

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2021.05.007

保肝口服液对 CCl₄ 所致肝损伤小鼠护肝作用评价^①

罗欣然, 李秋萍, 舒刚

四川农业大学 动物医学院, 成都 611130

摘要: 为评价自研保肝口服液对急性肝脏损伤的保护作用, 采用对受试小鼠进行分组及灌服给药, 建立四氯化碳(CCl₄)急性肝脏损伤模型的方法, 对肝脏进行病理学检查, 观察受试动物肝脏病变情况; 测定体内丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙二醛(MAD)及超氧化物歧化酶(SOD)的含量. 结果显示空白对照组的肝脏细胞病理学结构正常且较清晰; 模型组肝细胞变大、肿胀, 大小不均; 保肝口服液组和阳性组肝细胞颜色无明显变化, 形态大致正常; 生化指标显示口服液组的 ALT, AST 及 MAD 水平显著低于模型组, 所测保肝口服液组的 SOD 含量水平显著高于模型对照组. 结论: 保肝口服液对 CCl₄ 导致的急性肝损伤有一定的保护作用.

关键词: 保肝口服液; 急性肝损伤; 病理变化; 生化指标

中图分类号: S859.53

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2021)05-0038-06

肝脏具有解毒、消化、合成、贮藏和免疫等一系列功能, 而由肝脏细胞发生脂肪变性引起的脂肪肝是一种体内脂质类代谢紊乱性的疾病, 此类疾病危害着动物和人类的健康. 高脂血症会引发脂肪肝, 此症可以升高体内游离脂肪酸(FFA)的含量. FFA 本身的细胞毒性作用不仅能直接地损伤肝脏细胞, 而且能使甘油三酯(TG)在肝脏内堆积起来, 堆积过量的 TG 会压迫肝血窦, 从而慢慢使肝脏细胞出现缺血、变性和坏死等病况. 此外, 高脂血症能增多肝自由基的含量, 与肝内同样增多的 TG 产生相互作用, 引起脂质发生过氧化反应, 从而导致机体产生脂肪肝这一疾病.

中医相关文献里并未记载“脂肪肝”这一病名, 根据脂肪肝的临床表现, 国家按照标准将其命名为“肝癖”^[1]. 脾失健运, 肝失疏泄, 湿聚为痰, 痰滞经脉是脂肪肝主要的发病机制, 异物的阻滞导致气血运行不畅. 中医学依据中医基础理论, 应用中药来治疗肝脏疾病已经历了非常漫长的过程, 积累了相当丰富的临床经验^[2]. 另外, 国内目前在引发急性肝脏毒性实验方面, 多采用封闭群小鼠和 SD 小鼠来进行.

自研受试药物由茵陈蒿、柴胡、党参、熟地、淫羊藿、牛膝、益母草为组方, 具有易吸收、起效快的特点. 柴胡和茵陈蒿作为主药应用于其他药方中常有报道, 但二者合用于一个组方起护肝作用的研究鲜见报道. 诸药合用可有清热解毒, 活血化瘀, 保肝利胆的功效. 本试验主要通过对受试动物灌服研制的保肝口服液, 观察其各项生理生化指标, 考察保肝口服液对 CCl₄ 所致的急性肝损伤的保护作用, 为临床应用提供理论参考.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验场地

四川农业大学动物医学院药学系实验室及动物房.

① 收稿日期: 2020-08-27

基金项目: 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室开放基金项目(XNYB18-07).

作者简介: 罗欣然, 主要从事兽医制剂学研究.

通信作者: 舒刚, 副教授, 硕士研究生导师.

1.1.2 试验动物

健康 SPF 级昆明小鼠 40 只(雌雄各半), 体质量(20±2) g, 由达硕实验动物中心提供(动物许可证号: SYXK(川)2014-189).

1.1.3 主要试剂和设备

保肝口服液由茵陈蒿 30 g、柴胡 30 g、党参 20 g、淫羊藿 20 g、熟地 20 g、牛膝 10 g、益母草 10 g 为组方, 由水煎醇沉法制备得来, 其为一种褐色液体, 生药质量浓度为 1.03 g/mL; 复方蛋氨酸胆碱片(东宝肝泰片)由通化东宝药业股份有限公司出品(批号 20171201). CCl₄(分析纯); 橄榄油; 生理盐水; 电子天平, 高速冷冻离心机, 光学显微镜(均为 Eppendorf 公司产品); 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(均购自北京天根生化科技有限公司).

1.2 试验方法

1.2.1 动物分组及给药

让小鼠自由饮水进食, 在温度为 18~22 °C 且明暗各 12 h 的动物实验室内进行饲养. 于试验环境下进行 1 周适应性正常喂养后^[3], 按照体质量将 40 只小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只. 空白对照组与模型组: 灌服两组小鼠生理盐水, 剂量为 0.2 mL/10 g; 保肝口服液组: 对该组小鼠灌服保肝口服液, 剂量为每日每只小鼠每 10 g 体质量灌服生药量为 0.206 g; 阳性组(复方蛋氨酸胆碱片): 对该组小鼠灌服复方蛋氨酸胆碱片(复方蛋氨酸胆碱片溶液浓度为 35 mg/100 mL), 剂量为每日每只小鼠每 10 g 体质量灌服 0.07 mg.

各组小鼠 1 次/d 灌胃, 各组均灌胃 15 d. 第 15 d 结束后对模型组、阳性组、保肝口服液组单次腹腔注射 0.1% (用橄榄油稀释) 的 CCl₄ (0.1 mL/10 g)^[4], 建立急性肝损伤模型. 试验期间, 给小鼠正常饲喂水和基础饲料(主要营养成分及比例: 含水量 7.5%, 粗纤维 3.5%, 粗灰分 8.6%, 磷 0.7%, 钙 1.16%, 粗蛋白 24.3%, 粗脂肪 7.5%)^[5]. 记录每组的死亡率. 在注射 CCl₄ 后禁食不禁水 16 h, 称量各组小鼠体质量后, 用镊子摘除小鼠眼球, 在眼眶静脉丛处取血, 并分离小鼠肝脏, 称量肝脏质量及检测各项生化指标.

1.2.2 一般情况观察

观察试验过程中各组小鼠的一般情况, 包括精神、活动状况, 饮食饮水状况, 排便状况及皮毛色泽光泽状况等^[6].

1.2.3 肝脏指数的计算

颈椎脱臼处死小鼠后, 取小鼠肝脏, 用冰生理盐水冲洗, 取滤纸吸干水分, 观察肝脏组织大体形态后测其质量, 根据肝脏质量和体质量来计算肝脏指数. (肝脏指数计算公式为肝脏指数(%) = 肝脏质量(g)/质量(g) × 100%)

1.2.4 肝脏病理学检查

镊子摘取各组小鼠的肝脏左叶, 使用温度为 4 °C 左右的生理盐水, 将摘取的肝脏样品上黏着的血液及其他异物清洗干净, 然后取滤纸吸干附在样品表面的水分. 沿着所取的肝脏样品边缘剪一小块肝脏组织, 立即泡在 10% 甲醛溶液中, 固定 12 h. 接着制作肝脏切片, 其步骤为脱水、透明、浸蜡等, 最终将其制作成直径为 6 μm 左右的肝脏切片. 最后对所制得的肝脏切片进行 HE 染色, 在光学显微镜下观察各组小鼠的肝脏病理结构^[7].

1.2.5 血清生化指标检测

采集各组小鼠眼球血样后, 离心 10 min (3 000 r/min, 4 °C), 分离出上层血清, 在 -20 °C 条件下冷藏保存备用, 测定各组小鼠血清中 ALT, AST 的含量.

摘取各组小鼠的肝脏右叶, 称取约 1 g, 将其制成肝脏组织匀浆, 浓度为 100 g/L ($m_{\text{生理盐水}} : m_{\text{肝组织}} = 1 : 9$). 离心 (3 000 r/min), 取其上清液, 冷藏 (-80 °C) 保存备用, 测定肝脏组织中 SOD 和 MAD 的含量^[8].

1.2.6 统计学处理

统计软件为 SPSS 20.0. 对计算得到的各组小鼠肝脏指数, 及检测得到的 ALT, AST, MAD 及 SOD 含量等试验数据进行统计学分析. 所有数据均用 Mean ± SD 的形式来表示, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 的方法对组间均数进行比较, 单因素分析可采用 LSD 法^[8]. 以 $P < 0.05$ 结果为有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 染毒后观察

急性肝损伤模型建立成功后,口服液组、阳性组和空白组小鼠活动状况正常,饮食饮水正常,皮毛颜色正常且有光泽;模型组的小鼠精神出现萎靡不振的情况,并且饮食饮水量也明显减少,皮毛色泽暗沉.

2.2 保肝口服液对受试动物死亡率的影响

空白对照组的死亡率为 0, CCl_4 模型组的死亡率为 30%, 阳性组的死亡率为 10%, 保肝口服液的死亡率为 20%(表 1). 与空白对照组相比较,模型组、阳性组及保肝口服液组的小鼠均出现不同程度的死亡现象,出现明显死亡现象的是 CCl_4 模型组的小鼠,结果表明腹腔注射 CCl_4 会对小鼠造成明显死亡;与 CCl_4 模型组比较,阳性组和保肝口服液组小鼠死亡程度减轻,表明阳性组药物(复方蛋氨酸胆碱片)和保肝口服液能降低 CCl_4 所致肝损伤小鼠的死亡率;与阳性组相比,保肝口服液组小鼠的死亡率稍有上升,表明保肝口服液对 CCl_4 所致肝损伤小鼠的保护作用稍低于阳性组药物(复方蛋氨酸胆碱片).

表 1 保肝口服液对 CCl_4 所致小鼠肝损伤死亡率的影响

组 别	动物数/只	死亡数/只	死亡率/%
空白组	10	0	0
模型组	10	3	30
保肝口服液组	10	2	20
阳性组	10	1	10

2.3 保肝口服液对各组小鼠肝脏指数的影响

与空白组相比,模型组小鼠的肝脏指数明显增加($P < 0.01$),由此推测,模型组小鼠的肝脏可能出现肿胀、发炎等病变状况,结果表明 CCl_4 对小鼠肝脏造成明显损伤. 与模型组相比,保肝口服液组和阳性组小鼠肝脏指数减小,具有统计学意义($P < 0.05$),表明保肝口服液和复方蛋氨酸胆碱片对急性肝损伤有一定的保护作用(表 2).

表 2 保肝口服液对各组小鼠肝脏指数的影响

组 别	动物数/只	肝脏指数/%
空白组	10	3.31 ± 0.42^b
模型组	7	3.64 ± 0.23^a
保肝口服液组	9	3.38 ± 0.25^b
阳性组	8	3.37 ± 0.19^b

注:同列比较,字母相同表示差异不具有统计学意义($P > 0.05$),字母不同表示差异具有统计学意义($P < 0.05$).

2.4 保肝口服液对 CCl_4 所致肝损伤小鼠模型肝脏组织病理学改变的影响

图 1—图 4 为光学显微镜下放大 200 倍的图片.

空白对照组(图 1)其肝细胞结构清晰,无病变情况.

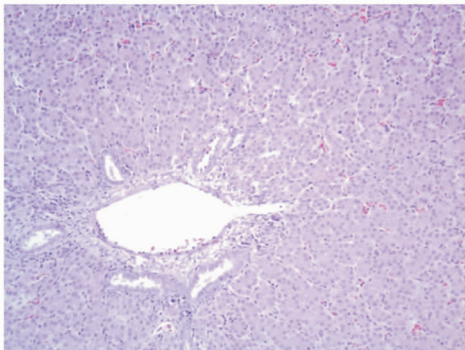


图 1 空白对照组肝脏切片(200X)

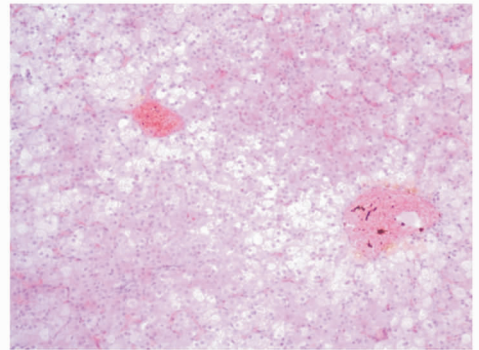


图 2 模型组肝脏切片(200X)

模型组(图 2),其病变情况除肝小叶结构消失,肝脏细胞肿大且大小程度不均匀以外,还伴有肝细胞

胞浆内的脂滴大小不相同(主要呈小泡性的脂肪滴), 肝窦略狭窄以及轻度的肝细胞水样变形的病变状况出现. 模型组呈现的肝索模糊、肝细胞核模糊、溶解, 出现坏死情况, 表明了 CCl_4 对小鼠肝脏能造成明显损伤.

保肝口服液组(图 3)和阳性组(图 4), 与模型组比较, 这两组小鼠的肝脏病变情况均有不同程度的改善. 肝脏细胞的颜色和形态均较为正常: 颜色没有明显变化, 形态也比较正常, 大小无不均匀情况出现. 此外, 虽然偶见肝脏细胞出现坏死和水样变形, 但肝内脂肪滴的数量也见减少. 结果表明本试验研制的保肝口服液对 CCl_4 所致小鼠肝细胞损伤有一定的保护作用.

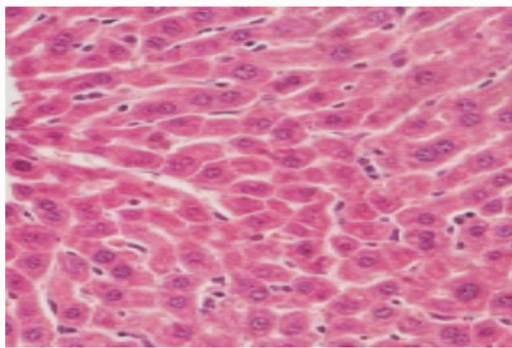


图 3 保肝口服液组肝脏切片(200X)

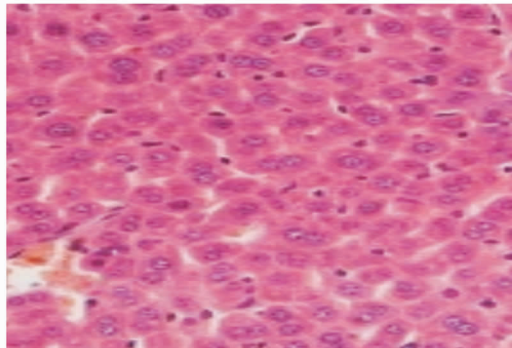


图 4 阳性组肝脏切片(200X)

2.5 保肝口服液对受试小鼠血清 ALT, AST 及肝脏 MDA, SOD 水平的影响

与空白对照组相比较, 腹腔注射 CCl_4 溶液后, CCl_4 模型组小鼠的 ALT, AST 及 MDA 活性有显著增高趋势($P < 0.01$), 而肝脏组织 SOD 活性则呈显著降低趋势($P < 0.01$), 说明 CCl_4 使模型组小鼠肝细胞出现氧化损伤, 证明急性肝损伤模型建造成功.

与 CCl_4 模型组相比较, 阳性组和保肝口服液组小鼠的 ALT 和 AST 活性呈现显著降低趋势($P < 0.05$), 说明该试验采用的阳性组药物和保肝口服液具有对抗 CCl_4 所致急性肝损伤小鼠异常增高 ALT 和 AST 的作用, 证明阳性组药物和保肝口服液能有效减轻 CCl_4 对肝细胞造成的损伤, 保护肝脏细胞膜, 明显减少细胞内酶的释放; 与 CCl_4 模型组相比较, 阳性组和保肝口服液组的肝脏组织 MDA 活性显著降低($P < 0.05$), SOD 活性显著增高($P < 0.05$), 表示该试验采用的阳性组药物和保肝口服液能提高 SOD 活性, 具有清除氧自由基而降低 MDA 活性的作用, 说明阳性组药物和保肝口服液对 CCl_4 所致急性肝损伤具有明显的保护作用.

与阳性组相比较, 保肝口服液组 ALT, AST, MDA 和 SOD 的活性差异不具有统计学意义($P > 0.05$), 说明由 CCl_4 所致急性肝损伤的保肝口服液组的保肝作用和提高了抗氧化损伤能力与阳性药物组相当(表 3).

表 3 保肝口服液对受试小鼠 ALT, AST, MDA 和 SOD 水平的影响

组 别	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
空白组	42.10 ± 8.81 ^c	116.47 ± 21.76 ^c	2.31 ± 0.32 ^c	195.21 ± 21.21 ^c
模型组	289.94 ± 35.87 ^a	374.77 ± 46.96 ^a	6.27 ± 1.12 ^a	101.76 ± 23.14 ^a
保肝口服液组	166.35 ± 27.04 ^{bc}	217.89 ± 38.64 ^b	3.24 ± 0.99 ^b	133.87 ± 24.67 ^b
阳性组	123.08 ± 21.89 ^b	173.82 ± 32.07 ^{bc}	2.91 ± 1.08 ^{bc}	138.29 ± 28.53 ^b

注: 同列比较, 字母相同表示差异不具有统计学意义($P > 0.05$), 字母不同表示差异具有统计学意义($P < 0.05$).

3 讨 论

本试验采用 CCl_4 0.2 mL/10 g 成功地建造了小鼠急性肝损伤模型. 近年来, 由肝损伤动物模型的建立依据来分, 可主要分为 4 类: ①化学性肝损伤模型, 可采用 CCl_4 、硫代乙酰胺(TAA)和 D-氨基半乳糖(D-Gal N)等化学试剂来造模. ②药物性肝损伤模型, 可由氯丙嗪、乙酰氨基酚、四环素和异烟肼等药物来造模. ③免疫性肝损伤模型, 可使用卡介苗加脂多糖(BCG+LPS)和刀豆蛋白 A(Con A)来建立这种肝损伤模型. ④酒精性肝损伤模型^[9]. 作为亲肝毒物中最为经典的一种, CCl_4 引发毒性的主要部位是呼吸道和消

化道。CCl₄ 进入体内之后,能够导致人和动物的肝脏出现不同程度的损伤情况。有相关文献报道,由 CCl₄ 诱导的急性肝损伤模型不仅已经广泛用于肝坏死及肝硬化的病因学、组织学研究和肝功能变化研究中,而且广泛应用于药用植物提取物、保肝药物的评价^[10-11]。

本试验所得的结果表明保肝口服液能明显对病变小鼠的 ALT,AST,MDA 及 SOD 含量水平产生影响。CCl₄ 引发肝脏毒性的机理为:当 CCl₄ 进入小鼠的体内之后,CCl₄ 会被名为 P₄₅₀ 的这种细胞色素分解为 CCl₃ 自由基。而 CCl₃ 自由基能引起脂质的过氧化反应,从而破坏肝脏细胞的细胞膜,使肝细胞发生变形,严重者则能导致肝细胞坏死。病变肝脏细胞的细胞膜被裂解后,肝脏细胞内的转氨酶及自由基更加容易渗入到血液中,导致活性升高。因此血清中 ALT 和 AST 可以作为肝脏损伤的敏感指示标志,它们的升高数值也反映了肝脏受到损伤的不同轻重程度^[12]。另外,大量研究也表明,MDA 均会抑制线粒体呼吸功能、丙酮酸脱氢酶活力及 α-酮戊二酸脱氢酶的生成^[13]。故肝组织内 MDA 含量可作为机体内的脂质过氧化水平的直观反映,可直接作为氧化损伤的生物标志物^[14-15]。SOD 通过清除超氧阴离子自由基,达到保护细胞免受损伤的目的。由大量的临床和动物实验证实^[16]可知,若动物肝脏发生病变情况,那么其肝组织中 SOD 活性会呈现比正常组明显降低的趋势,这样的结果表明在肝细胞发生炎症坏死等过程中 SOD 对肝脏起着不可或缺的保护作用。

本试验选用的保肝口服液是由茵陈蒿、柴胡、党参、熟地、淫羊藿、牛膝、益母草为组方经过工艺优化制得。据相关文献报道^[17-18],腹腔注射柴胡皂苷能显著降低血清 AST 和 ALT 活性,这是因为柴胡皂苷可以抑制由 D-半乳糖胺这一化学物质引起的小鼠肝损害;如果给小鼠灌胃茵陈蒿的水煎剂溶液,连续 7 日,能防治 CCl₄ 引起的肝损伤,降低丙氨酸氨基转化酶和血清胆固醇;党参则具有以下一些作用:增强机体对外界刺激物的应变能力、增强机体的免疫功能、延缓机体衰老速度、抗溃疡和补血等;熟地黄有抑制血栓形成的作用,尤其是对脂肪含量较高的食物引起的高脂血症、脂肪肝,以及对由小鼠内毒素而引起的肝静脉出血症有较好的治疗作用。通过本试验结果可知,根据该中药组方研制的保肝口服液确实具有降低 ALT,AST 和 MDA 水平及升高 SOD 水平的作用,有一定的护肝功效。可见,本试验选用的中药组方一方面继承了传统的中医理论基础,另一方面也紧密结合了临床实际,提高了疗效,但很难阐释其护肝机理,这点疑问尚未被解释清楚,所以仍有必要继续进一步更加深入研究其作用及其护肝作用机制。

4 结 论

从各试验组小鼠死亡率、肝脏组织病理学、血清 ALT 和 AST 水平、肝脏 MDA 和 SOD 水平进行比较分析,可以看出本试验的受试药物保肝口服液不但能够降低 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠的死亡率,而且还能降低血清中 ALT 和 AST 水平和肝脏 MDA 水平,以及升高肝脏 SOD 水平,证明该口服液对 CCl₄ 所致肝损伤有一定保护作用,对动物肝损伤药物的开发提供了可行性依据。

参考文献:

- [1] 林朝亮. 陈福来治疗脂肪肝经验总结 [J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(12): 108-109.
- [2] 马 静, 姚广涛. 保肝药效筛选方法及中药保肝的研究进展 [J]. 医学综述, 2016, 22(23): 4671-4675.
- [3] 王丽霞. 护肝颗粒剂对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(96): 158.
- [4] 李慧萍, 丁传波, 徐晓华, 等. 脱落酸对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(2): 64-69.
- [5] 严煜钧, 刘仲华, 林 勇, 等. 茶叶中 EGCG 对非酒精性脂肪肝大鼠的调脂保肝作用研究 [J]. 茶叶科学, 2014, 34(3): 221-229.
- [6] 杜丽萍, 康 永, 郝旭亮, 等. 菊杞保肝胶囊对大鼠亚急性酒精性肝损伤的保护作用及其机理 [J]. 中成药, 2015, 37(6): 1325-1329.
- [7] 李 萍, 丛玲华, 钟国平, 等. 4 种特殊染色法在肝脏穿刺活检病理学检查中的应用比较 [J]. 现代实用医学, 2018, 30(7): 879-880, 981.
- [8] 杨成林, 邬 静, 陈宇科. 丹参对铜诱导大鼠肝损伤的保护作用研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2016, 35(6): 13-16.
- [9] 布秀娟. 肝损伤动物模型制作研究进展 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(12): 166-168.

- [10] 刘冬,刘丽达,郑微,等. 某品牌保肝胶囊对酒精性肝损伤保护作用的研究 [J]. 预防医学情报杂志, 2018, 34(8): 1092-1095.
- [11] 吴丽芳,卓双塔,林涛. 保肝药预防抗肿瘤药物肝损伤用药合理性评价 [J]. 中国药业, 2019, 28(2): 88-90.
- [12] 沈斌,杨鑫骥,蒋利亚,等. 多属性效用理论在抗炎保肝治疗慢性乙型肝炎药物经济学评价中的应用 [J]. 中国基层医药, 2018, 25(22): 2903-2906.
- [13] 田苗,马伯艳,张贺,等. 化痰温胆汤对糖耐量低减大鼠肝细胞线粒体 SOD 及 MDA 水平的影响 [J]. 中医学报, 2018, 46(2): 33-35.
- [14] 林萍,邓才林. 谷氨酰胺对肝缺血再灌注导致急性肺损伤肺组织 MDA、SOD 水平及预后的影响 [J]. 河北医药, 2017, 39(20): 3082-3084.
- [15] 蔡纲,黄平,李绍民. 翻白草对 CCl₄ 所致慢性肝损伤大鼠肝组织中 SOD、MDA、GSH 水平的影响 [J]. 黑龙江医药科学, 2016, 39(1): 33-34, 36.
- [16] 尤金兰. 转氨酶水平检验在脂肪肝诊断中的应用价值分析 [J]. 特别健康, 2019(16): 60.
- [17] 冯群,赵红,孙蓉. 益母草临床应用和不良反应研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2014, 11(2): 74-76, 80.
- [18] 邹敏. 黄芩药材中黄芩苷含量的近红外光谱法测定分析 [J]. 养生保健指南, 2019(15): 396.

Effect of Liver-Protection Oral Liquid on Liver Protection of Acute Hepatic Injury Induced by CCl₄ in Mice

LUO Xin-ran, LI Qiu-ping, SHU Gang

College of Veterinary Medicine, School of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: Studies have been done to investigate the protective effect of liver-protection oral liquid on acute liver injury. The animals were grouped and administered, and a carbon tetrachloride (CCl₄) liver injury model was constructed. The pathological examination of the liver was performed to observe the liver lesions of the animals tested; the serum biochemical index alanine aminotransferase (ALT), glutamate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MAD), and superoxide dismutase (SOD) content were measured. Results show that the pathological structure of hepatocytes in the normal control group was clear; the hepatocytes in the model group became larger, swollen and uneven in size; the liver cells in test group and positive group had no significant changes in color, and the morphology was approximately normal; biochemical indicators showed the levels of ALT, AST and MAD of the test group were significantly lower than those of the model group. The level of SOD in the test group was significantly higher than that of the model group. It is concluded that the oral liquid developed has a certain protective effect on acute liver injury.

Key words: liver-protection oral liquid; acute liver injury; pathological changes; biochemical indicators

责任编辑 潘春燕