文章编号:1000-5404(2008)23-2187-04

论著

当归多糖对大鼠肝性脑病的预防作用

卿 轶,董 志 (重庆医科大学药学院药理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 观察当归多糖(*Angelica sinensis* polysaccharides, ASP)对四氯化碳性肝硬化大鼠肝性脑病发生的预防作用,并探讨其机制。**方法** 400 ml/L 四氯化碳皮下注射造模,分别给予蒸馏水(阴性组),乳果糖(50 g∶100 ml,阳性药物组),ASP 10、20、40 g/L 溶液 10 ml·kg^{-1}·d^{-1}灌胃,连续 14 d 后用内毒素(3 mg/kg)诱导大鼠昏迷,观察注射内毒素后 12 h 内各组大鼠昏迷发生时间和数量,测定各组大鼠的血氨、血清谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)浓度,观察脑细胞凋亡情况和星形胶质细胞数量。**结果** 各组大鼠血氨、GPT、GOT 水平,脑细胞凋亡数和昏迷率,阴性组最高;ASP 40 g/L 组的血氨、GOT 水平和昏迷率均低于阳性药物组,ASP 3 个剂量组的脑细胞凋亡数均低于阳性药物组,而星形胶质细胞数阴性组最低,且 ASP 3 个剂量组均高于阳性药物组。**结论** ASP 可保护脑功能,减缓肝性脑病的发生,作用优于阳性药物乳果糖。其机制可能与降低血氨,改善肝功能,保存星形胶质细胞和神经元的活性有关。

关键词: 当归多糖;肝性脑病;凋亡;胶质纤维酸性蛋白
中图法分类号: R285.5; R575.06; R747.9 **文献标识码:** A

Angelica sinensis polysaccharides prevents rat from hepatic encephalopathy

QING Yi, DONG Zhi (Biochemical and Molecular Pharmacology Laboratory, School of pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate to the role of *Angelica sinensis* polysaccharides (ASP) against hepatic encephalopathy and explore the probable mechanism. Methods Sprague-Dawley rats were established into carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver cirrhosis, then treated with distilled water (negative control), lactulose (positive control), ASP solution (10, 20 and 40 g/L respectively, intragastrically at dose of 10 ml·kg^{-1}·d^{-1}) for 14 days. On 15th day, all the survival rats were intraperitoneally injected with endotoxin (3 mg/kg) once, then in the following 12 h, the rats that fall into coma were counted and the time period of coma was recorded. The blood plasma concentrations of ammonia, serum glutamate-pyruvate transaminase (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) were determined. The apoptotic cerebral cells were dyed *in situ* by TUNEL. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes was determined by immunohistochemical method. Then we counted the apoptotic cerebral cells and GFAP positive cells under light microscope. Results The survival rats in distilled water group were highest in the concentrations of ammonia, GPT and GOT, the amount of apoptotic cerebral cells, and coma rate than the rats in other groups. The rats in 40 g/L ASP group had the higher ammonia level, GOT concentration, coma rate than those in lactulose group. The rats in 3 ASP groups all had less apoptotic cerebral cells than those in lactulose group. As to GFAP, distilled water group had the lowest immunological activity, and the GFAP immunological positive cells of 3 ASP groups were all more than those in lactulose group. Conclusion ASP, even more effective than lactulose, can protect rat brain function and delay the occurrence of hepatic encephalopathy, whose effects may be related to the decrease of blood ammonia, the amelioration of liver function as well as the protection of astrocyte function and neuronic activity.

Key words: *Angelica sinensis* polysaccharides; hepatic encephalopathy; apoptosis; glial fibrillary acidic protein

作者简介: 卿 轶,女,四川省宜宾市人,硕士,医师,主要从事神经精神药理和新药开发方面的研究。电话:(023)89014353,E-mail:qingyi@hotmail.com
通信作者: 董 志,E-mail:zhidong073@hotmail.com
收稿日期: 2007-10-10;**修回日期:** 2008-04-03

传统中药当归是伞形科植物当归(*Angelica sinensis*)的干燥根,当归多糖(*Angelica sinensis* polysaccharides, ASP)是当归根中主要的水溶性成分。当归多糖对人体作用广泛,具有调节免疫,影响造血系统,抗病毒,抗肿瘤,抗氧化等多种功能。研究表明,当归多糖可对抗四氯化碳引起的肝损害,降低 GOT 等转氨酶的血清水平[1]。ASP 可使铅染小鼠脑细胞凋亡调控相关的 Bcl-2 基因表达减少,改善其学习记忆能力[2]。肝性脑病是肝功能衰竭时脑功能紊乱的表现,当归多糖对肝脑功能都有一定的保护作用。本研究探讨 ASP 在四氯化碳致肝硬化大鼠肝性脑病发生过程中所起的作用,并观察在此过程中 ASP 对脑细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 当归多糖的提取

取甘肃岷县当归干燥根(购自重庆桐君阁医药股份有限公司),粉碎为细颗粒状,微波辅助水提醇沉法[3]提取 ASP。用葡萄糖做标准品,苯酚-硫酸法[4]测得 ASP 的糖含量为 68%。在实验前用双蒸水配成 ASP 浓度分别为 10、20、40 g/L 的溶液(按粗提品量)。

1.2 试剂

内毒素为大肠杆菌脂多糖(LPS,Sigma),GPT 和 GOT 试剂盒为南京建成生物工程研究所产品,TUNEL 细胞凋亡试剂盒为南京凯基生物发展有限公司产品,GFAP 免疫组化一抗、二抗试剂盒均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。其余为市售分析纯。

1.3 动物模型

清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 100 只[重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(渝)20020001],雌雄各半,按李夏青等[5]的方法用四氯化碳皮下注射造模,饲以高脂饲料(含 10% 猪油),4% 乙醇溶液。造模第 63 天,大鼠进入肝硬化中晚期。

1.4 分组给药

肝硬化大鼠按完全随机法分为阴性组,阳性药物组,ASP 10、20、40 g/L 5 组($n=16$),分别给予蒸馏水,乳果糖(50 g:100 ml),ASP 10、20、40 g/L 溶液 10 ml·kg^{-1}·d^{-1}灌胃。全部大鼠以常规鼠料喂养,纯水为饮料。连续灌胃 14 d 后,所有大鼠一次性腹腔注射内毒素 3 mg/kg 以诱导昏迷,观察 12 h 后处死,并取肝右叶和全脑做石蜡切片,以备后续检测。

1.5 检测项目

1.5.1 昏迷诱导情况 注射内毒素后从行动力、翻正反射、角膜反射、疼痛刺激等方面观察记录大鼠发生昏迷的情况,凡发生嗜睡、神经反射减弱或消失均判为发生肝昏迷,观察 12 h 并记录昏迷大鼠数和从注射内毒素到发生昏迷的时间。

1.5.2 血氨 处死前用一次性无菌注射器心脏穿刺采血,取 1 ml 于无氨肝素管中,用酚-次氯酸盐法检测。

1.5.3 血谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT) 心脏取血 4 ml,不抗凝,室温静置 4 h 候离心取血清,按 GPT 和 GOT 检测试剂盒(赖氏法)所述方法操作。

1.5.4 脑细胞凋亡计数 按 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒所述方法操作,100 倍光镜下,选取细胞较密集的 5 个视野计数凋亡细胞个数,取平均值为观察结果。

1.5.5 胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)免疫组化染色 用 GFAP 标记星形胶质细胞,按试剂盒说明进行操作。200 倍光镜下,选取细胞较密集的 5 个视野计数阳性细胞个数,取平均值为观察结果。

1.6 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SAS 8.01 统计软件,各组间均数比较用 SNK-q 检验,昏迷发生率用生存分析 Log-Rank 检验进行比较。

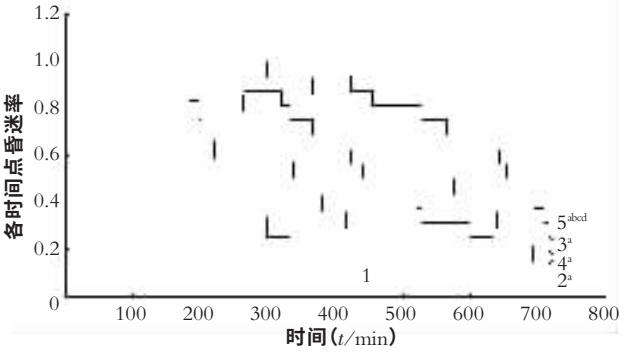
2 结果

2.1 造模情况

造模期间,有 12 只大鼠死亡。造模第 63 天,尚存活大鼠 88 只。选出 8 只大鼠处死,解剖发现肝脏表面成粗颗粒状,石蜡切片 HE 染色见肝结构紊乱,有假小叶形成,均发生了肝硬化,证明造模成功。

2.2 昏迷诱导情况

分组给药期间,各组大鼠分别有 4、2、0、2、0 只死亡,至诱导昏迷前,阴性组、阳性药物组、ASP 10 g/L 组、ASP 20 g/L 组、ASP 40 g/L 组各剩余 12、14、16、14、16 只大鼠。注射内毒素后 145 min 阴性组大鼠开始发生嗜睡,角膜反射和疼痛刺激反射减弱。观察 12 h,根据统计结果绘制曲线如图 1,Log-Rank 检验阴性组与其余 4 个组,ASP 40 g/L 组与阳性药物组、ASP 10 g/L 组、ASP 20 g/L 组比较有显著差异($P<0.01$),而阳性药物组与 ASP 10 g/L 组、ASP 20 g/L 组两两之间均无显著差异($P>0.05$)。



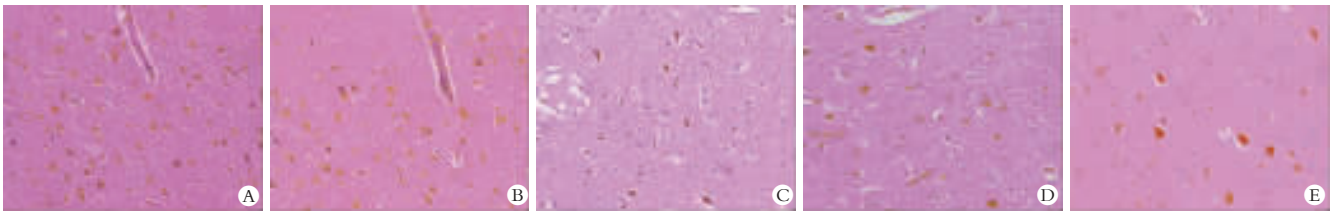
1: 阴性组; 2: 阳性药物组; 3: ASP 10 g/L 组; 4: ASP 20 g/L 组; 5: ASP 40 g/L 组; o 表示删失值

a: $P<0.01$,与阴性组比较;b: $P<0.01$,与阳性药物组比较;c: $P<0.01$,与 ASP 10 g/L 组比较;d: $P<0.01$,与 ASP 20 g/L 组比较

图 1 各组大鼠昏迷时间与昏迷率的比较

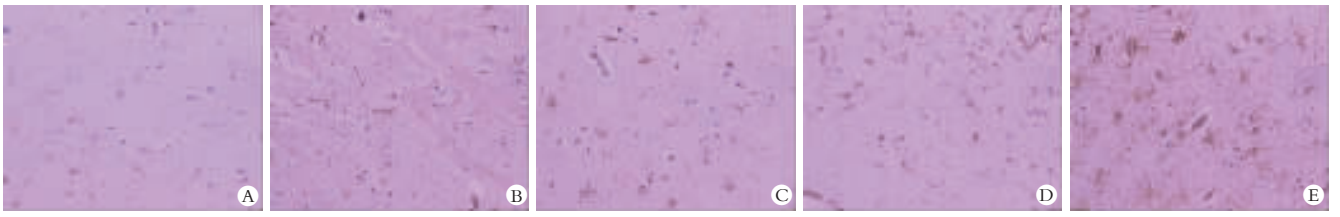
2.3 当归多糖对肝硬化大鼠血氨、血 GPT 和血 GOT 的影响

阴性组血氨值最高,与阳性药物组和 ASP 3 个剂量组都有显著差异;ASP 40 g/L 组血氨最低,和阳性药物组之间也有显著性差异($P<0.05$)。阴性组血清 GPT 水平最高,而阳性药物组与 ASP 3 个剂量组之间都没有显著性差异($P>0.05$)。GOT 水平,阴性组与阳性药物组和 ASP 3 个剂量组都有显著性差异($P<0.05$),ASP 40 g/L 组最低,与阳性药物组比较有显著性差异($P<0.05$)。见表 1。



A：阴性组；B：阳性药物组；C：ASP 10 g/L 组；D：ASP 20 g/L 组；E：ASP 40 g/L 组

图 2　各组脑细胞凋亡情况比较　凋亡细胞染为棕黄色　(TUNEL×200)



A：阴性组；B：阳性药物组；C：ASP 10 g/L 组；D：ASP 20 g/L 组；E：ASP 40 g/L 组

图 3　各组脑组织 GFAP 染色情况比较　(GFAP×200)

表 1　各组大鼠血氨、血 GPT、血 GOT 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血氨(μmol/L)	GPT(U/L)	GOT(U/L)
阴性组	12	231.00±20.61	174.93±58.07	248.07±44.76
阳性药物组	14	175.33±14.97[a]	74.81±31.53[a]	146.56±33.75[a]
ASP 10 g/L 组	16	177.92±25.98[a]	76.94±46.02[a]	140.25±23.92[a]
ASP 20 g/L 组	14	172.67±51.40[a]	76.11±33.57[a]	152.75±44.63[a]
ASP 40 g/L 组	16	111.71±26.70[abcd]	64.57±27.20[a]	112.95±21.63[abd]

a：$P<0.05$，与阴性组比较；b：$P<0.05$，与阳性药物组比较；c：$P<0.05$，与 ASP 10 g/L 组比较；d：$P<0.05$，与 ASP 20 g/L 组比较

2.4　免疫组化染色情况

脑组织细胞凋亡光镜下所见如图 2，所有处于凋亡过程中的细胞被特异性的染为棕黄色，大部分凋亡细胞有伪足，成不规则星状，内部结构不清；少数细胞则呈圆形，细胞内细胞核碎裂，细胞器排列散乱。ASP 3 个剂量组的脑组织凋亡细胞数明显减少，且 ASP 40 g/L 组细胞体积较小。GFAP 免疫染色阳性者均为星形胶质细胞，阴性组的星形胶质细胞中的 GFAP 染色较浅，伪足较少，ASP 各剂量组的 GFAP 染色则较深，数量也较多(图 3)。细胞凋亡数和星形胶质细胞计数结果见表 2。

表 2　各组大鼠脑细胞凋亡和星形胶质细胞(GFAP 阳性细胞)计数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡细胞数	星形胶质细胞数
阴性组	95.70±1.88	29.03±3.38
阳性药物组	89.75±3.76[a]	32.88±2.26[a]
ASP 10 g/L 组	70.66±2.08[ab]	35.73±1.97[a]
ASP 20 g/L 组	63.88±3.73[abc]	38.45±2.18[ab]
ASP 40 g/L 组	55.98±3.03[abcd]	42.05±2.94[abcd]

a：$P<0.05$，与阴性组比较；b：$P<0.05$，与阳性药物组比较；c：$P<0.05$，与 ASP 10 g/L 组比较；d：$P<0.05$，与 ASP 20 g/L 组比较

3　讨论

肝硬化动物在长期慢性肝病的发展过程中，机体对不良刺激的敏感性增高，注射小剂量内毒素即可引起十分明显的应激反应，可导致包括血氨、各种转氨酶等血生化指标发展 10 倍以上的改变，从而诱发肝性脑病的发生[5]。预实验中，对正常大鼠腹腔注射内毒素，剂量加大到 32 mg/kg 时，才有大鼠出现昏迷继而死亡，到 36 mg/kg 时，半数实验大鼠死亡。而对肝硬化大鼠，剂量在 3 mg/kg 时，半数以上在 12 h 内发生昏迷或死亡，因此本次实验选择 3 mg/kg 作为诱发肝性脑病的内毒素剂量。

肝硬化病情进展过程中，脑内神经元与胶质细胞均受到不良影响，高氨血症是其中一个极大的影响因素。能否降低血氨浓度在临床上是衡量药物疗效和评估患者预后的一个重要指标。在氨的作用下，Na^+-K^+-ATP 酶活性减低，ATP 缺乏，脑内神经元与胶质细胞的能量代谢紊乱，凋亡数量增加；另外氧化应激或者细胞内钙离子的蓄积导致线粒体渗透压改变，星形胶质细胞肿胀，GFAP 免疫活性降低[6-8]。星形胶质细胞是血脑屏障的重要组成部分，通过跨胶质细胞转运体从血中将底物摄取转运到脑内。星形胶质细胞与神经元有直接联系，调节神经递质过程和离子环境并给神经元提供底物。并且在脑内，星形胶质细胞是唯一有谷氨酰胺合成酶的细胞，代表了脑内主要的氨解毒部位。胶质纤维酸性蛋白(GFAP)是一种细胞质内丝蛋白，是星形胶质细胞特有的中间丝成分，起维持星形胶质细胞结构和功能的作用。GFAP 作为星形胶质细胞特异性蛋白，在免疫组化染色中标记星形胶质细胞的位置和数量，本实验中，GFAP 阳性细胞即为星形胶质细胞。保护好星形胶质细胞和神经元的功能，可改善肝硬化时的脑功能，预防肝昏迷和减轻病情。在本实验中，考察了肝硬化时的脑细胞凋亡和 GFAP 免疫

活性,可在光镜下见到大部分凋亡细胞是起支持和营养作用的胶质细胞,有伪足,呈不规则星状,内部结构不清;少数为神经元,呈圆形,细胞内细胞核碎裂,细胞器排列散乱。阴性组的星形胶质细胞中的GFAP染色较浅,伪足较少,ASP各剂量组的GFAP染色则较深,数量也较多。而且ASP各组,尤其是ASP 40 g/L组大鼠的血氨水平较低,细胞凋亡数较少,GFAP阳性细胞数量多,发生肝性脑病昏迷的数量也减少,且发生昏迷的时间延缓,从一定程度上反应了ASP对脑部功能的改善。

ASP能改善肝功能,降低血GPT、GOT含量[1,9]。本实验中,对各组大鼠在经过不同处理后的昏迷诱导情况做了分析,乳果糖和ASP均使大鼠的血氨、GPT、GOT明显降低,显然都可以改善肝功能,预防昏迷,并且高剂量的ASP药物浓度可以取得比乳果糖更好地降低血氨和血清GOT的作用效果。综上所述,ASP对肝硬化肝昏迷有一定的预防作用,对脑功能有保护作用,这个作用与降低血氨和血清GOT改善肝功能及保存脑细胞的功能活性有关。ASP是含多种糖组分的水溶性药物,可能不仅在肠道局部可以影响氨的产生和吸收,还能进入血循环,通过血脑屏障,直接对脑细胞发挥作用,但其具体分子机制尚待研究。

参考文献:

[1] 操 刚, 赵 骥, 陈红光, 等. 当归多糖对小鼠实验性肝损伤的影响[J]. 咸宁学院学报: 医学版, 2004, 18(5): 332-334.

[2] 区炳雄, 林 海. 当归多糖对染铅小鼠学习记忆及海马区bcl-2基因表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(7): 901-902.

[3] 龚盛昭, 杨卓如, 曾海宇. 微波辅助法萃取当归多糖的条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(7): 125-128.

[4] 杨兴斌, 梅其炳, 周四元, 等. 当归多糖质控中糖含量测定方法的建立与评价[J]. 中国新医药, 2003, 2(8): 3-5.

[5] 李夏青, 韩德五, 许瑞龄, 等. 内毒素诱发肝硬化大鼠发生肝性脑病的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(2): 151-153.

[6] Norenberg M D, Jayakumar A R, Rama-Rao K V, *et al*. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling[J]. Metab Brain Dis, 2007, 22(3-4): 219-234.

[7] 晏雪生, 彭亚琴, 陈军梅, 等. 乳黄片对A型肝性脑病大鼠大脑皮层星形胶质细胞GFAP表达的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2007, 17(4): 223-224, 233.

[8] Suarez I, Bodega G, Rubio M, *et al*. Down-regulation of astroglial proteins in the rat cerebellum after portacaval anastomosis[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2005, 31(2): 163-169.

[9] 柳 茜, 肖 俊. 当归多糖预防急性四氯化碳性肝损伤及其作用机制[J]. 中国医学研究与临床, 2006: 4(3): 5-6, 4.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)23-2190-01

米非司酮治疗产后断续出血的临床疗效

叶珊丰 (浙江省上虞市人民医院妇产科,浙江 上虞 312300)

产后及中期引产后1个月以上仍有不规则阴道出血是临床上比较棘手的问题,许多患者使用大量及长期的抗生素止血药物仍不见疗效[1],B超又未发现明显的残留,不具备清宫或再次清宫术的指征。而长期的不规则阴道出血可以引起盆腔感染,宫腔黏连,继发不孕等症。我院2007年1月至2008年1月对106例上述患者采用口服米非司酮与新生化汤加氨甲苯酸片进行对比治疗,现总结如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2007年1月至2008年1月在本院产科就诊的患者106例(患者均知情并同意),年龄18~40岁,排除重大内科疾病,其中中期妊娠引产20例,正常分娩48例,剖宫产38例。B超检查无明显组织残留。106例患者表现不规则出血,最短30 d,最长72 d,其中引产后患者均已行清宫术,正常分娩后行清宫术者9例,其中行2次清宫术4例。将106例患者随机分成2组,治疗组56例,予口服米非司酮治疗;对照组50例,予新生化汤加氨甲苯酸片治疗。

治疗组米非司酮25 mg口服每日2次,共6 d,同时常规使用抗生素预防感染;对照组新生化汤每日1剂分2次服用,氨甲苯酸片0.5 g每日3次。服药期间哺乳期妇女暂停哺乳,服药后1周和2周复查。

1.2 疗效判断

治愈:服药后阴道出血停止;无效:服药后仍有阴道出血或增多。

1.3 统计学处理

采用t检验和χ^2检验。

2 结果

治疗组治愈率94.6%,对照组治愈率72.0%,治疗组优于

(下转2197页)

作者简介:叶珊丰,女,浙江省上虞市人,主治医师,主要从事产科临床诊治方面的研究。电话:(0575)82881756,E-mail: sydxzs1728@sina.com

收稿日期:2008-07-25;修回日期:2008-09-05