

· 论著 ·

鳖甲寡肽 I-C-F-6 抗酒精诱导小鼠急性肝损伤活性研究

徐士勋 王咪娜 林锦旋 程亚涛 王艳慧 绪扩 张宇忠 雷海民

【摘要】 目的 探讨鳖甲寡肽 I-C-F-6 对 60% 酒精诱发的小鼠急性肝损伤的保护作用。**方法** 将 48 只 ICR 小鼠随机分为正常对照组、模型组、寡肽低剂量组($0.12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、寡肽高剂量组($0.24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、阳性药组($240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。正常对照组和模型组均皮下注射生理盐水($0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$)；寡肽低剂量组和寡肽高剂量组分别皮下注射寡肽的生理盐水溶液($0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$)；阳性药组灌胃还原型谷胱甘肽生理盐水溶液($0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$)，每天 1 次，连续 30 天。30 天后，除正常对照组外，其余组均灌胃 60% 乙醇 3 次(10 小时/次)($0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$)，末次给酒精 12 小时后处死小鼠采集血液样品和肝组织样品，测定血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)、肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛含量(MDA)，并进行病理组织学检查。**结果** 鳖甲寡肽 I-C-F-6 使灌胃酒精后小鼠血清 ALT、AST 含量和肝匀浆 MDA 含量显著降低($P < 0.05$)，肝匀浆 SOD 活力显著升高($P < 0.05$)，肝脏病理损伤减轻。**结论** 鳖甲寡肽 I-C-F-6 对小鼠急性酒精性肝损伤具有一定的预防保护作用。

【关键词】 寡肽 I-C-F-6；急性酒精性肝损伤；保护作用

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.10.001

Bioactive study of Oligo-peptide I-C-F-6 in Carapax Trionycis on acute liver injury induced by alcohol in rats XU Shi-xun, WANG Mi-na, LIN Jin-xuan, et al. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: LEI Hai-min, E-mail: leihaimin@126.com

【Abstract】 Objective To study the protective effect of oligo-peptide I-C-F-6 on the acute liver injury induced by alcohol in rats. **Methods** 48 healthy ICR rats were randomly divided into five groups: normal control group, model group, oligo-peptide low dose group($0.12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), oligo-peptide high dose group($0.24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), positive group($240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Rats in oligo-peptide groups were administered oligo-peptide saline solution($0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$) once a day for 30 days, while rats in normal group and model group were given saline solution($0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$); positive group($240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was given reduced-glutathione($240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) by intragastric administration once a day for 30 days too. After 30 days, rats in treatment groups and model group were given 60% alcohol 3 times($0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$), which the interval is 10 hours, then after 12 hours when the third time finished, they were sacrificed to collect the blood samples and liver tissue samples. At last, the levels of aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and the levels of liver tissue superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde(MDA) were determined respectively, changes of pathohisology of rats were observed. **Results** Serum concentrations of ALT, AST and was significantly higher in acute liver injury model group. Compared with model group, the serum concentrations of ALT, AST and the liver tissue content of MDA was significantly decreased in treatment groups ($P < 0.05$); the activity of SOD in the liver tissue in treatment groups were al-

基金项目:国家自然科学基金(81073017);北京中医药大学科研创新团队项目(2011-CXTD-15)。

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院[徐士勋(硕士研究生)、程亚涛(硕士研究生)、王艳慧(硕士研究生)、绪扩(硕士研究生)、雷海民],基础医学院[王咪娜(硕士研究生)、林锦旋(硕士研究生)、张宇忠]

作者简介:徐士勋(1987-),2011 级在读硕士研究生。研究方向:基于鳖甲功效的先导化合物的研究。E-mail: xushixun432@163.com

通讯作者:雷海民(1968-),博士,教授,博士生导师。研究方向:中药先导化合物的研发研究。E-mail: leihaimin@126.com

so significantly increased ($P < 0.05$). Pathological result showed that the acute liver injury in treatment groups was significantly improved. **Conclusion** Oligo-peptide I-C-F-6 has a significant therapeutic effect on acute liver injury induced by 60% alcohol in rats.

[Key words] Oligopeptide I-C-F-6; Acute alcohol liver injury; Protective effect

目前酒精滥用已经成为世界性的危害,长期大量饮酒对肝脏有直接毒害作用,从而引发酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)。在中国 ALD 发病率呈逐年上升趋势,已经严重威胁了人民健康^[1],酒精性肝病已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病^[2]。

近年来中医中药防治酒精性肝病的临床和实验研究已有报道^[3],鳖甲作为一味常用的保肝、护肝良药^[4-6],本课题组从醋炙鳖甲中分离获得寡肽 I-C-F-6,通过药理研究证实该物质对 CCl_4 诱导的急性肝损伤具有防护作用,初步推断其机理可能与提升肝脏内抗氧化酶谷胱甘肽还原酶及谷胱甘肽过氧化物酶与超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性有关^[7-8]。临床和实验研究报道,鳖甲对酒精引起的肝病也具有一定临床应用^[9-10],因此本实验探讨了其对小鼠急性酒精性肝损伤的作用。

本实验采用预先注射给药 30 天后以 60% 酒精灌胃 3 次诱导建立小鼠急性肝损伤模型,考察各实验组血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)酶含量及肝脏 SOD 活力、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及肝组织病理学检查,观察并分析评价鳖甲寡肽化合物 I-C-F-6 防治酒精致小鼠急性肝损伤效果,深入研究了该化合物的肝保护作用,为寡肽 I-C-F-6 用于临床防治酒精性肝病提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性 ICR 小鼠 18 ~ 20 g,北京中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证 SCXK(京)2012-0001。

1.2 药物和试剂

鳖甲寡肽 I-C-F-6(序列:GAGPHGG,纯度大于 98%),实验室从醋炙鳖甲中分离纯化确证结构,委托上海科肽生物科技有限公司合成。乙醇,生理盐水,双蒸水。ALT 试剂盒、AST 试剂盒、SOD 试剂盒、MDA 试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所,其它试剂均为国产分析纯,均购自北京化

工厂。

1.3 仪器

万分之一分析天平(上海分析仪器厂);TDL-5-A CENTRIFUGE 高速离心机(飞鸽牌);DK-98-I 型恒温水浴锅;注射器(常州悦康医疗器械有限公司);RM2015 组织切片机(Leicainstruments Ltd.);Nikon ECLIPSE90i 显微镜。

1.4 动物分组

雄性 ICR 小鼠 48 只,体重(18 ± 2) g,随机分为 5 组:正常对照组 8 只,模型组 10 只,寡肽低剂量、寡肽高剂量组各 10 只,阳性药组 10 只,实验过程中无动物死亡。

1.5 给药与造模

动物适应饲养 1 周后,正常对照组和模型组均按 $0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量皮下注射生理盐水,每天 1 次;寡肽低剂量组和寡肽高剂量组分别以 $0.32 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.64 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度,按 $0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量皮下注射寡肽的生理盐水溶液;阳性药组以 $240.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度按 $0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃还原型谷胱甘肽,连续 30 天。30 天后,除正常对照组以 $0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃生理盐水外,其余组均以 $0.12 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃 60% 乙醇 3 次(10 小时/次)。

1.6 取材

第 30 天给药结束后,连续 3 次灌胃 60% 酒精后(10 小时/次),最后一次禁食不禁水 12 小时,小鼠摘取眼球取血后,分离血清, -20°C 保存待检;小鼠取血处死后,打开腹腔,观察肝脏色泽形态等情况,从肝右叶切取 $1.0 \text{ cm} \times 0.8 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ 大小肝组织一块做苏木精—伊红染色,取肝左叶 1.0 g ,制备 10% 的肝匀浆待检。

1.7 观测指标

小鼠行为学状态:小鼠饮食量、毛发光泽、体重、粪便状态、醉酒状态。

小鼠肝体指数:称量小鼠体重及肝重,记录后以肝脏质量除以体重,得到小鼠的肝体指数。

血清 ALT、AST 测定:按试剂盒说明书步骤操作检测血清 ALT、AST 活性。

肝组织 MDA、SOD 的测定:按试剂盒说明书步骤操作检测肝脏 MDA、SOD 水平。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量指标用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间的比较采用双尾独立样本 t 检验; 组间差异用单因素重复测量方差分析 (One-way-ANOVA); 参数之间的相关性采用相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体重及外观行为变化

模型组小鼠毛质粗糙, 厌食, 精神萎靡, 动作迟缓, 体重明显减轻, 解剖肝脏花斑样改变, 苍白、质硬, 有的有腹腔积液; 给药组有所改善。实验过程中, 模型组小鼠无死亡现象。

2.2 小鼠血清 ALT、AST 比较

与正常对照组相比, 模型组血清 ALT、AST 的活性含量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 寡肽组和阳性药组血清 ALT、AST 含量明显降低 ($P < 0.05$); 与寡肽组相比, 阳性药组血清 ALT、AST 的含量无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 寡肽 I-C-F-6 对酒精所致急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药浓度 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ALT($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	AST($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
正常对照组	8	—	20.81 \pm 0.58	41.65 \pm 2.59
模型组	10	—	29.30 \pm 1.20 ^a	59.71 \pm 7.98 ^a
寡肽低剂量组	10	0.32	24.15 \pm 0.95 ^b	49.72 \pm 7.53 ^b
寡肽高剂量组	10	0.64	23.82 \pm 3.09 ^b	44.24 \pm 5.41 ^b
阳性药组	10	240.00	21.21 \pm 0.88 ^c	42.07 \pm 2.52 ^c

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

2.3 小鼠肝脏肝体指数、SOD、MDA 比较

与正常对照组相比, 模型组肝匀浆 SOD 活力显著降低、MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组

相比, 寡肽组和阳性药组肝匀浆 SOD 活力显著升高、MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$); 与寡肽组相比, 阳性药组肝匀浆 SOD 活力显著升高、MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$); 见表 2。

2.4 小鼠肝组织病理学检查

HE 染色后, 电镜下观察, 正常对照组对照肝细胞核深染, 胞浆较大, 胞质均匀 (A)。模型组肝细胞中央静脉周围存在碎片状肝细胞坏死, 部分肝细胞核溶解消失, 有充血现象 (B)。寡肽低剂量组肝细胞水肿范围较大, 出现肝细胞空泡 (C)。寡肽高剂量组肝细胞水肿较轻 (D)。阳性药组肝部分肝细胞浸润, 肝细胞正常范围多 (E)。见图 1。

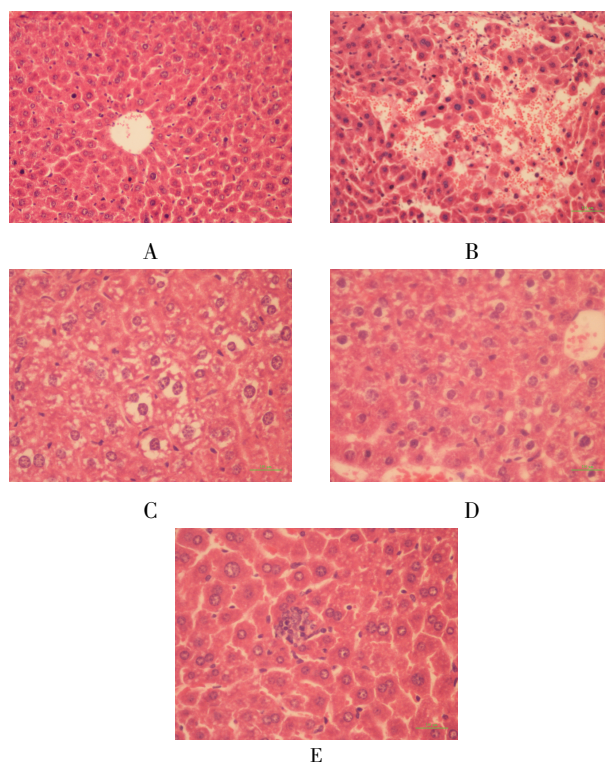


图 1 小鼠肝组织病理学检查 (HE 染色 $\times 400$)
A 正常对照组; B 模型组; C 寡肽低剂量组 ($0.32 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);
D 寡肽高剂量组 ($0.64 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); E 阳性药组 ($240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

表 2 寡肽 I-C-F-6 对酒精所致急性肝损伤小鼠肝匀浆 SOD、MDA 及肝体指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药浓度 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	SOD ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$)	MDA ($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$)	肝体指数
正常对照组	8	—	60.44 \pm 5.44	1.82 \pm 0.29	0.050 \pm 0.0033
模型组	10	—	45.37 \pm 8.55 ^a	4.54 \pm 1.48 ^a	0.059 \pm 0.0034
寡肽低剂量组	10	0.32	57.59 \pm 2.58 ^b	2.05 \pm 0.35 ^b	0.052 \pm 0.0038
寡肽高剂量组	10	0.64	54.94 \pm 3.55 ^b	1.91 \pm 0.58 ^b	0.050 \pm 0.0037
阳性药组	10	240.00	58.01 \pm 14.95 ^c	2.01 \pm 0.22 ^c	0.049 \pm 0.0029

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

3 讨论

酒精吸收入血后,90%以上主要在肝脏代谢,其肝损伤机制主要有乙醇的直接毒性、乙醇氧化成乙醛导致的化学性损伤、氧应激和脂质过氧化等,可损害肝脏各种细胞器和酶的结构功能^[11]。

ALT 和 AST 是用于诊断肝实质损害的主要酶类,是肝损伤的主要指标,当肝细胞被破坏、细胞膜通透性增高及线粒体损伤时,ALT 和 AST 被释放到血液中,使之明显升高^[12];自由基引起的氧化损伤被认为是酒精性肝损伤的重要病理机制^[13],它可以激活氧分子产生氧自由基导致肝细胞膜的脂质过氧化^[14-15],其中 SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着重要的作用,它能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤^[16];MDA 是脂质过氧化反应的终产物,它既能反映机体内氧化反应,也能作为机体损伤的损害因子^[17]。

还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 是由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成的一种三肽,能参与体内氧化还原过程,和过氧化物及自由基结合对抗氧化剂对巯基的破坏,保护细胞膜中含巯基的蛋白质和含巯基酶不被破坏,同时还可对抗自由基对重要脏器的损害,临床上常应用于肝脏疾病^[18]。

由实验结果可以发现模型组的肝体指数最大,可能是酒精对肝组织造成了影响,使肝脏肿胀、膨大,造成了一定的肝损伤;由血清指标及肝脏指标的统计比较可见,模型组小鼠血清指标 ALT、AST 及肝脏 MDA 较正常对照组有显著升高,肝脏 SOD 活力明显降低;而给予寡肽药物的两个剂量组肝功能指标均有不同程度的改善,其中寡肽高剂量组在对 ALT、AST、MDA 的抑制作用方面和 SOD 活力升高方面尤其明显,阳性药组则优于寡肽组。肝组织 HE 染色后的形态学观察亦说明,寡肽 I-C-F-6 可改善酒精导致的急性肝损伤;由此说明鳖甲寡肽 I-C-F-6 对酒精诱导的小鼠急性肝损伤有较好的预防保护作用。

由鳖甲寡肽 I-C-F-6 可以升高肝脏 SOD 酶活力和降低 MDA 含量可以说明其酒精性肝损伤保护机制可能是通过抗自由基及脂质过氧化而实现,但仍需进一步实验证实。

本实验所用药物鳖甲寡肽 I-C-F-6 是一种由 7 个 L-氨基酸组成的具有全新结构的小肽化合物,其分子量小于 1000,与蛋白质相比,小分子肽的抗原性小,不易引起过敏反应,而且还具有很好的溶解

性,在体内吸收快、利用率高,因此更有利于发挥药效。以上研究表明,鳖甲寡肽化合物 I-C-F-6 在防治酒精诱导形成的小鼠急性肝损伤方面有着较为显著作用,具有保护肝细胞作用,为后续先导化合物的开发和研究奠定基础,为后期临床研究提供一定的参考依据。

参 考 文 献

- [1] 庄辉.酒精性肝病的流行病学[J].中华肝病杂志,2003,11(11):689.
- [2] 李学锋,周明欢,向平,等.胰岛素抵抗与酒精性肝病血清瘦素水平的关系[J].实用医学杂志,2008,24(4):592-593.
- [3] 路瑞华,鲁庆峰.中医药防治酒精性肝损伤的研究进展[J].黑龙江医药,2004,1(17):38.
- [4] 姜宏伟.单味鳖甲治疗肝炎肝硬化 30 例[J].临床医学,2007,27(6):93-94.
- [5] 曹铁栓.通络化纤汤治疗肝纤维化 66 例[J].陕西中医,2006,26(9):1071-1073.
- [6] 邝卫红.鳖甲煎汤治疗慢性乙型肝炎 27 例疗效观察[J].山东中医杂志,2005,24(11):655-657.
- [7] 雷海民.抗乙肝病病毒寡肽及其衍生物[P].申请号:201010187949.9,实质审查的生效.
- [8] 张宇忠.鳖甲寡肽化合物 I-C-f-6 对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国病理生理杂志,2010,26(10):2074.
- [9] 郝彦开,杨玉巧,贾军峰,等.化肝汤 1 号对中老年酒精性肝纤维化患者 TGF- β 1 的影响[J].中国老年学杂志,2011,31(20):3916-3917.
- [10] 黄文豹.复方鳖甲软肝片治疗酒精性肝硬化疗效观察[J].浙江中西医结合杂志,2007,17(2):93-94.
- [11] 厉有名.酒精性肝病的发病机制[J].中华肝病杂志,2003,11(11):690-691.
- [12] Kew MC. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage [J]. Lancet 2000,355(9204):591-592.
- [13] Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury [J]. J Hepatol, 2000,32(1 Suppl):39-47.
- [14] Muller A, Sies H. Inhibition of ethanol-and aldehyde-induced release of ethane from isolated perfused rat liver by Pargyline and disulfiram [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1983,18(6):429.
- [15] Strubelt O, Younes M, Pentz R. Enhancement by glutathione Depletion of ethanol-induced acute hepatotoxicity in vitro and in vivo [J]. Toxicology, 1987,45(2):213.
- [16] 方允中,李文杰.自由基与酶(基础理论及其在生物学和医学中的应用)[M].北京:科学出版社,1999:200-205.
- [17] Masalkar PD, Abhang SA. Oxidative stress and antioxidant status in patients with alcoholic liver disease [J]. Clin Chim Acta, 2005, 355(1-2):61-65.
- [18] 袁平戈,张大志.还原型谷胱甘肽的作用机制及临床应用[J].药品评价,2006,3(5):385-390.

(收稿日期:2013-07-13)

(本文编辑:刘群)