following 4 days. Eighteen eels were disposed in the same way as the Cu-poisoned control fish in the first 4 days, and then six eels among them were dipped in 200 mg/L water solution of Baogan Jiedu decoction (BJD), which was made up of Yinchen, Longdan, Gancacao, Dahuang and Zhizi, in the following 4 days as low-dosage-drug-treated fish, other six eels were dipped in 400 mg/L BJD as high-dosage-drug-treated fish, and the remnant six eels were dipped in 100 mg/L of Jiangmeiling capsule containing Wuweizi as drug-treated control fish. Six eels as control fish were kept at background Cu levels (0.004 mg/L) in the whole trial course of 8 days without any disposition. The fish behavior and outer symptom were observed during the trial period. At the end, the fish were killed, and their blood were immediately collected and centri-

收稿日期: 2006-02-27

基金项目: 国家科技部国际科技合作重点项目(2003DF03008); 福建省自然科学基金计划资助项目(2006J0295)

作者简介: 梅景良(1967-)男, 福建惠安人, 硕士, 副教授, 主要从事兽医药理学与动物疾病防治研究, E-mail: fujianmj@126.com

\* 通讯作者: 黄一帆(1954-)男, 福建闽清人, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为动物疾病与保健, E-mail: zjhyfang@163.com

fused to collect serum for testing the activity of its transaminase (AST and ALT). Subsequently, liver was dissected out, rinsed with double-distilled water. A fraction of the liver was treated for the assaying of antioxidant enzymes (CAT, SOD and GSH-Px). The results indicated that, compared with the control fish, the levels of ALT and AST were elevated significantly ( $P < 0.01$ ), the activities of CAT and GSH-Px decreased sharply ( $P < 0.01$ ), and the activity of SOD was activated slightly ( $P < 0.05$ ) in Cu-poisoned control fish. And in drug-treated fish and drug-treated control fish, the activities of ALT and AST dropped obviously ( $P < 0.01$ ), the activities of CAT and GSH-Px increased remarkably ( $P < 0.01$ ), the activities of SOD were enhanced further more than the Cu-poisoned control fish. Overall, these results as mentioned above demonstrated that the Baogan Jiedu decoction can enhance the activities of ALT and AST in the serum, and also bring the activities of CAT, GSH-Px and SOD going up significantly. As a result, the preparation is suggested a effective liver-protective medicine against the liver injury induced by poison.

**Key words:** Baogan Jiedu decoction; *Anguilla anguilla*; cupric sulfate; experimental hepatitis; transaminase; antioxidant enzyme

目前中草药在防治鱼病方面的试验多侧重对防治效果的研究, 对于其作用机理的研究较少, 且主要集中在中草药免疫增强剂的作用机理研究上, 而其它方面的机理研究很少<sup>[1]</sup>。虽然临床上保肝中药制剂已越来越多地应用于防治鱼病, 但这类中药制剂对鱼类是否具有确切的保肝疗效及其治疗作用机理如何, 尚未见到任何报道。

鱼类肝脏抗氧化酶、血清转氨酶活性因可受环境等因素影响, 并与鱼体的生理病理状态密切相关, 这些酶活性已成为反映中毒鱼体肝脏生理病理状态的可靠生物标志物<sup>[2~4]</sup>。因此, 为了对铜离子致欧鳗肝损伤的致病机理以及中药制剂对实验性肝病的保护作用机理获得更为全面而深入的认识和理解, 课题组在对试验欧鳗肝组织进行显微病理学和超微病理学研究的同时, 对试验欧鳗的肝脏抗氧化酶、血清转氨酶活性等酶学机理进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验鱼 30尾健康欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*), 购自福建省霞浦县某养鳗场, 平均体重 ( $238.3 \pm 18.5$ ) g, 平均体长 ( $46.6 \pm 1.9$ ) cm。

1.1.2 试验药品 中药制剂保肝解毒汤 (BJD) 由中药茵陈、龙胆、甘草、大黄、栀子 (购于福州市药材采购供应站) 组成, 按等份比例 (1:1:1:1:1) 配方制成水煎剂, 过滤, 浓缩成含生药 2 g/mL 的溶液, 高温高压消毒灭菌, 密封, 4℃以下储存备用。

降酶灵胶囊 (由湖南九汇现代中药有限公司生

产, 批号: 030602), 所含成分为五味子果仁乙醇浸出物。将其配制成含 1 g/mL 五味子生药的溶液, 密封, 4℃以下储存备用。

1.1.3 主要试剂和仪器 硫酸铜 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 为分析纯 (由上海试剂一厂生产), 用蒸馏水配成含铜离子 0.64 g/L 母液, 试验时再稀释成所需浓度。

天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 及丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 酶活性检测试剂盒购自济南希森美康医用电子有限公司。超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT) 酶活性检测试剂盒, 以及考马斯亮蓝法测定粗酶液中蛋白质含量的检测试剂盒, 均由南京建成生物工程研究所生产。

日本产 Chexix-180 型全自动生化仪, 国产 VIS-722○型可见分光光度计。

### 1.2 试验方法

1.2.1 饲养管理 购入健康欧鳗于水族箱中暂养 5 d, 增氧器 24h 增氧 (整个试验过程增氧), 不投饵; 水源为经曝气去氯处理的自来水, 其 pH 6.8~7.1, 溶解氧 9~11 mg/L, 硬度 (以  $\text{CaCO}_3$  计) 4.0 mg/L, 铜离子 0.004 mg/L, 其它指标符合渔业水质标准<sup>[5]</sup>; 水温控制在 23~25℃, 每天换水一次。

1.2.2 肝中毒病模型的建立及保肝中药制剂给药剂量 参照文献<sup>[6]</sup>及孙氏综合法<sup>[7]</sup>, 试验前预先测定欧鳗 96h  $\text{Cu}^{2+}$  半数致死浓度  $\text{LC}_{50}$ , 获得本试验条件下的 96h  $\text{LC}_{50}$  为 ( $0.631 \pm 0.156$ ) mg/L。根据  $\text{LC}_{50}$  设计  $\text{Cu}^{2+}$  浓度梯度再进行药物性肝病造模试验, 选择肝病现象明显、酶学指标变化显著的  $\text{Cu}^{2+}$

浓度 0.12 mg/L 作为肝病模型的造模浓度。

参照水产养殖上常用的其它同类保肝中药制剂的口服治疗量进行预试验,确定本试验保肝解毒汤的低剂量为 200 mg/L,高剂量为 400 mg/L,治疗对照药降酶灵胶囊的剂量为将其内容物稀释成相当于含 100 mg/L 五味子生药的溶液。

1.2.3 试验分组及给药方法 随机将欧鳗平均分为 5 组。其中组 I 作为本试验的阴性空白对照组(即健康组),养于清水中,每天换水一半;组 II、组 III、组 IV、组 V 为试验组,均暴露于 0.12 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  溶液 4 d,每天换液一半以保证铜离子浓度稳定。第 5 天起,组 II 作为本试验的阳性空白对照组养于清水中;组 III 为阳性治疗试验低剂量组,浸浴于含保肝解毒汤 200 mg/L 溶液中;组 IV 为阳性治疗试验高剂量组,浸浴于含保肝解毒汤 400 mg/L 溶液中;组 V 为阳性治疗试验对照组,浸浴于用降酶灵胶囊内容物稀释成的相当于含 100 mg/L 五味子生药的溶液中。以上各组每天均换液一半,持续 4 d。

#### 1.2.4 血清转氨酶及肝脏抗氧化酶活性的测定

血清的制备:试验结束时,对试验鱼进行 MS-222 麻醉,从尾动脉采血 1.5 mL,血液于室温下静置 0.5 h 后 3 500 r/min 离心 15 min,取上层血清置 1.5 mL 塑料离心管中待测转氨酶活性。

粗酶液的制备:在冰盘中解剖试验鱼,取肝组织,用预冷的双蒸水漂洗去血液,剪去附着的结缔组织,再用滤纸吸去肝组织表面水分,剪碎混匀。称取 0.30 g 肝组织置研钵中,加 1 mL 预冷的生理盐水及少量石英砂,充分研磨。用生理盐水定容到 8.0 mL。然后于 4 °C 下 3 500 r/min 离心 15 min,将上清液即粗酶液置 4 °C 冰箱中保存待测各种酶活性(必须 24 h 内分析完毕)。

血清转氨酶活性的测定:AST 和 ALT 活性测定方法参照 Chexix-180 型全自动生化仪血生化分析指南和试剂盒说明进行。

肝脏抗氧化酶活性的测定:SOD、GSH-Px、CAT 活性的测定方法按试剂盒说明进行。SOD 活性单位定义:每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活性单位( $U_{\text{SOD}}$ )。GSH-Px 活性单位定义:每毫克组织蛋白,每分钟扣除非酶反应的作用,使反应体系中 GSH 浓度降低 1  $\mu\text{mol/L}$  为一个 GSH-Px 活性单位( $U_{\text{GSH-Px}}$ )。CAT 活性单位定义:每毫克组织蛋白每秒钟分解 1  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  的量为一个 CAT 活性单位( $U_{\text{CAT}}$ )。

粗酶液中蛋白质含量采用考马斯亮蓝法测定,具体操作按试剂盒说明进行。

### 1.3 数据统计方法

数据用平均数±标准误( $Mean \pm SD$ )表示。各组试验数据用参比差值法及 SPSS11.0 软件包进行统计分析,比较各处理组与对照组的差异显著性, $P < 0.05$  表明差异显著, $P < 0.01$  表明差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 血清转氨酶活性的变化

由表 1 可见,组 II(阳性空白对照组,即铜离子中毒不治疗组)欧鳗血清中的 AST 活性与组 I(阴性空白对照组,即健康组)之间差异极显著( $P < 0.01$ ),组 II 欧鳗血清中的 AST 活性比组 I 高 147.90%;组 III(治疗低剂量组)、组 IV(治疗高剂量组)、组 V(治疗对照组)与组 II 之间差异极显著( $P < 0.01$ ),分别比组 II 低 48.93%、25.98%、46.63%;组 III 与组 I 之间差异显著( $P < 0.05$ ),组 IV、组 V 与组 I 之间差异极显著( $P < 0.01$ ),3 个用药组分别仍比组 I 高出 26.61%、83.50% 和 32.30%;组 III 与组 IV 之间差异极显著( $P < 0.01$ ),与组 V 之间差异不显著( $P > 0.05$ );组 IV 与组 V 之间差异极显著( $P < 0.01$ )。结果表明,铜离子中毒能导致欧鳗血清中的 AST 活性出现极显著的升高;采用中药制剂治疗之后均能使极显著升高的 AST 活性有了非常明显的降低。3 个用药组中以治疗低剂量组的效果最理想,最接近健康组的水平,治疗对照组次之,而治疗高剂量组较差一些。

组 II 欧鳗血清中的 ALT 活性较组 I 升高 75.23%,两组之间差异极显著。组 III、组 IV、组 V 的 ALT 活性与组 II 之间差异极显著,并分别比组 II 降低 53.00%、61.06%、62.42%;组 III 与组 I 之间差异不显著,组 IV 与组 I 之间差异显著( $P < 0.05$ ),组 V 与组 I 之间差异极显著( $P < 0.01$ );组 III、组 IV、组 V 3 组之间差异不显著。由结果可知,用中药制剂治疗均能使因铜离子中毒导致的欧鳗血清中极显著升高的 ALT 活性明显降低,3 个用药组的 ALT 活性甚至低于健康组水平,其中以治疗对照组和治疗高剂量组最明显。

### 2.2 肝脏抗氧化酶活性的变化

各组欧鳗肝脏抗氧化酶活性的变化见表 2。

组 II 欧鳗肝脏中的 CAT 活性比组 I 降低了 23.25%,两组差异极显著( $P < 0.01$ )。组 III、组 IV、

表1 各组欧鳗血清转氨酶活性比较(Mean±SD)

Table 1 Comparison of the activities of transaminase in serum of *Anguilla anguilla* between groups

组别 Group	AST/U	ALT/U
组 I Group I	90.83±18.80 <sup>e</sup>	14.17±1.94 <sup>b</sup>
组 II Group II	225.17±16.98 <sup>A</sup>	24.83±2.04 <sup>A</sup>
组 III Group III	115.00±6.57 <sup>cd</sup>	11.67±3.01 <sup>bc</sup>
组 IV Group IV	166.67±30.22 <sup>B</sup>	9.67±2.58 <sup>cd</sup>
组 V Group V	120.17±10.76 <sup>C</sup>	9.33±1.97 <sup>cdE</sup>

同一列数据中肩标有相同字母者,表示差异不显著;肩标无相同字母者,表示差异显著;其中大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ ),小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同

In the same column, the difference level is showed by the superscript letters, the same letter means the difference is not significant, while if not, it means the difference is significant (the capitalization for  $P<0.01$ , the lowercase for  $P<0.05$ ). The same as below

组 V 肝脏中的 CAT 活性与组 II 比较,也有极显著的差异( $P<0.01$ ),分别比组 II 升高 31.41%、27.85%和 29.45%;组 III、组 IV、组 V、组 I 之间差异不显著。此结果显示,中药制剂治疗能使因铜离子中毒导致的欧鳗肝脏中极显著降低的 CAT 活性有了很明显的回升,并接近健康组的水平,3 个用药组的治疗效果差别很小。

组 II 欧鳗肝脏中的 SOD 活性比组 I 升高 13.37%,两组差异显著( $P<0.05$ )。组 III、组 V 肝

脏中的 SOD 活性与组 II 比较,差异极显著( $P<0.01$ ),分别比组 II 升高 15.92%和 14.75%;组 IV 与组 II 比较,差异不显著。组 III、组 IV、组 V 肝脏中的 SOD 活性与组 I 之间进行比较,差异极显著( $P<0.01$ ),分别比组 I 升高 31.42%、18.86%和 30.10%;组 III、组 IV、组 V 之间差异不显著。分析表明,铜离子中毒可导致欧鳗肝脏中的 SOD 活性明显升高,治疗低剂量组和治疗对照组酶活性进一步极显著地升高,治疗高剂量组酶活性也有一定程度的升高。3 个用药组之间的升高酶活性作用差别不大。

组 II 欧鳗肝脏中的 GSH-Px 活性与组 I 间差异极显著( $P<0.01$ ),组 II 比组 I 降低 42.16%。组 III、组 IV、组 V 的 GSH-Px 活性与组 II 比较,也有极显著的差异( $P<0.01$ ),分别比组 II 升高 130.45%、83.36%和 90.59%;组 III 与组 I 之间差异极显著( $P<0.01$ ),组 III 超过组 I 33.29%;组 IV、组 V 与组 I 之间差异不显著;组 III 与组 IV、组 V 之间差异显著,分别高出 25.68%、20.91%,而后者之间差异不显著。此结果说明,铜离子中毒可导致欧鳗肝脏中的 GSH-Px 活性极显著降低,采用中药制剂治疗之后则可使 GSH-Px 活性明显回升,甚至超出健康组的水平,其中以治疗低剂量组效果最为明显。

表2 各组欧鳗肝组织中抗氧化酶活性比较(Mean±SD)

Table 2 Comparison of the activities of antioxidant enzyme in liver tissue of *Anguilla anguilla* between groups

组别 Group	CAT/U <sub>CAT</sub>	SOD/U <sub>SOD</sub>	GSH-Px/U <sub>GSH-Px</sub>
组 I Group I	42.124±3.688 <sup>a</sup>	119.03±9.40 <sup>d</sup>	43.485±2.740 <sup>b</sup>
组 II Group II	32.331±3.299 <sup>B</sup>	134.95±3.32 <sup>e</sup>	25.151±3.706 <sup>C</sup>
组 III Group III	42.486±4.874 <sup>a</sup>	156.43±23.22 <sup>AB</sup>	57.960±3.032 <sup>A</sup>
组 IV Group IV	41.336±6.080 <sup>a</sup>	141.48±14.60 <sup>Bc</sup>	46.116±8.342 <sup>b</sup>
组 V Group V	41.854±5.592 <sup>a</sup>	154.86±6.14 <sup>B</sup>	47.935±2.719 <sup>b</sup>

### 3 讨论

#### 3.1 关于欧鳗实验性肝病模型的建立

近年来国内外常用的急性实验性肝损伤动物模型,一般是采用大鼠、小鼠或家兔作为实验动物,以四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)、D-氨基半乳糖(D-GalN)或醋氨酚(AP)作为试验造模药物<sup>[8]</sup>。但在水产养殖上,由于其对象都是鱼类等水生动物,它们与哺乳动物在生理生化以及组织结构上都有着非常大的差别,因此若采用哺乳动物作为实验动物是不合适的,所以短

期鱼类毒性试验常采用青、草、鲢、鳙四大养殖淡水鱼,较长期的多采用金鱼<sup>[9]</sup>,也有采用剑尾鱼的<sup>[10]</sup>。但考虑到本试验的特点,如个体采血量较多,故决定采用原型动物欧鳗作为试验鱼。而在现代水产养殖中,硫酸铜是常用药物,它可以防治鱼病,也可作除藻剂使用。大量研究表明,铜不但可影响鱼类的血液生理生化指标,并且由于其在鱼体鳃、肝脏的大量分布和积累,还可严重影响鳃和肝脏的组织结构及功能,从而使鱼类出现铜中毒<sup>[11~13]</sup>;其次,铜在肝中的浓度最高,在鳃中的分布次之,而在肌肉和皮肤中

的积累较少<sup>[14,15]</sup>;同时,在生产上经常由于铜使用不当而对鱼类产生损害作用,它已成为鱼类中毒性肝病的重要诱因<sup>[16]</sup>。因此,以硫酸铜作为致毒剂也更符合实际情况,试验结果也将更具有临床应用价值。结果表明,本试验中利用欧鳗和硫酸铜进行的肝病病理造模相当成功。

### 3.2 中药制剂对实验性肝病欧鳗血清转氨酶活性的影响

AST 和 ALT 是反映肝细胞受损伤的主要敏感指标<sup>[17]</sup>。测定 AST 和 ALT 的活性变化不仅可用于反映肝脏受损伤的程度,也可用以指示药物治疗后肝细胞恢复的程度,已成为现代保肝中药药理研究中的重要指标,和环境生态毒理学研究中用来指示污染物对鱼体造成伤害程度的生物标志物<sup>[3]</sup>。

重金属对鱼类血清中转氨酶活性的影响已有较多报道<sup>[11,18,19]</sup>,其它因素的影响也有一些研究<sup>[20,21]</sup>。关于如何降低肝损伤鱼类血清中转氨酶活性的研究,惠天朝等<sup>[19]</sup>、谢巧雄等<sup>[22]</sup>做了一些开创性的工作;桂远明等<sup>[23]</sup>则从改善鱼类消化道微环境入手,研究了微生态制剂对患中毒性肝病鲤降低 ALT 活性的效果。

本试验采用中药制剂研究了其对硫酸铜所致肝损伤欧鳗血清转氨酶活性的影响。结果显示,铜离子中毒组欧鳗血清中的 AST、ALT 活性较健康组有极显著的升高,表明铜离子中毒可导致血清转氨酶活性显著升高,与现有报道一致<sup>[11,13,18]</sup>。采用中药制剂治疗之后,各用药治疗组的 AST、ALT 活性与铜离子中毒组相比则有极明显的回落,说明保肝解毒汤降低转氨酶活性的效果极佳。3 个用药组中以治疗低剂量组降低 AST 活性的效果最理想,治疗对照组次之,治疗高剂量组则较逊色;治疗对照组和治疗高剂量组的 ALT 活性降低最明显。另外 3 个用药组的 ALT 活性均低于健康组水平。后者提示,保肝解毒汤对肝损伤欧鳗血清中 ALT 的降低作用,除了因其对损伤肝细胞的修复功能所导致之外(这一点将在后面讨论),很可能是其尚具有减少正常肝细胞内 ALT 合成或阻止 ALT 进入血液,或对血清 ALT 活性具有直接抑制作用所引起,这有待进一步研究探讨。

目前普遍认为,AST 在肝细胞内大部分位于线粒体,而 ALT 几乎全部在细胞浆水溶相,血清中转氨酶活性的升高主要是由于肝损伤导致肝细胞中的 AST、ALT 渗入血液所引起<sup>[17]</sup>。在本课题的电镜

部分,观察到健康组欧鳗绝大部分肝细胞的胞膜结构完整,胞质中线粒体丰富,结构清晰;阳性空白对照组欧鳗肝细胞的细胞界线不清、胞膜结构模糊,线粒体肿胀、嵴与内外膜呈不同程度破坏;而治疗低剂量组肝细胞的细胞界线及膜性结构较为清晰、胞膜完整,线粒体丰富、结构清晰;治疗高剂量组大部分肝细胞结构清晰、胞膜完整,少部分细胞界线不清、结构仍较模糊,部分线粒体结构清晰,但部分仍有肿胀;治疗对照组大部分肝细胞彼此连接紧密、细胞界线清晰、胞膜完整,胞质中线粒体丰富,结构清晰。各组欧鳗肝组织的超微结构变化特点与本试验中各组鱼血清转氨酶活性的变化规律相吻合,这充分说明了不同组试验鱼血清 AST、ALT 活性的变化体现了中药对肝细胞损伤修复过程所起的作用。

### 3.3 中药制剂对实验性肝病欧鳗肝脏抗氧化酶活性的影响

抗氧化酶系统存在于所有需氧生物的组织内,其功能是清除物质代谢过程中产生的活性中间产物,尤其是清除氧自由基。其中,SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,它能清除超氧阴离子自由基( $O_2 \cdot^-$ ),保护细胞免受损伤;GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢( $H_2O_2$ )分解的酶,它特异地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢的还原反应,可以起到保护细胞膜结构完整和功能正常的作用;CAT 也是机体内催化  $H_2O_2$  分解形成氧和水,从而阻断可产生活性极高的羟自由基( $\cdot OH$ )反应,消除  $H_2O_2$  对细胞毒性作用的酶<sup>[3]</sup>。在正常情况下,细胞内 SOD、CAT 和 GSH-Px 等抗氧化酶联合作用以清除活性氧自由基。在有毒污染物胁迫下,抗氧化酶的活性可能会发生增强或减弱两种应激改变,但这两种改变并不是最终的毒理效应,只是反映了生物体暂时所处的一种机能状态。诱导增强效应可认为是生物体克服不良环境和防止中毒的一种适应性改变,而活性的减弱则反映了生物体对环境压力十分敏感并可能受到进一步的损伤<sup>[24]</sup>。因此,鱼体抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 已逐渐成为水生态毒理学研究的重要生物标志物<sup>[25~28]</sup>。由于动物肝组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性变化可反映肝脏受损伤的程度以及药物治疗后恢复的程度,测定 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性变化也已成为现代保肝中药药理研究的重要指标<sup>[29,30]</sup>。

本试验中各组欧鳗肝脏中抗氧化酶活性的测定

结果显示,铜离子中毒能导致欧鳊肝脏中的 CAT、GSH-Px 活性极显著降低,SOD 活性明显升高,这与鲁双庆等<sup>[31]</sup>的研究结果不太一致,而与冯涛等<sup>[32]</sup>的报道相符。已有的研究表明,这 3 种抗氧化酶在污染物的作用下,一般表现出“抑制-诱导-抑制”的规律性变化,并存在“时间-效应”关系和“剂量-效应”关系<sup>[31,33]</sup>。但由于生物体内各种抗氧化酶在功能上既存在着相关性,又相对独立地催化不同生化反应,同时,不同鱼类体内的各种抗氧化酶生物特性也有可能不同,因此对相同的暴露条件都有可能表现出不同的敏感性和变化结果<sup>[34,35]</sup>。

采用中药制剂治疗之后,各治疗组的 CAT、GSH-Px 活性与阳性空白对照组相比有极明显的回升,并接近或超出健康组的水平;3 个用药组 CAT 活性的回升效果差别很小,但 GSH-Px 活性的回升效果以治疗低剂量组为最佳。各治疗组的 SOD 活性则在已有明显升高的基础上,进一步得到增强,其中尤以治疗低剂量组和治疗对照组最为显著,但 3 个用药组之间的升高 SOD 酶活性的作用差别不太大。说明在本试验条件下,保肝解毒汤和降酶灵胶囊对铜离子所致肝损伤欧鳊肝组织中的 CAT、GSH-Px 活性降低有不同程度的回升作用,并对 SOD 活性也有进一步的升高作用。

保肝解毒汤和降酶灵胶囊对铜离子所致肝损伤欧鳊肝组织中的 CAT、GSH-Px、SOD 的升高作用与各组肝细胞的超微结构变化也是相一致的。在电镜下,健康组欧鳊肝细胞中典型的过氧化物酶体极少见,阳性对照组的过氧化物酶体也少见,而各治疗组的过氧化物酶体则较多(另文报道)。肝细胞过氧化物酶体内含多种氧化酶,其中以过氧化氢酶和过氧化物酶为主<sup>[36]</sup>。本试验各组肝细胞中过氧化物酶体数量和体积的变化与其 CAT、GSH-Px、SOD 的变化规律是相平行的,说明保肝解毒汤和降酶灵胶囊有抗氧化保肝作用。

此外,健康组欧鳊肝细胞的粗面内质网丰富,多数不发达,滑面内质网较少;阳性空白对照组粗面内质网丰富,多数发达,其中部分粗面内质网明显扩张,网腔膨大呈壶状,核糖体颗粒脱落,部分肝细胞内可见滑面内质网明显增生并呈囊泡状;而各用药治疗组的粗面内质网扩张虽仍可见,但滑面内质网数量已大为减少且不见扩张。粗面内质网在肝细胞内与蛋白质的合成和分泌有关,当分泌蛋白合成旺盛时,粗面内质网则出现代偿性再生及囊泡扩大。

粗面内质网对细胞内外微环境的变化十分敏感,如饥饿、辐射、缺氧、炎症、中毒或服用某些药物时,粗面内质网可囊泡化,膜旁核糖体依附性降低,出现脱颗粒现象,其合成功能降低;当细胞萎缩、变性、老化、坏死时,粗面内质网囊泡内可见由膜反包入腔内而形成的池内隔离体。而滑面内质网在肝细胞内的重要功能之一是与细胞的解毒作用及药物代谢密切相关<sup>[36]</sup>。因此,各组肝细胞超微结构的变化以及治疗组欧鳊肝脏抗氧化酶活性的恢复表明,所用治疗药物增强了欧鳊肝脏的解毒功能、修复功能及合成分泌蛋白功能,起到了很好的抗肝损伤作用。

由上可见,本课题采用由茵陈、龙胆、甘草、大黄及栀子组成的保肝解毒汤对由硫酸铜所致肝损伤欧鳊进行的治疗试验结果表明,该方药可促使铜离子中毒欧鳊血清转氨酶 AST、ALT 活性明显回落,肝脏抗氧化酶 CAT、GSH-Px 活性显著恢复,SOD 活性进一步显著升高,从而表明保肝解毒汤对欧鳊实验性肝病确能起到保肝解毒之功效,可用于治疗欧鳊的中毒性肝病。

#### 参考文献:

- [1] 郭玉娟,陈学年.我国中草药防治水生经济动物病害研究进展[J].水产科学,2005,24(4):34~38.
- [2] 徐立红,张雨元,陈宜瑜.分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义[J].水生生物学报,1995,19(2):171~185.
- [3] Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment; a review[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003, 13(2): 57~149.
- [4] Cossu C, Doyotte A, Babut M, et al. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2000, 45(2): 106~121.
- [5] 陈佳荣.水化学[M].北京:中国农业出版社,1998. 260~261.
- [6] 黄玉瑶,赵忠宪,陈锦萍,等.铜离子对鳊鱼(*Anguilla japonica* Temm. et Schl.)仔鱼的急性毒性[J].中国环境科学,1992,12(4):255~260.
- [7] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993. 112~115.
- [8] 徐萍,刘华屏.常用的急性肝损伤动物模型[J].中国病理生理杂志,1995,11(4): 447~448.
- [9] 惠秀娟.环境毒理学[M].北京:化学工业出版社,

- 2003, 246~248.
- [10] 方展强, 张凤君, 郑文彪, 等. 多氯联苯对剑尾鱼  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 89~92.
- [11] 沈 竑, 徐 韧, 彭立功, 等. 铜对鲫鱼血清生化成分的影响[J]. 海洋湖沼通报, 1994, (1): 55~61.
- [12] Pelgrom S M G J, Lock R A C, Balm P H M, *et al.* Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure [J]. *Aquat Toxicol*, 1995, 32: 303~320.
- [13] Varanka Z, Rojik I, Varanka I, *et al.* Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part C: Toxicology & Pharmacology)*, 2001, 128(3): 467~478.
- [14] Marr J C A, Lipton J, Cacula D, *et al.* Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration, and rainbow trout growth [J]. *Aquat Toxicol*, 1996, 36: 17~30.
- [15] Giguère A, Campbell P G C, Hare L, *et al.* Influence of lake chemistry and fish age on cadmium, copper, and zinc concentrations in various organs of indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2004, 61(9): 1 702~1 716.
- [16] Claire D, Paris-Palacios S, Betoulle S, *et al.* Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part C: Toxicology & Pharmacology)*, 2004, 137(4): 325~333.
- [17] 徐克成. 病毒性肝炎血清酶学试验及其临床意义[J]. 实用内科杂志, 1991, 11(9): 454~456.
- [18] 戴家银, 郑微云, 王淑红. 铜和锌离子对真鲷幼鱼组织酶活性的影响[J]. 环境科学, 1998, 19(5): 60~62.
- [19] 惠天朝, 施明华, 朱荫涓. 硒对罗非鱼慢性镉中毒肝抗氧化酶及转氨酶的影响[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(3): 264~266.
- [20] 林仕梅, 罗 莉, 叶元土, 等. 喹乙醇对草鱼几项生理指标的影响[J]. 西南农业学报, 1998, 11(2): 119~123.
- [21] 汪开毓, 耿 毅. 鲤亚急性喹乙醇中毒的血液生化指标研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(1): 23~26.
- [22] 谢巧雄, 朱心玲, 卢全章. 亚硒酸钠对四氯化碳损伤草鱼肝原代细胞与肝组织的保护作用[J]. 水生生物学报, 1996, 20(3): 229~235.
- [23] 桂远明, 吴 垠, 祝国芹, 等. 复方回春生对鲤爆发性肝炎治疗效果的初步研究报告[J]. 中国微生态学杂志, 1992, 4(2): 47~50.
- [24] 李 康, 周忠良, 王明山, 等. 苯并(a)芘对鲫鱼(*Carassius auratus*) 肝脏抗氧化酶的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 10(1): 88~91.
- [25] 鲁双庆, 刘少军, 刘 筠, 等. 表面活性剂 AE 对黄鳝保护酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(4): 399~402.
- [26] 丁竹红, 谢 标, 王晓蓉. 生物标志物及其在环境中的应用[J]. 农业环境保护, 2002, 21(5): 465~467, 470.
- [27] Meyer J N, Smith J D, Winston G W, *et al.* Antioxidant defenses in killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to contaminated sediments and model prooxidants: short-term and heritable responses [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65(4): 377~395.
- [28] Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques M A. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 71(1): 39~48.
- [29] 时维静, 李立顺, 俞 浩, 等. 柴芪颗粒抗菌及保肝作用研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(5): 502~505.
- [30] 韩景兰, 李晓萍, 刘翠红. 保肝中药研究进展[J]. 中医药信息, 2001, 18(2): 22~23.
- [31] 鲁双庆, 刘少军, 刘红玉, 等.  $\text{Cu}^{2+}$  对黄鳝肝脏保护酶 SOD、CAT、GSH-Px 活性的影响[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 138~141.
- [32] 冯 涛, 郑微云, 洪万树, 等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏抗氧化防御系统影响的初步研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(5): 27~30.
- [33] 吕景才, 赵元凤, 吴益春, 等. 海水中铜在扇贝组织的蓄积及其对酶活性的影响[J]. 农业工程学报, 2005, 21(5): 131~135.
- [34] Ahmad I, Hamid T, Fatima M, *et al.* Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1 523: 37~48.
- [35] Van der Oost R, Goksøy A, Celander M, *et al.* Bio-monitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses [J]. *Aquatic Toxicology*, 1996, 36: 189~222.
- [36] 成令忠, 钟翠平, 蔡文琴. 现代组织学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003. 84~858.