

“水三仙”口服液对小鼠免疫性肝损伤保护作用的研究

杨雄志 张庆珍

(浙江医药高等专科学校 宁波 315100)

摘要:目的:探讨“水三仙”口服液(SSL)对卡介苗(BCG)和脂多糖(LPS)诱导的小鼠免疫性肝损伤的保护作用。方法:静脉注射 BCG 和 LPS 诱导小鼠免疫性肝损伤。在注射 LPS 前,小鼠腹腔注射不同剂量的 SSL(10、15、20 mL/kg),连续 10d 后,取血清,检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)的活性,测定肝组织匀浆中脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果:不同剂量的 SSL 治疗组小鼠血清 ALT、AST、LDH 活性及肝组织匀浆 MDA 含量均低于模型组,且肝组织损伤不同程度地减轻。结论:“水三仙”口服液对 BCG 和 LPS 诱导的小鼠免疫性肝损伤具有一定的保护作用。

关键词:“水三仙”口服液;卡介苗;脂多糖;免疫性肝损伤;保肝作用

Abstract: objective: To study the protective effect of Oral Shuishanxian Liquor (SSL) on experimental liver injury induced by Calmette-Guerin bacillus vaccine (BCG) and Lipopolysaccharide (LPS) in mice. Methods: Experimental liver injury was induced by Calmette-Guerin bacillus vaccine and Lipopolysaccharide in male mice by injecting via tail vein (50 μ g/kg), and administering LPS (10μ g/mouse) 10d later. Therapeutic groups were given respectively with SSL (10,15,20 ml/kg) before administration of LPS. The level of ALT, AST and LDH in serum were measured by automatic biochemistry analyzer, and MDA in liver plasma was measured by TBA method and the level of SOD was measured by pymgallol autooxidation method. Results: The three experimental groups were found with significant decrease in the elevation of serum GPT and LDH level and the content of MDA in the liver plasma. The liver tissue damages were also ameliorated. Conclusion: SSL has protective effect against the experimental liver injury induced by BCG and LPS in mice.

Key words: SSL; BCG; LPS; Immunological liver injury; hepatoprotection

中图分类号:R 575 文献标识码:B 文献编号: 1671-4040(2005)03- 0007-02

“水三仙”口服液是由菱角、薏苡仁、白莲、茯苓、山药、灵芝等中药配伍组成的清补之品。本品性味偏于甘凉,主入脾经,兼入心肾二经,其特点活泼清灵,补中有疏,疏而不泄,对脏腑而言可有健脾之功,而针对湿热又可清利。通过临床实践应用,本品扶正祛邪,解酒,健脾,生津,止渴,兼有养心安神、补肾固精之功,适宜作为调理大众身心、保证人民健康的中药制剂。目前资源尚未充分利用。“水三仙”口服液对肝损伤是否有保护作用还未见报道,为进一步探明其生物活性及治病机理,以小鼠为对象,应用 BCG+LPS 制作急性免疫性肝损伤模型,选择血清酶学血清超氧化物歧化酶(SOD)、肝脏脂质过氧化物丙二醛(MDA)为测定指标,从多方面观察“水三仙”口服液对小鼠急性免疫性肝损伤的保护作用及其作用机制,使其为中药制剂的开发及临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 昆明系小鼠,雄性♂,4~5 周龄,体重(20± 2) g,购自浙江省实验动物中心。

1.1.2 药品和试剂 “水三仙”口服液(SSL,每支 10mL,生药含量 2g / mL,本校药物研究中心研制);1%联苯双酯(DDB,北京协和制药厂);卡介苗冻干粉 BCG, 上海生物制品研究所),临用前以无菌生理盐水配成 12.5mg/mL;联苯三酚、细菌脂多糖(LPS)、硫代比妥酸(TBA)和四乙氧基丙烷(TEP)购自 Sigma 公司;血清谷丙转氨酶(ALT)、血清谷草转氨酶(AST)

和血清乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒购自南京建成生物制品研究所。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器 UV7250 紫外分光光度计(中国,上海);Olympus AU640 全自动生化分析仪(日本)。

1.3 方法

1.3.1 受试动物分组及药物用量 实验中动物随机分为 6 组,每组 12 只。各种药物用量为:正常组(N.S.)动物不给任何药,只给等量生理盐水及不作任何处理;损伤对照组(N.S.+BCG+LPS);阳性对照组(DDB+ BCG +LPS);实验组 A、实验组 B、实验组 C 为不同剂量的 SSL,剂量依次按生药量为 5mL/kg、10mL / kg、20mL / kg +(BCG+LPS)。见表 1。

表 1 实验分组及药物用量 (n=12)						
组别	N.S.	DDB	SSL/mL·kg ⁻¹			BCG+LPS
	/mL	/mL·kg ⁻¹	5	10	20	
正常组	10	—	—	—	—	—
对照组	10	—	—	—	—	*
阳性对照组	—	20	—	—	—	*
实验组 A	—	—	5	—	—	*
实验组 B	—	—	—	10	—	*
实验组 C	—	—	—	—	20	*

注:* 表示 BCG 和 LPS 仅给药 1 次,BCG 为开始时每鼠尾静脉注射 1mg/0.2mL,LPS 为最后每鼠尾静脉注射 10μ g/0.2mL。

1.3.2 小鼠免疫性肝损伤模型的建立^[4] 动物随机分组,每组 12 只,除正常组外,其余各组小鼠均经尾静脉注射 BCG 1mg/0.2mL,3 h 后,正常组小鼠腹腔注射等容生理盐水

生物学报,2000,16(1): 51~56

[4]Abe S.Molecular biological prognostic markers in lung cancer[J]. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 1997, 98(1):2~7

[5]于秋菊,马兰,景士兵,等.nm23、IV 型胶原、PCNA 在非小细胞肺

癌中表达的临床意义[J].中国肺癌杂志,2001,4(6): 469~470

[6]丁翠敏,徐金升,左连富,等.cyclin D1、P53 蛋白及 DNA 倍体在评价肺癌预后中的作用[J].中国肺癌杂志,2001,4(4): 287~289

(收稿日期: 2005-01-16)

10mg/kg, 给药组小鼠分别不同剂量的 SSL(10mL、15mL、20 mL /kg),连续 10d。最后 1 次给药 3h 后,经尾静脉注射 LPS 10μ g/0.2mL/ 只,诱导小鼠肝损伤。24 h 后,小鼠眼眶取血,分离血清待测。同时脱颈椎处死小鼠,迅速取出肝脏并制备成肝匀浆待测 MDA 含量和 SOD 酶活。

1.3.3 血清酶活性测定 血清 ALT,AST,LDH 活性均用 Olympus AU640 全自动化生化分析仪测定。

1.3.4 肝组织 MDA 含量的测定 采用硫代巴比妥酸(TBA)改进法^[9]测肝组织匀浆 MDA 含量:肝组织用冰冷的 0.15% 氯化钠溶液制成 10%的肝匀浆。加等体积的 SDS 摇匀后,依次加入 20%醋酸缓冲液和 0.67%TBA,摇匀后 95℃水浴 1 h,离心,取上清液于 532nm 波长下比色,以四乙氧基丙烷(TEP)为标准液,建立 TEP 标准曲线(r=0.998,P<0.001),得直线回归方程:Y=0.005661+0.0004989X (Y 为 OD 值,X 为 10nmol / L TEP 的用量 μ L)。测定样本 OD 值,计算每克肝组织(湿重)MDA 的生成量(nmol/g)。

1.3.5 肝组织 SOD 酶活的测定 测肝组织匀浆 SOD 活性采用邻苯三酚自氧化—微量进样法^[4]。采用微量进样器调节邻苯三酚的体积,严格控制其自氧化速率为 0.070 A/min。测试管加入 pH 8.2 的 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL,肝组织匀浆 10μ L,45 mmol /L 邻苯三酚 10μ L 迅速摇匀,在 UV7250 紫外分光光度计上 325 nm 处测吸光值,每 30 s 测 1 次,测 3min。计算ΔA / min 和 SOD 活性。

1.3.6 统计学方法 实验数据用 SPSS8.0 统计软件进行方差分析,数据以($\bar{X} \pm S$)表示。

2 结果

2.1 SSL 对 BCG+LPS 诱发的肝损伤小鼠血清 ALT、AST、LDH 活性的影响 由表 2 结果可以得出:(1)模型对照组较正常对照组各项指标均显著升高,其中 ALT 升高 69.3% (P<0.01),AST 升高 43.5% (P<0.05),LDH 升高 45% (P<0.05),表明 BCG+LPS 染毒后对小鼠肝细胞造成了严重的损伤,动物模型建立成功。(2)D 组与模型对照组相比有显著差异 (P<0.01,P<0.05),DDB 阳性对照有效。(3)SSL 的 B 组和 C 组与模型对照组比较各项指标均有所降低,有统计学意义 (P<0.01,P<0.05),说明 SSL 能减少肝细胞内酶的逸出,对肝细胞有较明显的保护作用;其中 C 组效果更为显著。

2.2 SSL 对 BCG+LPS 诱发的小鼠肝损伤组织中 MDA 含量和 SOD 活性的影响 小鼠依次尾静脉注射 BCG+LPS 后,模型组小鼠肝匀浆 MDA 含量升高 59.4%(P<0.01),SOD 水平降低 49.8% (P<0.01),不同剂量的 SSL 给药组小鼠肝匀浆 MDA 含量低于模型组,SOD 水平高于模型组。其中 SSL

剂量为 20mL/Kg 时,效果极为明显。

表 2 肝损伤小鼠血清 ALT、ALP、AST 和 LDH 的影响 ($\bar{X} \pm S$)						
组别	剂量 /mL·Kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹		AST/U·L ⁻¹		LDH/U·L ⁻¹
正常对照组	—	33.26± 4.35		37.23± 11.15		248.12± 61.20
模型对照组	—	109.22± 9.80**		83.72± 11.61*		451.62± 98.26*
水三仙 A 组	10	108.12± 10.02		79.6± 10.36		273.45± 67.85
水三仙 B 组	15	85.35± 4.34 [△]		71.02± 10.45 [△]		289.16± 79.68
水三仙 C 组	20	63.62± 4.80 ^{△△}		65.41± 9.27 ^{△△}		268.32± 21.10 ^{△△}
1%联苯双酯 D 组	20	64.35± 4.89 ^{△△}		61.2± 5.23 ^{△△}		259.80± 65.22 [△]

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01;与正常组比较,△P<0.05,△△P<0.01。

表 3 肝损伤小鼠 MDA 含量和 SOD 活性的影响 ($\bar{X} \pm S$) μmol/L				
组别	剂量 /mL·Kg ⁻¹	MDA		SOD
正常对照组	—	35.57± 7.25		67.05± 12.86
模型对照组	—	56.55± 7.85**		33.56± 13.09**
水三仙 A 组	10	41.26± 2.48 ^{△△}		55.01± 18.98 [△]
水三仙 B 组	15	37.92± 6.21 ^{△△}		65.02± 21.88 ^{△△}
水三仙 C 组	20	36.27± 3.01 ^{△△}		60.28± 12.78 ^{△△}
1%联苯双酯 D 组	20	49.24± 5.89 ^{△△}		51.66± 18.74 [△]

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01;与正常组比较,△P<0.05,△△P<0.01。

3 讨论

注射微量的 BCG 和 LPS 可诱导小鼠严重的免疫性肝损伤模型类似于人类肝炎发生的病理生理过程,是筛选保肝药物较为理想的模型之一^[5]。小鼠尾静脉注射 BCG 和 LPS 后,引起小鼠血清转氨酶和 LDH 的显著升高,肝匀浆 MDA 的含量显著升高,SOD 水平明显降低,表明造模成功。不同剂量的 SSL 给药组小鼠血清 AST、ALT、LDH 的水平降低,SSL 为 20mL/Kg 时,血清 ALT 含量降低 41.7%,肝匀浆 MDA 的含量明显减少,肝损伤不同程度减轻,表明 SSL 对 BCG 和 LPS 诱导的小鼠免疫性肝损伤具有良好的防护作用。

参考文献

[1]江苏新医学院. 中药大词典[M].上海:上海科学出版社,1996.2 395,3 315,3 692,4 100,4 789

[2]Nagai H, Yakuo I ,Yamada H,et al. Liver injury model in mice for immunopharmacological study [J]. Japan J Pharmacol, 1988: 247~255

[3]向荣,王鼎年. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进[J]. 生物化学与生展,1990,17(3):241~242

[4]沈乃. 超氧化物歧化酶测定[A]. 见:徐叔云,卞如谦,陈修主编. 药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1991.502~504

[5]许建明,徐叔云,梅俏,等. 褪黑素对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,1998,14(5): 452~454

(收稿日期: 2005 - 01-14)

中级按摩师职业资格培训招生

江西省中医药研究院职业技能培训中心 2005 年 6 月起,全年开办全国按摩培训,招收初中以上文化者。培训时间 1 个月,在本院附属医院推拿科边培训边实践。收费 2 500 元(含培训、资料、住宿、办证费)。经理论及手法培训成绩合格者,颁发中华人民共和国职业资格证(中级技术等级),可作

为就业、上岗、晋级、出国劳务的主要依据,全国通用。成绩优秀者可留聘本院或推荐到相关单位工作。有意者与本部余老师电话联系。地址:南昌市文教路 221 号,邮编:330077,电话:0791-8525609、8525621、8525626。从火车站、汽车站乘 11 路公交车到文教路站(青山湖风景区)下即达。