

曹丽萍, 杜金梁, 贾睿, 等. 姜黄素、甘草次酸和香菇多糖联合对  $\text{CCl}_4$  诱导的建鲤肝损伤的保护作用[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5): 1100-1106.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.05.019

## 姜黄素、甘草次酸和香菇多糖联合对 $\text{CCl}_4$ 诱导的建鲤肝损伤的保护作用

曹丽萍<sup>1,2,3</sup>, 杜金梁<sup>2,3</sup>, 贾睿<sup>2,3</sup>, 殷国俊<sup>2,3</sup>, Galina Jeney<sup>3,4</sup>, 丁炜东<sup>2</sup>, 高崧<sup>1</sup>

(1.扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 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国际联合实验室, 江苏无锡 214081; 4. Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation, Ann light 8, Szarvas H-4440, Hungary)

**摘要:** 以四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )构建建鲤体内急性肝损伤模型,对姜黄素、甘草次酸和香菇多糖联合护肝作用进行研究。分别采用含有姜黄素、甘草次酸、香菇多糖和低、中、高剂量姜黄素+甘草次酸+香菇多糖联合中草药的饲料投喂 60 d 后,各组建鲤腹腔注射 30%  $\text{CCl}_4$ , 注射剂量为每 1 g 鱼体注射 0.005 ml, 禁食 72 h, 以诱导建鲤急性肝损伤。通过测定各组建鲤生长指标、血清和肝脏生化指标及肝组织炎症细胞因子 mRNA 的表达情况, 观察姜黄素、甘草次酸和香菇多糖联合用药的保肝效果。结果显示:甘草次酸单味用药及中、高剂量姜黄素+甘草次酸+香菇多糖联合用药能显著提高建鲤的相对增重率和特定生长率, 显著降低饵料系数; 与模型组相比, 各用药组能显著抑制  $\text{CCl}_4$  导致的血清中谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)和乳酸脱氢酶(LDH)活性的升高, 显著恢复肝组织中谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)水平, 抑制丙二醛(MDA)生成, 能显著抑制 *C-Rel*、*iNOS*、*IL-1 $\beta$* 、*TNF- $\alpha$* 、*IL-6* 和 *IL-8* 表达量的升高; 与姜黄素、甘草次酸或香菇多糖单味用药相比较, 姜黄素+甘草次酸+香菇多糖联合用药的保肝效果更明显, 随着联合用药剂量的升高, 作用愈加显著。说明姜黄素、甘草次酸和香菇多糖联合用药, 对  $\text{CCl}_4$  诱导的建鲤肝损伤具有协同保护作用。

**关键词:** 建鲤; 四氯化碳; 肝损伤; 中草药

中图分类号: S948 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2018)05-1100-07

## The liver protective effect of curcumin combined with glycyrrhizic acid and lentinan on $\text{CCl}_4$ -induced hepatic damage in common carp (*Cyprinus carpio*)

CAO Li-ping<sup>1,2,3</sup>, DU Jin-liang<sup>2,3</sup>, JIA Rui<sup>2,3</sup>, YIN Guo-jun<sup>2,3</sup>, GALINA Jeney<sup>3,4</sup>, DING Wei-dong<sup>2</sup>, GAO Song<sup>1</sup>

(1. Veterinary Medicine College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, 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, China; 3. International Joint Research Laboratory for Fish immunopharmacology, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 4. Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation, Ann light 8, Szarvas H-4440, Hungary)

收稿日期: 2018-06-28

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2017JBFZ01); 国家自然科学基金项目(31702318); 江苏自然科学基金项目(BK20170218)

作者简介: 曹丽萍(1977-), 女, 江苏无锡人, 博士, 副研究员, 研究方向为鱼类免疫和药理学。(E-mail) caoliping771004@126.com

通讯作者: 高崧, (E-mail) gsong@yzu.edu.cn; 丁炜东, (E-mail) dingwd@126.com

**Abstract:** The *Cyprinus carpio* Jian acute hepatocyte damage model was constructed by  $\text{CCl}_4$  induction to evaluate the combined liver protective effect of curcumin, glycyrrhizic acid (GC) and lentinan (LNT). Feeds containing curcumin,

glycyrrhizic acid, lentinan and combined groups containing low, medium and high dose of extracts were used to feed carp for 60 d, then 30% CCl<sub>4</sub> mixture at 0.005 ml/g was injected intraperitoneally, and acute hepatic injury of carp was induced after fasting for 72 h. Then blood and liver tissue were collected, and growth indicators, biochemical indicators in serum and liver tissue homogenate were determined, respectively. In addition, the changes in mRNA expression level of *NF-κB/C-Rel* and cytokine *IL-1β*, that *iNOS*, *TNF-α*, *IL-6* and *IL-8* in tissue were determined using real-time quantitative PCR. The results showed that GC and medium and high dose combined treatments could significantly increase relative weight rate (*RWR*) and specific growth rate (*SGR*), reduce feed conversion ratio (*FCR*). Curcumin, GC and LNT and combined group could significantly inhibit the increase of glutamic oxalacetic transaminase (*GOT*), glutamic pyruvic transaminase (*GPT*) and lactate dehydrogenase (*LDH*) contents in carp serum caused by CCl<sub>4</sub>, promote the recovery of glutathione (*GSH*) and superoxide dismutase (*SOD*) levels in liver tissue homogenates and significantly inhibit malondialdehyde (*MDA*) synthesis. Meanwhile, curcumin, GC and LNT and combined treatments could significantly inhibit the increase of expression of *C-Rel*, *iNOS*, *IL-1β*, *TNF-α*, *IL-6* and *IL-8* induced by CCl<sub>4</sub>. Compared with single drug group, the preventive effect of combined group was more significant with a dose effect. The combination of curcumin, GC and LNT could synergistically reduce the liver injury induced by CCl<sub>4</sub>.

**Key words:** *Cyprinus carpio* Jian; CCl<sub>4</sub>; hepatocyte damage; Chinese herbal medicine

中药姜黄为姜科姜黄属植物姜黄(*Curcuma longa* L.)的干燥根茎,现代药理学研究证明其具有广泛的药理作用<sup>[1-2]</sup>。姜黄素(Curcumin)是中药姜黄的主要活性成分,是唯一一种具有酚基和醌基的天然药物<sup>[3]</sup>,毒性低,耐受性好,具有较强的抗炎、抗氧化、抗肿瘤、保肝及免疫调节等活性,且无明显的毒副作用,是常用传统中药<sup>[4]</sup>。甘草次酸(Glycyrrhetic acid, GA)是甘草的重要成分,具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、免疫调节、保肝等广泛的药理学作用。香菇多糖(Lentinan, LNT)是从担子菌纲香菇中提取的一种B-D-(1,3)葡萄糖残基为主链、(1,6)葡萄糖残基为侧链的葡聚糖<sup>[5]</sup>,具有抗病毒、抗肿瘤、调节免疫功能和促进干扰素生成等功能<sup>[6-8]</sup>。

临床上,利用不同中药联合用药治疗疾病是中医用药的特色和优势。联合用药的优势一方面是中药基本性能发挥作用,另一方面是各个组成药物之间的协同放大作用。复方甘草酸苷联合水飞蓟素治疗药物性肝病的效果明显优于单味用药<sup>[9]</sup>。五味子与黄芪多糖协同作用,能显著提高乙酰氨基酚致肝损伤小鼠谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)水平,降低谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)水平,减轻肝组织损伤程度<sup>[10]</sup>。鉴于姜黄素、甘草次酸和香菇多糖的保肝和免疫调节功效,本研究以CCl<sub>4</sub>诱导建鲤肝损伤,并建立急性肝损伤模型,通过检测建鲤生长指数、血清和肝脏组织匀浆中相关生化指标及细胞因子 mRNA 表达的变化,研究姜黄素、甘草次酸和香菇多糖联合用药对建鲤急性肝损伤的保护作用,探讨这 3 种中药配伍的合理性和科

学性,为进一步开发鱼类保肝中草药配方奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验鱼

建鲤取自中国水产科学院淡水渔业研究中心渔场,体质健康无伤,规格基本一致,饲养于循环水系统中。驯养条件为:(27±2)℃,pH6.8~7.6,溶解氧(DO)质量浓度>5 mg/L, NH<sub>3</sub>质量浓度<0.05 mg/L, H<sub>2</sub>S 质量浓度<0.01 mg/L。每天投喂普通饲料(粗蛋白 40%,粗脂肪 10%,灰分 10%,能量 21 kJ/g)2 次,每次投喂饲料量为鱼体质量的 2%,驯养 7 d。

### 1.2 主要药品与仪器

姜黄素、甘草次酸购自 Sigma 公司,香菇多糖粗制粉购自无锡正大畜禽有限公司。CCl<sub>4</sub>(分析纯)购于国药集团化学试剂有限公司,配置成 30%的 CCl<sub>4</sub>-橄榄油溶液(CCl<sub>4</sub>:橄榄油=3:7,体积比)。谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)活性以及谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量测定试剂盒购自于南京建成生物工程研究所科技有限公司。DuGreen 核酸染料(10 000×水溶液)购自硕世生物科技有限公司,总 RNA 抽提试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒购自于 TaKaRa 公司。MK3 酶标仪为 Thermo 公司产品,ABI-7500 型 PCR 仪为美国 ABI 公司产品。

### 1.3 试验设计

初体质量为(30.0±1.0)g的健康鲤鱼,饲养于淡水渔业研究中心宜兴妃亭基地 700 cm×435 cm×120 cm 的室内水泥池内。随机分为 8 组,每组 20

尾,分别为空白对照组、模型对照组( $\text{CCl}_4$ )、姜黄素组(5.0 g/kg姜黄素)、甘草次酸组(3.0 g/kg甘草次酸)、香菇多糖组(3.0 g/kg香菇多糖)、联合药物低剂量组(1.0 g/kg姜黄素+1.0 g/kg甘草次酸+1.0 g/kg香菇多糖)、联合药物中剂量组(2.5 g/kg姜黄素+1.5 g/kg甘草次酸+1.5 g/kg香菇多糖)和联合药物高剂量组(5.0 g/kg姜黄素+3.0 g/kg甘草次酸+3.0 g/kg香菇多糖)。其中,空白对照和模型对照组均投喂普通饲料,其他各药物组分别投喂含相应剂量中药的饲料。每天投喂2次,每天记录投喂饵料量,每天投喂量约为鱼体质量的2%,共投喂60 d。投喂结束后,空白对照组腹腔注射橄榄油,模型对照组和各药物组腹腔注射30%的 $\text{CCl}_4$ ,注射剂量为每10 g鱼体注射0.05 ml。禁食72 h,以诱导肝损伤。MS-222麻醉,各组称质量、采集血液和肝组织。

#### 1.4 香菇多糖的制备及纯度测定

香菇多糖粗制粉的制备采用水煮醇沉法<sup>[11]</sup>,略加修改。称取香菇多糖粗制粉100 g加于100 ml无菌水中,100 ℃水浴加热溶解30 min,待完全冷却后,350 g、20 ℃离心10 min,弃沉淀。上清液用无水分析乙醇沉淀至终浓度为80%,静置过夜。次日,用2层纱布滤出沉淀,并用无水乙醇洗涤沉淀2~3次。40 ℃烘箱中烘干沉淀,干燥后研磨过筛,备用。

采用Dubotls法<sup>[12]</sup>绘制葡萄糖标准曲线并测定样品中多糖的含量。精密称取105 ℃干燥恒质量的葡萄糖10 mg,置于100 ml容量瓶中定容。准确吸取标准溶液0.2 ml、0.4 ml、0.6 ml、0.8 ml和1.0 ml分置于试管中,各加蒸馏水使体积为2.0 ml,再各加5%的苯酚1.0 ml,摇匀,滴加浓硫酸5.0 ml,摇匀放置10 min,置沸水浴中加热15 min,冷却,同时另取蒸馏水2.0 ml,同上操作为空白对照。在490 nm处测定吸光度,以浓度和吸光度为坐标绘制标准曲线,得到标准曲线回归方程: $Y=1.0219+1.7225x$ , $R^2=0.999$ 。精密称取2 mg香菇多糖提纯样品,溶解后按标准曲线绘制方法测定的吸光度值为2.638,以回归方程计算出样品中葡萄糖含量为93.82%。

#### 1.5 生长指标的测定

饲养试验结束后,按照以下公式,计算每组鱼相对增质量率、特定生长率和饵料系数。相对增质量率( $RWR$ )= $(W_t - W_0)/W_0 \times 100\%$ ,特定生长率( $SGR$ )= $(\ln W_t - \ln W_0)/t \times 100\%$ ,饵料系数( $FCR$ )= $F/(W_t - W_0) \times 100\%$ ,其中, $W_t$ 为终体质量, $W_0$ 为初始

体质量, $t$ 为投喂时间, $F$ 为投喂饲料量。

#### 1.6 血清生化指标的测定

试验结束后,用一次性注射器采集鱼尾静脉血。各组血液样品4 ℃静置2 h后,3 000 r/min、4 ℃离心15 min分离血清,-20 ℃保存,备用。按照试剂盒操作说明分别测定血清中谷丙转氨酶( $GPT$ )、谷草转氨酶( $GOT$ )和乳酸脱氢酶( $LDH$ )活性。

#### 1.7 肝组织匀浆生化指标的测定

将抽完血的鱼进行解剖,在肝脏右中叶相同部位取肝脏组织,用预冷的生理盐水漂洗血液,剪去肝脏表面附着的结缔组织,再用滤纸吸去表面水分,称质量,用眼科剪刀剪碎,移入匀浆管中,加入9倍体积的生理盐水(体积分数为0.86%)进行匀浆。该匀浆以2 000 r/min离心15 min,收集上清液,备用。按照试剂盒操作说明分别测定肝匀浆中超氧化物歧化酶( $SOD$ )活性、谷胱甘肽( $GSH$ )含量和丙二醛( $MDA$ )含量。

#### 1.8 肝组织中 $NF-\kappa B$ / $C-Rel$ 、 $iNOS$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 和 $IL-8$ mRNA 的表达水平测定

鲤鱼处死后,剖取适量肝组织,参照RNAiso Reagent说明书提取总RNA。采用紫外分光光度计测定RNA的浓度及纯度,以 $OD_{260}/OD_{280}$ 值达到1.8~2.0作为合格标准。以Oligo(dT)<sub>18</sub>为引物进行RT反应,合成cDNA。实时荧光定量PCR反应按照TaKaRa公司生产的ExScript™ RT-PCR Kit(Perfect Real Time: SYBR Green I)说明书进行。基因特异引物及内参 $\beta$ -actin引物分别按照鲤 $NF-\kappa B$ / $C-Rel$ 、 $iNOS$ 、 $IL-1\beta$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-8$ 和 $\beta$ -actin基因序列采用Primer Primer 5.0软件设计(表1)。

表1 用于基因表达分析的引物

Table 1 Primer utilized for gene expression analysis

基因	引物序列(5'→3')
$NF-\kappa B/C-Rel$	F: AATGTGGTCCGTCTGTGCTT R: TGTTCATAGATGGGTTGGA
$iNOS$	F: CACTCGTGTTCGGGTGTCG R: TTGGTGTGTCAGTCTGCCTA
$IL-1\beta$	F: CAACATTCGTGTCGAG R: AAGTTTGTGGTTCGGG
$TNF-\alpha$	F: AACCAGGACCAGGCTTTCCT R: CATGTAGCGCCATAGGAATC
$IL-6$	F: CATATCGCAGCCATCTTG R: CACAGGTTGGTTGGAGGA
$IL-8$	F: GGGTGTAGATCCACGCTGTC R: AGGGTGCAGTAGGGTCCAGA
$\beta$ -actin	F: GTCAAGTCCGTTGAGATGCACC R: GGATGATGACCTGAGCATTGAAGC

## 1.9 数据分析

试验数据用平均值±标准差表示,数据分析采用 SPSS15 软件包中的单因素方差分析(one-way-ANOVA)。

## 2 结果

### 2.1 姜黄素、甘草次酸和香菇多糖对肝损伤建鲤生长指标的影响

60 d 的试验结果(表 2)显示:与对照相比,甘草

表 2 不同用药组建鲤相对增质量率、特定生长率和饵料系数的比较

Table 2 Comparison of relative weight rate, specific growth rate and feed conversion ratio between different drug groups in Jian carp

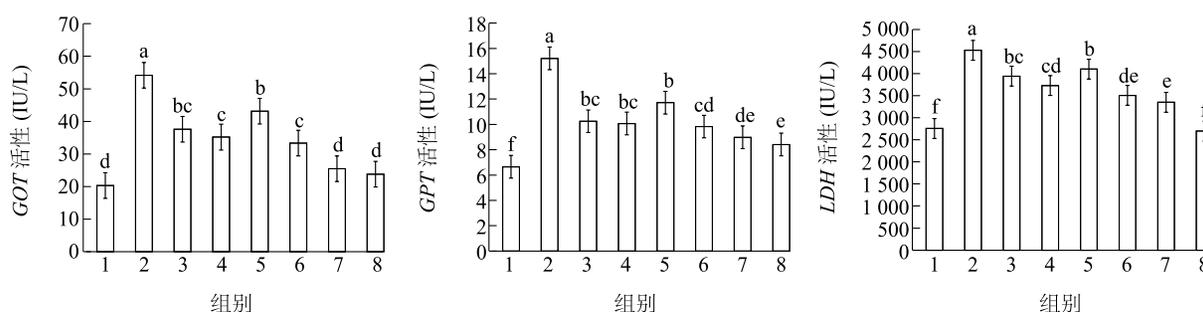
组别	初始体质量(g)	终体质量(g)	相对增质量率(%)	特定生长率(%/d)	饵料系数(%)
对照组	32.12±1.06	59.67±4.65a	85.7±8.12a	1.03±0.072a	2.19±0.120a
姜黄素组	31.96±3.01	63.35±2.16a	98.2±6.43ab	1.14±0.069ab	1.91±0.091ab
甘草次酸组	31.89±2.38	65.84±4.32ab	106.4±9.23bc	1.21±0.082bc	1.86±0.110bc
香菇多糖组	33.08±2.23	62.17±3.65a	87.9±9.33a	1.05±0.054ab	1.93±0.050ab
联合用药低剂量组	32.18±0.98	65.09±3.22ab	102.2±6.98ac	1.17±0.074bc	1.94±0.059ab
联合用药中剂量组	31.02±1.34	69.76±3.76b	124.2±6.15c	1.35±0.068c	1.82±0.089c
联合用药高剂量组	31.45±2.77	69.98±2.45b	122.2±7.67c	1.33±0.081c	1.82±0.077c

同一列中不同字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

### 2.2 姜黄素、甘草次酸和香菇多糖对肝损伤建鲤生化指标的影响

图 1 显示:30% CCl<sub>4</sub>-橄榄油腹腔注射建鲤后 72 h,血清中 GOT、GPT 和 LDH 活性均显著性高于空白对照组( $P<0.05$ );各个用药组与 CCl<sub>4</sub>对照组相比较,血清中

GOT、GPT 和 LDH 活性均显著下降( $P<0.05$ );与姜黄素、甘草次酸或香菇多糖单味用药组相比较,姜黄素+甘草次酸+香菇多糖联合用药对恢复血清中的 GOT、GPT 和 LDH 活性有显著作用( $P<0.05$ ),随着联合用药剂量的升高,协同作用愈加明显。



1:空白对照组;2:CCl<sub>4</sub>对照组;3:姜黄素组;4:甘草次酸组;5:香菇多糖组;6:联合用药低剂量组;7:联合用药中剂量组;8:联合用药高剂量组。不同字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )。

图 1 不同用药组建鲤血清中谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)和乳酸脱氢酶(LDH)水平的比较

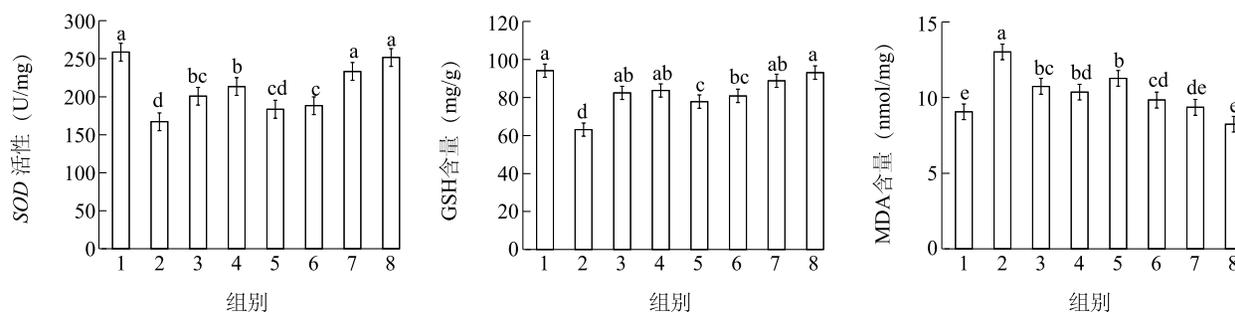
Fig.1 Comparison of glutamic oxalacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) and lactate dehydrogenase (LDH) levels between different drug groups in Jian carp serum

从图 2 可见,30% CCl<sub>4</sub>-橄榄油腹腔注射建鲤后 72 h,肝组织匀浆中 GSH 含量和 SOD 活性均显著低于空白对照( $P<0.05$ ),MDA 含量显著升高( $P<$

0.05);与 CCl<sub>4</sub>对照相比,姜黄素、甘草次酸、联合用药均能显著促进组织中 SOD 活性及 GSH 含量水平恢复( $P<0.05$ ),显著抑制 MDA 生成( $P<0.05$ ),其

中,香菇多糖组能显著提高 GSH 水平,抑制 MDA 生成 ( $P < 0.05$ ),但对 SOD 活性恢复没有明显作用 ( $P > 0.05$ );与姜黄素、甘草次酸或香菇多糖单味用药相比较,姜黄素+甘草次酸+香菇多糖联合用药对恢复

肝组织中 SOD 活性和 GSH 水平及降低 MDA 含量有显著作用 ( $P < 0.05$ ),随着联合用药剂量的升高,作用愈加显著。



1:空白对照组;2:CCl<sub>4</sub>对照组;3:姜黄素组;4:甘草次酸组;5:香菇多糖组;6:联合用药低剂量组;7:联合用药中剂量组;8:联合用药高剂量组。不同字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图2 不同用药组建鲤肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性以及谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量的比较

Fig.2 Comparison of superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels between different drug groups in Jian carp liver

### 2.3 姜黄素、甘草次酸和香菇多糖对建鲤肝组织中炎性细胞因子表达的影响

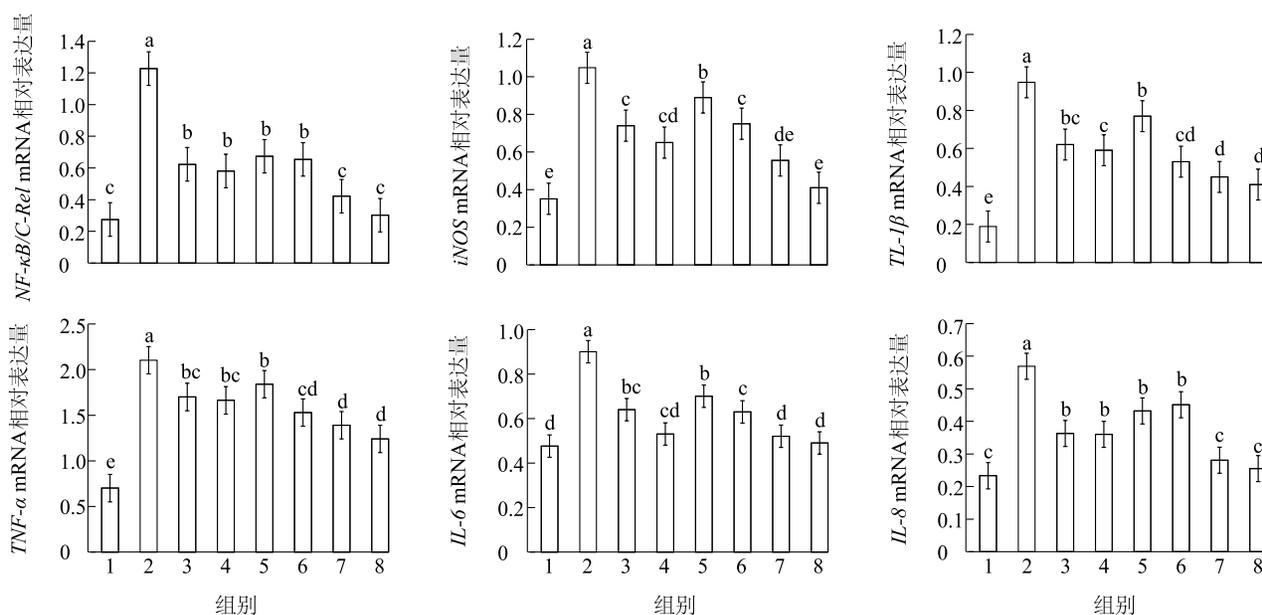
为了考察中药联合用药对建鲤肝组织中炎性细胞因子表达的影响,应用实时定量 PCR 方法测定了 *NF-κB/C-Rel*、*iNOS*、*IL-1β*、*TNF-α*、*IL-6* 和 *IL-8* mRNA 相对含量。结果(图3)显示,30% CCl<sub>4</sub>-橄榄油腹腔注射建鲤后 72 h,肝组织中炎性细胞因子的 mRNA 表达量与空白对照相比,均显著升高 ( $P < 0.05$ );与 CCl<sub>4</sub>对照组相比,姜黄素、甘草次酸、联合用药均能显著抑制 *NF-κB/C-Rel*、*iNOS*、*IL-1β*、*TNF-α*、*IL-6* 和 *IL-8* 表达量的升高 ( $P < 0.05$ );与姜黄素、甘草次酸或香菇多糖单味用药相比较,姜黄素+甘草次酸+香菇多糖联合用药对恢复肝组织中炎性细胞因子的 mRNA 水平有显著作用 ( $P < 0.05$ ),随着联合用药剂量的升高,作用愈加显著。

## 3 讨论

CCl<sub>4</sub>诱导建鲤肝组织损伤后,中间代谢产物过氧化三氯甲烷自由基(CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·)<sup>[13]</sup>通过攻击肝细胞膜上磷脂分子引起脂质过氧化,损伤肝细胞,导致肝组织中的生化指标发生变化。*GPT*、*GOT* 和 *LDH* 是主要功能酶,肝细胞受损或坏死时,这些酶会进入血液,使血清中酶水平显著提高<sup>[14]</sup>。同时脂质过氧化会导致 SOD 活性、GSH 含量下降,MDA 含量增

加<sup>[15-17]</sup>。本研究中采用 30% CCl<sub>4</sub>-橄榄油腹腔注射建鲤后,发现姜黄素、甘草次酸、香菇多糖单味用药及联合用药均可以降低 CCl<sub>4</sub>诱导的建鲤血清中酶活性和肝组织中 MDA 含量,恢复肝组织中 SOD 和 GSH 水平,说明姜黄素、甘草次酸和香菇多糖不管是单独使用还是联合用药均有保护肝组织的作用。研究结果还表明,姜黄素+甘草次酸+香菇多糖联合用药与 3 种中药单独使用相比较,降低肝损伤的作用更显著,且具有剂量依赖性,说明三者联合使用具有协同保护作用。

另一方面,CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·可激活核转录因子 *NF-κB*,导致炎细胞大量释放炎性介质(例如细胞因子 *IL-1β*、*TNF-α*、*IL-6* 及 *IL-8* 等),介质进一步活化中性粒细胞等炎细胞,通过级联反应而导致肝细胞变性死亡<sup>[18-19]</sup>。抑制有关细胞因子的表达,可以有效降低肝损伤<sup>[20-21]</sup>。本研究结果显示,30% CCl<sub>4</sub>-橄榄油腹腔注射建鲤后,肝组织中 *NF-κB/C-Rel*、*iNOS*、*IL-1β*、*TNF-α*、*IL-6* 和 *IL-8* mRNA 表达量显著增加,而姜黄素、甘草次酸和香菇多糖均能抑制相关因子的表达上调,而联合用药的效果更为显著,表明姜黄素、甘草次酸和香菇多糖能通过抑制 *NF-κB/C-Rel* 的活化以及下调炎症细胞因子的表达来降低 CCl<sub>4</sub>诱导的肝损伤,具有肝保护作用,3 种药联合使用对抑制细胞因子表达具有协同作用。



1:空白对照组;2:CCl<sub>4</sub>对照组;3:姜黄素组;4:甘草次酸组;5:香菇多糖组;6:联合用药低剂量组;7:联合用药中剂量组;8:联合用药高剂量组。不同字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ )。

图3 不同用药组建鲤肝组织中NF- $\kappa$ B/C-Rel、iNOS、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-8 mRNA表达量的比较

Fig.3 Comparison of NF- $\kappa$ B/C-Rel, iNOS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 mRNA levels between different drug groups in Jian carp liver

临床上,甘草被广泛应用于中药复方配伍里,甘草对增加溶解性,提高有效成分利用率,增强药效和降低毒性有显著作用<sup>[22-23]</sup>。甘草次酸作为甘草的主要有效成分之一,也表现出与甘草类似的调和性质。常明向等发现相较于姜黄素或甘草次酸单独用药,两者联合用药药效呈现相加或增强作用<sup>[24]</sup>。周京辉等也发现,甘草次酸能加强姜黄素对HepG-2、MCF-7、A549癌细胞增殖的抑制作用,而且两者在癌细胞的增殖抑制方面表现出协同作用<sup>[25]</sup>。这些发现与本研究结果具有一致性,姜黄素、甘草次酸和香菇多糖联合用药对CCl<sub>4</sub>诱导的建鲤肝损伤具有协同保护作用,这除了与它们自身的药性作用有关外,可能还与甘草次酸的调和特性及香菇多糖能提高机体免疫力的作用有关,这也表明姜黄素、甘草次酸和香菇多糖联合用药的合理性和科学性。

#### 参考文献:

- [1] 李立,国大亮,朱晓薇,等.姜黄素类物的提取、分离及精制[J].天津中医药,2010,27(6):509-511.
- [2] 刘强,张晓燕,鲁颖.姜黄素对人结肠癌细胞MMP-2、MMP-9表达的影响[J].国际医药卫生导报,2009,15(21):22-24.
- [3] AMMON H P, SAFAYHI H, MACK T, et al. Mechanism of anti-inflammatory actions of curcumin and boswellic acids[J]. Journal of ethnopharmacology, 1993,38:113-119.
- [4] AMMON H, ANAZODO M. Curcumin: A potent inhibitor of leukotriene B<sub>4</sub> formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL) [J]. Planta Medica,1992,58: 226.
- [5] CHINARA G. 香菇多糖的免疫药理作用[J].国外医药·植物药分册,1993,8(4):165-167.
- [6] MARUYAMA S, SUKEKAWA Y, KANEKO Y, et al. Anti tumor activities of lentinan and micellapast in tumor-bearing mice [J]. Gan To Kagaku Ryoho,2006,33(12):1726-1729.
- [7] 张福明,张淑芹,孙非,等.香菇多糖对单纯疱疹病毒的抑制作用[J].长春中医药大学学报,2006,22(4):11-12.
- [8] 张涛,柳朝阳,魏凤香,等.香菇多糖对小鼠免疫功能的影响[J].黑龙江医药科学,2003,26(6):108-109.
- [9] 赵勇华,于建武,高洁,等.复方甘草酸苷联合水飞蓟素治疗药物性肝病疗效观察[J].肝脏,2007,12(1):39-40.
- [10] 燕菲,张巧艳,张宏,等.五味子与黄芪多糖协同保护对乙酰氨基酚致小鼠急性肝损伤[J].药学实践杂志,2009,27(5):340-343.
- [11] 倪艳,苏强,刘霞.黄芪多糖水煎提取工艺的优化试验研究[J].中国中药杂志,1998,23(5):284-286.
- [12] DUBOTLS M, GILLES K A, HAMILTON J K. Colorimetric method for determination of sugars and related substance [J]. Anal Chem, 1956(28): 350-354.
- [13] RECKNAGEL R O, GLENDE J R E, DOLAK J, et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity [J]. Pharmacology & Therapeutics, 1989, 43 (1): 139-154.

- [14] BERRY M N, HALLS H J, GRIVELL M B. Techniques for pharmacological and toxicological studies with isolated hepatocyte suspensions [J]. *Life Sciences*, 1992,51:1-16.
- [15] 许治冲,刘 晖,徐奇友,等. 温度和饲料脂肪水平对松浦镜鲤免疫及抗氧化能力的影响[J]. *大连海洋大学学报*,2012,27(5):429-435.
- [16] 唐 玲,徐奇友,许 红,等. 饲料中添加女贞子对镜鲤生长性能、消化酶活性以及肌肉品质的影响[J]. *大连海洋大学学报*,2011,26(6):560-564.
- [17] OHTA Y,SASAKI E,NISHIDA K,et al. Contribution of the antilipid peroxidative action of Dai-saiko-to extract to its preventive effect on carbon tetrachloride -induced acute liver injury in rats [J]. *Phytotherapy Research*,1998,12:5-8.
- [18] MURIEL P. *NF- $\kappa$ B* in liver diseases; a target for drug therapy [J]. *J Appl Toxicol*, 2009,29:91-100.
- [19] REYES-GORDILLO K, SEGOVIA J, SHIBAYAMA M, et al. Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile duct obstruction or CCl<sub>4</sub> in rats: role of *TGF- $\beta$*  modulation and oxidative stress [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008,22:417-427.
- [20] ZHANG L J, YU J P, LI D, et al. Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2004,10:77-81.
- [21] 于岩岩,斯崇文,田秀兰,等. 多种细胞因子单独及协同作用对肝坏死影响的实验研究[J]. *中华医学杂志*,1996,76:258-261.
- [22] 吕邵娃,段继新,郭玉岩,等. 甘草的复方配伍作用机制的研究进展[J]. *中成药*,2015,37(9):2022-2025.
- [23] 欧小群,黄勤挽,黄 攀,等. 姜黄配伍甘草影响姜黄素类化合物提取效果的研究[J]. *中成药*,2014,36(10):2218-2220.
- [24] 常明向,吴梅梅,李瀚旻. 姜黄素与甘草次酸联用对肝癌 HepG-2 细胞增殖的抑制作用[J]. *药物评价研究*,2017,40(1):42-46.
- [25] 周京辉,魏晓翠,曾志涛. 姜黄素与甘草次酸联合用药的体外抗肿瘤作用[J]. *北方药学*,2011,8(4):7-8.

(责任编辑:张震林)