

珠子参总皂苷对四氯化碳致大鼠肝纤维化的影响^{*}

张丽^{1**} 梁卓菲² 张化为² 黄文丽² 宋小妹² 宋蓓³

(1. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046;

3. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 探讨珠子参总皂苷对四氯化碳(CCl_4)诱导肝纤维化的预防保护作用。方法 腹腔注射 CCl_4 制备肝纤维化模型,珠子参总皂苷灌胃给药进行干预,实验结束后,生化法和ELISA法检测各组大鼠肝功能及肝纤维化指标,HE和Masson染色法比较各组肝脏组织病理改变。结果 珠子参总皂苷能显著降低肝纤维化大鼠血清AST、ALT、LN、HA和MDA水平,升高SOD和GSH-px水平,降低肝组织HYP水平。结论 珠子参总皂苷具有一定的预防肝纤维化作用,其机制可能与抑制脂质过氧化、减少自由基的生成、提高组织的抗氧化能力等有关。

关键词:珠子参总皂苷;肝纤维化; CCl_4 ;脂质过氧化;抗氧化

中图分类号:R575.2 文献标识码:A 文章编号:2096-1340(2021)03-0075-05

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2021.03.017

Effects of Total Saponins of *Panax Japonicus* on Hepatic Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats

ZHANG Li¹ LIANG Zhuofei² ZHANG Huawei² HUANG Wenli² SONG Xiaomei² SONG Bei³

(1. The First Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China;

2. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China;

3. The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effects of total saponins of *Panax japonicus* on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl_4). **Methods** Liver fibrosis model was established by intraperitoneal injection of CCl_4 . After the experiment, liver function and liver fibrosis indexes were detected by biochemical method and ELISA method, and pathological changes of liver tissue were compared by HE and Masson staining. **Results** Total saponins of *Panax japonicus* could significantly reduce the levels of AST, ALT, LN, HA and MDA in serum, increase the levels of SOD and GSH-px, and decrease the level of HYP in liver tissue. **Conclusion** Total saponins of *Panax japonicus* can prevent liver fibrosis to some extent, and its mechanism may be related to inhibiting lipid peroxidation, reducing the generation of free radicals and improving the antioxidant capacity of tissues.

Keywords: Total Saponins of *Panax japonicus*; Liver fibrosis; CCl_4 ; Lipid peroxidation; Antioxidation

肝纤维化是各种原因引起肝损伤后细胞的代偿反应,如长期无有效治疗,可进一步发展为肝硬

^{*} 基金项目:陕西省科技厅重点研发计划项目(2018SF-324);陕西省科技厅计划项目(202400002);陕西中医药大学学科创新团队项目(2019-YL12)

^{**} 作者简介:张丽(1975-),女,副主任药师,主要从事中药制剂的研究与开发。E-mail:418242650@qq.com

化和肝癌。而肝纤维化被认为是一个动态的、可逆的过程,如果在这个阶段适当治疗,可以有效预防肝硬化和肝癌发生^[1]。然而目前FDA尚没有批准任何一种治疗肝纤维化的药物,因此,寻求一种有效防治肝纤维化的中药成为一个迫切解决的问题。

珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 具有一定的保肝作用^[2]。前期,本课题组对珠子参总皂苷进行的保肝作用研究表明,珠子参总皂苷对四氯化碳致大鼠急性或慢性肝损伤都有显著的保护作用,且无毒性反应^[3]。本部分实验进一步对珠子参总皂苷预防肝纤维化作用进行研究,通过观察肝纤维化大鼠组织的病理变化,血清的各项生化指标的变化,探讨珠子参总皂苷对肝纤维化大鼠的预防保护作用,为珠子参总皂苷用于肝纤维化的防治提供一定的依据。

1 材料

1.1 药品及试剂 珠子参总皂苷由本实验室(陕西中医药大学中药化学实验室)制备^[4],实验前取粉末适量,用0.5%的羧甲基纤维素溶解成混悬液;秋水仙碱,云南植物药业有限公司,以超纯水配制成所需浓度;四氯化碳,天津科密欧化学试剂有限公司,与橄榄油以1:1混合配制成50% CCl₄溶液;天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒、羟脯氨酸测定(HYP)试剂盒、透明质酸(HA)试剂盒、层粘连蛋白(LN)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物 SD大鼠,SPF级,雌雄各半,体重 200 ± 20 g,购于成都达硕实验动物中心,合格证号:SCXK(川)2015-030。

1.3 主要仪器及设备 病理冰冻切片机(德国LEICA公司),低温高速离心机(美国BECKMAN公司),酶标仪(美国BIO TEK公司),激光扫描共聚焦显微镜(德国LEICA公司),PTPS-2011彩色病理图文分析系统(重庆天海医疗设备有限公司)。

2 方法

2.1 模型建立 取SD大鼠48只,随机分为正常组(8只)、模型组(8只)、珠子参总皂苷

(100 mg/kg、50 mg/kg、25 mg/kg)和秋水仙碱组(阳性对照组,0.1 mg/kg),每组各8只。正常组腹腔注射同体积的橄榄油,剩余各组腹腔注射50% CCl₄溶液,2次/w,连续8 w,注射量为2 mL/kg。正常组以外,剩余各组注射50% CCl₄溶液2 w后,在各组大鼠饮水中加入含量为350 mg/L的苯巴比妥,从而增加大鼠肝脏对CCl₄的敏感度。从造模第二周起,各给药组和阳性对照组大鼠灌胃给予相应的药物,而正常组和模型组灌胃给予相应量的0.5%羧甲基纤维素钠溶液,1次/d,连续7 w。

2.2 样本采集与处理 末次给药第2 d,各组分别用20%氨基甲酸乙酯溶液(1.2 g/kg, ip)麻醉大鼠,并分离腹腔主动脉,用10 mL无抗凝剂的离心管取血,3500 rpm使其离心15 min,取血清保存于-20℃以备用。取肝脏,并称重,计算肝脏指数($\text{g/g} \times 1000$);另取剩余部分肝组织-80℃保存。

2.3 病理学观察 经4.0%多聚甲醛固定2 d的肝组织,脱水,包埋,切片(5 μm),然后进行HE和Massion染色,每张切片100倍光镜下观察肝组织病理形态变化,并拍照。

2.4 生化指标检测 按试剂盒说明书标示方法测定血清中ALT、AST,ELISA法检测SOD、GSH-Px、MDA、LN、HA水平,酶标仪测定其OD值,制备标准曲线,采用双波长比色法,并计算大鼠血清中各指标含量。从-80℃冰箱中称取50 mg肝组织,采用样本碱水解法测定HYP含量,检测时严格按照试剂盒说明书进行。

2.5 统计学方法 应用SPSS Statistics 20.0软件对数据进行处理并对其进行分析,数值变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示。先检验数据是否符合正态分布,再进行方差齐性检验。多组间差异的比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对大鼠肝脏指数影响 实验时给药前各组大鼠体重基本均一,然而在造模后,与正常组相比,模型组大鼠体重增长速度减慢,药物干预后各组大鼠体重虽有一定的改变,但无显著性差异;与正常组相比,模型组大鼠的肝脏指数显著升高($p < 0.01$);与模型组相比,各剂量给药组大鼠肝脏指数的降低均具有显著性($p < 0.01$),结果如表

1 所示。

表 1 对大鼠肝脏指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (mg/kg)	肝脏指数 (%)
正常组	8	—	2.70 ± 0.11
模型组	8	—	4.04 ± 0.35 *
珠子参总皂苷低剂量组	8	25	3.47 ± 0.30 #
珠子参总皂苷中剂量组	8	50	3.06 ± 0.19 #
珠子参总皂苷高剂量组	8	100	3.07 ± 0.27 #
阳性组	8	0.1	3.02 ± 0.23 #

注：* 与正常组相比差异极显著, $p < 0.01$,#与模型组相比差异极显著, $p < 0.01$, $n = 8$

3.2 对大鼠肝纤维化病理组织形态的影响 如图 1 所示为 HE 染色和 Masson 的染色结果,正常

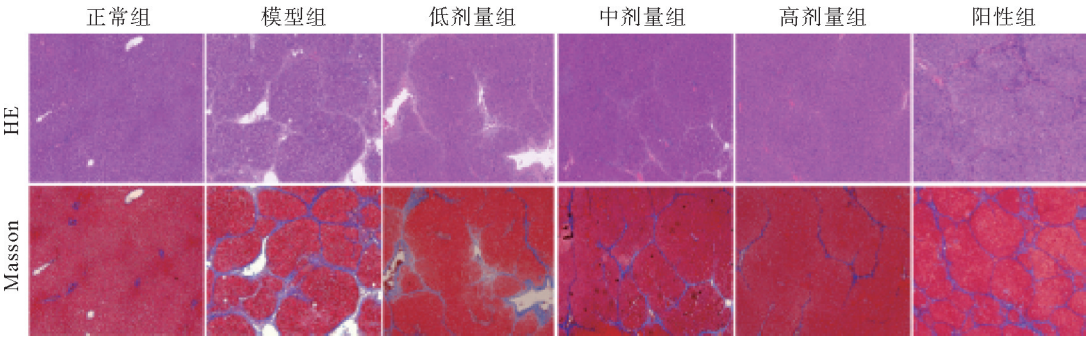


图 1 肝纤维化大鼠病理组织染色结果(HE 和 Masson, × 100)

3.3 对大鼠血清 ALT、AST 的影响 当肝脏受损时,肝细胞发生坏死,ALT、AST 大量释放入血中,血中转氨酶活性增高,因此 ALT、AST 是肝脏损伤的敏感标志。研究发现,与正常组相比,模型组大

组大鼠具有完整的肝小叶结构,以中央静脉为中心的肝细胞向四周成条索状排列,仅在中央静脉及肝窦周围出现极少量蓝色胶原纤维。而模型组大鼠肝细胞排列紊乱,周围炎性细胞浸润明显;纤维组织大量产生,自汇管区周围向外延伸,相互连接,形成假小叶结构;同时可见明显的脂肪性空泡。和模型组相比,珠子参总皂苷中、高剂量组肝组织病理损伤比模型组明显减少,而低剂量组肝组织纤维程度低,但比中、高剂量组明显,且仍伴有大量脂肪性空泡;高剂量组改善大鼠肝纤维化的作用优于阳性对照组。结果表明:珠子参总皂苷的所有给药组都使肝纤维化有不同程度的改善,纤维组织增生减少并且着色变浅,阳性对照组与高剂量组比较,以高剂量组最为明显。

鼠血清 ALT、AST 水平显著升高,与模型组相比,给药组大鼠血清 ALT、AST 水平显著降低,差异均具有显著性($p < 0.01$)。结果见表 2

表 2 对大鼠血清 ALT、AST 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常组	8	—	12.22 ± 2.04	19.52 ± 2.36
模型组	8	—	50.05 ± 3.93 *	45.40 ± 4.55 *
珠子参总皂苷低剂量组	8	25	32.34 ± 2.53	24.94 ± 1.74 #
珠子参总皂苷中剂量组	8	50	18.23 ± 3.71 #	23.87 ± 1.48 #
珠子参总皂苷高剂量组	8	100	16.30 ± 1.04 #	16.72 ± 1.73 #
阳性组	8	0.1	17.69 ± 8.22 #	21.65 ± 2.09 #

注：* 与正常组相比差异极显著, $p < 0.01$,#与模型组相比差异极显著, $p < 0.01$, $n = 8$

3.4 对大鼠肝组织 HYP 和血清 HA、LN 的影响 羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 为胶原组织的主要成分之一,透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 和层

粘连蛋白 (laminin, LN) 为细胞外基质主要成分,可较灵敏地反映肝内已生成的纤维量及肝细胞受损状况^[5]。与正常组相比,模型组大鼠肝组织

HYP、血清中 HA 和 LN 含量显著升高($p < 0.01$),而与模型组相比,给药组中、高剂量大鼠肝组织中 HYP 含量降低并且具有显著性($p < 0.01$),各剂量

组大鼠血清中 HA 和 LN 含量均显著降低($p < 0.01$)。结果见表 3。

表 3 对大鼠肝组织 HYP、血清 HA 和 LN 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 (mg/kg)	HYP (μg/g)	HA (ng/mL)	LN (ng/mL)
正常组	8	—	437.0 ± 49.7	1.51 ± 0.06	60.28 ± 4.24
模型组	8	—	765.70 ± 43.9 *	2.29 ± 0.18 *	93.41 ± 5.31 *
珠子参总皂苷低剂量组	8	25	646.70 ± 11.7	1.79 ± 0.08 #	73.75 ± 7.04 #
珠子参总皂苷中剂量组	8	50	616.2 ± 28.8 #	1.68 ± 0.04 #	68.52 ± 2.67 #
珠子参总皂苷高剂量组	8	100	579.5 ± 31.41 #	1.63 ± 0.10 #	64.11 ± 4.90 #
阳性组	8	0.1	546.3 ± 37.7 #	1.60 ± 0.09 #	65.21 ± 6.15 #

注: * 与正常组相比差异极显著, $p < 0.01$, #与模型组相比差异极显著, $p < 0.01$, $n = 8$

3.5 对大鼠血清 MDA、SOD 和 GSH - Px 的影响 机体内脂质过氧化程度常常由 MDA 的量反映,可以间接地反映出肝细胞损伤的程度;SOD 能清除超氧阴离子自由基,保护细胞不受损伤,并反映机体抗氧化酶类活力;GSH - Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶^[6]。与正常组相比,模型组 MDA 水平显著升高($p < 0.01$),在

给予药物干预后,与模型组相比,中、高剂量组 MDA 水平显著降低($p < 0.01$),低剂量组无显著差异;与正常组相比,模型组 SOD 和 GSH - Px 的水平显著降低($p < 0.01$),各剂量给药组均使 SOD 和 GSH - Px 的水平显著升高($p < 0.01$)。结果,见表 4。

表 4 对大鼠血清 MDA、SOD 和 GSH - Px 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 (mg/kg)	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)	GSH - Px (U/mL)
正常组	8	—	4.28 ± 0.55	167.7 ± 13.7	761.7 ± 43.7
模型组	8	—	5.71 ± 0.82 *	128.7 ± 11.5 *	526.5 ± 35.6 *
珠子参总皂苷低剂量组	8	25	4.87 ± 0.16	150.3 ± 5.8 #	650.7 ± 45.7 #
珠子参总皂苷中剂量组	8	50	4.53 ± 0.60 #	158.4 ± 3.0 #	678.6 ± 53.1 #
珠子参总皂苷高剂量组	8	100	4.39 ± 0.60 #	159.2 ± 7.9 #	689.4 ± 46.3 #
阳性组	8	0.1	4.34 ± 0.20 #	157.9 ± 9.2 #	657.6 ± 47.9 #

注: * 与正常组相比差异极显著, $p < 0.01$, #与模型组相比差异极显著, $p < 0.01$, $n = 8$

4 讨论

病毒、药物的诱发和自身免疫性疾病等很多因素会导致肝损伤,肝损伤过程中凋亡和坏死的肝细胞以及其他非实质细胞会产生大量细胞因子和活性氧(ROS),细胞因子和 ROS 能激活肝星状细胞,使其大量增殖^[7-10],导致细胞外基质过度聚集^[11-14],最终形成肝纤维化。本文结果表明,珠子参总皂苷对四氯化碳所致大鼠肝纤维化有显著的预防保护作用。

AST 和 ALT 反映肝细胞的损伤程度^[15],给药

组大鼠血清中 AST 和 ALT 的表达水平显著降低,表明珠子参总皂苷有效的保护了损伤的肝细胞;HYP 在肝纤维化的进程中随着胶原的增加或减少而发生变化,是评价胶原蛋白量与肝纤维化程度的重要指标^[16],给药组大鼠肝组织中 HYP 含量以及血清中 HA 和 LN 含量与模型组相比显著降低,表明珠子参总皂苷可能通过抑制纤维连接蛋白和胶原蛋白的过度表达,减轻肝纤维化的程度。CCl4 经机体肝微粒体 CYPs 酶代谢可产生氯自由基,这些自由基可与细胞膜上的脂质发生脂

质过氧化反应,导致氧化过程的终产物如MDA大量产生^[17]。SOD为肝脏内最重要的抗氧化剂,在机体发生脂质过氧化反应时可有效清除体内的自由基^[18]。GSH-Px可将氧化型谷胱甘肽(GSSH)还原为还原型谷胱甘肽(GSH),增加机体的抗氧化能力^[19-21]。由于CCl₄诱导肝纤维化大鼠体内产生脂质过氧化反应,因而脂质过氧化产物MDA大量产生而显著性升高,SOD和GSH-Px这两种抗氧化酶被大量消耗而表现为显著性下降。珠子参总皂苷显著降低大鼠血清中的MDA的水平并且提高血清的抗氧化酶SOD、GSH-Px的水平,说明其能通过抑制脂质过氧化反应和自由基的产生来保护肝组织。

综上所述,珠子参总皂苷对大鼠肝纤维化具有一定的预防保护作用,可能通过抑制脂质过氧化、减少自由基生成、提高组织的抗氧化能力来发挥作用。本研究为珠子参总皂苷用于肝纤维化的防治提供一定的依据。

参考文献

[1] Sarin SK, Kumar M, Eslam M, et al. Liver diseases in the Asia - Pacific region: a Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(2):167-228.

[2] Dai YW, Zhang CC, Zhao HX, et al. Chikusetsu saponin V attenuates lipopolysaccharide - induced liver injury in mice[J]. Immunopharm Immunot, 2016, 38(3):167-174.

[3] 王薇,张旋,许苗苗,等. 珠子参总皂苷对四氯化碳致大鼠慢性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床. 2014,30(5):70-73.

[4] 王薇,宋小妹,康亚国,等. 大孔吸附树脂富集纯化珠子参总皂苷的工艺研究[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(4):713-715.

[5] 曲蕃升,程玉,彭金咏,等. 胶原代谢在肝纤维化中的作用及中药调控胶原代谢研究进展[J]. 中国药师. 2017, 20(4): 728-731.

[6] 王建超,银艳桃,文彬,等. 天然牛磺酸抗肝纤维化作用机制研究[J]. 中华中医药学刊. 2020, 38(1): 144-147.

[7] Schuppan D. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2015, 39(S1):51-59.

[8] Younossi Z M, Loomba R, Anstee Q M, et al. Diagnostic modalities for nonalcoholic fatty liver disease, nonalcoholic

steatohepatitis, and associated fibrosis[J]. Hepatology, 2018, 68(1): 349-360.

[9] Pollheimer M J, Fickert P, Stieger B. Chronic cholestatic liver diseases: Clues from histopathology for pathogenesis[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2014, 37: 35-56.

[10] Scarpa M, Grillo A R, Brun P, et al. Snail transcription factor is a critical mediator of hepatic stellate cell activation following hepatic injury[J]. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 2011, 300(2): 316-326.

[11] Novo E, Busletta C, Bonzo L V D, et al. Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow - derived hepatic pro - fibrogenic cells[J]. Journal of Hepatology, 2011, 54(5): 964-974.

[12] Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis[J]. Fibrogenesis & tissue repair, 2008, 1(1): 5.

[13] 蒋锐沅,蒋锐沅,王振常. 中药抗肝纤维化作用机制的研究进展[J]. 中医药导报, 2020, 26(5): 113-117.

[14] 吕超,毛德文,石清兰,等. 中药及其复方抗肝纤维化作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 242-250.

[15] 胡毅翔,刘任祝,郭小兰,等. 茶条槭总黄酮提取物抗小鼠肝纤维化作用及其机制研究[J]. 西北药学杂志, 2020, 35(1): 67-72.

[16] 蔡卫民,张彬彬,翁红雷,等. 八项肝纤维化血清标志物比较研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(4): 32-35.

[17] 高天娇,蕾董,史海涛,等. 莲子心醇提取物抗四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(12): 1476-1480.

[18] 邓家刚,周程艳,郑作文. 黄根醇提取物对四氯化碳所致大鼠肝纤维化的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2009(1): 1339-1341.

[19] 张雅. 川西獐牙菜中苦龙胆酯苷的提纯及其抗肝纤维化作用机制研究[D]. 西安:中国人民解放军空军军医大学, 2018.

[20] 冯欣. 藏药波棱瓜子抗肝纤维化作用及机理研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.

[21] 王伟伟,唐亮,周文龙,等. 谷胱甘肽生物合成及代谢相关酶的研究进展[J]. 中国生物工程杂志. 2014, 34(7): 89-95.