

连翘苷元对大鼠免疫性肝纤维化的影响

王恩力¹, 姚景春², 刘 铮^{1*}

1. 沈阳药科大学 生命科学与生物制药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 鲁南制药集团 药理中心, 山东 临沂 273400

摘要: **目的** 研究连翘苷元对牛血清白蛋白诱导的大鼠免疫性肝纤维化的影响。**方法** 动物按照体质量随机分为对照组、模型组、连翘苷元低、中、高剂量(0.1、0.3、1.0 mg/kg)组和水飞蓟宾葡甲胺组(50 mg/kg), 利用牛血清白蛋白建立大鼠免疫性肝纤维化模型。全自动生化分析仪检测血清蛋白水平; Elisa试剂盒检测血清透明质酸(HA)、层黏蛋白(LN)、IV型胶原(IV-C)和III型前胶原(PCIII)水平; 分光光度计法检测肝脏组织羟脯氨酸(Hyp); 取肝左叶固定、HE染色, 显微镜下观察肝纤维化程度。**结果** 连翘苷元能够显著降低肝纤维化大鼠血清HA、LN、IV-C和PCIII的量, 减少肝脏质量和肝脏系数, 降低肝脏Hyp水平, 减轻肝纤维化程度。**结论** 连翘苷元对免疫性大鼠肝纤维化有较好的治疗作用。

关键词: 连翘苷元; 免疫性肝纤维化; 牛血清白蛋白; 羟脯氨酸

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2015)02-0161-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.02.009

Effect of forsythiaside on immunological hepatic fibrosis of rats

WANG En-li¹, YAO Jing-chun², LIU Zheng¹

1. School of Life Science and Bio-pharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Center of Pharmacology, Lunan Pharmaceutical Group Corporation, Linyi 273400, China

Abstract: Objective To investigate the effects of forsythiaside on immunological hepatic fibrosis induced by bovine serum albumin (BSA) in rats. **Methods** To establish the immunological hepatic fibrosis models induced by BSA. Animals were randomly divided into six groups namely normal group, model group, forsythiaside (0.1, 0.3, and 1.0 mg/kg) treated groups, and Silybin group (50 mg/kg). The levels of TP, ALB, AST, and ALT were assayed by automatic biochemical analyzer; The levels of LN, HA, IV-C and PCIII in serum were assayed by ELISA kit; Hydroxyproline (Hyp) content in liver tissue was assayed by spectrophotometry; Taking the left hepatic lobe fixed, HE staining was used to examine the histopathological change under microscope. **Results** Forsythiaside could significantly alleviate the hepatic fibrosis, not only in decreasing the Hyp content in hepatic tissue, but also reducing the levels of LN, HA, IV-C and PCIII in rats with immunological hepatic fibrosis. **Conclusion** Forsythiaside has the protective effects on the hepatic fibrosis induced by BSA in rats.

Key words: forsythiaside; immunological hepatic fibrosis; bovine serum albumin; hydroxyproline

连翘苷元(forsythiaside), 又称连翘脂素、连翘脂苷A, 是从木犀科连翘属植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 干燥果实连翘中分离提取的一种单体化合物。作为连翘提取物的主要有效成分^[1], 连翘苷元具有抗肿瘤、抗氧化等多种药理活性^[2-4], 但对免疫性肝纤维化的影响还没有报道。本实验利用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)诱导免疫性肝纤维化大鼠模型, 考察连翘苷元

对免疫性肝纤维化的影响, 为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

Wisata 大鼠, 体质量 120~160 g, 雄性, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 质量合格证号 11400700047208; 动物饲养于屏障环境中, 温度 20~26 ℃, 湿度 40%~70%, 光照 12 h 明暗交替。

收稿日期: 2014-12-15

作者简介: 王恩力(1983—), 男, 陕西汉中, 研究生在读, 研究方向为新药药理。Tel: 13864947620 E-mail: 13864947620@163.com

*通信作者 刘 铮(1959—), 男, 辽宁沈阳人, 教授, 主要从事药理学和毒理学教学及研究工作。Tel: (024)23986283 E-mail: liu306608@sohu.com

网络出版时间: 2015-03-09 15:34 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1409.R.20150309.1534.005.html>

1.2 药物与试剂

连翘苷元(质量分数 98.6%), 山东新时代药业提供; 水飞蓟宾葡甲胺片(Silibin), 湖南千金协力药业有限公司; BSA、弗氏不完全佐剂, Sigma 公司; 羟脯氨酸(Hyp)试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 透明质酸(HA)、层黏蛋白(LN)、III型前胶原(PCIII)、IV型胶原(IV-C) Elisa 试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司; 总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)测试盒, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司。

1.3 仪器

BS200 全自动生化分析仪, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; MK3 GO 酶标仪, 美国赛默飞世尔科技公司; TG16-WS 高速离心机, 长沙维尔康湘鹰离心机有限公司; BS124 Sartorius 精密电子天平, 赛多利斯科学仪器北京有限公司; Olympus 显微镜。

2 方法

2.1 大鼠免疫性肝纤维化模型的制备

参考文献方法^[5-6], 选取健康雄性 Wisatr 大鼠 90 只, 留取 10 只作为正常对照, 其余大鼠均多点 sc 9 mg/mL BSA 弗氏不完全佐剂乳剂, 每次 0.5 mL, 连续注射 5 次致敏, 前 2 次注射间隔 2 周, 后 3 次间隔 1 周。末次致敏后第 10 天, 大鼠眼眶静脉丛采血检测抗体, 取 BSA 抗体阳性大鼠尾静脉攻击注射 BSA 生理盐水溶液, 每次 0.4 mL, 每周 2 次, 剂量由每次 2.0 mg 递增至 3.0 mg, 以后每次增加 0.2 mg, 直至 4 mg, 共攻击注射 16 次。正常对照组用生理盐水代替 BSA。

2.2 动物分组及给药

80 只造模大鼠共有 76 只 BSA 抗体呈阳性, BSA 生理盐水攻击注射后, 大鼠出现不同程度的抽搐、俯卧、呼吸急促等过敏反应, 其中 6 只大鼠症状严重死亡。剩余 70 只大鼠按照体质量分为模型组、连翘苷元低、中、高剂量(0.1、0.3、1.0 mg/kg)组和阳性对照水飞蓟宾葡甲胺组(50 mg/kg), 每组 14 只。分组后即刻开始给药, 除阳性对照组按照 10 mL/kg ig 给药外, 其他各组均按照 2 mL/kg 体积 sc 给药, 每天给药 1 次, 连续给药直至造模结束后 2 周。正常对照组和模型组给予生理盐水; 连翘苷元组给予连翘苷元注射液; 阳性对照组给予水飞蓟宾葡甲胺。

2.3 指标测定

给药结束后动物禁食不禁水 12~16 h, ip 50 mg/kg 戊巴比妥钠溶液麻醉, 腹主动脉取血, 3 500 r/min 离心 10 min, 分离上层血清用全自动生化分析仪检测血清 AST、ALT、TP、ALB 的量, 用 Elisa 试剂盒检测血清 HA、LN、PCIII、IV-C 水平; 放血处死大鼠, 迅速摘取肝脏, 称质量后剪取 0.5 g 肝组织, 按照试剂盒说明书检测 Hyp; 摘取肝脏左叶放入 10% 中性甲醛中固定, 常规取材、脱水, HE 染色, 显微镜下观察肝脏纤维化程度, 根据纤维结缔组织的纤维化程度将其分为 0~4 级。0 级: 无纤维化; 1 级: 纤维结缔组织仅局限于汇管区或汇管区有扩大, 有向小叶发展的倾向; 2 级: 纤维结缔组织增生明显, 超过小叶的 2/3 并伴有 1 级改变; 3 级: 纤维结缔组织进入肝小叶中央静脉周围; 4 级: 纤维结缔组织在全小叶呈多处弥漫性增生, 有假小叶形成, 并有 3 级改变。

2.4 统计处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 软件进行分析, 组间比较采用 ANOVA 统计学检验。

3 结果

3.1 连翘苷元对免疫性肝纤维大鼠血清蛋白和转氨酶的影响

表 1 结果显示, 与对照组相比, 模型组血清 TP、ALB 水平未见明显降低, ALT、AST 也未见明显升高; 与模型组相比, 连翘苷元组和水飞蓟宾葡甲胺组上述指标也未见显著差异。

3.2 连翘苷元对免疫性肝纤维化大鼠肝脏 Hyp 含量的影响

与对照组相比, 模型组肝脏 Hyp 水平显著升高 ($P < 0.01$), 肝纤维化模型成功; 与模型组比较, 连翘苷元 0.1 mg/kg 即能显著降低肝脏组织 Hyp 水平 ($P < 0.05$), 0.3、1.0 mg/kg 剂量组降低更为显著 ($P < 0.01$), 降低程度与剂量呈正相关, 水飞蓟宾葡甲胺也能显著降低肝脏 Hyp 水平 ($P < 0.01$), 见表 2。

3.3 连翘苷元对免疫性肝纤维化大鼠血清 HA、LN、PCIII、IV-C 水平的影响

表 2 结果显示, 与对照组相比, 模型组血清 HA、LN、PCIII、IV-C 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 连翘苷元 0.1、0.3、1.0 mg/kg 剂量组均能显著降低血清 HA、LN、PCIII、IV-C 水平 ($P < 0.01$), 降低程度与剂量呈正相关, 阳性药水飞蓟宾葡甲胺亦有类似作用。

表1 连翘苷元对免疫性肝纤维化大鼠血清TP、ALB、ALT和AST的影响($\bar{x} \pm s$)Table 1 Effect of forsythiaside on levels of TP, ALB, ALT, and AST in rats with immunological hepatic fibrosis induced by BSA ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照	10	—	46.88±2.67	30.40±1.69	56.67±10.52	80.35±22.71
模型	14	—	45.29±2.74	30.92±1.30	59.77±20.39	89.85±25.81
连翘苷元	14	0.1	47.20±2.11	28.97±5.09	50.91±15.85	87.25±21.40
	14	0.3	47.49±2.92	30.58±1.08	49.45±9.00	82.00±9.53
	14	1.0	47.73±3.11	30.48±1.41	49.17±10.99	83.33±15.01
水飞蓟宾葡甲胺	14	50	47.67±2.48	30.78±1.27	48.17±9.76	81.75±14.70

表2 连翘苷元对免疫性肝纤维化大鼠Hyp、HA、LN、PCⅢ和IV-C水平的影响($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of forsythiaside on contents of Hyp, HA, LN, PCⅢ, and IV-C in rats with immunological hepatic fibrosis induced by BSA ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Hyp/(mg·kg ⁻¹)	HA/(μg·L ⁻¹)	LN/(μg·L ⁻¹)	PCⅢ/(μg·L ⁻¹)	IV-C/(μg·L ⁻¹)
对照	10	—	0.540	23.6±1.4	101.2±6.4	28.0±5.5	33.6±2.5
模型	14	—	0.896 ^{##}	73.1±5.5 ^{##}	298.7±11.1 ^{##}	67.6±6.7 ^{##}	61.0±7.0 ^{##}
连翘苷元	14	0.1	0.800 [*]	61.6±5.6 ^{**}	250.0±26.3 ^{**}	55.5±3.4 ^{**}	52.5±3.9 ^{**}
	14	0.3	0.719 ^{**}	52.4±5.0 ^{**}	216.0±15.1 ^{**}	50.9±1.7 ^{**}	46.4±5.1 ^{**}
	14	1.0	0.627 ^{**}	38.8±5.3 ^{**}	189.1±7.7 ^{**}	45.2±1.8 ^{**}	38.8±5.3 ^{**}
水飞蓟宾葡甲胺	14	50	0.691 ^{**}	45.4±5.8 ^{**}	210.5±19.0 ^{**}	52.0±2.7 ^{**}	45.4±5.8 ^{**}

与对照组比较: ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01 vs model group

3.4 连翘苷元对免疫性肝纤维化大鼠肝脏质量和系数的影响

表3结果显示,与对照组相比,模型组大鼠肝脏湿质量升高(*P*<0.05),脏器系数提升(*P*<0.01);与模型组相比,连翘苷元能够降低大鼠肝脏质量,1.0 mg/kg 剂量组差异有统计学意义(*P*<0.05);能够降低脏器系数,0.3、1.0 mg/kg 剂量组差异显著(*P*<0.01);阳性药水飞蓟宾葡甲胺亦能够降低大鼠肝脏湿质量(*P*<0.05)和系数(*P*<0.01)。

3.5 连翘苷元对免疫性肝纤维化大鼠肝脏病理变化的影响

对照组大鼠肝小叶结构完整,肝细胞未见明显水肿、变性、坏死,肝组织未见明显肝纤维化;模型组动物肝脏肝小叶内可见新生肝细胞,间质见纤维组织广泛性增生,新生毛细胆管细胞纤维化严重,纤维结缔组织增生并进入肝小叶中央静脉周围。与模型组相比,连翘苷元组肝纤维化程度有所减轻,减轻程度与剂量正相关,水飞蓟宾葡甲胺亦能减轻大鼠肝脏的纤维化程度。肝纤维化程度分级结果见表4,显微图片见图1。

表3 连翘苷元对免疫性肝纤维化大鼠肝脏湿质量和系数的影响($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of forsythiaside on weight and coefficients of rats with immunological hepatic fibrosis induced by BSA ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝脏质量/g	肝脏系数/(g·kg ⁻¹)
对照	10	—	12.11±5.1	0.27±0.04
模型	14	—	18.44±6.5 [#]	0.38±0.04 ^{##}
连翘苷元	14	0.1	16.96±5.9	0.36±0.04
	14	0.3	15.24±5.3	0.33±0.02 ^{**}
	14	1.0	13.46±3.9 [*]	0.31±0.05 ^{**}
水飞蓟宾葡甲胺	14	50	14.97±5.7 [*]	0.32±0.02 ^{**}

与对照组比较: [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01[#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01 vs model group

4 讨论

肝纤维化是一种疾病状态,是各种慢性肝脏疾病发展为肝硬化的前期过程^[7]。对肝纤维化的有效治疗能够有效降低肝硬化的发病率,提高患者生活

表4 连翘苷元对免疫性肝纤维化大鼠肝纤维化的影响
Table 4 Effect of forsythiaside on hepatic fibrosis of rats with immunological hepatic fibrosis induced by BSA

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝纤维化程度/只				
		0	I	II	III	IV
对照	—	10	0	0	0	0
模型	—	0	3	5	6	0
连翘苷元	0.1	1	3	6	4	0
	0.3	2	4	5	3	0
	1.0	2	6	5	1	0
水飞蓟宾葡甲胺	50	2	5	5	2	0

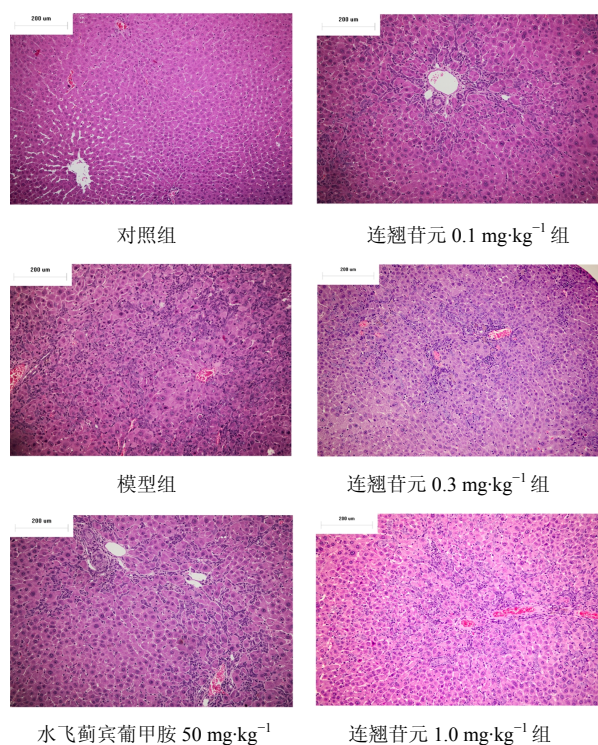


图1 连翘苷元对肝纤维化的影响

Fig. 1 Effects of forsythiaside on hepatic fibrosis

质量, 因此近年来对肝纤维化的研究受到越来越多学者的关注。异种血清诱导的免疫性肝纤维化模型是研究肝纤维化治疗药物的重要筛选工具, 其主要发病机制类似于III过敏反应, 与临床病毒性肝炎引起的肝纤维化类似, 与化学性肝纤维化模型相比较, 该模型与人类肝纤维化的病理机制更为接近^[8], 而且肝纤维化形成稳定, 肝细胞受损较轻, 动物总体状态良好, 有利于进行长期的研究。

血清 HA、LN、PCIII、IV-C “肝纤四项” 是临

床上理想的诊断慢性肝病患者病情发展情况和治疗效果以及衡量炎症活动度、纤维化程度的重要血清学指标, 它们在血清中的水平伴随炎症及其肝纤维化的进展存在逐渐升高的趋势, 与肝纤维化的严重程度具有正相关性^[9]。在本实验中, 模型组动物“肝纤四项”显著升高, 伴随肝脏重量增加, Hyp 含量升高, 显微镜下可见明显的组织纤维化, 但血清 AST、ALT 未见明显升高, 这可能与可能与动物肝脏细胞受损较轻有关, 与文献报道相一致^[10]。肝纤维化大鼠给予连翘苷元治疗后能够显著减轻组织纤维化程度, 包括“肝纤四项”水平降低, 肝脏重量减轻, 组织纤维增生减少等, 结果表明, 连翘苷元对大鼠免疫性肝纤维化有较好的治疗作用。

参考文献

- [1] 王曙宾, 郑亚杰. 连翘提取物和连翘酯苷 A 原料中连翘酯苷 A 的稳定性研究 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 909-911.
- [2] Su B N, Zhu Q X, Gao K, *et al.* Ligand and Phenylpropanoid Glycosides from *Lancea tibetica* and Their Antitumor Activity [J]. *Planta Med*, 1999, 65: 558-561.
- [3] 赵晨阳, 邱 嵘, 郑荣梁. 呋喃萜呋喃木脂素的体外抗肿瘤活性 [J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2000, 36(4): 66-68.
- [4] 秦 宇, 张文丽, 林媛媛. 连翘化学成分与抗氧化活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 149-152.
- [5] 王慧明, 姜 溪, 陈芙蓉. 清肝化淤胶囊对大鼠免疫性肝纤维化的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1157-1159.
- [6] 邢 伟, 孔维涵, 方步武. 葛萼养阴软坚方对免疫性肝纤维化大鼠的治疗作用 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1667-1672.
- [7] 中华肝病学会. 肝纤维化诊断及疗效评估共识 [J]. 中华肝脏杂志, 2002, 10(5): 327.
- [8] Zhao X Y, Zeng X, Li X M, *et al.* Pirfenidone inhibits carbon tetrachloride and albumin complex-induced liver fibrosis in rodents by preventing activation of hepatic stellate cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(10): 963-968.
- [9] 孙 宇, 姜美凤. “肝纤四项”检测在肝纤维化诊断中的价值 [J]. 实用临床医药杂志, 2011, 15(7): 141.
- [10] Wang H, Wei W, Wang N P, *et al.* Effects of total glucosides of peonyon immunological hepatic fibrosis in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(14): 2124-2129.