

穿破石水提取物对四氯化碳致大鼠肝纤维化的治疗作用

金俊杰¹, 钟鸣^{2*}, 余胜民², 黄洁玲¹

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 广西壮族自治区民族医药研究院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 研究穿破石水提取物对大鼠肝纤维化的治疗作用。方法: SD 大鼠按体重随机分为对照组、模型组、阳性药秋水仙碱组(0.000 25 g·kg⁻¹)和穿破石水提取物高剂量组(4.57 g·kg⁻¹)、中剂量组(3.05 g·kg⁻¹)、低剂量组(1.52 g·kg⁻¹)。除对照组外,其余各组大鼠均皮下注射 40% 四氯化碳(CCl₄)橄榄油液 3 mL·kg⁻¹(首次为 5 mL·kg⁻¹)每周 2 次,连续 8 周,造模同时各给药组给药。8 周后测定丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),总蛋白质(TP),白蛋白(Alb),球蛋白(Glob),血清一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、碱性磷酸酶(AKP)和肝纤维化指标透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(CⅣ);取肝制备肝匀浆,测定羟脯氨酸(HYP)水平,并取肝组织做病理检查。结果:大鼠肝纤维化损伤时,模型组 ALT,AST 活性及血清 AKP,HA, LN 和 CⅣ含量及肝组织 HYP 明显增加,而 TP, Alb, SOD 明显降低,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$);与模型组比较,穿破石水提取物可降低 ALT, AST 活性及血清 PCⅢ, HA 含量及肝组织 HYP 水平,而提高血清 SOD, TP, ALB 含量,差异均有显著性($P < 0.05$)。病理学检查结果显示,穿破石水提取物治疗组肝纤维化有显著改善。结论:穿破石水提取物对四氯化碳所致的大鼠肝纤维化具有良好的治疗作用。

[关键词] 穿破石水提取物; 肝纤维化; 四氯化碳; 肝功能; 羟脯氨酸; 病理检查

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0258-05

Effect of Water Extract of *Cudrania cochinchinensis* on Liver Fibrosis Rat Models Induced by Carbon Tetrachloride

JIN Jun-jie¹, ZHONG Ming^{2*}, YU Sheng-min², HUANG Jie-ling²

(1. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute of Nationality Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-liver fibrosis effect of water extract of *Cudrania cochinchinensis* in rats. **Method:** One hundred and thirty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, model group, positive control group and three different doses (4.57 g·kg⁻¹, 3.05 g·kg⁻¹, 1.52 g·kg⁻¹) of water extract of *C. cochinchinensis* treatment group. Liver fibrosis rat model was induced by carbon tetrachloride (CCl₄). Except control group, other groups were given drugs when being given carbon tetrachloride. Ending the study at the eighth week, liver function (alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), total protein (TP), albumin (Alb), globulin (Glob)), serum concentrations of nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), alkaline phosphatase (AKP), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen-III (PCⅢ) and collagen-IV (CⅣ) were measured. The concentrations of hydroxyproline (HYP) in liver hydrolysate were measured too. Moreover, pathological examination on liver tissue was made. **Result:** Serum concentrations of ALT, AST, AKP, HA, LN, CⅣ and concentration of HYP in liver hydrolysate was significantly

[收稿日期] 20120305(018)

[基金项目] 广西自然科学基金重点项目(2010GXNSF-D013041)

[第一作者] 金俊杰,在读硕士,从事壮医药研究与产品开发工作,Tel:15277711047,E-mail:king.jj@hotmail.com

[通讯作者] *钟鸣,研究员,从事壮医药研究与产品开发工作,Tel:13707881236,E-mail:gxmyszm@163.com

higher in liver fibrosis model group, however, the concentrations of TP, Alb, SOD were significantly lower in model group. Compared with model group, the serum concentrations of ALT, AST, PCⅢ, HA and concentration of HYP in liver hydrolysate were significantly decreased in water extract of *C. cochinchinensis* treatment groups and the serum concentrations of SOD, TP, Alb were significantly increased in water extract of *C. cochinchinensis* treatment groups. Pathological result showed that the liver fibrosis in water extract of *C. cochinchinensis* groups was significant improved. **Conclusion:** Water extract of *C. cochinchinensis* has significant therapeutic effect on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats.

[Key words] water extract of *Cudrania cochinchinensis*; liver fibrosis; carbon tetrachloride; liver function; hydroxyproline; pathological examination

穿破石为桑科柘属植物构棘或柘树的根,具有祛风利湿,活血通经,治风湿关节疼痛,黄疸,淋浊,蛊胀,闭经,劳伤咳血,跌打损伤,疔疮痈肿,在临床上治疗急慢性肝炎效果良好^[1]。药材在广西地区使用广泛,在药物研发方面尤其是抗肝纤维化方面还处于初期,穿破石常以水煎方式临床用药,本研究拟观察穿破石水提取物对四氯化碳致大鼠肝纤维化的作用,为穿破石在临床上治疗急慢性肝炎提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 穿破石采自广西龙虎山,挖出植物根部,除去须根,洗净,切段晒干备用。经广西壮族自治区民族医药研究院生药室梁定仁主任鉴定,为桑科植物构棘 *Cudrania cochinchinensis* (Lour) ludo et Masaml 的根。秋水仙碱,美国 Sigma 公司,购自南宁恒因生物科技有限公司。CCl₄ (分析纯),天津市富宇精细化工有限公司,批号 20091108。橄榄油(酸度 7.5%),上海提顿进出口有限公司,批号 20100521。羟脯氨酸(HYP)、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(CⅣ)放免试剂盒购自上海海研医学生物技术中心,批号 20101201。丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),总蛋白质(TP),白蛋白(ALB),球蛋白(GLOB),血清一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、碱性磷酸酶(AKP)试剂盒由南京建成生物工程研究所,批号 20101123。

1.2 动物 SPF 级-SD 大鼠 130 只,雌雄各半,体重 180~220 g。长沙市开福区东创实验动物科技服务部提供,许可证号 SCXK(湘)2009-0012。

1.3 仪器 UV-2401PC 型紫外可见分光光度计(日本岛津)。7020 型全自动生化分析仪(日本日立)。GC-2016 型 γ 放射免疫计数仪(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。TGL-16M 型高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。恒

温水浴锅(上海益恒实验仪器有限公司)。BX43 生物显微镜(日本 Olympus)。

2 方法

2.1 提取方法 药材粗粉用 10 倍体积的蒸馏水于不锈钢锅中浸泡完全后加热水煮,药液煮沸后调整温度致药液微沸,继续水煮 1.5 h 后,滤出药液,重复 3 次,将 3 次滤出的药液合并浓缩,得到穿破石水提取物。

2.2 动物分组 130 只大鼠按体重随机分为 6 组,每组雌雄各半,对照组 16 只,模型组 26 只,秋水仙碱组 22 只,穿破石水提取物高、中、低剂量组各 22 只。

2.3 造模与给药 大鼠肝纤维化造模方法参照文献[2-6],用橄榄油将 CCl₄ 配制成 40% 橄榄油液,除对照组之外,其余各组大鼠按体重背部皮下注射 40% CCl₄ 橄榄油液 3 mL·kg⁻¹ (5 mL·kg⁻¹ 首次),每周 2 次,持续 8 周。造模同时给药,穿破石水提取物高、中、低 3 个剂量组用每毫升含生药材 4.57, 3.05, 1.52 g·kg⁻¹ 的穿破石水提取物灌胃给药,秋水仙碱组用浓度为 0.025 g·L⁻¹ 的秋水仙碱水溶液按大鼠体重 10 mL·kg⁻¹ 灌胃给药,模型组和对照组按大鼠体重 10 mL·kg⁻¹ 灌胃给蒸馏水,每天灌胃给药 1 次,观察大鼠一般情况及死亡情况,自由饮水、摄食。实验室温度为 21~27 °C,相对湿度为 50%~60%。

2.4 标本采集 于末次给药 24 h 后,大鼠用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,仰卧位固定,打开腹腔,观察肝脏色、质、形态等情况。经腹主动脉采血,摘取肝、脾称重。从肝右叶切取 1.0 cm × 0.8 cm × 0.3 cm 大小肝组织一块做 HE, Masson 染色,由半定量的方法^[7]对肝纤维化程度进行评估,留取肝组织作 HYP 含量测定。所采血液于 4 °C 下,以 6 000 r·min⁻¹ × 10 min 冷冻离心,分离血清,检测各项血清学指标,肝功能用日立 7020 型全自动生化分析仪。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况 实验中,对照组大鼠情况良好。第 3 周,皮下注射 40% CCl₄ 橄榄油液,除对照组外,其余各组大鼠出现精神萎靡,背毛蓬松,皮肤溃烂、脱落。第 6 周,秋水仙碱、穿破石水提取物治疗组大鼠精神有所改观。第 1~2 周死亡大鼠跟正常大鼠处死解剖肝脏结果无明显差异;第 3 周,死亡大鼠肝脏表面颜色苍白,质硬,有花斑样改变。模型组死亡 2 只,秋水仙碱组死亡 2 只,高剂量组死亡 6 只,中剂量组死亡 8 只,有 2 只死亡大鼠死因分析判断为肺水肿和肠梗阻,低剂量组死亡 3 只。

3.2 对肝功能 ALT,AST,TP,ALB,GLOB 影响 表 1 结果显示,模型组血清 ALT,AST 明显增高,血清 TP,ALB 明显下降,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$);穿破石水提取物高、中剂量组能降低血清 ALT,AST,穿破石低剂量组能提高血清 TP,ALB,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

3.3 对血清 MDA,SOD,NO,AKP 的影响 表 2 结果显示:模型组血清 AKP 明显增高,血清 SOD 明

显下降,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$);穿破石水提取物高、中、低剂量组能提高血清 SOD,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

3.4 对血清肝纤维化指标 HA, LN, PCⅢ及 CⅣ的影响 表 3 结果显示,模型组血清 HA, LN, CⅣ明显增高,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$);穿破石水提取物高、中剂量组能降低血清 HA, PCⅢ,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

3.5 对肝组织 HYP 的影响 表 4 结果显示,模型组肝组织 HYP 明显增高,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$);穿破石水提取物中、低剂量组能降低肝组织 HYP,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

3.6 对肝纤维化大鼠肝脏病理组织学的影响 用肉眼观察,模型组大部分大鼠肝脏表面凹凸不平,呈颗粒状病变,质硬。显微镜下,各组均有不同程度的纤维化发生,各给药组与模型组之间有明显差异。对照组未见异常;模型组大鼠呈Ⅱ~Ⅳ维纤维化,肝细胞中重度脂肪变性伴轻中度水肿和灶性坏死;穿破石水提取物治疗组绝大部分大鼠呈Ⅱ维纤维化,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$),结果见表 5,肝细胞中、重度脂肪变性伴轻度水肿和点状坏死,HE 病理切片见图 1,Masson 病理切片见图 2。

表 1 穿破石水提取物对大鼠血清 ALT,AST,TP,ALB,GLOB 影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	GLOB/g·L ⁻¹	A/G
对照	-	16	35.38 ± 8.20	99.06 ± 16.52	52.23 ± 7.12	23.10 ± 2.42	29.13 ± 5.47	0.81 ± 0.10
模型	-	24	196.54 ± 114.02 ²⁾	381.79 ± 177.82 ²⁾	45.21 ± 11.66 ¹⁾	16.83 ± 3.99 ²⁾	28.39 ± 8.42	0.61 ± 0.11 ²⁾
穿破石水提取物	4.57	16	132.13 ± 53.93 ³⁾	242.00 ± 95.85 ⁴⁾	45.61 ± 7.93	17.89 ± 4.10	27.72 ± 4.77	0.65 ± 0.12
	3.05	14	126.64 ± 67.38 ³⁾	256.71 ± 108.12 ³⁾	46.53 ± 11.25	18.06 ± 3.94	28.36 ± 8.64	0.73 ± 0.40
	1.52	19	144.37 ± 43.96	294.47 ± 57.68	55.59 ± 9.21 ⁴⁾	21.43 ± 3.47 ⁴⁾	34.52 ± 7.07 ³⁾	0.64 ± 0.12
秋水仙碱	0.000 25	20	135.25 ± 47.99 ³⁾	309.70 ± 100.48	51.84 ± 8.62 ³⁾	19.52 ± 2.59 ³⁾	32.33 ± 7.30	0.63 ± 0.14

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

表 2 穿破石水提取物对血清 MDA,SOD,NO,AKP 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	MDA/nmol·mL ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	NO/μmol·L ⁻¹	AKP/U·g ⁻¹
对照	-	16	7.72 ± 0.94	163.57 ± 12.09	59.52 ± 2.80	86.56 ± 29.31
模型	-	24	8.41 ± 1.34	147.54 ± 28.27 ¹⁾	59.23 ± 4.78	246.67 ± 118.81 ²⁾
穿破石水提取物	4.57	16	8.24 ± 1.06	173.66 ± 5.62 ⁴⁾	60.31 ± 12.13	257.13 ± 86.30
	3.05	14	8.45 ± 1.08	174.74 ± 5.86 ⁴⁾	58.77 ± 5.36	271.71 ± 148.37
	1.52	19	9.35 ± 1.22	177.63 ± 5.51 ⁴⁾	57.49 ± 2.94	295.84 ± 143.42
	0.000 25	20	8.88 ± 1.66	164.97 ± 22.53 ³⁾	60.60 ± 4.05	380.45 ± 159.35

表3 穿破石水提取物对血清肝纤维化指标 HA, LN, PCⅢ及 CIV的影响($\bar{x} \pm s$)

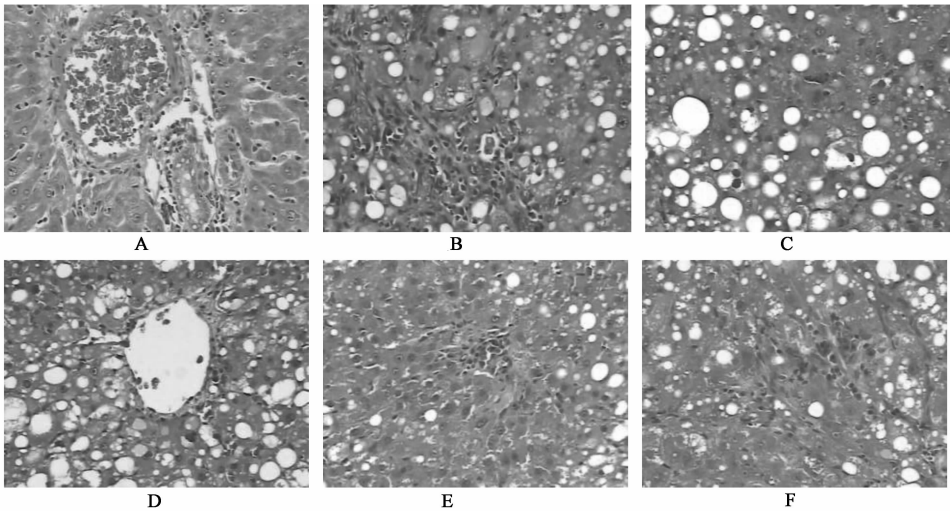
组别	给药剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	HA/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	LN/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	PCⅢ/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	CIV/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照	-	16	79.06 ± 19.92	34.68 ± 10.36	18.29 ± 7.20	8.95 ± 1.30
模型	-	24	177.46 ± 165.69 ¹⁾	44.13 ± 13.99 ¹⁾	18.97 ± 6.35	10.29 ± 1.44 ¹⁾
穿破石水提取物	4.57	16	81.91 ± 45.00 ²⁾	61.07 ± 13.33	13.12 ± 9.95 ²⁾	10.31 ± 1.52
	3.05	14	77.11 ± 44.05 ²⁾	51.75 ± 14.34	8.18 ± 3.86 ³⁾	9.95 ± 1.81
	1.52	19	112.56 ± 64.68	56.10 ± 17.60	16.44 ± 8.83	10.45 ± 2.30
秋水仙碱	0.000 25	20	113.88 ± 58.72	51.80 ± 16.26	14.16 ± 6.01 ²⁾	10.19 ± 2.51

表4 穿破石水提取物对肝组织 HYP 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	HYP/ $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$
对照	-	16	0.25 ± 0.04
模型	-	24	0.36 ± 0.09 ¹⁾
穿破石水提取物	4.57	16	0.32 ± 0.05
	3.05	14	0.28 ± 0.05 ³⁾
	1.52	19	0.30 ± 0.06 ²⁾
秋水仙碱	0.000 25	20	0.30 ± 0.06 ²⁾

表5 穿破石水提取物对肝纤维化大鼠肝脏的病理观察

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	纤维化				
			-	+	++	+++	++++
对照	-	16	16	0	0	0	0
模型	-	24	0	0	9	9	6 ²⁾
穿破石水提取物	4.57	16	0	0	11	2	3 ³⁾
	3.05	14	0	1	10	1	2 ³⁾
	1.52	19	0	2	13	2	2 ³⁾
秋水仙碱	0.000 25	20	0	2	10	5	3



A. 对照组; B. 模型组; C. 秋水仙碱 0.000 25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 穿破石水提取物高剂量 4.57 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 穿破石水提取物中剂量组 3.05 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 穿破石水提取物低剂量 1.52 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组(图2同)

图1 穿破石水提取物对肝纤维化大鼠肝脏病理组织学的影响(HE染色, $\times 200$)

4 讨论

四氯化碳(CCl_4)是一种典型的肝脏毒物,可破坏肝细胞功能,引起脂质过氧化破坏膜性结构,损伤肝细胞,用 CCl_4 攻击建立的肝纤维化模型,具有简便、易行、价廉、耗时短、病变典型等特点,被广泛使用^[8]。肝细胞损伤后发生纤维化,肝脏中HYP含量升高,HYP是胶原蛋白特有的氨基酸之一,其含量可以反映肝纤维化或肝硬化的程度^[9]。临床上常

用的肝纤维化4项检测指标HA, LN, PCⅢ和CIV可以基本上反映出纤维化程度的变化^[10]。肝纤维化时血清NO水平增高,导致肝细胞炎症及损伤,进一步促进肝纤维化的形成^[11]。 CCl_4 导致肝细胞坏死,形成脂质过氧化终产物MDA,测定血清可间接反应肝细胞损伤程度^[12],SOD是超氧阴离子自由基的清除剂,可抑制自由基启动的脂质过氧化。

大鼠肝纤维化模型用 CCl_4 造模,皮下注射 CCl_4

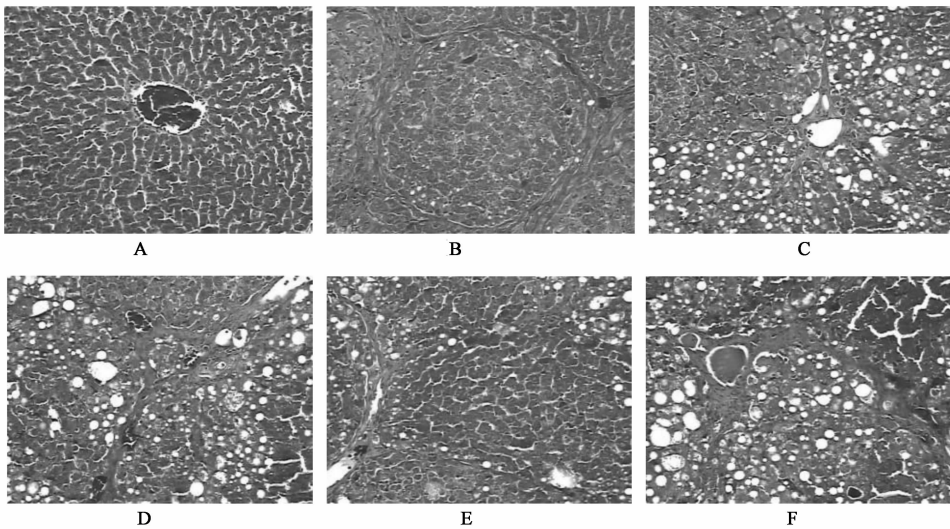


图 2 穿破石水提取物对肝纤维化大鼠肝脏病理组织学的影响 (MASSON 染色, $\times 100$)

的大鼠会出现死亡现象。模型组大鼠在造模后合理状况:第 1~5 周,一般不会死亡;第 6 周,随着 CCl_4 对肝脏损伤,死亡几率增大;第 8 周,大鼠处于严重病态,死亡率升高。穿破石水提取物各组大鼠在造模后, CCl_4 损伤机体功能,特别是肝功能,药物和 CCl_4 相互作用超过肝脏承受范围,出现大鼠死亡。第 1~2 周治疗组大鼠可能出现突然死亡且尸体解剖无明显病症,第 3~5 周大鼠死亡尸体解剖肝脏有病变,第 6 周后大鼠死亡率不大。实验周期设定为 8 周,是确保各组大鼠预设存活率的基础上,各组大鼠毛色、精神状态、步态、摄食量、粪便及腹部胀满程度等判断出治疗组大鼠状态明显好于模型组,确定结束实验。

大鼠肝纤维化损伤时,模型组 ALT,AST 活性及血清 AKP,HA, LN 和 C IV 含量及肝组织 HYP 明显增加,而 TP, Alb, SOD 明显降低,与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$);与模型组比较穿破石水提取物可降低 ALT,AST 活性及血清 PC III, HA 含量及肝组织 HYP 水平,而提高血清 SOD, TP, Alb 含量,差异均有显著性 ($P < 0.05$)。病理学检查结果显示,穿破石水提取物治疗组肝纤维化比模型组有显著改善,显示穿破石水提取物具有良好的治疗肝纤维化作用。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:1088.
[2] 王付,尚立芝,苗小玲,等. 四逆散加味对肝纤维化大鼠肝功能、肝纤维化指标及病理变化的影响[J]. 中

国实验方剂学杂志,2012,18(5):177.

[3] 赵宗豪,梅俏,吴军,等. N-乙酰半胱氨酸保护大鼠肝纤维化的机制初步研究[J]. 安徽医学,2010,31(1):5.
[4] 邝满元,罗明英,贾蕾. 二氢杨梅素对肝纤维化大鼠脂质过氧化损伤的保护作用[J]. 中国医药导报,2009,6(18):26.
[5] 邓家刚,周程艳,郑作文. 黄根醇提物对肝纤维化大鼠肝组织中 $\text{TGF-}\beta_1$ 表达及 COL I、COL III 水平的影响[J]. 北京中医药大学学报,2009,32(1):42.
[6] 曾建国,肖俐,王宇红,等. 博落回提取物对实验性肝纤维化的防治作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):134.
[7] 范震,张啸,张筱凤,等. 17β -雌二醇对大鼠肝纤维化影响作用的实验研究[J]. 肝脏,2006,11(2):98.
[8] 邝满元,刘映霞,李映菊. 肝纤维化动物模型造模方法的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2008,8(9):1768.
[9] 陈东亚,魏威,吴梧桐. 重组人肝星状细胞激活相关蛋白抗大鼠肝纤维化的作用[J]. 药物生物技术,2008,15(2):133.
[10] 徐川,董云旭,吕文天,等. 在 CCl_4 诱导的大鼠肝脏纤维化模型中肝功、肝脏纤维化程度的监测[J]. 中国实验诊断学,2007,11(9):1137.
[11] 李隽,曹治宸. NO 在 CCl_4 致大鼠肝纤维化中的氧化应激作用[J]. 解放军医学杂志,2006,31(3):234.
[12] 杜东红,袁凤仪,何云. 银杏制剂对大鼠急性肝细胞损伤的作用及机制[J]. 世界华人消化杂志,2003,11(1):85.

[责任编辑 李玉洁]