· 实验研究 ·

火棘多糖对 CCl_4 所致大鼠肝损伤保护作用*

袁成福, 李志红, 彭帆, 肖方祥

摘　要: 目的　探讨火棘多糖对四氯化碳(CCl_4)所致大鼠肝损伤的保护作用。**方法**　将 50 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组: 对照组, CCl_4 模型组, 联苯双酯(BP)组, 火棘多糖 200、400 mg/kg 组。对照组大鼠中腹膜下注射橄榄油, 其余各组大鼠腹膜下注射 30% CCl_4, 联苯双酯组、火棘多糖组分别灌胃 BP 200 mg/kg, 火棘多糖 200、400 mg/kg。5 周后, 测定血清中丙氨酸转氨酶(ALT)及天冬氨酸转氨酶(AST)含量; 检测肝组织中丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量及总抗氧化能力(T-AOC)活性; 用 real time PCR 检测大鼠肝组织中核因子相关因子 2(Nrf2)及过氧化氢酶(CAT) mRNA 表达变化。**结果**　与 CCl_4 模型组大鼠血清 ALT、AST 含量[(521.42 ± 68.21)、(589.17 ± 39.44) U/L]比较, 火棘多糖 200、400 mg/kg 组大鼠血清 ALT、AST 含量[分别为(221.13 ± 28.46)、(190.31 ± 27.32)与(286.4 ± 31.57)、(224.6 ± 30.52) U/L]明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 CCl_4 模型组大鼠肝组织中丙二醛含量[(32.14 ± 3.26) nmol/mg pro]比较, 火棘多糖 200、400 mg/kg 组大鼠肝组织中丙二醛含量[分别为(23.29 ± 4.38)、(18.67 ± 3.28) nmol/mg pro]明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 CCl_4 模型组大鼠肝组织中 T-AOC 活性[(73.15 ± 9.23) U/mL]比较, 火棘多糖 200、400 mg/kg 组大鼠肝组织中 T-AOC 活性[分别为(106.32 ± 14.23)、(152.31 ± 16.12) U/mL]明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); real time PCR 结果显示, 与 CCl_4 模型组比较, 火棘多糖组大鼠肝组织中 Nrf2 及 CAT mRNA 表达水平增加。**结论**　火棘多糖对 CCl_4 所致大鼠肝损伤具有保护作用, 其机制可能与火棘多糖可提高大鼠抗氧化能力有关。

关键词: 火棘多糖; 四氯化碳(CCl_4); 肝损伤; 抗氧化系统

中图分类号: R 392　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2016)11-1485-03　DOI: 10.11847/zgggws2016-32-11-09

Hepatoprotective effect of *Pyracantha fortuneana* polysaccharides on liver injury induced by CCl_4 in rats

YUAN Cheng-fu, LI Zhi-hong, PENG Fan, et al (*Department of Biochemistry, College of Medical Science, China Three Gorges University, Yichang, Hubei Province* 443002, China)

Abstract: Objective　To study hepatoprotective effect of *Pyracantha fortuneana* polysaccharides on liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl_4) in rats. **Methods**　Fifty Wistar rats were randomly divided into five groups: control group, CCl_4 group, biphenyldicarboxylate pills (BP) group, and 200 and 400 mg/kg *Pyracantha fortuneana* polysaccharides groups. The rats of control group were given olive oil by intraperitoneal injection (IP) and those of other groups were given 30% CCl_4 by IP, respectively. The rats of BP group were given BP (200 mg/kg) by gavage and the rats of *Pyracantha fortuneana* polysaccharides groups were given *Pyracantha fortuneana* polysaccharides of 200 and 400 mg/kg by gavage, respectively. Five weeks after the treatments, the contents of serum alanine transferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were determined; the levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and the activity of total antioxidative capacity (T-AOC) in liver were measured. The mRNA expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) and catalase (CAT) were detected with real time PCR. **Results**　The serum ALT (221.13 ± 28.46 and 190.31 ± 27.32 U/L) and AST (286.4 ± 31.57 and 224.6 ± 30.52 U/L) decreased remarkably in the rats of 200 and 400 mg/kg *Pyracantha fortuneana* polysaccharides groups compared to those of the rats in CCl_4 group (521.42 ± 68.21 and 589.17 ± 39.44 U/L) (all $P < 0.05$). The MDA (23.29 ± 4.38 and 18.67 ± 3.28 nmol/mg pro) in liver of the rats of 200 and 400 mg/kg *Pyracantha fortuneana* polysaccharides groups decreased remarkably compared to that of rats in the CCl_4 group (both $P < 0.05$). The T-AOC (106.32 ± 14.23 and 152.31 ± 16.12 U/mL) in liver of the rats in 200 and 400 mg/kg *Pyracantha fortuneana* polysaccharides groups increased significantly compared to that (73.15 ± 9.23 U/mL) of the rats in CCl_4 group (both $P < 0.05$). The mRNA expression levels of Nrf2 and CAT increased in the liver of rats in *Pyracantha fortuneana* polysaccharides groups compared with those of the rats in CCl_4 group. **Conclusion**　*Pyracantha fortuneana* polysaccharides administration is effective in attenuating CCl_4-induced liver injury and the effects may be related to the enhancement of antioxidant activity of *Pyracantha fortuneana* polysaccharides in rats.

Key words: *Pyracantha fortuneana* polysaccharides; carbon tetrachloride; liver injury; antioxidant system

* **基金项目**: 国家自然科学基金(30800410; 81550029); 湖北省自然科学基金(2015CFB198); 三峡大学人才启动基金(KJ2014B064); 宜昌市科学技术局项目(A16 - 301 - 31); 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室基金(2015KZL02)

作者单位: 三峡大学医学院生物化学教研室, 湖北 宜昌 443002

作者简介: 袁成福(1976 -), 男, 湖北人, 副教授, 博士, 主要从事天然产物活性研究。

通讯作者: 肖方祥, E-mail: yuancf46@163.com

数字出版日期: 2016 - 2 - 23 7:59

数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160223.0759.008.html

肝脏在调节物质代谢及有害物质解毒方面发挥重要作用,易受到药物及其代谢产物攻击而发生损伤[1]。研究表明,氧化应激反应涉及到炎症及随后的组织损伤;有毒化学物质能通过 O_2^-、HO^- 及 H_2O_2 等引起肝细胞膜的脂质过氧化反应,从而导致肝脏损伤[2]。四氯化碳(CCl_4)是一种广泛用作肝损伤动物模型的有毒物质,它可通过激活细胞色素 P450 系统,诱导产生三氯甲基($-CCl_3$)及过氧三氯甲基($-OOCCl_3$),这些过剩的自由基可与脂质、蛋白质及核酸等大分子结合,从而导致肝脂肪变、肝纤维化及肝硬化,最终导致肝脏损伤[3]。研究表明,多糖有希望成为治疗氧化应激相关性疾病的一种新方式[4]。火棘(*Pyracantha fortuneana Li*)广泛分布于中国西北部,曾被用作中草药治疗消化不良[5];在日本,也被用作增白剂,这可能与其抑制酪氨酸酶的活性有关[6]。研究表明,火棘多糖可增强小鼠免疫功能,这种免疫调节作用与抗氧化作用相关[7]。本研究旨在探讨火棘多糖对 CCl_4 诱导的大鼠肝损伤是否具有保护作用及保护作用机制。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*主要仪器与试剂*　Real time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),HITACHI 全自动生化分析仪(日本日立公司);逆转录、real time PCR 试剂盒及 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司),天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathioe peroxidase, GSH-Px)、总抗氧化能力(total antioxidizing capacity, T-AOC)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2　*火棘果实收集与多糖分离纯化*　在湖北省恩施土家族苗族自治州地区收集成熟火棘果实;将火棘果实干燥研磨成粉末后,用石油醚在 75 ℃脱脂,每次 5 h;将石油醚收集并浸于热水中(45 ℃)过夜;将水提取物在 55 ℃真空离心后用 4 倍体积的乙醇处理,用 trypsin 去蛋白,得到初制多糖,经 0.15 mmol/L NaCl 洗脱、透析并低温冻干,最终产物命名为火棘多糖[7]。用 phenol-H_2SO_4 法检测碳水化合物含量;用 vitriol-carbazole 法检测糖醛酸含量;用 Bradford 法检测蛋白含量;用高效液相色谱法对多糖纯度及单糖成分进行分析[7]。

1.3　*动物分组及处理*　Wistar 大鼠 50 只(雌雄各半),体重 200 ~ 220 g,自由饮食饮水。大鼠由重庆医科大学提供,实验动物生产许可证号:SCXK(渝)2012-0001;大鼠随机分为 5 组(每组 10 只):对照组,CCl_4 模型组,联苯双酯(BP)组(阳性对照),火棘多糖低、高剂量组。对照组大鼠每周 2 次腹膜下注射橄榄油 2 mL/kg;其余组大鼠每周 2 次腹膜下注射 30% CCl_4 2 mL/kg(溶于橄榄油);阳性对照组,火棘多糖低、高剂量组大鼠每日分别灌胃联苯双酯 200 mg/kg,火棘多糖 200、400 mg/kg;5 周后,大鼠禁食 16 h 处死,收集血液及肝组织待检。

1.4　*指标与方法*

1.4.1　血清中肝功能指标检测　取 5 mL 血液样品室温下放置 4 h,8 000 r/min 离心 5 min 分离血清,用全自动生化分析仪检测血清中 ALT、AST 含量。

1.4.2　肝组织中丙二醛、GSH-Px 含量及 T-AOC 活性检测　取肝组织匀浆,检测丙二醛含量、GSH-Px 及 T-AOC 活力,操作根据试剂盒说明书进行。

1.4.3　肝组织中相关因子 mRNA 表达水平检测　采用 Trizol 抽提肝组织中总 RNA;用逆转录试剂盒合成 cDNA;用 primer 3 软件设计核转录相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2)、过氧化氢酶(catalase, CAT)PCR 引物,用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glycolytic glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作内参。引物序列如下:Nrf2 上游引物:5′-GTCAGCTACTCCCAGGTTGC-3′,下游引物:5′-ATCAGGGGTGGTGAAGACTG-3′;CAT 上游引物:5′-CACCTGAAGGACCCTGACAT-3′,下游引物:5′-CCATTCGCATTAACCAGCTT-3′;GAPDH 上游引物:5′-GGCATTGCTCTCAATGACAA-3′,下游引物:5′-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3′。用 SYBR Green mixture 检测相应基因扩增,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达水平。

1.5　*统计分析*　计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,不同组别数据比较采用两独立样本 t 检验;$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　*火棘多糖中单糖成分分析*　高效液相色谱分析结果显示,火棘多糖由木糖、阿拉伯糖、岩藻糖、甘露糖、核糖、鼠李糖、葡糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖及半乳糖组成;分子比为 29.8:23.2:25.7:4.1:1.8:3.8:2.9:3.2:2.2:3.3;硒含量为 3.7 μg/g。

2.2　*火棘多糖对肝损伤大鼠肝功能影响(表 1)*　与对照组比较,CCl_4 模型组大鼠血清中 ALT 及 AST 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 CCl_4 模型组比较,阳性对照组、火棘多糖 200、400 mg/kg 组大鼠血清中 ALT 及 AST 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2.3　*火棘多糖对肝损伤大鼠肝组织中氧化应激指标影响(表 2)*　与对照组比较,CCl_4 模型组大鼠肝组织中丙二醛含量明显上升、GSH-Px 及 T-AOC 活力明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);与

表 1　火棘多糖对肝损伤大鼠血清 AST、ALT 水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别(mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
对照组	110.14 ± 22.12	123.14 ± 18.21
CCl_4 模型组	521.42 ± 68.21[a]	589.17 ± 39.44[a]
阳性对照组	163.22 ± 47.01[b]	194.31 ± 26.21[b]
火棘多糖 200	221.13 ± 28.46[c]	286.40 ± 31.57[c]
400	190.31 ± 27.32[b]	224.60 ± 30.52[b]

注：与对照组比较，a $P < 0.01$；与 CCl_4 模型组比较，b $P < 0.01$，c $P < 0.05$。

CCl_4 模型组比较，阳性对照组、火棘多糖组大鼠肝组织中丙二醛含量明显降低，GSH-Px 及 T-AOC 活力明显升高，差异有统计学意义（$P < 0.01$ 或 $P < 0.05$）。

表 2　火棘多糖对大鼠肝组织中氧化应激指标影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 (mg/kg)	MDA (nmol/mg pro)	GSH-Px (mg/g pro)	T-AOC 活性 (U/mL)
对照组	11.17 ± 2.41	28.14 ± 5.67	185.11 ± 21.21
CCl_4 模型组	32.14 ± 3.26[a]	6.24 ± 2.34[a]	73.15 ± 9.23[a]
阳性对照组	14.34 ± 2.77[b]	23.21 ± 4.39[b]	171.20 ± 19.13[b]
火棘多糖 200	23.29 ± 4.38[c]	16.87 ± 3.28[c]	106.32 ± 14.23[c]
400	18.67 ± 3.28[b]	19.38 ± 5.91[b]	152.31 ± 16.12[b]

注：与对照组比较，a $P < 0.01$；与 CCl_4 模型组比较，b $P < 0.01$，c $P < 0.05$。

2.4　火棘多糖对肝损伤大鼠肝组织中 Nrf2、CAT mRNA 表达影响（表 3）　与对照组比较，CCl_4 模型组大鼠肝组织中 Nrf2、CAT mRNA 表达明显下降，差异有统计学意义（$P < 0.01$）；与 CCl_4 模型组比较，阳性对照组、火棘多糖组大鼠肝组织中 Nrf2、CAT mRNA 表达明显升高，差异有统计学意义（$P < 0.01$ 或 $P < 0.05$）。

表 3　火棘多糖对大鼠肝组织中 Nrf2、CAT mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别(mg/kg)	Nrf2	CAT
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
CCl_4 模型组	0.23 ± 0.04[a]	0.25 ± 0.04[a]
阳性对照组	0.77 ± 0.05[b]	0.76 ± 0.05[b]
火棘多糖 200	0.48 ± 0.05[c]	0.54 ± 0.04[c]
400	0.68 ± 0.05[b]	0.74 ± 0.06[b]

注：与对照组比较，a $P < 0.01$；与 CCl_4 模型组比较，b $P < 0.01$，c $P < 0.05$。

3　讨　论

CCl_4 是一种常被用作制备肝损伤模型的细胞毒物[8-9]，可介导肝脏脂质过氧化反应，导致肝细胞死亡，进而导致血清标志酶（ALT、AST）升高。本研究结果显示，CCl_4 所致大鼠血清中 AST、ALT 酶活性升高，肝脏中丙二醛含量升高，大鼠肝脏中 GSH-Px 及 T-AOC 活性降低；与 CCl_4 模型组大鼠比较，火棘多糖组大鼠血清中 AST、ALT 酶活性降低，肝组织中丙二醛含量降低，大鼠肝脏中 GSH-Px 及 T-AOC 活性升高。提示火棘多糖对 CCl_4 所致大鼠肝损伤具有一定保护作用，其作用机制可能与火棘多糖提高大鼠抗氧化能力有关。氧化应激是肝损伤的主要原因[10]。活性氧（ROS）通过脂质过氧化诱导肝损伤，抗氧化酶如 CAT、GSH-Px 等是针对活性氧及清除自由基的第一道防线；GSH-Px 能催化超氧阴离子形成 H_2O_2，后者再被 CAT 分解为 H_2O，从而发挥针对 ROS 的保护作用。Nrf2 即为核因子相关因子 2，广泛存在多种组织和细胞中，参与氧化应激相关过程。本研究结果显示，与对照组比较，CCl_4 模型组大鼠肝组织中 Nrf2 及 CAT mRNA 表达水平明显下降；与 CCl_4 模型组比较，火棘多糖组大鼠肝组织中 Nrf2 及 CAT mRNA 表达水平明显升高。提示火棘多糖可激活肝组织中 Nrf2，使其进入细胞核内，与核内抗氧化反应元件（ARE）结合，调节下游抗氧化因子（如 CAT）基因表达，从而抵御氧化损伤。

参考文献

[1] Thilakchand KR, Mathai RT, Simon P, et al. Hepatoprotective properties of the Indian gooseberry (*Emblica officinalis Gaertn*): a review[J]. Food and Funct, 2013, 4: 1431 – 1441.

[2] Hsu DZ, Li YH, Chu PY, et al. Attenuation of endotoxin-induced oxidative stress and multiple organ injury by 3,4-methylenedioxyphenol in rats[J]. Shock, 2006, 25: 300 – 305.

[3] Khan RA, Khan MR, Sahreen S. CCl_4-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat[J]. BMC Complement Altern Med, 2012, 178.

[4] Huang X, Li Q, Li H, et al. Neuroprotective and antioxidative effect of cactus polysaccharides *in vivo* and *in vitro*[J]. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29(8): 1211 – 1221.

[5] Deng RF, Wang SG, Li GR. Studies on the nutritional components of the fruit of the wild plant-firethorn[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 1990, 12: 79 – 84.

[6] Van Gelder CWG, Flurkey WH, Wichers HJ. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases[J]. Journal of Phytochemistry, 1997, 45: 1309 – 1323.

[7] Yuan CF, Wang CD, Bu YQ, et al. Antioxidative and immunoprotective effects of *Pyracantha fortuneana* (*Maxim.*) *Li* polysaccharides in mice[J]. Immunol Lett, 2010, 133(1): 14 – 18.

[8] 赵翠霞，袁雪芬，孙莉，等. 富锗灵芝对四氯化碳诱导大鼠肝损伤保护作用[J]. 中国公共卫生，2015，31(2)：196 – 198.

[9] 裴凌鹏. 虾青素对四氯化碳致小鼠急性肝损伤保护作用[J]. 中国公共卫生，2009，25(5)：582 – 584.

[10] 赵丽娜，于燕妮，朱志坚，等. 刺猬信号通路在氟中毒大鼠肝脏中表达及意义[J]. 中国公共卫生，2015，31(9)：1162 – 1166.

收稿日期：2015-10-26　　（解学魁编辑　郑新校对）