



图 2 兔 ip 葛根素后视网膜组织的药物浓度-时间曲线

Fig 2 Concentration-time curve of puerarin in retinal tissue of rabbits after ip administration

了眼局部应用葛根素滴眼液房水中葛根素的药动学,笔者也曾通过 ip 葛根素,应用 HPLC 技术测定了兔眼房水中葛根素的药动学变化^[7]。本研究通过 ip 葛根素,应用 HPLC 技术对视网膜组织中葛根素的药动学进行研究,葛根素在视网膜组织中的药动学变化符合开放式二房室模型,2 h 达高峰,以后逐渐下降,但葛根素进入视网膜组织中的量较低,8 h 就降至 0.02 μg/mg,16 h 几乎测不到,消除较快。

本实验采用高氯酸和高速离心技术沉淀视网膜中的蛋白质,以甲醇-水-冰醋酸(35 65 0.2)为流动相,色谱柱为DiamondsilC₁₈不锈钢柱,在波长为 250 nm 紫外光下对兔视网膜中的葛根素含量进行了测定。结果表明,本方法具有特异、灵敏、快速等

优点,适用于对视网膜中葛根素含量的测定。本实验结果表明葛根素通过 ip 能透过血-视网膜屏障,进入视网膜组织,此结果为葛根素全身用药治疗眼底疾病提供了实验依据。

References

- [1] Ji Y B. *Pharmacology and Application of the Active Ingredients of Chinese Traditional Medicine* (中药有效成分药理与应用) [M]. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Publishing House, 1995.
- [2] Guo Y X, Wu H Q, Lui J Q. The current and future of puerarin to treat glaucoma [J]. *J Tradit Chin Ophthalmol* (中国中医眼科杂志), 2002, 24(6): 519-520.
- [3] Yang H Y, Zhou Y Q, Wu Z H, et al. puerarin eyedrops: action of reducing intraocular pressure and the concentration in aqueous humor [J]. *Recent Adv Ophthalmol* (眼科新进展), 1999, 19(2): 73-77.
- [4] Chen S L, Chen S B, Yang D J, et al. HPLC fingerprint analysis of *Radix Puerariae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(7): 661-663.
- [5] Guo Y R, Meng T P, Wei G, et al. Determination of puerarin in whole blood by HPLC [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2000, 20(6): 343-344.
- [6] Wu Z H, Zhu Y Q, Cheng G X, et al. Studies on pharmacokinetics of puerarin eyedrops [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 28(3): 221-224.
- [7] Deng X G, Hu S X, Zhang Q J, et al. Pharmacokinetic study of puerarin in aqueous humor of rabbits following intraperitoneal [J]. *Chin Ophthalmic Res* (眼科研究), 2003, 21(3): 258-260.

大蒜素对二甲基亚硝胺诱发的肝纤维化大鼠的保护作用

朱兰香¹, 陈卫昌¹, 许春芳¹, 刘世增², 顾振纶², 王响英^{3*}

(1. 苏州大学附属第一医院 消化科, 江苏 苏州 215006; 2. 苏州大学医学院 药理学系药理教研室, 江苏 苏州 215007; 3. 苏州大学 电镜室, 江苏 苏州 215007)

摘要: 目的 研究大蒜素对实验性肝纤维化大鼠的保护作用。方法 SD 大鼠随机分为 5 组: 正常对照组、模型组(给等量蒸馏水)、大蒜素(11、22 mg/kg)组、秋水仙碱(0.15 g/kg)组。二甲基亚硝胺(DMN)诱发大鼠肝纤维化模型, 各组在造模开始时 ig 给药, 实验共进行 42 d。腹主动脉取血, 制备血清, 进行肝功能、血脂、肝细胞病理学检查。结果 大蒜素各组均能明显降低实验性肝纤维化大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST) ($P < 0.05, 0.01$) 水平, 以大蒜素 22 mg/kg 组作用明显, 而秋水仙碱对肝功能没有明显的改善作用 ($P > 0.05$)。大蒜素均能明显降低血清甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)水平, 提高血清白蛋白(ALB)含量。病理学检查结果, 大蒜素组肝细胞的坏死、空泡变性、出血及脂肪沉积较模型组和秋水仙碱组明显减轻, 炎症细胞明显减少。电镜检查结果显示, 大蒜素 11 mg/kg 组肝细胞坏死、自溶较模型组明显减轻, 大蒜素 22 mg/kg 组肝细胞接近正常。结论 大蒜素对 DMN 所致肝损伤具有保护作用。

关键词: 大蒜素; 二甲基亚硝胺; 肝纤维化

中图分类号: R 286.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)12-1384-04

* 收稿日期: 2004-03-22

作者简介: 朱兰香(1963—), 女, 江苏人, 硕士学位, 副主任医师, 研究方向为肝纤维化的防治。

Tel: (0512) 62002430 E-mail: zhulanxiang@medmail.com.cn

Protective effect of garlicin on hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in ratsZHU Lan-xiang¹, CHEN Wei-chang¹, XU Chun-fang¹, LIU Shir-zeng²,
GU Zhen-lun², WANG Xiang-ying³

(1. Department of Digestive Diseases, Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, China;

2. Department of Pharmacology, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China;

3. Department of Electronic Microscope, Suzhou University, Suzhou 215007, China)

Abstract **Object** To investigate the effect of garlicin on dimethylnitrosamine (DMN)-induced hepatic fibrosis in rats **Methods** SD rats were randomly divided into five groups: normal group, model group, garlicin (11, 22 mg/kg) groups, and colchicine (0.15 g/kg) group. Except for normal group, rats in other four groups were given DMN by ip to induce hepatic fibrosis. Rats in all groups were given corresponding drugs by ig, and the treatment was consecutively carried out for 42 d. After the last time of treatment, the celiac arterial blood of all rats were taken. The serum liver function test, albumin, TG, and TC, pathobiological examination of hepatic cells were analyzed **Results** In the groups treated with garlicin, the serum levels of ALT and AST were reduced. Albumin was increased significantly ($P < 0.01$, 0.05). Garlicin 22 mg/kg group has the most significant effect on ALT and AST. But the colchicine did not show any beneficial effect on liver functions ($P > 0.05$). TG and TC were decreased in garlicin groups. The pathobiological examination showed that the necrosis, vacular degeneration, hemorrhagic, and accumulation of TG in the liver of garlicin groups were less severe than that in the model group and colchicine group. Electronic microscope examination showed that in garlicin 11 mg/kg group the liver necrosis and isophagy were less severe than that in the model group. The hepatic cells in garlicin 22 mg/kg group were as normal as that in negative control group. **Conclusion** It is suggested that garlicin have protective effect on hepatic fibrosis induced by DMN in rats

Key words: garlicin; dimethylnitrosamine (DMN); hepatic fibrosis

慢性肝损伤或急性肝损伤反复发作是肝纤维化的前提。大蒜素是一种含硫化合物,近年研究已经进一步揭示其能抑制脂质过氧化物对膜结构的损害,目前已有研究显示大蒜素对乙醇、四氯化碳诱发的肝损伤及免疫性肝损伤具有保护作用。前期研究表明大蒜素对二甲基亚硝胺(DMN)致大鼠肝纤维化具有防治作用^[1],本研究通过其对肝纤维化模型大鼠肝功能和肝细胞病理学影响,观察大蒜素作为抗氧化剂对DMN所致肝损伤的防治作用。

1 材料与方法

1.1 动物:SD大鼠,雌雄兼用,体重200~260 g,由苏州大学实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂:大蒜素微粒(含大蒜素10.4%),江苏省靖江制药厂提供,批号20010112。秋水仙碱,昆明制药股份有限公司,批号980732,规格:每片0.5 mg。二甲基亚硝胺(DMN),上海开明化学厂生产,化学纯,批号01610720。血清甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLOB)、乳酸脱氢酶(LDH)、总胆红素(TB)、直接胆红素(DB)、间接胆红素(B)试剂盒均由日本一化公司提供。

1.3 仪器:LXT—II型离心机,上海医用分析仪器厂;全血动生化分析仪,日本Olympus公司提供;CH—B145—T—2光学显微镜,日本Olympus公司产品;CH600 HITACHI透射电子显微镜,日本。

1.4 方法

1.4.1 肝纤维化模型建立、分组及给药:大鼠随机分为5组,正常组6只,其余各组8只,雌雄各半,分别为正常组、模型组(给等量蒸馏水)、大蒜素(11、22 mg/kg)组、秋水仙碱(0.15 g/kg)组。生理盐水将DMN配成0.5%溶液,除正常组外,其余各组大鼠ip DMN溶液,每次10 mg/kg (2 mL/kg),第1周每天1次,连续3 d,第2~4周每周各1次,第5~6周均每天1次,连续2 d,共10次,42 d。各组在造模开始同时ig给药,每次10 mL/kg,每天1次,持续42 d。实验结束用3%戊巴比妥钠ip (45 mg/kg)麻醉动物,腹主动脉取血制备血清,−30℃冰箱保存待检。采血后取肝脏称质量,并取左叶肝脏置10%福尔马林溶液中固定备用。

1.4.2 生化指标检测:AST、ALT、TG、TC采用液体双试剂法;TP和ALB测定分别用双缩脲法、溴甲酚绿法。LDH、TB、DB、B等指标均严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4.3 肝病理组织学观察:大鼠肝脏用 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,加苏木素染 4 min,加盐酸乙醇分化,温水蓝化,用伊红浸染,然后乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封固。

1.4.4 超微结构观察:实验结束,在各组中随机取 1~2 只动物的左叶肝脏切片后,以 2.5% 戊二醛固定,1% 锇酸固定,常规乙醇脱水,LR White 渗透包埋,超薄切片,铀铅双染,电镜观察肝超微结构的改变,摄影,拍照。

1.4.5 统计学处理:实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 对血清肝功能指标影响:模型组血清 AST 和 ALT 活性明显增加,分别为正常对照组的 1.67 倍 ($P < 0.01$) 和 1.5 倍 ($P < 0.01$),大蒜素 11、22 mg/kg 可使血清 AST 和 ALT 活性显著降低 ($P < 0.01$),而秋水仙碱无显著降低 AST、ALT 活性的作用 ($P > 0.05$)。各组 LDH、TB、DB、B 未见明显差异。提示大蒜素可显著抑制 DMN 所致肝功能异常。实验结果见表 1。

2.2 对 TP、ALB、ALB/GLOB 比例的影响:模型

表 2 大蒜素对肝纤维化模型大鼠血清蛋白合成的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of garlicin on protein synthesis in serum of hepatic fibrosis model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	ALB/GLOB
正常	-	6	62.32 ± 6.92	22.32 ± 1.094*	0.55 ± 0.051
模型	-	8	58.10 ± 8.31	18.36 ± 3.315	0.45 ± 0.052
秋水仙碱	150	8	57.05 ± 3.95	19.51 ± 3.420	0.46 ± 0.061
大蒜素	11	8	61.37 ± 5.92	21.21 ± 2.089*	0.52 ± 0.050
	22	8	61.08 ± 5.92	20.63 ± 1.125*	0.52 ± 0.048

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

表 3 大蒜素对肝纤维化模型大鼠血清

TG 和 TC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of garlicin on TG and TC levels in serum of hepatic fibrosis model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
正常	-	6	0.254 ± 0.085*	1.102 ± 0.209*
模型	-	8	2.081 ± 0.485	3.425 ± 1.276
秋水仙碱	150	8	0.605 ± 0.142 [#]	1.376 ± 0.347*
大蒜素	11	8	0.578 ± 0.123*	1.242 ± 0.378*
	22	8	0.584 ± 0.125*	0.970 ± 0.254**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ [#] $P < 0.05$ (单侧)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ [#] $P < 0.05$ (single) vs model group

2.4 对肝组织的影响:肝组织 HE 染色光镜显示:正常组,肝小叶内肝细胞呈单行放射状排列在中央静脉周围,小叶周围可见汇管区围绕。模型组肝组织

表 1 大蒜素对肝纤维化模型大鼠血清

AST 和 ALT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of garlicin on AST and ALT activities in serum of hepatic fibrosis model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)
正常	-	6	37.83 ± 4.17**	102.21 ± 51.08*
模型	-	8	63.25 ± 16.85	153.37 ± 31.08
秋水仙碱	150	8	50.00 ± 8.90	126.25 ± 15.96
大蒜素	11	8	31.84 ± 3.12**	101.42 ± 30.96*
	22	8	32.56 ± 2.49**	103.13 ± 30.18*

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

组血清 TP 和 ALB/GLOB 与正常组和治疗组比较差异无显著性 ($P > 0.05$),而 ALB 合成较正常组明显降低 ($P < 0.05$),大蒜素组均可提高血清 ALB 水平,与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$),秋水仙碱组 ALB 水平及 ALB/GLOB 与模型组比较未见显著意义。结果见表 2。

2.3 对血脂的影响:模型组血清 TG、TC 含量较正常组显著增加 ($P < 0.05$),大蒜素组与模型组比较显著下降 ($P < 0.05, 0.01$),秋水仙碱组与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$, 单侧),见表 3。

失去正常肝小叶结构,结缔组织增生,假小叶形成。可见肝细胞肿大,颗粒样变性,片状肝细胞坏死,表明肝纤维化形成。秋水仙碱组,肝组织细胞大而圆,失去多角形外观,细胞变性,在肝细胞之间有炎性细胞浸润,但纤维化明显减轻。大蒜素 11 mg/kg 组,肝细胞仅见轻度变性,纤维化明显减轻;大蒜素 22 mg/kg 组未见肝细胞变性,肝细胞形态接近正常组。

2.5 对肝组织超微结构的影响:正常组,肝细胞呈多角形,双核或单核,核圆形,位居中央,核仁常为 1~2 个,胞质中有各种细胞器,线粒体呈杆状或椭圆形,基质较暗,嵴清晰,粗面内质网呈平行状排列,核糖体正常,滑面内质网呈束泡状,其他细胞器如溶酶体、微粒体、高尔基复合体等正常分布,细胞间连接明显。模型组,肝细胞核呈异形核变明显,呈锯齿

状、哑铃状,核仁常边集,胞浆中可见片状或块状不规则空泡变性、坏死,线粒体大小不一,粗面内质网扩张,表明肝纤维化形成。秋水仙碱组,肝细胞外形不规则,核形规则,光面内质网增生,可见空泡样变性。大蒜素组,肝脏结构基本接近正常,线粒体发达,未见明显肝细胞坏死。

3 讨论

前期研究表明大蒜素对DMN致大鼠肝纤维化具有防治作用^[1],秋水仙碱作为抗肝纤维化阳性对照药物已得到国内外一致认可,本研究以秋水仙碱为对照,进一步研究大蒜素对肝纤维化模型大鼠肝功能和肝细胞病理学的影响,观察大蒜素作为抗氧化剂对DMN所致肝损伤的防治作用。

DMN是一种具有肝毒性的化学制剂^[2],目前用DMN ip制备急性肝损伤、肝纤维化模型,是国内外一致认可较为理想的制备动物模型的方法^[3]。ip DMN后7d开始出现中央小叶肝细胞纤维化和出血坏死,14d可见中性粒细胞浸润,伴随肝细胞脂肪变性、胆管增生、桥样坏死并可观察到肝纤维化在中央静脉周围形成^[4]。本实验光镜及电镜结果均表明模型组肝纤维化已经形成。研究表明DMN在肝纤维化动物模型中对肝细胞损伤作用与脂质过氧化有关^[5]。大蒜素能明显增强还原型谷胱甘肽(GSH)及其相关酶活性确保GSH氧化还原过程顺利进行,加速对肝内毒物的代谢和灭活^[6]。大蒜素作为抗氧化剂,其抗化学毒物致肝损伤机制主要在于其抗氧化活性而抑制脂质过氧化物对膜结构的损伤。

肝细胞坏死几乎是各型肝炎硬化形成的基本因素,肝细胞坏死为点状或灶状时则通过肝细胞再生而迅速修复,如反复的点状、灶状坏死,纤维增生则变得活跃,坏死为带状或大块时,由于网状支架塌陷,网状纤维互相聚集,黏合形成胶原纤维。本实验模型组大鼠肝脏切片光镜、电镜下均提示肝细胞内和细胞间大量脂滴沉积,肝细胞脂肪变性,肝细胞之间见炎性细胞浸润。大蒜素可使DMN所致肝细胞脂肪样变性、炎症、坏死明显减轻,生化检查表明其使AST、ALT活性降低,TG、TC含量减少,肝ALB合成增加,表示肝细胞再生和合成功能进一步加强。由此可见,大蒜素较秋水仙碱具有较好的肝脏保护作用,可以阻止肝纤维化的进一步发展,对肝纤维化的防治起积极作用。

References

- [1] Zhu L X, Cheng W C, Liu S Z, et al. Studies on effect of garlicin on experimental liver fibrosis rats [J]. *Chin J Dig* (中华消化杂志), 2003, 23(7): 441-443.
- [2] Huang J A, Ding H. Effect of allitridin on ethanol-induced hepatotoxicity in mice [J]. *World Chin J Dig* (世界华人消化杂志), 1999, 7(5): 427-428.
- [3] George J, Chandrakasan G. Biochemical abnormalities during the progression of hepatic fibrosis induced by DMN [J]. *Clin Biochem*, 2000, 33(7): 563-570.
- [4] George J, Rao K R, Stern R, et al. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats the early disposition [J]. *Toxicology*, 2001, 156(2): 129-138.
- [5] Chen Q X, Wang S H, Xu Y C. The effects of DMN on lipid peroxidation in rats [J]. *Cancer* (癌症), 1997, 16(5): 338-340.
- [6] Wang H, Peng R X, Kong R. Effect of allicin on ethanol-induced hepatotoxicity in mice [J]. *J Hyg Res* (卫生研究), 1998, 27(6): 415-416.

青龙衣提取物对荷瘤小鼠细胞膜流动性的影响

季宇彬, 马宏图*

(哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 探讨青龙衣提取物对S₁₈₀和H₂₂荷瘤小鼠细胞膜脂流动性的影响。方法 选取S₁₈₀和H₂₂作为瘤株,于正常小鼠腋下接种S₁₈₀瘤液,腹腔接种H₂₂瘤液,荷瘤小鼠分别每天ip青龙衣冷醇提取物(191.37、95.68、47.84 mg/kg)、热醇提取物(121.17、60.58、30.29 mg/kg)、环磷酰胺(20 mg/kg,为阳性对照)、生理盐水(阴性对照),给药7d后处死小鼠,制备肿瘤细胞和红细胞悬液。以1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)为探针剂,用荧光偏振法测定荧光偏振度(P)值和微黏度(η),观察青龙衣提取物对细胞膜脂流动性的影响。结果 青龙衣冷醇、热醇提取物均能使S₁₈₀小鼠的肿瘤细胞膜流动性提高,使H₂₂小鼠的肿瘤细胞膜流动性降低,与生理盐水组比较,两种提取物均能降低H₂₂小鼠红细胞膜流动性(P<0.05)。结论 青龙衣提取物可能通过对肿瘤细胞膜的影响起到抑瘤作用,而对维持红细胞膜的稳定性起积极作用。

* 收稿日期: 2004-04-01

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目

作者简介: 季宇彬(1956—),男,博士,教授,博士生导师,多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究。