

贝母辛抗大鼠肝纤维化的作用研究

刘 珺¹, 徐选福², 郭传勇², 刘小雨¹, 王 昀¹

1. 同济大学附属第十人民医院 中医科, 上海 200072

2. 同济大学附属第十人民医院 肝病科, 上海 200072

摘 要: **目的** 观察贝母辛对四氯化碳(CCl₄)致大鼠肝纤维化的保护作用。**方法** 实验设对照组, 模型组, 贝母辛低、中、高剂量(2.5、5、10 mg/kg)组。除对照组外, 其他组大鼠每隔3天ip给予CCl₄ 1次, 连续8周, 贝母辛各组于造模第4周开始给药, 每天1次, 给药至造模结束后4周。通过观察肝纤维化大鼠肝组织病理学变化, 血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转氨酶(GGT)、透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、III型前胶原(PC-III)、IV型胶原(IV-C)水平, 以及肝组织中羟脯氨酸(Hyp)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)量的变化, 考察贝母辛对肝纤维化大鼠的影响。**结果** 与模型组相比, 贝母辛组肝纤维化大鼠肝病理组织学改变得到明显改善, 血清中ALT、AST、ALP、GGT、HA、LN、PC-III、IV-C水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01); 肝组织中Hyp、MDA的量显著减少($P < 0.01$), SOD的量增加($P < 0.01$)。**结论** 贝母辛对CCl₄致大鼠肝纤维化有较好的保护作用, 其机制可能与抑制肝内胶原合成、降低自由基生成、减轻脂质过氧化有关。

关键词: 贝母辛; 四氯化碳; 肝纤维化; 胶原合成; 脂质过氧化

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)11-1455-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.018

Protection of peimisine on hepatic fibrosis of rats induced by CCl₄

LIU Jun¹, XU Xuan-fu², GUO Chuan-yong², LIU Xiao-yu¹, WANG Yun¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

2. Department of Hepatopathy, Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of peimisine on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis in rats. **Methods** The rats were divided into control, model, low-, mid-, and high-dose (2.5, 5, and 10 mg/kg) peimisine groups. Hepatic fibrosis models were induced by ip injection of CCl₄ in rats once every 3 d for 8 weeks. The rats in the treatment groups were administered four weeks after the model establishment, once daily until the end of the week 4 after the model establishment. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), glutamyl transpeptidase (GGT), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen (PC-III), and collagen type IV (IV-C) were assayed, and hepatic tissue contents of hydroxyproline (Hyp), superoxide dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) were determined. The effect of peimisine on hepatic fibrosis in rats was observed. **Results** Compared with the model control group, the hepatic fibrosis of rats in peimisine groups was improved obviously, the levels of ALT, AST, ALP, and GGT in serum were lowered obviously ($P < 0.05$, 0.01), also the serum levels of HA, LN, PC-III, IV-C, and the contents of Hyp and MDA in liver tissue were decreased ($P < 0.01$), while the level of SOD was increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Peimisine has the protective effect on the experimental hepatic fibrosis formation. The possible mechanisms are associated with inhibiting fibrogenesis and fibrosis accumulation, and decreasing lipid peroxidation.

Key words: peimisine; carbon tetrachloride; hepatic fibrosis; collagen synthesis; lipid peroxidation

肝纤维化是慢性肝脏疾病共同的病理过程, 也是慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段, 其病理学基础是肝星状细胞活化、增殖并产生胶原, 表现为肝

内弥散性细胞外基质过度沉积的病理变化^[1]。祖国医学认为痰热内蕴是肝纤维化发生的病机之一。中药贝母可清热、利湿、化痰, 其复方具有抗肝纤维

收稿日期: 2012-11-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001573); 上海市第十人民医院 5810 培养计划

作者简介: 刘 珺(1982—), 女, 医学博士。Tel: 13816951240 E-mail: liujun19820124@yahoo.com.cn

化作用^[2]。贝母辛是贝母的主要有效成分之一，但有关其在贝母抗肝纤维化中的作用鲜见报道。本研究探讨贝母辛对四氯化碳(CCl₄)致大鼠肝纤维模型的保护作用，为明确贝母辛抗肝纤维化的物质基础提供实验依据。

1 材料

1.1 药品及试剂

贝母辛对照品，质量分数98%，研域(上海)化学试剂有限公司；CCl₄，分析纯，北京北化精细化学品有限责任公司；亮绿、冰醋酸、丽春红酸性品红、磷钼酸、苯胺蓝，国药集团化学试剂有限公司；丙氨酸转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰氨基转移酶(GGT)、透明质酸(HA)、III型前胶原(PC-III)、IV型胶原(IV-C)检测试剂盒，均购于北京华英生物技术研究所；超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、羟脯氨酸(Hyp)检测试剂盒，均购自南京建成生物工程研究所；层黏连蛋白(LN)放射免疫分析药盒，北京北方生物技术研究所。

1.2 动物

雄性SD大鼠，清洁级，体质量150~180 g，由复旦大学医学院动物实验中心提供，许可证号SCXK(沪)2007-0002。

1.3 仪器

Ultraspec 3000型分光光度计，Pharmacia Biotech公司；酶标仪，美国Bio-Tek公司；-80℃超低温冰箱，日本三洋公司；石蜡切片机，德国Leica公司；显微镜，Olympus公司。

2 方法

2.1 模型制备、分组与给药

大鼠50只随机均分为5组：对照组，模型组，贝母辛低、中、高剂量(2.5、5、10 mg/kg)组。模型制备参照文献方法^[3]。实验第1天，除对照组外，其他组大鼠ip 100% CCl₄ 5 mL/kg，以后每隔3天ip 40% CCl₄ 橄榄油溶液 3 mL/kg，连续给予8周；第1~2周大鼠饲喂高脂玉米粉饲料(玉米粉 795 g/kg+猪油 200 g/kg+胆固醇 5 g/kg)，第3~8周饲喂纯玉米粉+30%乙醇饮料，对照组大鼠正常喂饲。自第4周起除对照组与模型组，贝母辛低、中、高剂量组ig给予相应药物，每天1次，给药至造模结束后4周。

2.2 样本采集与处理

末次给药后，大鼠禁食不禁水过夜，24 h后腹

主动脉取血，分离出血清。采血后取左叶肝组织用10%中性甲醛固定，石蜡包埋，切片，Masson染色，光镜(×100)下观察肝组织病理形态学和网质改变。取肝右叶约0.5 g，在低温条件下剪碎，放入匀浆器中，加入9倍体积的冷生理盐水研磨成匀浆，离心，获得肝匀浆液。

2.3 指标检测

在实验期间观察大鼠一般状况。按照试剂盒说明检测血清ALT、AST、ALP、GGT水平，肝组织中Hyp、SOD、MDA的量。按照试剂盒说明用放射免疫法测定血清中HA、LN、PC-III、IV-C。

2.4 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析，组间比较用 t 检验。

3 结果

3.1 大鼠体征

对照组大鼠精神状态好，活动佳，饮食正常，体质量增加明显，大便正常，皮毛光泽。模型组大鼠精神萎靡，活动明显减少，体质量增加慢且饮食少，大便稀水样，皮毛无光泽且略发黄。贝母辛各剂量组大鼠精神活动尚可，皮毛有光泽，体质量亦增加，但体质量轻于对照组大鼠，总体状态好于模型组大鼠。

3.2 对肝组织病理形态学的影响

对照组大鼠肝组织结构完整，肝细胞索以中央静脉为中心向四周呈放射状整齐排列，肝细胞分界清，大小较均一，核圆而清晰，位于细胞中央，胞质丰富，肝窦排列规则，汇管区清晰。模型组大鼠肝细胞呈弥漫性脂肪变性，胞质内充满大量大小不等的圆形脂滴，脂肪变性以汇管区最为明显，肝小叶边界不清，肝索排列紊乱，周围间质纤维结缔组织增多，呈蓝色。贝母辛各组大鼠肝脂肪变性的肝细胞周围间质纤维结缔组织分布较模型组少，见图1。

3.3 对肝纤维化大鼠血清ALT、AST、ALP、GGT的影响

与对照组相比，模型组大鼠血清ALT、AST、ALP、GGT水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组相比，贝母辛低、中、高剂量组大鼠血清中ALT、AST、ALP、GGT水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01)，结果见表1。

3.4 对肝纤维化大鼠血清HA、LN、PC-III、IV-C的影响

与对照组相比，模型组大鼠血清中HA、LN、

PC-III、IV-C 水平显著升高 ($P<0.01$), 表明肝纤维化模型制备成功。与模型组相比, 贝母辛各剂量组大鼠血清中 HA、LN、PC-III、IV-C 水平显著降低 ($P<0.01$)。结果见表 2。

3.5 对肝纤维化大鼠肝组织 Hyp、SOD、MDA 的影响

与对照组相比, 模型组大鼠肝组织中 Hyp、MDA 的量显著升高 ($P<0.01$), SOD 活性显著降

低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 贝母辛各剂量组大鼠肝组织中 Hyp、MDA 的量显著下降 ($P<0.01$), SOD 活性显著增强 ($P<0.01$)。结果见表 3。

4 讨论

肝纤维化的症状、体征与中医学的“胁痛”、“积聚”症状相似^[3], 其发生多因各种肝病在急性期治疗不彻底, 或在恢复期调养失宜, 以致湿热之邪未

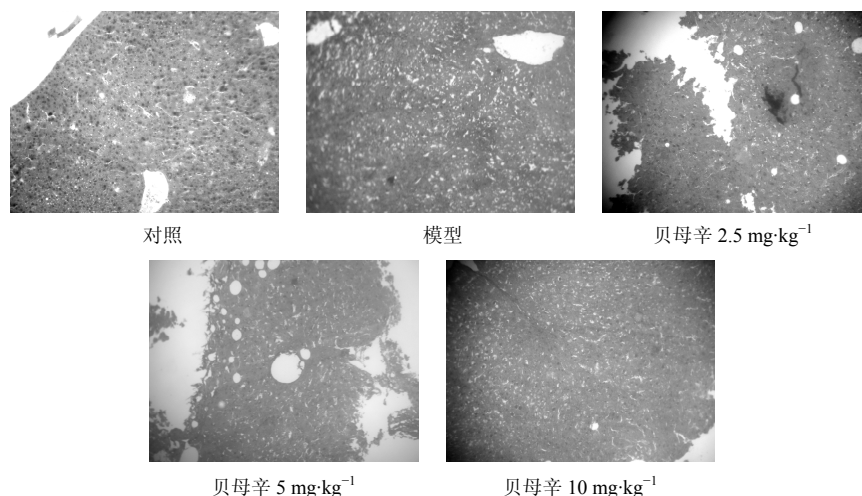


图 1 各组大鼠肝组织病理学观察

Fig. 1 Histopathological observation on hepatic tissue of rats in each group

表 1 贝母辛对肝纤维化大鼠血清 ALT、AST、ALP、GGT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of peimisine on levels of ALT, AST, ALP, and GGT in serum of rats with CCl₄-induced hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	ALT / (U·L ⁻¹)	AST / (U·L ⁻¹)	ALP / (U·L ⁻¹)	GGT / (U·L ⁻¹)
对照	—	23.47 ± 4.59	77.63 ± 7.90	87.64 ± 16.49	37.38 ± 16.31
模型	—	325.18 ± 27.80**	483.99 ± 17.84**	325.02 ± 35.30**	210.22 ± 20.12**
贝母辛	2.5	304.67 ± 15.34**▲	260.49 ± 58.17**▲▲	215.63 ± 17.69**▲▲	174.39 ± 24.39**▲▲
	5	229.66 ± 17.70**▲▲	208.38 ± 34.53**▲▲	180.39 ± 38.47**▲▲	144.54 ± 17.18**▲▲
	10	155.69 ± 26.35**▲▲	202.48 ± 31.40**▲▲	125.65 ± 28.65**▲▲	130.95 ± 17.78**▲▲

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$, 下表同

** $P<0.01$ vs control group; ▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$ vs model group, same as below

表 2 贝母辛对肝纤维化大鼠血清 HA、LN、PC-III、IV-C 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of peimisine on levels of HA, LN, PC-III, and IV-C in serum of rats with CCl₄-induced hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	HA / (ng·L ⁻¹)	LN / (ng·L ⁻¹)	PC-III / (mg·L ⁻¹)	IV-C / (mg·L ⁻¹)
对照	—	160.11 ± 69.45	57.88 ± 5.42	93.30 ± 35.26	82.37 ± 22.00
模型	—	621.03 ± 138.43**	92.47 ± 7.87**	481.07 ± 90.15**	371.29 ± 36.94**
贝母辛	2.5	416.64 ± 93.71**▲▲	74.84 ± 9.56**▲▲	313.62 ± 40.39**▲▲	195.84 ± 35.30**▲▲
	5	300.37 ± 84.06**▲▲	67.29 ± 8.84**▲▲	250.73 ± 41.43**▲▲	180.56 ± 51.92**▲▲
	10	241.13 ± 51.00**▲▲	63.48 ± 8.92**▲▲	208.86 ± 20.98**▲▲	166.50 ± 46.60**▲▲

表3 各组大鼠肝组织 Hyp、MDA 量和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 3 Effects of peimisine on levels of Hyp, SOD, and MDA in serum of rats with CCl₄-induced hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	Hyp / (mg·g ⁻¹)	SOD / (U·mg ⁻¹)	MDA / (μmol·g ⁻¹)
对照	—	184.58 ± 57.61	293.27 ± 15.74	22.61 ± 5.91
模型	—	704.31 ± 85.87**	76.02 ± 25.05**	52.34 ± 9.84**
贝母辛	2.5	512.57 ± 63.18**▲▲	154.04 ± 51.00**▲▲	37.49 ± 3.75**▲▲
	5	383.36 ± 70.80**▲▲	213.64 ± 84.20**▲▲	30.51 ± 8.02**▲▲
	10	338.25 ± 104.10**▲▲	261.43 ± 44.06▲▲	27.14 ± 4.88▲▲

能彻底清除，余邪留恋，蕴积于肝胆脾胃，即残毒余热未尽；或脏腑功能失调、肝郁脾虚、肝木横逆犯脾、脾胃运化失职、痰湿内生、蕴久化热。中医临床上常用贝母清热利湿化痰，其功效有三，一则清除余邪，二则有利于气机的运行，三则促进痞块的软缩。

豪猪信号通路 (Hedgehog) 是生物体内重要的信号传导通路，其调控发育过程中及组织损伤过程中干细胞的分化、移行和增殖，经典的 Hedgehog 与肝星状细胞的活化有关。前期研究表明，肝纤维化时肝星状细胞 (HSC) 中 Hedgehog 信号通路被异常激活，调控下游靶基因的转录表达，使肝星状细胞活化，最终导致肝纤维化的发生^[4]。环杷明 (cyclopamine) 是目前国际公认的且研究较为清楚的 Hedgehog 通路抑制剂之一，可有效遏制 HSC 活化^[5-7]。从结构上比较，贝母辛较环杷明缺少 C-5, 6 位双键，C-6 位增加了酮基，其他结构及立体构象二者完全一致^[8]。

肝细胞受到破坏死亡后，血清 ALT、AST、ALP、GGT 经肝细胞膜转移至血液中，使其在血液中的量明显升高，是衡量肝细胞损伤状态的指标^[9-10]。本实验结果表明，贝母辛可明显降低肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST、ALP、GGT 水平，对肝功能有改善效果。

肝纤维化的发生是以胶原为主的细胞外基质合成增多、降解减少，两者失去动态平衡而致过多的细胞外基质沉积于肝脏引起。HA、LN、PC-III、IV-C 是反映肝纤维化的血清学指标，对肝纤维化的发生、发展、评估有重要临床意义和价值^[11-13]。本实验结果表明，贝母辛可显著降低肝纤维化大鼠的血清 HA、LN、PC-III、IV-C 水平。

Hyp 是胶原蛋白所特有的氨基酸，其量可衡量胶原总体水平，评定纤维化病变程度。在本实验中，

模型组大鼠肝组织中 Hyp 显著增加，而贝母辛各剂量组 Hyp 明显降低。贝母辛还显著降低肝纤维化大鼠组织中 MDA 的量和提高 SOD 活性，抑制自由基产生和促进其清除。抑制氧自由基引起的脂质过氧化反应，减少 MDA 产生，从而对肝组织产生保护作用，使大鼠肝纤维化减轻^[14]，这可能是贝母辛抗脂质过氧化抗肝纤维化的作用机制之一。

综上所述，贝母辛可有效抑制肝纤维化发展，其机制可能是抑制自由基及胶原的合成，促进其降解。贝母辛对肝星状细胞的活化有无影响及其确切机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 杨凤蕊, 娄建石, 方步武. 蒿鳖养阴软坚方抗 CCl₄ 复合因素所致大鼠肝纤维化的作用 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 530-534.
- [2] 朱飞叶, 陈国中, 徐 珊. 化痰行瘀汤对肝纤维化大鼠肝脏超微结构的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(6): 1658-1660.
- [3] 谌 辉, 张景辉, 刘文琪. 姜黄素抗血吸虫病肝纤维化及其机制的实验研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1274-1277.
- [4] 刘 珺, 徐选福, 杨文娟, 等. 红花注射液对肝星状细胞 HSC-T6 增殖、凋亡及凋亡相关基因表达的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1270-1274.
- [5] 刘 珺, 徐选福, 王兴鹏, 等. Hedgehog 通路与肝纤维化及肝星状细胞活化的关系研究 [J]. 中华消化杂志, 2009, 29(2): 101-104.
- [6] Yang L, Wang Y, Mao H, et al. Sonic hedgehog is an autocrine viability factor for myofibroblastic hepatic stellate cells [J]. *Hepatology*, 2008, 48(1): 98-106.
- [7] 刘 珺, 徐选福, 杨文娟, 等. Hedgehog-Gli1 信号通路在肝星状细胞 HSC-T6 激活中的作用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(1): 34-38.
- [8] Chao R B, Hu L. Study on analysis of peimisine in *Bulbus Fritillariae* by HPLC [J]. *Acta Pharm Sin*, 1993,

- 28(9): 705-708.
- [9] Nan J X, Park E J, Kim Y C, *et al.* *Scutellaria baicalensis* inhibits liver fibrosis induced by bile duct ligation or carbon tetrachloride in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2002, 54: 555-563.
- [10] Pavanato A, Tunon M J, Sanchez-Campos S, *et al.* Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis [J]. *Dig Dis Sci*, 2003, 48(4): 824-849.
- [11] 肖俐, 曾建国, 刘林, 等. 别隐品碱抗肝纤维化作用 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1158-1163.
- [12] Lee K S, Buck M, Houghlum K, *et al.* Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(5): 2461-2468.
- [13] Tsukada S, Parsons C J, Rippe R A. Mechanisms of liver fibrosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 364(1/2): 33-60.
- [14] Drewna G, Krzyzyska-Malinowska E, Wozniak A, *et al.* Activity of superoxide dismutase and catalase and the level of lipid peroxidation products reactive with TBA in patients with psoriasis [J]. *Med Sci Monit*, 2002, 8(8): BR338-BR343.