

复方护肝汤对刀豆蛋白 A 诱导小鼠肝损伤的保护作用

罗裕旋¹, 何小媚², 邱群芳¹, 杨建军¹, 朱 飞¹

[摘要]目的:探讨复方护肝汤对刀豆蛋白 A(ConA)诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用及其可能作用机制。方法:将 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组、ConA 诱导肝损伤组、联苯双酯治疗组(1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)及复方护肝汤低、中、高剂量(7、14、28 g·kg⁻¹·d⁻¹)组,每组 10 只。尾静脉注射 ConA 12.5 mg/kg,每周 1 次;对照组尾静脉注射 250 μl PBS 溶液,每周 1 次。均连用 7 周。除对照组外,其余各组均诱导小鼠急性肝损伤模型。分别检测各组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转氨酶(GGT)、透明质酸酶(HA)和肝组织匀浆中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)的水平。结果:经复方护肝汤治疗后,ConA 诱导肝损伤小鼠的血清 ALT、AST、ALP、GGT、HA 和肝组织匀浆 MDA、NO 的水平均比模型组减低($P < 0.05 \sim P < 0.01$);中、高剂量组血清 SOD 水平均较模型组显著增高($P < 0.01$)。结论:复方护肝汤对 ConA 诱导小鼠急性肝损伤具有较好的防治功能,其作用机制可能与其抗氧化活性有关。

[关键词] 肝疾病;复方护肝汤;生化指标;小鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 575 **[文献标识码]** A

Protective effect of compound Hupan decoction on ConA-induced liver injury in mice

LUO Yu-xuan¹, HE Xiao-mei², QIU Qun-fang¹, YANG Jiang-jun¹, ZHU Fei¹

(1. Shenzhen Longhua Hospital, Shenzhen Guangdong 518109;

2. Prevention and Health Care Center of Longhua Baoan, Shenzhen Guangdong 518109, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of compound Hupan decoction on conA-induced liver injury in mice. **Methods:** BALB/c mice were randomly divided into six groups, 10 in each, which included normal, liver injury, biphenyldimethylterate treatment 1.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ and compound Hupan decoction treatment (7 g·kg⁻¹·d⁻¹, 14 g·kg⁻¹·d⁻¹, 28 g·kg⁻¹·d⁻¹) groups. The animal model of liver injury was established by intravenous injection of ConA (12.5 mg/kg) in BALB/c mice. The serum level of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyltransferase (GGT), and hyaluronidase (HA) were assayed by spectrophotometer. **Results:** Compound Hupan decoction significantly decreased the concentration of serum transaminases (ALT, AST, ALP, GGT) and it showed a dose-dependent manner between the range of 7–28 g·kg⁻¹·d⁻¹. **Conclusions:** Compound Hupan decoction performs protective effect against ConA-induced liver injury in mice. Such protective effects might be related to the increase of antioxidant enzyme activity and the promotion of free radicals elimination.

[Key words] liver diseases; compound Hupan decoction; aminotransferase; mouse

我国是病毒性肝炎的高发区,仅乙肝病毒携带者就达 1.3 亿^[1]。如慢性乙型肝炎患者不能得到及时有效的治疗,有可能发生肝纤维化、肝硬化,甚至肝癌。因此,积极寻找肝病的防治方法已成为人们面临的艰巨任务。复方护肝汤是由柴胡、甘草、白花蛇舌草、丹参、半枝莲、虎杖、仙鹤草、贯众、蚤休、土茯苓、北芪、仙灵脾等十二味药物组成,具有清热解毒、疏肝利胆作用。本实验采用刀豆蛋白 A(ConA)

诱导小鼠急性肝损伤模型,观察复方护肝汤对 ConA 诱导小鼠急性肝损伤是否具有保护作用,同时初步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 动物:健康 BALB/c 小鼠,体重 20~40 g,由广东医学院动物中心提供。药物:柴胡 12 g,甘草 6 g,白花蛇舌草 10 g,丹参 8 g,半枝莲 10 g,虎杖 5 g,仙鹤草 10 g,贯众 6 g,蚤休 8 g,土茯苓 6 g,北芪 6 g,仙灵脾 10 g,先加蒸馏水浸泡 30 min,一煎加药材量的 8 倍水,沸腾后煎 30 min;二煎加药材量的 6 倍水,沸腾后煎 30 min;过滤,两煎所得滤液混合后干燥浓缩,-20℃保存备用。

1.2 仪器与试剂 德国罗氏全自动生化分析仪(MODULARDP)721B 型分光光度计(上海第三分析仪器厂生产),Thermo 酶标仪,LXJ-II B 上海安亭

[收稿日期] 2011-01-17

[基金项目] 广东省深圳市宝安区科技计划社会公益资助项目(2010718)

[作者单位] 1. 广东省深圳市宝安区龙华人民医院 检验科 518109;
2. 广东省深圳市宝安区龙华预防保健所 检验科, 518109

[作者简介] 罗裕旋(1971-)男,主管检验师。

[通讯作者] 何小媚,主管检验师。

离心机 ,GHP-9270 隔水式恒温箱; 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转肽酶(GGT) 检测试剂及质控品由罗氏公司提供; 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO) 试剂盒由南京建成生物研究所提供; 小鼠透明质酸酶检测试剂由厦门慧嘉生物科技有限公司提供。

1.3 动物模型的建立及处理 60 只小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只; 设正常对照组、肝损伤模型组、联苯双酯治疗组、复方护肝汤低、中、高剂量(7. 14、28 g · kg⁻¹ · d⁻¹) 组, 分别以 12. 5 mg/kg 尾静脉注射 ConA(美国 Sigma 公司), 每周 1 次; 对照组尾静脉注射 250 μl PBS 溶液, 每周 1 次。均连续重复 7 周; 所有动物每注射 24 h 取尾静脉血, 分离血清做血清酶检查。

除对照组外, 其余各组第 7 周 ConA 均诱导小鼠形成急性肝损伤模型; 模型组给予生理盐水, 其余 4 组分别给予联苯双酯 150 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 和复方护肝汤低(7 g · kg⁻¹ · d⁻¹)、中(14 g · kg⁻¹ · d⁻¹)、高剂量(28 g · kg⁻¹ · d⁻¹)。治疗 15 天后摘眼球采血, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清作 ALT、

AST、ALP、GGT 和透明质酸酶(HA) 检测; 脱颈椎处死, 取肝脏、脾脏称重计算脏器系数(mg/10g), 去除血管内血液后取肝组织 1 000 mg, 放置烧杯中捣碎、磨浆加入 9 倍生理盐水混匀, 取 5 ml 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 严格按操作说明检测 MDA、SOD、NO 的浓度。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

各组小鼠注射 ConA 后, 血清酶(ALT、AST、ALP、GGT 和 HA) 明显高于对照组(*P* < 0. 01) (见表 1); 在反复注射过程中, 第 2 次注射后达到峰值, 接着急剧下降, 到 4~6 周处于缓慢下降期, 6 周后位于高值平稳期, 在没有药物治疗的情况, 长期处于高水平; 血清 HA 极度升高, 最终导致类似慢性乙型肝炎的肝纤维化。各实验组血清 ALT、AST、ALP、GGT 和 HA 及肝指数、脾指数、NO 与模型组比较, 差异均有统计学意义(*P* < 0. 05 ~ *P* < 0. 01), 而中、高剂量组和联苯双酯治疗组 SOD 和 MAD 与模型组比较, 差异均有统计学意义(*P* < 0. 05 ~ *P* < 0. 01) (见表 2、3)。

表 1 对照组和模型组小鼠 1~7 周血清 ALT、AST、ALP、GGT 和 HA 比较(*n_i* = 10; $\bar{x} \pm s$)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	GGT(U/L)	HA(μg/L)
对照组	28.5 ± 6.2	25.9 ± 6.7	37.9 ± 8.9	28.5 ± 5.6	25 ± 5.2
模型组					
第 1 周	1 127.0 ± 233.6**	1 220.0 ± 221.5**	645.9 ± 65.1**	145.9 ± 98.6	37 ± 6.6
第 2 周	2 320.0 ± 283.4##	2 420.0 ± 292.7##	1 183.0 ± 165.7##	245.3 ± 108.6**	57 ± 15.3##
第 3 周	1 829.0 ± 233.7##	1 920.0 ± 223.6##	1 255.0 ± 173.6##	345.9 ± 153.4**	357 ± 66.1##
第 4 周	1 036.0 ± 183.6**	1 120.0 ± 171.5**	895.0 ± 165.9##	445.9 ± 167.2##	457 ± 83.8##
第 5 周	820.0 ± 153.2##	895.0 ± 161.3##	745.0 ± 159.8**	543.9 ± 178.6##	675 ± 135.7##
第 6 周	675.0 ± 143.3##	689.0 ± 148.8##	695.0 ± 125.2**	602.9 ± 182.5##	1 287 ± 164.3##
第 7 周	620.0 ± 133.8##	635.0 ± 121.5##	605.0 ± 115.9**	545.9 ± 163.8##	1 357 ± 227.5##
<i>F</i>	146.18	165.32	79.72	21.03	213.64
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
<i>MS</i> _{组内}	35 644.398	34 638.878	18 009.671	20 633.666	13 607.696

q 检验: 与对照组比较* *P* < 0. 05, ** *P* < 0. 01; 与模型组第 1 周比较# *P* < 0. 05, ## *P* < 0. 01

表 2 复方护肝汤对 ConA 诱导小鼠急性肝损伤各组情况比较(*n_i* = 10; $\bar{x} \pm s$)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	GGT(U/L)	HA(μg/L)
对照组	28.5 ± 6.2	25.9 ± 6.7	37.9 ± 8.9	28.5 ± 5.6	25.0 ± 5.2
模型组	620.0 ± 133.8**	635.0 ± 121.5**	605.0 ± 115.9**	545.9 ± 163.8**	1 357.0 ± 227.5**
复方护肝汤低剂量组	492.3 ± 80.2##	490.7 ± 73.8##	435.9 ± 83.7##	445.9 ± 96.3**#	1 057.0 ± 125.3##
复方护肝汤中剂量组	378.3 ± 65.6##	381.3 ± 57.6##	325.9 ± 68.5##	345.9 ± 78.6##	857.0 ± 106.7##
复方护肝汤高剂量组	261.3 ± 48.3##	260.3 ± 40.2##	220.9 ± 51.2##	250.9 ± 66.7##	657.0 ± 84.2##
联苯双酯治疗组	262.3 ± 43.6##	272.3 ± 44.8##	225.9 ± 48.7##	245.9 ± 63.5##	538.0 ± 79.3##
<i>F</i>	77.42	97.49	76.35	38.33	137.03
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
<i>MS</i> _{组内}	5 485.022	4 532.403	5 033.848	8 465.765	15 374.400

q 检验: 与对照组比较* *P* < 0. 05, ** *P* < 0. 01; 与模型组比较# *P* < 0. 05, ## *P* < 0. 01

表3 复方护肝汤对 ConA 诱导急性肝损伤肝、脾指数和肝组织 MDA、SOD、NO 的影响情况比较 ($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	肝指数(g/kg)	脾指数(g/kg)	SOD(Ku/g)	MAD($\mu\text{mol/g}$)	NO($\mu\text{mol/L}$)
对照组	43.5 ± 4.2	5.91 ± 1.07	147.9 ± 18.9	4.52 ± 1.06	31.7 ± 5.2
模型组	81.7 ± 5.6**	12.73 ± 1.54**	85.9 ± 15.1**	8.93 ± 2.86**	115.3 ± 16.6**
复方护肝汤低剂量组	56.3 ± 4.7**	10.28 ± 2.16**	96.8 ± 15.7**	7.82 ± 2.54**	87.8 ± 15.3**
复方护肝汤中剂量组	51.7 ± 4.5**	8.74 ± 1.53**	119.3 ± 23.6**	7.06 ± 2.18*	65.3 ± 12.1**
复方护肝汤高剂量组	48.7 ± 4.3**	6.39 ± 1.17**	135.0 ± 25.9**	5.93 ± 1.68#	41.7 ± 8.8**
联苯双酯治疗组	47.6 ± 4.2**	6.22 ± 1.28**	138.6 ± 19.8**	6.11 ± 1.76#	43.8 ± 8.7**
F	89.63	33.16	14.92	5.47	73.87
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	21.245	2.255	408.587	4.405	139.372

q 检验: 与对照组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

3 讨论

全世界范围内,慢性病毒性肝炎已成为仅次于心血管病和恶性肿瘤的重大疾病,对人类危害极大。因此,积极寻找肝病的防治方法已成为人们面临的艰巨任务。化学药品治疗肝纤维化往往有严重的不良反应,而且疗效有限,而国内外大量研究^[2-3]工作表明,中药在治疗肝纤维化方面显示出可靠的疗效和较少的不良反应的特点。

目前,国内外常用的实验动物模型主要有四氯化碳法、二甲基亚硝胺法和注射异种蛋白引起肝损伤。而 ConA 致肝纤维化的启动因素是激活 T 细胞使肝细胞受损。与 HBV 引起肝损伤极其相似,而且有确定剂量,易于建立稳定肝细胞损伤模型。用 ConA 诱导的小鼠急性肝损伤模型具有制作简便快捷、有剂量依赖性和肝脏特异性等特点。该模型中小鼠肝损伤的病理变化更接近、更类似于人类肝病的病理点,故被认为最适合研究人类病毒性肝炎、自身免疫性肝病等肝脏疾病的病理机制^[4]。

ConA 是一种多克隆丝裂原,在体内有强嗜肝性,可以激活 T 细胞,引起 T 细胞介导的肝细胞损伤;其次,体内活化的 T 淋巴细胞与细胞因子 IFN- γ 等随血流到肝脏,直接与肝细胞接触或进一步激活巨细胞、破坏血管内皮细胞导致肝损伤^[5]。研究^[6]表明,单次注射 ConA 24 h 后 ALT、AST 达到峰值,48 h 接近正常。但经多次注射 ConA 后即引起不可恢复的肝损伤,各项酶指标长时间处于高水平,提示 ConA 引起肝损伤具有剂量依赖性^[7]。本研究结果显示,高、中剂量组与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$);中、高剂量组与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$);肝组织匀浆 MDA、NO 的水平与治疗前相比减低 ($P < 0.01$);SOD 在血

清中的水平与治疗前相比提高 ($P < 0.01$),与相关报道一致。可见复方护肝汤对 ConA 诱导小鼠急性肝损伤具有较好的防治作用,其作用机制可能与其抗氧化活性有关。

据报道^[8],用柴胡、连翘、大青叶、芍药等组成的中药复方清肝排毒饮对 ConA 所致小鼠免疫性肝损伤具有较好的保护作用,抑制 T 淋巴细胞活化和干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α 的释放是其主要的的作用机制。中药有着多靶点、多环节综合作用的特点,在治疗肝损伤方面有自身的优势。但目前对其作用机制尚不完全明了,限制了人们对其在理论上的阐述和临床上的推广应用。因此,本课题应用建立在病理、生理机制上更接近人体肝炎的免疫性肝损伤动物模型,为进一步探讨复方护肝汤抗肝损伤的免疫和分子机制及其临床应用提供依据。

[参考文献]

- [1] 胡祚,刘菁.慢性无症状乙型肝炎病毒携带者心理干预的研究进展[J].解放军护理杂志,2008,25(2B):36-37.
- [2] 雷力民,姜婷婷,林寿宁.肝纤维化的中药治疗作用机制研究[J].医学综述杂志,2008,14(8):1242-1244.
- [3] 李贤仁.软肝化纤丸治疗慢性乙型肝炎肝硬化49例疗效观察[J].山东中医杂志,2008,27(7):463-464.
- [4] 曲建慧,张修礼.小鼠 ConA 性肝损伤模型[J].世界华人消化杂志,2001,9(5):571-574.
- [5] Cantner F, Leist M, Lohse AW, et al. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumormecor [J]. Hepatology, 1995, 21(1): 190-198.
- [6] Tieg G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A [J]. J Clin Invest, 1992, 90(1): 196-203.
- [7] 曲建慧,张修礼. ConA 性小鼠肝损伤模型的研究及应用[J].世界华人消化杂志,2001,9(3):180-181.
- [8] 李常青,刘丽丽,朱宇同,等.中药清肝排毒饮对刀豆蛋白 A 所致小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J].世界华人消化杂志,2005,13(11):1283-1286.

(本文编辑 姚仁斌)