

草苳蓉水萃取物对脂多糖与 D-氨基半乳糖所致小鼠肝脏氧化应激和细胞凋亡的影响

尹学哲¹, 许惠仙¹, 赵文玺², 全吉淑²

(1. 延边大学 附属医院, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学 医学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 研究草苳蓉水萃取物(BRAF)对脂多糖(LPS)与 D-氨基半乳糖(GalN)联合诱发的小鼠急性肝损伤的保护作用。将小鼠按体质量随机分为 5 组,即正常组、模型组,BRAF 高、低剂量组及水飞蓟素(SIL)组(阳性对照组)。每日给药 1 次,连续 7 d。实验末期,除正常组外,其余组小鼠腹腔注射 LPS 和 GalN 建立急性肝损伤模型,苏木素-伊红(HE)染色法观察肝组织病理学变化,ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α),比色法检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)以及肝脏过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活性及还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)含量,电泳法检测小鼠肝细胞 DNA 损伤情况。结果显示,BRAF 明显降低 GalN 和 LPS 联合诱导的急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活性,减轻肝组织病理损伤,降低血清 TNF- α 水平,降低肝 NO 和 MDA 水平,升高肝组织 CAT、GPx、GST 活性和 GSH 水平,并降低肝细胞 DNA 损伤程度。提示:BRAF 对 GalN 和 LPS 联合诱导的小鼠急性肝损伤具有保护作用,其机制可能与其抗氧化活性和抗肝细胞凋亡作用有关。

关键词: 草苳蓉;肝损伤;氧化应激;凋亡

中图分类号:S 567.23;Q 593.1 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2013)05—0469—05

Effect of Aqueous Fraction of *Boschniakia rossica* on Hepatic Oxidative Stress and Hepatocyte Apoptosis of Mice with Acute Liver Injury Induced by Lipopolysaccharide and D-Galactosamine

YIN Xue-zhe¹, XU Hui-xian¹, ZHAO Wen-xi², QUAN Ji-shu²

(1. Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Medical College of Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: Effect of the aqueous fraction from ethanolic extract of *Boschniakia rossica* (BRAF) on the oxidative stress and apoptosis of liver in mice with an acute liver injury induced by Lipopolysaccharide (LPS) and D-galactosamine (GalN) was investigated in this manuscript. The mice were randomly assigned to 5 groups: normal control, model control, silymarin (positive

收稿日期: 2013-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30360113;81160539)。

作者简介: 尹学哲(1962—),男,朝鲜族,吉林延吉人,医学博士,教授,博士研究生导师,主要从事中草药分子药理学研究。

E-mail:yinxz@ybu.edu.cn

control), as well as high and low dose groups of BRAF. Animals were treated once daily for 7 days. At the end of the experiment, LPS and GalN were given intraperitoneally to the mice of groups, then the pathological changes was detected with hematoxylin & eosin (HE) staining, tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by ELISA method, the alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) were assayed with colorimetric method, and DNA damage was analyzed using the electrophoretic method. The results showed that the administration with BRAF reduced the serum ALT and AST, alleviated the hepatic lesions induced by GalN/LPS, decreased serum TNF- α level, reduced the hepatic NO and MDA contents, increased the hepatic CAT, GPx, GST and GSH levels, and reduced the DNA damage of hepatocyte in mice with acute liver injury. It is suggested that BRAF has a protective effect on acute liver injury induced by GalN and LPS in mice, probably via antioxidative and anti-apoptotic abilities.

Key words: *Boschniakia rossica*, liver injury, oxidative stress, apoptotic

草苈蓉 (*Boschniakia rossica* Fedtsch. et Flerov) 又名不老草, 为列当科草苈蓉属多年生寄生性草本植物, 国家二类保护植物。草苈蓉性味甘、酸、涩, 全草入药。具有补肾壮阳、润肠止血、滋补强身、延年益寿的功效; 用于治疗肾虚阳痿、腰膝冷痛、老年性习惯便秘、膀胱炎、功能性子宫出血、肾炎、前列腺炎, 以及肾脏和膀胱出血等疾病^[1]。研究发现, 草苈蓉具有抗脂质过氧化、抗炎、增强免疫及抗肿瘤等作用^[1-3], 这与草苈蓉醛、草苈蓉内酯、草苈蓉酸、草苈蓉碱、草苈蓉纳拉苷和糖类等多种活性成分有关^[4]。草苈蓉多糖是从草苈蓉中提取出来的生物活性成分, 是草苈蓉水萃取物 (BRAF) 的主要成分^[5]。它无毒, 具有抗肿瘤和免疫增强功能^[4-5]。本实验通过建立脂多糖 (LPS) 及 D-氨基半乳糖 (GalN) 联合诱导的小鼠急性肝损伤模型, 观察 BRAF 对小鼠急性肝损伤的保护作用, 为草苈蓉的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 昆明小鼠, 雄性, 体质量为 18~22 g, 由延边大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂和仪器 LPS 及 GalN, Sigma 公司产品; 水飞蓟素 (SIL), 沈阳东陵药业股份有限公司产品; TNF- α ELISA 试剂盒, 武汉博士德公司产品; 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、一氧化氮 (NO)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、谷

胱甘肽-S-转移酶 (GST)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 及蛋白质试剂盒, 南京建成科技有限公司产品。3-30K 型离心机, Sigma 公司提供; S22PC 型分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司产品; RT-2100 型酶标仪, 深圳雷杜公司产品; BA200 型生物显微镜, 中国麦克奥迪实业集团有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 BRAF 的制备 草苈蓉采自吉林省长白山, 经延边大学药学院刘勇镇教授鉴定为草苈蓉 *Boschniakia rossica* Fedtsch. et Flerov。草苈蓉用体积分数 90% 乙醇提取后, 依次用乙酸乙酯、正丁醇萃取, 水层经减压蒸馏, 即得 BRAF, 得率约为 3.2%^[2]。主要成分有多糖 (质量分数 67.0%) 和蛋白质 (质量分数 3.1%)。

1.2.2 实验动物分组及处理 将小鼠按体质量随机分为 5 组, 即正常组、模型组, BRAF 高、低剂量组和 SIL 组。每日灌胃给药 1 次, 连续 7 d, BRAF 高、低剂量分别为 240、120 mg/kg, SIL 剂量 50 mg/kg, 正常组及模型组小鼠则以等体积蒸馏水灌胃。末次给药 1 h 后, 除正常组外, 其余各组小鼠腹腔注射给予 500 mg/kg GalN 和 10 μ g/kg LPS (用无菌生理盐水配制)。造模期间禁食, 不禁水。

1.2.3 血清转氨酶及 TNF- α 水平的检测 造模 1.5 h 后, 分离血清, ELISA 法检测小鼠血清 TNF- α 含量。再次造模 8 h 后, 分离血清, 检测小鼠血清 ALT、AST 活性。

1.2.4 肝组织病理学检查 造模 8 h 后处死动物,取小鼠肝左叶,固定于质量分数 10% 福尔马林溶液中,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,在光镜下观察肝组织病理学变化。

1.2.5 肝组织氧化应激与抗氧化相关指标、DNA 损伤及细胞凋亡相关指标的检测 4 ℃ 裂解肝细胞,离心取上清液。按试剂盒操作方法测定 CAT、GPx、GST、GSH、MDA、NO 水平。提取肝细胞 DNA,上琼脂糖凝胶电泳,检测肝细胞 DNA 损伤情况。

1.2.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 SPSS11.5 统计软件,以单因素方差分析和 Turkey's 多因素 *t* 检验进行。

2 结果与分析

2.1 BRAF 对急性肝损伤小鼠肝组织病理学的影响

如图 1 所示,模型组小鼠肝小叶结构模糊,可见大量肝细胞坏死,肝细胞核明显大小不等,呈不同程度的固缩,凋亡严重,可见大量凋亡小体。BRAF 和 SIL 干预均能减轻上述肝组织病理学损

伤,凋亡肝细胞明显减少。

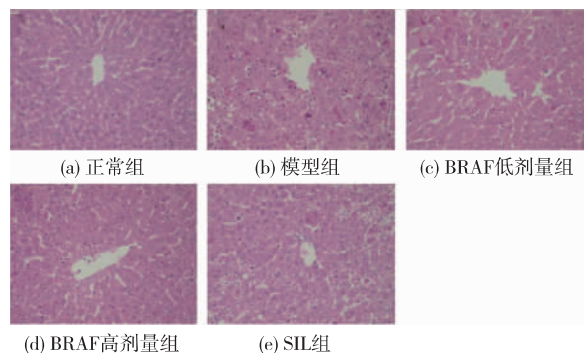


图 1 肝组织病理学观察结果 (HE ×200)

Fig. 1 Pathological observation of liver sections (HE×200)

2.2 BRAF 对急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST、TNF-α 以及肝组织 NO 水平的影响

如表 1 所示,腹腔注射 GalN/LPS 后 1.5 h,模型组小鼠血清 TNF-α 水平升高,注射 8 h 时模型组小鼠血清 ALT 和 AST 活性明显上升,肝组织 NO 水平也明显升高 ($P < 0.05$);而 BRAF 高、低剂量组和 SIL 组小鼠血清 ALT、AST、TNF-α 和肝 NO 水平与模型组比较明显降低 ($P < 0.05$)。

表 1 BRAF 对急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST、TNF-α 和肝组织 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of BRAF on serum TNF-α and hepatic NO levels of mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TNF-α/(ng/L)	NO/(μmol/L)
正常组	—	55.9±10.2	60.3±11.7	36.5±9.4	10.6±2.7
模型组	—	372.6±42.8*	105.8±14.2*	162.4±30.8*	23.4±4.3*
BRAF 低剂量组	120	257.9±30.4 [#]	72.3±12.4 [#]	91.3±29.6 [#]	14.5±4.5 [#]
BRAF 高剂量组	240	203.3±30.1 [#]	69.5±10.3 [#]	85.6±24.3 [#]	13.3±4.1 [#]
SIL 低剂量组	50	246.2±30.5 [#]	67.1±9.5 [#]	94.3±32.7 [#]	13.9±3.2 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.3 BRAF 对急性肝损伤小鼠肝组织抗氧化活性和脂质过氧化水平的影响

如表 2 所示,腹腔注射 LPS 和 GalN 明显降低模型组小鼠肝组织 CAT、GPx 和 GST 活性 ($P < 0.05$),降低肝脏 GSH 水平 ($P < 0.05$),增高肝脏 MDA 含量 ($P < 0.05$)。而 BRAF 治疗可回升小鼠肝 CAT、GPx、GST 活性和 GSH 含量 ($P < 0.05$),降低肝 MDA 水平。说明 BRAF 可升高 GalN/LPS 所致急性肝损伤小鼠肝脏抗氧化防御能力,降低肝脏氧化应激。

2.4 BRAF 对急性肝损伤小鼠肝组织 DNA 损伤的影响

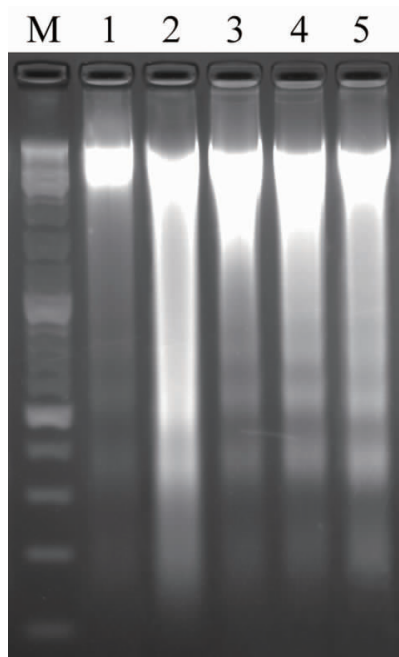
DNA 电泳结果显示,注射 LPS 和 GalN 可明显增高模型组小鼠肝细胞 DNA 损伤,损伤肝细胞 DNA 断裂形成梯形条带,呈现细胞凋亡的结构特征。另有部分 DNA 随机降解成模糊涂片状,呈现细胞坏死特征。电泳图条带的灰度值比较结果显示,模型组小鼠肝细胞 DNA 断裂和降解均明显高于正常组 ($P < 0.05$),而 BRAF 和 SIL 预处理可明显降低急性肝损伤小鼠肝细胞 DNA 断裂和降解程度 ($P < 0.05$)。

表 2 BRAF 对急性肝损伤小鼠肝组织 CAT、GPx、GST、GSH 和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of BRAF on hepatic CAT, GPx, GST, GSH and MDA levels of mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg/kg)	CAT/(U/mg)	GPx/(U/mg)	GST/(U/mg)	GSH/(nmol/mg)	MDA/(nmol/mg)
正常	—	14.5±1.9	169±24	17.9±4.4	24.8±4.5	2.24±0.33
模型	—	10.3±2.0*	118±20*	12.6±3.1*	15.6±3.9*	3.48±0.41*
BRAF 低剂量	120	13.7±1.5 [#]	129±18	19.2±3.7 [#]	20.5±4.1 [#]	2.57±0.36 [#]
BRAF 高剂量	240	12.9±1.7 [#]	141±21 [#]	22.6±3.6 [#]	22.0±4.6 [#]	2.64±0.42 [#]
SIL	50	13.5±1.5 [#]	139±19 [#]	21.2±3.3 [#]	21.3±4.2 [#]	2.49±0.35 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$ 。



M:Marker; 1.正常组; 2.模型组; 3.BRAF低剂量组; 4.BRAF高剂量组; 5.SIL组

图 2 BRAF 对急性肝损伤小鼠肝组织 DNA 损伤的影响

Fig. 2 Effect of BRAF on DNA damage of liver in mice with acute liver injury

3 讨论

肝损伤是指在一系列理化因素的作用下,肝细胞发生不同程度的肿胀、变性、坏死和凋亡的病理状态。在肝细胞病变过程中,自由基、酶及脂质过氧化等均发挥主要作用^[6]。GalN/LPS 诱导的肝损伤小鼠是研究急性肝损伤十分理想的动物模型。GalN 诱发的动物肝组织损伤在形态学和功能学上与人类急性重症肝炎相似,而小剂量 LPS 可诱导 GalN 致敏小鼠发生以细胞凋亡为重要特征的急性肝功能衰竭^[7]。细胞凋亡过程中氧化应激起着关键性作用,

氧化应激状态下,机体活性氧自由基产生过多,同时抗氧化体系功能下降,进而对机体产生损伤^[8]。为了对抗氧化应激引起的各种损伤,有氧生物在进化过程中发展了多种抗氧化防御机制,包括各种抗氧化酶和解毒酶,如 SOD、CAT、GPx 和 GST 等,可与 GSH 等抗氧化剂一起有效清除体内脂质过氧化物,使机体免受自由基的损害^[9]。本实验表明,模型组小鼠血清转氨酶、肝组织抗氧化酶活性及 GSH 水平降低,肝脏脂质过氧化水平升高。BRAF 预处理可逆转这些血清及肝脏指标,提示 BRAF 可提高 GalN/LPS 所致急性肝损伤小鼠肝脏抗氧化防御能力和抑制脂质过氧化反应,抑制急性肝衰竭氧化应激,这可能是 BRAF 保护肝损伤的重要机制之一。

血清 TNF- α 在炎症反应的发生、发展过程中发挥关键作用^[8]。LPS 使 GalN 致敏小鼠发生得肝细胞凋亡是由释放入血循环的 TNF- α 所致,进而引起白细胞介素等炎症因子的释放^[8]。在炎症反应中,NO 大量释放也被人们关注和广泛研究。NO 是一种细胞信使分子和细胞毒性分子,是组织损伤的诱发因子和各种病变的增强因子,能引起肝损伤。NO 的这种双重性在肝脏疾病的发生与治疗中具有重要作用^[10]。而 TNF- α 被认为是 NO 合成的一个重要调节者^[8]。本实验中发现肝衰竭时, GalN/LPS 腹腔注射 1.5 h,血清 TNF- α 水平升高,注射 8 h 时肝脏 NO 水平也增高,而 BRAF 预处理可降低血清 TNF- α 和肝脏 NO 水平,从而减少炎症反应的发生。

细胞凋亡是 LPS 诱导 GalN 致敏小鼠最重要的肝细胞死亡形式^[7-9]。其明显的生化特征是形成 180-200 bp 或者其多聚体组成的寡核苷酸片段^[11]。本实验结果显示,腹腔注射 LPS 和 GalN 能使肝细胞 DNA 发生断裂形成有规则片段,而 BRAF 明显降低肝细胞 DNA 断裂程度,提示 BRAF 可抑制急性肝

损伤小鼠肝细胞凋亡。同时,BRAF 还明显降低 LPS/GalN 所致肝损伤小鼠的肝细胞 DNA 随机降解,减少肝细胞 DNA 损伤。

综上所述,BRAF 对 LPS/GalN 所致小鼠急性肝损伤具有保护作用,其机制可能与其提高抗氧化活性、减少炎症反应和抑制肝细胞凋亡作用有关。

参考文献:

- [1] 汪霞,周微,李天,等. 草苈蓉环烯醚萜对肝癌前病变大鼠血清标志酶及抗氧化活性的影响[J]. 食品科技,2010,35(7):242-245.
WANG Xia,ZHOU Wei,LI Tian,et al. Effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* on serum marker enzymes and antioxidative activities of rat with hepatic preneoplasia[J]. **Food Science and Technology**,2010,35(3):72-74.(in Chinese)
- [2] 杨振凯,杨阳,张亚男,等. 草苈蓉正丁醇及水萃取物对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 延边大学医学学报,2011,34(2):105-107.
YANG Zhen-kai,YANG Yang,ZHANG Ya-nan,et al. Protective effects of butanol soluble and aqueous fractions of *Boschniakia rossica* on acute liver injury in mice[J]. **Journal of Medical Science Yanbian University**,2011,34(2):105-107.(in Chinese)
- [3] QUAN Ji-shu,YIN Xue-zhe,XU Hui-xian. *Boschniakia rossica* prevents the carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat [J]. **Experimental and Toxicologic Pathology**,2011,63:53-59.
- [4] 费瑞,迟立超,杜建石,等. 草苈蓉多糖的毒性实验研究[J]. 东北师大学报:自然科学版,2008,40(2):98-100.
FEI Rui,CHI Li-chao,DU Jian-shi,et al. Toxicity of polysaccharides of *Boschniakia rossica*[J]. **Journal of Northeast Normal University:Natural Science Edition**,2008,40(2):98-100.(in Chinese)
- [5] WANG Zheng-hui,WU Bao-jun,ZHANG Xiang-hong,et al. Purification of a polysaccharide from *Boschniakia rossica* and its synergistic antitumor effect combined with 5-Fluorouracil[J]. **Carbohydrate Polymers**,2012,89:31-35.
- [6] 陈伟平,谢国沁,胡金鹿,等. 紫心甘薯对四氯化碳、卡介苗加脂多糖诱发小鼠肝损伤的保护作用[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(6):887-893.
CHEN Wei-ping,XIE Yuan-qin,HU Jin-lu,et al. Protective effect of purple sweet potato on hepatic injury mice[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(6):887-893.(in Chinese)
- [7] 宋志伟,吴艳玲,朴惠善. 桦褐孔菌对小鼠急性肝组织损伤的保护作用[J]. 延边大学医学学报,2007,30(1):34-36.
SONG Zhi-wei,WU Yan-ling,PIAO Hui-shan. Protective effects of extracts of *Inonotus obliquus* on acute hepatic failure in mice[J]. **Journal of Medical Science Yanbian University**,2007,30(1):34-36.(in Chinese)
- [8] 董梅. 黄芩素对 D-氨基半乳糖/内毒素诱导急性肝衰竭预防作用及相关机制研究[D]. 延吉:延边大学,2009.
- [9] 刘小玲,李艳,赵鹏,等. 仙草提取物对 CCl₄ 致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 食品与生物技术学报,2009,28(6):1-5.
LIU Xiao-ling,LI Yan,ZHAO Peng,et al. Protective effects of extracts of *Mesona blumes* on carbon tetrachloride induced liver injury in mice[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(6):1-5.(in Chinese)
- [10] 周燕,翟羽佳,何蓉蓉,等. 荆条子乙醇提取物对小鼠免疫性肝炎及急性炎症的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(17):2404-2408.
ZHOU Yan,ZHAI Yu-jia,HE Rong-rong,et al. Effect of *Vitex negundo* var.*heterophylla* seeds ethanol extract (VSE) on mice model of immunological hepatitis and acute inflammation[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**,2011,36(17):2404-2408.(in Chinese)
- [11] 郭宏兴,刘亮明,张吉翔,等. 大鼠内毒素性急性肝损伤后肝细胞凋亡与炎性因子的表达[J]. 中华传染病杂志,2008,26(7):415-419.
GUO Hong-xing,LIU Liang-ming,ZHANG Ji-xiang,et al. Endotoxin-induced acute liver injury in rats with hepatocellular apoptosis and expression of inflammatory cytokines[J]. **Chinese Journal of Infectious Diseases**,2008,26(7):415-419.(in Chinese)