

垂盆草水煎液对不同小鼠急性肝损伤模型的疗效作用

刘三海¹, 李蕊^{2,3}, 乔艳雪¹, 陈芯¹, 张楠楠^{2,3}, 张剑平^{2,3} (1.北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 3.新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015)

摘要: 目的 复制四氯化碳(CCl₄)、D-氨基半乳糖联合内毒素(D-GalN/LPS)、D-氨基半乳糖联合肿瘤坏死因子- α (D-GalN/TNF- α)及刀豆蛋白A(ConA)诱导小鼠急性肝损伤模型, 筛选针对垂盆草(*Sedum Sarmentosum*, SS)水煎液有效的急性肝损伤小鼠模型。方法 采用152只雄性6~8周龄C57BL/6小鼠, 其中80只小鼠随机分为CCl₄ + H₂O组、CCl₄ + SS组、D-GalN/LPS + H₂O组、D-GalN/LPS + SS组、D-GalN/TNF- α + H₂O组、D-GalN/TNF- α + SS组、ConA + H₂O组及ConA + SS组共8组, 每组10只, 观察各组生存率。其余72只小鼠随机分为Normal组、CCl₄ + H₂O肝功能组、CCl₄ + SS肝功能组、D-GalN/LPS + H₂O肝功能组、D-GalN/LPS + SS肝功能组、D-GalN/TNF- α + H₂O肝功能组、D-GalN/TNF- α + SS肝功能组、ConA + H₂O肝功能组及ConA + SS肝功能组共9组, 每组8只, 检测血浆ALT、AST和乳酸脱氢酶(LDH)水平。结果 垂盆草水煎液将CCl₄小鼠急性肝损伤模型的生存率由55%提高到90% ($P = 0.0128$)。造模24小时后, CCl₄ + SS组ALT为(5500.00 \pm 426.20) U/L, AST为(4383.00 \pm 358.00) U/L, LDH为(6764.00 \pm 691.30) U/L, 分别低于CCl₄ + H₂O组ALT[(10521.00 \pm 1374.00) U/L]、AST[(7328.00 \pm 947.80) U/L]、LDH[(13589.00 \pm 1542.00) U/L], 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。结论 垂盆草水煎液对CCl₄诱导小鼠急性肝损伤模型有保护作用。

关键词: 垂盆草; 急性肝损伤; C57BL/6小鼠

Effect of *Sedum Sarmentosum* on acute liver injury-induced by different causes in mice

LIU San-hai¹, LI Rui^{2,3}, QIAO Yan-xue¹, CHEN Xin¹, ZHANG Nan-nan^{2,3}, ZHANG Jian-ping^{2,3} (1.School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2.Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3.Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To study an appropriate murine model for this research, the mice were administrated by gastrogavage with CCl₄, D-GalN/LPS, D-GalN/TNF- α and ConA to induce acute liver injury in different group, respectively. **Methods** The 80 mice were randomly separated from 152 male mice (6-8 weeks). The 80 mice were randomly divided into CCl₄ + H₂O group, CCl₄ + *Sedum Sarmentosum* (SS) group, D-GalN/LPS + H₂O group, D-GalN/LPS + SS group, D-GalN/TNF- α + H₂O group, D-GalN/TNF- α + SS group, ConA + H₂O group, and ConA + SS group (10 mice per group) with the injection of CCl₄, D-GalN/LPS, D-GalN/TNF- α and ConA in different groups, and all the mice were administrated by gastrogavage with SS at same time. The survival rate were observed. The 72 mice were randomly divided into Normal group, CCl₄ + H₂O group, CCl₄ + *Sedum Sarmentosum* (SS) group, D-GalN/LPS + H₂O group, D-GalN/LPS + SS group, D-GalN/TNF- α + H₂O group, D-GalN/TNF- α + SS group, ConA + H₂O group, and ConA + SS group (8 mice per group). The mice were sacrificed and plasma alanine aminotransferase (ALT), aspartate

aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured. **Results** The survival rate of CCl_4 + SS group mice was elevated from 55% to 90% ($P = 0.0128$). After 24 hours challenge, the serum ALT level was (5500.00 ± 426.20) U/L, AST (4383.00 ± 358.00) U/L and LDH (6764.00 ± 691.30) U/L of CCl_4 + SS group, lower than CCl_4 + H_2O group ALT (10521.00 ± 1374.00) U/L, AST (7328.00 ± 947.80) U/L and LDH (13589.00 ± 1542.00) U/L ($P < 0.05$). **Conclusions** Sedum Sarmentosum has an obvious protecting effect for acute liver injury induced by CCl_4 in mice.

Key words: Sedum Sarmentosum; Acute liver injury; C57BL/6 mice

垂盆草为景天科植物垂盆草 (*sedum sarmentosum bunge*, SS) 的干燥全草, 味甘、淡, 性微寒, 归肝、胆、小肠经, 具有利湿退黄, 清热解毒之功效, 现代药理研究发现垂盆草具有抑制炎症渗出, 减少肝细胞损伤, 抑制肝肿瘤细胞过度增长等作用^[1-3]。本实验通过复制4种急性肝损伤小鼠模型, 给予垂盆草水煎液灌胃治疗, 筛选针对垂盆草的有效急性肝损伤模型, 为下一步研究垂盆草保肝作用的机制提供合适的小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择野生型C57BL/6小鼠152只, 雄性, 6~8周, 体重(20 ± 2) g, 由中国医学科学院实验动物中心提供, 动物许可证编号: SCXK京2009-0007。所有实验动物均按照动物保护相关法规饲养于中国医学科学院动物所SPF级动物室。

1.2 主要试剂 四氯化碳(CCl_4)为成都市科龙化工试剂厂; 刀豆蛋白A(ConA)为美国Sigma公司; 脂多糖(LPS)为美国Sigma公司; D-氨基半乳糖胺(D-GalN)为美国Sigma公司; 人重组肿瘤坏死因子- α (TNF- α)为上海欣百诺生物科技有限公司。

1.3 中药制备 中药的标准剂量参考中国中医药出版社出版的全国统编的第2版《中药学》^[4]。小鼠用药剂量: 以60 kg成人的体表面积换算, 小鼠用药量是成人每公斤体重的9.1倍, 本实验小鼠用药量按成人每公斤体重的10倍换算^[5]。垂盆草100 g, 水煎浓缩至125 ml, 浓度为0.8 g/ml, 小鼠用药量为10 g/kg。中药购自北京同仁堂前门总店, 按传统方法将中药浸泡, 武火煮沸, 文火煎2次, 去渣合并浓缩, 分装, -20°C 保存备用。

1.4 模型制备

1.4.1 生存率模型制备 152只小鼠中, 选择80只小鼠随机分为8组, 每组10只, 造模前12小时禁食不禁水,

造模后立即进行1次灌胃治疗, 分别用双蒸水和垂盆草水煎液(10 g/kg)灌胃, 灌胃体积为12.5 ml/kg。分组情况如下:

(1) CCl_4 模型: CCl_4 (50%橄榄油溶液, 2.5 ml/kg)腹腔注射。 CCl_4 + H_2O 组给予双蒸水灌胃, CCl_4 + SS组给予垂盆草水煎液灌胃。

(2)D-GalN/LPS模型: D-GalN(0.2 g/ml, 400 mg/kg)/LPS(10 mg/ml, 0.25 mg/kg)腹腔注射。D-GalN/LPS + H_2O 组给予双蒸水灌胃, D-GalN/LPS + SS组给予垂盆草水煎液灌胃。

(3)D-GalN/TNF- α 模型: D-GalN(0.2 g/ml, 700 mg/kg)/TNF- α (100 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/kg}$)腹腔注射。D-GalN/TNF- α + H_2O 组给予双蒸水灌胃, D-GalN/TNF- α + SS组给予垂盆草水煎液灌胃。

(4)Con A模型: Con A(6 mg/ml, 20 mg/kg)静脉注射。Con A + H_2O 组给予双蒸水灌胃, Con A + SS组给予垂盆草水煎液灌胃。

1.4.2 肝功模型制备 152只小鼠中, 其余72只小鼠随机分成9组, 每组8只。分组情况如下:

(1)Normal组: 不做任何处理。

(2) CCl_4 模型: CCl_4 (10%橄榄油溶液, 2 ml/kg)腹腔注射。 CCl_4 + H_2O 肝功能组给予双蒸水灌胃; CCl_4 + SS肝功能组给予垂盆草水煎液灌胃。

(3)D-GalN/LPS与D-GalN/TNF- α 模型: D-GalN/LPS肝功能组与D-GalN/TNF- α 肝功能组造模均同生存率模型的制备。

(4)Con A模型: Con A(6 mg/ml, 15 mg/kg)静脉注射。Con A + H_2O 组给予双蒸水灌胃, Con A + SS组给予垂盆草水煎液灌胃。

1.5 方法

1.5.1 观察小鼠生存率 从模型小鼠造模、灌胃后计时开始, 至小鼠死亡计时结束, 未死亡的小鼠计为

生存。CCl₄模型连续观察216小时, Con A模型连续观察48小时, D-GalN/LPS和D-GalN/TNF- α 模型均观察24小时, 记录动物死亡时间。

1.5.2 检测小鼠血浆ALT、AST和LDH水平 CCl₄模型\Con A模型\D-GalN/LPS模型和D-GalN/TNF- α 模型分别取灌胃后24、12、5、5小时取外周血, 2000 r/min, 离心20分钟, 分离血浆, 检测小鼠血浆ALT、AST和LDH水平。

1.6 统计学处理 采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。研究中生存曲线采用Kaplan-Meier统计学分析; 呈正态分布的计量资料采用 t 检验比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察急性肝损伤小鼠模型的生存率 持续观察小鼠状态, 发现4种小鼠模型在1小时造模后均表现活动减少, 发热, 发抖, 竖毛, 蜷缩, 呼吸加快。死亡后解剖可见肝脏肿大、紫绀、有出血点, 其他脏器未见明显改变。垂盆草水煎液灌胃治疗后, CCl₄模型生存率从55.00%提高至90.00% ($P = 0.0128$); Con A模型生存率从37.50%下降至12.50%; D-GalN/LPS模型生存率从18.75%上升至25.00%; D-GalN/TNF- α 模型生存率从52.63%下降至50.00%, 并且D-GalN/LPS和D-GalN/TNF- α 模型小鼠的死亡时间均集中在4~6小时(图1)。在CCl₄模型中, 存活小鼠的状态CCl₄ + SS组明显优于CCl₄ + H₂O组, CCl₄ + SS组生存率达到了90.00%, 与CCl₄ + H₂O组比较, $P = 0.0128$ 。其他3种模型给药与未给药情况相似, 未出现缓解状态, 无显著提高生存率的作用, 且差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠血浆ALT、AST、LDH水平 为进一步验证垂盆草的疗效, 检测各组小鼠血浆转氨酶的水平。CCl₄ + H₂O组血浆ALT、AST、LDH活性较正常对照组显著升高 ($P < 0.05$); CCl₄ + SS组血浆较CCl₄ + H₂O组低 ($P < 0.05$), 见图2。其余3种模型中未能见到垂盆草显著降低小鼠血浆ALT、AST和LDH水平, 提示垂盆草水煎液可以显著降低CCl₄小鼠血浆ALT、AST和LDH水平, 说明垂盆草

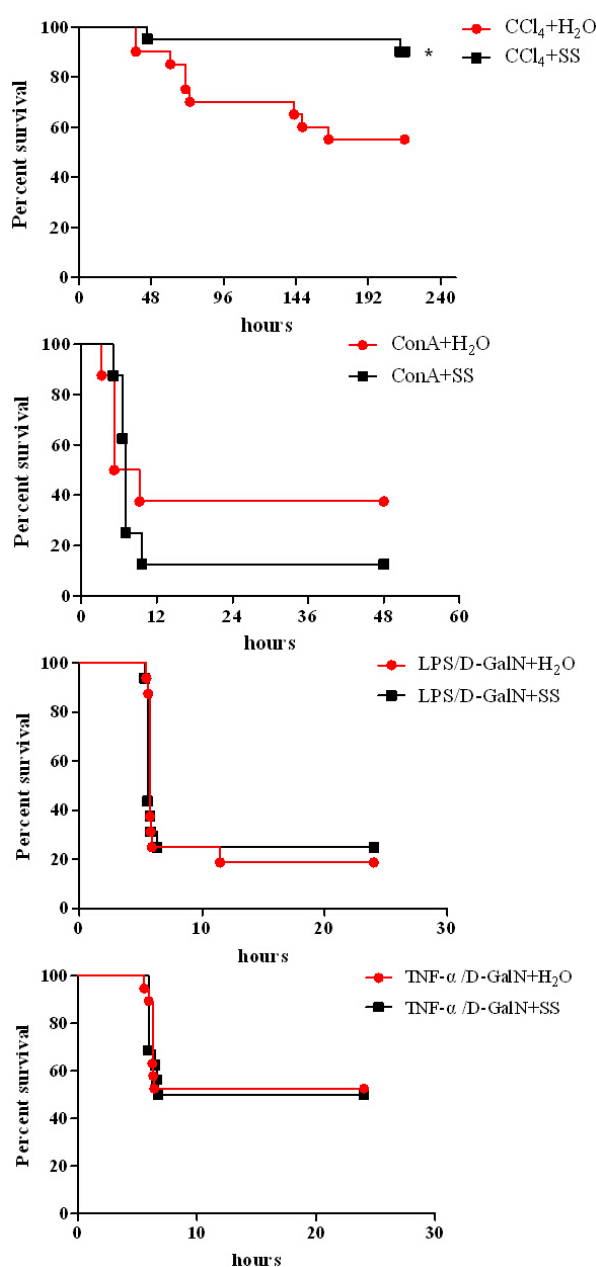


图1 垂盆草对小鼠急性肝损伤模型生存率的影响

能减轻小鼠肝细胞损伤。

3 讨论

急性肝损伤的机制较为复杂, 主要可分为化学性和免疫性两大类^[6,7]。化学性肝损伤主要是通过细胞色素P450及其结合中间代谢产物所致的损伤, 表现为质膜完整性的破坏、线粒体功能失调、胞内离子浓度失衡、酶活性的降解和自由基的作用等^[8-11]。CCl₄模型是比较常用的化学性肝损伤模型, 此模型能准确反映肝细胞功能代谢的改变, 且简单经济, 重复性好^[12]。免疫性肝损伤主要有Con A、D-GalN/

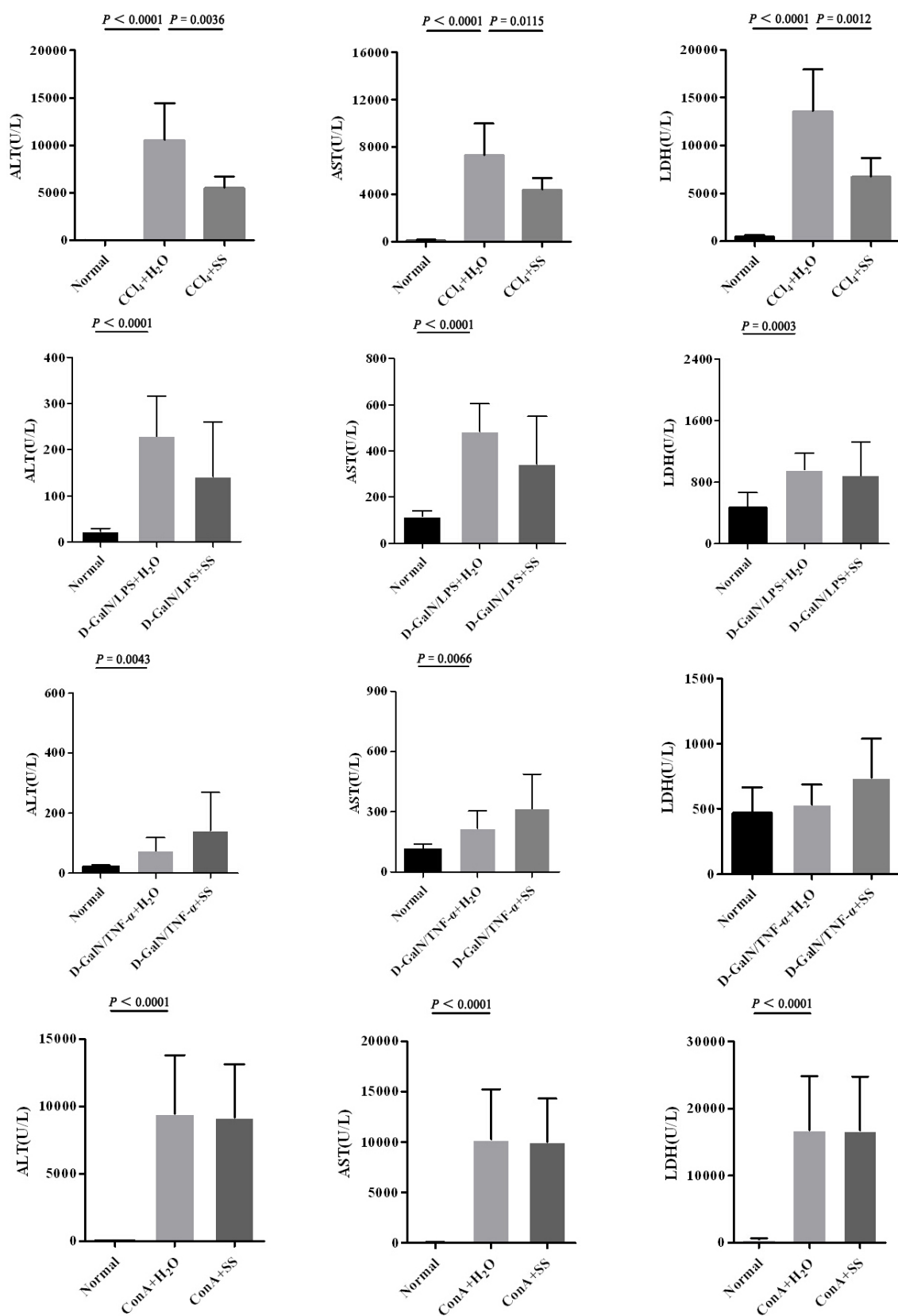


图2 垂盆草对小鼠急性肝损伤血浆ALT、AST和LDH水平的影响

LPS和D-GalN/TNF- α 诱导的肝损伤模型等,前者是以活化的T淋巴细胞浸润至肝脏,产生大量炎性细

胞因子为其病理特点^[13],后两者诱导急性肝损伤是以TNF- α 分泌为主,激活单核-巨噬细胞,释放大

炎性因子为特点,其中D-GalN造成的肝细胞弥漫性损伤使肝脏对LPS的解毒能力大大降低,从而增强LPS的肝毒性^[14-17]。

垂盆草药用历史悠久,具有利湿退黄,清热解暑等多种功效,常用于治疗湿热黄疸,小便不利,痈肿疮疡,急慢性肝炎等。《本草纲目拾遗》记载“治痢疗便毒,黄疸喉”。《天宝本草》记载“利小便,敷火疮肿痛,汤火症;退湿热,兼治淋症”。现代药理^[18,19]研究发现,垂盆草有免疫抑制、抗菌和保肝等作用,其中保肝作用并非是直接通过保护肝细胞,而是抑制炎症渗出,减少肝细胞损伤,使肝功水平下降,这与该药具有“清热、解毒、消肿”的功效吻合。

本实验分别采用CCl₄、D-GalN/LPS和D-GalN/TNF- α 腹腔注射,Con A静脉注射诱导C57BL/6小鼠急性肝损伤模型,同时给予垂盆草水煎液灌胃治疗,观察小鼠行为及生存率,检测其血浆转氨酶的方法,筛选针对垂盆草有效的急性肝损伤小鼠模型。观察急性肝损伤小鼠模型的生存率显示,垂盆草治疗后,对比生存率CCl₄模型(90.00%)>D-GalN/TNF- α 模型(50.00%)>D-GalN/LPS模型(25.00%)>Con A模型(12.50%)。CCl₄模型小鼠开始死亡的时间约为37小时,9天后基本稳定。检测各组小鼠血浆ALT、AST、LDH水平结果,4种急性肝损伤小鼠模型均给予垂盆草水煎液灌胃后,显示垂盆草水煎液明显降低CCl₄模型小鼠血浆ALT、AST和LDH水平,说明垂盆草水煎液能有效治疗CCl₄诱导的急性肝损伤,提示垂盆草是治疗化学性肝损伤的有效中药,其作用机制有待于进一步研究。

化学研究表明,垂盆草主要含有糖类、黄酮类、三萜类及苷类成分,其中垂盆草总黄酮是垂盆草中重要的保肝降酶活性部位之一^[20-22]。不同剂型的垂盆草对小鼠生物化学指标的功效有所不同,其中垂盆草水煎液的保肝降酶功效最好^[23]。并且文献^[24]报道垂盆草对乙醇致小鼠肝损伤亦有保护作用。此外,垂盆草可增强小鼠的抗氧化功能,明显改善其免疫功能,特别对免疫功能处于抑制状态时有显著

增强作用^[25]。在本实验中,垂盆草对D-GalN/LPS并未起到很好的保护作用,这与文献^[26,27]报道垂盆草对D-氨基半乳糖与内毒素合用所致的小鼠急性肝损伤有保护作用不一致,推测原因可能是因为文献所用垂盆草为渣汁,低温脱水,冻干燥所得,并且提前1小时预防给药,这与本实验采用传统煎煮法,造模同时治疗给药不同,此外可能与文献中造模药的剂量和中药给药剂量的差异亦有关,单味中药治疗肝病的疗效往往有限,所以造模肝损伤的程度不同,有时候会导致截然相反的结果。

本实验选择4种小鼠急性肝损伤模型,通过观察不同小鼠肝损伤模型的生存率和检测小鼠血浆转氨酶水平,初步得到垂盆草水煎液对CCl₄诱导的肝损伤有一定的保护作用。分析肝损伤小鼠模型的特点,垂盆草的治疗作用是否仅针对化学性肝损伤而不是免疫性肝损伤,还有待于进一步探讨,为垂盆草的保肝作用提供新的思路 and 判断依据,亦为临床治疗肝病用药提供一定的参考作用。

参考文献

- [1] Kang TH, Pae HO, Yoo JC, et al. Antiproliferative effects of alkaloids from *Sedum sarmentosum* on murine and human hepatoma cell lines[J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 70: 177-182.
- [2] 董亚男, 陈逸云, 张富永, 等. 垂盆草的现代实验和临床研究综述[J]. *云南中医学院学报*, 2014, 37: 101-104.
- [3] Yoo HJ, Kang HJ, Jung HJ, et al. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of *Sedum sarmentosum* extract[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120: 282-286.
- [4] 高学敏. 中药学[M]. 第2版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 234.
- [5] 施新猷. 医学实验动物学[M]. 陕西: 陕西科学技术出版社, 1989: 368.
- [6] 宋正己. 实验性肝损伤模型的建立和研究进展[J]. *医学综述*, 2004, 10: 278-280.
- [7] 凌银娣, 刘海燕, 黄巨恩, 等. 急性肝损伤实验动物模型的研究进展[J]. *解剖学杂志*, 2012, 35: 389-391.
- [8] Shah H, Hartman SP, Weinhouse S. Formation of carbonyl chloride in carbon tetrachloride metabolism by rat liver in vitro[J]. *Cancer Res*, 1979, 39: 3942-3947.
- [9] 张玲霞, 周先志. 现代传染病学[M]. 第2版. 北京: 人民军医出版社, 2010: 1-5.
- [10] Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2003, 33: 105-110.
- [11] 汪涛, 姜华, 陆国才, 等. 四氯化碳肝脏毒性研究新进展[J]. *毒理学杂志*, 2008, 22: 324-327.
- [12] Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon

- tetrachloride mode of action[J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2007, 25: 185-209.
- [13] Wang HX, Liu M, Weng SY, et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18: 119-125.
- [14] Roland CR, Naziruddin B, Mohanakumar T, et al. Gadolinium blocks rat Kupffer cell calcium-dependent prostaglandin E2 synthesis and septic mortality[J]. Hepatology, 1999, 29: 756-765.
- [15] 刘亮明, 罗杰, 张吉翔, 等. 内毒素诱导D-半乳糖胺致敏小鼠急性肝衰竭的研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86: 2122-2126.
- [16] Szabo G, Velayudham A, Romics L Jr, et al. Modulation of non-alcoholic steatohepatitis by pattern recognition receptors in mice: the role of toll-like receptors 2 and 4[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2005, 29: 140-145.
- [17] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2011, 3: 40-56.
- [18] 魏太明, 闫玉凝. 垂盆草的本草考证与文献综述[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 28: 75-78.
- [19] 郭佳, 史又新. 垂盆草降谷丙转氨酶的机理探讨[J]. 上海中医药杂志, 1991, 23: 47-49.
- [20] 潘金火, 潘萍. 垂盆草总黄酮的保肝降酶作用及其化学成分的鉴别研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21: 1930-1934.
- [21] 潘金火, 何满堂, 罗兰, 等. 垂盆草不同提取部位保肝降酶试验[J]. 时珍国医国药, 2001, 12: 888-890.
- [22] Oh H, Kang DG, Kwon JW, et al. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from Sedum sarmentosum[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27: 2035-2037.
- [23] 董亚男, 申弘, 陈逸云, 等. 不同剂型的垂盆草对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的防治作用[J]. 药物评价研究, 2013, 6: 426-430.
- [24] 李清, 刘姣, 曹秀莲, 等. 垂盆草提取物对乙醇致小鼠肝损伤的保护作用研究[J]. 药理药化, 2011, 22: 201-203.
- [25] 赵俊, 蓝茹. 从齐墩果酸结构分析抗肝细胞损伤的作用机制[J]. 黑龙江医药, 1999, 4: 844.
- [26] 金京丽. 垂盆草对D-氨基半乳糖与内毒素合用所致小鼠急性肝损伤的保护作用[D]. 延边大学, 2006.
- [27] Lian LH, Jin X, Wu YL, et al. Hepatoprotective effects of Sedum sarmentosum on D-Galactosamine/lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure[J]. J Pharmacol Sci, 2010, 114: 147-157.

收稿日期: 2014-10-22

· 消息 ·

《中国医学前沿杂志(电子版)》征稿启事

《中国医学前沿杂志(电子版)》创刊于2008年9月, 是国家卫生和计划生育委员会主管、人民卫生出版社主办的集光盘、纸版导读、网络、手机报、微信、微博等多位一体的国家级电子期刊, 现为月刊, 国内统一刊号: CN 11-9298/R, 国际标准刊号: ISSN 1674-7372, 全国公开发行, 邮发代号: 82-136, 光盘定价: 20元/期, 2013年9月加入中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)。

《中国医学前沿杂志(电子版)》已被万方、知网等数据库全文收录, 2013年扩展影响因子为1.586, 在全国129种医药卫生总论类期刊中排名第1; 2013年核心影响因子为0.796, 在全国47种医学综合类期刊中排名第7。

《中国医学前沿杂志(电子版)》常设栏目有院士论坛、述评、专题笔谈、专家论坛、论著、中国循证指南共识、国际循证指南共识、病例报告、百家讲坛(视频)、会议纪要等。

征稿栏目: 论著

征稿方向: 医学各学科

投稿方式: www.yixueqianyan.cn