

## 狭基线纹香茶菜对肝损伤小鼠 TNF- $\alpha$ 及肝组织超微结构的影响

李小翠<sup>1</sup>, 祝晨蓀<sup>1</sup>, 李常青<sup>2</sup>, 林朝展<sup>1</sup>, 苏俊芳<sup>3</sup>

**摘要:**目的 观察狭基线纹香茶菜提取物对免疫性肝损伤小鼠 TNF- $\alpha$  释放及肝组织超微结构的影响。方法 50 只雄性 NIH 小鼠, 随机分为 5 组, 分别为正常对照组, 模型组, 狭基线纹香茶菜提取物高、低剂量组 (剂量分别为 18.2g/kg、4.55g/kg), 与环磷酰胺 (43mg/kg) 对照组。除正常对照组外, 其余小鼠于实验首日上午尾静脉注射刀豆蛋白 A (Con A) 20mg/Kg, 并于首日、次日和第 3d、第 4d 下午各给药 1 次, 第 5d 给药后 2h, 模型组和各给药组小鼠再次尾静脉注射 Con A 20mg/kg, 4h 后, 每组取相同序号小鼠 8 只, 取血检测血清 TNF- $\alpha$  活性, 每组所剩 2 只小鼠, 8h 后处死取肝组织, 3%戊二醛固定, 切片, 染色后, 透射电镜观察肝组织超微结构。结果 显示模型组 TNF- $\alpha$  活性较正常组明显升高, 肝组织超微结构发生了显著改变, 肝细胞严重肿胀、线粒体破坏、毛细胆管和肝窦腔结构明显变形、中性粒细胞滞留, 细胞及细胞器的完整性遭到破坏。狭基线纹香茶菜提取物高、低剂量组 TNF- $\alpha$  活性较模型组明显降低 ( $P < 0.01, 0.05$ )、肝组织超微结构虽有一定程度改变, 但细胞及细胞器的形态及完整性得到保护。结论 狭基线纹香茶菜具有较好的保肝作用, 其作用机理与抑制 TNF- $\alpha$  的产生密切相关。

**关键词:** 刀豆蛋白 A; 肝损伤; 狭基线纹香茶菜; 肝组织超微结构

中图分类号: R-331 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2011)11-1376-03

**Effects of extract of *Isodon Lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth.) Hara on the production of TNF- $\alpha$  and the change of ultrastructure of liver cell in mice induced by concanavalin A.** LI Xiao-hui, ZHU Chen-hen, LI Chang-qing, et al. (1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, P. R. China)

**Abstract: Objective** To investigate effects of extract of *Isodon Lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth.) Hara (LIVG) on the production of TNF- $\alpha$  and the change of ultrastructure of liver cell in mice induced by concanavalin A. **Methods** Fifty NIH mice were randomly divided into normal control group, model group, extract groups of LIVG (high- and low-dosage), and cyclophosphamide group (43mg/kg). In the experimental groups, mice received the extract of LIVG (18.20, 4.55g/kg, respectively) by gastric perfusion or injected with cyclophosphamide into its abdominal cavity daily at the first, the second, the third and fourth day afternoon. Excepts those in normal control group, mice in other groups were injected with Con A (dose of 20mg/Kg) via the tail vein at the first day morning of experiment, On the 5th day, mice were injected with Con A once again with the same dosage 2 hours after the drugs were administered. After 4 hours, the blood of eight mice in each group were obtained and the TNF- $\alpha$  activity was determined. The mice in each group were killed 8 hours later and the change of ultrastructure of the hepatocyte of mice was observed under electron microscope. **Results** It showed that contents of TNF- $\alpha$  in serum in both groups of LIVG were obviously lower than that of model group ( $P < 0.01, 0.05$ ), Histopathological change of ultrastructure of hepatocyte were alleviated in both groups of LIVG. **Conclusion** It suggested that the extract of LIVG possess the effects of protecting liver from immune injury in mice induced by concanavalin A by suppressing the production of TNF- $\alpha$ .

**Key words:** Concanavalin A; Liver injury; *Isodon Lophanthoides* var. *gerardianus* (Benth.) Hara; Ultrastructure of liver cell

狭基线纹香茶菜为我国南方地区民间及临床应用广泛的治乙型肝炎的中草药, 疗效确切。研究显示狭基线纹香茶菜有较好的抗乙病毒作用<sup>[1]</sup>, 对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤有较好的保护作用<sup>[2]</sup>。我们前期的研究结果显示狭基线纹香茶菜对刀豆蛋白 A (Con A) 诱导的免疫性肝损伤有较好的保护作用, 可以明显降低实验小鼠血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平<sup>[3]</sup>, 但其作用机制尚不清楚。本实验通过研究狭基线纹香茶菜提取物干预后, Con A 性肝损伤小鼠血清 TNF- $\alpha$  活性及肝组织超微结构的变化, 探讨其作用机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 动物 NIH 小鼠, 雄性, 体重 25g 左右, 广东省医学实验动物中心提供, 许可证号为 SCXK (粤) 2003-0002, 粤监证字 2007A004。

1.1.2 药物 狭基线纹香茶菜提取物为褐色粉末, 每克药粉相当于 17.69 克生药, 用时以蒸馏水配成所需浓度; 环磷酰胺注射液, 江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 批号 07121321; 刀豆蛋白 A (Con A) 为 sigma 公司产品, 用时以生理盐水溶解。

作者单位: 1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405; 3. 广州中医药大学基础医学院, 广东 广州 510405

1.1.3 主要试剂与仪器 TNF- $\alpha$  放免检测试剂盒由北京普尔伟业生物科技有限公司提供,批号为 080225 SN-695B 型放免  $\gamma$  测量仪(上海日环仪器一厂);TLL-C 台式冷冻离心机(北京四环科学仪器厂);日立 H-600 透射电镜。

1.2 方法

1.2.1 模型制备及分组给药 50 只雄性 NIH 小鼠,随机分为 5 组,每组 10 只,分别为正常对照组、模型组、狭基线纹香茶菜提取物高、低剂量组(剂量分别为 18.2g/kg、4.55g/kg),与环磷酰胺(43mg/kg)对照组。除正常对照组外,其余小鼠于实验首日上午尾静脉注射 Con A 20mg/Kg,并于首日、次日和第 3d、第 4d 下午各给药一次,第 5d 给药后 2h,模型组和各给药组小鼠再次尾静脉注射 Con A 20mg/kg,禁食不禁水 4h 后,每组取相同序号小鼠 8 只,摘眼球取血,离心分离血清待检,每组所剩 2 只小鼠 8h 后断头处死,快速取肝左叶组织,3%戊二醛固定,送检。

1.2.2 检测指标及方法

1.2.2.1 血清 TNF- $\alpha$  活性检测 TNF- $\alpha$  活性检测采用放免法,按试剂盒说明操作。

1.2.2.2 肝组织固定及切片 以 3%戊二醛固定肝组织,常规超薄切片,铀-铅染色,透射电镜观察。

1.3 统计学方法 采用 SPSS10.0 软件包进行统计分析,多组计量资料分析采用单因素方差分析(One-way ANOVA),多重比较采用 LSD。

2 结果

2.1 狭基线纹香茶菜提取物对 Con A 致肝损伤小鼠血清 TNF- $\alpha$  活性的影响

由表 1 可知,模型组小鼠血清 TNF- $\alpha$  活性较正常组明显升高,差异具有显著性意义( $P<0.01, 0.05$ )。

狭基线纹香茶菜提取物高、低剂量组血清 TNF- $\alpha$  活性均明显低于模型组( $P<0.01, 0.05$ );高剂量组血清 TNF- $\alpha$  活性明显低于低剂量组,差异有显著性意义( $P<0.05$ )。

表 1 狭基线纹香茶菜提取物对 Con A 致肝损伤小鼠血清 TNF- $\alpha$  活性的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	N	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$ /ng·mL <sup>-1</sup>
正常组	8	--	1.48 $\pm$ 0.36
模型组	8	--	3.08 $\pm$ 0.77 $\Delta\Delta$
高剂量组	8	18.2	2.01 $\pm$ 0.40**
低剂量组	8	4.55	2.42 $\pm$ 0.60*
环磷酰胺	8	0.43 $\times 10^{-1}$	1.75 $\pm$ 0.36*

注:与正常组比较  $\Delta\Delta P<0.01$ ;与模型组比较 \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

2.2 肝组织超微结构变化 电镜下正常组肝细胞胞核圆或椭圆形,核仁居中,丰富的线粒体呈杆状或卵圆状,基质较深暗,含有少量基质颗粒,嵴的数量中等,粗面内质网呈层状排列,较多,滑面内质网呈微泡状,较少。肝窦内皮细胞扁平,核椭圆形,有胞核处胞体略突向管腔,其余胞质呈薄片状,有窗孔,胞质中含少量小线粒体、短小粗面内质网等,可见溶酶体样的致密小体,Disse 间隙宽约 0.25~2 $\mu$ m,一般仅有血浆而无红血球,肝细胞表面的微绒毛伸入其中进行物质交换。

模型组肝细胞核膜出现锯齿状凹陷,核周隙宽窄不均匀,异染色质增多,胞质内高电子密度脂滴增多,线粒体肿胀,嵴减少或消失,基质稀薄,呈空泡变性,可见部分线粒体膜破裂、线

粒体溶解、线粒体明显减少;内质网扩张,呈泡状或不规则腔隙,粗面内质网脱颗粒,糖原颗粒增多,肝窦腔变狭窄,有微血栓形成。枯否氏细胞增多,白细胞滞留,Disse 间隙窄小,肝细胞与管壁细胞膜模糊不清,部分溶解消失。

狭基线纹香茶菜提取物高、低剂量组和环磷酰胺治疗组肝细胞核膜凹陷减少,核周隙均匀,胞质内线粒体明显增多,线粒体肿胀减轻,但仍有嵴减少表现,少数内质网脱颗粒,肝窦腔和 Disse 间隙基本正常。见图 1(A、B、C、D、E、F、G)。

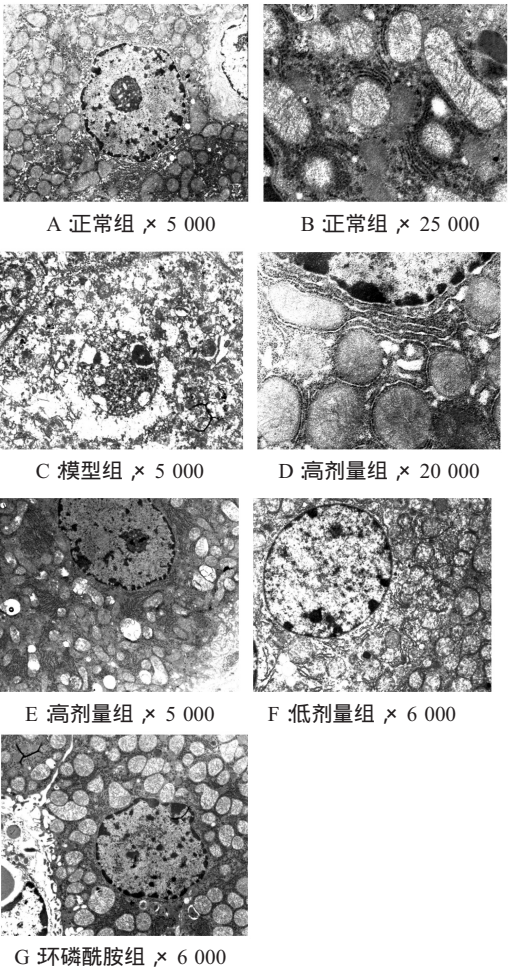


图 1 狭基线纹香茶菜提取物对免疫性肝损伤小鼠 TNF- $\alpha$  释放及肝组织超微结构的影响(铀-铅染色)

3 讨论

狭基线纹香茶菜对刀豆蛋白 A(Con A)是一种被广泛应用可活化 T 细胞的有丝分裂原,Con A 静脉注射小鼠体内后,大部分在肝脏内聚集,ConA 与肝窦具有亲和性,使循环 T 淋巴细胞汇入肝窦并在局部增殖,释放多种细胞因子,肝窦内大量存在的巨噬细胞,激活后产生的细胞因子 TNF- $\alpha$  可直接损伤肝细胞,导致肝细胞凋亡、坏死,TNF- $\alpha$  是引起急性肝损伤的重要炎症介质,是导致 ConA 性肝损伤最重要的细胞因子,在注射后 Con A 2h 后 TNF- $\alpha$  达到峰值,预先用抗 TNF- $\alpha$  单抗处理,可完全阻断 Con A 诱发的小鼠肝损伤<sup>[4,5]</sup>。鉴于巨噬细胞合成 TNF- $\alpha$  的能力大于 T 淋巴细胞,推测 T 细胞活化后刺激巨噬细胞释放 TNF- $\alpha$  在这一病理过程中发挥重要作用。

TNF- $\alpha$  引起肝损伤的机制主要如下<sup>[6]</sup> (1)刺激血管内皮细胞表达新的表面受体,如粘附因子,诱发中性粒细胞向内皮

细胞粘附或活化中性粒细胞,促使其趋化聚集于肝脏,释放蛋白酶或氧自由基,引起血管内皮损伤和血管内凝血。(2)通过调高肝细胞上的膜型受体(mTNF- $\alpha$  R)表达而强化对肝细胞的毒性,导致细胞溶解。(3)直接激活靶细胞的核酸内切酶,使 DNA 降解,导致细胞凋亡。

本研究结果显示应用 ConA 后模型组 TNF- $\alpha$  活性较正常组明显升高,肝组织超微结构发生了显著改变,肝细胞严重肿胀、线粒体破坏、毛细胆管和肝窦腔结构明显变形、中性粒细胞滞留,细胞及细胞器的完整性遭到破坏,证实肝组织超微结构损害明显。狭基线纹香茶菜提取物高、低剂量组 TNF- $\alpha$  活性较模型组明显降低,肝组织超微结构虽有一定程度改变,但细胞及细胞器的形态及完整性得到保护,提示狭基线纹香茶菜具有较好的保肝作用,其作用机理与抑制 TNF- $\alpha$  的产生密切相关。

### 参考文献:

[1] 胡英杰,赖小平,刘中秋,等.狭基线纹香茶菜(溪黄草)的化学成

分与抗乙肝病毒作用研究[J].中草药,2005,36(11):1612-1615.

- [2] 长尾由纪子,叶木荣,林朝展,等.狭基线纹香茶菜对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国中药杂志,2006,31(7):576-579.
- [3] 林朝展,祝晨蓀,钟志勇,等.狭基线纹香茶菜对刀豆蛋白所致小鼠免疫肝损伤的保护作用[J].中药新药与临床药理,2006,17(5):325-328.
- [4] Ganter F,Leist M,Lohse AW,et al. Concanavalin A induced T-cell mediated hepatic injury in mice: The role of tumor necrosis factor[J]. Hepatology,1995,21:190-198.
- [5] Trautwein CR,Akemann Brenner DA. Concanavalin A induced liver cell damage: activation of intracellular pathways triggered by tumor necrosis factor in mice [J]. Gastroenterology,1998,114(5):1035-1045.
- [6] 骆抗先.乙型肝炎基础和临床[M].人民卫生出版社,北京:1997,第1版:128-131.

收稿日期 2011-05-12 编辑 杜中华

(上接第 1363 页)

2.4.1 性别分布 NT 病例中男性报告发病数明显多于女性分别占 37.83%、17.06%,男女比例为 2.2:1。

2.4.2 发病时间分布 新生儿出生 5~10d 为 NT 发病高峰,95%的病例在出生 10d 内发病。最短出生 1d 发病,最长出生 26d,发病中位数 6d,全年发病无明显季节性分布,94.3%有吃奶或进食困难,92%出现肌肉强直或痉挛。

2.4.3 分娩情况与接生人员情况 728 例病例中在家分娩的孕妇为 691 例,占 94.92%,在诊所和乡级卫生院分娩的 17 例,占 2.33%,在县级以上医院分娩的仅有 2 例,占 0.27%,分娩地点不详的为 18 例,占 2.48%。

2.4.4 患儿童母亲疫苗接种情况及产前检查情况 1999~2009 年监测个案表统计 728 例中仅有 6 位患儿母亲接受过破伤风疫苗,占 0.83%,患儿母亲接受过产前检查的有 39 例,占 5.36%,在家分娩且由接受过卫生知识培训的人员接生的 22 例,占 3.18%。

### 3 讨论

新生儿破伤风是 WHO 确定的全球消除疾病之一。虽然我国政府在 1995 年提出消除 NT 目标,对将育龄的妇女实施破伤风疫苗接种策略,但由于其工作的艰巨性和资源的限制性,消除 NT 的难度较大,使这一目标还在努力当中。1999 年我省也曾与卫生部儿童基金会合作对高危市县开展消除 NT 项目工作,虽然取得显著成绩和经验,但离消除 NT 目标仍有一定距离。

为有效控制降低 NT 发病率乃至消除。1999 年我省在卫生部的统一部署下建立了 NT 监测系统,覆盖全市 19 市县,10 年来消除 NT 工作取得了可喜的成绩,1999~2009 年共监测报告 NT 发病数 728 例,发病率为 0.18~1.16 之间‰。发病率正呈逐年缓慢下降趋势。2000 年发病达高峰,为 1.16‰,从 2002 年起我省 NT 发病率就持续下降,发病率一直均控制在<1‰目标之下。但是,目前仍然有部分市县 NT 发病率>1‰,这些都是

历史发病较多的东部少数民族市县如 陵水、东方、昌江、乐东、三亚等地区。

由于新生儿破伤风发病是与卫生缺乏和经济条件有关的疾病。因此,提高住院分娩率和实行清洁接生是降低 NT 发病率的重要手段。由于受传统习惯、经济条件、人口流动和躲避超生等因素的影响,仍有部分产妇选择在家分娩<sup>[6]</sup>。因此,在继续提高监测敏感性的同时要继续加强卫生科普知识的宣传,加强孕产妇对生育知识的健康教育,提高孕产妇对在家分娩风险的认识和自我保护意识,改变旧的习惯,提倡新法接生,提高住院分娩。随着新型农村合作医疗体系不断完善,使广大农民的有了基本的医疗保障,以及一系列惠民措施的落实将有助于提高住院分娩率,这对预防和消除新生儿破伤风必将起着积极的推动作用。

### 参考文献:

- [1] 连文远.计划免疫学[M].第2版.上海:上海科学技术文献出版社,2001:421.
- [2] fuat G,Mehmet B,Bunyamin D,et al. Neonatus: A continuing challenge in the southeast of Turkey [J]. European Journal of Epidemiology, 1999,15(2):171-174.
- [3] WHO. Health for all 200 [R]. Copenhagen:WHO,Regional office for Europe,1998.
- [4] Fidler A,Hartog R,Lezana MA,et al. Field trial of a rapid assessment technique against a probabilistic community survey: Operational implications for neonatal tetanus elimination [J]. Int J epidemiology, 1994,23(2):386-392.
- [5] 柴峰,张经坤,曾光.我国 1996~1998 年新生儿破伤风疫情分析与监测系统评价[J].中国计划免疫,1996,5(3):125-129.
- [6] 林风华,陈杨,陈剑慧,等.福州市 2003~2006 年新生儿破伤风疫情分析[J].职业与健康,2008,24(2):161-162.

收稿日期 2011-07-13 编辑 杜中华