

# 双虎清肝颗粒对刀豆球蛋白 A 所致肝损伤的防护作用机制研究

刘添 周建平 李绍旦

**【摘要】 目的** 从一氧化氮(nitric oxide, NO)及总蛋白巯基(total sulfhydryl, TSH)、蛋白巯基(protein-bound sulfhydryl, PSH)的变化来探讨双虎清肝颗粒对刀豆球蛋白 A(Concanavalin A, ConA)所致肝损伤的防护作用机制。**方法** 84 只 BALB/c 雄性小鼠随机分成三组,正常对照组、模型对照组和双虎清肝颗粒组各 28 只。正常对照组给予生理盐水 0.2 ml 尾静脉注射;模型对照组尾静脉注射 ConA(15 mg/kg)生理盐水溶液 0.2 ml;双虎清肝颗粒组每日给予双虎清肝颗粒(5 mg/kg)生理盐水溶液 2 ml 灌胃一次,连续 7 天后再按模型对照组处理。观察 3 小时、6 小时、9 小时及 12 小时时血浆谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)及  $\text{NO}_2^-$  含量以及肝组织 TSH、PSH 含量的变化情况。**结果** 双虎清肝颗粒组各时间点血浆 ALT、AST 及  $\text{NO}_2^-$  的含量与正常对照组比较均无统计学差异( $P > 0.05$ ),而与模型对照组比较均存在显著性差异( $P < 0.05$ )。双虎清肝颗粒组各时间点肝组织 TSH、PSH 含量与正常对照组比较均无统计学差异( $P > 0.05$ ),而与模型对照组比较均有显著性差异( $P < 0.05$ )。**结论** 双虎清肝颗粒防护肝损伤的作用机制可能是通过抑制机体 NO 的生物合成从而降低 NO 含量、阻断肝细胞 TSH 及 PSH 被持续性消耗从而提高肝组织细胞的抗氧化应激能力和解毒能力等方式实现的。

**【关键词】** 双虎清肝颗粒; 肝损伤; 作用机制; 一氧化氮; 巯基

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.12.001

## Mechanism of protective effect of Shuanghu Qingan Granules on hepatic injury induced by ConA

LIU Tian, ZHOU Jian-ping, LI Shao-dan. Department of Hepatobiliary Surgery, Chinese PLA General Hospital, 100853 Beijing, China

Corresponding author: LI Shao-dan, E-mail: lsd301@126.com

**【Abstract】 Objective** Investigate mechanism of protective effect of Shuanghu Qingan Granules on hepatic injury induced by ConA through detecting the level of NO (nitric oxide), TSH (total sulfhydryl) and PSH (protein-bound sulfhydryl). **Methods** 84 male BALB/c mice were randomly divided into three groups. NS (normal saline, 0.2 ml) was injected via the tail vein to be regarded as the normal group. ConA (15 mg/kg) in NS (0.2 ml) was injected via the tail vein to be served as the model group. Shuanghu Qingan Granules (5 mg/kg) was given in NS (2 ml) by intragastric administration everyday in a week before ConA was injected via the tail vein to be served as the Shuanghu Qingan group. Plasma samples for ALT, AST and  $\text{NO}_2^-$  measurements were obtained at 3, 6, 9 and 12 hours after respective treatments in each group, meanwhile content of TSH and PSH of liver tissue homogenate. **Results** In the Shuanghu Qingan group, level of ALT, AST and  $\text{NO}_2^-$  in plasma changed indistinctively at different time, vs the normal group  $P > 0.05$  and vs the model group  $P < 0.05$  respectively. Meanwhile content of TSH and PSH in liver tissue homogenate of the Shuanghu Qingan group also changed indistinctively at different time, vs the normal group  $P > 0.05$  and vs the model group  $P < 0.05$  respectively. **Conclusion** The mechanism of protective effect of Shuanghu Qingan Granules on hepatic injury is partly due to inhibiting the biosynthesis of

基金资助:军队中医药科研专项课题(10ZY2241)

作者单位:100853 北京,解放军总医院肝胆外科[刘添(硕士研究生)],中医科(李绍旦);军事医学科学院毒物药物研究所(周建平)

作者简介:刘添(1988-),2011 级在读硕士研究生。研究方向:肝胆疾病的临床与基础研究。E-mail:liutian301@126.com

通讯作者:李绍旦(1976-),博士,副主任医师。研究方向:中医及中西医结合临床与基础。E-mail:lsd301@126.com

NO significantly and preventing the consumption of TSH and PSH markedly.

**【Key words】** Shuanghu Qingan Granules; Hepatic Injury; Mechanism; NO; Sulfhydryl

研究表明,双虎清肝颗粒具有显著改善肝功能、阻止肝纤维化发展及抗乙型肝炎病毒作用,广泛用于乙型病毒性肝炎等肝病治疗<sup>[1-2]</sup>,但其保肝、护肝的疗效机制尚不明确。刀豆球蛋白 A (concanavalin A, ConA) 诱导所致的 BALB/c 小鼠肝损伤模型,是近来公认的研究人类病毒性肝炎、自身免疫性肝病等的理想动物模型<sup>[3]</sup>。本研究基于 ConA 诱导肝损伤动物模型,通过观察一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及总蛋白巯基 (total sulfhydryl, TSH)、蛋白巯基 (protein-bound sulfhydryl, PSH) 的变化,来探讨双虎清肝颗粒对肝损伤的防护作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康清洁级雄性 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,体重 20~22 g,军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证为 SCXK-(军)2007-004,常规条件饲养,自由饮水进食。

### 1.2 主要试剂

ConA、二硫硝基苯甲酸 (5,5,-dithio-2- nitrobenzoic acid, DTNB)、还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH),均为美国 Sigma 公司产品;NO 检测试剂盒购于北京邦定泰克生物技术公司。双虎清肝颗粒为北京华神制药有限公司产品 (国药准字 Z10980118)。

### 1.3 动物分组

84 只 BALB/c 雄性小鼠随机分成三组,正常对照组、模型对照组和双虎清肝颗粒组各 28 只。

### 1.4 处理方式

正常对照组给予生理盐水 2 ml 灌胃,每天 1 次,连续 7 天,于末次灌胃 4 小时后再一次性给予生理盐水 0.2 ml 尾静脉注射;模型对照组给予生理盐水 2 ml 灌胃,每天 1 次,连续 7 天,于末次灌胃 4 小时后再一次性给予 ConA (剂量按 15 mg/kg) 生理盐水溶液 0.2 ml 尾静脉注射<sup>[4]</sup>;双虎清肝颗粒组动物给予双虎清肝颗粒 (含生药量按 5 g/kg 体质量) 的生理盐水溶液 2 ml 灌胃<sup>[5]</sup>,每天 1 次,连续 7 天,于末次灌胃 4 小时后再一次性给予 ConA (剂量按 15 mg/kg) 生理盐水溶液 0.2 ml 尾静脉注射处理。三组动物在上述处理 6 小时后,分别于 3 小时、6 小时、9 小时及 12 小时四个时间

点分别取 7 只动物眼眶采血,分离血浆;取血后立刻拉颈处死动物,迅速打开腹腔摘取肝右叶,称量 500 mg 肝组织后以生理盐水为介质在冰浴中制成肝匀浆。

### 1.5 血浆谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 测定

由日立 7020 全自动生化分析仪测定。

### 1.6 血浆 NO 代谢产物 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度的测定

采用化学比色法按 NO 检测试剂盒说明书进行。

### 1.7 肝组织匀浆 TSH 含量的测定

取 4% 肝匀浆 0.1 ml,加入 0.2 mol/L Tris-0.02 mol/L EDTA-Na<sub>2</sub> 缓冲液 (pH = 8.2) 0.3 ml,混匀后再依次加入 0.01 mol/L DTNB 20 μl 和无水甲醇 1.58 ml,放置 15 分钟,不时振摇,室温下 7000 rpm 离心 15 分钟后取上清液,用紫外分光光度计于 414 nm 测吸光度。以 GSH 为标准绘制标准曲线,计算出 TSH 含量<sup>[6]</sup>。

### 1.8 肝组织匀浆 PSH 含量的测定

先按下方法测定出非蛋白巯基 (nonprotein sulfhydryl, NPSH) 含量,取 4% 肝匀浆 0.5 ml 加入 10% 三氯乙酸 0.5 ml 后充分混匀,室温下 7000 rpm 离心 15 分钟,取上清 0.6 ml 加入 0.4 mol/L Tris-0.02 mol/L EDTA-Na<sub>2</sub> (pH = 8.9) 1.2 ml 混匀,再加入 0.01 mol/L DTNB 30 μl 混匀,5 分钟内用紫外分光光度计于 414 nm 处测吸光度。以 GSH 为标准绘制标准曲线,计算 NPSH 含量。蛋白巯基含量 PSH = TSH - NPSH<sup>[6]</sup>。

### 1.9 统计学处理

应用 SPSS 12.0 软件包进行统计分析。定量数据用均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用两因素方差分析进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 血浆 ALT、AST 含量的变化

双虎清肝颗粒组各时间点血浆 ALT、AST 含量与正常对照组比较均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。而模型对照组 ALT、AST 呈进行性升高,在 12 小时时分别高达 (323.06 ± 52.95) U/L 和 (740.07 ± 149.01) U/L,与正常对照组、双虎清肝颗粒组比较均有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 三组小鼠在不同时间点的血浆 ALT、AST 含量变化( $U/L, \bar{x} \pm s, n=7$ )

		3 小时	6 小时	9 小时	12 小时
正常对照组	ALT	31.56 $\pm$ 8.16	28.82 $\pm$ 6.92	29.08 $\pm$ 9.34	33.19 $\pm$ 10.52
	AST	103.64 $\pm$ 16.22	106.76 $\pm$ 15.37	117.19 $\pm$ 17.08	111.54 $\pm$ 15.73
模型对照组	ALT	66.24 $\pm$ 15.37	126.12 $\pm$ 21.06 <sup>a</sup>	254.28 $\pm$ 48.91 <sup>bc</sup>	323.06 $\pm$ 52.95 <sup>bc</sup>
	AST	236.49 $\pm$ 24.33 <sup>a</sup>	344.80 $\pm$ 96.41 <sup>a</sup>	628.23 $\pm$ 130.27 <sup>bc</sup>	740.07 $\pm$ 149.01 <sup>bc</sup>
双虎清肝颗粒组	ALT	38.21 $\pm$ 11.34	40.24 $\pm$ 12.07	36.31 $\pm$ 10.89	34.18 $\pm$ 10.74
	AST	122.01 $\pm$ 16.81	119.23 $\pm$ 17.08	126.34 $\pm$ 12.87	120.76 $\pm$ 19.02

注:与正常对照组、双虎清肝颗粒组比较:<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与同组 3 小时、6 小时比较:<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 2 三组小鼠在不同时间点的血浆 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量变化( $\mu mol/L, \bar{x} \pm s, n=7$ )

		3 小时	6 小时	9 小时	12 小时
正常对照组		40.08 $\pm$ 15.81	56.82 $\pm$ 19.62	46.81 $\pm$ 20.07	55.17 $\pm$ 9.37
模型对照组		100.76 $\pm$ 13.12 <sup>a</sup>	187.85 $\pm$ 22.55 <sup>a</sup>	215.37 $\pm$ 20.28 <sup>bc</sup>	94.08 $\pm$ 5.93 <sup>a</sup>
双虎清肝颗粒组		66.97 $\pm$ 21.06	78.75 $\pm$ 19.51	83.54 $\pm$ 25.07	65.14 $\pm$ 7.71

注:与正常对照组、双虎清肝颗粒组比较:<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与同组 3 小时、6 小时比较:<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 3 三组小鼠在不同时间点的肝组织 TSH、PSH 含量变化( $\mu mol/g, \bar{x} \pm s, n=7$ )

		3 小时	6 小时	9 小时	12 小时
正常对照组	TSH	18.92 $\pm$ 3.21	20.26 $\pm$ 1.19	20.73 $\pm$ 2.55	19.86 $\pm$ 1.79
	PSH	15.76 $\pm$ 3.82	16.08 $\pm$ 1.54	16.87 $\pm$ 1.57	16.65 $\pm$ 1.28
模型对照组	TSH	17.12 $\pm$ 1.93	16.94 $\pm$ 2.38 <sup>a</sup>	15.37 $\pm$ 1.82 <sup>a</sup>	12.71 $\pm$ 3.23 <sup>ac</sup>
	PSH	14.01 $\pm$ 2.53	14.14 $\pm$ 2.08 <sup>a</sup>	12.27 $\pm$ 1.63 <sup>ad</sup>	10.08 $\pm$ 3.16 <sup>bef</sup>
双虎清肝颗粒组	TSH	18.91 $\pm$ 1.88	18.67 $\pm$ 1.27	17.09 $\pm$ 3.22	17.34 $\pm$ 2.71
	PSH	15.08 $\pm$ 1.91	15.56 $\pm$ 1.82	14.73 $\pm$ 3.79	14.92 $\pm$ 2.04

注:与正常对照组、双虎清肝颗粒组比较:<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与同组 3 小时、6 小时比较:<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与同组 3 小时比较:<sup>d</sup> $P < 0.05$ ,<sup>e</sup> $P < 0.01$ ;与同组 6 小时比较:<sup>f</sup> $P < 0.05$

## 2.2 血浆 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度的变化

双虎清肝颗粒组各时间点血浆 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量与正常对照组比较均无统计学差异( $P > 0.05$ )。而模型对照组血浆 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 浓度随时间不断升高,在 12 小时时高达(215.37  $\pm$  20.28)  $\mu mol/L$ ,与另两组比较均有非常显著性差异( $P < 0.01$ ),见表 2。

## 2.3 肝组织 TSH、PSH 含量的变化

正常对照组及双虎清肝颗粒组各时间点肝组织 TSH、PSH 含量变化不大。而模型对照组 TSH、PSH 含量均呈下降趋势,在 12 小时时降至最低,与另两组比较均有显著性差异( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),见表 3。

## 3 讨论

双虎清肝颗粒主要成分为金银花、虎杖、黄连、

丹参、法半夏等,其中以金银花、虎杖清热解毒、利湿活血为主,配以白花蛇舌草、黄连、蒲公英等助其清热解毒利湿,以枳实、半夏、瓜蒌等理气化痰,研究表明其能明显减轻肝细胞肿胀、气球样变、脂肪变及炎症坏死,具有保肝、护肝作用<sup>[7-8]</sup>,但其作用机制不明确。ConA 诱导的肝损伤模型是研究病毒性肝炎、自身免疫性肝病等较为理想的实验动物模型,广泛应用于其发病机理及其治疗药物的作用机制研究<sup>[3]</sup>。本研究基于此动物模型,来探讨双虎清肝颗粒防护肝损伤的可能作用机制。

NO 在正常体内有一定量的合成,在组织中处于持续动态平衡的状态<sup>[9]</sup>,并具有广泛生物学效应,其作为一种新型细胞信使分子、自由基及细胞毒性因子,高浓度的 NO 可对机体细胞功能产生多方面影响<sup>[10]</sup>:如作用于细胞膜与线粒体膜,可

导致膜结构破坏和功能紊乱,进而致使细胞死亡;作用于细胞 DNA 使其单链或双链断裂、碱基缺失与错配,从而致使细胞坏死、凋亡;可干扰细胞能量代谢,作用于细胞凋亡基因启动凋亡程序,诱导细胞凋亡;另外其本身作为一种自由基,具有自由基细胞毒性可直接导致细胞损伤、死亡等等。本研究中,ConA 诱导的肝损伤模型组动物血浆 NO 代谢产物  $\text{NO}_2^-$  的浓度随时间延长呈上升趋势,至 12 小时与正常对照组比较有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ),表明体内 NO 生物合成机制被激活;而经双虎清肝颗粒干预后,其血浆  $\text{NO}_2^-$  含量与正常对照组比较均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )、与模型组比较则有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),结合三组血浆 ALT、AST 含量变化,提示双虎清肝颗粒可能是通过抑制机体 NO 的生物合成从而降低了 NO 含量、减少其毒性作用,进而起到防护肝损伤的作用。

细胞内 TSH 具有强烈的抗氧化应激作用和解毒作用,其分为 NPSH 和 PSH,而 PSH 对细胞内酶的功能起决定作用,这些酶对维持细胞稳态及正常功能如离子浓度的调节、主动转运或线粒体代谢功能是十分重要的<sup>[6]</sup>。在本研究中,ConA 诱导的肝损伤模型组动物肝组织 TSH、PSH 水平持续下降,尤其是在 12 小时与正常对照组比较均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),表明细胞巯基逐步消耗而肝细胞损伤逐渐加重;而经双虎清肝颗粒干预后,其肝组织 TSH、PSH 含量与正常对照组比较均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )、与模型组比较则有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),结合三组血浆 ALT、AST 含量变化,由此可以推测,阻断肝细胞 TSH 及 PSH 被持续性消耗从而提高肝组织细胞的抗氧化应激能力和解毒能

力并维持肝细胞稳态,也是双虎清肝颗粒防护肝损伤的作用机制之一。

临床研究已证实双虎清肝颗粒除能保肝护肝外还具有抗纤维化、抗病毒作用<sup>[2,11]</sup>,结合本研究结果,双虎清肝颗粒防护肝损伤的作用机制应该是多方面、多途径的,其治疗肝病的疗效机制有待进一步深入研究明确。

### 参 考 文 献

- [1] 魏国丰,周洪彬. 双虎清肝颗粒联合清开灵注射液治疗急性乙型肝炎 98 例[J]. 中国中医急症,2010,19(7):1218-1219.
- [2] 于占国. 双虎清肝颗粒对慢性乙型肝炎患者肝纤维化的防治作用[J]. 临床合理用药杂志,2009,2(6):7-8.
- [3] 李绍旦,袁本利. ConA 诱导肝细胞损伤机理及 CsA 对其损伤的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2004,13(5):471-474.
- [4] Houghton M, Abrignani S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus[J]. Nature,2005,436(7053):961-966.
- [5] 赵建学,徐国江,陆玮婷,等. 双虎清肝颗粒对四氯化碳诱发大鼠肝损伤模型肝组织基因表达谱的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2004,18(2):145-149.
- [6] 李绍旦,袁本利. 巯基状态在小鼠急性重型肝损伤中的改变[J]. 中国医学杂志,2004,2(5):236-238.
- [7] 靳娟,高海琪,罗改云. 双虎清肝颗粒治疗黄疸型肝炎 120 例[J]. 现代中医药,2010,30(4):25-26.
- [8] 刘敏. 双虎清肝颗粒治疗非酒精性脂肪性肝病 50 例[J]. 世界中西医结合杂志,2010,15(8):701-705.
- [9] Davies IR, Zhang X. Nitric oxide selective electrodes[J]. Methods Enzymol,2008,436:63-95.
- [10] 李绍旦,刘毅,杨明会. 补肾活血饮对帕金森病模型小鼠一氧化氮及 a-肿瘤坏死因子、r-干扰素的影响[J]. 南方医科大学学报,2011,1(31):90-93.
- [11] 刘育民,杨岩. 双虎清肝颗粒治疗 HBV-DNA 低水平复制的慢性乙型肝炎 44 例[J]. 包头医学,2009,33(4):198-199.

(收稿日期:2013-10-10)

(本文编辑:秦楠)

## · 信息之窗 ·

### 《环球中医药》杂志期刊稿件采编系统 2014 年元旦上线

本刊社决定于 2014 年 1 月 1 日起,启用在线期刊稿件采编系统。系统入口位于《环球中医药》杂志官方网站 www.hqzyy.com 首页。

作者投稿本刊,请首先在本刊网站在线注册账号,以该账号登陆稿件采编系统投稿,并可以随时了解稿件编审进度。使用稿件采编系统十分方便作者和编辑的随时交流。

被邀请审阅稿件外审专家则会收到一封采编系统发出的邮件,其中包含账号和预设的密码,以及“查看稿件”、“开始审稿”、“登录系统”等字样的链接,通过点击这些链接实现与采编系统的交互,完成对稿件的评议。

同时编辑部将通过采编系统的短信功能,保持与作者、专家的沟通,保证整个稿件审稿过程的流畅。

结合稿件采编系统上线,本刊网站将重新建设,新版面、新功能、新气象,欢迎浏览。

作者 2013 年所投稿件,继续通过本刊收稿邮箱 hqzyy@163.com 联络,如有问题可拨打本刊编辑部电话 010-65269860 交流。