

羟基积雪草苷对小鼠急性肝损伤的保护作用

李洪忠¹, 万敬员^{1*}, 张 力², 罗福玲¹, 章 卓¹, 周岐新¹

(1. 重庆医科大学 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学基础医学院 病理生理教研室, 重庆 400016)

摘要:目的 研究羟基积雪草苷对小鼠急性肝损伤的保护作用及其初步机制。方法 建立四氯化碳(CCl₄)诱导的小鼠急性肝损伤模型,检测羟基积雪草苷(3、10、30 mg/kg)对血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)以及肝组织一氧化氮(NO)的影响;Western-blotting检测肝组织中诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)、环氧合酶-2(COX-2)蛋白的表达,并取部分肝组织进行HE染色,观察病理学改变。结果 羟基积雪草苷明显降低急性肝损伤小鼠血清中ALT、AST活性及肝组织中NO的量,抑制肝组织中iNOS、COX-2蛋白的表达,病理切片显示羟基积雪草苷组病变程度远较模型组为轻。结论 羟基积雪草苷具有一定的肝保护作用,其机制可能与其抗炎作用有关。

关键词:羟基积雪草苷;急性肝损伤;一氧化氮;环氧合酶2

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)10-1525-03

Protection of madecassoside on mice with acute liver injury and its mechanism

LI Hong-zhong¹, WAN Jing-yuan¹, ZHANG Li², LUO Fu-ling¹, ZHANG Zhuo¹, ZHOU Qi-xin¹

(1. Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences,

Chongqing 400016, China; 2. Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine,

Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To discuss the protective effect and mechanism of madecassoside on mice with acute liver injury induced by CCl₄. **Methods** Mice models of acute liver injury were provided with madecassoside at different doses (3, 10, and 30 mg/kg) separately. Serum function indexes including alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), and contents of NO in liver tissue were measured according to the instruction of test kits. Western blotting was used for the analysis of protein expression of induced nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) in liver tissue. Some liver tissues were dyed with HE and histopathological changes in liver were observed under light microscope. **Results** The levels of ALT and AST in serum and the content of NO in liver tissue were reduced significantly by madecassoside in mice with acute liver injury. Meanwhile, the protein expression of iNOS and COX-2 in liver tissue was also inhibited by madecassoside with histopathological changes of liver more improved than that in model group. **Conclusion** Madecassoside is effective in amelioration of CCl₄-induced hepatotoxicity. The effect may be due to its antiinflammatory activity associated with less increase in hepatic iNOS and COX-2 protein content.

Key words: Madecassoside; acute liver injury; nitric oxide (NO); cyclooxygenase-2 (COX-2)

积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 为伞形科积雪草属植物,全草入药,性寒,味苦、辛,具有清热利湿,解毒消肿之功效。临床多用于湿热黄疸、癰肿疮毒、跌打损伤、传染性肝炎、皮肤病、流行性脑脊髓膜炎等。羟基积雪草苷为三萜类化合物,是积雪草主要活性成分之一^[1]。另有研究报道,含有羟基积雪草苷的积雪草总苷对二甲基亚硝基诱导的大鼠慢性肝纤维化具有良好的治疗作用^[2],这些提示羟基积雪草苷存在着一定的肝保护作用。本实验通过 CCl₄诱

导小鼠急性肝损伤,观察羟基积雪草苷对急性肝损伤的作用,并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、NO测定试剂盒为南京建成生物工程研究所产品;CCl₄为上海新中化学试剂厂产品,临用前用花生油稀释;羟基积雪草苷(质量分数95%,批号20060127),由广西昌洲天然植物开发有限公司提供;BCA蛋白定量试剂盒购自

收稿日期:2007-12-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500463)

作者简介:李洪忠(1982—),男,硕士研究生。Tel: (023) 68485038 E-mail: sdtalhz3166@yahoo.com.cn

* 通讯作者 万敬员 Tel: (023) 68485038 Fax: (023) 86134172 E-mail: jywan@cqmu.edu.cn

Pierce 公司;诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS)、环氧合酶 2 (COX-2) 抗体,购自 Abcam 公司。

1.2 动物:清洁级 BALB/c 小鼠,重庆医科大学实验动物中心提供。

1.3 实验分组及造模方法^[3]:健康小鼠 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组:对照组,模型组,羟基积雪草苷大、中、小剂量组 (30、10、3 mg/kg),每组 10 只。对照组与模型组给予等体积生理盐水,药物组 ig 对应剂量药物,连续给药 3 d。第 3 天,ig 1 h 后,除对照组 ip 橄榄油 5 mL/kg 外,其余各组 ip 0.5% CCl₄油溶液 5 mL/kg,禁食,24 h 后麻醉小鼠,眼球取血,离心取血清,按照试剂盒说明书测定 ALT、AST 活性。处死小鼠后取肝脏左叶 10% 甲醛固定,脱水、脱钙后石蜡包埋切片,HE 染色。取中叶和右叶肝组织 -80 ℃ 冰冻保存,留做 Western-blotting 及 NO 测定,NO 的测定按照试剂盒要求进行。

1.4 免疫印迹法检测肝组织中 iNOS、COX-2 蛋白表达:取小鼠肝组织,称质量,研磨后裂解细胞提取蛋白,BCA 法蛋白定量。取 50 μg 蛋白上样,SDS-PAGE 电泳后,转移至硝酸纤维素膜上,室温下封闭 1 h;加入一抗 4 ℃ 冰箱封闭过夜;次日脱洗 3 次,二抗孵育 1 h,再脱洗 5 次后,ECL 显色,X 光片曝光,洗片。

1.5 统计学处理:各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST 活性测定:结果见表 1。模型组 ALT、AST 活性明显高于对照组,而羟基积雪草苷组可明显降低 CCl₄引起的 ALT、AST 活性升高,且具有一定的剂量依赖性。

表 1 羟基积雪草苷对小鼠急性肝损伤血清 ALT 和 AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

Table 1 Effect of madecassoside on activity of ALT and AST in serum of mice with acute liver injury ($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照	—	12.4 ± 5.4	13.3 ± 3.9
模型	—	97.1 ± 16.4**	90.8 ± 15.2**
羟基积雪草苷	3	79.2 ± 17.3*	67.1 ± 13.2**
	10	74.5 ± 15.6**	59.4 ± 12.8**
	30	50.4 ± 16.3**	43.2 ± 16.5**

与对照组比较: ***P* < 0.01

与模型组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

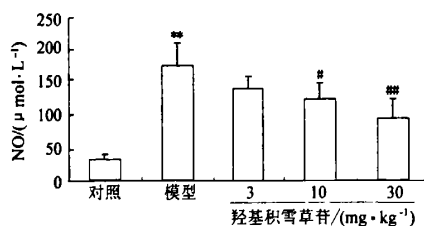
**P* < 0.01 vs control group

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

2.2 肝组织中 NO 量的测定:结果见图 1。模型组 NO 量远高于对照组,而羟基积雪草苷 30 mg/kg

组、10 mg/kg 组可显著降低急性肝损伤产生的过量 NO (*P* < 0.01, 0.05); 3 mg/kg 组 NO 平均值低于模型组,但无统计学意义。

2.3 羟基积雪草苷对肝组织中 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响:模型组 iNOS、COX-2 蛋白表达明显高于对照组,而羟基积雪草苷可显著降低急性肝损伤中 iNOS、COX-2 蛋白的过量表达,并呈现出一定的剂量依赖关系。见图 2。



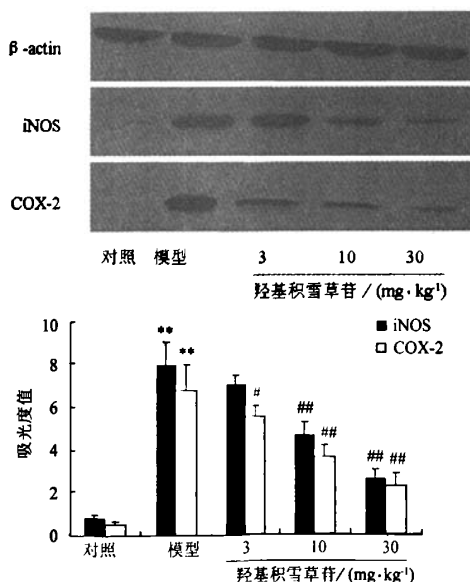
与对照组比较: ***P* < 0.01

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

图 1 羟基积雪草苷对急性肝损伤小鼠肝组织 NO 的影响
Fig. 1 Effect of madecassoside on level of NO in liver tissue of mice with acute liver injury



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

图 2 羟基积雪草苷对急性肝损伤小鼠肝组织中 iNOS、COX-2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of madecassoside on expression of iNOS and COX-2 protein in liver tissue of mice with acute liver injury

2.4 病理学检查结果:对照组小鼠光镜下肝小叶结构完整,肝细胞索排列整齐,以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞核大而圆,位于肝细胞中央。模型组小鼠肝小叶失去正常结构,肝细胞普遍变性坏

死,浑浊肿胀,胞浆疏松,并可见大量炎性细胞浸润。羟基积雪草苷组肝细胞仍有部分变性坏死,且有少量中性粒细胞浸润,但病变程度远比模型组轻。结果见图3。

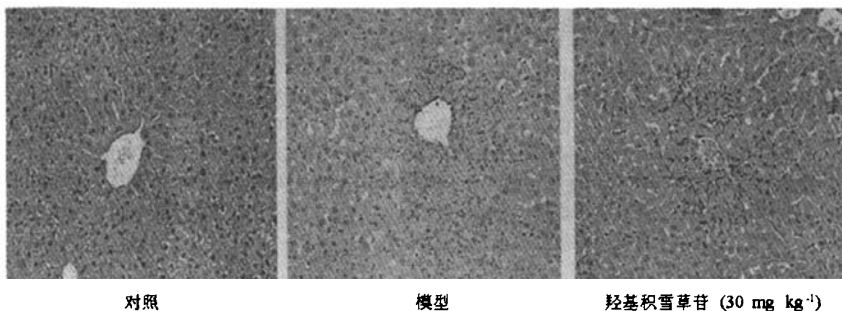


图3 羟基积雪草苷对 CCl₄损伤小鼠肝组织病理形态改变的影响

Fig. 3 Effect of madecassoside on hepatic histopathological changes of mice with liver injury induced by CCl₄

3 讨论

CCl₄导致的急性肝损伤是经典模型之一,被广泛用于肝炎药物的研发。CCl₄导致肝损伤引起脂质过氧化而导致细胞膜、细胞器损伤,并引起 ALT、AST 溢出至血液,使血清中 ALT 与 AST 活性升高^[4]。本实验显示羟基积雪草苷明显抑制 CCl₄引起的 ALT、AST 活性升高,减轻了肝损伤的程度,对肝组织起到了较好的保护作用。

NO 在调节血管及炎症反应等生理进程中起着重要作用,在很多炎症及自身免疫性疾病中都存在过量表达^[5]。在急性肝损伤中过量表达的 NO 可通过抑制肝细胞线粒体的呼吸、蛋白质的合成、干扰细胞代谢等途径损伤肝组织。NO 的合成依赖 NO 合成酶家族,其中 iNOS 在炎症及自身防御体系中起着关键的调节作用,其不断表达直接导致 NO 的过量产生,从而参与炎症进程^[6,7]。本实验表明羟基积雪草苷明显抑制肝组织中 iNOS 表达,减少 NO 生成。

COX-2 在炎症过程中起着重要作用,可被内毒素、有丝分裂原、细胞因子等诱导表达。在 CCl₄所致急性肝损伤中,炎症反应被激活,包括 COX-2 在内的各种炎症因子大量生成,导致肝细胞进一步坏死,加重了肝损伤程度。而且有报道,COX-2 选择性抑制剂可明显减轻 CCl₄引起的肝损伤,这也为肝损伤的治疗提供了新的思路^[8]。本实验中羟基积雪草苷能明显抑制肝组织中 COX-2 的表达,这也可能是

其肝保护作用的主要机制之一。

积雪草在我国长江以南地区广泛生长,研究其有效成分的药理作用将对我国传统中药的开发和利用提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 张蕾磊,王海生,姚庆强,等. 积雪草化学成分研究 [J]. 中草药, 2005, 36(12): 1761-1763.
- [2] 明志君,刘世增,曹 莉,等. 积雪草总苷抗 DMN 诱导大鼠肝纤维化的作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24: 731-734.
- [3] Rao P S, Mangipudy R S, Mehendale H M. Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl₄ hepatotoxicity: a novel dose-response [J]. *Toxicology*, 1997, 118: 181-193.
- [4] Lee T Y, Mai L M, Wang G J, et al. Protective mechanism of salvia miltiorrhiza on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats [J]. *J Pharmacol Sci*, 2003, 91: 202-210.
- [5] Clancy R M, Amin A R, Abramson S B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity [J]. *Arthritis Rheum*, 1998, 41: 1141-1151.
- [6] Zhu W, Fung P C. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl₄-induced acute liver injury of mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29: 870-880.
- [7] Al-Shabanah O A, Alam K, Nagi M N, et al. Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice [J]. *Life Sci*, 2000, 66: 265-270.
- [8] Begay C K, Jay Gandolfi A. Late administration of COX-2 inhibitors minimize hepatic necrosis in chloroform induced liver injury [J]. *Toxicology*, 2003, 185: 79-87.