

猪苓多糖对中毒性肝炎小鼠肝脏的保护作用¹

林云富²、关国利 (北京师范大学生物系生物化学教研室, 北京 100088)

提要 给小鼠 ip CCl₄ 后和 ip D-半乳糖胺前或后, ip 猪苓多糖提取液, 均可明显阻止肝病发生。SGPT 活力下降, 肝 5'-核苷酸酶、酸性磷酸酶 6-磷酸葡萄糖磷酸酶活力回升。体外, 猪苓多糖具有类似体内的作用。我们认为, 猪苓多糖对小鼠肝脏有明显的保护作用。

关键词 中毒性肝炎; 四氯化碳中毒; 半乳糖胺; 多糖; 肝功能试验; 猪苓

猪苓系真菌纲担子菌亚纲多孔菌科植物 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 的菌核。其提取物猪苓多糖(PSP)对动物移植性肿瘤具有显著的抗肿瘤作用⁽¹⁾, 对荷肝癌小鼠的肝脏有保护作用^(2,3)。后来, 临床上用 PSP 治疗肝炎获得初步结果。本工作以 CCl₄ 和 D-半乳糖胺(D-Gal-N)诱发小鼠肝病变为动物模型, 研究 PSP 的保肝作用及其机理, 为治疗肝炎提供理论依据。

材 料 和 方 法

昆明种杂交♂性小鼠 607 只, 由军事医学科学院动物房提供, 体重 20.0±SD 0.5 g, 随机分组, 自由饮食。

将 CCl₄ 配成 0.2% 花生油溶液, ip 0.02-0.3 ml/kg, 对照组 ip 等容量花生油。

D-Gal-N 配成生理盐水溶液, 加 NaOH 调至中性, ip 1 g/kg, 对照组 ip 等容量生理盐水。

PSP 制剂由中医研究院中药研究所提供, ip 100-200 mg/kg, 对照组 ip 等容量生理盐水。

对硝基苯磷酸酯(PNPP)系 Sigma 公司产品; 5'-腺苷酸(5'-AMP)系 Koch-Light Lab 产品; CCl₄ 系北京化工厂产品, AR; D-Gal-N 由重庆医学院化学教研室提供; 6-磷酸葡萄糖单钠盐系上海生化所东风试剂厂产品。

采用眶后静脉取血, 获得血清后立即用 2,4-二硝基苯肼显色反应⁽⁴⁾测定血清谷丙转氨酶(SGPT)活力。

小鼠颈椎脱臼处死, 取肝, 按每克肝加 25 ml 蔗糖溶液(0.25 mol/L)制成匀浆, 立即测酶活力。6-磷酸葡萄糖磷酸酶(G-6-Pase)用磷钼蓝显色法⁽⁵⁾测定无机磷(P_i)生成量来表示其活力; 5'-核苷酸酶(5'-NT)活力用 5'-AMP 分解量来表示⁽⁶⁾; 酸性磷酸酶(AcP)活力用对硝基酚的生成量来表示⁽⁷⁾, 匀浆酶活力表示游离酸性磷酸酶(AcP_f)活力, 测酸性磷酸酶总酶活力(AcP_t)时加 0.1% Triton X-100, 结合酸性磷酸酶(AcP_b)活力以 AcP_f 和 AcP_t 活力之差表示。蛋白质含量测定用比色法⁽⁸⁾。

CCl₄ 剂量及病变时间的选择 取小鼠 210 只, 分成 7 组, 分别 ip CCl₄ 0, 0.01, 0.02, 0.025, 0.05, 0.1, 0.3 ml/kg, 于 12, 24, 36, 48, 72 h 后分别取 5 只测定 SGPT, G-6-Pase, AcP, 5'-NT 活力。根据结果确定: 病变时间均为 24 h, 最适剂量分别为 SGPT 0.02 ml/kg, G-6-Pase 0.025 ml/kg, AcP 0.05 ml/kg; 5'-NT 活力及肝脏蛋白质含量在全部 CCl₄ 实验剂量范围(0.01-0.3 ml/kg)及病变时间(12-72 h)内, 均无显著变化(p>0.05)。

D-Gal-N 诱发肝病变时各酶活力的变化 取小鼠 50 只, ip D-Gal-N 1 g/kg, 于 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 36, 48, 72 h 后测定各酶活力及肝蛋白质含量, 确定各指标的最佳变化时间分别为 5'-NT 20 h(p<0.05), G-6-Pase 30 h(p<0.01), SGPT 36 h(p<0.01), AcP_f 24

1687 年 1 月 3 日收稿 1988 年 1 月 15 日接受

¹ 本文曾在 1985 年 11 月北京中国中西医结合研究会第二届会员代表暨学术讨论会上宣读。

² 现在: 浙江医科大学生物化学教研室, 杭州 310006。

h(p<0.01)。

PSP对CCl₄和D-Gal-N诱发肝病变的抑制作用 取小鼠112只,分成3组,观察PSP对CCl₄诱发肝病变的抑制作用。甲组49只,ip CCl₄ 25 μl/kg,观察G-6-Pase;乙组32只,ip CCl₄ 20 μl/kg,观察SGPT;丙组31只,ip CCl₄ 50 μl/kg,观察AcP_b。各组又分成几小组,其中NC为正常对照组,(ip花生油+生理盐水);TC为病变对照(ip CCl₄+生理盐水);PR₁,PR₂为预防组(ip PSP+CCl₄),即在ip CCl₄前8,4h分别ip PSP 100和200 mg/kg;TH₁,TH₂为治疗组(ip CCl₄+PSP),即在ip CCl₄后4,8,12h ip PSP 100和200 mg/kg。

取小鼠205只,分成4大组,分别观察PSP在防治D-Gal-N诱发肝病变时5'-NT,G-6-Pase,SGPT,AcP_b活力的变化。各大组又分成几小组,NC ip生理盐水;TC ip D-Gal-N 1g/kg+生理盐水;PR₁,PR₂在ip D-Gal-N前8,4h ip PSP 100和200 mg/kg;TH₁,TH₂在ip D-Gal-N后4,8,12h ip PSP 100和200 mg/kg。

体外实验方法 小鼠10只,取肝制成匀浆。一组加入CCl₄至50%饱和度(25℃,25 mmol/L的蔗糖溶液中);另一组加CCl₄的同时加一定量的PSP(0.01和0.2 mg/ml);然后37℃保温15 min,测定各酶活力。

Tab 1. Prophylactic and therapeutic effects of *Polyporus umbellatus* polysaccharides (PSP) on CCl₄-induced toxicity to liver of mice. Mice were killed at 24 h after ip CCl₄. PR₁, PR₂: ip PSP 100 and 200 mg/kg at 4, 8 h before ip CCl₄; TH₁, TH₂: ip PSP 100 and 200 mg/kg at 4, 8, 12 h after ip CCl₄. Number of mice in the parentheses. $\bar{x} \pm SD$, *p>0.05, **p<0.05, ***p<0.01 vs toxic control.

CCl ₄ (mg/kg)	0.025	0.02	0.05	0.05
	G-6-Pase (IU/g liver)	SGPT (King's U/100 ml serum)	Bound AcP (IU/g liver)	Free AcP Bound AcP
Control	4.75±0.15*** (15)	188±9*** (11)	301±13*** (7)	1.25
Toxic control	2.96±0.10 (9)	3860±180 (6)	118±5 (8)	3.74
PR ₁	2.92±0.26* (5)			
PR ₂	3.14±0.09* (5)	3540±300* (6)	155±8* (8)	2.53**
TH ₁	3.45±0.15** (8)			
TH ₂	3.91±0.15*** (7)	2390±120*** (8)	246±25** (8)	1.67***

取小鼠10只,取肝制成匀浆。一组分别加D-Gal-N至浓度为25和50 μg/ml,37℃保温1h后,分别测定G-6-Pase和5'-NT活力;另一组在保温同时,加0.2和1.0 mg/ml PSP,观察PSP的作用。

PSP对肝功能酶活力的影响 整体实验:取小鼠10只,5只ip PSP200 mg/kg两次,相隔4h,对照组ip等容量生理盐水。于第1次注射后24h处死,取肝测各酶活力。体外实验:取小鼠10只,取肝制成匀浆,5只加PSP 0.2 mg/ml,5只加等容量生理盐水,37℃保温1h后,测各酶活力。

结 果

PSP对CCl₄诱发肝病变的防治作用 PSP治疗CCl₄诱发的肝病变时,肝G-6-Pase和AcP_b活力显著恢复(p<0.01),接近正常对照组水平;SGPT活力亦明显下降(p<0.01),但仍与正常对照组有很大差异(表1)。用PSP预防时,效果没有治疗那么明显。

PSP对D-Gal-N诱发肝病变的防治作用 与上段相比,PSP对D-Gal-N诱发的肝病变兼有显著的预防和治疗作用,这从几个酶活力的变化中可以看出(表2)。

但总的来说,PSP的治疗效果比预防效果更显著一些。治疗时,TH₁组5'-NT和G-6-Pase活力分别恢复到NC组的90和70%,

Tab 2. Prophylactic and therapeutic effects of PSP on D-galactosamine-induced toxicity to liver of mice. PR₁, PR₂, TH₁ and TH₂ were the same as Tab 1, but ip D-galactosamine 1 g/kg. Number of mice in the parentheses. $\bar{x} \pm SD$, * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs toxic control.

	5'-Nucleotidase (IU/g liver)	G-6-Pase (IU/g liver)	SGPT (King's U/ 100 ml serum)	Bound AcP (IU/g liver)	Free AcP Bound AcP
Control	1.18 ± 0.08*** (11)	4.99 ± 0.13*** (15)	138 ± 8*** (8)	294 ± 5*** (12)	1.23
Toxic control	0.86 ± 0.04 (12)	2.44 ± 0.14 (14)	257 ± 16 (14)	164 ± 13 (6)	1.98
PR ₁	0.99 ± 0.05* (7)	2.74 ± 0.21* (7)	193 ± 13* (10)		
PR ₂	1.06 ± 0.08** (8)	3.85 ± 0.22*** (8)	165 ± 6*** (8)	259 ± 25*** (7)	1.69*
TH ₁	1.05 ± 0.07*** (8)	3.52 ± 0.28*** (8)	155 ± 11*** (11)		
TH ₂	1.07 ± 0.06*** (7)	3.64 ± 0.12*** (8)	156 ± 7*** (8)	221 ± 17*** (7)	1.92

而 PR₁ 组 5'-NT 和 G-6-Pase 活力无明显恢复 ($p > 0.05$)。从 SGPT 活力的变化也可看出这一趋势。

CCl₄ 和 D-Gal-N 对肝匀浆酶活力的影响及 PSP 的抑制作用 在肝匀浆中加入 CCl₄, G-6-Pase 活力从对照组的 4.8 ± 0.4 降至 3.17 ± 0.12。加 CCl₄ 的同时分别按终浓度 0.01 和 0.2 mg/ml 加 PSP, G-6-Pase 活力分别为 3.70 ± 0.12 ($p > 0.05$) 和 4.7 ± 0.3 ($p < 0.01$)。同样条件下, AcP_f 和 5'-NT 活力不变, AcP_b 和 AcP_i 活力虽然下降, 但均不显著 ($p > 0.05$)。

D-Gal-N 可引起肝匀浆 G-6-Pase, 5'-NT 活力显著下降。D-Gal-N 0.05 mg/ml 使 G-6-Pase 活力从对照组的 4.88 ± 0.24 降至 0.83 ± 0.18 ($p < 0.01$)。按 PSP 0.2 和 1.0 mg/ml 与 D-Gal-N 一起加入, G-6-Pase 活力分别为 2.02 ± 0.13 ($p < 0.05$) 和 4.15 ± 0.16 ($p < 0.01$)。对 5'-NT 活力的作用情况与此相似, D-Gal-N 0.25 mg/ml 使 5'-NT 活力对照组的 1.25 ± 0.14 降至 0.80 ± 0.04 ($p < 0.01$)。PSP 0.2 mg/ml 不能使 5'-NT 活力恢复, PSP 1.0 mg/ml 使 5'-NT 活力增加至 1.03 ± 0.08 ($p < 0.01$)。AcP 活力没有变化。

以上结果说明, 即使在体外肝匀浆中, PSP 亦有保护肝细胞的功能, 抑制由 CCl₄ 和 D-Gal-N 诱发的肝细胞功能酶活力的下降。(以上 PSP 作用结果所用 p 值, 均与加 CCl₄ 或 D-Gal-N 组比较)。

PSP 对正常小鼠肝脏酶活力的体内及体外影响 无论 ip PSP 200 mg/kg 2-3 次或在肝匀浆中加 PSP 1.0 mg/kg 并 37°C 保温, 小鼠肝 G-6-Pase, 5'-NT, AcP_b 活力均无显著变化。体内, 对照组 G-6-Pase, 5'-NT, AcP_b 活力分别为 5.13 ± 0.21, 1.22 ± 0.08, 381 ± 23, ip PSP 后, 各酶活力分别为 4.8 ± 0.5, 1.30 ± 0.10, 390 ± 30。体外, 对照组 G-6-Pase, 5'-NT 活力分别为 5.1 ± 0.3, 1.31 ± 0.06, 加 PSP 后分别为 4.36 ± 0.20, 1.34 ± 0.05。 p 值均大于 0.05。说明 PSP 对这些酶均无直接的活化作用。

讨 论

CCl₄ 和 D-Gal-N 均可诱发多种实验动物发生肝病变, 并广泛用于保肝药物的筛选及机理研究。

PSP 对 CCl₄ 和 D-Gal-N 诱发的小鼠肝病变均有显著的治疗作用(表 1, 2)。这个结论为临床上用 PSP 治疗肝炎并能取得一定效果提供了一个理论依据。对 D-Gal-N 诱发的肝病变, PSP 还有显著的预防作用。体外, PSP 亦有抑制 CCl₄ 和 D-Gal-N 引起的肝匀浆酶活力下降的作用。而 PSP 对肝细胞酶, 无论体内还是体外均无活化作用。综上所述, 我们认为 PSP 确有保护肝脏的作用。

PSP 如何抑制肝病变的发展呢? 既然 PSP 对 D-Gal-N, CCl₄ 诱发的肝病变都有抑制作

用,那么有可能是PSP阻止了 CCl_4 和D-Gal-N诱发肝病过程中某一相同或相似的步骤。

比较 CCl_4 , D-Gal-N诱发肝病变的机理,有一点值得注意,即 Ca^{2+} 进入肝细胞是一切肝损伤的最后共同途径⁽⁹⁾。造成这种肝细胞内 Ca^{2+} 自稳态破坏的根本原因是质膜糖蛋白及糖脂的合成受到 CCl_4 , D-Gal-N代谢物抑制,质膜结构受到破坏,质膜透性增加,大量 Ca^{2+} 进入肝细胞。我们推测,PSP可能以直接或间接方式保护了肝细胞质膜,阻止 Ca^{2+} 进入肝细胞,从而达到保护肝脏的目的。

参 考 文 献

- 1 中医研究院中药研究所药理室肿瘤组。猪苓提取物治疗肿瘤的实验研究。中华肿瘤杂志 1981; 3: 106
- 2 魏群、吴国利、聂剑初。猪苓多糖对荷肝癌H22小鼠肝脏糖原积累、糖异生和分解酶系的作用。中国药理学报 1983; 4: 141
- 3 魏群、吴国利、聂剑初、宋书元、白玉珍。

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Jul; 9 (4): 345-348

Protective effect of *Polyporus umbellatus* polysaccharides on toxic hepatitis in mice

LIN Yun-Fu¹, WU Guo-Li

(Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100088)

ABSTRACT Carbon tetrachloride (CCl_4) and D-galactosamine (D-Gal-N) caused acute toxicity to liver of mice. After ip *Polyporus umbellatus* polysaccharides (PSP) 100 and 200 mg/kg 3 times at 4, 8, 12 h after ip CCl_4 , the activities of liver glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) and bound acid phosphatase (AcP_b) were significantly recovered ($p < 0.01$, $p < 0.05$, respectively, vs CCl_4 control); the activity of serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT) was sharply decreased ($p < 0.01$). After ip the same doses of PSP twice at 4, 8 h or 3 times at 4, 8, 12 h before or after ip D-Gal-N, respectively, the activities of the marker enzyme were also significantly recovered vs D-Gal-N control. SGPT, G-6-

- 猪苓多糖对荷肝癌H22小鼠肝脏糖代谢和肾上腺皮质功能的作用。同上 1983; 4: 52
- 4 Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957; 28: 56
 - 5 Duve C de, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 1955; 60: 604
 - 6 Michell RH, Hawthorne JN. The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 21: 333
 - 7 Andersch MA, Szczypinski AJ. Use of p-nitrophenylphosphate as the substrate in determination of serum acid phosphatase. *Am J Clin Pathol* 1947; 17: 571
 - 8 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265
 - 9 Schanne FAX, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependency of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 1979; 206: 700

Pase, 5'-nucleotidase (5'-NT), $p < 0.01$; AcP_b , $p < 0.05$. *In vitro*, addition of CCl_4 or D-Gal-N to liver homogenates caused the decrease of 5'-NT and G-6-Pase activities and such changes were significantly inhibited by PSP in combination with CCl_4 or D-Gal-N. From these results, we conclude that PSP has significant protective effects on acute toxicity to the liver of mice induced by CCl_4 and D-Gal-N. The mechanisms of PSP were also discussed.

KEY WORDS toxic hepatitis; carbon tetrachloride poisoning; galactosamine; polysaccharides; liver function tests; *Polyporus umbellatus*

¹Now in: Department of Biochemistry, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006