

文章编号: 1674 - 5566(2014)05 - 0718 - 08

## 枸杞多糖对四氯化碳诱导建鲤原代肝细胞损伤的保护作用研究

刘英娟<sup>1</sup>, 杜金梁<sup>2,3</sup>, 贾睿<sup>1,2</sup>, 曹丽萍<sup>2,3</sup>, 王佳豪<sup>1</sup>, 殷国俊<sup>1,2,3</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081; 3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部鱼类免疫药理学联合实验室, 江苏无锡 214081)

**摘要:** 研究中枸杞多糖 (*Lycium barbarum polysaccharide*, LBP) 对四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 诱导的建鲤 (*Cyprinus carpio* var. jian) 肝细胞急性损伤的保护作用。利用 8 mmol/L 四氯化碳构建建鲤肝细胞损伤模型, 用不同浓度的枸杞多糖处理肝细胞, 设空白对照组、枸杞多糖对照组 (0.4 mg/mL)、模型组 (CCl<sub>4</sub>)、预防组 (CCl<sub>4</sub> 处理前加枸杞多糖孵育, 0.1、0.2 和 0.4 mg/mL)、治疗组 (CCl<sub>4</sub> 处理后加枸杞多糖孵育, 0.1、0.2 和 0.4 mg/mL) 和预防治疗组 (枸杞多糖孵育后经 CCl<sub>4</sub> 处理再经枸杞多糖孵育, 0.1、0.2 和 0.4 mg/mL)。12 h 后, 收集细胞和细胞培养液, 然后测定谷丙转氨酶 (GPT)、谷草转氨酶 (GOT)、乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、细胞活力、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、免疫球蛋白 M (IgM) 及药物代谢酶细胞色素 P450 2E1 (CYP2E1) 等生化指标。研究结果表明: CCl<sub>4</sub> 处理后可以显著增加 GPT、GOT、LDH、MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IgM 及 CYP2E1 的含量, 降低 SOD 活性和细胞活力; 枸杞多糖处理组可不同程度地抑制上述生化指标的变化, 其中预防组及预防治疗组对于转氨酶 (GPT、GOT)、LDH、MDA、细胞因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )、IgM 及 CYP2E1 等活性的升高皆有显著抑制作用, 同时显著提高 SOD 酶活性及细胞活力, 且呈剂量依赖性; 而治疗组仅对 LDH、TNF- $\alpha$  及 CYP2E1 有显著的抑制作用。综上结果, 认为枸杞多糖对四氯化碳致建鲤肝损伤具有一定保护作用, 可以应用于鱼类肝损伤的防治。

**研究亮点:** 目前枸杞多糖的保肝研究仅限于哺乳动物, 在水产上还没有相关的研究报道。通过测定转氨酶、抗氧化酶、炎症因子及药物代谢酶等生化指标探究枸杞多糖对 CCl<sub>4</sub> 作用原代培养肝细胞的保护作用, 为枸杞多糖在水产肝胆疾病的防治提供理论依据。

**关键词:** 枸杞多糖; 急性肝损伤; 四氯化碳; 原代培养肝细胞; 建鲤  
**中图分类号:** S 963  
**文献标志码:** A

目前, 鱼类肝损伤成为水产养殖业面临的一个主要问题, 出现以“肝胆综合症”为主要特征的鱼类肝损伤疾病 (其特征是肝体积增大, 肝胆颜色发生变化)<sup>[1-2]</sup>。关于其起因还没有具体定论, 有研究认为药物滥用和环境污染是疾病爆发的最主要原因<sup>[3-7]</sup>。在被污染的水环境中许多化学物质可以引起肝损伤, 如乙醇、二噁英、叔丁基氢过氧化物、四氯化碳等。尽管肝细胞可以通过代谢酶等将外源物进行生物转化或者利用溶酶

体分解外来毒物<sup>[8]</sup>, 但是仍无法抵抗大量自由基等损害因子对细胞的攻击<sup>[9]</sup>。

CCl<sub>4</sub> 致肝损伤模型常被用来筛选保肝药物<sup>[10]</sup>, CCl<sub>4</sub> 在肝细胞内经肝微粒体细胞色素 P450 酶代谢后, 其分子中的 C-Cl 键断裂, 生成三氯甲基自由基 ( $\cdot$ CCl<sub>3</sub>) 和三氯甲基过氧自由基 ( $\cdot$ OOCCL<sub>3</sub>), 这些自由基作用于细胞后, 导致脂质过氧化反应和氧化应激, 从而破坏细胞的膜结构及功能完整性<sup>[11-12]</sup>。细胞膜的功能受损, 通

收稿日期: 2014-03-05 修回日期: 2014-04-15

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2013JBFM11, 2013JBFM12); 国家自然科学基金青年科学基金 (31202002、31200918); 江苏省自然科学基金 (BK2012535)

作者简介: 刘英娟 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类药理免疫学。E-mail: liuyingjuan829@163.com

通信作者: 殷国俊, E-mail: yingj@ffrc.cn

透性增加,胞浆内的一些代谢酶被释放出来,如谷草转氨酶、谷丙转氨酶等就会逃逸出细胞,实验中可在培养基内检测到相关酶指标含量的变化,同时机体在脂质过氧化过程产生的代谢物浓度也会升高<sup>[13]</sup>。肝细胞受损后机体也会产生一系列免疫应答反应,如分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等多种细胞因子,当这些因子大量产生时又会加剧细胞受损的程度<sup>[14-15]</sup>。多数实验中经常通过测定一系列胞内酶及相关因子的变化来评价细胞受损的程度,这些指标的变化规律被国内外学者广泛用到科学研究当中。如曹丽萍等<sup>[10]</sup>、ROBERT 等<sup>[16]</sup>及 LIN 等<sup>[17]</sup>在研究药物的保肝机制中,利用 CCl<sub>4</sub> 作为诱导剂致肝组织损伤,实验结果显示经 CCl<sub>4</sub> 处理后 GOT、GPT、LDH、MDA 及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等指标均显著性升高,且抗氧化能力显著降低。

中草药具有无抗药性、无药物残留、毒副作用小及不污染环境等特点,现已日益受到关注<sup>[18-22]</sup>。枸杞多糖 (*Lycium barbarum polysaccharide*, LBP) 具有广泛的药理学作用,有抗衰老、保护生殖系统、降血脂、促进造血、保肝及抗癌等作用<sup>[23-29]</sup>。在对哺乳动物研究中,枸杞多糖表现出对实验性肝损伤的保护作用<sup>[30-31]</sup>。其保护机制可能是通过提高抗氧化能力,防止脂质过氧化,恢复肝细胞功能,并促进肝细胞的再生<sup>[32]</sup>。然而在水产领域关于枸杞多糖的保肝作用却鲜有报道。因此,本实验通过测定原代培养肝细胞的一系列生化指标,来评价枸杞多糖对建鲤肝损伤的保护作用,为枸杞多糖在水产动物肝胆疾病的防治提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验用鱼

建鲤来自于中国水产科学院淡水渔业研究中心渔场,体质健康,6 月龄,大小规格基本一致,平均质量约 150 g,饲养于循环水系统中,水温 25  $^{\circ}\text{C}$ ,使用商品饲料(40% 粗蛋白、10% 粗脂肪、10% 灰分、能量 21 kJ/g DM)驯养一周,每天投喂 2 次。

#### 1.1.2 药品和试剂

枸杞多糖(LBP)购自南通四海植物提取有限公司。L-15 培养基、二甲基亚砷(DMSO)、0.5%

台盼蓝、链霉素/青霉素 (Streptomycin/penicillin)、0.25% 胰蛋白酶及 Dulbecco's 缓冲液 (D-PBS) 购自于 Sigma 公司 (St. Louis, Missouri, USA); 新生胎牛血清 (FCS) 购自于 GIBCO 公司 (USA); 谷丙转氨酶 (GPT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷草转氨酶 (GOT)、乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA) 等试剂盒及肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、免疫球蛋白 M (IgM) 和细胞色素 2E1 (CYP2E1) Elisa 试剂盒购自于南京建成生物工程研究所科技有限公司; WST-1 细胞增殖及细胞毒性试剂盒购自于碧云天生物技术研究。CCl<sub>4</sub> (分析纯) 购于国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 枸杞多糖的提纯

枸杞多糖通过经典的水煮醇沉方法<sup>[23-26]</sup>分离提纯:取 10 g 粗枸杞多糖室温下浸润于 100 mL 超纯水中过夜处理,然后加热煎煮 2 h,用定性滤纸过滤除去不溶杂质,上清液进行离心 (600 r/min, 10 min),再用 0.22  $\mu\text{m}$  的过滤器进行过滤,收集上清液,用无水乙醇沉淀 3 次。

其间有絮状沉淀产生,静置 2 h。将静置后固形物依次以 95% 乙醇、无水乙醇、丙酮洗涤除杂,分离絮状沉淀,转速 2 000 r/min,离心 5 min,95% 乙醇洗涤沉淀 3 次,烘箱中烘干,待用。

#### 1.2.2 肝细胞分离与培养

建鲤肝细胞采用胰酶消化法进行制备获得<sup>[1]</sup>。无菌条件下,取健康无病建鲤肝脏至 PBS 缓冲液中清洗 3 次,将肝组织切成 1 mm<sup>3</sup> 大小,加入约为剪碎组织 5 ~ 10 倍体积的 0.25% 胰酶消化液进行消化 5 ~ 10 min,加入 FCS 终止消化后过 200 目筛,滤液在 600 r/min 进行离心 5 min,弃上清,PBS 液清洗 3 次。台盼蓝法检测细胞活性(细胞存活率 > 95% 时可用于后续实验)后,显微计数,用 L-15 培养基制备细胞悬液,调整细胞浓度为 1  $\times 10^6$  个/mL,接种到 24 孔板和 96 孔板内,于 27  $^{\circ}\text{C}$  培养箱内培养 24 h 后(细胞贴壁牢固),备用。

#### 1.2.3 实验设计

培养于 96 孔板和 24 孔板的肝细胞贴壁牢固后,弃上清,按分组加入含 CCl<sub>4</sub> 及不同浓度枸杞多糖的 L-15 培养基,每组设置 4 个平行孔,探究枸杞多糖对肝毒物 CCl<sub>4</sub> 致肝损伤的保护作用。

具体分组为:空白对照组、模型组( $\text{CCl}_4$ )、枸杞多糖对照组、预防组、治疗组、预防治疗组。

空白对照组、枸杞多糖对照组及模型组:用 L-15 培养基培养 8 h 后,弃上清培养基,分别加入新鲜 L-15 培养基、含 0.4 mg/mL 枸杞多糖的 L-15 培养基(LBP)或 8 mmol/L 四氯化碳的 L-15 培养基( $\text{CCl}_4$ ),继续培养 4 h 后 24 孔板收集上清培养基。

预防组:L-15 培养基培养 4 h 后,弃上清培养基,加入含枸杞多糖浓度为 0.1、0.2 和 0.4 mg/mL 的 L-15 培养基培养 4 h,弃上清培养基,换用浓度为 8 mmol/L  $\text{CCl}_4$  的 L-15 培养基,继续培养 4 h 后 24 孔板收集上清培养基。

治疗组:L-15 培养基培养 4 h 后,弃上清培养基,加入 8 mmol/L  $\text{CCl}_4$  的 L-15 培养基培养 4 h,弃上清培养基,换用含枸杞多糖浓度为 0.1、0.2 和 0.4 mg/mL 的 L-15 培养基,继续培养 4 h 后,24 孔板收集上清培养基。

预防治疗组:先分别加入含枸杞多糖浓度为 0.1、0.2 和 0.4 mg/mL L-15 培养基培养 4 h,换用浓度为 8 mmol/L  $\text{CCl}_4$  的 L-15 培养基培养 4 h,弃上清培养基,再加入含枸杞多糖浓度为 0.1、0.2 和 0.4 mg/mL 的 L-15 培养基孵育,培养 4 h 后 24 孔板收集上清培养基。

上述 24 孔板各组收集的上清培养基用于测定 GOT、GPT、LDH 和 SOD 酶活性及 MDA 含量。

#### 1.2.4 细胞活力检测

上述 96 孔板用于测定细胞活力,通过 WST-1 试剂盒检测。经上述实验处理后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  WST-1,混合均匀,培养 2 h,在酶联免疫检测仪器上 450 nm 波长处测定各孔光吸收值。

$$W = A_{450i} / A_{450o} \quad (1)$$

式中: $W$  为细胞存活率; $A_{450i}$  为处理组 450 nm 处测得吸光值; $A_{450o}$  为空白对照组 450 nm 处测得吸光值。

#### 1.2.5 生化指标活力测定

按照南京建成公司试剂盒操作说明书分别测定上清培养基的生化参数:GOT、GPT、LDH、SOD 酶活性和 MDA 含量。按照 Elisa 试剂盒说明书测定 TNF- $\alpha$ 、IL-1  $\beta$ 、IgM 及 CYP2E1 的含量。

#### 1.2.6 实验数据分析

实验数据采用平均值  $\pm$  标准误差表示,实验数据分析采用 SPSS 19.0 软件包中的 One-way-

ANOVA 处理。 $P < 0.05$  表示差异显著; $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 枸杞多糖对原代肝细胞细胞活力的影响

通过 WST-1 试剂盒测定细胞的活力大小,经  $\text{CCl}_4$  作用后细胞活力显著降低,仅为空白对照组的 65% ( $P < 0.05$ )。与  $\text{CCl}_4$  组相比,枸杞多糖处理组的肝细胞活力都有所升高,其中预防组枸杞多糖 0.2 mg/mL 及预防治疗组枸杞多糖 0.1、0.4 mg/mL 细胞活力得到显著升高,见图 1。

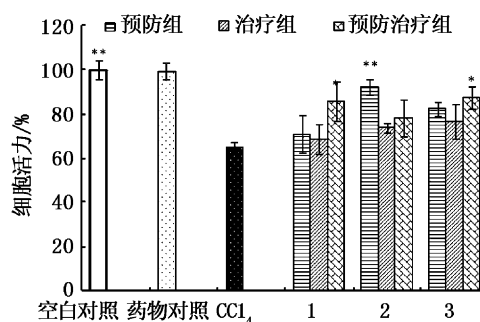


图 1 枸杞多糖对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on cell viability of  $\text{CCl}_4$ -treated primary hepatocytes

1. 0.1 mg/mL 枸杞多糖处理; 2. 0.5 mg/mL 枸杞多糖处理; 3. 1 mg/mL 枸杞多糖处理; \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$  (与  $\text{CCl}_4$  组相比较);图 2-5 同。

### 2.2 枸杞多糖对原代肝细胞 GOT、GPT 及 LDH 的影响

原代培养肝细胞经  $\text{CCl}_4$  处理后,LDH、GOT、GPT 明显增加,且与空白对照组相比,差异显著 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ );与  $\text{CCl}_4$  组相比,枸杞多糖的预防组及预防治疗组的 3 个浓度组 (0.1、0.2、0.4 mg/mL) 均可显著抑制由  $\text{CCl}_4$  引起的 GOT 及 GPT 含量的升高;预防组及预防治疗组的 0.2 mg/mL 和 0.4 mg/mL 枸杞多糖显著抑制了 LDH 的上升 ( $P < 0.01$  或者  $P < 0.05$ )。而治疗组对 GOT、GPT 的抑制作用不显著,治疗组 0.2 mg/mL 枸杞多糖对 LDH 的升高有显著抑制作用,见图 2。

### 2.3 枸杞多糖对原代肝细胞 MDA 及 SOD 的影响

建鲤原代肝细胞经  $\text{CCl}_4$  损伤作用后,MDA 的释放量明显增加,且与空白对照组相比,差异

显著( $P < 0.05$ )。与  $\text{CCl}_4$  组相比,预防组枸杞多糖 0.2 mg/mL 和 0.4 mg/mL 及预防治疗组 0.4 mg/mL 可显著抑制由  $\text{CCl}_4$  作用引起的 MDA 释放量的增加,见图 3。

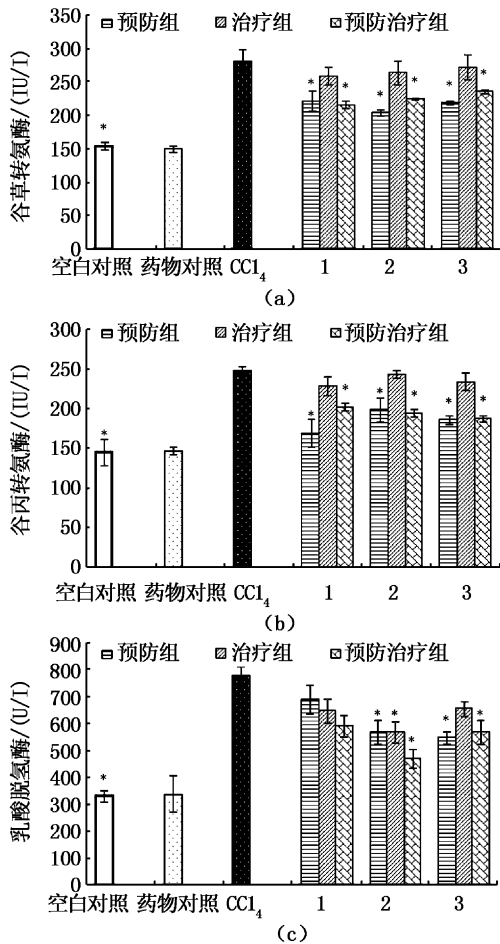


图2 枸杞多糖对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤原代肝细胞 GOT(a)、GPT(b)及 LDH(c)酶活性的影响  
Fig.2 Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on GOT(a), GPT(b) and LDH(c) activity of  $\text{CCl}_4$ -treated primary hepatocytes

肝细胞经  $\text{CCl}_4$  损伤作用后,抗氧化酶 SOD 酶活力比空白对照组显著降低( $P < 0.01$ )。与  $\text{CCl}_4$  组相比,各枸杞多糖处理组的 SOD 活性均不同程度地得到提高,预防组枸杞多糖 0.2 mg/mL 和 0.4 mg/mL 及预防治疗组 0.1 mg/mL 细胞中 SOD 酶活性的降低得到显著抑制。

#### 2.4 枸杞多糖对原代肝细胞 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及 IgM 的影响

取细胞培养基上清测定细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IgM,经  $\text{CCl}_4$  作用后, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IgM 含量明显增加,与空白对照组相比,差异极显著

( $P < 0.01$ );与  $\text{CCl}_4$  组相比,预防组枸杞多糖 0.2 mg/mL 和 0.4 mg/mL 及预防治疗组 0.4 mg/mL 都显著抑制细胞因子 IL-1 $\beta$  的升高;预防组枸杞多糖 0.4 mg/mL、治疗组及预防治疗组枸杞多糖 0.1 mg/mL 对 TNF- $\alpha$  的升高有显著的抑制作用;预防组枸杞多糖 0.1 mg/mL 和 0.4 mg/mL 及预防治疗组 0.2 mg/mL 均显著抑制了 IgM 的升高,见图 4。

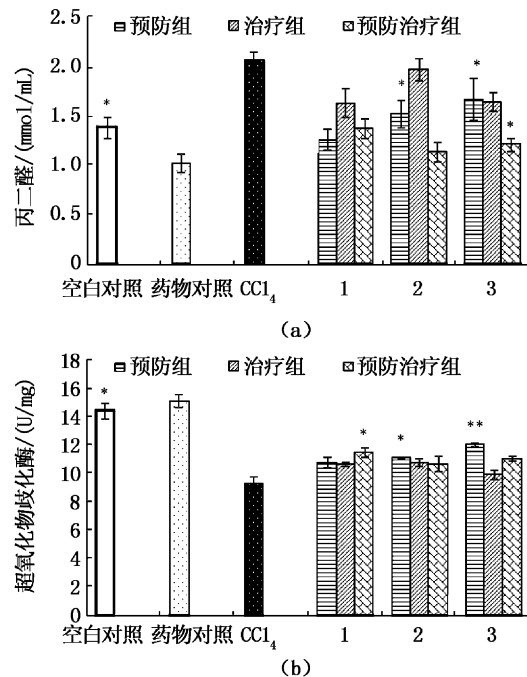


图3 枸杞多糖对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤原代肝细胞 MDA(a)及 SOD(b)活性的影响

Fig.3 Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on MDA (a) and SOD (b) activity of  $\text{CCl}_4$ -treated primary hepatocytes

#### 2.5 枸杞多糖对原代肝细胞 CYP2E1 的影响

如图 5 所示,与空白对照组相比,  $\text{CCl}_4$  损伤作用显著促进了 CYP2E1 酶活性的升高( $P < 0.01$ )。与  $\text{CCl}_4$  组相比,预防组枸杞多糖 0.4 mg/mL、治疗组 0.1 mg/mL 及预防治疗组 0.2 mg/mL 对于酶活性的升高均有显著抑制作用。

### 3 讨论

肝脏是鱼体内最大的代谢器官,也是外源性物质攻击的主要靶器官<sup>[33]</sup>。GPT 是肝细胞内的一种胞浆酶,当肝细胞受到损伤时逸出细胞外,可灵敏地反映细胞受损的程度。此外,反映肝细胞受损的酶还有 LDH 及 GOT<sup>[34]</sup>。LDH、GPT、GOT 这 3 个酶作为  $\text{CCl}_4$  致肝损伤的敏感指标,可

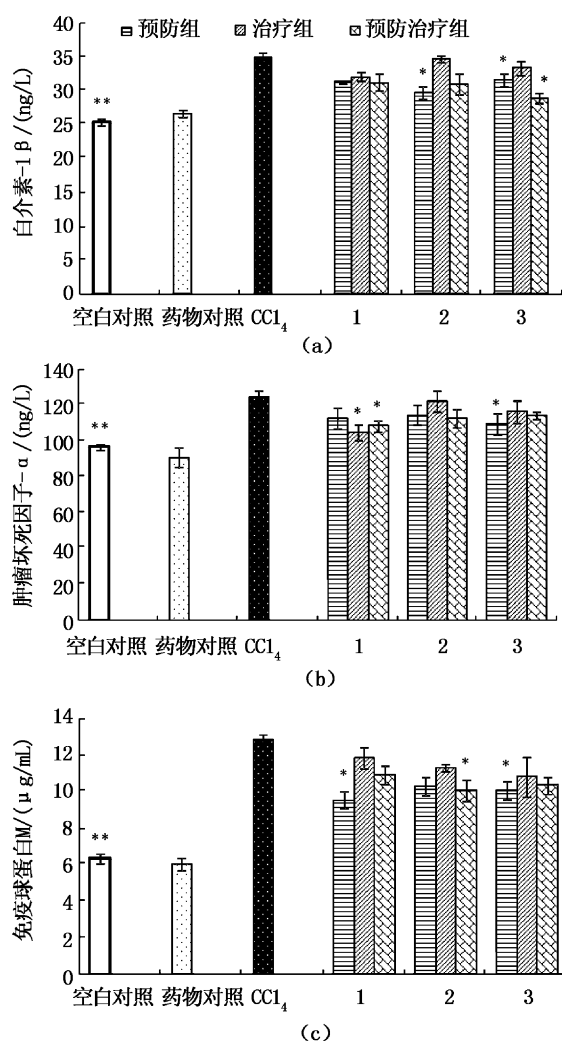


图4 枸杞多糖对 CCl<sub>4</sub> 致肝损伤原代肝细胞

IL-1β (a)、TNF-α (b) 及 IgM (c) 的影响

Fig. 4 Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on IL-1β (a), TNF-α (b) and IgM (c) of CCl<sub>4</sub>-treated primary hepatocytes

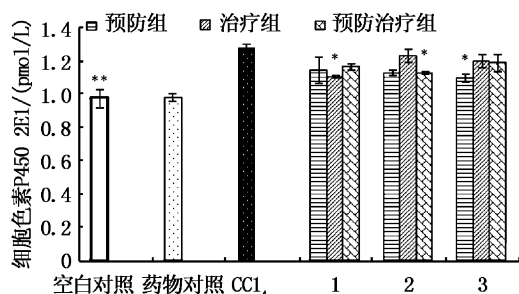


图5 枸杞多糖对 CCl<sub>4</sub> 致肝损伤原代肝细胞 CYP2E1 的影响

Fig. 5 Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on CYP2E1 of CCl<sub>4</sub>-treated primary hepatocytes

评价 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝毒性及枸杞多糖的保肝作用<sup>[35]</sup>。在本实验中, 建鲤原代肝细胞经 CCl<sub>4</sub> 作用后培养基上清内的 LDH、GPT、GOT 含量明显增加, 枸杞多糖的预防组及预防治疗组显著地抑制了转氨酶及 LDH 的增加, 类似的结果在小鼠中也有报道, 黄培池和王娟<sup>[36]</sup> 曾在枸杞多糖对小白鼠肝损伤的保护作用研究中发现, 枸杞多糖可以显著抑制 CCl<sub>4</sub> 致肝损伤引起的转氨酶及磷酸激酶的升高。这种抑制作用可能与枸杞多糖可以提高肝微粒体膜的活性, 减少胞浆内转氨酶逸出, 从而保证细胞正常代谢有关<sup>[37-38]</sup>。

MDA 是脂质过氧化的重要产物, 也能作为损害因子对机体进行损伤, 其含量的多少常被用作检测脂质过氧化的重要指标<sup>[12]</sup>。本实验中, CCl<sub>4</sub> 代谢后产生的自由基导致了脂质过氧化, 引起了 MDA 含量的升高; 而枸杞多糖处理后, 不同处理组内 MDA 均被不同程度地抑制。这可能和枸杞多糖可以增强抗氧化酶活性, 增强清除自由基能力有关。王红丽等<sup>[39]</sup> 在对枸杞多糖的抗脂质过氧化研究中显示, LBP 可增加衰老小鼠肝脏中抗氧化酶的活力, 降低肝脏中 MDA 含量。

有关报道指出, 药物的保肝作用与其抗氧化及清除自由基的能力有关。SOD 作为自由基清除剂, 是体内重要的抗氧化酶, 其活力的高低可反映机体清除自由基的能力<sup>[40]</sup>。枸杞多糖药物对照组 SOD 含量比空白组显著升高, 且预防组及预防治疗组也显著抵制了由 CCl<sub>4</sub> 作用引起的酶活力的降低。这可能与枸杞多糖可以降低质膜的流动性, 减少自由基对抗氧化酶的破坏有关。邵鸿娥等<sup>[41]</sup> 曾在研究枸杞多糖对小鼠体内抗氧化酶活性及耐受力的影响时, 发现枸杞多糖可以提高小鼠血清中 SOD 水平, 且其作用与剂量呈依赖关系。

CCl<sub>4</sub> 经代谢后产生的自由基, 攻击肝细胞, 然后激活肝 Kupffer 细胞, 产生一系列细胞因子, 这些因子引起肝细胞损伤<sup>[42-43]</sup>。TNF-α 是肝损伤过程中出现最早的炎症因子, 对细胞质膜有一定的破坏作用, 还可以影响其他因子的活性, 与其他炎症因子作用产生关联反应, 放大损伤程度, 进而引起肝细胞损伤。三氯甲基等自由基还刺激肝星状细胞产生 IL-1β, IL-1β 低浓度时可调节免疫反应, 当大量产生时会对细胞产生破坏, 诱导急性肝损伤<sup>[44-45]</sup>。大量的 TNF-α 及 IL-1β

可加剧质膜的通透性,破坏细胞器的功能完整性,导致多种酶系漏出,以致细胞受损甚至坏死<sup>[46]</sup>。CCl<sub>4</sub>经体内代谢后,促进了细胞炎症因子的分泌。加入枸杞多糖后,预防组及预防治疗组炎症因子 TNF- $\alpha$  与 IL-1B 含量显著降低。JIA 等<sup>[18]</sup>也曾报道,体内实验中,小鼠经 CCl<sub>4</sub> 注射后,血清中白细胞介素及肿瘤坏死因子均显著升高,进一步加剧了肝损伤的程度。

CCl<sub>4</sub> 进入细胞内后,作为外毒物攻击细胞,引起细胞的免疫应答,IgM 是机体初次免疫应答时的重要抗体<sup>[47]</sup>。当 CCl<sub>4</sub> 攻击细胞时,机体迅速产生大量的 IgM 来对抗异源物的攻击。与空白对照组相比,CCl<sub>4</sub> 组 IgM 的量显著增加。加入枸杞多糖后,IgM 的释放量显著降低。本实验推测 CCl<sub>4</sub> 经代谢后产生的自由基,作为免疫原,刺激细胞释放 IgM 来进行免疫应答,枸杞多糖具有解毒作用,修复线粒体损伤,恢复抗氧化酶的活性,清除自由基,从而减少对细胞的刺激,使得 IgM 含量降低。

在肝细胞的亲脂性膜上存在有大量的药物代谢酶,参与药物的代谢及转化。CYP450 作为肝药酶中重要的酶系,参与许多内源性 & 外源性物质的代谢过程<sup>[48-49]</sup>。CCl<sub>4</sub> 进入机体后主要依赖 CYP450 中的亚型 CYP2E1 进行代谢分解。CYP2E1 是二甲基亚硝胺 D-脱甲基酶,一些外来物质经 CYP2E1 转化后或者被转化为细胞毒物,或者形成极性更大的物质排出体外<sup>[50]</sup>。CCl<sub>4</sub> 经代谢后产生的活性自由基作为细胞毒物对细胞进行破坏,通过结合细胞内大分子物质诱发脂质过氧化反应,造成肝损伤的发生。CCl<sub>4</sub> 作用后细胞色素 P450E1 酶活性升高,加入枸杞多糖后显著抑制了酶活性的升高,这可能与 CCl<sub>4</sub> 经 CYP450 酶系作用后生成大量自由基,这些自由基诱导 CYP450 酶的表达,枸杞多糖作用后提高抗氧化酶的活力,清除自由基的破坏作用,使得 CYP450 酶活性趋于正常有关。

#### 4 结论

实验探究枸杞多糖对 CCl<sub>4</sub> 致肝细胞损伤的影响结果显示,枸杞多糖预防组效果较好,预防治疗组效果次之,两个处理组效果都好于治疗组,且 0.4 mg/mL 质量浓度的枸杞多糖作用效果显著,且作用效果呈剂量依赖性。由本实验推

测,枸杞多糖对建鲤肝细胞保护作用与其提高抗氧化酶活性,抑制转氨酶、LDH 活性,降低膜的脂质过氧化,抑制细胞炎症因子对细胞的破坏作用,调节药物代谢酶 CYP450 的活性等有关。

#### 参考文献:

- [1] MYERS M S, LANDAHL J T, KRAHN M M, et al. Relationship between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U S West Coast Environ[J]. Health Persp, 1991, 90:7-15.
- [2] YIN G J, CAO L P, XU P, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of Hibiscus sabdariffa extract against carbon tetrachloride induced hepatocyte damage in *Cyprinus carpio* [J]. In Vitro Cellular Development Biology Animal, 2011, 47(1):10-15.
- [3] MYERS M S, LANDAHL J T, KRAHN M M, et al. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound; evidence for a xenobiotic chemical etiology I: pathology and epizootiology [J]. The Science of the Total Environment, 1990, 94:33-50.
- [4] ARNOLD H, PLUTA H J, BRAUNBECK T. Sublethal effects of prolonged exposure to disulfoton in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cytological alterations in the liver by a potent esterase inhibitor [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1996, 34(1):43-55.
- [5] 王利伟, 罗理, 姜兰. 不同剂量氟苯尼考对罗非鱼血药浓度的影响及组织毒理学研究[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(1):9-12.
- [6] 郑乐云, 杨求华, 黄种持. 循环水养殖密度和氨氮对斜带石斑鱼生长和免疫力的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(5):706-712.
- [7] 胡益峰, 蒋红, 李卫丁, 等. 嵊泗绿华岛养殖海域环境质量综合评价[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(4):603-608.
- [8] NIMMO I A. The glutathione-S-transferases of fish [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1987, 3:163-172.
- [9] WINSTON G W, MOORE M N, KICHIN M A, et al. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effect of xenobiotics [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1996, 113(2):221-229.
- [10] 曹丽萍, 贾睿, 丁炜东, 等. 建鲤急性肝损伤模型的建立及当归提取物的保肝和抗氧化作用研究[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(6):551-557.
- [11] 甘露, 张声华. 枸杞多糖的抗肿瘤活性和对免疫功能的影响[J]. 营养学报, 2003, 25(2):196-199.
- [12] MA M, LIU G H, YU Z H. Effect of the Lycium barbarum polysaccharides administratin on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo [J]. Food Chemistry, 2009, 113(4):872-877.

- [13] 黄正明,杨新波,曹文斌. CCl<sub>4</sub>, D- Gal, ANIT 对化学性肝损伤小鼠血液生化指标的影响[J]. 华人消化杂志,1998,6(1):17-18.
- [14] 马书娟,马金法四逆颗粒对四氯化碳慢性肝损伤大鼠血清 TNF- $\alpha$  及 IL-8 水平的影响[J]. 陕西中医,2003,24(1):87-88.
- [15] 文明梁,于明超,离卓佳. 饲料中添加芽孢杆菌和中草药制剂对凡纳滨对虾免疫功能的影响[J]. 上海海洋大学学报,2009,18(2):181-186.
- [16] ROBERT D,HRVOJE J,GORDANA B. Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF- $\alpha$ , COX-2 and iNOS expression in CCl<sub>4</sub>-intoxicated mice[J]. Toxicology,2011,280(1/2):33-43.
- [17] LIN X, HUANG R, ZHANG S J, et al. Methyl helicterate protects against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats by inhibiting oxidative stress, NF- $\kappa$ B activation, Fas/FasL pathway and cytochrome 4502E1 level [J]. Food and Chemical Toxicology,2012,50:3413-3420.
- [18] JIA R, CAO L P, XU P, et al. In vitro and in vivo hepatoprotective and antioxidant effects of Astragalus polysaccharides against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish Physiology Biochemistry,2012,38(3):871-881.
- [19] YIN G J, CAO L P, XU P, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of Glycyrrhiza glabra extract against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish Physiology Biochemistry,2011,37(1):209-216.
- [20] 王丽宏,吉红,张宝彤,等. 中草药保肝作用的研究进展[J]. 饲料博览,2012(11):41-45.
- [21] LIU X, WANG D, LU T Y. The Effects of Compound Chinese Medicine Immune Aditives on Growth Performance and Antioxidant Capacity of *Acipenser schrenckii* [J]. Animal Husbandry and Feed Science,2012,4(5):221-225.
- [22] CHATTOPADHYAY R R. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: part II [J]. Journal of Ethnopharmacology,2003,89:217-219.
- [23] ROSS J A, KASUM C M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety[J]. Annual Review of Nutrition,2002,22:19-34.
- [24] 董进文,胡庆和,高天顺,等. 枸杞多糖的药理学研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志,1998,4(5):54-56.
- [25] 黄秋婷,陈远峰. 枸杞多糖的研究及其进展[J]. 食品研究与开发,2006,27(1):172-175.
- [26] 陶大勇. 枸杞多糖的免疫调节作用[J]. 安徽农业科学,2007,35(22):6816-6818.
- [27] 孟协中,席金萍,李力平,等. 枸杞多糖化学研究的现状[J]. 宁夏农林科技,1999,3(4):22-25.
- [28] 董进文,胡庆和,高天顺,等. 枸杞多糖的药理学研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志,1998,4(5):54-56.
- [29] OTTU O J,ATAWODI S E,ONYIKE E. Antioxidant, hepatoprotective and hypolipidemic effects of methanolic root extract of *Cassia singuana* in rats following acute and chronic carbon tetrachloride intoxication [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine,2013,6(8):609-615.
- [30] 王远吉. 枸杞多糖对鲫鱼血清溶菌酶活性的影响[J]. 中国饲料,2004,6(24):28,31.
- [31] 宋毅,王玉娥,冯玲玲. 枸杞多糖免疫调节作用的实验研究[J]. 湖北预防医学杂志,2000,11(3):16.
- [32] 边纶,沈新生,王燕蓉,等. 枸杞多糖对四氯化碳所致小鼠肝损伤修复作用的形态学研[J]. 宁夏医学杂志,1996,18(4):196-198.
- [33] 龚峻梅,朴英杰,陈素云. 急性 CCl<sub>4</sub> 肝损伤的研究进展[J]. 国外医学:生理病理科学与临床分册,2002,22(3):308-310.
- [34] DONG H, LU F, ZHAO L. Chinese herbal medicine in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine,2012,18(2):152-160.
- [35] YANG Z, XU M, YI J K, et al. Clinical characteristics and mechanism of liver damage in patients with severe acute respiratory syndrome [J]. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International,2005,4(1):60-63.
- [36] 黄培池,王娟. 枸杞多糖对小白鼠肝损伤的保护作用研究[J]. 海峡药学,2009,21(10):29-31.
- [37] TANIGUCHI M, TAKEUCHI T, NAKATSUKA R, et al. Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride [J]. Life Sciences,2004,75(13):1539-1549.
- [38] MASUGA Y. Learning toxicology from carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity [J]. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan,2006,126(10):885-899.
- [39] 王红丽,杨孝来,王彩琴. 枸杞多糖的抗脂质过氧化作用研究[J]. 卫生职业教育,2005,23(17):112.
- [40] HATTORI T, ITO M, SUZUKI Y. Studies on antinephritic effects of plant components in rats. Effects of saikosponins original-type anti-GBM nephritis in rats and its mechanisms [J]. Nihon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacol Jpn,1991,97(1):13-21.
- [41] 邵鸿娥,刘斌钰,邢雁霞. 枸杞多糖对小鼠体内抗氧化酶活性及耐力的影响[J]. 中国自然医学杂志,2010,12(2):133-134.
- [42] 朱善良,陈龙,高伟,等. CCl<sub>4</sub> 致小鼠肝损伤中几种免疫介质含量变化的研究[J]. 实验生物学报,2004,37(1):50-54.
- [43] GUAZZONE V A, JACOBO P, THEAS M S, et al. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review [J]. Microscopy Research and Technique,2009,72(8):620-628.
- [44] 边纶,沈新生,王燕蓉,等. 枸杞多糖对四氯化碳所致小鼠肝损伤修复作用的形态学研究[J]. 宁夏医学杂志,1996,18(4):196-198.
- [45] HIRANO T. The biology of interleukin-6 [J]. Chem Immunol,1992,51:153-180.
- [46] TANG W M, ENOCH C, KWOK C Y, et al. A review of the

- anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit[J]. *Inflammopharmacology*, 2012, 20(6):307-314.
- [47] VIITALA K, ISRAEL Y, BLAKE J E, et al. Serum IgA, IgG, and IgM antibodies directed against acetaldehyde-derived epitopes: relationship to liver disease severity and alcohol consumption[J]. *Hepatology*, 1997, 25(6):1418-1424.
- [48] WRIGHTON S A, VARDONBRADON M, RING B J. The human drug metabolizing cytochromes P450 [J]. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 1996, 24(5):461-473.
- [49] 常彬霞, 貌盼勇, 辛绍杰. I 相药物代谢酶细胞色素 P450 及其与肝脏疾病的关系[J]. *解放军医学杂志*, 2010, 35(3):333-335.
- [50] 王春花, 成军, 郎振为, 等. 细胞色素 CYP II E1 与肝脏疾病关系的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(4):950-954.

## Hepatoprotective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on carbon tetrachloride induced primary hepatocyte injury in Jian Carp

LIU Ying-juan<sup>1</sup>, DU Jin-liang<sup>2,3</sup>, JIA Rui<sup>1,2</sup>, CAO Li-ping<sup>2,3</sup>, WANG Jia-hao<sup>1</sup>, YIN Guo-jun<sup>1,2,3</sup>

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, Jiangsu, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, Jiangsu, China; 3. International Joint Research Laboratory for Fish Immunopharmacology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081, Jiangsu, China)

**Abstract:** In order to study the hepatoprotective effects of Chinese herbal medicine *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) against carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury in *Cyprinus carpio* var. jian. Different concentrations of LBP (0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL) were added to the carp primary hepatocytes before (pre-treatment), after (post-treatment) and both before and after (pre-and post-treatment) incubation of the hepatocytes with CCl<sub>4</sub>. After 12 h, the cell and supernatant were collected, and then the levels of glutamatepyruvate transaminase (GPT), glutamate oxalate transaminase (GOT), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), cell viability, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), immunoglobulin M (IgM) and cytochrome p450 2E1 (CYP2E1) were measured. The results showed that CCl<sub>4</sub> at 8 mmol/L in the culture medium significantly elevated the levels of GPT, GOT, LDH, MDA, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IgM and CYP2E1, and significantly reduced levels of SOD and cell viability; however, treatment with LBP attenuated the adverse changes of these biochemical indexes, especially in pre-treatment and pre-and post-treatment; the changed levels of GPT, GOT, LDH, MDA, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IgM and CYP2E1 and the elevated levels of SOD and cell viability were significantly inhibited in a dose-dependent manner, while the post-treatment of hepatocytes with LBP only significantly reduced the levels of LDH, TNF- $\alpha$  and CYP2E1. Based on the results, it is indicated that LBP may have the hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury in *Cyprinus carpio* var. jian and may be used as a hepatoprotective agent in fish liver diseases.

**Key words:** *Lycium barbarum* polysaccharide; acute liver injury; carbon tetrachloride; primary hepatocyte; Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. jian)