

大黄素和大黄多糖对铜负荷模型大鼠脂质过氧化的影响

徐磊* 蔡永亮 王艳昕 侯志峰 朱虹

(安徽省中医院脑病二科, 安徽省合肥市梅山路 117 号, 230031)

基金项目: 安徽中医学院临床科研基金项目(2009LC1-021B)

* 通讯作者: jessepower@163.com, (0551)2838706

[摘要] 目的 探讨大黄素(EMD)和大黄多糖(RTP)对铜负荷模型鼠体内脂质过氧化以及肝功能的影响。方法 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组和给药组, 每组 20 只, 以铜负荷饮食法造模 8 周, 造模第 4 周后给药组给予 EMD、RTP 各 200 mg/(kg·d)灌胃, 对照组和模型组给予等量生理盐水, 各组共灌胃 4 周。观察各组大鼠血清和肝组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平和肝功能指标的变化。结果 与对照组比较, 模型组血清和肝组织中 MDA 水平显著升高, SOD、GSH-Px 水平显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 模型组血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)和总胆红素(TBIL)水平较对照组显著升高, 白蛋白(ALB)水平显著下降($P<0.01$)。给药组较模型组血清和肝组织中 MDA 水平显著下降, SOD、GSH-Px 水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 给药组 ALT、AST 和 TBIL 水平较模型组显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)、ALB 水平无显著变化($P>0.05$)。结论 EMD 联合 RTP 能抑制铜负荷模型鼠体内脂质过氧化, 改善其肝功能水平。

[关键词] 大黄素; 大黄多糖; 肝豆状核变性; 铜负荷; 脂质过氧化; 肝功能

Effect of Emodin and Rheum Tanguticum Polysaccharide on Lipid Peroxidation in Copper-Overloaded Rats

XU lei, CAI Yongliang, WANG Yanxin, HOU Zhifeng, ZHU Hong

(TCM Hospital of Anhui Province, Anhui Province 230031)

ABSTRACT Objective To research the effect of Emodin (EMD) and Rheum tanguticum polysaccharide (RTP) on lipid peroxidation and liver function in copper-overloaded rats. **Methods** Sixty Wistar rats were randomized into the control group, model group and treatment group, with 20 in each. The rat models were established with copper-overloaded diet for eight weeks. The treatment group was intragastrically administrated with 200 mg/(kg·d) EMD and RTP. The other two groups were given normal saline. The treatment lasted for four weeks. The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL) and albumin (ALB) were observed. **Results** Comparing with the control group, the levels of MDA, ALT, AST and TBIL were significantly increased ($P<0.01$) but the levels of SOD, GSH-Px and ALB were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$) in the model group. Comparing with the model group, the levels of SOD and GSH-Px were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$) but the levels of MDA, ALT, AST and TBIL were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$) in the treatment group. There was no significant difference between the model group and treatment group in the ALB level ($P>0.05$). **Conclusion** The combination of EMD and RTP can inhibit the lipid peroxidation and improve liver function in copper-overloaded rats.

Keywords Emodin; Rheum tanguticum polysaccharide; liver degeneration; copper-overloaded; lipid peroxidation; liver function

肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD)是一种常染色体隐性遗传的铜代谢障碍疾病, 临床上主要表现为进行性加重的锥体外系症状、肝硬化、肾功能损害及角膜 K-F 环形成等^[1]。研究表明, HLD 患者体内蓄积的铜能够产生大量的氧自由基, 通过刺激过氧化产物形成来损害靶细胞^[2]。大黄素(EMD)和大黄多糖(RTP)具有抑制自由基引起的脂质过氧化反应, 增加自由基清除的作用^[3],

并且能够改善肝功能^[4-5]。本研究利用 EMD 和 RTP 治疗铜负荷大鼠, 观察其对模型大鼠血清和肝组织氧化应激指标和肝功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

清洁级雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重(250±30)g, 购于安徽医学科学研究所实验动物中心, 动物合格证号: SCXK(皖)2011-002。适应性饲养 1 周,

按随机数字表法分对照组、模型组和给药组,各 20 只。

1.2 主要试剂与仪器

ASCA 全自动生化分析仪:美国 Microgenics 仪器公司。丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒:由南京建成生物工程研究所提供,批号:20101205。EMD:购于合肥博美生物科技有限责任公司,批号:lot20090512112,纯度:98%。RTP:由安徽中医药大学药理实验室采用水提醇沉法提取,纯度:80%。

1.3 模型建立及给药

参考文献[6]建立模型,将模型组和给药组大鼠予以铜负荷饮食,喂饲含硫酸铜 1 g/kg 的粉状饲料和 0.185%硫酸铜去离子水 8 周。对照组喂普通饲料 8 周。治疗组于第 4 周后将 EMD 溶于 0.5%羧甲基纤维素钠,于每日下午给予灌胃,RTP 溶于 0.5%羧甲基纤维素钠于 EMD 后 1 h 给予灌胃。EMD 和 RTP 均以 200 mg/(kg·d)剂量灌胃。对照组和模型组给予等量生理盐水灌胃,各组灌胃 4 周。

1.4 观察指标及方法

第 8 周结束后禁食 18 h,动物麻醉,腹主动脉取血 8 ml 置于非抗凝管,静置 0.5 h,3000 r/min 离心 10 min 取血清,血清充氮气后密封放入超低温冰箱中保存以备测;在肝脏最大叶边缘 0.5 cm 处取小块肝组织冰生理盐水冲洗,滤纸吸干,称取 0.5 g 置于预冷的 5 ml 生理盐水,迅速用内切式匀浆机 10000 r/min 匀浆 10 s/次,间隙 30 s,连续 3 次,0℃中制成 10%的肝匀浆,再用高速冷冻离心机 4℃3000 r/min 离心 10 min,取上清液 3 ml,-20℃保存

待检。SOD、MDA 和 GSH-Px 测定分别采用黄嘌呤氧化酶法、硫代巴比妥酸法和二硫代二硝基苯甲酸法,按试剂盒说明书要求严格操作。血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)和总胆红素(TBil)和白蛋白(ALB)测定由全自动生化仪测定。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两样本均数比较采用 *t* 检验,多样本均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 一般情况

造模大鼠在前 4 周对饲料的消耗及饮水量减少,约为对照组的 2/3,活动减少,毛色欠光泽,在造模过程中模型组和给药组各有 3 只大鼠死亡,对照组无死亡。在给药过程中模型组死亡 3 只,给药组死亡 2 只。

2.2 各组大鼠血清和肝组织 SOD、MDA 和 GSH-Px 水平比较

表 1 示,模型组大鼠血清和肝组织中 SOD、GSH-Px 水平较对照组显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、MDA 水平显著升高($P < 0.01$);给药组大鼠血清和肝组织中 SOD、GSH-Px 水平较模型组显著升高($P < 0.01$)、MDA 水平显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠肝功能比较

表 2 示,模型组 ALT、AST 和 TBil 较对照组显著升高、ALB 显著降低($P < 0.01$)。给药组 ALT、AST 和 TBil 水平较模型组显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、ALB 水平无显著变化($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠血清和肝组织 SOD、MDA 和 GSH-Px 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血清			肝脏		
		SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)	GSH-Px(U/ml)	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	GSH-Px(U/mg)
对照组	20	184.20±6.65	5.33±0.14	256.28±8.39	205.66±12.53	5.42±0.24	420.79±8.32
模型组	14	163.93±6.21*	8.23±0.94**	142.85±6.66**	109.03±12.68**	7.88±0.29**	293.77±6.51**
给药组	15	191.89±10.27△△	5.99±0.15△△	233.50±6.45△△	162.67±7.18△△	6.12±0.13△	357.39±10.16△△

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠肝功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBil(μ mol/L)	ALB(g/L)
对照组	20	17.24±5.41	27.87±6.19	7.40±1.50	48.54±17.72
模型组	14	33.45±8.41**	55.81±13.62**	32.30±5.10**	30.91±12.41**
给药组	15	27.62±10.83△△	40.19±12.41*△	19.90±5.70*△△	32.23±20.17

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

给药组 AST 和 TBiL 水平较对照组显著升高($P < 0.05$)。

3 讨论

HLD 是一种常染色体隐性遗传性铜代谢障碍疾病,是由于转运铜的 WD 基因发生突变,其编码产物 P 型 ATP 酶(ATP7B)部分或全部丧失,导致铜过量沉积于脑、肝、肾等脏器^[7]。铜蓄积在组织中,作为氧化物前体促进自由基和有害的脂质蛋白质氧化物形成而引起细胞损伤^[8]。自由基作用于脂质发生过氧化反应,氧化终产物为 MDA,会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性,MDA 作为氧化应激标志物来反映机体脂质过氧化程度,从而间接反应细胞的损害情况^[9]。SOD 和 GSH-Px 可以消除机体内的过氧化氢及脂质过氧化物,防止细胞脂质过氧化,阻断活性氧自由基对机体的进一步损伤,是生物体内重要的活性氧自由基清除剂,在保护细胞免受自由基损伤过程中起着关键作用,是反映机体抗氧化能力的一个重要指标^[10]。本实验中,模型组大鼠血清和肝组织的 MDA 水平显著高于对照组($P < 0.01$),而 SOD 和 GSH-Px 水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),再次证明脂质过氧化反应在铜蓄积引起细胞损害中的发挥作用。

大黄的主要成分 EMD 和 RTP 在抗氧化及防治有氧化损伤引起的相关疾病方面有较好的疗效。Lee 等^[11]研究表明,大黄素可以明显降低 CCl₄ 诱导的急性肝功能损害大鼠的 ALT 和 AST 水平,减少 MDA 的产生。在 Dang 等^[12]研究中,大黄素降低 TBiL、ALT 和 AST 水平,并且具有降低肝组织 MDA 水平和升高 SOD 水平的抗氧化应激作用。而 Liu 等^[13]研究表明,RTP 具有减少 MDA 生成,提高 SOD 活性的作用。本实验中,给药组大鼠血清和肝组织中 SOD、GSH-Px 水平较模型组显著升高($P < 0.01$)、MDA 水平显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明 EMD 和 RTP 在铜负荷大鼠的氧化应激损伤中具有保护作用,能够抗氧化和清除自由基。而给药组 ALT、AST 和 TBiL 水平较模型组显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),也证实了 EMD 和 RTP 具有改善肝功能的作用。

综上所述,EMD 和 RTP 能够抑制铜负荷模型大鼠体内脂质过氧化,具有抗氧化和清除自由基的作用,并改善其肝功能水平,为治疗 HLD 提供实验依据。

参考文献

- [1] Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al. Wilson's disease[J]. Lancet, 2007, 369(9559): 397-408.
- [2] Huster D, Purnat TD, Burkhead JL, et al. High Copper Selectively Alters Lipid Metabolism and Cell Cycle Machinery in the Mouse Model of Wilson Disease[J]. J Biol Chem, 2007, 282(11): 8343-8355.
- [3] 王志鹏, 刘莉, 梅其炳, 等. 唐古特大黄多糖对大鼠实验性颅脑外伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(10): 974-976.
- [4] 刘莉, 李保莉, 周四元, 等. 唐古特 RPP 对 CCl₄ 小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 第四军医大学学报, 1999, 20(6): 549-551.
- [5] 展玉涛, 魏红山, 王志荣, 等. 大黄素抗肝纤维化作用的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(4): 235-237.
- [6] 徐磊, 蔡永亮, 徐志树, 等. 凯西莱联合青霉胺治疗肝豆状核变性模型鼠的研究[J]. 临床神经病学杂志, 2007, 20(6): 450-452.
- [7] Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update[J]. Nat Clin Pract Neurol, 2006, 2(9): 482-493.
- [8] Nagasaka H, Inoue I, Inui A, et al. Relationship between oxidative stress and antioxidant systems in the liver of patients with Wilson disease: hepatic manifestation in Wilson disease as a consequence of augmented oxidative stress[J]. Pediatr Res, 2006, 60(4): 472-477.
- [9] Nakhjavani M, Esteghamati A, Nowroozi S, et al. Type 2 diabetes mellitus duration: an independent predictor of serum malondialdehyde levels [J]. Singapore Med J, 2010, 51(7): 582-585.
- [10] Montazerifar F, Hashemi M, Karajibani M, et al. Evaluation of lipid peroxidation and erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase in hemodialysis patients[J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2012, 23(2): 274-279.
- [11] Lee BH, Huang YY, Duh PD, et al. Hepatoprotection of emodin and Polygonum multiflorum against CCl₄-induced liver injury[J]. Pharm Biol, 2012, 50(3): 351-359.
- [12] Dang SS, Zhang X, Jia XL, et al. Protective effects of emodin and astragalus polysaccharides on chronic hepatic injury in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(11): 1010-1014.
- [13] Liu LN, Mei QB, Liu L, et al. Protective effects of Rheum tanguticum polysaccharide against hydrogen peroxide-induced intestinal epithelial cell injury[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(10): 1503-1507.

(收稿日期: 2012-06-21; 修回日期: 2012-12-16)

[编辑: 洪 涛]