

去氢木香内酯对实验性大鼠肝损伤的保护作用

孙文利^{1,2} 张晓旭^{1,2} 黄志英^{2,3} 陈 畅² 康 琛² 高 健² 段飞鹏⁴
田朋朋^{1,2} 陈 坤⁴ 李德凤² 刘玉欣¹ 李韶菁²

(1 河北大学药学院, 保定, 071002; 2 中国中医科学院中药研究所, 北京, 100700;

3 中国药科大学药学院, 南京, 211198; 4 北京中医药大学, 北京, 100102)

摘要 目的:研究去氢木香内酯对大鼠肝损伤模型的保护作用。方法:以氨基半乳糖、四氯化碳建立大鼠肝损伤模型,分别设正常对照组、模型组、阳性药对照组(0.2 mg/kg)、去氢木香内酯高、中、低剂量组(45 mg/kg, 15 mg/kg, 5 mg/kg),测定各组大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(Alanine Aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate Aminotransferase, AST)活性及肝组织中丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量。另以 HE、Masson 染色,对各组大鼠肝脏作病理检查。结果:与模型组相比,去氢木香内酯可显著降低大鼠血清 ALT、AST 的活性及 MDA 的含量($P < 0.05$),减轻大鼠肝脏坏死性病理改变。结论:去氢木香内酯对大鼠肝脏损伤有较好的保护作用。

关键词 去氢木香内酯;肝损伤;氨基半乳糖;四氯化碳

The Protective Effect of Dehydrocostus Lactone on Liver Injury in Laboratory Rats

Sun Wenli^{1,2}, Zhang Xiaoxu^{1,2}, Huang Zhiying^{2,3}, Chen Chang², Kang Chen², Gao Jian², Duan Feipeng⁴,
Tian Pengpeng^{1,2}, Chen Kun⁴, Li Defeng², Liu Yuxin¹, Li Shaojing²

(1 College of Pharmacy, Hebei University, Hebei Baoding 071002, China; 2 China Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3 College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Jiangsu Nanjing 211198, China; 4 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective: To investigate the protective effect of Dehydrocostus lactone on liver injury in experimental rats. **Methods:** Rats were injected with galactosamine and carbon tetrachloride to induce liver injury. The model rats were randomly divided into normal group, vehicle control, positive control group (0.2 mg · kg⁻¹), high, middle, and low Dehydrocostus lactone dose groups (45, 15 and 5 mg · kg). The changes of activity of ALT, AST in serum and MDA content in liver tissue were measured. The pathologic change of liver tissue was examined under light microscope by HE and Masson staining. **Results:** Compared with the vehicle group, Dehydrocostus lactone remarkably decreased ($P < 0.05$) the activities of ALT, AST in serum and MDA content in liver tissue. It was observed that Dehydrocostus lactone could significantly alleviate the necrotic pathologic change of liver tissue.

Conclusion: Dehydrocostus lactone has protective effects on liver injury in laboratory rats.

Key Words Dehydrocostus lactone; Liver injury; Galactosamine; Carbon tetrachloride

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.03.025

肝脏疾病是人类最常见的疾病之一,其中肝损伤、肝纤维化、肝硬化是临床常见病和多发病。肝损伤是肝炎、饮酒、寄生虫导致的常见症状,肝硬化是肝损伤迁延或反复的结果,肝纤维化是肝损伤和肝硬化的桥梁^[1]。

去氢木香内酯(Dehydrocostus Lactone)(结构见图1)是菊科云木香属植物木香干燥根的主要活性成分。据文献报道,其具有很好的抗癌^[2]、抗

菌^[3-4]、抗高血酯^[5]、抑制胃溃疡^[6]、增加胃肠蠕动等作用^[7]。本试验首次研究了去氢木香内酯对氨基半乳糖和四氯化碳肝损伤大鼠动物模型的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠 120 只,SPF 级,体重 220 ~ 260 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2012-0001。

基金项目:重大新药创制国家科技重大专项(编号:2012ZX09103201-055);国家自然科学基金项目(编号:81274133,81303261);中国中医科学院自主选题项目(编号:ZZ2014005,ZZ2014060)

作者简介:孙文利(1989.12—),女,汉,硕士研究生,药物分析专业,研究方向:药物代谢和分子药理学,E-mail:sunwenli1215@163.com

通信作者:李韶菁(1974.3—),女,汉,博士,副研究员,研究方向:中药组效关系和分子药理学研究,E-mail:shaolingli2004@126.com;刘玉欣(1956.12—),男,汉,博士,教授,研究方向:细胞及分子药理学研究,E-mail:yuxinliu@hbu.edu.cn

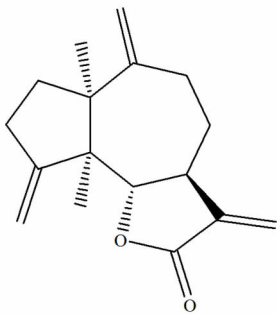


图1 去氢木香内酯结构,分子式 $C_{15}H_{18}O_2$, 分子量 230.1307

1.2 药品及试剂 去氢木香内酯(纯度 98%),购自百灵威科技有限公司;阳性对照药:双环醇,北京协和药厂;秋水仙碱,北京嘉林药业股份有限公司;氨基半乳糖,北京拜尔迪生物技术有限公司; CCl_4 为分析级,中国北京化工厂;丙氨酸氨基转移酶(Alanine Aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate Aminotransferase, AST)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(批号 20100505);水合氯醛,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器 高速低温冷冻离心机(J2-21, 美国 Beckman Coulter 公司);酶标仪(Spectra Max M5, 美国 Molecular Devices 公司);全自动生化仪(7180 型, 日立公司);75 mm 组织匀浆器(涿州市琦瑞玻璃制品厂)。

1.4 动物分组及给药 将 Wistar 大鼠随机分为氨基半乳糖肝损伤组和四氯化碳肝损伤组,每组 60 只,每组又分为 6 小组,即正常对照组(Nor 组,等量溶媒)、模型组(Mod 组,等量溶媒);双环醇组(0.2 mg/kg/d),去氢木香内酯高、中、低剂量组(45, 15, 5 mg/kg/d),每组 10 只。

1.5 模型的制备

1.5.1 氨基半乳糖肝损伤模型 除 Nor 组外,各组以氨基半乳糖溶液造模,8.5% 腹腔注射,1 mL/100 g,同时 50% 乙醇灌胃,5 mL/kg,每周 2 次。造模后次日给药,连续 7 d。

1.5.2 CCl_4 肝损伤模型 除 Nor 组外,各组以 50% CCl_4 花生油灌胃造模,2 mL/kg,同时 10% 乙醇灌胃,5 mL/kg,每周 2 次,造模 4 周后给药。

1.6 指标检测 给药 4 周后,以水合氯醛腹腔麻醉取材,拍摄肝脏外观;腹主动脉采血后,3 000 r/min 离心 10 min,采用全自动生化仪测定血清 ALT、AST 活性。同时取肝右叶,用冰生理盐水冲洗干净,滤纸吸干,称取 0.5 g,加生理盐水 4.5 mL,转入预冷了的

匀浆器中制成肝匀浆,用于测定肝组织中 MDA 含量。取左下叶肝脏,用 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋、切片,HE、Masson 染色观察病理变化。

1.7 统计学方法 实验结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 均认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 去氢木香内酯对氨基半乳糖肝损伤模型的影响 结果表明,与正常组相比,模型组 ALT、AST、MDA 含量显著上升($P < 0.05$);与模型组相比,阳性药和去氢木香内酯可显著降低大鼠血清 ALT、AST 及肝组织中 MDA 的含量($P < 0.05$),高剂量组效果最明显,以上作用有剂量依赖性。表明去氢木香内酯对氨基半乳糖肝损伤大鼠有保护作用,结果见表 1。如图 2 所示,模型组肝脏颜色灰黄、表面颗粒密布,而给药组肝脏颜色发红,表面光滑,色泽发亮,高剂量组最明显。病理结果可见(图 3),模型组肝硬化明显,胶原纤维明显增生,出现假小叶,腹水现象严重,去氢木香内酯组大鼠肝纤维化程度明显改善,无肝萎缩和腹水现象,表明去氢木香内酯具有抗损伤、抗肝硬化,逆转肝纤维化作用。

表1 去氢木香内酯对氨基半乳糖肝损伤模型的影响 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ mg/kg	ALT (U/L)	AST (U/L)	MDA (nmol. mg/g. pro)
正常组	-	68.9 $\pm$ 20.9	73.5 $\pm$ 8.3	8.9 $\pm$ 1.1
模型组	-	345.7 $\pm$ 56 $\Delta\Delta$	395.3 $\pm$ 63 $\Delta\Delta$	11.9 $\pm$ 2.8 $\Delta\Delta$
双环醇	0.2	197.8 $\pm$ 70**	291.4 $\pm$ 76**	10.1 $\pm$ 1.1*
去氢木香内酯	5	266.8 $\pm$ 65*	321.5 $\pm$ 74*	9.5 $\pm$ 1.7*
	15	212.6 $\pm$ 83**	293.6 $\pm$ 80**	9.4 $\pm$ 1.4**
	45	190.7 $\pm$ 56**	269.6 $\pm$ 75**	9.1 $\pm$ 1.9**

注: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

2.2 去氢木香内酯对四氯化碳肝损伤和肝硬化模型的影响 结果表明,与正常组相比,模型组 ALT、AST、MDA 含量显著上升($P < 0.05$);与模型组相比,阳性药和去氢木香内酯可显著降低大鼠血清 ALT、AST、MDA 的含量($P < 0.05$),去氢木香内酯组大鼠肝纤维化程度明显改善,肝纤维化计分明显降低,以上作用有剂量依赖性。提示去氢木香内酯对肝脏纤维化和硬化大鼠有保护作用,结果见表 2。模型组肝脏颜色灰黄、表面颗粒密布,而给药组肝脏颜色发红,表面光滑,色泽发亮,高剂量组最明显。病理结果可见(图 4),模型组肝硬化明显,胶原纤维明显增生,出现假小叶,有肝萎缩和腹水现象,去氢木香内酯组大鼠肝纤维化程度明显改善。

表 2 去氢木香内酯对四氯化碳肝损伤和肝硬化模型的影响 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ mg/kg	ALT (U/L)	AST (U/L)	MDA (nmol. mg/g. pro)
正常组	-	67.7 ± 18.6	70.3 ± 7.9	9.1 ± 1.0
模型组	-	333.7 ± 51 ^{△△}	377.8 ± 68 ^{△△}	12.3 ± 2.6 ^{△△}
秋水仙碱	0.2	188.8 ± 79 [*]	298.6 ± 79 [*]	12.2 ± 1.3 [*]
去氢木香内酯	5	256.8 ± 75 [*]	321.5 ± 74 [*]	9.5 ± 1.4 [*]
	15	248.4 ± 88 [*]	313.6 ± 80 [*]	9.1 ± 1.2 ^{**}
	45	242.8 ± 69 [*]	298.6 ± 75 [*]	11 ± 1.2 ^{**}

注: [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs normal group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group

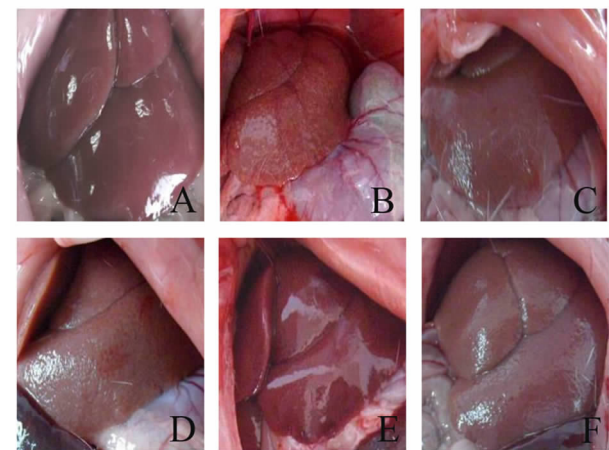


图 2 去氢木香内酯对肝损伤大鼠肝脏的影响

注: A. 正常组; B. 模型组; C. 阳性药组; D. 去氢木香内酯(5 mg/kg)组; E. 去氢木香内酯(15 mg/kg)组; F. 去氢木香内酯(45 mg/kg)组

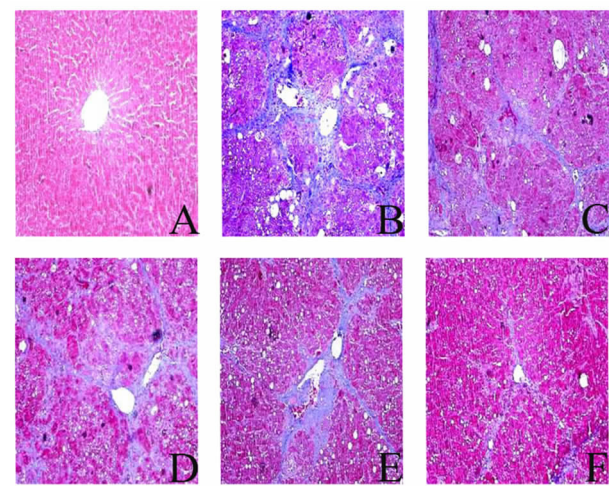


图 3 去氢木香内酯对氨基半乳糖肝损伤大鼠的病理学影响

注: A. 正常组; B. 模型组; C. 双环醇组; D. 去氢木香内酯(5 mg/kg)组; E. 去氢木香内酯(15 mg/kg)组; F. 去氢木香内酯(45 mg/kg)组

3 讨论

氨基半乳糖 (GaIN) 肝损伤模型是经典的动物模型之一。是目前公认的比较好的研究病毒性肝炎

的发病机制及有效治疗药物的实验动物模型。GaIN 是一种肝细胞磷酸尿嘧啶核苷干扰剂,可造成肝弥漫性坏死和炎症,其引起的肝脏病理变化与临床病毒性肝炎相似。GaIN 可以引起质膜损害,在肝细胞内形成尿苷二磷酸一半乳糖胺复合物,耗竭尿苷三磷酸,致使质膜结构蛋白质合成减少,膜出现损伤; GaIN 也可改变细胞内离子浓度,引起肝细胞内 Ca^{2+} 增多, Mg^{2+} 减少。 Ca^{2+} 增多使线粒体功能受到抑制,激活磷脂酶,加速氧化自由基产生,加剧肝细胞损伤^[8]。另外 GaIN 还可引起肝细胞的代谢紊乱而导致肝损伤^[9]。

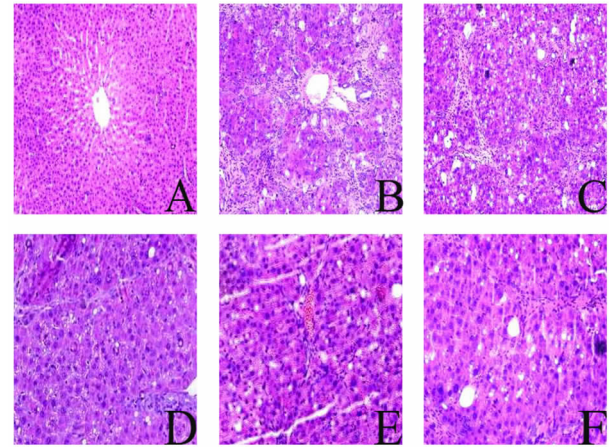


图 4 去氢木香内酯对四氯化碳肝损伤大鼠的病理学影响

注: A. 正常组; B. 模型组; C. 秋水仙碱组; D. 去氢木香内酯(5 mg/kg)组; E. 去氢木香内酯(15 mg/kg)组; F. 去氢木香内酯(45 mg/kg)组

CCl_4 在肝脏细胞微粒体内的细胞色素 P450 的作用下,产生自由基(三氯甲基自由基、三氯甲基过氧自由基和氯自由基)及一系列氧活性物,使细胞膜、内质网膜等发生氯烷基化和脂质过氧化,损伤膜的结构和功能,最终导致肝细胞死亡^[10]。 CCl_4 致肝损伤主要表现为血清中 AST、ALT 量增加和肝上皮细胞脂质过氧化或坏死,在病理上主要表现为上皮细胞肿胀、脂肪变性,继而破裂坏死,大量枯氏细胞聚集吞噬,随着损伤程度加深,肝细胞增殖减弱,胶原纤维大量堆积,形成条索状增生。

在肝组织中,ALT 主要分布于细胞质内,AST 主要分布于细胞质和线粒体中^[11]。正常情况下,血清中 ALT、AST 甚少,当肝脏出现任何原因导致的肝组织损伤或细胞破坏、坏死时,酶从细胞内逸出进入血液,血清中 ALT、AST 含量将明显升高^[12]。因此,血清 ALT、AST 的升高是肝损伤的重要标志,转氨酶在一定程度上反映了肝细胞损害和坏死程度^[13]。与正常组比较,模型组大鼠血清中 AST 和 ALT 含量升

高,肝细胞受到明显损伤;而经去氢木香内酯治疗后,各剂量组均可不同程度的降低肝损伤大鼠血清AST、ALT的升高,以上结果提示去氢木香内酯对大鼠免疫性肝损伤具有较好的保护作用。

脂质过氧化在肝损伤的发生发展过程中起重要作用。MDA脂质过氧化的最终产物自由基可诱发和增强机体内脂质过氧化作用,导致细胞膜系统损伤及其功能丧失^[14]。本研究表明去氢木香内酯对肝损伤具有保护作用,其机制可能与抑制机体脂质过氧化功能有关。

实验结果显示,去氢木香内酯在降酶、抗自由基及脂质过氧化方面有明显的作用,从病理结果来看,去氢木香内酯改善了大鼠肝纤维化程度。本文首次证明了去氢木香内酯对肝损伤有一定的保护作用。

参考文献

- [1] Lamireau T, Desmouliere A, Bioulac-Sage P, et al. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Arch Pediatr, 2002, 9(4): 392-405.
- [2] Saori Yuuya, Hisahiro Hagiwara, Toshio Suzuki, et al. Guaianolides as Immunomodulators. Synthesis and biological activities of dehydrocostus lactone, mokko lactone, eremanthin, and their Derivatives[J]. Nat. Prod, 1999, 62(1): 22-30.
- [3] 李晓强, 李智勤, 孟宪华, 等. 藏木香根的抗菌活性成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2342-2344.
- [4] Wedgea, D. E., Galindob, J. C. G., Macias, F. A. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs[J]. Phytochemistry, 2000, 53(7): 747-757.

- [5] Shimoda, H., Ninomiya, K., Nishida, N. et al. Anti-hyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycosides from the leaves of artichoke (Cynara scolymus L.): structure requirement and mode of action[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2003, 13(2): 223-228.
- [6] Masayuki Yoshikawa, Sachika Hatakeyama, Joji Yamahara. Extraction of Sesquiterpenes (Saussureamines) from Saussurea lappa and their antitumor activities[P]. JP, 06, 211, 826.
- [7] Joji Yamahara, Takechi Chisaka, Qirong Huang, et al. Gastrointestinal motility enhancing effect of Saussurea Radix[J]. Phytotherapy Research, 1990, 4(4): 160-161.
- [8] 徐中南, 吴锡铭, 王佩, 等. 18c甘草酸对D-氨基半乳糖引起的大鼠急性肝损伤治疗作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(1): 63-65, 70.
- [9] 汤新慧, 高静. 实验性肝损伤机制[J]. 中西医结合肝病杂志, 2002, 12(1): 53-55.
- [10] 布秀娟. 肝损伤动物模型制作研究进展[J]. 中国医药导报, 2014, 11(12): 166-167.
- [11] 顾芳, 周艳, 杨浩然, 等. β -酪啡肽-7对小鼠酒精性肝损伤防治作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 397-400.
- [12] 任丽平, 杜钢军, 崔新萍. 蒲公英对酒精性肝损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 179-181.
- [13] 洪梅, 孙文静, 毕昱. 三七总皂苷对免疫性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 实用临床医药杂志, 2011, 15(1): 9-14.
- [14] 董丽萍, 于锋, 柳静, 等. 异甘草酸镁对D-氨基半乳糖急性肝损伤模型小鼠的保护作用研究[J]. 中国药房, 2006, 17(12): 902-904.

(2014-11-15 收稿 责任编辑: 张文婷)

第十一届国际络病学大会征文通知

为推动络病学学科深入发展,由中华中医药学会主办、络病分会承办的第十一届国际络病学大会将于2015年5月22日至24日在石家庄召开,参会者将授予国家一类学分。现征集参会论文,具体事宜如下:

征文以“继承创新、发展络病理论”为主题,由络病学大会组委会、《世界中医药》杂志社、《疑难病杂志》杂志社组成评审组,对征文逐一评审,评出获奖作品一等奖3名,二等奖6名,三等奖10名,纪念奖若干名。获一、二、三等奖的论文将择优在2015年分期免费刊登在《世界中医药》或《疑难病杂志》,对获奖文章第一作者颁发获奖证书和奖品。获奖论文将收录到国际络病学大会论文集。

征文内容:

- (1) 络脉及络病理论的文献整理研究;
- (2) 络脉与络病的理论探讨;
- (3) 运用络病理论指导诊治心血管、脑血管、心律失常、慢性心衰、周围血管、糖尿病、糖尿病血管并发症、肿瘤、呼吸系统、泌尿系统等疑难病经验总结或验案报道;

(4) 运用络病理论指导治疗上述疑难病的创新药物研究;

- (5) 通络治法及通络药物治疗疑难病的临床研究;
- (6) 运用现代科学技术对络病理论及通络药物的研究;
- (7) 国外中医药学发展现状及络病理论的推广应用前景;

(8) 络病学教学经验与方法学、络病学会发展建设探讨。要求:

征文不超过3000字,附中英文摘要,注明作者姓名、工作单位、通讯地址及邮编、第一作者电子邮箱。

截稿日期:2015年4月15日
论文电子稿(WORD版)请发至:络病研究室邮箱 luobinglab@sina.com

邮件标题命名为“络病学大会投稿”

联系电话:0311-85901553

国际络病学大会组委会

2015年3月4日