

灵芝益甘粉对 D-氨基半乳糖诱导小鼠肝损伤的保护作用研究

李敏, 栾英杰, 张大磊, 王权, 李岳, 彭帅, 李卫东*, 林志彬

(北京大学医学部基础医学院, 北京 100083)

摘要:目的: 观察灵芝益甘粉保肝作用, 并探讨其作用机制。方法: 实验分为: 正常对照组、模型对照组、阳性对照组、灵芝益甘粉高、中、低剂量组。造模 24h 后处死动物并取材, 测定: ①肝、脾、胸腺与体重之比; ②血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性; ③肝组织丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)含量; ④小鼠肝组织病理变化。结果: 灵芝益甘粉低、中、高剂量给药组对模型小鼠升高的 ALT 和 AST 活性降低。与模型组比较, 灵芝益甘粉可以明显降低小鼠肝匀浆 MDA 的水平, 升高 GSH-PX 活性。模型组小鼠肝细胞气球样变性、坏死程度高于对照组, 灵芝益甘粉能明显改善肝细胞坏死病变程度。结论: 灵芝益甘粉对 D-氨基半乳糖诱导的肝损伤具有一定的保护作用, 其保护作用可能与其抑制脂质过氧化损伤有关。

关键词: 灵芝益甘粉; 免疫性肝损伤; D-氨基半乳糖; 药理研究

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1673-2197(2009)08-0015-04

灵芝(*Ganoderma lucidum*), 是祖国中医药宝库中的珍品。通常所称的灵芝是指灵芝[*Ganoderma lucidum*(Leyss. ex Fr.) Karst.] 的子实体部分, 包含多种活性成分, 如: 多糖类、三萜类甾醇类和肽类等。药理与临床研究均证明, 灵芝具有抗肿瘤、免疫调节、镇静、调节血脂、降血糖、保肝、抗氧化等作用^[1-8]。灵芝益甘粉是以段木栽培的灵芝、丹参、大黄为主要原料, 经科学合理提取, 佐以精氨酸和牛磺酸而成。仅有的报道证明, 该品对 CCl₄ 诱导的化学性肝损伤有辅助保护作用^[9]。本文探讨了灵芝益甘粉对 D-GalN 诱导肝损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂

灵芝益甘粉由福州东星生物技术有限公司提供, 组分为: 灵芝 52%、丹参 19%、大黄 2.3%、牛磺酸 6.7%、精氨酸 20%, 为棕褐色粉剂, 易溶于水, 实验前用生理盐水溶解; 氨基半乳糖: INALCO SPA MILANO ITALY 公司; 宽胸解毒颗粒: 购自北京中医科学院西苑医院, 京药制字: Z20063019; 门冬氨酸氨基转移酶试剂盒(AST)、丙氨酸氨基转移酶试剂盒(ALT)由北京北化康泰临床试剂有限公司提供; 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒、丙二醛(MDA)

测定试剂盒由南京建成生物工程研究所第一分所提供。

1.2 实验动物

昆明种小鼠, 雄性, 体重 25±3g, 批准号为 SKXK-京-2006-0008, 北京大学医学部实验动物中心提供。

1.3 分组与给药

实验分组及给药方法。动物按体重随机分组, 每组 12 只。灵芝益甘粉低、中、高剂量组分别每日灌胃灵芝益甘粉 0.125g/kg、0.25g/kg、0.5g/kg。正常组、模型组均以等体积生理盐水灌胃, 阳性药对照组每日灌胃宽胸解毒颗粒 1g/kg。给药 4 周后按下述方法制备肝损伤模型。

1.4 制备肝损伤模型方法

除正常组以外各组均一次性腹腔注射, D-氨基半乳糖(D-GalN)(650mg/kg)造模, 24h 后, 处死动物, 取材。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 血清 ALT 活性测定 剖杀前一天断饲, 第 2 天摘眼球取血, 3 500rPm 离心 5min, 取血清, 以改良赖氏法检测^[10], 血清中的 ALT 能与丙氨酸和 α-酮戊二酸反应生成丙酮酸及谷氨酸, 丙酮酸与 2, 4-二硝基苯肼生成 2, 4-二硝基苯腙在碱性液中显棕红色, 在 505 nm 处有最大吸收值。先用丙酮酸标准液作标准曲线, 然后测定样品的吸光度, 查

收稿日期: 2009-05-21

作者简介: 李敏(1980—), 女, 河北人, 硕士, 北京大学医学部基础医学院技师, 研究方向为抗炎免疫药理与肿瘤药理; 李卫东(1957—), 女, 北京人, 博士, 北京大学医学部基础医学院教授, 研究方向为抗炎免疫药理与肿瘤药理。

阅标准曲线, 并且乘以血清稀释倍数, 计算 ALT 的活力。

1.5.2 血清 AST 活性测定 血清中的 AST 能与天冬氨酸和 α -酮戊二酸反应生成草酰乙酸和谷氨酸, 草酰乙酸与 2,4-二硝基苯肼生成 2,4-二硝基苯腙在碱性液中显棕红色, 在 505nm 处有最大吸收值。同上法计算 AST 的活力。

1.5.3 肝组织匀浆丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测定 取肝脏约 0.5g, 用冰冷的生理盐水漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 称重, 在冰浴的平皿上剪碎, 用生理盐水配 10% 肝组织, 用匀浆器匀浆, 低温离心, 化学比色法和硫代巴比妥酸法^[11]测定肝匀浆中 GSH-PX 和 MDA 活性。

1.5.4 肝组织 HE 染色 肝左叶同一部位组织, 4% 甲醛固定, 按常规方法制备切片, 在光镜下进行病理学检查。

1.6 统计学方法

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数值变量均采用 SPSS 10.0 单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 灵芝益甘粉对急性 D-GalN 肝损伤小鼠肝、脾、胸腺体重比的影响

至动物给药结束时, 灵芝益甘粉各组肝/体重比均低于模型组, 其中低剂量组和高剂量组与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$); 灵芝益甘粉各组脾/体重比以及胸腺/体重比与模型组比较无统计学差异(表 1)。

表 1 灵芝益甘粉对急性 D-GalN 肝损伤小鼠肝、脾、胸腺的影响

组别	剂量 (g/kg)	肝/体重 (mg/g)	脾/体重 (mg/g)	胸腺/体重 (mg/g)
空白组	—	55.1 ± 2.3	2.8 ± 0.6	1.8 ± 0.5
模型组	—	56.4 ± 5.4	3.9 ± 2.2	1.7 ± 0.6
宽胸颗粒组	1	56.4 ± 7.6	6.4 ± 3.0*	2.3 ± 3.2
灵芝益甘粉	0.125	50.4 ± 4.2*	5.6 ± 2.5	1.7 ± 0.2
灵芝益甘粉	0.25	52.5 ± 5.0	3.9 ± 1.0	1.7 ± 0
灵芝益甘粉	0.5	48.1 ± 3.7*	4.2 ± 1.2	1.5 ± 0.3

注: n=12, 与模型组比较; * $P < 0.05$ 。

2.2 灵芝益甘粉对急性 D-GalN 肝损伤小鼠血清 ALT、AST 的影响

实验结果可见, 模型组的血清 ALT、AST 活性显著高于对照组, 灵芝益甘粉各组的血清 ALT、AST 活性较模型组均有明显降低。提示灵芝益甘粉对急性肝 D-GalN 损伤小鼠肝脏均有一定的保护作用, 使血清中 ALT、AST 活性趋于正常(表 2)。

表 2 灵芝益甘粉对急性 D-GalN 肝损伤小鼠血清 ALT、AST 的影响

组别	剂量 (g/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
空白组	—	30.4 ± 6.5	125.7 ± 40.3
模型组	—	155.7 ± 77.2 [#]	190.5 ± 40.8 [#]
宽胸解毒颗粒组	1	51.2 ± 23.0**	153.9 ± 16.2*
灵芝益甘粉 × 4w	0.125	42.0 ± 11.5**	123.1 ± 13.0**
灵芝益甘粉 × 4w	0.25	52.6 ± 12*	131.9 ± 26.4**
灵芝益甘粉 × 4w	0.5	40.0 ± 16.3**	125.9 ± 19.4**

注: n=12, 与模型组比较; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 模型与空白组比较[#] $P < 0.05$ 。

2.3 灵芝益甘粉对急性 D-GalN 肝损伤小鼠肝 GSH-PX、MDA 的影响

模型组肝组织 GSH-PX 显著低于对照组, 而灵芝益甘粉组肝组织 GSH-PX 则比模型组活性显著升高; 模型组肝组织 MDA 显著高于对照组, 而灵芝益甘粉组肝组织 MDA 比模型组显著下降, 说明灵芝益甘粉对小鼠急性肝损伤时出现的活性氧自由基释放有抑制作用(表 3)。

表 3 灵芝益甘粉对急性 D-GalN 肝损伤小鼠肝组织匀浆中 GSH-PX、MDA 的影响

组别	剂量 (g/kg)	GSH-PX (活力单位)	MDA (nmol/mL)
空白组	—	634.9 ± 26.8	6.6 ± 1.3
模型组	—	423.3 ± 35.8 [#]	7.4 ± 1.1
宽胸颗粒组	1	490.4 ± 141.6*	3.6 ± 0.4**
灵芝益甘粉	0.125	558.1 ± 113.0*	4.7 ± 0.9**
灵芝益甘粉	0.25	681.5 ± 18.9*	4.4 ± 0.7**
灵芝益甘粉	0.5	702.5 ± 23.0*	4.0 ± 0.6**

注: n=12, 与模型组比较; ** $P < 0.01$; 模型与空白组比较; [#] $P < 0.05$ 。

2.4 灵芝益甘粉对 D-GalN 肝损伤小鼠肝组织病理学影响

小鼠肝脏病理组织学检查结果显示, 正常组肝小叶结构正常, 无肿胀和明显水肿, 无脂肪变性, 肝小叶内及汇管区无炎细胞浸润, 无纤维结缔组织增生; 模型组小鼠可见肝小叶结构紊乱不清, 肝细胞明显肿胀, 体积增大, 水肿变性, 及气球样变性, 小区出现肝细胞片状坏死伴多量炎细胞浸润, 汇管区大量炎细胞浸润及明显纤维结缔组织增生, 说明模型建立成功; 灵芝益甘粉低剂量组显示不同程度的肝细胞变性, 坏死程度显著减轻, 炎性细胞浸润减少, 肝组织病变明显改善(图 1—6)。

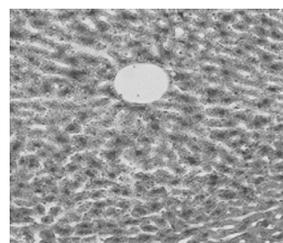


图 1 正常组 HE × 200

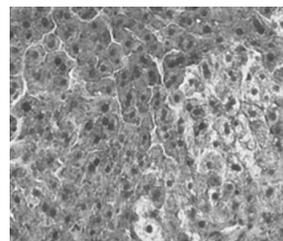


图 2 模型组 HE × 200

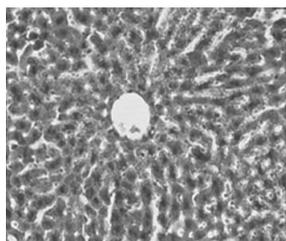


图 3 宽胸颗粒组(1g/kg) HE× 200

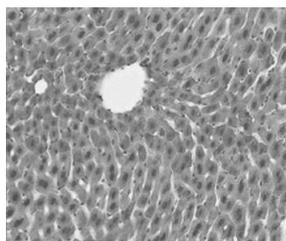


图 4 灵芝益甘粉组(0.125g/kg) HE× 200

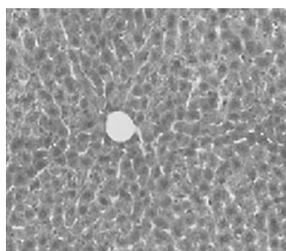


图 5 灵芝益甘粉组(0.25g/kg) HE× 200

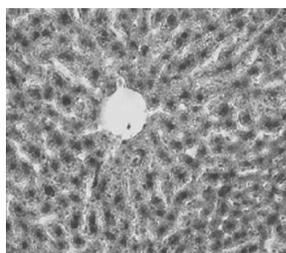


图 6 灵芝益甘粉组(0.5g/kg) HE× 200

3 讨论

肝炎包括病毒性肝炎和非病毒性肝炎两大类。非病毒性肝炎主要是由乙醇、化学毒物或药物引起的中毒性肝炎。病毒性肝炎的治疗包括抗病毒、调节免疫和保肝。尽管目前已有一些抗病毒药如干扰素、干扰素诱导剂、拉米夫定等,但这些药物疗效不够理想,且不良反应较多。由于病毒性肝炎患者同时存在免疫功能障碍和肝损伤,故保肝和免疫治疗仍是重要的治疗环节。在化学毒物或药物引起的肝损伤,保肝治疗更是非常重要的手段。

D-GalN 肝损伤动物模型,接近人肝炎发生的病理过程,是筛选和研究保肝药物较为理想的模型之一。肝细胞内许多物质代谢过程与磷酸尿嘧啶核苷密切相关,磷酸尿嘧啶核苷如果发生耗竭,可以引起肝细胞损伤甚至坏死。

D-GalN 是一种肝细胞磷酸尿嘧啶核苷干扰剂,通过竞争生成二磷酸尿苷半乳糖使磷酸尿苷耗竭,导致物质代谢障碍,引起肝细胞变性、坏死^[2]。D-GalN 作为急性肝损伤工具药,仅需给药 1 次,较 CCl₄ 方便,目前已被广泛用于小鼠和大鼠肝损伤模型制备,因此,我们本实验采用 D-Gal 作为致毒物可制成小鼠特异性肝损伤模型。

灵芝[赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst] 是担子菌纲多孔菌科灵芝属真菌的子实体,曾有报道^[13],灵芝乙醇提取物对四氯化碳(CCl₄) 诱发的小鼠肝损伤有明显保护作用,可降低肝损伤小鼠血清 ALT, 肝脏甘油三酯(TG), 并改善中毒小鼠肝脏的解毒功能,王明宇等^[14] 证明灵芝中提取的三萜类化合物均能明显降低 CCl₄、D-Gal 及 BCG + LPS 引起的小鼠肝损伤模型的血清 ALT 和肝脏 TG 含量,并不同程度减轻动物肝损伤的程度。灵芝三萜类化合物除对 CCl₄ 和 D-氨基半乳糖引起的肝损伤有明显的保护作用外,还对卡介苗(BCG) + 脂多糖(LPS) 引起的免疫性肝损伤有明显保护作用^[15]。另外,灵芝肽(GLP) 对 D-Gal 诱导的小鼠肝损伤有很好的保护作用^[16]。中药丹参具有活血通络、祛瘀止痛、凉血消痈、清心除烦之功效。现代药理研究证明,丹参对小鼠四氯化碳、D-GalN 肝损伤有明显的保护作用^[17]。大黄具有泻下攻积、清热泻火、止血解毒、活血祛瘀、利胆退黄之功效。生大黄对四氯化碳或酒精中毒性肝炎的动物具有减轻肝脏炎症或坏死的作用^[18],实验证明,灵芝辅以丹参、大黄和氨基酸,对化学性肝损伤具有保护作用^[19]。

本实验结果指出,灵芝益甘粉明显改善肝脏组织病理学,显著降低肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 的活性;使肝组织 GSH-Px 活性显著升高、MDA 含量显著降低,提示灵芝益甘粉可能通过清除自由基、保护细胞膜和抗脂质过氧化而发挥肝细胞保护作用。然而,灵芝益甘粉保肝作用机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] ZHANG GL, WANG YH, NI W, et al. Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(4): 728-733.
- [2] CAO LZ, LIN ZB. Regulation on maturation and function of dendritic cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides[J]. Immunol Lett, 2002, 83(3): 163-169.
- [3] ZHANG GL, TANG Q, ZIMMERMANN A-KORDMANN, et al. Activation of B lymphocytes by GHS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*[J]. Life Sci, 2002, 71(6): 623-638.
- [4] BAO XF, WANG XS, DONG Q, et al. Structure feature of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. Phytochemistry, 2002, 59(2): 175-181.

- [5] LIU X, YUAN LP, CHUNG CK, et al. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum* [J] . *Cancer Lett*, 2002, 182(2): 155-161.
- [6] GAO JJ, MIN BS, AHN EM, et al. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells[J] . *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 2002, 50(6): 837-840.
- [7] SLIVA D, LABARRERE C, SLIVOVA V, et al. *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells[J] . *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 298(4): 603-612.
- [8] LEE JM, KWON H, JEONG H, et al. Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*[J] . *Phytother Res*, 2001, 15(3): 245-249.
- [9] 曹素芳, 林建松, 林东星. 灵芝组方保肝的研究[J] . *中国食用菌*, 2006, 25(5): 49-50.
- [10] 杨昌国, 许叶, 江摩海, 等. 转氨酶测定标准化的意见[J] . *临床检验杂志*, 1992, 10(4): 170.
- [11] ELLMAN GL. Tissue sulfhydryl groups[J] . *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82: 70-77.
- [12] 汤新慧, 高静. 实验性肝损伤的损伤机制[J] . *中西医结合肝病杂志*, 2002, 12(1): 53-551.
- [13] 林志彬. 灵芝的现代研究[M] . 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1996. 166-169.
- [14] 王明宇, 刘强, 车庆明. 灵芝三萜类化合物对 3 种小鼠肝损伤模型的影响[J] . *药学报*, 2000, 35(5): 326-329.
- [15] 王明宇, 林志彬. 灵芝三萜类成分在体内对外对小鼠免疫性肝损伤的影响[J] . *中国药理学杂志*, 2000, 35(12): 809-812.
- [16] 石燕玲, 何慧, 梁润生. 灵芝肽对小鼠半乳糖胺致肝损伤的保护作用[J] . *食品科学*, 2008, 29(5): 316-419.
- [17] 刘永刚, 陈厚昌, 蒋毅萍, 等. 丹参酮 II-A 对小鼠肝损伤的保护作用[J] . *中药材*, 2001, 24(8): 588-589.
- [18] 胡华林, 崔锦章等. 生大黄的实验研究及治疗肝性脑病的临床观察[J] . *江苏医药*, 1994, 20(6): 304-305.

(责任编辑:王尚勇)

The Protective Effect of *Ganoderma* Liver-protective Powder on D-galactose Induced Liver Injury in Mice

Li Min, Luan Yingjie, Zhang Dalei, Wang Quan, Li Yue, Peng Shuai, Li Weidong, Lin Zhibin

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

Abstract; Objective To observe the effect of *Ganoderma* liver-protective powder (GLPP) on liver protection and explore the mechanism. **Methods:** Experimental animals divided into four group e. g. control group, model group, positive control group, GLPP high, medium and low-dose groups. After 24 hours modeling, we kill the mice and take samples; ①calculated the ratio of liver, spleen, thymus with body weight; ②detected the activity of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST); ③detected the content of liver maleic dialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-PX); ④observed histopathology of liver were. **Results:** The low-dose, medium-dose and high-dose of GLPP decreased the elevating activity of ALT and AST. The low-dose, medium-dose and high-dose of GLPP could obviously decrease the content of MDA of liver homogenate, The activity of GSH-PX in liver homogenate increased. Histopathological changes in liver tissue show that, there are balloon-like degeneration in liver cells and cellular necrosis in model and the degree higher than control. GLPP could obviously improve the degree of hepatic necrosis. **Conclusion** GLPP showed significant protective action on acute liver injury induced by D-GalN in mice, and protective effect may be related to the inhibition of lipid peroxidation damage.

Key words: *Ganoderma* liver-protective powder; Liver damage; D-galactose; pharmacological study