

毛菊苣提取物对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用

庞市宾¹, 吴发宝², 刘晓燕¹, 徐磊¹, 哈木拉提·哈斯木¹, 孙玉华^{1*}

1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004

2. 新疆维吾尔自治区中医民族医药管理局, 新疆 乌鲁木齐 830004

摘要: 目的 观察毛菊苣提取物抗慢性肝纤维化的作用。方法 将 Wistar 大鼠随机分为毛菊苣提取物低、中、高剂量 (50、100、150 mg/kg) 组, 秋水仙碱 (colchicine, 0.5 mg/kg) 组, 模型组和正常组, ig 给药。给药同时各组 sc 四氯化碳 (CCl₄) 造模, 每周 2 次。于 60 d 后, 检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、肝组织丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、羟脯氨酸 (Hyp) 及肝组织病理变化。结果 与模型组比较, 毛菊苣提取物低、中、高剂量组均能明显降低肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST 的含量及肝组织中 MDA 和 Hyp 的含量 ($P < 0.01$), 明显提高血清 TP、ALB 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01) 及肝组织 GSH-Px 活性 ($P < 0.01$); 肝脏组织学检查表明, 毛菊苣提取物可明显改善肝组织病理损伤程度, 其作用呈一定的量效关系。结论 毛菊苣提取物对实验性慢性肝损伤具有保护肝细胞, 减少肝损伤, 抗肝纤维化作用。

关键词: 肝纤维化; 毛菊苣; 四氯化碳

中图分类号: R975.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2013)06-0418-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.06.004

Preventive and therapeutic effects of *Cichorium glandulosum* extract on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats

PANG Shi-bin¹, WU Fa-bao², LIU Xiao-yan¹, XU Lei¹, Humulati Hasimu¹, SUN Yu-hua¹

1. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China

2. Xinjiang State Administration of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830004, China

Abstract: Objective To investigate the effects of *Cichorium glandulosum* extract (CGE) on liver fibrosis induced by chronic hepatic injury. **Methods** Wistar rats were randomizedly divided into six groups: CGE (50, 100, and 150 mg/kg) treatment groups, colchicine (Colc, 0.5 mg/kg) treatment group, model group, and normal control group. Rats were sc injected with carbon tetrachloride (CCl₄) two times a week to induce liver fibrosis as well as ig administration of CGE or Colc. After 60 d, the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein (TP), albumin (ALB) in serum and malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), hydroxyproline (Hyp) in liver tissue were determined, and the liver histological changes were investigated by pathological examination. **Results** Compared with the model group, CGE significantly reduced the levels of ALT and AST in serum ($P < 0.01$), and decreased MDA and Hyp levels in liver tissue ($P < 0.01$) while TP, ALB, and GSH-Px were significantly elevated ($P < 0.05$, 0.01). Pathological examination revealed that CGE had the therapeutical effect on the experimental liver fibrosis. **Conclusion** CGE has the better effects on protecting hepatocyte, relieving liver injury, and against liver fibrosis.

Key words: liver fibrosis; *Cichorium glandulosum* Boiss et Huet; carbon tetrachloride

毛菊苣 *Cichorium glandulosum* Boiss.et Huet, 为菊科菊苣属一年生草本植物, 广泛分布在中国新疆及周边地区。系维吾尔族习用药材, 以地上部分入药, 具有清肝利胆、健胃消食、利尿消肿之功效, 维吾尔医认为该药生湿生寒, 用于调节异常胆液质,

降低肝火, 清胃之热^[1]。临床上用于湿热黄疸、胃痛食少、水肿尿少等症^[1-3]。有文献报道毛菊苣根提取物具有保肝、降血糖、降血脂等作用, 种子提取物具有抗肝毒性作用^[4]。本研究通过大鼠肝纤维化模型的建立, 观察毛菊苣提取物对肝纤维化大鼠的

收稿日期: 2013-08-01

作者简介: 庞市宾 (1980—), 男, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理与毒理研究。Tel: (0991)2320296 E-mail: pangzhiyou1980@163.com

*通信作者 孙玉华 (1965—), 男, 硕士, 研究员, 从事中药药理与毒理研究。Tel: (0991)2312070 E-mail: sunyuh1117@yahoo.com.cn

治疗作用,为毛菊苣的作为抗慢性肝损伤肝纤维化药物研究提供理论参考。

1 材料

1.1 动物

Wistar 大鼠, SPF 级, 体质量 (150 ± 30) g, 雌雄各半, 购自新疆医科大学实验动物研究中心, 生产许可证号 SCXK (新) 2003-001。

1.2 药品与试剂

毛菊苣籽购自乌鲁木齐市二道桥药材市场, 由新疆维吾尔自治区药物研究所民族药研究室何江副研究员鉴定为菊科毛菊苣 *Cichorium glandulosum* Boiss.et Huet 的种子。毛菊苣提取物制备: 将毛菊苣籽用 70%乙醇回流提取 2.0 h, 料液比 1:50, 回流温度 70 °C, 收集提取液减压浓缩得浸膏, 含 12 g 生药/g 浸膏。秋水仙碱, 西双版纳版纳药业有限责任公司生产, 批号 101025; CCl_4 , 天津市化学试剂三厂, 批号 20091028; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB) 试剂盒, 购自中生北控生物科技股份有限公司, 批号分别为 111631, 100761.201012, 110991, 101011.201006; 肝组织丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、羟脯氨酸 (Hyp) 试剂盒, 购自南京建成生物科技股份有限公司, 批号分别为 20110912, 110615, 20110711。

1.3 仪器

Sartorius BS323S 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司), 3K30 低温高速离心机 (Sigma 公司), SABA—18 全自动血液生化分析仪 (意大利 AMS 公司), HH—S₄ 数显恒温水浴锅 (金坛市医疗仪器厂), 722 光栅分光光度计 (上海第三分析仪器厂)。

2 方法^[5-6]

2.1 CCl_4 慢性肝损伤模型

大鼠 sc 40% CCl_4 橄榄油溶液, 根据大鼠体质量腹部 sc 4 mL/kg, 每周 2 次, 连续 60 d。

2.2 分组及给药

动物造模成功后, 随机分 5 组, 分别为模型组, 阳性对照组 (秋水仙碱 0.5 mg/kg), 毛菊苣提取物低、中、高剂量 (50、100、150 mg/kg) 组, 另设空白对照组。各组 ig 给予相应药物 10 mL/kg, 空白对照、模型组给予等量生理盐水, 连续给药 60 d, 期间观察动物的活动状态。

2.3 标本的采集

末次给药后, 禁食 24 h, 大鼠乙醚麻醉, 颈动

脉取血, 分离血清; 剖腹取肝脏, 将肝脏置于冰生理盐水中充分洗涤后, 取部分置于 10%甲醛溶液, 剩余部分肝组织匀浆。

2.4 检测方法

2.4.1 血清中 ALT、AST、TP、ALB 按照试剂盒说明书方法测定。

2.4.2 肝组织中 MDA、GSH-Px、Hyp 检测均按照试剂盒说明书方法测定。

2.4.3 光镜检查取肝组织石蜡包埋, 常规 HE 染色, 光镜观察肝小叶结构、纤维增生情况、间隔是否形成、汇管区是否扩大、肝细胞排列, 肝细胞变性坏死、间质炎性细胞浸润和肝细胞的再生情况。

2.5 数据处理

采用 SPSS 13.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 一般症状观察

造模期间, 正常对照大鼠体质量增加, 活动正常, 正常饮水饮食。造模大鼠在 sc CCl_4 7 d 后, 活动略有减少、懒动, 毛色变得蓬松、干枯、无光泽, 饮食饮水减少, 体质量下降, 大便减少; 在给予毛菊苣提取物和秋水仙碱后, 大鼠的活动状态、毛色、饮食饮水、体质量的减少均较模型组有一定程度的减轻。

3.2 毛菊苣提取物对 CCl_4 致慢性肝纤维化大鼠肝功能的影响

大鼠乙醚麻醉, 颈动脉取血, 分离血清, 测定血清 ALT 和 AST、TP、ALB, 结果见表 1。模型组大鼠肝功能各项指标 (ALT、AST) 较对照组明显升高, TP、ALB、白蛋白/球蛋白比值 (A/G) 较对照组明显降低 ($P < 0.01$)。在给予毛菊苣提取物后, 各给药组与模型组比较能够显著降低血清中升高的 ALT、AST 水平 ($P < 0.01$), 随着剂量增加其作用效果越显著。另外, 毛菊苣提取物各给药组对 TP、ALB 水平的降低有升高的作用, 其中毛菊苣高剂量 (150 mg/kg) 组与模型组差异有显著性 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.3 毛菊苣提取物对 CCl_4 致肝纤维化大鼠肝组织 MDA、GSH-Px、Hyp 的影响

由表 2 可以看出, 模型组较对照组 MDA、Hyp 含量明显升高, GSH-Px 含量降低。给药后, 毛菊苣提取物各剂量组肝组织 MDA、Hyp 含量较模型组明显降低, 差异有显著性 ($P < 0.01$); GSH-Px

含量较模型组升高,各剂量组与模型组比较差异有显著性 ($P<0.01$)。

3.4 毛茛苣提取物对 CCl_4 致慢性肝纤维化大鼠肝组织病理学检查的影响

组织病理学检查结果表明,对照组大鼠肝脏细胞完整,未见到肝细胞细胞变性,坏死,炎性细胞浸润,充血,出血。模型组、秋水仙碱组以及毛茛苣提

取物各剂量组均可见不同程度的肝组织病变。

本实验中,模型组大鼠肝脏组织结构受到严重破坏,可见肝细胞中度脂肪性病变,汇管区纤维结缔组织增生显著,形成纤维膜样间隔,有形成假小叶的趋势。秋水仙碱组和毛茛苣提取物各剂量组观察发现,肝细胞脂肪性病变及纤维组织的增多较模型组在程度和范围上有所减轻,结果见表3。

表1 毛茛苣对 CCl_4 致慢性肝纤维化大鼠肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of CGE on liver function in experiential rat model with CCl_4 -induced liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	ALB/GLB
对照	—	47.24±4.66	146.17±16.64	68.40±4.86	41.87±3.12	1.67±0.56
模型	—	97.86±8.01 ^{##}	280.67±25.52 ^{##}	58.34±3.13 ^{##}	33.42±3.26 ^{##}	1.39±0.35 ^{##}
秋水仙碱	0.5	55.04±5.68 ^{**}	220.81±27.74 ^{**}	64.27±4.11 ^{**}	39.21±2.26 ^{**}	1.62±0.36
毛茛苣	50	77.31±11.08 ^{**}	251.71±31.61 ^{**}	60.96±3.42	34.38±2.28	1.30±0.14
	100	68.36±6.17 ^{**}	233.16±25.40 ^{**}	61.40±2.65 [*]	35.67±3.00	1.41±0.27
	150	63.10±6.78 ^{**}	226.63±27.11 ^{**}	63.62±1.35 ^{**}	36.60±2.90 [*]	1.40±0.29

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

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs control group

表2 毛茛苣对 CCl_4 致大鼠肝纤维化肝组织 MDA、GSH-Px、Hyp 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of CGE on MDA, GSH-Px, and Hyp in liver issue of experiential rat model with CCl_4 -induced liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)	Hyp/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)
对照	—	12.45±2.52	156.21±30.05	0.152±0.027
模型	—	46.15±5.01 ^{##}	65.72±10.30 ^{##}	0.297±0.044 ^{##}
秋水仙碱	0.5	19.10±3.16 ^{**}	133.69±32.17 ^{**}	0.194±0.028 ^{**}
毛茛苣	50	31.67±5.05 ^{**}	87.39±11.16 ^{**}	0.247±0.031 ^{**}
	100	27.89±5.06 ^{**}	96.53±17.20 ^{**}	0.234±0.023 ^{**}
	150	25.41±2.95 ^{**}	104.84±14.29 ^{**}	0.211±0.016 ^{**}

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

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs control group

表3 毛茛苣 CCl_4 致大鼠肝纤维化肝组织病理学检查的影响 ($n=10$)

Table 3 Effect of CGE on pathological examination in experiential rat model with CCl_4 -induced liver fibrosis ($n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝细胞脂变	肝细胞坏死	炎细胞浸润	窦旁细胞增生	纤维间隔形成	假小叶形成趋势
对照	—	—	—	—	—	—	—
模型	—	++	+	+	+	++	++
秋水仙碱	0.5	+	+	+	+	+	+
毛茛苣	50	++	+	+	+	++	+
	100	++	+	+	+	+	+
	150	++	+	+	+	+	+

—无, +-部分可见, ++明显可见

-- negative; + - partially visible; ++ -obvious visible

4 讨论

肝纤维化是由于纤维增生和纤维分解不平衡,导致肝脏纤维结缔组织的过度沉积,是各种慢性肝病后产生的一种共同结果。在这一病理过程中,细胞-细胞因子-基质之间相互作用,使肝脏细胞外基质代谢紊乱,在窦周间隙过度沉积,继之肝窦毛血管纤维化,造成纤维在肝脏内沉积过多,最终导致肝纤维化^[7]。

CCl₄是目前诱导肝纤维化的常用化学物质,其作用机制为脂质过氧化致细胞损伤达一定程度后引起肝内胶原纤维增多,随病程进展而迁延,从而形成肝纤维化。近年来,研究报道中药复方和中药有效成分有抗实验性肝纤维化作用,甘草甜素、氧化苦参碱等已试用于临床,效果较为满意,中药有效成分大多具有减轻肝脏炎症或促进肝细胞再生,减少肝脏胶原沉积,促进肝脏胶原降解等功能^[8-9]。本研究结果显示,由CCl₄造模大鼠有明显肝损伤及慢性纤维化症状,在给予维吾尔习用药材毛菊苣提取物后,大鼠肝功能各指标均得到不同程度改善,血清中ALT、AST的抑制作用均较明显,同时能够显著升高血清中TP、ALB水平;病理组织学检查也显示毛菊苣提取物各剂量组肝细胞炎性浸润较模型组明显减轻,表明毛菊苣能够明显改善肝功能,具有保肝降酶作用。此外,毛菊苣提取物各剂量组能够明显降低由CCl₄致慢性肝纤维化大鼠肝组织MDA含量、升高GSH-Px含量,提示抗氧化作用是毛菊苣提取物发挥保肝降酶、抗肝纤维化作用的可能途径;毛菊苣提取物对肝纤维化大鼠肝组织中Hyp的含量有较为明显的降低作用。胶原纤维主要由胶原蛋白所构成,Hyp为胶原蛋白所特有的氨基酸成分,其在肝中的含量可反映胶原代谢的变化情

况,与肝纤维化程度平行。病理观察发现,毛菊苣提取物可以明显减轻肝细胞脂肪变性及炎性细胞浸润,抑制胶原纤维的增生,说明其能抑制肝脏胶原纤维的合成与沉积,也是其抗肝纤维化可能的作用机制之一。

本实验结果表明维药毛菊苣具有较好的肝保护及抗肝纤维化作用,其作用机制可能是通过抗氧化作用和抑制肝脏胶原纤维的合成和沉积而抑制肝纤维化的发展。这一结果将为进一步研究维吾尔药材毛菊苣在保肝降酶、抗肝纤维化方面的作用以及临床治疗提供实验依据。

参考文献

- [1] 中华本草 [M]. 维吾尔药卷. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 326-327.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] Yang C Y. Flora Xinjiangensis (Tomus 5) [M]. Xinjiang Science & Technology & Hygiene Publishing House, 1999: 369.
- [4] Ahmed B, Al-Howriny T A, Siddiqui A B. Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 87(2/3): 237-240.
- [5] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 1350-1351.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 724-728, 832-836.
- [7] 张媛辉, 刘俊田. 中药抗肝纤维化作用机制的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6): 66-70.
- [8] 倪春艳, 郑仕中, 陆茵, 等. 以瘦素为靶点中药单体成分防治肝纤维化研究策略及进展 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1837-1841.
- [9] 胡庆伟, 刘耕陶. 抗肝纤维化药物研究的进展 [J]. 药学报, 2006, 41(1): 7-11.