

小茴香对肝纤维化大鼠脂质过氧化水平的影响

范 强 阿地力江·伊明[△] 王水泉 甘子明

(新疆医科大学基础医学院解剖学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的:研究小茴香对肝纤维化大鼠的脂质过氧化水平的影响。**方法:**取 Wister 大鼠 100 只,随机取 12 只设为正常组,其余采用四氯化碳(CCL₄)复合因素法复制肝纤维化大鼠模型,复制成功后随机分为模型对照组、小茴香组和复方丹参组(n=12);相应药物干预 8 周后,镜检肝组织形态学改变;全自动生化分析仪检测外周血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平与血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)含量;生化法检测肝组织羟脯氨酸(HYP)与血清丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)活性。**结果:**HE 结果显示:模型组肝脏炎症与脂肪变性明显,经小茴香干预后明显改善。生化检测结果显示:与正常组比较,模型组 ALT、AST 水平显著升高(P<0.05),TP、ALB 含量显著降低(P<0.05),HYP、MDA 含量显著增加(P<0.05),而 SOD、GSH-PX 和 CAT 活性显著降低(P<0.05);与模型组比较,小茴香组 ALT、AST 水平显著下降(P<0.05),TP、ALB 水平显著升高(P<0.05);HYP、MDA 含量显著降低(P<0.05),SOD、GSH-PX 和 CAT 活性显著提高(P<0.05)。**结论:**小茴香的抗肝纤维化作用可能与调节大鼠脂质过氧化水平有关。

关键词:小茴香;肝纤维化;脂质过氧化

中图分类号:Q95-3, R285.5, R575.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)21-4043-04

Effects of foeniculum vulgare mill on lipid peroxidation in rats with liver hepatic fibrosis

FAN Qiang, Adilijiang.Yiming[△], WANG Shui-quan, GAN Zi-ming

(The human anatomy department of preclinical college of Xinjiang Medical university Urumqi, 830011, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of foeniculum vulgare mill on liver fibrosis. **Methods:** 100 Wister rats were randomly divided into 4 groups as control group, model group, foeniculum vulgare mill group, and danshen group. Liver fibrosis models were established by the combination of injecting carbon tetrachloride (CCL₄) subcutaneously. Drugs were lavaged for 8 weeks, rats livers tissue were examined with HE staining; the serum level of alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB) and total protein (TP) were determined using corresponding test kits; the hepatic lipid peroxidation indexes, including malondialdehyde (MDA), Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSH-PX), Catalase (CAT) were measured by biochemical methods; **Results:** Compared with normal group, ALT, AST level and MDA content remarkably increased, level of TP, ALB and SOD activity decreased (P<0.05). Compared with model group, Foeniculum Vulgare Mill group ALT, AST level and MDA content remarkably decreased, level of TP, ALB and SOD, GSH-PX, CAT activity remarkably increased (P<0.05). **Conclusions:** Foeniculum Vulgare Mill can inhibit the hepatic fibrosis and it's probably mechanism is associated with the effect of Foeniculum Vulgare Mill regulate the lipid peroxidation in the liver.

Key words: Foeniculum Vulgare Mill; Hepatic Fibrosis; Lipid Peroxidation

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R285.5, R575.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)21-4043-04

前言

小茴香是维吾尔族医药材,是一种天然抗氧化剂,有对 H₂O₂ 等多种活性氧或自由基不同程度清除和抑制脂质过氧化的作用^[1]。肝纤维化(Hepatic fibrosis, HF)是指肝脏内纤维结缔组织异常增生的病理过程,多是持续性肝损伤或存在促纤维化刺激因子的结果;不少学者认为,氧应激、脂质过氧化可能在肝纤维化损伤过程中起重要作用。本研究通过建立肝纤维化大鼠模型,以中药小茴香和抗氧化中药复方丹参进行治疗性干预,

对小茴香护肝作用和可能的作用机制进行初步研究,为从中草药中筛选具有抗氧化和清除自由基活性的物质,为临床应用和相关药物研发提供可靠的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

取清洁级 Wister 大鼠 100 只,雌雄各半,平均体重(200±20)g,由新疆医科大学实验动物中心提供。大鼠均自由饮水进食,每 12 小时昼夜交替饲养,动物饲养环境温度 20℃,相对湿度 50%±10%。小茴香由医院购买,复方丹参片为广州白云山中药厂出品(批准文号 2009A015);四氯化碳分析纯、MDA 试剂盒、HYP 试剂盒、SOD、GSH-PX 及 CAT 试剂盒、考马斯亮兰试剂盒均从南京建成生物工程公司购买。

作者简介:范强(1971-),男,本科,讲师,研究方向:肝纤维化的实验研究, E-mail: Fanq2010@163.com

△通讯作者:阿地力江·伊明, E-mail: Adlijm@yahoo.com.cn

(收稿日期:2011-06-09 接受日期:2011-07-03)

1.2 实验方法

1.2.1 造模、分组及药物干预 大鼠 100 只,随机取 12 只设为正常对照组,余为造模组,采用复合因素法造模^[2];复制模型成功后随机分为小茴香组、复方丹参组和模型对照组(n=12),以相应药物灌胃干预,小茴香组剂量为 2.16g/kg^[3],复方丹参组剂量按人鼠等效剂量换算法定为 1.02g/kg, 每日 1 次, 干预时间 8 周。

1.2.2 取材与检测 实验终结时, 乙醚法麻醉后下腔静脉取血, 分离血清后部分用全自动生化分析仪检测 ALT、AST、TP、ALB, 余部 -70℃冻存, 以生化法检测血清 MDA、肝组织 HYP 含量和 SOD、GSH-PX 和 CAT 活性, 具体操作过程按试剂盒说明书进行;取肝脏以 4%中性甲醛固定,石蜡包埋保存,制备切片,HE 常规染色,光镜下观察并摄片;肝纤维化分期按照《病毒性肝炎防治方案》的肝纤维化分期标准^[4]进行。

1.2.3 统计学处理 所有数据中计量资料用 进行统计描述, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 纤维化程度以等级资料表示,采用 Ridit 分析,使用统计软件 SPSS 13.0 进行数据处理, 检验水准 $\alpha =0.05$, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

造模大鼠注射 CCL4 后,可见精神萎靡,出现消瘦、厌食、大便稀等情况,并随干预时间延长逐渐加重,造模过程死亡 22 只;而经以不同剂量小茴香干预后,上述情况明显改善;复方丹参组也有一定好转;正常组生长良好,无异常。

2.2 各组大鼠肝组织病理学变化

HE 染色显示: 正常组肝细胞(图 A)多呈单核,大小正常,肝小叶网状纤维完整,整齐,分界清楚,无炎性细胞浸润;肝细胞索以肝小叶中央静脉呈放射状排列;模型组肝脏(图 B)部分肝小叶失去正常结构,肝细胞索排列紊乱,并有炎性细胞浸润;小茴香组和丹参组(图 C、D)可见少量肝细胞呈脂肪变性,肝组织结构完整,无假小叶形成。肝纤维化病变程度比较显示:模型组肝纤维化病变程度较正常组有显著差异($P<0.01$);小茴香组和丹参组比较模型组肝纤维化病变程度均有显著差异 ($P<0.05$)。

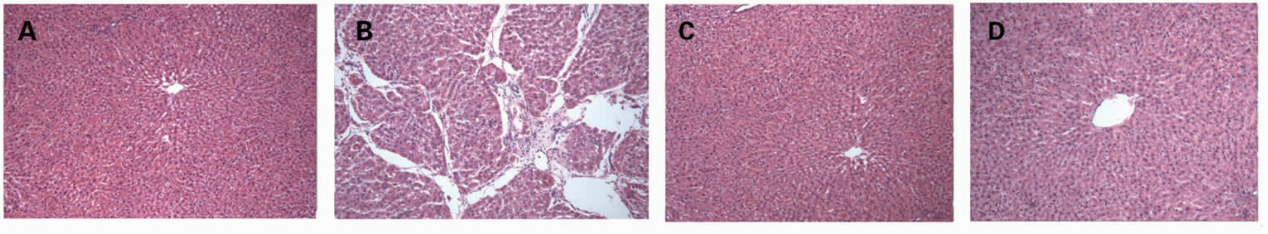


图 各组大鼠肝组织 HE 染色结果(100×): A 正常组;B 模型组;C 小茴香组;D 丹参组

Figure HE dying of different groups in liver tissue(100×): A Control group; B Model group; C Therapy group; D Danshen group

表 1 各组大鼠肝组织病理学变化比较($\bar{x} \pm s$, n=12)

Table 1 Pathological comparison of different groups in liver tissue

Group	S0	S1	S2	S3	S4
Control group	12	0	0	0	0
Model group	0	0	3	7	2**
Therapy group	0	6	5	1	0▲
Danshen group	0	5	5	2	0▲

Note: ★★ $P<0.01$ Compared with the control group; ▲ $P<0.05$ Compared with the model group

2.3 各组大鼠血清肝功能检测结果

模型组 ALT、AST 活性较正常组显著升高($P<0.01$), TP、ALB 含量显著降低 ($P<0.01$); 小茴香组与丹参组 ALT、AST

活性均显著低于模型组而 TP、ALB 含量均显著高于模型组 ($P<0.05$, $P<0.01$);

表 2 各组大鼠大鼠血清肝功能比较($\bar{x} \pm s$, n=12)

Table 2 Hepatic function comparison of different groups in blood serum

Group	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)
Control group	58.1± 5.4	124.1± 4.6	64.75± 5.97	35.43± 2.11
Model group	609.5± 21.6**	635.6± 19.4**	56.02± 3.51**	23.71± 3.54**
Therapy group	236.4± 19.5▲▲■	262.1± 32.9▲▲■	68.06± 4.73▲■	33.35± 2.76▲■
Danshen group	326.2± 23.9▲▲	386.4± 19.2▲	64.39± 7.37▲	29.24± 5.51▲

Note: ★★ $P<0.01$ Compared with the control group; ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$ Compared with the model group; ■ $P<0.05$ Compared with the Danshen group;

2.4 各组大鼠肝 HYP、血清 MDA 含量和 SOD、GSH-PX 及 CAT 活性检测结果

模型组肝脏 HYP、血清 MDA 含量与正常组比较均显著升高 (P<0.01), 血清 SOD、GSH-PX 及 CAT 活性显著下降 (P<

0.01); 小茴香组和丹参组的肝 HYP、血清 MDA 含量均显著低于模型组 (P<0.05), 而血清 SOD、GSH-PX 及 CAT 活性显著高于模型组 (P<0.05);

表 3 各组大鼠 HYP、MDA 含量及 SOD、GSH-PX 及 CAT 活性比较 (x± s, n=12)
Table 3 HYP, MDA, SOD, GSH-PX and CAT comparison of different groups

Group	HYP(μg/mg liver)	MDA (n mol/ml)	SOD(U/ml)	GSH-PX (U)	CAT (U/ml)
Control group	0.278± 0.037	2.66± 0.73	178.61± 23.07	42.65± 2.59	2.25± 0.43
Model group	0.884± 0.212**	11.75± 2.08**	83.08± 22.28**	21.59± 1.88**	1.21± 0.23**
Therapy group	0.498± 0.104▲	5.58± 1.70▲■	150.80± 20.54▲	38.35± 1.83■	2.18± 0.32■
Danshen group	0.533± 0.167▲	7.63± 2.05▲	115.99± 21.11▲	33.11± 2.18▲	1.77± 0.28▲

Note: ★★P<0.01Compared with the control group; ▲P<0.05Compared with the model group; ■P<0.05Compared with the Danshen group

3 讨论

CCL4 复合因素法复制大鼠肝纤维化模型是研究抗肝纤维化药物的良好药理模型, CCL4 除可直接进入动物肝细胞, 破坏肝细胞膜结构, 使肝细胞变性坏死, 还可经肝细胞色素酶 P450 代谢为三氯甲基自由基和三氯甲基过自由基, 引发机体脂质过氧化, 损伤肝细胞, 产生 MDA 等, 促进 HSC 转化、增殖和合成 ECM, 同时抑制 ECM 降解, 导致肝纤维化。实验中模型组的肝功能明显异常, 血清 AST、ALT 显著升高, 而 TP、ALB 明显下降, 表明肝细胞炎症损伤明显, 是肝纤维化发生的重要因素; 而经小茴香干预后可见模型大鼠 AST、ALT 显著下降, TP、ALB 则升高, 提示异常肝功能得到明显纠正, 同时病理学组织观察也表明该药可显著减轻肝细胞的变性坏死, 抑制肝脏炎症, 提示小茴香能显著减轻大鼠的肝纤维化程度, 具有保肝降酶作用, 有显著抗肝纤维化的作用, 效果明显优于临床广泛应用的活血化瘀药物复方丹参^[5,6]。

肝纤维化是肝脏对多种原因慢性损伤的病理修复反应, 以肝脏细胞外基质代谢失衡、过度增生沉积为特征, 目前认为 HSC 的活化增殖是肝纤维化形成的中心环节。肝脏是脂质过氧化物降解的主要场所, 肝脏发生病变、肝细胞受损时, 必然导致自由基代谢紊乱。自由基除能直接作用于各种信号分子, 促使 HSC 增殖与活化诱导肝纤维化的发生外, 还能攻击肝细胞的各种膜结构, 引起脂质过氧化链式反应, 脂质过氧化损伤可刺激肝星状细胞等的胶原基因与蛋白表达增加, 最终导致肝纤维化的形成, 目前研究表明^[7], 活性氧自由基及其诱导的脂质过氧化是肝脏炎症性损伤发展至肝纤维化的桥梁, 脂质过氧化产物是直接刺激胶原基因转录的重要因素。

CCL4 可引起肝脏脂质过氧化, 活性氧自由基可使核酸链断裂和不饱和脂肪酸过氧化, 进而造成膜损伤, 线粒体氧化磷酸化等影响, 最终导致脂质过氧化链式反应的产生。MDA 是自由基脂质过氧化的终末产物, 其含量高低可间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度和体内自由基过氧化的水平。肝纤维化主要为胶原增生沉积为主, HYP 是胶原特有的氨基酸, 反应胶原的生成水平^[8], 能特异的反映胶原增生与肝纤维化程度。机体在生命过程中通过主要抗氧化酶 SOD、GSH-PX 和 CAT 的

系列催化反应将自由基转化为 O₂ 和 CO₂, 拮抗氧应激, 抑制自由基启动的脂质过氧化反应; SOD 是超氧阴离子的主要清除者, 它可以把自由基反应的始动因子超氧化阴离子催化分解为 H₂O₂, 并进一步通过 CAT 转化生成 O₂ 和 H₂O; GSH-PX 是机体内重要的过氧化物分解酶, H₂O₂ 也可通过 GSH-PX 的催化和还原型谷胱甘肽 (GSH) 反应生成 H₂O, 同时生成 GSH, 起到保护生物膜结构和功能完整性的作用。抗氧化酶 SOD、GSH-PX 和 CAT 活性的高低可间接反映机体清除氧自由基的能力。实验中模型大鼠血清 SOD、GSH-PX 和 CAT 活性下降, 而肝 HYP 与血清 MDA 含量明显增加, 提示 CCL4 可引起明显的脂质过氧化, 产生大量的自由基和脂质过氧化物, 消耗了抗氧化酶 SOD、GSH-PX 和 CAT, 从而使机体的抗氧化损伤的防御机制受损, 不能清除过多的自由基而导致肝损伤; 模型组脂质过氧化反应增强, 且与肝纤维化病理密切相关, 与相关报道^[9,10]一致; 同时可见, 小茴香能显著降低模型大鼠肝组织 HYP 含量, 改善肝组织结构, 减轻肝脏胶原沉积, 提示该药具有良好抗肝纤维化作用, 而且该药能显著提高大鼠血清 SOD、GSH-PX 和 CAT 的活性, 显著降低血清 MDA 含量, 作用与具有消除氧自由基、调节多种抗氧化酶活性并有直接抗氧化作用的丹参相似, 具有良好抗肝脏脂质过氧化作用, 提示通过增强机体抗氧化酶 SOD、GSH-PX 和 CAT 的活性这一途径从而抑制脂质过氧化水平可能是小茴香抗肝纤维化作用的机理之一, 但其具体的作用机制还需进一步深入研究。

参考文献 (Reference)

[1] 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都热依木·玉素甫. 小茴香和洋茴香对多种活性氧的清除作用研究[J]. 维吾尔医药杂志, 1998, 1:38-40
Hamulati, Abudureyimu. The Elimination Effect of propofol on reactive oxygen species about Foeniculum Vulgare Mill and Pimpinella anisum L[J]. Uygur Medical Journal, 1998, 1:38-40

[2] 韩德五, 卢良威, 张永生. 大鼠肝纤维化模型复制探究[J]. 浙江中医学院学报, 2000, 24(3):9-12
HanDe-wu, LuLiang-wei, ZhangYong-sheng. Research of Hepatic Fibrosis Model of Rats Built [J]. Journal of ZheJiang College of Traditional Chinese Medicine, 2000, 24(3):9-12

[3] 甘子明, 方志远. 中药小茴香对大鼠肝纤维化的预防作用[J]. 新疆医科大学学报, 2004, 27(6):56-58.

GanZi-ming,FangZhi-yuan. Effection of foeniculum vnlgare mill on CCL4-induced liver fibrosis in rats [J]. Journal of XinJiang Medical University, 2004, 27 (6):56- 58.

[4] 中华肝脏病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. 中华肝脏病杂志,02,10(5):327-328
Hepatic Fibrosis Study Group of Chinese Liver Diseases Association. Consensus on evaluation of the diagnosis and efficacy of hepatic fibrosis. Chinese Journal of Hepatology, 02,10(5):327-328

[5] 薛慧明,胡义扬,顾宏图,等.丹参抗 CCL4 及 DMN 诱导的大鼠肝纤维化的研究[J].中西医结合肝病杂志,2009,9 (4) :16-17
XueHui-ming,HuYi-yang,GuHong-tu, et al. Research of Danshen on CCL4-induced and DMN-induced liver fibrosis in rats [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases, 2009,9 (4) :16-17

[6] 刘永刚,陈厚昌,蒋毅萍.丹参酮对四氯化碳致大鼠肝纤维化的实验研究[J].中药材,2006,2 (1) :31-32

LiuYong-gang,ChenHou-chang,JiangYi-ping. Effect of Tanshinone on CCL4-induced liver fibrosis in rats [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2006,2 (1) :31-32

[7] Rambaldi A, Gluud C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis and cirrhosis [J].Cochrane Database Syst Rev, 2005, (2): CD002148

[8] Siciliano M, Annicchiarico BE, FRANCESCHELLI A. Erythropoietin secretion in patients with liver cirrhosis [J]. Scand J Gastroenterol, 2005 , 40(1):122-123

[9] 李石.肝纤维化发生机制[J].中华消化杂志,1999,19 (1) :48-50
Li Shi. Research of pathogenic mechanisms in hepatic fibrosis [J]. Chinese Journal of Digestion, 1999,19 (1) :48-50

[10] FANG HL, LAI JJ, LIN WL, et al. A fermented substance from Aspergillus phoenicis reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. Biosci Biotechnol Biochem 2007;71 (5) :1154-1161

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001;2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN: 978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法 and 应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。