

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.07.0916

## 蕨麻多糖保护 *D*-氨基半乳糖急性肝损伤小鼠的作用机制

闵光涛<sup>1</sup>, 王利军<sup>2</sup>, 段钟平<sup>3</sup>, 闵光宁<sup>2\*</sup>, 贺志云<sup>4</sup>, 王永强<sup>2</sup>

1. 兰州大学第一医院普外科, 兰州 730000
2. 兰州大学第一医院药剂科, 兰州 730000
3. 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心, 北京 100069
4. 兰州大学第二医院结直肠外科, 兰州 730000

**[摘要]** **目的** 考察蕨麻多糖(PAP)对 *D*-氨基半乳糖(*D*-GlaN)诱导的急性肝损伤小鼠肝脏的保护作用机制。

**方法** 60只昆明小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、联苯双酯组(阳性对照)以及PAP 50、100、200 mg/kg各剂量组,每组10只。先分别给予生理盐水、联苯双酯以及不同剂量受试药PAP,然后除正常对照组注射生理盐水外,其余5组均于给药7 d后用8% *D*-GlaN腹腔注射,建立 *D*-GlaN急性肝损伤模型。24 h后处死,测定小鼠肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)等指标。**结果** 模型对照组小鼠肝组织中的MDA含量升高,SOD和GSH-Px活性降低,GSH含量降低,与正常对照组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );联苯双酯以及50、100、200 mg/kg各剂量PAP均可明显降低 *D*-GlaN急性肝损伤小鼠肝组织中的MDA含量,提高SOD和GSH-Px的活性,增加GSH含量,与模型对照组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** PAP对 *D*-GlaN急性肝损伤小鼠肝脏的保护作用可能与其清除自由基、保护细胞膜和抗脂质过氧化有关。

**[关键词]** 蕨麻多糖; *D*-氨基半乳糖; 肝损伤

**[中图分类号]** R 575 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)07-0916-04

## Protective mechanism of *Potentilla anserina* polysaccharide on mice with *D*-galactosamine-induced acute liver injury

MIN Guang-tao<sup>1</sup>, WANG Li-jun<sup>2</sup>, DUAN Zhong-ping<sup>3</sup>, MIN Guang-ning<sup>2\*</sup>, HE Zhi-yun<sup>4</sup>, WANG Yong-qiang<sup>2</sup>

1. Department of General Surgery, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China
2. Department of Pharmacy, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China
3. Artificial Liver Center, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China
4. Department of Colorectal Surgery, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the protective mechanism of *Potentilla anserina* polysaccharide (PAP) on acute liver injury induced by *D*-galactosamine (*D*-GlaN) in mice. **Methods** Sixty Kunming mice were randomly divided into normal control group, model group, bifendate group (positive control) and PAP (50, 100, 200 mg/kg) treated groups, with 10 mice in each group. After treatment with normal saline, bifendate and PAP (50, 100, 200 mg/kg) for 7 days, the mice in normal control group were injected intraperitoneally with normal saline, and those in the other 5 groups were injected intraperitoneally with *D*-GlaN to establish acute liver injury models. All the animals were sacrificed 24 h after model establishment, and the levels of hepatic superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined. **Results** Compared with normal control group, the model group had significantly increased hepatic MDA level ( $P<0.05$ ) and significantly decreased activities of hepatic SOD, GSH-Px and level of GSH ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared

**[收稿日期]** 2015-10-31 **[接受日期]** 2016-01-19

**[基金项目]** 甘肃省自然科学基金(0710RJZA045, 145RJZA043), 中央高校基本科研业务费专项资金(Lzujbky-2012-194), 兰州市科技计划项目(2011-2-45), 兰州大学国家级大学生创新创业训练计划(201610730166). Supported by Natural Science Foundation of Gansu Province (0710RJZA045, 145RJZA043), Fundamental Research Funds for the Central Universities (Lzujbky-2012-194), Science and Technology Plan of Lanzhou Municipality (2011-2-45), and National Level Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Program of Lanzhou University (201610730166).

**[作者简介]** 闵光涛, 硕士, 副主任医师. E-mail: minguangtao@sina.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0931-8356440, E-mail: mgn10@163.com

with the model group, bifendate and 50, 100, 200 mg/kg PAP significantly decreased hepatic MDA level ( $P < 0.05$ ), increased the activities of hepatic SOD, GSH-Px and level of GSH ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in mouse acute liver injury model. **Conclusion** PAP can protect the liver of mice with acute liver injury induced by D-GlaN, which is probably through scavenging free radicals, protecting cell membranes and inhibiting lipid peroxidation.

[Key words] *Potentilla anserina* polysaccharide; D-galactosamine; liver injury

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(7): 916-919]

蕨麻又名人参果、戳玛、卓玛沙曾、延寿果等,为蔷薇科委陵菜属植物鹅绒委陵菜(*Potentilla anserina* L.)的根,为藏医常用药。蕨麻是多年生草本,广泛分布于我国甘肃、青海、宁夏、西藏、山西等10多个省区。蕨麻中含有鞣质、糖类、蛋白质、脂肪酸及委陵菜苷等化学成分<sup>[1-3]</sup>。药理实验结果提示该药具有提高机体免疫力、抗疲劳、耐缺氧和止泻抑菌的作用<sup>[4-5]</sup>。蕨麻中多糖含量丰富,且多糖具有广泛的生理、药理作用,因此推测蕨麻多糖(*Potentilla anserina* polysaccharide, PAP)应为蕨麻的活性成分之一<sup>[6]</sup>。本研究在课题组前期研究PAP对四氧化碳诱导的小鼠肝损伤具有保护作用<sup>[7-8]</sup>的基础上,对PAP保护D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-GalN)肝损伤小鼠的可能作用机制进行了研究。

## 1 材料和方法

1.1 动物 昆明小鼠60只,SPF级,雌雄各半,体质量(18±2)g,由兰州大学医学实验动物中心提供[动物许可证号:SCXK(甘)2009-0004]。

1.2 药品与试剂 PAP(由兰州大学第一医院药物实验室提供,含量为62.3%,临用前用蒸馏水配制所需浓度);联苯双酯滴丸(浙江万邦药业有限公司,批号:20070704,临用前用蒸馏水配制所需浓度的混悬液);D-GalN(重庆医科大学生物医学工程研究所,批号080528,临用前配成8% D-GalN生理盐水溶液,用1 mol/L氢氧化钠溶液调pH至7.0左右)。超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、谷胱甘肽(GSH)试剂盒及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒均购自南京建成生物工程技术有限公司。

1.3 主要仪器 UV-722G紫外可见分光光度计(上海分析仪器厂);D-37520型低温离心机(德国Kendro公司);MA110型分析天平(上海第二分析仪器厂);电热恒温水浴锅(北京科伟永鑫实验仪器设备厂);DY-2型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科

技股份有限公司);WH-861型旋涡混合器(上海环球物化仪器厂);BX51型病理成像分析仪(Olympus公司)。

1.4 动物分组与给药<sup>[9]</sup> 将60只昆明种小鼠按随机数字表随机分为6组:正常对照组,模型对照组,联苯双酯组(阳性对照),PAP 50、100、200 mg/kg 3个剂量组,每组10只。联苯双酯组(200 mg/kg)、受试药PAP各组小鼠均灌胃给予相应的药物,其余各组小鼠均用同等体积生理盐水灌胃,1次/d,每次0.01 mL/g,给药7 d。

1.5 动物模型的建立<sup>[10]</sup> 末次给药1 h后除正常对照组腹腔注射生理盐水外,其余5组均腹腔注射8% D-GalN 0.01 mL/g,造成急性肝损伤模型。造模后禁食,自由饮水,24 h后摘眼球取血,进行相关检测。

1.6 检测指标及方法 小鼠断颈椎处死,剖腹取肾上腺、脾脏、胸腺,用4℃生理盐水冲洗,滤纸吸干,称质量,计算肾上腺系数、脾脏系数、胸腺系数。脏器系数=脏器质量(g)/体质量(g)。

实验结束时,取肝右叶相同部位的一小块肝组织,用预冷至4℃的生理盐水冲洗,滤纸拭干,然后用4℃生理盐水按1:9(W/V)制成10%肝匀浆。在4℃温度下以900×g离心10 min,取上清液,按试剂盒说明书测定肝组织中SOD、GSH-Px的活性及MDA、GSH的含量。

1.7 统计学处理 实验数据采用Excel 2010进行处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用双尾t检验。检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 PAP对D-GlaN急性肝损伤小鼠的肾上腺、脾脏、胸腺的影响 PAP 50 mg/kg治疗组可使D-GlaN急性肝损伤小鼠的肾上腺、胸腺质量增加,但与模型对照组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。PAP 100 mg/kg治疗组对D-GlaN急性肝损伤小鼠

的肾上腺、胸腺质量无明显影响。PAP 200 mg/kg 治疗组可使 D-GlaN 急性肝损伤小鼠的肾上腺、胸腺质量减轻,与模型对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );胸腺系数亦减少,与模型对照

组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PAP 各剂量组的脾脏、脾脏系数与模型对照组相比均有所降低,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。详见表 1。

表 1 PAP 对 D-GlaN 急性肝损伤小鼠的脾脏、胸腺、肾上腺质量及脏器系数的影响

$n=10, \bar{x} \pm s$

指标	正常对照组	模型对照组	联苯双酯组	PAP 组 $\omega_B/(mg \cdot kg^{-1})$		
				50	100	200
体质量 $m/g$	24.63±2.17	22.47±2.84	22.37±1.60	19.98±1.66*	20.07±3.32	20.23±2.19
肾上腺质量 $m/g$	0.008 0±0.001 8	0.008 2±0.001 9	0.008 6±0.001 6	0.012 3±0.014 9	0.008 4±0.004 0	0.006 2±0.001 5*
肾上腺系数	0.000 3±0.000 1	0.000 4±0.000 1	0.000 4±0.000 1	0.000 5±0.000 6	0.000 4±0.000 2	0.000 3±0.000 1
脾脏质量 $m/g$	0.110 2±0.022 1	0.140 8±0.065 7	0.108 5±0.022 9	0.116 8±0.028 4	0.087 0±0.028 0	0.129 2±0.088 3
脾脏系数	0.004 5±0.000 7	0.006 5±0.002 9	0.004 8±0.000 9	0.005 5±0.001 5	0.004 4±0.001 2	0.005 2±0.002 4
胸腺质量 $m/g$	0.103 6±0.018 9	0.094 8±0.020 2	0.191 8±0.283 9	0.167 1±0.269 8	0.084 0±0.028 9	0.052 9±0.024 2**
胸腺系数	0.004 2±0.000 7	0.004 5±0.001 4	0.008 5±0.012 4	0.008 4±0.014 4	0.004 0±0.001 2	0.002 8±0.001 2*

\*  $P < 0.05, ** P < 0.01$  与模型对照组比较。PAP: 蕨麻多糖; D-GlaN: D-氨基半乳糖

2.2 PAP 对 D-GlaN 肝损伤小鼠肝脏 MDA、GSH 含量及 SOD、GSH-Px 活性的影响 模型对照组与正常对照组相比,MDA 含量升高 ( $P < 0.05$ ),GSH 含量降低 ( $P < 0.01$ ),SOD 活性降低 ( $P < 0.05$ ),GSH-Px 活性降低 ( $P < 0.01$ ),说明造模成功。联苯双酯可降低急性肝损伤小鼠肝组织中的 MDA ( $P < 0.01$ ),升高 GSH 含量和 SOD、GSH-Px 活性 ( $P <$

0.05,  $P < 0.01$ ),说明实验方法可行。PAP 50、100、200 mg/kg 各剂量组均不同程度降低急性肝损伤小鼠 MDA 含量,升高 GSH 含量和 SOD、GSH-Px 活性,除 PAP 200 mg/kg 组 GSH-Px 活性与模型对照组相比差异无统计学意义外,其余各组与模型对照组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。详见表 2。

表 2 PAP 对 D-GlaN 急性肝损伤小鼠肝组织 MDA、GSH 含量及 SOD、GSH-Px 活性的影响

$n=10, \bar{x} \pm s$

组别	MDA $m_B/(nmol \cdot mg^{-1})$	GSH $\omega_B/(mg \cdot g^{-1})$	SOD ( $U \cdot mg^{-1}$ )	GSH-Px ( $U \cdot mg^{-1}$ )
正常对照	42.130±8.865*	699.869±364.822**	87.748±6.197*	557.485±241.032**
模型对照	53.205±9.201	132.087±59.352	75.708±11.273	338.177±84.389
联苯双酯	38.441±4.256**	245.808±94.102*	86.502±10.851*	491.431±149.228**
PAP 50 mg/kg	43.349±8.711*	326.113±109.391**	119.187±53.883*	495.230±126.739**
PAP 100 mg/kg	37.664±6.156**	377.320±210.356**	98.224±24.744*	468.504±109.831*
PAP 200 mg/kg	36.281±9.367**	312.396±174.585*	89.615±18.442*	444.837±93.482

\*  $P < 0.05, ** P < 0.01$  与模型对照组比较。PAP: 蕨麻多糖; D-GlaN: D-氨基半乳糖; MDA: 丙二醛; GSH: 谷胱甘肽; SOD: 超氧化物歧化酶; GSH-Px: 谷胱甘肽过氧化物酶

### 3 讨论

从实验结果可以看出 PAP 50 mg/kg 组可使肝损伤小鼠胸腺质量增加,而 200 mg/kg 组可使肝损伤小鼠胸腺质量降低,其可能的机制有待于进一步研究。PAP 低剂量(50 mg/kg)可使肾上腺的质量增加,但由于组内差异比较大,与模型对照组相比差

异没有统计学意义;高剂量(200 mg/kg)可降低 D-GlaN 急性肝损伤小鼠的肾上腺质量,其原因可能与 PAP 对小鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA axis)的影响有关<sup>[11-12]</sup>。

肝损伤时肝脏产生大量的自由基、引起脂质过氧化,由于级联瀑布效应导致肝脏进一步的损伤。通过清除过量的自由基及抗脂质过氧化,可以对肝



脏起到保护作用。SOD可以清除超氧离子自由基,以保护细胞不受自由基损害。GSH-Px是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶,它特异地催化GSH对过氧化氢的还原作用,可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用,在肝损伤发生的过程中起缓解细胞膜损害的作用。GSH-Px是内源性抗氧化系统的重要组成部分,在人体的各组织中以肝脏中的GSH-Px活性最高。MDA是脂质过氧化的最终产物,可严重破坏细胞膜的结构,导致细胞肿胀、坏死。因此,SOD、GSH-Px活性的降低和MDA含量的增加可以间接反映脂质过氧化损害的程度。本实验结果表明,D-GalN可降低小鼠肝组织中的抗氧化酶SOD、GSH-Px活性及抗氧化物GSH的含量,增加脂质过氧化物MDA含量,表明D-GalN引起肝损伤的机制与抗脂质过氧化有关。对D-GalN引起的急性肝损伤动物模型,PAP各剂量组均可降低小鼠肝脏组织中的MDA含量、增高GSH的含量、提高抗氧化酶SOD和GSH-Px的活性,提示PAP可能通过清除自由基、保护细胞膜和抗脂质过氧化而发挥肝细胞保护作用。

研究结果提示,PAP在肝病治疗中可能具有良好的应用前景,其可能的分子机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 吴征镒. 新华本草纲要[M]. 第3册. 上海:上海科学技术出版社,1990:106.
- [2] 青海省药品检验所,青海省藏医药研究所. 中国藏药[M]. 第1册. 上海:上海科学技术出版社,1996:79.
- [3] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京:民族出版社,1997:121.

- [4] 陈炅然,王琴. 蕨麻多糖的提取及其清除自由基的作用[J]. 中国兽医科技,2004,34:59-62.
- [5] HU T J, SHUAI X H, CHEN J R, WEI Y Y, ZHENG R L. Protective effect of a *Potentilla anserina* polysaccharide on oxidative damages in mice[J]. Int J Biol Macromol, 2009, 45: 279-283.
- [6] CHEN J R, YANG Z Q, HU T J, YAN Z T, NIU T X, WANG L, et al. Immunomodulatory activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharide from *Potentilla anserina*[J]. Fitoterapia, 2010, 81: 1117-1124.
- [7] 闵光宁,鹿琼,闵光涛,徐斐,武新安,吴勇杰. 蕨麻多糖的提取及对CCl<sub>4</sub>急性肝损伤的保护作用[J]. 兰州大学学报(医学版),2008,34:5-7.
- [8] 闵光涛,冯颖,闵光宁,王莉,王文婷. 蕨麻提取物保护小鼠四氯化碳急性肝损伤的作用机制[J]. 兰州大学学报(医学版),2012,38:49-52,56.
- [9] 范秋领,金艳,黄才国,冯波,魏善建,缪辉南,等. 鲨鱼肝刺激物的促肝细胞增殖和抗小鼠急性肝损伤作用[J]. 第二军医大学学报,2005,26:227-228.
- FAN Q L, JIN Y, HUANG C G, FENG B, WEI S J, MIAO H N, et al. Shark hepatic stimulator substance promoting proliferation of hepatocyte and preventing acute hepatic injury in mice[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26: 227-228.
- [10] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:1346.
- [11] 艾连中,吴艳,郭本恒,王荫榆. 黄芪多糖的研究进展[J]. 山东食品发酵,2008(1):39-41.
- [12] 林卡莉,辛贻海,李凯丽,陈方,陈会琴. 香菇多糖对荷瘤鼠垂体-肾上腺轴的实验形态学影响[J]. 解剖学杂志,2010,33:333-336.

[本文编辑] 尹茶