

学研究亦表明,刺山柑总生物碱乳膏可使SSc小鼠真皮鳞状上皮变薄,胶原纤维明显减少,皮脂腺增多,炎性细胞浸润明显减少^[4],提示刺山柑总生物碱乳膏对SSc组织纤维化有一定改善作用。

硬皮病的发病机制复杂,主要病理过程之一是成纤维细胞合成胶原增多、分解减少,大量胶原纤维在皮肤、肺、消化道等组织器官沉积,组织器官硬化,出现功能障碍^[5]。SSc胶原纤维主要合成I、III型前胶原,且I型前胶原比例较正常胶原纤维增高,表明本病以I型前胶原增多为主^[6]。Col-I、Col-III过量表达与胶原纤维的持续活化,分泌过量的胶原蛋白相关,将硬皮病胶原纤维培养至第15代,其胶原合成量仍高于正常人,并显示出高胶原合成的特性,因此Col-I客观反映了硬皮病的病理状态^[7]。Hyp是胶原蛋白中一种重要且含量稳定的氨基酸,在其他组织中含量甚微,因此,测定Hyp的含量是检测胶原含量的可靠方法^[6]。本研究发现,刺山柑总生物碱乳膏中、高剂量可降低小鼠皮肤及肺组织Hyp、Col-I含量,提示刺山柑总生物碱乳膏可减少Col-I在组织器官的过度沉积,减轻纤维化程度。

REFERENCES

- [1] LI Y, DENG D Q. Recent advances in the treatment on systemic sclerosis [J]. Chin J Derm Venereol(中国皮肤性病学杂志), 2011, 25(5): 393-396.
- [2] LU X Y, LI M, WENG M W. The expression of type I collagen mRNA and transforming growth factor β 1 in dermal fibroblasts from patients with systemic sclerosis [J]. Chin J Dermatol(中华皮肤科杂志), 2003, 36(9): 490-492.
- [3] LV Q, BIAN H, CHEN Z G, et al. Effects of Wenyang Huazhuo Tongluo recipe contained serum on collagen protein and TGF- β 1 of systemic sclerosis skin fibroblasts [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(16): 184-187.
- [4] KANG X L, HE C H, LIU J, et al. Effect of capparid spinosa total alkaloid on the III type collagen expression in systemic sclerosis mice [J]. J China Med Univ(中国医科大学学报), inpress.
- [5] HE N, LIN Y K, LIU J P. Systemic scleroderma and tissue fibrosis [J]. J Clin Dermatol(临床皮肤科杂志), 2009, 38(8): 546-548.
- [6] LI J B, ZHANG C P, JI J, et al. Effect of acitretin on collagen synthesis and mRNA expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts [J]. Chin J Lepr Skin Dis(中国麻风皮肤病杂志), 2014, 30(7): 397-399.
- [7] YAN X N, HAN S R, LI W B, et al. Effects of Refu Yao on mice models with scleroderma of COL-I and COL-III [J]. Chin J Dermatovenereol Integr Tradit West Med(中国中西医结合皮肤性病学杂志), 2011, 10(6): 353-355.

收稿日期: 2015-07-27

藏药刺柏提取物对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化的保护作用

武燕¹, 何华¹, 刘健² (1.甘肃中医药大学, 兰州 730030; 2.兰州大学第一附属医院, 兰州 730000)

摘要: 目的 研究藏药刺柏提取物(Juniperus extract, JE)对大鼠肝纤维化的保护作用和相关机制。方法 利用CCl₄建立大鼠肝纤维化模型,JE(25, 50 mg·kg⁻¹)连续灌胃给药6周。给药结束后检测血清谷丙转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)以及肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量; HE染色观察肝组织的变化; 应用免疫组化法检测MMP-2的表达。结果 与模型组比较,JE组大鼠血清中ALT、AST水平降低($P<0.05$),同时肝组织中SOD含量增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),50 mg·kg⁻¹ JE组MDA含量降低($P<0.05$); 病理学研究表明,JE组大鼠肝纤维化程度明显改善,50 mg·kg⁻¹ JE组能明显抑制肝组织中MMP-2的表达($P<0.05$)。结论 JE可能通过降低MMP-2的表达减少氧化应激,从而改善CCl₄引起的肝纤维化损伤。

关键词: 刺柏提取物; 肝纤维化; 氧化应激; MMP-2

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)01-0035-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.01.009

Protective Effect of Juniperus Extract on CCl₄-induced Liver Fibrosis of Rats

WU Yan¹, HE Hua¹, LIU Jian² (1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 2. The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

基金项目: 甘肃省科技计划项目(1506RJYA039); 甘肃中医学院中青年科研基金项目(ZQ2014-6)

作者简介: 武燕, 女, 讲师 Tel: (0931)8641182 E-mail: wuyan8188@163.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects and possible mechanism of Juniperus extract(JE) on liver fibrosis. **METHODS** The liver fibrosis model was induced by CCl₄, and JE were administered by gastric perfusion at 25, 50 mg·kg⁻¹ qd for 6 weeks, at the end of the experiment, the contents of alanine transaminase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), superoxide dismutase(SOD), maleic dialdehyde(MDA) and the contents of PINP were measured in liver tissue, the expression of MMP-2 was observed by immunohistochemistry. The pathological changes of liver tissue were examined by HE. **RESULTS** JE(25, 50 mg·kg⁻¹) improved the liver function significantly through reducing the level of ALT, AST ($P<0.05$), and increasing the content of SOD ($P<0.05$ or 0.01), 50 mg·kg⁻¹ JE significantly reduced the content of MDA and the expression of MMP-2($P<0.05$). **CONCLUSION** JE may inhibit the liver fibrosis induced by CCl₄ by decreasing the oxidative stress, the mechanism possibly involves the inhibition of the expression of MMP-2.

KEY WORDS: Juniperus extract; liver fibrosis; oxidative stress; MMP-2

刺柏为柏科植物杜松(*Juniperus rigida* Si. et Zucc.)的干燥嫩枝叶,为蒙医临床常用药,具清热、利尿、补肾等功效,主要用于治疗尿血、尿道疼痛、炭疽、风湿、肾“达日干”、“协日乌素”等病症,主要成分为槲皮苷等^[1]。

慢性肝脏疾病可引起肝纤维化,肝纤维化可能发展为肝硬化甚至肝癌,严重影响人们的健康。早期肝纤维化尚存在可逆性,所以早期干预、阻止肝纤维化的进展是治疗肝病的关键^[2]。研究表明,中药在抗肝纤维化的治疗中具有明显的优势。黄酮类化合物具有较强的抗氧化性和抗肝纤维化活性^[3-4],刺柏中含有一定的黄酮类化合物,有关其药理活性的研究很少。本研究采用 HPLC 对刺柏提取物(*Juniperus extract*, JE)中的黄酮进行定量,并研究其对 CCl₄所致大鼠肝纤维化的保护作用和相关机制。

1 材料

1.1 动物和药材试剂

SD 大鼠,♀♂各半,体质量 250~300 g,由兰州大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK(甘)2009-0004。刺柏样品采于内蒙古自治区锡林浩特,经甘肃中医药大学药学院刘东玲副教授鉴定(槲皮苷的含量为 0.25%)为 *Juniperus rigida*. Et Zucc.;兔抗大鼠 MMP-2 多克隆抗体及免疫组化二抗试剂(RayBiotech, Inc);RIPA 裂解缓冲液(北京迪诺奥生物科技有限公司);谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)试剂盒均购于南京建成生物制品研究所(批号分别为 20140412, 20140415)。

1.2 刺柏提取物的制备

取干燥刺柏粉末以 10 倍量 70%乙醇回流提取,每次 1.5 h,连续提取 3 次后合并提取液,浓

缩得粗黄酮提取物,其中提取物得率为 3%。其主要成分槲皮苷的含量测定依据文献[3]报道的方法测得槲皮苷含量为 0.25%。

1.3 仪器

Z-36HK 台式离心机(德国 Hermel);UV-1800 紫外可见分光光度计(日本岛津);DK-98-1 型数显恒温水浴锅(金坛大地仪器);BS-224-S 型电子分析天平(塞多利斯科学仪器有限公司);Electrophoresis Power Supply-EPS301 电泳仪(GE Health);CR 22G II 型高速冷冻离心机(日立);Image Quant 300 凝胶成像系统(GE Health)。

2 方法

2.1 建模与给药

大鼠随机分为空白对照组、模型组和 JE 25, 50 mg·kg⁻¹ 组($n=6$)。大鼠给予灌胃 50% CCl₄ 花生油溶液 1 mL·kg⁻¹,每周 2 次,JE 组同时每日 1 次灌胃给予 JE 25, 50 mg·kg⁻¹,空白对照组给予等量生理盐水^[5]。连续 6 周后禁食禁水,断尾取血后剖腹取出肝脏用于生化指标检测,并将一部分用福尔马林保存用于病理学研究,一部分在-80℃保存。

2.2 血清及肝脏生化测定

血清的 ALT 和 AST 及肝脏的 SOD 和 MDA 指标测定依据试剂盒说明。

2.3 肝脏病理学研究

福尔马林溶液固定肝组织 24 h 后,脱水透明石蜡包埋,肝脏石蜡切片作 HE 染色,按前期研究方法进行^[6]。

2.4 免疫组化检测 MMP-2 蛋白的表达

取 80~100 mg 冷冻肝脏,加入 RIPA 裂解缓冲液,按照文献[7]描述的方法在 450 nm 处测定吸光度,按照试剂盒计算 MMP-2 值;另外,将防脱切片常规脱蜡、脱水,柠檬酸盐缓冲液高温修复 2 min,冷却后 PBS 冲洗,再用 H₂O₂ 阻断,滴加

MMP-2 多克隆抗体, PBS 冲洗后滴加二抗。脱水透明、封固后光镜下观察^[5]。

2.5 统计学处理

数据用 SPSS 18.0 统计软件进行处理, 实验结果均采用组间差异比较 *t* 检验, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 JE 对大鼠模型血清和肝脏生化指标的影响

模型组与空白对照组比较, 血清中 ALT、AST 和肝脏中 MDA、SOD 活力具有显著性差异 ($P < 0.01$), 说明 CCl_4 造肝纤维化模型成功; $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ JE 治疗组与模型组比较, 血清中 ALT、AST 和肝脏中 MDA、SOD 活力具有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 0.01)。结果见表 1。

3.2 JE 对肝脏组织的病理学改变

空白对照组肝脏的肝小叶结构完整清晰, 呈条索状向四周放射状排列, 无纤维组织增生; 模型组可见灶状坏死, 伴炎性细胞浸润, 并有纤维化症状; JE 治疗组可见肝小叶结构破坏逐渐减轻, 未见纤维组织增生及纤维化, 其中 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组抑制纤维化效果更明显。结果见图 1。

表 1 JE 对大鼠模型血清、肝脏组织中相关生化指标及 MMP-2 表达的影响

Tab. 1 Effects of JE on the levels of of serum and liver tissue and the expression of MMP-2 protein

组别	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/NU·mL ⁻¹	MMP-2
空白对照组	36.5±10.3	58.4±14.8	5.4±0.8	72.3±8.5	2.46±0.79
模型组	108.4±22.7 ¹⁾	113.3±20.5 ¹⁾	14.2±1.3 ¹⁾	36.2±7.3 ¹⁾	9.15±2.20 ¹⁾
JE(25 mg·kg ⁻¹)	78.9±18.5 ²⁾	80.2±17.6 ²⁾	10.4±1.0	52.9±7.7 ²⁾	6.12±1.16
JE(50 mg·kg ⁻¹)	62.9±12.0 ²⁾	71.2±15.9 ²⁾	7.5±1.4 ²⁾	74.6±6.8 ³⁾	5.18±0.85 ²⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

Note: compared with blank control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$.

4 讨论

肝纤维化是多种原因引起的慢性肝损害所致的病理改变, 表现为细胞外基质在肝内过度的沉积, 并影响肝功能。多数慢性肝病患者都有不同程度的肝纤维化, 早期肝纤维化尚存在可逆性, 所以早期干预、阻止肝纤维化的进展是预防肝硬化发生、发展的关键^[6,8]。

本研究发现, 与模型组相比, JE 治疗组能够降低血清中 ALT、AST 的表达, 明显增加肝脏中的酶类活性氧清除剂 SOD, 以及抑制 MDA 增多。说明 JE 能明显改善 CCl_4 所致的肝脏纤维化程度。在肝纤维化的形成过程中, MMP-2 与肝纤维化密切相关, 肝脏纤维化早期, 活化的 MMP-2 可以降低基底膜中的 IV 型胶原蛋白支架, 破坏正常基底

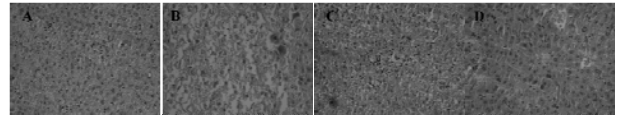


图 1 大鼠肝脏在 HE 染色后的病理学变化(40×)

A-空白对照组; B-模型组; C-JE $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; D-JE $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

Fig. 1 Histological examination of liver tissue sections stained with HE(40×)

A-normal group; B-model group; C-JE $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; D-JE $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

3.3 JE 对肝脏组织 MMP-2 的影响

空白对照组 MMP-2 表达很弱, 仅散在分布在肝细胞周围, 显色较浅; 模型组 MMP-2 表达增强, 肝小叶周围着色较深, 与空白对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$); JE $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 MMP-2 表达量明显减弱 ($P < 0.05$), 仅呈现微弱着色, 肝细胞也仅见少量着色。结果见图 2 和表 1。

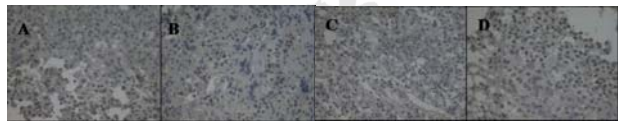


图 2 JE 对大鼠 MMP-2 表达的影响(40×)

A-空白对照组; B-模型组; C-JE $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; D-JE $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

Fig. 2 Immunohistochemical expression of MMP-2 protein in rats(40×)

A-normal group; B-model group; C-JE $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; D-JE $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

膜结构, 进而影响肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)微环境, 促进 HSCs 激活, 从而参与肝脏纤维化启动^[8]。综上所述, 本研究表明 JE 能抑制 MMP-2 的表达, 且与剂量呈量效关系, 提示 JE 可通过抑制 MMP-2 的表达来调控脂质过氧化反应, 达到抗纤维化作用。

REFERENCES

- [1] 边巴顿珠, 索朗. 藏药刺柏膏质量标准的研究[J]. 西藏科技, 2013, 38(3): 71-72.
- [2] CUI H J, BA D M, LIN Y. Quantification of quercitrin in Juniper leaves [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2013, 25(2): 221-223.
- [3] SHEN N, HUANG X D, LI Z W, et al. Effects of hemerocallis citrine baroni flavonoids on CCl_4 -induced liver fibrosis of rats [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2015, 50(5): 547-551.

- [4] OU S Y, LUO W S, JIN Y L, et al. Effect of total flavone from *Litchi chinensis* Sonn on expression of MMP-2 in rats livers with hepatic fibrosis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(13): 209-212.
- [5] WANG R, WANG Y Y, WANG Y J, et al. Molecular mechanism of salvianolic acid A prevention against hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2014, 12 (11): 1083-1087.
- [6] WU Y, WU S M. Protective effects of extracts of *Sibraea angustata* on hepatic injury induced by combining isoniazid

with rifampicin in mice [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2010, 30(19): 1472-1473.

[7] 白辰, 车念聪, 刘文兰. 一贯煎对大鼠肝纤维化拮抗作用的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 815-817.

[8] LOU J L, CHEN H, JIANG M N, et al. Effect of herb medicine Gan-fu-kang on the expression of JNK, and MMP-2, TIMP-2 in rat fibrotic model [J]. Prog Mod Biomed(中华中医药杂志), 2009, 23(9): 4411-4414.

收稿日期: 2015-07-04

红景天主要成分对小鼠免疫细胞的促增殖转化作用

陈伟, 马小琴, 范文玺, 周凡^{*} (新疆华世丹药物研究有限责任公司, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 观察红景天中主要成分红景天苷、昔元酪醇、络塞维对小鼠免疫系统的保护作用。方法 以 Giemsa 染色法、MTT 法及 NO 检测法等为研究手段, 分析不同浓度红景天苷、酪醇、络塞维对小鼠外周血 T、B 淋巴细胞、小鼠外周血白细胞及小鼠腹腔巨噬细胞等具有代表意义的免疫细胞活性及功能的影响。结果 红景天苷能够促进 T/B 淋巴细胞的转化及增殖, 对外周血白细胞及腹腔巨噬细胞的吞噬能力有显著的提升作用。昔元酪醇(62.5~250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)能够特异性的刺激 B 淋巴细胞的增殖和转化($P<0.05$), 且作用效果高于阳性药物组。络塞维则对静止型 T 细胞向母细胞转化具有显著的促进作用($P<0.05$)。结论 不同红景天主要成分在体外会对不同的免疫靶细胞起作用, 具有细胞免疫和体液免疫功能, 同时能提高单核细胞的吞噬能力, 免疫活性广泛。

关键词: 红景天苷; 昔元酪醇; 络塞维; T/B 细胞; 白细胞; 细胞转化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)01-0038-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.01.010

Major Efficacy Component of *Rhodiola* Stimulate Proliferation and Transformation on Mouse Immune Cells

CHEN Wei, MA Xiaoqin, FAN Wenxi, ZHOU Fan^{*} (Xinjiang Hua Shidan Pharmaceutical Research Co., Ltd., Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the immunopotential of salidroside, tyrosol and rosavin of major ingredient of *Rhodiola* on mouse immune system. **METHODS** LPS-induced and ConA-induced mouse peripheral blood lymphocyte proliferation and transformation, and phagocytosis of *Rhodiola* on peripheral blood leukocyte and peritoneal macrophage were analysed by MTT assay, Giemsa staining and NO detection kit. **RESULTS** Compared with solvent control group, the salidroside group could increase proliferation and transformation of T/B cells significantly, and also improved phagocytosis of peripheral blood leukocyte and peritoneal macrophage($P<0.05$). Moreover, there was significant difference between the tyrosol group (62.5–250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and levamisole hydrochloride (positive drug) group on LPS-induced B cells. And rosavin could obviously increase the transformation of mouse T cells compared with solvent control group. **CONCLUSION** Three main active substance of *Rhodiola* can enhance mouse non-specific and specific immune response, and activity of T/B cells and macrophage.

KEY WORDS: salidroside; tyrosol; rosavin; T/B cells; white blood cells; transformation of cell

免疫细胞作为免疫系统中承上启下的组织结构基础, 在机体中具有不可替代的作用^[1]。红景天系景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola*)植物, 多年生草本或亚灌木, 其根及根茎入药。研究表

明红景天具有抗氧化、抗疲劳、抗肿瘤、抗病毒等功效^[2-4]。红景天药物活性成分为红景天苷、昔元酪醇及络塞维(肉桂醇苷)3种, 研究表明红景天主要成分对机体体液免疫和细胞免疫均具有显著

基金项目: 新疆生产建设兵团中小企业科技创新基金(2015AE009)

作者简介: 陈伟, 男, 硕士, 工程师 Tel: 18999864306 E-mail: 285239579@qq.com
E-mail: zhoufan0220@sina.com

^{*}通信作者: 周凡, 女, 硕士, 工程师 Tel: