

丹参多糖对小鼠急性肝损伤的保护作用

姚莹华, 刘强, 陈育尧, 孙学刚, 吕志平*
(南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的:探讨丹参多糖 *Salvia miltiorrhiza polysaccharides* (SMPS) 对小鼠急性肝损伤的影响。方法:将小鼠随机分为空白对照组、模型组、丹参多糖高剂量组(15.6 g·kg⁻¹)、丹参多糖中剂量组(7.8 g·kg⁻¹)和丹参多糖低剂量组(3.9 g·kg⁻¹),连续 ig 7 d 后,采用尾 iv 脂多糖(LPS)诱导小鼠急性肝损伤模型,检测各组小鼠肝组织中丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、血清中谷丙转氨酶(ALT)的活性以及肝组织的病理改变。结果:丹参多糖能降低 LPS 诱导的急性肝损伤模型小鼠肝组织中 MDA 含量,升高 GSH 含量,降低血清 ALT 含量。结论:丹参多糖对小鼠急性肝损伤有显著的保护作用。

[关键词] 丹参多糖;脂多糖;急性肝损伤;保护作用

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)06-0227-04

Protection for Acute Liver Injury in Mice by
a Polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza*

YAO Ying-hua, LIU Qiang, CHEN Yu-yao, SUN Xuegang, LV Zhi-ping*
(School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of *Salvia miltiorrhiza* against acute liver injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Method:** Fifty NIH mice were randomly divided into five groups, low-dose (3.9 g·kg⁻¹) of SMPS (SMPS-L), middle-dose (7.8 g·kg⁻¹) of SMPS (SMPS-M), and high-dose (15.6 g·kg⁻¹) of SMPS (SMPS-H) were given daily via gavage for a period of 7 days. The control group and model group were given an equal volume of saline. Seven days later, the mice were given LPS (5 mg·kg⁻¹) (control received saline alone) via lateral tail vein injection. Three hours after the injection of LPS, the mice were weighed and the blood was collected from mice orbit. The contents of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in the liver tissue were measured by colorimetric method, and the serum levels of alanine aminotransferase (ALT) was determined. The pathological change of liver was observed using light microscope. **Result:** SMPS could significantly reduced contend of MDA and the serum levels of ALT, nevertheless the levels of GSH significantly increased. **Conclusion:** SMPS offers obvious effects on protecting acute liver injury induced by lipopolysaccharide.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides; lipopolysaccharide; acute liver injury; protection

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,性味苦,微寒,归心、肝经。具有活血祛瘀、通经止痛、清心安神的功效^[1]。目前研究的丹参有效成分多为脂溶性丹参酮类和水溶性的丹酚酸类,而丹参多糖部位研究较少,本课题组对丹参多

糖的初步研究发现其具有明显的抗免疫性肝损伤的作用^[2]。本实验通过观察丹参多糖对小鼠急性肝损伤的保护作用,探讨了其作用机制,为丹参多糖的进一步开发及临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 雄性 NIH 小鼠,18~22 g,50 只,南方医科大学实验动物中心,动物许可证号 SCXK(粤)2006-0015。颗粒饲料南方医科大学实验动物中心。动物房保持通风,干燥,室温 22~25℃,湿度 50%~

[收稿日期] 2009-12-17
[通讯作者] * 吕志平, Tel: (020) 61648241; E-mail: lzping@fimmu.com

70%,自由饮水,鼠料定量饲养。

1.2 药物 丹参购于广州广弘中药材公司,经南方医科大学中医药学院刘强教授鉴定为唇形科植物丹参 *S. miltiorrhiza* 的干燥根及根茎,丹参多糖的制备按照专利(一种从丹参中提取多糖的方法,公开号:200810026249.4)方法。

1.3 试剂 脂多糖(LPS, Sigma 公司,批号 20081124);MDA 检测试剂盒、GSH 检测试剂盒、血清 ALT 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20090718);考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20090718)。

1.4 仪器 低温高速离心机(Thermo);DK-8AD 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司);721B 型分光光度计(上海第三分析仪器厂);酶标仪(Sigma 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 将小鼠按体重随机分为正常对照组、模型组、丹参多糖高、中、低剂量组,每组 10 只。丹参多糖高、中、低剂量组分别按 15.6,7.8,3.9 g·kg⁻¹ ig 7 d,正常对照组和模型组给予同容量生理盐水。给药 7 d 后开始造模,模型组和丹参多糖组采用小鼠尾 iv LPS 5 mg·kg⁻¹诱导急性肝损伤模型,正常组小鼠尾 iv 同等量生理盐水。3 h 后摘眼球采血,静置后 3 000 r·min⁻¹,离心 10 min,取血清超低温冰箱冻存备检。取肝左叶置于 10% 甲醛固定液制备病理切片,HE 染色。剩余肝脏超低温冰箱冻存制备肝组织匀浆。

2.2 指标检测

2.2.1 病理学观测 光镜下观察肝脏的组织学变化。病理损伤程度分级:-未见明显病理改变;+部分肝组织肿胀伴有散在的点状坏死,汇管区有少许炎性细胞浸润;++肝细胞肿胀有点状坏死及小灶性坏死,可见散在的肉芽肿形成,汇管区有大量炎性细胞浸润;+++肝细胞肿胀,有大片状坏死,有肉芽肿形成,汇管区及周围有大量炎性细胞浸润。

2.2.2 血清学检测 血清 ALT 按试剂盒说明检测。

2.2.3 肝组织中 MDA 含量测定 冻存肝脏化冻后生理盐水洗去浮血,用生理盐水配成 10% 肝组织匀浆^[2],取 0.1 mL 组织匀浆,按试剂盒说明书步骤进行。以下列公式计算肝组织中 MDA 含量:肝组织中 MDA 含量=(测定管吸光度-空白管吸光度)/(标准管吸光度-空白管吸光度)×标准品浓度÷组织匀浆蛋白含量。

准管吸光度-空白管吸光度)×标准品浓度÷组织匀浆蛋白含量。

2.2.4 肝组织中 GSH 含量测定 取 0.5 mL 组织匀浆,按试剂盒说明书所述步骤进行。肝组织中 GSH 含量的计算公式同 2.2.3。

2.3 统计学处理 计量资料用均数±标准差表示,组间比较用单因素方差分析。方差齐性时,采用 LSD 方法进行组间多重比较,方差不齐时,采用 Dunnett T3 方法进行组间多重比较,等级资料采用 χ^2 检验。用统计软件 SPSS 13.0 进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 丹参多糖对急性肝损伤小鼠肝脏病理变化的影响

3.1.1 肉眼观察 模型组肝脏肿大,表面多颗粒,有大小不等的瘀血斑块区域,肝脏整体色泽较正常组发白。丹参多糖高、中、低剂量组肝脏变化较模型组轻。正常组肝脏未见异常。

3.1.2 光镜观察 见图 1 和表 1。

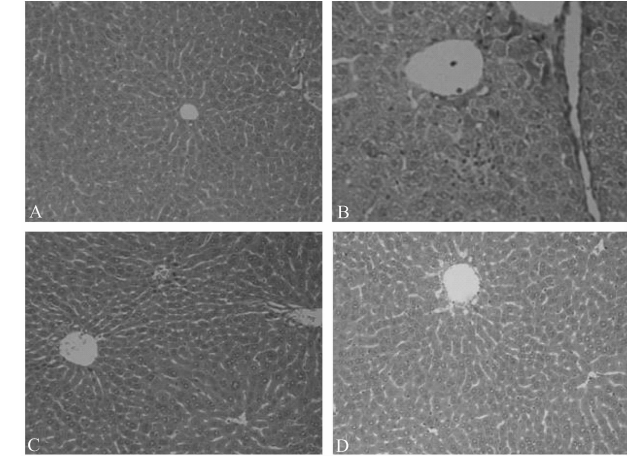


图 1 肝组织病理切片(HE, ×200)

A. 正常对照组;B. 模型组,肝索结构消失,肝细胞肿胀,坏死,肝窦狭窄,炎细胞浸润(×400);C. 丹参多糖中剂量组,肝细胞肿胀,肝窦及血管周围有少量炎细胞浸润;D. 丹参多糖高剂量组,肝细胞轻度肿胀

与正常组比较,模型组肝脏病理变化显著($P < 0.01$)。丹参多糖高、中剂量组与模型组相比,肝脏病理变化明显改善($P < 0.01, P < 0.05$)。低剂量组与模型组相比肝脏病理变化差异不显著。

3.2 丹参多糖对急性肝损伤小鼠血清转氨酶的影响 见表 2。如表 2 所示。与正常组比较,模型组血清 ALT 水平显著升高($P < 0.01$),表明尾 iv LPS

表 1 丹参多糖对脂多糖诱导急性肝损伤小鼠
肝脏病理变化的影响 (n = 10)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	-	+	++	+++
正常对照	-	10	0	0	0 ²⁾
模型	-	0	1	6	3
丹参多糖	3.9	0	3	6	1
	7.8	2	6	2	0 ¹⁾
	15.6	4	5	1	0 ²⁾

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (下同)。
后对小鼠肝组织造成了严重损伤,动物模型建立成功。丹参多糖高、中剂量组与模型组相比有明显下降。

3.3 丹参多糖对急性肝损伤小鼠肝组织中 MDA 含量的影响 见表 2。与正常组比较,模型组肝组织 MDA 水平显著升高($P < 0.01$),丹参多糖高、中剂量组与模型组比有显著下降($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),以丹参多糖高剂量组疗效更为明显($P < 0.01$)。表明丹参多糖具有降低急性肝损伤的肝组织中过氧化脂质含量,减少肝细胞损伤的作用。

3.4 丹参多糖对急性肝损伤小鼠肝组织中 GSH 含量的影响 见表 2。模型组肝组织 GSH 含量与正常组相比显著降低($P < 0.01$),表明造模后小鼠肝组织内 GSH 损耗,生成减少。与模型组相比,丹参多糖高、中、低剂量组肝组织 GSH 含量增多,有显著差异($P < 0.01$),表明丹参多糖可显著提高机体抗氧化能力。

表 2 丹参多糖对脂多糖诱导急性肝损伤小鼠血清 ALT 水平
及肝组织 MDA, GSH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	GSH /mg·g ⁻¹
正常对照	-	51.60 ± 11.539 ²⁾	1.139 ± 0.684 ²⁾	3.829 ± 0.312 ²⁾
模型	-	94.00 ± 14.514	4.169 ± 1.638	2.780 ± 0.302
丹参多糖	3.9	86.40 ± 16.588	3.049 ± 0.676	4.496 ± 1.126 ²⁾
	7.8	76.40 ± 12.989 ¹⁾	2.160 ± 0.782 ¹⁾	5.570 ± 1.166 ²⁾
	15.6	74.80 ± 15.325 ¹⁾	1.621 ± 0.532 ²⁾	4.811 ± 1.220 ²⁾

4 讨论

研究证实,LPS 通过 TLR₄受体复合物及 CD14 共同作用激活肝内枯否细胞产生、释放多种促炎性细胞因子(如 TNF-α, IL-1),从而导致肝损伤的发生^[4]。亦与活性氧有密切关系^[5]。病毒颗粒及免疫复合物等进入肝脏后可激活吞噬细胞,使其代谢加速,氧摄取骤增,引起细胞“呼吸爆发”,产生大量的

ROS,引起细胞脂质膜的脂质过氧化反应而造成周围组织细胞的损伤。MDA 是 ROS 所致脂质过氧化反应的终末产物,其含量的变化可以反映毒性基团引起氧化应激的程度。而当外源性和内源性毒物产生如亲电子基、氧自由基等代谢物时,GSH 可与该毒性基团结合后排出体外,从而保护细胞膜及蛋白质免受自由基的损伤,维持和增强细胞内的氧化还原潜能,增强细胞清除 H₂O₂的能力,呈现抗氧化效应,减轻机体的损伤^[6]。这一反应过程是体内的关键保护机制之一。此外,GSH 还是维持机体正常免疫功能的必要条件,并可抑制多种炎性细胞因子及活性氧中间产物(ROI)的产生和活性^[7]。而肝脏是 GSH 合成的主要场所。研究发现,病毒性肝炎时,内毒素血症的发生和抗氧化系统功能受损可进一步加强肝脏的损伤^[8]。因此,设法阻止活性氧的产生并提高机体的抗氧化能力,将有助于减轻肝脏的损害。

本实验中小鼠尾 iv LPS 3 h 后,模型组小鼠肝内 GSH 含量明显减少,MDA 含量和血清内 ALT 活性却显著增高;病理观察显示肝细胞肿胀,坏死,肝窦狭窄,炎细胞浸润;表明脂多糖诱导小鼠急性肝损伤模型成功。进一步证实 LPS 所致的急性肝损伤与氧化应激引发脂质过氧化以及抗氧化系统功能减弱有着密切关系。丹参多糖高、中、低剂量组小鼠肝组织内 MDA 含量和血清 ALT 活性均明显低于模型组,而肝组织中 GSH 的含量则显著高于模型组。病理观察显示丹参多糖组小鼠肝细胞肿胀、坏死及炎性细胞浸润现象均较模型组减轻,尤其以丹参多糖高剂量组疗效更为明显。说明丹参多糖能显著抑制自由基及其代谢产物的生成,促进肝组织中 GSH 含量增加,提高机体抗氧化能力,从而改善炎症所致的组织细胞损伤。

[参考文献]

[1] 刘燕,谢培德,王宝琴.丹参及其制剂质量的评价方法[J].中国中药杂志,1990,15(3):31.
[2] Yu-Hong Song, Qiang Liu, Zhi-Ping Lv, et al. Protection of a polysaccharide from Salvia miltiorrhiza, a Chinese medicinal herb, against immunological liver injury in mice[J]. Int J Biol Macromol, 2008, 43:170.
[3] Wang Y Z, Hu S S. A novel nitric oxide biosensor based on electropolymerization poly (toluidine blue) film electrode and its application to nitric oxide released in liver homogenate [J]. Biosens Bioelectron, 2006, 22:

10.
[4] Landmann R, Scherer F, Schumann R, *et al.* LPS directly induces oxygen radical p roduction in human monocytes via LPS binding p rotein and CD14 [J]. J Leukoc Biol, 1995, 57(3): 440.
[5] 王宝恩, 张定凤. 现代肝脏病学[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 51.
[6] Forman H, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling resp iratory burst in macrophage signaling[J]. Am J Resp ir Crit Care Med, 2002, 166(12 Pt2): S4.
[7] 叶维法, 钟振义. 当代肝胆疾病治疗学[M]. 成都: 四川科技出版社, 2000: 171.
[8] 贾战生. 肝病细胞治疗基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 5.

[责任编辑 何伟]

(上接第 226 页)

[5] BERETHD, LIEUWE. Massive increase inserum creatine kinase during olan-zapine and quetiapine treatment, not during treatment with clozapine [J]. Psychopharmacology, 2000, 150: 347.
[6] 袁建琴, 王瑞元. 血清肌酸激酶与骨骼肌损伤关系的探讨[J]. 沈阳体育学院学报, 2004, 23 (3): 105.
[7] Novak L P, Tillery G W. Relationship between serum creatine phosphokinase to body composition [J]. Hum Biol, 1977, 49: 375.
[8] 崔俊雪. 黄芪注射液的临床应用[J]. 继续医学教育, 2002, 8(16): 25.
[9] 刘慧琦. 黄芪注射液的临床应用[J]. 继续医学教育, 2002, 8(16): 55.
[10] 杨映雪, 陈建业, 王亚平. 黄芪总黄酮的抗氧化作用[J]. 川北医学院学报, 2007, 12(9): 606.
[11] 白玉新, 傅亮, 高进. 黄芪对缺血性急性肾功能衰竭的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (2): 74.
[12] 郝钰, 邱全瑛, 吴, 等. 黄芪多糖促进中性粒细胞与血管内皮细胞黏附及相关黏附分子表达[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(5): 427.
[13] 朱文辉, 陈世益, 任惠民, 等. 活血生肌类中药对大鼠急性钝挫伤后骨骼肌 II b 型 MHC 及 I 、 III 型胶原蛋白表达的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2005, 24(2): 182.

[责任编辑 邹晓翠]