

虎杖提取物对 CCl₄ 诱导建鲤损伤肝细胞生化指标的影响

杜金梁, 贾睿, 曹丽萍, 殷国俊*

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081)

摘要: 为探明虎杖对鱼类损伤肝细胞是否具有修复作用, 分离建鲤肝细胞, 设 6 个试验组: I 组(空白对照组); II 组(CCl₄ 模型组); III 组(800 μg/mL 虎杖提取物对照组); IV 组(造模前 200、400、800 μg/mL 虎杖提取物处理组); V 组(造模后 200、400、800 μg/mL 虎杖提取物处理组); VI 组(造模前、后 200、400、800 μg/mL 虎杖提取物处理组)。各组细胞经处理后继续培养 12 h, 收集肝细胞培养液, 检测血清培养液中丙氨酸转氨酶(GPT)、天冬氨酸转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)等酶活性, 丙二醛(MDA)含量及肝细胞的存活率。结果表明: III 组肝细胞培养液中 GOT、GPT、LDH、SOD、MDA 值及细胞存活率与 I 组相比无明显变化($P > 0.05$), 说明 800 μg/mL 虎杖提取物没有细胞毒性, 可用于后续试验; 与 II 组相比, IV 组中 800 μg/mL 虎杖提取物处理组的效果优于其他 2 个浓度组, 可以极显著降低培养液中 GOT 值($P < 0.01$), 显著降低培养液中 GPT、LDH 值($P < 0.05$), 显著提高肝细胞的存活率($P < 0.05$), 而 MDA 含量和 SOD 值差异无统计学意义($P > 0.05$); 与 II 组相比, V 组中 400 μg/mL 虎杖提取物效果优于其他 2 个浓度组, 可以极显著降低培养液中 GOT 值($P < 0.01$), 显著降低培养液中 LDH 值($P < 0.05$), 显著提高肝细胞的存活率($P < 0.05$), 但 GPT 值、MDA 含量、SOD 的差异无统计学意义($P > 0.05$); 与 II 组相比, VI 组中 800 μg/mL 虎杖提取物效果优于其他 2 个浓度组, 能极显著降低培养液中 GOT、GPT、LDH 在肝细胞中的释放($P < 0.01$), 显著降低培养液中 MDA 含量($P < 0.05$), 显著提高肝细胞的存活率($P < 0.05$)。综合以上结果, 以 VI 组中 800 μg/mL 的虎杖提取物效果最好, 能有效抑制 CCl₄ 所造成的肝细胞损伤, 其机制可能与其抗氧化作用有关。

关键词: 建鲤; 虎杖提取物; 肝细胞; 四氯化碳

中图分类号: S965.116; R282

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)04-0413-06

Effects of *Polygonum cuspidatum* extract on biochemical indexes of injured primary hepatocytes of Jian carp caused by CCl₄

DU Jin-liang, JIA Rui, CAO Li-ping, YIN Guo-jun*

(Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, Jiangsu 214081, China)

Abstract: To investigate whether *Polygonum cuspidatum* (PCE) has remedy effects on injured fish liver, primary hepatocytes were isolated from Jian carp and randomly divided into six groups: group I (blank control), group II (treated with CCl₄), group III (treated with 800 μg/mL PCE), IV (treated with 200, 400 or 800 μg/mL PCE before CCl₄ treatment), group V (treated with 200, 400 or 800 μg/mL PCE after CCl₄ treatment), group VI (treated with 200, 400 or 800 μg/mL PCE before and after CCl₄ treatment), 12 h after treatment, culture medium of hepatocytes were collected to determinate the activity of alanine aminotransferase (GPT), aspartate aminotransferase (GOT), lactic acid dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), the content of malondialdehyde (MDA) and the cell viability of hepatocytes in each group.

收稿日期: 2013-01-24

基金项目: 国家自然科学基金(31202002、31200918); 江苏省自然科学基金(BK2012535); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心)资助项目(2013JBFM12)

作者简介: 杜金梁(1982—), 男, 河北沧州市人, 助理研究员, 主要从事临床药理与药物代谢研究, dujl@ffrc.cn; *通信作者, yingji@ffrc.cn

The results showed that in group III, GOT, GPT, LDH, SOD, MDA and cell viability had no obvious change compared with the group I ($P > 0.05$), indicating 800 $\mu\text{g/mL}$ PCE had no cell toxicity and can be used for further testing. In group IV, the remedy effect of 800 $\mu\text{g/mL}$ PCE was better than the other two concentrations, which very significantly decreased the activity of GOT in culture medium ($P < 0.01$); significantly decreased the activity of GPT and LDH ($P < 0.05$); and significantly increased the cell livability of hepatocytes ($P < 0.05$), compared with the group II, but the difference in the content of MDA and the activity of SOD were not statistically significant ($P > 0.05$). In group V, the effect of 800 $\mu\text{g/mL}$ PCE was better than the other concentrations, which could very significantly decrease the activity of GOT in culture medium ($P < 0.01$); significantly decrease the activity of LDH ($P < 0.05$); significantly increase the cell viability ($P < 0.05$), compared with the group II, but the difference in the content of MDA and the activity of GPT were not statistically significant ($P > 0.05$). In group VI, the effect of 800 $\mu\text{g/mL}$ PCE was better than the other concentrations, which very significantly decreased the release of GOT, GPT, LDH in hepatocytes ($P < 0.05$); significantly decreased the content of MDA ($P < 0.05$); significantly increased the cell viability of hepatocytes ($P < 0.05$), compared with the group II. It is concluded that 800 $\mu\text{g/mL}$ PCE in group VI had the best effect, which could effectively protect the primary hepatocytes against CCl_4 induced injury, which was possibly associated to its anti-oxidative activity.

Key words: *Cyprinus carpio* var. Jian; *Polygonum cuspidatum* extract; hepatocytes; CCl_4

近年来,随着水产养殖规模的不断扩大,鱼类肝胆综合症频繁发生。目前认为主要由环境污染、滥用药物、饲料配比不合理等造成。如果肝损伤得不到及时有效的治疗,会造成鱼类的大量死亡,给养殖户造成巨大经济损失。由于现阶段还没有治疗此病的有效药物,养殖户通常在鱼类饲料中长期低剂量添加一些抗生素类药物,如四环素、土霉素、利福平、异烟肼、磺胺类等^[1-3]来进行预防和治疗。虽然这些药物在一定程度上能缓解肝损伤程度,但由于抗生素的长期使用会对鱼类的肝、胆、肾等产生损害作用,同时也会造成药物在鱼体内残留以及产生耐药性;因此,选用、开发具有解毒护肝、疏肝理气、促进肝细胞再生的中药来防治鱼类肝病具有重要意义。

虎杖(*Polygonum cuspidatum*)为蓼科植物,虎杖的根茎含有多种药理活性成分,具有护肝、抗菌、抗病毒、抗肿瘤的作用^[4-6]。张斌等^[7]运用虎杖清肝汤治疗慢性乙型肝炎,结果显示,虎杖清肝汤对慢性乙型肝炎有较好的临床疗效和抗肝纤维化作用。虎杖对鱼类是否有保肝、护肝作用目前还不清楚。笔者以分离培养的建立鲤肝细胞为实验材料,用四氯化碳(CCl_4)构建鱼类的肝损伤模型,从细胞水平上探究虎杖提取物对 CCl_4 所造成的肝细胞损伤的影响,旨在为鱼类保肝药物的开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试鱼

试验所用建鲤取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心渔场,体质健康、无伤,规格基本一致,在循环水系统中驯养 1 周。

1.1.2 试剂和仪器

虎杖提取物购自南通四海植物精华有限公司; L-15 培养基、HBSS 溶液、链霉素/青霉素购于美国 SIGMA 公司;胎牛血清(FBS)和细胞培养板购于 GIBCO 公司;0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液购于美国 SIGMA 公司; CCl_4 (分析纯)购于国药集团化学试剂有限公司;GPT、GOT、LDH、MDA 和 SOD 测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所科技有限公司;细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(WST-1)购自碧云天生物技术研究;723 分光光度计购自上海欣茂仪器有限公司;酶标仪 MK3 购于美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 建鲤肝细胞的分离和培养

无菌采取建鲤肝脏,放入含双抗的 HBSS 溶液漂洗、修剪,加入约为剪碎组织 5 倍体积的胰蛋白

酶消化液^[8-9], 27℃水浴下消化15~20 min后, 用孔径74 μm过滤网过滤, 滤液以1 200 r/min离心10 min, 用HBSS溶液洗3次。弃上清, 加入含体积分数10%胎牛血清的L-15培养基制成细胞悬液, 分别接种于24孔培养板和96孔培养板中, 27℃、5%(体积分数)CO₂条件下培养, 备用。

1.2.2 肝细胞处理及分组

将96孔板和24孔板中的建鲤肝细胞培养24 h后, 弃掉上清, 换用含CCl₄或不同浓度虎杖提取物的L-15培养基进行培养, 观察虎杖提取物对CCl₄所致肝细胞损伤的修复作用。具体分组情况为:

空白对照组(I组): 不用任何药物处理, 具体做法为肝细胞用L-15培养基培养8 h后, 再换用新鲜的L-15培养基继续培养4 h, 然后从24孔板收集上清液。

CCl₄造模组(II组): 肝细胞用L-15培养基培养8 h后, 再换用含8 mmol/L CCl₄的L-15培养基继续培养4 h, 然后从24孔板收集上清液。

虎杖提取物对照组(III组): 肝细胞用L-15培养基培养8 h后, 换用含800 μg/mL虎杖提取物的L-15培养基继续培养4 h, 然后从24孔板收集上清液。

造模前虎杖提取物处理组(IV组): 肝细胞用L-15培养基培养4 h后, 换用含虎杖提取物(200、400、800 μg/mL)的L-15培养基继续培养4 h, 再换用含8 mmol/L CCl₄的L-15培养基培养4 h, 然后从24孔板收集上清液。

造模后虎杖提取物处理组(V组): 肝细胞用L-15培养基培养4 h后, 换用含8 mmol/L CCl₄的L-15培养基培养4 h, 再换用含虎杖提取物(200、400、800 μg/mL)的L-15培养基继续培养4 h, 然后从24孔板收集上清液。

造模前、后虎杖提取物处理组(VI组): 肝细胞用含虎杖提取物(200、400、800 μg/mL)的L-15培养基培养4 h后, 换用含8 mmol/L CCl₄的L-15培养基培养4 h, 再换用含虎杖提取物(200、400、800 μg/mL)的L-15培养基继续培养4 h, 然后从24孔板收集上清液。

以上每个试验组肝细胞取自4尾鱼, 每尾鱼4个重复孔。以上从24孔板各组收集的上清液用于

生化指标检测。

1.2.3 细胞活力的检测

对96孔培养板中各组细胞进行活力检测: 每孔加入10 μL WST-1继续孵育2 h, 在450 nm波长处, 用酶联免疫检测仪测定各孔光吸收值, 并记录结果。细胞存活率=处理组的A_{450 nm}/I组的A_{450 nm}。

1.2.4 生化指标测定

参照试剂盒说明书测定肝细胞培养液中的生化参数, 包括丙氨酸转氨酶(GPT)、天冬氨酸转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)活力等和丙二醛(MDA)含量。

1.2.5 数据统计分析

试验数据采用SPSS16.0进行处理。

2 结果与分析

2.1 建鲤原代肝细胞的存活率

建鲤肝细胞的分离方法有很多, 主要有组织块法、机械分散法、酶消化法和二步灌流法等, 但常用的方法是酶消化法, 且一般多应用胰蛋白酶来进行消化。本试验成功用胰蛋白酶消化法对建鲤肝细胞进行了分离, 细胞存活率在95%以上, 同时用含体积分数为10%胎牛血清的L-15培养基进行培养, 细胞生长状况良好; 因此, 用胰蛋白酶消化法获得的建鲤肝细胞可以用于模型的构建和药理研究。

2.2 虎杖提取物对建鲤肝细胞存活率的影响

由表1可以看出, 经过CCl₄处理的II组细胞的存活率下降明显, 与对照I组相比, 差异显著($P<0.05$)。与II组相比, IV组质量浓度为800 μg/mL虎杖提取物处理能显著提高建鲤细胞的存活率($P<0.05$); V组中质量浓度为400 μg/mL虎杖提取物处理能显著提高建鲤肝细胞的存活率($P<0.05$); VI组中质量浓度200 μg/mL和800 μg/mL虎杖提取物处理能显著提高建鲤肝细胞的存活率($P<0.05$)。比较而言, 以800 μg/mL虎杖提取物组效果较好, 而虎杖提取物对照组(III)与I组相比无明显变化。

表 1 不同质量浓度虎杖提取物对建鲤肝细胞存活率的影响

Table 1 Effects of PCE on the cell viability of primary hepatocytes in different groups

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	肝细胞存活率/%
I		(100.00 \pm 1.23)a
		(66.20 \pm 3.77)b
III	800	(99.71 \pm 2.29)a
IV	200	(78.02 \pm 5.14)ab
	400	(75.42 \pm 3.50)ab
	800	(86.87 \pm 3.22)a
V	200	(76.79 \pm 6.73)ab
	400	(88.84 \pm 2.23)a
	800	(76.86 \pm 7.83)ab
VI	200	(88.86 \pm 5.62)a
	400	(71.21 \pm 8.06)ab
	800	(89.66 \pm 5.10)a

2.3 虎杖提取物对建鲤肝细胞培养液中 GOT 活性的影响

由表 2 可以看出, 组细胞经 CCl_4 处理后的 GOT 活性值升高明显, 与 I 组相比, 差异极显著 ($P<0.01$)。加入 3 种不同浓度的虎杖提取物后, 3 个处理组均出现了 GOT 活性值下降的现象, 与造模 II 组相比, IV 组中 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理能显著降低 GOT 活性 ($P<0.05$), 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理能极显著降低 GOT 活性值 ($P<0.01$); 与 II 组相比, V 组中 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理能极显著降低 GOT 活性值 ($P<0.01$), 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理能显著降低 GOT 活性值 ($P<0.05$); 与 II 组相比, VI 组中 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理能显著降低 GOT 活性值 ($P<0.05$), 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理能极显著降低 GOT 活性值 ($P<0.01$)。综合分析后发现, 以 VI 组中 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的虎杖提取物处理降低 GOT 活性的效果较好, 与 I 组最接近, 而 III 组与 I 组相比无明显变化。

表 2 虎杖提取物对建鲤肝细胞培养液中 GOT、GPT、LDH、SOD、MDA 变化的影响

Table 2 Effects of PCE on the activity of GOT, GPT, LDH, SOD and content of MDA in primary hepatocyte culture medium

组别	虎杖提取物质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	GOT/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	GPT/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	LDH/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	SOD/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	MDA/($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)
I		(9.13 \pm 0.95)A	(8.76 \pm 1.11)A	(357.46 \pm 24.34)A	(12.28 \pm 1.35)a	(0.86 \pm 0.04)a
		(29.05 \pm 1.34)Ba	(19.95 \pm 2.42)Ba	(672.29 \pm 34.52)Ba	(7.72 \pm 1.01)b	(1.44 \pm 0.09)b
IV	800	(7.15 \pm 0.43)A	(8.31 \pm 2.12)A	(352.48 \pm 23.43)A	(11.93 \pm 0.90)a	(0.77 \pm 0.02)a
	200	(16.36 \pm 0.61)b	(14.72 \pm 0.98)ab	(570.81 \pm 53.23)ab	(13.02 \pm 0.84)a	(1.03 \pm 0.04)ab
	400	(14.21 \pm 0.72)b	(12.78 \pm 1.08)ab	(438.23 \pm 23.47)b	(11.48 \pm 0.57)a	(1.12 \pm 0.03)ab
V	800	(12.05 \pm 0.83)A	(10.83 \pm 1.32)b	(442.65 \pm 37.23)b	(8.71 \pm 0.93)ab	(1.38 \pm 0.07)b
	200	(21.89 \pm 0.94)ab	(17.32 \pm 0.78)ab	(513.56 \pm 24.28)ab	(9.62 \pm 0.99)ab	(0.97 \pm 0.07)a
	400	(12.46 \pm 0.76)A	(15.23 \pm 0.91)ab	(427.39 \pm 43.02)b	(11.01 \pm 1.00)ab	(1.09 \pm 0.08)ab
VI	800	(15.91 \pm 0.94)b	(11.33 \pm 1.09)b	(498.34 \pm 29.38)ab	(11.57 \pm 1.11)a	(1.51 \pm 0.03)b
	200	(14.11 \pm 1.18)b	(15.23 \pm 0.65)ab	(492.82 \pm 31.540)ab	(10.23 \pm 0.52)ab	(0.98 \pm 0.03)a
	400	(18.32 \pm 0.54)ab	(12.89 \pm 1.56)ab	(374.74 \pm 34.90)A	(9.59 \pm 0.62)ab	(1.59 \pm 0.05)b
	800	(10.77 \pm 0.88)A	(9.72 \pm 0.89)A	(362.64 \pm 28.47)A	(12.48 \pm 0.97)a	(0.82 \pm 0.07)a

2.4 虎杖提取物对建鲤肝细胞培养液中 GPT 活性的影响

由表 2 可以看出, 组细胞经 CCl_4 处理后 GPT 活性值升高明显, 与 I 组相比, 差异极显著 ($P<0.01$); 加入不同浓度的虎杖提取物后, 3 个处理组中 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的虎杖提取物处理均能显著降低 GPT 活性值, 与 II 组相比差异显著 ($P<0.05$); 3 个处理组中以 VI 组 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的虎杖提取物处理降低 GPT 活

性的效果较好, 与 I 组最接近, 而 III 组与 I 组相比无明显变化。

2.5 虎杖提取物对建鲤肝细胞培养液中 LDH 活性的影响

由表 2 可以看出, 组细胞经 CCl_4 处理后的 LDH 活性值升高明显, 与空白对照 I 组相比, 差异极显著 ($P<0.01$)。加入 3 种不同浓度的虎杖提取物后, 3 个处理组均出现了 LDH 活性值下降的现象:

在 IV 组中, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理能显著降低 LDH 活性值, 与 II 组相比差异显著 ($P < 0.05$); 在 V 组中, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理能显著降低 LDH 活性值, 与 II 组相比差异显著 ($P < 0.05$); 在 VI 组中, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理也能显著降低 LDH 活性值, 与 II 组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。综合分析得出, 以 VI 组中 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的虎杖提取物降低 LDH 活性的效果较好, 与 I 组最接近, III 组与 I 组间差异无统计学意义。

2.6 虎杖提取物对建鲤肝细胞培养液中 SOD 活性的影响

由表 2 可以看出, 组细胞经 CCl₄ 处理后的 SOD 活性值下降明显。加入 3 种不同浓度的虎杖提取物处理后发现, 在 IV 组中 200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理均可以显著提高 SOD 活性值, 与 II 组相比差异显著 ($P < 0.05$); V 组中质量浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的虎杖提取物与 VI 组中相同浓度的虎杖提取物处理均能显著提高 SOD 活性值, 与 II 组相比差异显著 ($P < 0.05$), 但以 VI 组中质量浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的虎杖提取物处理提高 SOD 活性的效果较好, 与 I 组最接近, III 组与 I 组相比无明显变化。

2.7 虎杖提取物对建鲤肝细胞培养液中 MDA 含量的影响

由表 2 可以看出, 组细胞经 CCl₄ 处理后的 MDA 值升高明显, 与空白对照 I 组相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。加入不同浓度的虎杖提取物处理后, IV 组中 MDA 值与 II 组相比变化不明显, 但随着虎杖提取物浓度的增加, MDA 含量呈增加的趋势; V 组中 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的虎杖提取物处理可以显著降低 MDA 值, 与 II 组相比差异显著 ($P < 0.05$); VI 组中, 200、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的虎杖提取物处理均可以显著降低 MDA 值 ($P < 0.05$), 但以 VI 组中 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的虎杖提取物处理降低 MDA 含量的效果最好, 与 I 组最接近, 而 III 组与 I 组相比无明显变化。

3 结论与讨论

与 CCl₄ 处理组比较, 虎杖提取物 3 个处理组中肝细胞的存活率均有不同程度的提高, 这说明虎杖

提取物具有促进受损肝细胞恢复、保护肝细胞的作用。而虎杖提取物处理 III 组中细胞存活率与空白对照 I 组相比无明显变化, 说明虎杖提取物本身对肝细胞不产生毒性作用或毒性很小。

关于 CCl₄ 的损伤机制, 目前普遍认为是自由基的形成及引发的链式过氧化反应^[10-13], 破坏了生物膜结构的完整性, 引起膜通透性增高, 最终导致肝细胞死亡。肝细胞受损后, 转氨酶会从肝细胞内溢出, 导致细胞外 GOT、GPT 水平增高, 故 GOT、GPT 是判断肝损伤的重要标志。LDH 广泛分布于机体组织细胞的胞质内, 当肝细胞受到损伤后, 其含量也会升高。关于 CCl₄ 致肝细胞损伤的研究, 报道的对象多为人、小鼠、大鼠^[14-18], 而在鱼类方面未见有相关报道。研究人员发现, 在 CCl₄ 致人或大鼠肝细胞损伤的模型组中, GOT、GPT 活性值明显升高, 与正常对照组相比, 差异极显著 ($P < 0.01$)。在本研究中, 经过 CCl₄ 造模后, GOT、GPT、LDH 的活性值均明显升高, 说明肝细胞损伤模型的制备是成功的。本实验结果与亢泽春、罗霄山等利用 CCl₄ 致人或大鼠肝细胞损伤后的 GOT、GPT 活性值变化情况相符^[17-18]。将 3 种不同浓度的虎杖提取物处理建鲤肝细胞后, 肝细胞培养液中 GOT、GPT、LDH 的活性值均降低, 但以造模前、后 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物处理的效果最好, 能降低 CCl₄ 对肝细胞造成的损伤, 对建鲤肝细胞有一定的保护作用。

SOD 是机体中重要的抗氧化酶, 其活性值变化在一定程度上反映了机体抗氧化能力的高低。而 MDA 是脂质过氧化物的产物, 其含量变化则在一定程度上反映了受自由基攻击的情况。在本实验中, CCl₄ 造模后, 由于建鲤肝细胞膜受损, 通透性增加^[19-20], 导致肝细胞中 MDA 含量显著上升, SOD 活性显著下降, 使建鲤肝细胞处于氧化应激状态, 这说明 MDA、SOD 可能参与了 CCl₄ 在建鲤肝细胞中的代谢解毒过程, 以抵抗 CCl₄ 对肝细胞所造成的损伤。待加入 3 种不同浓度的虎杖提取物后, 3 个处理组中 MDA 含量出现不同程度的降低, 其中以虎杖提取物前、后处理组中 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的处理降低 MDA 的效果最好, 说明 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虎杖提取物可以明显抵抗 CCl₄ 脂质过氧化, 对肝细胞有修复作用。3 个处理组中 SOD 活性值出现不同程度的升高,

其中以 800 $\mu\text{g/mL}$ 虎杖提取物提高 SOD 活性的效果最好。

综上所述,造模前、后虎杖提取物处理组修复损伤肝细胞的效果明显好于造模前处理组和造模后处理组,3个试验浓度中以 800 $\mu\text{g/mL}$ 的虎杖提取物作用效果略好于其他 2 个浓度的效果。虎杖提取物能明显提高建鲤肝细胞的抗氧化功能,降低氧自由基和脂质过氧化物的产生,保护细胞膜结构与功能的完整,减轻 CCl_4 对建鲤肝细胞造成的损害,因此,虎杖提取物可以作为一种鱼类保肝药物,用来防治鱼类肝损伤。

参考文献:

- [1] 柳富荣. 常见鱼病防治新技术. 肝胆综合症[J]. 湖南农业, 2007(3): 19.
- [2] 谢刚, 海波. 鱼类肝胆综合症的防治[J]. 江西饲料, 2006(4): 43.
- [3] 李好琴. 鱼类肝胆综合症的防治技术[J]. 河南水产, 2007, 73(4): 23-24.
- [4] 李菁雯, 陈祥龙, 孟祥智. 虎杖及其提取物的研究进展[J]. 中医药学报, 2011, 39(3): 103-106.
- [5] 张海防, 龚昌贵, 刘晓华, 等. 虎杖提取物抗炎作用的实验研究[J]. 药学进展, 2003, 27(4): 230-233.
- [6] 曹庸, 于华忠, 杜亚填, 等. 虎杖白藜芦醇超临界 CO_2 萃取研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2003, 29(4): 353-358.
- [7] 张斌, 王灵台, 陈建杰, 等. 虎杖清肝汤治疗慢性乙型肝炎及对肝纤维化形成的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(3): 37-39.
- [8] 李月红, 吉尚雷, 吴东明, 等. 鲤鱼肝细胞的原代培养研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(22): 11278-11279.
- [9] 李效宇, 刘永定, 宋立荣. 鲢、鲤和鲫肝细胞原代培养[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4): 419-420.
- [10] Huo H Z, Wang B, Liang Y K, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl_4 -induced oxidative damage in rats[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(10): 6529-6543.
- [11] Yang L, Wang C Z, Ye J Z, et al. Hepatoprotective effects of polyphenols from *Ginkgo biloba* L. leaves on CCl_4 -induced hepatotoxicity in rats[J]. Fitoterapia, 2011, 82(6): 834-840.
- [12] 何秋霞, 彭维兵, 韩利文, 等. 四氯化碳致斑马鱼肝损伤的初步研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(8): 1182-1183.
- [13] 汪涛, 姜华, 陆国才, 等. 四氯化碳肝脏毒性研究新进展[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(4): 324-327.
- [14] 吴丽, 孙妩弋, 桂双英, 等. 芍药苷对体外化学性肝细胞损伤的保护作用[J]. 陕西中医学院学报, 2006, 29(6): 49-51.
- [15] 焦河玲, 黄兆胜, 贾建功. 大黄素对四氯化碳损伤原代培养大鼠肝细胞的保护作用[J]. 河南中医, 2000, 20(5): 20-22.
- [16] 蒲含林, 洪岸, 彭波, 等. HPP 对 CCl_4 致大鼠肝脏灌流损伤的影响[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2001, 40(5): 126-128.
- [17] 罗霄山. 芦荟大黄素对 CCl_4 损伤原代培养大鼠肝细胞的保护作用[J]. 中医药学刊, 2003, 21(7): 1101-1102.
- [18] 亢泽春, 李金莲, 牟茜, 等. 甘薯黄酮对 CCl_4 所致肝细胞损伤的保护作用[J]. 滨州医学院学报, 2010, 33(5): 331-333.
- [19] 孟洁, 杭瑚. 虎杖提取物的抗氧化活性及稳定性研究[J]. 化学世界, 2000, 41(8): 418-421.
- [20] 唐云安, 刘玉清, 王国钦. 肝损伤动物模型研究进展[J]. 卫生毒理学杂志, 2002, 16(4): 236-238.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维