

丹酚酸 A 抗四氯化碳中毒致大鼠肝损伤和肝纤维化的作用

胡义扬¹, 刘平, 刘成, 徐列明, 刘成海 (上海中医药大学肝病研究所, 上海 200032, 中国)

朱大元, 黄梅芬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

R595-106

R575-205

Actions of salvianolic acid A on CCl₄-poisoned liver injury and fibrosis in rats

HU Yi-Yang¹, LIU Ping, LIU Cheng, XU Lie-Ming, LIU Cheng-Hai (Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ZHU Da-Yuan, HUANG Mei-Fen

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China)

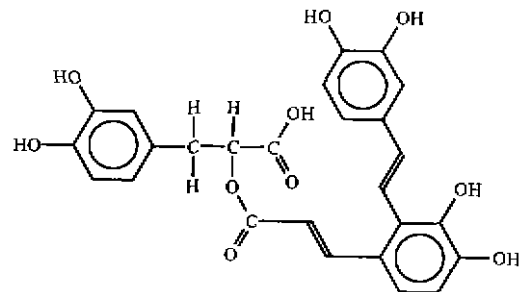
KEY WORDS salvianolic acid A; carbon tetrachloride poisoning; liver; collagen; *Salvia miltiorrhiza*; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase; serum albumin; liver cirrhosis; malondialdehyde

AIM: To study the actions of salvianolic acid A (SA-A) on liver injury and liver fibrosis. **METHODS:** The liver fibrotic rat was made by ip injection of CCl₄. The model rats were divided into 3 groups treated with SA-A, colchicine (Col), and *Salvia miltiorrhiza* Bunge (SMB), respectively. Six wk later the rat liver pathology was examined, type I and III collagen in the liver were examined by immunohistochemical method. Also hydroxyproline (Hyd) and malondialdehyde (MDA) in the liver, alanine aminotransferase (AlaAT), aspartate aminotransferase (AspAT), and albumin (Alb) levels in the serum were measured. **RESULTS:** SA-A inhibited serum AlaAT and AspAT activities, decreased MDA and Hyd contents, alleviated liver fibrogenesis, protected deposition of type I and III collagen in liver matrix. The actions of SA-A on liver fibrosis were similar to those of Col and SMB, action of SA-A decreasing MDA was better than that of Col. **CONCLUSION:** SA-A has marked effects against liver injury and fibrosis, associated with its anti-lipid peroxidation actions.

关键词 丹酚酸 A; 四氯化碳中毒; 肝; 胶原; 丹参; 丙氨酸氨基转移酶; 门冬氨酸氨基转移酶; 血清白蛋白; 肝硬化; 丙二醛 肝纤维化 肝损伤

目的: 研究丹酚酸 A (SA-A) 抗肝损伤、肝纤维化作用。 **方法:** 采用 CCl₄ 诱导大鼠肝损伤及肝纤维化, 期间予 SA-A 灌胃治疗, 另设秋水仙碱 (Col) 组、丹参组作对照, 6 周后进行肝组织病理学和 I、III 型胶原免疫组化观察, 肝组织羟脯氨酸 (Hyd)、丙二醛 (MDA) 含量及血清 AlaAT、AspAT 和白蛋白含量测定。 **结果:** SA-A 降低血清 AlaAT、AspAT 水平及肝组织 MDA、Hyd 含量, 减轻肝纤维化程度, 抑制 I、III 型胶原在基质中沉积。其抗肝纤维化强度与 Col、丹参一致, 对 MDA 作用优于 Col。 **结论:** SA-A 有显著的抗肝损伤、肝纤维化作用, 与抗脂质过氧化有关。

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge, SMB) 有显著的抗肝损伤、抗肝纤维化效果^[1-3]。丹酚酸 A (salvianolic acid A, SA-A) 是从 SMB 中提取的一种水溶性成分。有研究表明, SA-A 有很强的抗氧化活性, 体外可抑制铁-半胱氨酸引起的线粒体脂质过氧化和 ATP 酶活性的丧失, 抑制脂质过氧化引起的心脏和肝脏线粒体肿胀以及肝脏线粒体膜流动性下降, 同时对超氧阴离子和羟自由基具有



Salvianolic acid A

C₂₆H₂₂O₁₀

M_r 494

¹ Phn: 86-21-6403-6889. Fax: 86-21-6403-6889.

Received 1996-10-28

Accepted 1997-05-10

清除作用^[4]。本实验用 CCl₄ 诱发的大鼠肝损伤、肝纤维化整体动物模型, 观察 SA-A 的疗效。

MATERIALS AND METHODS

药物 SA-A: 由中国科学院上海药物研究所从上海崇明人工栽培 SMB 中分离提取、鉴定。SMB: 产于上海崇明, 为人工栽培, 由中国科学院上海药物研究所鉴定, 水煎为含 SMB 50 g·L⁻¹ 的灌胃液。秋水仙碱 (colchicine, Col), Serva 公司产品。

试剂 CCl₄ 分析纯, 宜兴化学试剂三厂产品; 羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyd) 标准品, 日本ナカライテス株式会社产品; 兔抗牛 I 型胶原多克隆抗体, 抗体效价 1:80, 兔抗人 III 型胶原多克隆抗体, 抗体效价 1:80, 羊抗兔 IgG 及兔 PAP, 抗体效价 1:200, 均由上海医科大学病理学教研室研制提供。

大鼠模型 Wistar 大鼠, SPF 级, ♂, 大鼠体重 181 g ± s 18 g, 由中国科学院上海实验动物中心繁殖 (证书号 0001750)。首次于 sc CCl₄ 5 mL·kg⁻¹, 以后每周 2 次 sc 40 % CCl₄-橄榄油 3 mL·kg⁻¹, 共 6 wk。在第 1-2 wk 予 20 % 猪油加 0.5 % 胆固醇的玉米粉饲料, 第 3-6 wk 予单纯玉米粉。

分组与治疗 随机分正常组 (normal)、模型组 (control)、Col 组、SMB 组、SA-A 组。SA-A 剂量为 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, Col 为 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹, SMB 水煎剂 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹。在造模开始 d 1 即 ig 给药, 模型组灌等量蒸馏水, 共 6 wk。

观测项目 用药周期完成后, 乙醚麻醉下开腹, 经下腔静脉采血, 从肝左叶切取 0.3 mm × 0.5 mm × 0.5 mm 大小肝组织置 10 % 甲醛固定液, 其余肝组织标本 -70 °C 保存。

生化检测 血清 AlaAT、AspAT 活性, 赖氏法; 血清

白蛋白 (albumin, Alb) 含量, 双缩脲法; 肝组织丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, 采用南京建成生物工程研究所试剂盒; 肝组织羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyd) 含量, 按文献^[5]方法测定。

病理学观察 肝组织切片分别进行 HE 染色、胶原纤维染色 (武兆发改良的 Mallory 氏法) 及肝组织 I、III 型胶原免疫组化 (PAP 法显色)。光镜下观察肝脏脂肪变性程度、纤维化程度及 I、III 型胶原显色程度, 以 0-4 级积分标准^[6,7]进行统计。

RESULTS

血清 AlaAT、AspAT 活性及 Alb 含量 较之正常组, 模型组 AlaAT 及 AspAT 活性显著升高, 其中 AlaAT 活性上升近 3.5 倍, 而 Alb 含量显著下降。各药物组 Alb 含量略高于模型组。在酶活性方面, Col 显示有一定的降酶作用, 但不及 SMB 及 SA-A, 其中 SMB 在该实验中降酶作用非常显著 (Tab 1)。

肝组织 MDA 和 Hyd 含量 经 6 wk 病理刺激后, 模型组 Hyd 和 MDA 含量均显著上升, 分别为正常组的 2-3 倍。3 个药物组的 Hyd 含量几乎在同一水平, 均显著低于模型组。而在 MDA 方面, SA-A 及 SMB 组显著低于模型组, 其中以 SA-A 为优, 而 Col 组则与模型组同一水平 (Tab 1)。

未经药物治疗的两组大鼠 (正常组及模型组共 20 只), 其肝组织 MDA 含量与 Hyd 含量变化呈正相关 ($r=0.779, P<0.01$)。

肝组织病理变化

HE 染色 模型组大鼠正常肝小叶结构破坏,

Tab 1. Effect of salvianolic acid A on serum AlaAT, AspAT activity, serum Alb contents, liver Hyd, MDA contents, and liver histological findings in CCl₄-induced fibrotic rats. Histological findings graded on scale 0-4, with normal being 0. $\bar{x} \pm s$. ^a $P<0.05$, ^c $P<0.01$ vs control.

	Normal (n=8)	Control (n=12)	Col (n=11)	SMB (n=10)	SA-A (n=11)
AlaAT (U·L ⁻¹)	38 ± 4 ^a	125 ± 60	89 ± 59	21 ± 7 ^c	70 ± 54 ^b
AspAT (U·L ⁻¹)	79 ± 9 ^a	134 ± 37	100 ± 25 ^b	75 ± 14 ^c	96 ± 17 ^b
Alb (g·L ⁻¹)	30.3 ± 0.6 ^c	26.8 ± 2.2	28.9 ± 1.9 ^b	28.0 ± 1.2	28.4 ± 1.8
MDA (nmol·L ⁻¹ /g liver)	118 ± 36 ^c	329 ± 68	313 ± 110	273 ± 47 ^b	224 ± 92 ^c
Hyd (μg/g liver)	115 ± 26 ^c	241 ± 48	190 ± 31 ^c	193 ± 27 ^c	194 ± 43 ^b
Adiposis		2.6 ± 0.8	1.6 ± 0.7 ^c	1.6 ± 0.7 ^c	1.7 ± 0.6 ^b
Fibrosis		2.4 ± 0.9	1.6 ± 0.9 ^b	1.4 ± 0.7 ^c	1.6 ± 0.7 ^b
Collagen Type I		2.1 ± 1.0	1.4 ± 0.8	1.4 ± 0.4	1.3 ± 0.5
Collagen Type III		1.9 ± 1.0	1.4 ± 0.8	1.2 ± 0.4	1.3 ± 0.5

肝索排列紊乱,肝细胞水肿明显,脂肪变性广泛,汇管区结缔组织有不同程度的增生,肝组织中有少量炎细胞浸润。SA-A组与两药物对照组相似,在肝组织中仍可见到少量炎细胞浸润,但肝小叶结构破坏明显减轻,肝细胞水肿、脂肪变性程度显著轻于模型组,汇管区结缔组织增生不明显。

胶原纤维染色 模型组肝脏内主要由胶原纤维构成的纤维间隔正在形成或已经形成,其破坏界板,分割、包绕肝小叶,其中一鼠已有较多完整的假小叶。SA-A组和SMB组、Col组的肝内胶原纤维增生均减轻(Tab 1)。

肝组织 I、III型胶原免疫组织化学 模型组肝组织 I型胶原主要分布于因纤维组织增生而增宽的汇管区及形成的纤维间隔中,形成纤维索,重者分隔包绕肝小叶。SA-A组与SMB组及Col组一致,其阳性着色较模型组少而浅,大部分仅见中央静脉周围及汇管区着色,各组 III型胶原分布及着色程度与 I型胶原基本一致(Tab 1)。

DISCUSSION

SA-A是丹参中的一种水溶性成分。研究结果显示SA-A可显著降低CCl₄慢性中毒大鼠血清AlaAT、AspAT活性和肝组织MDA含量,从整体实验上证实SA-A有显著的抗脂质过氧化、抗肝损伤的作用;另一方面,SA-A可显著降低作为胶原蛋白独特氨基酸成分的肝脏Hyd含量,减轻肝组织纤维化程度,抑制I、III型胶原在基质中的沉积,表明有显著的抗肝纤维化作用。

在四氯化碳、酒精引起的肝纤维化中,脂质过氧化是其主要的肝损伤形成机制^[8]。现认为,除乙醛、纤维发生因子、转化生长因子等外,脂质过氧化产物是直接刺激胶原基因转录的重要因素^[8,9]。本实验结果所见,肝组织Hyd含量与MDA含量呈显著的正相关,再次证实了这一点,同时可能揭示SA-A抗脂质过氧化作用是其抗肝纤维化作用的主要机制之一。

本实验SA-A的上述药理作用与抗肝纤维化阳性药物Col比较,其作用强度基本一致,但后者

无显著的抗脂质过氧化作用。SA-A与丹参比较,虽未求其最佳药物浓度,实验显示两者间作用程度未见显著差异,提示SA-A为丹参抗肝纤维化作用的主要有效成分之一,极有进一步深入研究的价值。至于本实验所见丹参降低血清AlaAT、AspAT活性的作用异常显著,尚未见类似报道,除可能与丹参产地不同而成分有别外,还可能与剂量不同等因素有关,有待进一步探讨。

REFERENCES

- 1 Ma XH, Zhao YC, Yin L, Han DW, Sun SQ. Studies on collagen fibers of liver reabsorptive action of *Salvia miltiorrhiza* on experimental cirrhosis. *Chin J Integ Trad West Med* 1988; 8: 161-3.
- 2 Ye HJ, Song WH, Chen ZC, Dong L, Song YF. Study on prevention and treatment with *Salvia miltiorrhiza* Bunge and IL-2 in immune fibrosis of rats. *Chin J Digestion* 1994; 14: 266-9.
- 3 Deng HJ, Ma XH, Xu RL, Chen XM, Zhao YC, Yin L, et al. Studies on mechanisms of protective action of *Radix Salvia miltiorrhiza* (RSM) against experimental hepatic injury in rats. *China J Chin Mat Med* 1992; 17: 233-6.
- 4 Lin TJ, Liu GT. Protective effect of salvianolic acid A on heart and liver mitochondria injury induced by oxygen radicals in rats. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1991; 5: 276-81.
- 5 Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem* 1981; 112: 70-5.
- 6 Ruwart MJ, Rush BD, Snyder KF, Peters KM, Appelman HD, Henley KS. 16, 16-Dimethyl prostaglandin E₂ delays collagen formation in nutritional injury in rat liver. *Hepatology* 1988; 8: 61-4.
- 7 Ala-Kokko L, Günzler V, Hoek JB, Rubin E, Prockop DJ. Hepatic fibrosis in rats produced by carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine; observations suggesting immunoassays of serum for the 7S fragment of type IV collagen are a more sensitive index of liver damage than immunoassays for the NH₂-terminal propeptide of type III procollagen. *Hepatology* 1992; 16: 167-72.
- 8 Bedossa P, Houghum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen α₁(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology* 1994; 19: 1262-71.
- 9 Niemelä O, Parkkila S, Ylä-Herttuala S, Villanueva J, Ruebner B, Halsted CH. Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 1995; 22: 1208-14.