

白头翁皂苷抗小鼠血吸虫病肝纤维化的试验

陈岩勤^{1,2}, 高秀丽^{1,2,3}, 诸葛洪祥⁴, 杨世林⁴, 李笑然⁴, 杨盛刚^{1,2*}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州医科大学微生物与生化药学工程中心, 贵州贵阳 550025; 3. 贵州医科大学, 药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州贵阳 550004; 4. 苏州大学医学部, 江苏苏州 215123)

摘要 [目的] 研究白头翁皂苷经腹腔注射给药对血吸虫病肝纤维化的作用机制。[方法] 将 30 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分为阴性对照组、阳性对照组和白头翁皂苷组, 每组 10 只。血吸虫感染 40 条尾蚴 6 周后, 阴性对照组、阳性对照组腹腔注射 0.9% 生理盐水, 白头翁皂苷组腹腔注射白头翁皂苷注射液。感染 8 周后, 检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天门冬氨酸氨基转移酶(AST)含量; 称取小鼠体重及肝重; 免疫组化观察肝组织 α -SMA 表达。[结果] 白头翁皂苷组小鼠的体重、肝重、ALT 及 AST 含量与阳性对照组比较均有统计学意义, 白头翁皂苷组肝组织 α -SMA 表达明显低于阳性对照组。[结论] 白头翁皂苷经腹腔注射给药可明显减轻日本血吸虫病所引起的肝纤维化程度。

关键词 白头翁皂苷; 肝纤维化; 丙氨酸氨基转移酶; 天门冬氨酸氨基转移酶; α -平滑肌肌动蛋白

中图分类号 S567 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)14-0181-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.14.053

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Test on the Total Saponins of Pulsatilla against the Hepatic Fibrosis of Murine Schistosomiasis

CHEN Yan-qin^{1,2}, GAO Xiu-li^{1,2,3}, ZHUGE Hong-xiang⁴ et al (1. College of Pharmacology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. Microbiological and Biochemical Pharmacy Engineering Center, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025; 3. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004; 4. Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123)

Abstract [Objective] The research aimed to study the effects of total saponins of pulsatilla against liver fibrosis in mice infected with *Schistosoma japonicum*. [Method] Thirty C57BL/6 female mice were randomly divided evenly into negative control group, positive control group and Pulsatilla saponin group. After positive control group and Pulsatilla saponin group infected with 40 *S. japonicum* cercariae for 6 weeks, the negative control group and the positive control group were intraperitoneally injected with 0.9% normal saline, and the Pulsatilla saponin group were intraperitoneally injected with Pulsatilla saponin. After 8 weeks of infection, The serum of all mice were measured the value of ALT and AST; body weight and liver weight of the mice were weighed; α -SMA expression was observed by immunohistochemistry. [Result] The body weight, liver weight, ALT and AST content of the pulsatilla saponin group were significantly different from those of the positive control group. The expression of α -SMA in the liver of the pulsatilla saponin group was significantly lower than that of the positive control group. [Conclusion] The pulsatilla saponin by intraperitoneal injection can significantly reduce the degree of liver fibrosis caused by *Schistosoma japonicum*.

Key words Pulsatilla saponin; Hepatic fibrosis; ALT; AST; α -SMA

血吸虫病是一种慢性虫卵肉芽肿的免疫病理反应, 沉积于肝微血管内的大量虫卵以及宿主对虫卵的炎症反应和纤维化为血吸虫病的主要病变^[1]。目前治疗血吸虫病的有效药物是吡喹酮, 但经过杀虫治疗后, 肝组织中的沉积虫卵继续释放虫卵可溶性抗原激活一系列导致肝脏病变的信号通路, 使肝脏虫卵肉芽肿持续出现并诱导肝纤维化^[2]。在肝纤维化过程中肝星状细胞由静止状态转变为活化状态, 胶原蛋白分泌增多, α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)合成增多, 肝脏损伤的同时调动多种与免疫相关细胞的应答以及细胞间的浸润, 加速肝纤维化的发生^[3]。临床上丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)常作为观察肝病发展及预后的一个指标, 是检测肝功能最敏感的指标之一, 在一定程度上作为肝纤维化的诊断、治疗的动态变化的参考^[4]。

白头翁为毛茛科植物白头翁的干燥根, 作为中药始载于《神农本草经》, 其性寒, 味苦, 具有清热解毒、凉血止痢、燥湿杀虫的功效^[5]; 尚有文献报道其在抗肿瘤^[6-9]、抗病毒^[10]等方面的药理作用; 路西明等^[11]研究发现白头翁对异烟肼和利福平引起的血清 ALT 升高有对抗作用, 且能对抗药物引起的肝细胞死亡, 具有保肝作用。因此探索白头翁皂苷在干预血吸虫肝纤维化发展进程中的作用, 期望从白头翁皂苷对血吸虫病所致的肝纤维化着手来研究其作用机制, 为肝纤维化的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物和钉螺 C57BL/6 小鼠, 雌性, 由苏州大学实验动物中心提供, 体重 18~20 g; 阳性钉螺(*O. hupensis*) 购自江苏省血吸虫病防治研究所。

1.2 药品试剂及仪器 白头翁皂苷由苏州大学医学部药学院杨世林教授课题组提供; 0.9% 生理盐水购自江苏四环生物股份有限公司; ALT、AST 试剂盒购自南京建成生物技术公司; 20 mg/mL 白头翁皂苷注射液用无菌生理盐水溶解 200 mg PRS 定容至 100 mL 经无菌抽滤后分装 4 °C 储存备用。 α -SMA 一抗购自武汉博士德生物工程有限公司; 二抗免疫组化试剂盒购自上海基因科技有限公司; XD-811 半自动生化分析仪为上海迅达医疗仪器有限公司产品; 德国 Lei-

基金项目 国家自然科学基金项目(81860627); 贵州省卫生计生委科学技术基金项目(gzwlkj2016-1-052); 贵州省中医药管理局基金项目(S201609120032); 贵州医科大学博士启动基金项目(YJ2017-11)。

作者简介 陈岩勤(1972—), 女, 河南南阳人, 副教授, 博士, 从事感染与免疫方向的研究。* 通信作者, 副教授, 博士, 从事药物分析研究。

收稿日期 2019-03-04; **修回日期** 2019-03-21

ca 公司产 UC6 病理切片机。

1.3 方法 用去氯水 25 °C 浸泡钉螺白炽灯下照射逸出尾蚴。将 30 只小鼠随机平均分为阴性对照组、阳性对照组、白头翁皂苷组,采用腹部贴片法感染尾蚴 40 条;感染 6 周后,白头翁皂苷组每日按剂量 200 mg/kg 腹腔注射白头翁皂苷药物,阴性对照组、阳性对照组按 0.02 mL/g 容量给小鼠腹腔注射生理盐水。8 周后,禁食 12 h,小鼠眼眶静脉丛采血,离心,取血清测定 ALT、AST 含量;取肝脏称重,并取左叶组织 1 cm³置入 10% 中性甲醛溶液中,4 °C 冰箱中固定 24 h 制作石蜡切片用于免疫组化检测 α -SMA 表达。

1.4 统计学分析 所有试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,组间比较利用 *t* 检验评价, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小鼠体重及肝脏重量的变化 从表 1 可看出,经过白头翁皂苷治疗后第 8 周末,阳性对照组与阴性对照组相比,阳性对照组体重显著降低($P < 0.05$);白头翁皂苷组比阳性对照组体重升高显著($P < 0.05$);阳性对照组肝重与阴性对照组相比显著升高($P < 0.05$);白头翁皂苷组与阳性对照组比较肝重下降显著($P < 0.05$)。

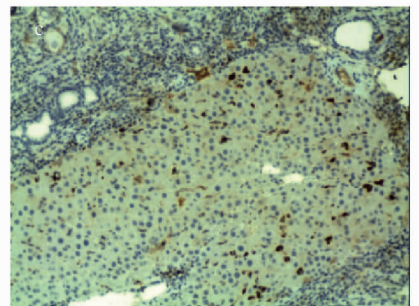
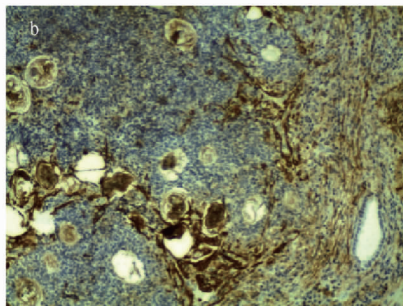
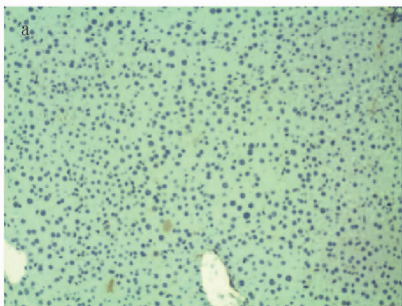
表 1 白头翁皂苷治疗对小鼠体重、肝重的影响

Table 1 Effect of pulsatillae saponin on body and liver weight of mice

组别 Group	体重 Body weight g	肝重 Liver weight g
阴性对照组 Negative control group	22.94±0.54	1.096±0.388
阳性对照组 Positive control group	18.30±0.80 [*]	1.376±0.060 [*]
白头翁皂苷组 Saponins of pulsatillae group	20.97±1.05 ^{&}	1.208±0.030 ^{&}

注: * 表示与阴性对照组相比差异显著($P < 0.05$); & 表示与阳性对照组相比差异显著($P < 0.05$)

Note: * indicates significant difference compared with the negative control group($P < 0.05$); & indicates significant difference compared with the positive control group($P < 0.05$)



注: a. 阴性对照组; b. 阳性对照组; c. 白头翁皂苷组

Note: a. Negative control group; b. Positive control group; c. Saponins of pulsatillae group

图 1 小鼠肝脏 α -SMA 表达(100 \times)

Fig.1 The expression of α -SMA in mouse liver

以间接地反映出肝细胞受损的程度。试验结果显示白头翁皂苷能够有效降低 ALT 和 AST 水平。肝星状细胞活化是肝纤维化发生、发展的中心环节, α -SMA 表达是肝星状细胞激活的标志,其表达量直接与肝纤维化程度相关联。通过对白头翁皂苷对血吸虫病引起的肝纤维化的治疗研究发现其能减弱肝纤维化的进展,为其能够成为治疗肝纤维化药物打下

2.2 血清 ALT、AST 含量的变化 从表 2 可看出,阳性对照组小鼠血清中 ALT、AST 含量均显著高于阴性对照组($P < 0.05$);白头翁皂苷组小鼠血清中 ALT、AST 含量均显著低于阳性对照组($P < 0.05$)。

表 2 白头翁皂苷治疗后小鼠血清中 ALT、AST 水平

Table 2 Effect of pulsatillae saponin on levels of ALT and AST in serum of mice

组别 Group	ALT	AST
阴性对照组 Negative control group	26.66±3.66	45.17±2.17
阳性对照组 Positive control group	78.52±6.41 [*]	80.21±7.27 [*]
白头翁皂苷组 Saponins of pulsatillae group	33.99±4.33 ^{&}	49.19±4.55 ^{&}

注: * 表示与阴性对照组相比差异显著($P < 0.05$); & 表示与阳性对照组相比差异显著($P < 0.05$)

Note: * indicates significant difference compared with the negative control group($P < 0.05$); & indicates significant difference compared with the positive control group($P < 0.05$)

2.3 小鼠肝脏免疫组化结果 肝脏 α -SMA 免疫组化显示(图 1),阴性对照组少有 α -SMA 表达;阳性对照组 α -SMA 表达主要集中在虫卵内部及周围区域,着色明显深于白头翁皂苷组 α -SMA 的表达。

3 讨论与结论

日本血吸虫感染小鼠引起肝脏纤维化的病理模型与人类血吸虫病肝纤维化极为相似,以此为研究对象研究开发治疗或逆转肝纤维化的药物具有重要的意义。有学者认为肝纤维化可以逆转,肝硬化不可逆转,在血吸虫肝病的早期应用抗纤维化的治疗措施有利于肝纤维化的逆转。该研究建立了血吸虫病肝纤维化小鼠模型,利用白头翁皂苷腹腔给药发现能够显著降低血吸虫病小鼠血清中 ALT 和 AST 的含量。而 ALT 和 AST 能够敏感体现肝细胞膜损伤的程度,肝细胞膜损伤后会使 ALT 和 AST 进入血液,从而使小鼠血清中 ALT 和 AST 升高。所以血清中 ALT 和 AST 数值的大小可

基础。

参考文献

- [1] CIOLI D, PICA-MATTOCCIA L, BASSO A, et al. Schistosomiasis control: Praziquantel forever[J]. Mol Biochem Parasitol, 2014, 195(1): 23-29.
- [2] COLLEY D G, BUSTINDUY A L, SECOR W E, et al. Human schistosomiasis[J]. Lancet, 2014, 383(9936): 2253-2264.

(下转第 200 页)

况。当温度下降到一定值时,电阻值突然增大,此时为共晶点温度,表示试验材料的水分几乎全部冻结为冰;给试验材料加热,当温度上升到一定值时,电阻值突然减少,此时为共熔点温度。根据实际操作经验,真空冷冻干燥过程中的速冻(预冻)温度一般为比共晶点温度低 20 ℃ 左右。降温 and 升温时佛手瓜电阻随温度的变化情况分别如图 1 和图 2 所示。据此计算出佛手瓜的共晶点约 -15.3 ℃,共熔点约 -10.1 ℃。

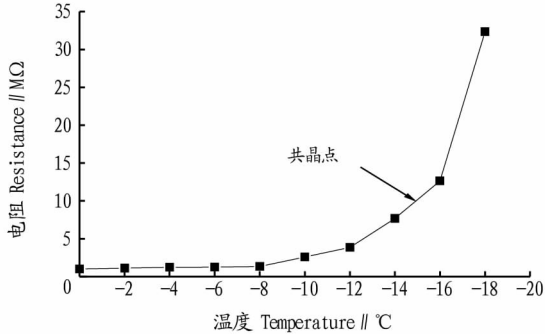


图 1 降温过程中佛手瓜电阻随温度的变化情况

Fig.1 The resistance changes of *S.edule* with temperature during the cooling process

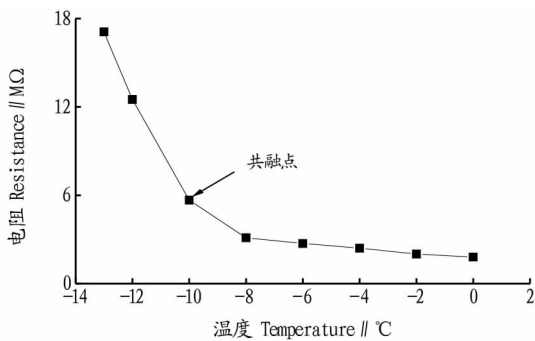


图 2 升温过程中佛手瓜电阻随温度的变化情况

Fig.2 The resistance changes of *S.edule* with temperature during the heating process

2.4 最佳真空冷冻干燥条件的确定 根据正交试验优化的结果,可得到感官评分最优值,因此可预测最佳真空冷冻干燥条件如下:护色溶液含有 0.15% 偏重亚硫酸钠、0.20% 维生素 C、0.30% 柠檬酸钠;增味溶液含 0.75% 柠檬酸和 10% 蔗糖,

硬化处理溶液含 0.05% 乳酸钙,在此条件下综合感官评分的预测值为 96.5 分。

2.5 验证试验 按照最佳条件进行 3 次重复试验,测得感官评分为 96 分,与预测结果相差约 0.1%,验证了试验结果的可靠性,表明该正交试验结果的可信度高。

3 结论

该研究方法干燥的佛手瓜片具有良好的复水性,保持了佛手瓜的特有风味和色泽,且破坏程度小、重量轻、保藏期长、便于运输。该研究聚焦在风味调配、冻干程序工艺对佛手瓜进行了干燥试验。经过正交试验的优化,最佳的工艺条件如下:护色溶液含有 0.15% 偏重亚硫酸钠、0.20% 维生素 C、0.30% 柠檬酸钠,浸泡时间为 30 min;增味溶液含 0.75% 柠檬酸和 10% 蔗糖,浸泡时间为 120 min;硬化处理溶液含 0.05% 乳酸钙,浸泡时间为 45 min。验证试验中测得感官评分为 96 分,此时冻干瓜肉部分色泽洁白,靠近瓜皮部分色泽浅绿,口感酥脆,酸甜适口。

参考文献

- [1] 张庆和.佛手瓜庭院优质高产栽培技术[J].江西农业,2018(14):12,14.
- [2] 冯敏,肖正璐,张红霞,等.佛手瓜的营养成分及开发利用[J].现代园艺,2018(1):49-50.
- [3] 陈建福,林洵,陈美慧,等.响应面法优化超声辅助提取佛手瓜总黄酮的工艺研究[J].中国饲料,2015(16):25-28,33.
- [4] 周义润.种瓜富了秋洞人[J].中国老区建设,2003(9):56.
- [5] 丘韶燕.新丰县佛手瓜村乡村旅游发展 SWOT 分析[J].南方农业,2012,6(4):71-74.
- [6] 山东烟台市农技中心.佛手瓜的五种立体栽培形式[J].农村实用工程技术,1993(8):19.
- [7] 徐冲,陈杰,陈丽媛,等.真空冷冻干燥技术在食用菌加工中的应用研究[J].微生物学杂志,2015,35(6):96-99.
- [8] REYES A, EVSEEV A, MAHN A, et al. Effect of operating conditions in freeze-drying on the nutritional properties of blueberries[J]. International journal of food sciences and nutrition, 2011, 62(3):303-306.
- [9] 李新建,王辉,彭菲菲.真空冷冻干燥糯米方便粥的工艺研究[J].食品工业,2019,40(1):74-78.
- [10] 陈健旋.响应面法优化超声辅助提取佛手瓜多糖工艺[J].山东农业大学学报(自然科学版),2017,48(2):171-177.
- [11] 于静静,毕金峰,丁媛媛.不同干燥方式对红枣品质特性的影响[J].现代食品科技,2011,27(6):610-614,672.
- [12] 刘书成,张常松,吉宏武,等.不同干燥方式对罗非鱼片品质和微观结构的影响[J].农业工程学报,2012,28(15):221-227.
- [13] 李翠丽,冀晓龙,许芳溢,等.干燥方式对梨枣粉品质特性的影响[J].中国食品学报,2014,14(12):121-127.
- [7] BANG S C, KIM Y, LEE J H, et al. Triterpenoid saponins from the roots of *Pulsatilla koreana*[J]. J Nat Prod, 2005, 68(2):268-272.
- [8] YE W C, ZHANG Q W, HSLAO W W, et al. New lupine glycosides from *Pulsatilla chinensis*[J]. Planta Med, 2002, 68(2):183-186.
- [9] XU Q M, SHU Z, HE W J, et al. Antitumor activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Phytomedicine, 2012, 19(3/4):293-300.
- [10] 李春晓,王月明,韦东来,等.白头翁药理作用的研究进展[J].植物医生,2018,31(8):26-29.
- [11] 路西明,王学延,王建刚.白头翁对小鼠免疫功能的影响[J].甘肃中医学院学报,1998,15(2):32-34.

(上接第 182 页)

- [3] SINKALA E, KAPULU M C, BESA E, et al. Hepatosplenic schistosomiasis is characterised by high blood markers of translocation inflammation and fibrosis[J]. Liver Int, 2016, 36(1):145-150.
- [4] 王娴默,肖林.血吸虫病导致的肝纤维化血清学检测研究进展[J].检验医学与临床,2017,14(S1):362-365.
- [5] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:上册[M].上海:上海科学技术出版社,1998.
- [6] KIM Y, KIM S B, YOU Y J, et al. Deoxydopphyllotoxin, the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana*[J]. Planta Med, 2002, 68(3):271-274.