

藏药青叶胆对实验性慢性肝损伤小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响

陶爱恩¹, 赵飞亚¹, 黎氏文梅^{2a}, 夏从龙^{2a}, 李水仙^{2b*} (1.云南大学旅游文化学院医学院, 云南 丽江 674199; 2.大理学院, a.药学与化学学院, b.基础医学院, 云南 大理 671000)

摘要: 目的 观察青叶胆对小鼠慢性肝损伤的保护作用及其对小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的调节作用。方法 采用腹腔注射四氯化碳(CCl₄)造成小鼠化学性肝损伤模型, 检测小鼠血清天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、总蛋白(total protein, TP)及总胆红素(total bilirubin, TBI); HE 染色, 观察肝组织形态; 流式细胞术检测 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺阳性细胞数的变化情况, 计算 CD4⁺/CD8⁺比例, 并与模型组和对对照组比较。**结果** 青叶胆对 CCl₄ 造成的小鼠慢性肝脏损伤具有保护作用, 与模型组相比, 能明显降低小鼠血清 ALT、AST 含量($P<0.01$), 升高 TP 含量($P<0.01$); 与模型组相比, 青叶胆低剂量组对 CD3⁺细胞具有下调作用($P<0.05$), 对 CD8⁺细胞的上调作用和对 CD4⁺/CD8⁺比值的下调作用具有显著性差异($P<0.01$); 高剂量组对 CD8⁺细胞的上调作用和对 CD4⁺/CD8⁺比值的下调作用具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 青叶胆对 CCl₄ 诱导的小鼠慢性肝损伤具有保护作用, 其机制可能是通过调节 T 淋巴细胞亚群, 提高免疫功能。

关键词: 藏药; 青叶胆; 慢性肝损伤; T 淋巴细胞亚群; 免疫调节

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)08-0935-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.08.007

引用本文: 陶爱恩, 赵飞亚, 黎氏文梅, 等. 藏药青叶胆对实验性慢性肝损伤小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 935-938.

Effect of Tibetan Medicine *Swertia Mileensis* T. M. Host W. L. Shih on T Lymphocyte Subsets in Mice with Experimental Chronic Liver Injury

TAO Ai'en¹, ZHAO Feiya¹, LISHI Wenmei^{2a}, XIA Conglong^{2a}, LI Shuixian^{2b*} (1.School of Medicine, Tourism and Culture College of Yunnan University, Lijiang 674199, China; 2.Dali University, a.School of Pharmacy and Chemistry, b.School of Basic Medicine, Dali 671000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the protective effect of *Swertia mileensis* T. M. Host W. L. Shih on chronic liver injury in mice and its regulation on spleen T lymphocyte subsets in mice. **METHODS** A model of chemical liver injury in mice was induced by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride(CCl₄). Serum aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), total protein(TP) and total bilirubin(TBI) were detected in mice. HE staining was used to observe liver tissue morphology; flow cytometry was used to detect changes in the number of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ positive cells; the proportion of CD4⁺/CD8⁺ ratio were calculated, and they were compare with the model group and the control group. **RESULTS** *S. mileensis* had protective effects on chronic liver injury induced by CCl₄ in mice, which could significantly decrease serum ALT and AST levels($P<0.01$) and increase TP content compared with model group($P<0.01$). Compared with model group, the low dose group of *S. mileensis* had a down-regulating effect on CD3⁺ cells($P<0.05$), and there was a significant difference in the up-regulating effect on CD8⁺ cells and the down-regulating effect on the ratio of CD4⁺/CD8⁺($P<0.01$); the high dose group of *S. mileensis* had a statistically significant effect on the up-regulation of CD8⁺ cells and the down-regulation of CD4⁺/CD8⁺ ratio($P<0.05$). **CONCLUSION** *S. mileensis* has protective effect on CCl₄-induced chronic liver injury in mice, and its mechanism may be through the regulation of T lymphocyte subsets, affecting immune function.

KEYWORDS: Tibetan medicine; *Swertia mileensis* T. M. Host W. L. Shih; chronic liver injury; T lymphocyte subsets; immunomodulation

青叶胆又名肝炎草, 来源于龙胆科獐芽菜属植物 *Swertia mileensis* T. M. Host W. L. Shih, 为中国药典 2015 年版黄精收载的基源物种之一^[1], 是

藏医药收载的治疗肝脏疾病的民族药物, 药用部位为全草。目前是我国青叶胆片、利肝康片、黄疸肝炎丸、珍熊胆丸等多种中成药的重要原料。

基金项目: 云南省科技厅科技计划项目(2018FD072); 大理大学青年教师科研基金项目(KYQN201505)

作者简介: 陶爱恩, 男, 硕士, 助教 Tel: 18987245571 E-mail: 2515073996@qq.com *通信作者: 李水仙, 女, 讲师 Tel: 13988555289 E-mail: lsx5289@163.com

主要成分为三萜类、环烯醚萜苷类、酮类、内酯类、糖苷类和生物碱类,具有保肝、镇痛、降血糖、利尿等作用^[2-4]。已有学者对青叶胆抗乙肝病毒进行了研究^[5-8],亦有学者对青叶胆乙醇提取物的保肝利胆活性进行了研究^[9-10],但迄今尚未见青叶胆对实验性慢性肝损伤小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响研究。T 淋巴细胞亚群相对平衡维持着机体的正常免疫功能,在保护机体免受各种疾病侵袭的过程中起着重要的作用^[11-12],CD3⁺是与 T 细胞抗原受体相关联的一种表面抗原,常用于检测成熟 T 细胞数;CD4⁺代表辅助性 T 细胞,其功能为协助 B 细胞、单核及巨噬细胞与杀伤性 T 细胞发挥免疫功能;CD8⁺代表抑制和细胞毒性 T 细胞。在 T 细胞亚群中,CD4⁺/CD8⁺的数量和适当的比例是免疫调节的关键。CD4⁺、CD8⁺彼此相互调节,能表现辅助和抑制的作用,是免疫系统的核心^[13-14]。青叶胆在保护肝损伤的同时对机体 T 淋巴细胞亚群是否还具有调节作用尚不清楚,鉴于此,本实验通过建立小鼠慢性肝损伤模型,研究青叶胆对肝损害的保护作用及对小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的调节,为青叶胆的抗肝胆疾病药物研究和开发利用奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

FD-1C-80 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);RE-2000 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D(III)型循环水式真空磊(巩义市矛华仪器有限责任公司);3-15 型台式高速离心机(Sigma 公司);1580MGR 型台式冷冻离心机(ScanSpeed);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);XFA6000 型全自动动物血细胞分析仪(南京普朗医疗设备有限公司)。

1.2 动物

SPF 级健康昆明种小鼠 50 只,体质量 18~22 g,♀♂各半,昆明医科大学动物实验中心提供,生产许可证号:SCXK(滇)2015-0002。

1.3 药品与试剂

四氯化碳(CCl₄,分析纯,汕头市西陇化工厂有限公司,批号:080103);联苯双酯(浙江万邦药业股份有限公司,批号:A02131017);XFA6000 动物血细胞分析仪用稀释液(批号:PD1501)、HB 探针清洗液(批号:PB9407)、ANI-3D 溶血剂(批号:PF2402)、HB 含酶清洗液(批号:PB7501)均购自

南京普朗医疗设备有限公司;FITC Hamster Anti-Mouse CD3e(批号:553062)、PE Rat Anti-Mouse CD4(批号:553049)、Per-CP Rat Anti-Mouse CD8a(批号:553036)均购自美国 BD 公司。

青叶胆药材采自云南省弥勒县,由大理大学药学院生药教研室夏从龙教授鉴定为青叶胆 *Swertia mileensis* T. M. Host W. L. Shih。将药材粉碎,称取粗粉 1 kg,蒸馏水热浸提取 5 次,过滤,合并滤液、离心,取上清液浓缩,冷冻干燥后得药物干燥粉末,密封保存,待用。

2 方法

2.1 分组及给药

将 50 只小鼠按体质量随机分 5 组(每组♀♂各半),分别为正常组、模型组、阳性药组(0.1 g·kg⁻¹联苯双酯)和青叶胆高剂量组(3.0 g·kg⁻¹)、低剂量组(1.5 g·kg⁻¹)。除正常组给等体积生理盐水外,其余各组均皮下注射 20% CCl₄ 0.02 mL·(10 g)⁻¹,每 3 d 1 次,连续 5 周。造模同时给药,除正常组和模型组灌胃等体积生理盐水外,其余组灌胃给予相应的药物,每天 1 次,连续 5 周。

2.2 肝功能生化检测

末次给药后对各组小鼠禁食不禁水,24 h 后眼内眦静脉丛取血,静置 4 h 后 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清,并送至云南省大理白族自治州人民医院检测丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)、总蛋白(total protein,TP)及总胆红素(total bilirubin,TBI)含量。

2.3 肝组织形态学观察

末次给药后,禁食 24 h,取肝组织,10%甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,切片后 HE 染色,光镜下观察肝脏组织细胞形态学变化。

2.4 T 淋巴细胞亚型的检测

末次给药后,禁食 24 h,无菌操作取脾脏,置于细胞筛网上,用 PBS(含 3%血清)研磨成单细胞悬液,台盼蓝计数,调整细胞浓度为 10⁷·mL⁻¹,取细胞悬液 100 μL 加入流式管中,做 FITC-CD3-Ab、PE-CD4-Ab、Per-Cp-CD8-Ab 抗体染色,用流式细胞仪检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞百分比。

2.5 数据处理

各组实验数据采用统计软件 SPSS 17.0 进行方差分析,均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 肝组织病理变化

正常组小鼠肝细胞排列整齐, 细胞核呈圆形或卵圆形, 细胞大小形态均匀一致, 细胞形态清晰。模型组小鼠肝细胞气球变样, 肿胀或缩小, 排列紊乱, 可见明显的组织损伤并伴有大量炎细胞浸润, 肝细胞肿胀, 胞浆内出现圆形空泡, 有脂肪性病变, 大量肝细胞坏死。青叶胆各剂量给药组肝细胞变性程度减轻, 肝细胞少量坏死, 炎细胞浸润减少, 表明青叶胆对 CCl_4 造成的小鼠急性肝脏损伤具有保护作用, 见图 1。

3.2 青叶胆对肝损伤小鼠肝功能生化指标的影响

对于 CCl_4 诱导的小鼠慢性肝损伤实验中, 模型组 ALT、AST 含量明显升高, 与正常组比较, 差异有显著性($P<0.01$), 说明造模成功。与模型组比较, 阳性药组和青叶胆高、低剂量组的 ALT、AST 含量均明显降低($P<0.01$)。与正常组比较, 模型组 TP 含量降低($P<0.01$)。与模型组比较, 阳性药组和青叶胆高、低剂量组的 TP 含量均明显升高($P<0.01$)。模型组 TBI 含量与正常组相比明显升高($P<0.01$), 阳性药组 TBI 含量较模型组明显下降($P<0.05$), 青叶胆各给药组 TBI 含量与模型组相比无统计学意义, 但 TBI 含量有所下降。结果表明

青叶胆具有保肝作用。结果见表 1。

3.3 青叶胆对肝损伤小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚型的影响

与正常组相比, 模型组 $\text{CD}3^+$ 细胞和 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ 比值上调, $\text{CD}8^+$ 细胞下调($P<0.05$)。与模型组比较, 阳性药组、青叶胆低剂量组对 $\text{CD}3^+$ 细胞具有下调作用($P<0.05$), 青叶胆低剂量组对 $\text{CD}8^+$ 细胞具有上调作用, 对 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ 比值具有下调作用($P<0.01$); 青叶胆高剂量组对 $\text{CD}8^+$ 细胞具有上调作用, 对 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ 比值具有下调作用($P<0.05$)。结果表明, 青叶胆高、低剂量组对肝损伤小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚型 $\text{CD}3^+$ 、 $\text{CD}8^+$ 细胞具有调控作用, 能在一定程度上逆转 CCl_4 所致小鼠脾脏 $\text{CD}3^+$ 细胞、 $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ 比值的上调和 $\text{CD}8^+$ 细胞的下调, 尤以低剂量组效果最为显著。结果见表 2。

4 结论

青叶胆为藏医药中治疗肝炎、黄疸型肝炎、肝胆疾病的民族药, 本研究通过对青叶胆抗慢性肝损伤肝功能和小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的调节研究, 结果发现青叶胆提取物能够明显降低 CCl_4 诱导的慢性肝损伤小鼠 ALT、AST、TBI 含量; 青叶胆提取物给药组的病理组织切片中肝细胞变性程度、细胞坏死明显减轻, 表明青叶胆提取物对

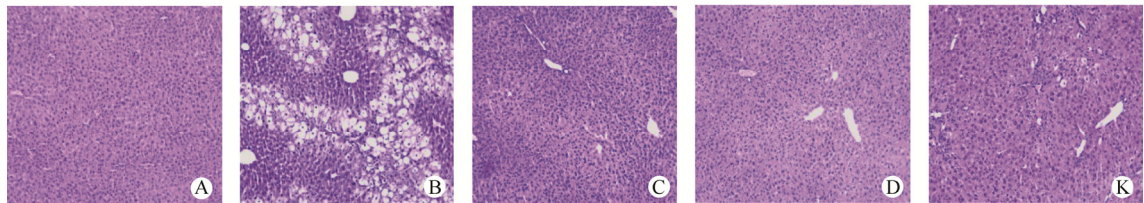


图 1 小鼠肝组织病理切片
A-正常组; B-模型组; C-青叶胆低剂量组; D-青叶胆高剂量组; K-阳性药组。

Fig. 1 Pathological section of mice liver tissue
A-normal group; B-model group; C-low dose group of *Swertia mileensis*; D-high dose group of *Swertia mileensis*; K-positive drug group.

表 1 青叶胆对肝损伤小鼠血清 ALT、AST、TP、TBI 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 1 Effect of *Swertia mileensis* on serum ALT, AST, TP, TBI activity in mice with liver injury($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	TBI/μmol·L ⁻¹
正常组	135.00±23.69	34.00±5.16	76.57±5.84	1.172 7±0.38
模型组	10 778.89±2 474.60 ¹⁾	13 108.75±2 766.30 ¹⁾	55.80±2.44 ¹⁾	11.055 6±2.71 ¹⁾
阳性药组	5 045.45±861.19 ³⁾	1 551.82±342.75 ³⁾	68.13±2.49 ³⁾	8.272 7±1.48 ²⁾
青叶胆组低剂量组	5 862.00±1 222.50 ³⁾	6 396.36±1 208.46 ³⁾	61.98±5.27 ³⁾	10.533 3±2.22
青叶胆组高剂量组	6 978.08±920.43 ³⁾	8 359.96±1 281.43 ³⁾	58.12±8.01 ³⁾	9.711 1±2.31

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表 2 青叶胆对肝损伤小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚型的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 2 Effect of *Swertia mileensis* on T lymphocyte subsets in spleen of mice with liver injury($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	CD3 ⁺ /%	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常组	33.74±5.09	66.93±3.17	26.42±3.73	2.60±0.51
模型组	36.84±5.97 ¹⁾	66.25±4.16	22.83±2.64 ¹⁾	2.90±0.39 ¹⁾
阳性药组	34.89±4.15 ²⁾	65.22±4.33	29.08±4.45 ²⁾	2.30±0.43 ²⁾
青叶胆组低剂量组	35.32±3.82 ²⁾	62.68±7.18	32.75±7.10 ³⁾	1.98±0.69 ³⁾
青叶胆组高剂量组	34.11±6.62	63.50±6.96	30.13±7.68 ²⁾	2.11±0.80 ²⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

CCl₄ 造成的小鼠肝脏损伤具有保护作用, 结果与文献报道一致^[9]。T 淋巴细胞亚群对维持机体正常免疫功能, 保护机体免受疾病侵袭中起重要作用^[11-12], CD4⁺、CD8⁺彼此相互调节, 是免疫系统的核心^[13-14]。本研究对青叶胆提取物抗肝损伤小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚型进行研究, 发现其高、低剂量组对 T 淋巴细胞亚型 CD3⁺、CD8⁺细胞具有调控作用, 能在一定程度上逆转 CCl₄ 所致小鼠脾脏 CD3⁺细胞、CD4⁺/CD8⁺比值的上调和 CD8⁺细胞的下调, 其中低剂量组 CD3⁺、CD8⁺细胞调控作用较高剂量组强, 其原因可能是青叶胆低剂量组在 CD3⁺、CD8⁺细胞调控的作用量效范围内, 对 T 淋巴细胞具有正向促进作用, 而高剂量组可能超过免疫调节的作用范围, 导致作用下降。综上所述, 青叶胆对 CCl₄ 造成的小鼠肝脏损伤具有保护作用, 同时能调控 CD8⁺细胞提高机体的免疫力。本研究为青叶胆抗肝损伤和免疫调节活性成分的进一步研究及其药物的开发奠定基础。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015.
- [2] SHI B S, CHEN Y P, CHEN L J, et al. Advances in studies of chemical constituents and pharmacological effects about *swertia mileensis* [J]. J Kunming Med Univ(昆明医科大学学报), 2017(11): 122-126.
- [3] WU Y Y, YAN Y Y, LIU X L. Analysis of the transcriptome of *Swertia mileensis* based on high-throughput sequencing [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(3): 363-369.
- [4] WANG J Y, TONG Y L, ZHAO W H. Anti-inflammatory activity of swertiamarin and its effect on the expression of NF- κ B pathway-related factors p65 and IKK- α [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(12): 1817-1820.
- [5] GENG C G, JIANG Z Y, MA Y B, et al. Swerilactones A and B, anti-HBV new lactones from a traditional Chinese herb: *Swertia mileensis* as a treatment for viral hepatitis [J]. Org Lett, 2009, 11(18): 4120-4123.
- [6] GENG C G, ZHANG X M, SHEN Y, et al. Swerilactones C and D, anti-HBV new lactones from a traditional Chinese herb: *Swertia mileensis* [J]. Org Lett, 2009, 11(21): 4838-4841.
- [7] GENG C A. ChemInform abstract: swerilactones C (I) and D (II), anti-HBV new lactones from a traditional Chinese herb: *Swertia mileensis* [J]. Cheminform, 2010, 41(10). Doi: 10.1002/chin.201010199.
- [8] GENG C G, WANG L J, ZHANG X M, et al. Anti-hepatitis B virus active lactones from the traditional Chinese herb: *Swertia mileensis* [J]. Chemistry, 2011, 17(14): 3893-3903.
- [9] 王龙, 张雪辉, 何旭. 青叶胆乙醇提取物保肝利胆活性研究 [J]. 邢台学院学报, 2017, 32(4): 173-174, 180.
- [10] GUO Y Q, SHEN L, YANG X Q, et al. Comparative study on six kinds of medicinal plants in Tibetan medicine "Dida" on preventing chronic hepatic injury [J]. J Dali Univ(大理大学学报), 2017, 16(4): 16-19.
- [11] 黄妙珍, 陈芝芸, 严茂祥, 等. 补气养阴解毒方对慢性萎缩性胃炎大鼠表皮生长因子和生长抑素的影响[J]. 浙江中医杂志, 2003, 38(7): 314-316.
- [12] ZHUGE D J, CHENG M, DONG W B, et al. Effects of polysaccharides of cordyceps sinensis mycelium on the number and function of T lymphocytes in tumor-bearing mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(5): 528-533.
- [13] KODAMA M, MURAKAMI K, SATO R, et al. Helicobacter pylori-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(45): 7063-7071.
- [14] CAMPANA D, NORI F, PAGOTTO U, et al. Plasma acylated ghrelin levels are higher in patients with chronic atrophic gastritis [J]. Clin Endocrinol, 2010, 67(5): 761-766.

收稿日期: 2019-07-04

(本文责编: 李艳芳)