

重楼总皂苷对 CCl_4 致小鼠肝损伤作用的组织学研究

杨黎江, 沈放, 路斌, 刘子超, 刘凌云
(昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214)

摘要:以四氯化碳(CCl_4)建立小鼠急性肝损伤动物模型,探讨重楼总皂苷对急性化学性肝损伤小鼠肝脏组织的影响.各试验组小鼠先皮下注射 CCl_4 建模,之后小鼠按分组连续 7 d 腹腔注射重楼总皂苷和联苯双酯,于第 9 d 将各组小鼠处死,获取的小鼠肝组织进行石蜡包埋、制片及 HE 染色,采集小鼠肝组织的病理学资料.结果显示,重楼总皂苷对 CCl_4 诱导的急性肝损伤引起的肝细胞坏死和肝实质炎症反应具有修复作用.

关键词:重楼总皂苷;四氯化碳;肝损伤;肝组织

中图分类号:R965.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2017)03-0071-04

DOI:10.14091/j.cnki.kmxyxb.2017.03.017

Histological Analysis of the Total Saponins of *Rhizoma Paridis* on Mice Liver Injury with CCl_4

YANG Lijiang, SHEN Fang, LU Bin, LIU Zichao, LIU Lingyun

(Department of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: To study the effects of the total saponins of *Rhizoma Paridis* on acute chemical liver injury with CCl_4 , mice were employed into liver injury animal models with CCl_4 . All mice were injected CCl_4 in subcutaneous injection into liver injury animal models, and then were divided into two groups randomly and injected the total saponins of *Rhizoma Paridis* or carbon tetrachloride respectively for seven consecutive days. On the 9th day, all mice were dissected for livers. All livers were embedded into paraffin and cut into slices for HE staining. Then HE staining were observed and taken photos with microscope. All HE staining results showed that the total saponins of *Rhizoma Paridis* can repair necrosis of hepatic cells and inflammatory reaction of the liver parenchyma of acute liver injury with CCl_4 .

Key words: total saponins of *Rhizoma Paridis*; carbon tetrachloride; liver injury; liver tissue

重楼(*Rhizoma Paridis*)是百合科重楼属植物,又名云南重楼(*Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. -Mazz.)或七叶一枝花(*Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara.).其干燥根茎入药,中医学归肝经,用于清热解毒,消肿止痛,凉肝定惊.重楼作为一种传统中药材,是我省地方特色中成药云南白药、宫血宁、热毒清、季胜德蛇药片等多种药物的主要原料之一^[1].重楼的化学成分复杂,其中重楼总皂苷活性成分以甾体皂苷类化合物为主^[2],而甾体皂苷具有止血、抑菌、镇静镇痛、抗肿瘤和抗细胞毒等独特的药理活性^[3].但重楼皂苷对肝脏的影响至今鲜有报道.目前,肝脏疾病的发病率较高,且难以根治.而肝脏作为药物在体内代谢的主要场

所,药物不可避免地影响到肝脏的功能.因此,寻找高效、低毒的活性成分已成为保护肝药物研发的热点.本研究采用四氯化碳(CCl_4)建立小鼠急性肝损伤动物模型,以肝脏组织学观察为指标,探讨重楼总皂苷对小鼠化学性肝损伤的保护作用.

1 材料与方法

1.1 材料

重楼总皂苷由昆明学院化学科学与技术系袁琳教授分离制备并提供.用生理盐水将重楼总皂苷配制成质量浓度为 2.5 mg/mL 的样品稀释液.

1.2 仪器和试剂

数显恒温水浴锅(HH-6);天平(瑞士梅特勒

收稿日期:2017-03-08

基金项目:云南省高校特色生物资源开发与利用重点实验室开放基金资助项目(GXKJ201501).

作者简介:杨黎江(1969—),女,云南昆明人,副教授,硕士,主要从事生理学和药理学研究.

公司 METTIER XS205DU);生物组织切片机(LEICA RM2235);显微图像分析系统(MOTIC BA300);恒温培养箱. 选用联苯双酯(浙江万邦药业股份有限公司生产,产品批号:A02130207)作为阳性对照(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$);所用试剂均为国产分析纯.

1.3 动物及分组

选用由昆明医科大学实验动物中心提供(许可证号:2005017)的性成熟健康昆明种小鼠,体质量为25~35 g,雌雄不限. 试验前将小鼠随机分为:正常对照组($n=10$); CCl_4 模型组($n=10$);联苯双酯阳性对照组($n=10$);重楼总皂苷组($n=10$). 之后,小鼠生活于室温条件下1周,正常饮水、进食,自然昼夜交替以适应环境.

1.4 急性肝损伤动物模型建立

用0.35%四氯化碳橄榄油溶液,按0.1 mL/10 g剂量皮下注射. 模型组小鼠皮下注射 CCl_4 后,第9 d称小鼠体质量,之后将小鼠处死. 重楼总皂苷组、阳性对照组小鼠先按0.1 mL/10g剂量皮下注射四氯化碳损伤肝组织,第2 d开始分别按组别连续7 d腹腔注射重楼样品及联苯双酯. 其中,重楼总皂苷组按2.5 mg/mL,0.1 mL/只的剂量腹腔注射;联苯双酯按100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,0.1 mL/只的剂量腹腔注射. 空白对照组试验期间腹腔注射同等体积生理盐水. 其间,每日对小鼠进食及活动情况进行观察,并记录异常情况. 第9 d称小鼠体质量,之后处死小鼠. 各组小鼠处死时,解剖并暴露肝脏,肉眼观察肝脏形态、颜色,之后离体完整肝脏,称肝脏湿质量以获取各组小鼠肝脏指数数据,再取肝脏相同部位固定于苦味酸,石蜡包埋,HE染色并制片.

1.5 小鼠肝组织病理学观察

各组小鼠肝组织经固定、包埋、常规HE染色制片后,采用显微图像分析系统采集小鼠肝组织病理学资料.

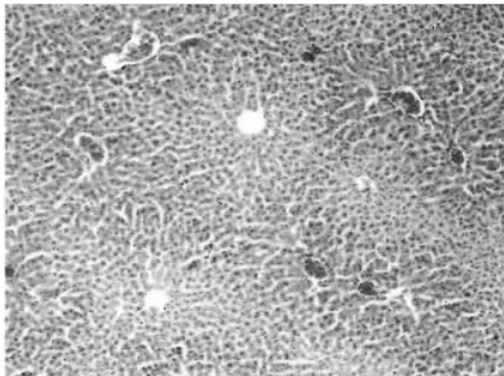


图1 正常对照组小鼠肝脏HE $\times 100$

1.6 数据处理

应用SPSS 17.0 统计分析软件进行数据处理,各组小鼠肝脏系数用(平均数 \pm 标准差)[即($\bar{x} \pm s$)]表示,组间对比用新复极差(Duncan's)检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义.

2 结果

2.1 CCl_4 所致肝损伤对小鼠肝脏指数的影响

计算小鼠肝脏指数可间接反映肝细胞肿胀和炎症反应情况. 各组小鼠处死后,解剖暴露肝脏并肉眼观察,可见正常小鼠肝脏质地软而有弹性,外观颜色均匀呈红褐色. 阳性对照组有部分小鼠肝脏颜色较空白对照组浅,这些小鼠肝脏表面有明显的白色斑点呈均匀分布,且肝脏表面有白色斑块附着,呈增生状. 其他各组小鼠肝脏轮廓清楚,未见瘀血. 各组小鼠肝脏完整离体后于分析天平上称全肝湿质量,按下列公式计算肝脏系数,结果见表1.

肝脏系数 = (肝脏湿质量/体质量) $\times 100\%$.

表1 CCl_4 对小鼠肝脏系数的影响

| 分组 | 体质量/g | 肝脏湿质量/g | 肝脏系数/% |
|--------|------------------|-----------------|--------------------|
| 正常对照组 | 26.27 \pm 1.25 | 1.34 \pm 0.16 | 5.07 \pm 0.40 |
| 模型组 | 31.26 \pm 2.20 | 1.68 \pm 0.14 | 5.37 \pm 0.29 |
| 阳性对照组 | 31.17 \pm 4.14 | 1.98 \pm 0.27 | 6.36 \pm 0.47 ab |
| 重楼总皂苷组 | 30.40 \pm 2.57 | 1.63 \pm 0.16 | 5.38 \pm 0.25 |

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$.

2.2 小鼠肝脏组织病理学观察

经HE染色后,正常对照组小鼠低倍镜下(图1),中央静脉贯穿小叶中央,肝小叶结构完整,分界清晰. 高倍镜下(图2),肝细胞围绕中央静脉呈放射状分布,排列成索状,有的肝细胞索有分支,细胞索相互吻合成网状,肝细胞大小不均,细胞内有1~2个核,核明显且染色深,肝血窦腔隙清晰,其间分布有巨噬细胞.



图2 正常对照组小鼠肝脏HE $\times 400$

模型组小鼠于低倍镜下(图3),肝小叶轮廓模糊,部分区域肝细胞片状溶解、坏死. 高倍镜下(图4),中央静脉受挤压变形,巨噬细胞聚集于静脉周围,

表现炎症细胞浸润现象. 肝细胞体积增大、肿胀,细胞轮廓不清,部分细胞的胞核消失,胞质溶解呈疏松状. 肝索形态不清,肝血窦狭窄甚至消失.

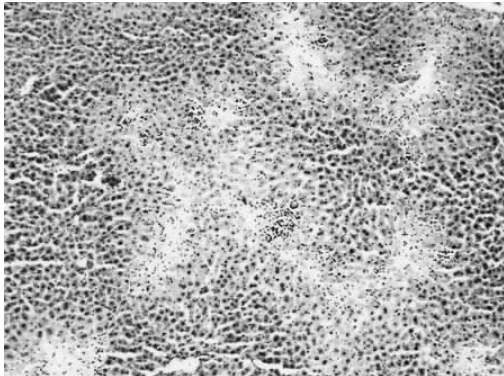


图3 模型 | 组小鼠肝脏HE × 100

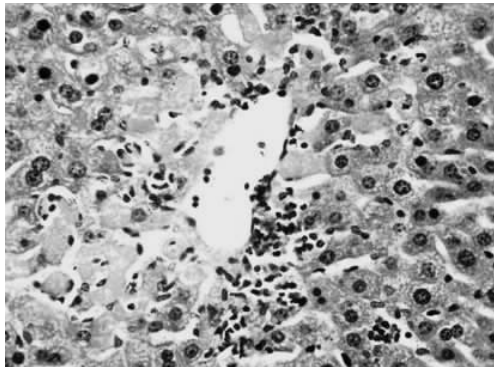


图4 模型 | 组小鼠肝脏HE × 400

重楼总皂苷组小鼠肝脏于低倍镜下(图5),肝小叶结构未见明显异常. 高倍镜下(图6),肝细胞胞质染色均匀,但细胞轮廓不清,多数细胞胞核清

晰,染色深,轮廓清楚,少数细胞内核消失. 细胞索状排列,但肝血窦腔隙不均匀,窦腔间有巨噬细胞分布.

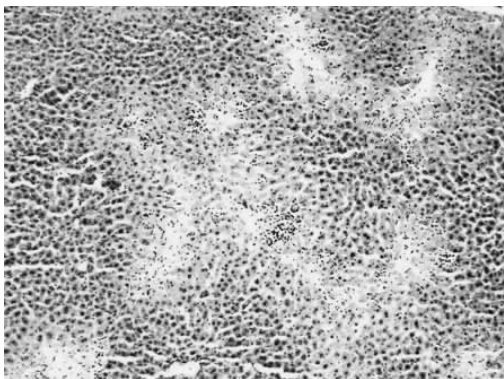


图5 重楼总皂苷组小鼠肝脏HE × 100

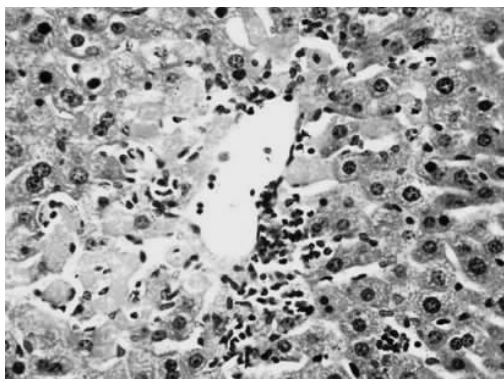


图6 重楼总皂苷组小鼠肝脏HE × 400

阳性对照组小鼠肝脏低倍镜下(图7),中央静脉明显,但肝细胞索状排列不清楚,肝血窦紧缩,使肝小叶分界不清. 高倍镜下(图8),肝细胞轮廓不

清,中央静脉周边细胞的核小,有的细胞内核已消失,部分细胞核周边因胞质溶解消失呈空泡状. 肝血窦完全消失,未见索状排列,巨噬细胞明显减少.



图7 阳性对照组小鼠肝脏HE × 100

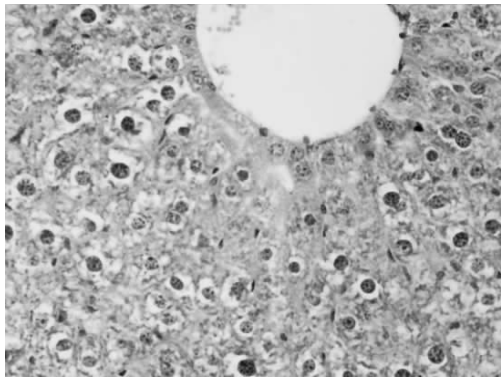


图8 阳性对照组小鼠肝脏HE × 400

3 讨论

本研究采用化学毒性物质四氯化碳(CCl_4)造成急性化学性肝损伤动物模型。 Ca^{2+} 在体内参与许多重要的生理代谢活动,细胞外液中稳定的 Ca^{2+} 对细胞的生命活动极为重要。当 CCl_4 进入动物体内,可损伤细胞膜,使胞外的 Ca^{2+} 涌入胞内并聚集在线粒体,引起线粒体膜的脂质溶解。由于线粒体膜的破坏导致酶系统的异常,引起细胞能量代谢障碍,使肝细胞变性、坏死^[4]。另外,因 CCl_4 直接损伤肝细胞膜造成 Ca^{2+} 内流堆积于细胞内, Ca^{2+} 激活 Ca^{2+} 依赖性磷脂酶,促使细胞膜中的磷脂分解引起变性损伤^[5]。本试验中,尽管就肝指数而言,模型组与正常对照组虽差异无统计学意义($P > 0.05$),但是当小鼠肝细胞膜失去完整性后,一方面肝细胞内物质渗漏,另一方面,导致肝小叶结构破坏,所以高倍镜下(图4)可见细胞轮廓模糊,因细胞外液涌入使肝细胞体积明显增大、肿胀,细胞相互挤压而变形。由于 CCl_4 代谢产物的刺激作用使巨噬细胞数量增加^[4],在炎症细胞浸润区域,细胞溶解、坏死。肝索形态不清,肝血窦狭窄甚至消失,表明建模成功。

重楼总皂苷组小鼠皮下注射 CCl_4 后,连续7 d腹腔注射重楼总皂苷,光镜下(图6)肝细胞轮廓虽不清,但胞质染色均匀,胞核染色深且轮廓清楚,细胞索状排列,但肝血窦腔隙不均匀,未见炎症细胞聚集,巨噬细胞仅在腔隙间有分布。所以重楼总皂苷组、模型组小鼠肝组织结构与正常对照组相比,重楼

总皂苷组肝小叶结构明显优于模型组。该结果提示,重楼总皂苷对 CCl_4 诱导的急性肝损伤引起的肝细胞坏死和肝实质炎症反应具有修复作用。

试验所用阳性对照药物联苯双酯对多种化学性毒物造成的肝损伤具有改善作用,其通过诱导肝细胞微粒体细胞色素P450提高肝的解毒能力,并保护肝细胞^[6]。但在本试验中,该药对 CCl_4 造成的肝损伤未表现出理想的改善作用。分析试验过程,可能与给药途径和药物剂量不足有关。

肝脏作为机体一个重要器官,具有丰富的血液供应和独特的组织形态结构,它承担着代谢、消化、解毒及清除等多方面功能。本试验通过重楼总皂苷对 CCl_4 致小鼠急性化学性肝损伤的组织学研究,可为研发新的高效、安全的保肝护肝药物提供前期实验依据。

[参考文献]

- [1] 何俊,张舒,王红,等.滇重楼植物的研究进展[J].云南植物研究,2006,28(3):271-276.
- [2] 何明生,李秀.重楼药理作用研究进展[J].世界中医药,2012,7(6):579-582.
- [3] 陈清,阎姝.重楼的药理作用及其毒性反应的研究进展[J].医药导报,2012,31(7):886-888.
- [4] 朱安妮,李蕊,刘三海,等.四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤模型的建立与优化[J].中国肝脏病杂志,2014,6(1):27-31.
- [5] 曲相如,孙景春,卢秀花,等.实验性肝损伤动物模型的制备与评价[J].中国实验诊断学,2009,13(10):1477-1479.
- [6] 孙华,魏怀玲,刘耕陶.联苯双酯对肝癌发生的化学预防作用观察[J].解放军医学杂志,2010,35(12):1433-1435.

