

竹荪多糖对砷中毒大鼠肝功能及肝纤维化的影响*

胡 婷, 罗 鹏**

(贵州医科大学 公共卫生学院 环境污染与疾病监控省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550000)

[摘要] 目的: 探讨竹荪多糖对砷中毒大鼠肝损伤的影响。方法: 将24只清洁级健康SD大鼠均分为对照组、模型组、竹荪干预组3组, 每组雌雄各半; 对照组以常规饲料饲养, 竹荪干预组和模型组喂饲砷含量50 mg/kg的饲料, 竹荪干预组每日以10 g/L的竹荪多糖20 mL/kg灌胃, 各组大鼠喂养3个月时取血检测血清谷草转氨酶(AST)及谷丙转氨酶(ALT)活力、总蛋白(TP)及白蛋白(ALB)水平、白蛋白与球蛋白比值(A/G)、粘连蛋白(LN)、透明质酸酶(HA)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)以及Ⅳ型胶原(PCⅣ)的水平; 取大鼠同一肝小叶行HE及Masson染色, 观察肝组织病理学改变, 并计算肝纤维化增生面积。结果: 与对照组相比, 竹荪干预组和模型组大鼠血清内AST的活力均升高, ALB水平降低, LN、HA、PCⅣ水平增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组相比, 竹荪干预组大鼠血清内AST和ALT的活力均降低, TP、A/G、ALB水平升高, LN、PCⅣ水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); HE和Masson染色结果显示, 竹荪干预组和模型组均出现不同程度的肝损伤; 通过图像分析系统测量, 对照组、竹荪干预组、模型组大鼠肝脏增生纤维面积呈增加趋势, 竹荪干预组和模型组与对照组相比胶原纤维沉积面积差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 竹荪多糖对砷中毒大鼠肝脏有一定的保护作用。

[关键词] 竹荪多糖; 亚砷酸钠; 肝损伤; 模型, 动物; 大鼠, Sprague-Dawley; 纤维化

[中图分类号] R151; R595.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)11-1258-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.11.005

Effect of Dictyophora Polysaccharide on Liver Function and Fibrosis in Arsenic Poisoning Rats

HU Ting, LUO Peng

(The Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education Department of Toxicology, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of dictyophora polysaccharide on liver injury in arsenic poisoning rats. **Methods:** A total of 24 healthy adult clean SD rats were randomly divided into control group (normal feed), dictyophora polysaccharide group and exposed group (arsenic content in feed was 50 mg/kg). Dictyophora polysaccharide group received intragastric administration with dictyophora polysaccharide (10 mg/mL) at 20 mL/kg every day. 3 months after feeding, the rats were executed and the blood was collected to detect serum activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total protein (TP) and albumin (ALB), albumin to globulin ratio (A/G), liver fibrosis 4 items laminin (LN), hyaluronidase (HA), type III procollagen (PCIII), type IV procollagen (PCIV). HE and Masson staining were performed in the same liver of rats, the pathological changes of liver tissue were observed, and the area of hepatic fibrosis was calculated. **Results:** Compared with the control group, in dictyophora intervention group and model group rats' serum AST activity were increased, ALB decreased; LN, HA, and PCIV levels increased. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with model group, AST and ALT activity in rats' serum of dic-

* [基金项目] 国家自然科学基金(81160336); 贵州省科技厅农业攻关计划项目[黔科合 NY 字(2011)3055 号]; 贵州省教育厅基金项目[黔省专合字(2010)39 号]; 贵州省科技厅[黔科合 J 字(2010)2188]

** 通信作者 E-mail: 519484547@qq.com

网络出版时间: 2016-11-15 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20161115.1757.009.html>

tyophora polysaccharide intervention group decreased while TP, A/G, ALB, LN, PCIV level decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). HE and Masson staining showed that in dictyophora polysaccharide intervention group and model group the liver damage occurred in different degree. Through the image analysis and systematic measure, control group, in dictyophora polysaccharide intervention group and model group the rats' liver fiber hyperplasia area showed an increasing trend, and there was statistically significant difference in collagen deposition area between dictyophora polysaccharide intervention group, model group and control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Dictyophora polysaccharide may has a protective effect on the liver of rats with arsenic poisoning.

[**Key words**] dictyophora polysaccharide; sodium arsenite; liver injury; model, animal; rats Sprague-Dawley; fibrosis

砷是广泛存在于自然界中的一种元素,存在于大气、土壤、水等环境中,并可以在这些环境中迁移和富集,还可能产生不同程度的环境毒害效应^[1-2]。贵州省燃煤污染型砷中毒病区主要分布于4县9乡镇32个行政村,在黔西南州的兴义市、兴仁县和安龙县及毕节地区的织金县较为严重,暴露人口约4万人,8700余户,现症病人2848人。据病区统计因皮肤癌、肺癌、乳腺癌、肝癌及肝硬化腹水死亡的砷中毒人数已达200余人,其中因砷引起的肝纤维化、肝硬化、肝癌的患者逐年增多^[3]。竹荪(*Dictyophora indusiata*)属鬼笔目(Phallales)、鬼笔科(Phallaceae)、竹荪属(*Dictyophora*),是名贵的大型食用菌之一,素有“菌中皇后”和“真菌之花”等美誉^[4]。全世界已报道的竹荪有12种,我国有7种,而贵州就有5种,是贵州地产特色药食两用的真菌,具有补气养阴、润肺止咳、清热利湿之功效。研究发现,竹荪含有多种氨基酸、维生素、多糖和多种无机盐^[5-6]。中干竹荪不仅对高血压、高血脂、神经衰弱、肠胃疾病等具有保健作用,还具有特异的防腐功能,据测定其含蛋白质19.4%、脂肪2.6%、碳水化合物总量60.4%,其中菌糖4.2%、粗纤维8.4%,灰分9.3%^[7]。研究发现在肝损害等方面多糖也具有较好的干预作用,其中竹荪多糖提取工艺相对简便,毒副作用小。本实验通过亚砷酸钠染毒大鼠,以竹荪多糖进行干预,观察竹荪多糖对砷中毒大鼠的肝功能的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

全自动生化分析仪(AU400, OLYMPUS有限公司,日本), Milli-Q超纯水器(Millipore公司,美国), μ Quant Max200超级酶标仪(Bio-Tek公司,

美国), Z36HK高速冷冻离心机(Hermle公司,德国), ZT-12P2组织脱水机(上海华岩仪器设备有限公司,中国), LEICA RM2135旋转式超薄切片机(徠卡公司,德国), (HI1220徠卡烘片机(徠卡公司,德国), YT-6C生物组织摊烤片机(孝感市亚光医用电子技术有限公司,中国)。亚砷酸钠(优级纯,美国Sigma公司), 竹荪多糖(课题组提取), 含亚砷酸钠饲料由第三军医大学动物实验中心制备。

1.2 实验动物分组及染毒方法

普通级SD大鼠24只,体质量160~200g,雌雄各半。动物室温度控制在15~20℃,照明时间为每日12h,相对湿度为50%~60%,购自中国人民解放军第三军医大学,合格证号[SCXK(军)2012-0011]。将大鼠随机分为对照组、竹荪干预组、模型组,每组8只,雌雄各半。对照组给予普通饲料喂饲,竹荪干预组按文献[8]给予喂饲砷含量50mg/kg的饲料、同时每日以10g/L的竹荪多糖20mL/kg灌胃,模型组喂饲砷含量50mg/kg的饲料。饲喂3个月。

1.3 指标检测与数据收集

饲喂3个月时,1%戊巴比妥钠按照10mg/kg麻醉,麻醉后心脏取血,收集非抗凝血4mL,分离血清后,分为两份,一部分即日采用全自动生化分析仪检测大鼠谷草转氨酶(AST)及谷丙转氨酶(ALT)活力、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)水平及白蛋白球蛋白比值(A/G),另一部分按ELISA试剂盒操作说明检测各组大鼠血清透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、三型前胶原(PCⅢ)和IV型前胶原(PCIV)水平。大体解剖时,肉眼观察肝脏(颜色、大小、外型、硬度等)是否有改变;取大鼠同一小叶的肝脏组织,10%甲醛浸泡24h,常规脱水后石蜡包埋、切片,HE染色和Masson染色,二甲苯中

透明 5 min,中性树脂封片,在光学显微镜下,通过 SONY 摄像头采集肝组织 Masson 染色图像,每例切片随机选取 5 个不同汇管区视野,将数据输入图像分析系统进行单位视野增生纤维组织面积测量,记录数据。

1.4 统计学分析

Excel 2013 录入数据,用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析,进一步多重比较采用 *Dunnnett-t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 肝功能及肝纤维化

与对照组相比,模型组血清内 AST 和 ALT 活力均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,竹荪干预组大鼠血清内 AST 和 ALT 的活力均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比,模型组和竹荪干预组 TP、A/G、ALB 水平降低,其中模型组 TP、A/G 和竹荪干预组及模型组 ALB 与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,竹荪干预组大鼠血清内 TP、ALB、A/G 的水平均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比,竹荪干预组和模型组大鼠血清肝纤维化 LN、HA、PCIII、PCIV 水平增高,其中模型组 LN、HA、PCIV 水平差异具有统计学意义($P < 0.05$),竹荪干预组大鼠的血清中 LN 和 PCIV 水平低于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);见表 1。

表 1 各组大鼠血清 AST 及 ALT 活力、A/G 比值、TP、ALB、LN、HA、PCIII 及 PCIV 水平($n = 8, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Serum activities of AST and ALT and the level of TP,ALB,A/G,LN,HA,PCIII,PCIV in each group

指标	对照组	模型组	竹荪干预组
AST(U/L)	108.95 ± 3.52	155.47 ± 27.93 ⁽¹⁾	126.48 ± 7.15 ⁽¹⁾⁽²⁾
ALT(U/L)	28.77 ± 1.83	35.87 ± 2.49 ⁽¹⁾	30.96 ± 2.26 ⁽²⁾
TP(g/L)	71.40 ± 3.30	63.54 ± 4.51 ⁽¹⁾	66.9 ± 2.55 ⁽²⁾
ALB(g/L)	38.45 ± 2.19	34.79 ± 1.99 ⁽¹⁾	36.13 ± 1.70 ⁽¹⁾⁽²⁾
A/G	1.06 ± 0.10	0.85 ± 0.06 ⁽¹⁾	0.98 ± 0.05 ⁽²⁾
LN(μg/L)	261.59 ± 13.67	310 ± 18.93 ⁽¹⁾	293.64 ± 13.49 ⁽²⁾
HA(μg/L)	38.13 ± 2.13	52.39 ± 1.16 ⁽¹⁾	49.27 ± 0.95
PCIII(μg/L)	9.63 ± 0.70	11 ± 0.73	10.47 ± 0.91
PCIV(μg/L)	16.64 ± 1.00	18.18 ± 1.74 ⁽¹⁾	16.66 ± 1.24 ⁽²⁾

⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与模型组比较, $P < 0.05$

2.2 肝脏病理学观察

2.2.1 HE 染色 对照组肝组织结构正常,肝小叶结构清楚,肝细胞呈多边形大小形态一致,以中央静脉为中心呈索状放射状分布,汇管区结构清楚,肝内胆管、血管数量及排列正常,未见病理性改变(图 1A);竹荪干预组肝细胞体积增大,胞浆浅染、疏松呈细颗粒状;肝细胞索排列稍有紊乱,肝细胞出现不同程度的水肿及空泡变性,少量肝纤维组织增生(图 1B);模型组肝细胞水变性,进一步扩大,胞浆浅染呈透亮状。大鼠肝细胞索排列稍有紊乱,肝细胞出现不同程度的水肿及空泡变性,间质内均可见炎性细胞浸润,肝细胞液化坏死,肝纤维组织增生(图 1C)。

2.2.2 Masson 染色 对照组大鼠肝小叶结构完整清晰,仅于血管周围可见少量蓝色纤维形成,大鼠肝组织中肝小叶,肝细胞索由中央静脉向四周整齐排列(图 1D);竹荪干预组大鼠肝小叶周边及门管区有少量蓝染的胶原纤维,肝小叶周边胶原纤维轻度增生(图 1E);模型组大鼠肝小叶结构异常,细胞索排列紊乱,肝小叶周边胶原纤维中度增生间质内均可见较明显的炎性细胞浸润(图 1F)。

2.3 肝纤维增生面积

图像分析系统测量结果显示,对照组、竹荪干预组、模型组大鼠肝脏增生纤维面积呈增加趋势,竹荪干预组和模型组与对照组相比胶原纤维沉积面积差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠肝脏纤维组织增生面积($n = 8, \bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)

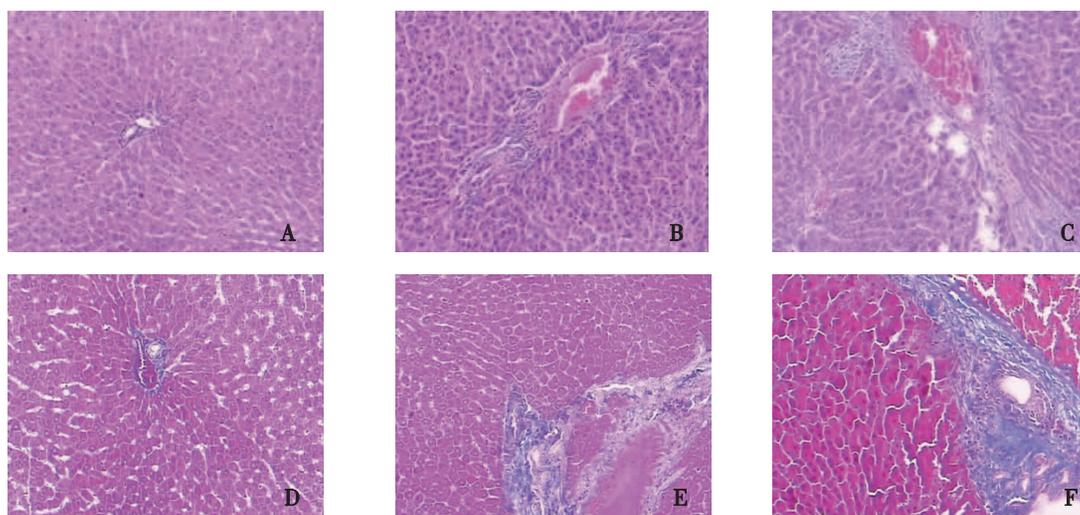
Tab.2 Measurement of liver tissue area of rat liver in each group

组别	n	增生纤维组织面积
对照组	8	0.08 ± 0.02
模型组	8	0.88 ± 0.24 ⁽¹⁾
竹荪干预组	8	0.42 ± 0.13 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾与模型组比较, $P < 0.05$

3 讨论

近年来通过流行病学调查和动物实验已证实砷对肝脏的损伤作用,且砷会蓄积于肝脏、血液、毛发、皮肤等^[9]。临床上主要使用二巯基丙磺酸钠等药物做驱砷治疗和进行对症治疗^[10],对已造成的损伤没有特效手段,如果能找到一种降低砷中毒



注: A、B、C 为 HE 染色, D、E、F 分 Masson 染色, 分别为对照组、竹荪干预组、模型组

图 1 各组大鼠肝脏组织学图片(×100)

Fig. 1 Masson staining of liver in rats

损害的物质将会大大减轻砷的危害。竹荪多糖是从竹荪中提取的高活性大分子物质,具有具有抗衰老、抗疲劳、耐缺氧、抑菌等作用,有良好的药用价值和经济前景^[11-13]。本研究将大鼠分为以普通饲料喂饲的对照组,含砷饲料喂饲的竹荪干预组和模型组,其中竹荪干预组每日灌胃竹荪多糖液,3 个月后常规处死,检测大鼠血清中 AST、ALT、TP、ALB、LN、HA、PCⅢ以及 PCIV 的活力或水平,取同一肝小叶做病理切片后行 HE 染色和 Masson 染色,通过图像分析系统测量大鼠肝脏增生纤维面积,以了解竹荪多糖对砷中毒大鼠体内肝损伤的影响。

检测大鼠血清生化指标显示,与对照组相比,模型组和竹荪干预组血清内 AST 和 ALT 活力均升高,其中 AST 的活力,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。AST、ALT 存在于肝脏细胞内,当肝细胞受损时,胞膜被破坏,AST、ALT 可从细胞内释放入血,引起血清 AST、ALT 活性升高,故 AST、ALT 被认为是检测肝细胞损伤的“金标准”,通过血清肝功能检测其在血液中的活性及水平可以间接评估肝细胞的受损程度^[14]。而肝脏作为机体蛋白合成的主要场所,分泌球蛋白外几乎所有蛋白质,其中 ALB 由肝实质细胞合的,其合成与分泌速度最快,其作用包括:维持胶体渗透压,物质的结合和转运,协调血管内皮的完整性,保护血细胞参与凝血功能和抗氧化、损伤修复等^[15]。当肝细胞损伤引起肝脏功能障碍时,蛋白合成不足,血清蛋白质浓度发

生改变,可使血浆中 GLB 失去胶体保护作用,稳定性下降。血浆球蛋白的稳定性下降,将严重影响机体的代谢、利用,引起相应的症状(营养不良、消瘦、黄疸等),其程度取决于肝脏的损伤类型、严重程度与持续时间。本研究中 AST 和 ALT 活性升高,TP、A/G、ALB 水平降低提示,砷导致了大鼠肝脏实质细胞的损伤和肝脏蛋白合成的功能障碍,而竹荪多糖干预可以减轻砷致肝损伤。

慢性肝脏疾病的基本病变有感染、病毒引起的炎症和纤维化,肝纤维化是位于慢性肝脏疾病发展过程中的一处特异、关键阶段。肝血清纤维化 4 项 LN、HA、PCⅢ、PCIV 做为早期肝纤维化敏感指标,其中 HA 为基质成分之一,由间质细胞合成,可较准确灵敏地反映肝内已生成的纤维量及肝细胞受损状况,是肝纤维化和肝硬变的敏感指标。本实验中,与对照组相比,竹荪干预组和模型组大鼠血清肝纤维化 LN、HA、PCⅢ、PCIV 的浓度增高,其中模型组 LN、HA、PCIV 的浓度差异具有统计学意义($P < 0.05$),而竹荪干预组大鼠的血清中 LN 和 PCIV 水平低于模型组($P < 0.05$),提示竹荪多糖能在早期对肝损伤起到拮抗的作用。

HE 染色结果示,与对照组相比,竹荪干预组肝细胞体积增大,胞浆浅染、疏松呈细颗粒状。肝细胞索排列稍有紊乱,肝细胞出现不同程度的水肿及空泡变性,有点灶坏死,少量肝纤维组织增生,模型组肝细胞水变性,进一步扩大,胞浆浅染呈透亮状。大鼠肝细胞索排列稍有紊乱,肝细胞出现不同

程度的水肿及空泡变性,间质内均可见炎性细胞浸润,肝细胞液化坏死,肝纤维组织增生。Masson 染色结果示,与对照组相比,竹荪干预组大鼠肝小叶周边及门管区有少量蓝染的胶原纤维,肝小叶周边胶原纤维轻度增生,模型组大鼠肝小叶结构异常,细胞索排列紊乱,肝小叶周边胶原纤维中度增生间质内均可见较明显的炎性细胞浸润。综合大鼠肝脏 HE、Masson 染色和肝脏增生纤维化面积的结果来看,竹荪干预组和模型组出现了不同程度的肝损伤,竹荪干预组肝损伤程度与模型组相比较轻,与对照组相比较重。而对照组、竹荪干预组、模型组大鼠肝脏增生纤维面积呈增加趋势,竹荪干预组和模型组与对照组相比胶原纤维沉积面积差异均有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果提示竹荪多糖可以减轻砷致大鼠的肝损伤。

综上所述,竹荪干预组大鼠血清内 AST 和 ALT 活性,肝纤维化 LN、HA、PC III、PCIV 的浓度,较对照组升高,较模型组降低,血清蛋白 TP、A/G、ALB 水平较对照组降低,HE、Masson 染色中,竹荪干预组肝损伤程度与模型组相比较轻,与对照组相比较重,肝脏增生纤维面积较对照组增多,较模型组减少,均说明竹荪多糖对砷中毒大鼠肝脏有一定的保护作用。

4 参考文献

- [1] Chao D, Fu H, Xu J, et al. Physicochemical and biological properties of phosphorylated polysaccharides from *Dictyophora indusiata* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014(72):894-899.
- [2] Dong Z, Liu C, Liu Y, et al. Using publicly available data, a physiologically - based pharmacokinetic model and Bayesian simulation to improve arsenic non - cancer dose

- response [J]. *Environment International*, 2016(92):239-246.

- [3] 韩俊洋,吴顺华. 地方性砷中毒致肝损伤机制研究进展 [J]. *中国公共卫生*, 2014(3):374-376.
- [4] 吴雪艳,罗鹏,叶建方,等. 响应面法优化竹荪菌托多糖的提取工艺 [J]. *南方农业学报*, 2015(3):480-485.
- [5] 郑杨,邹青青,张岱,等. 竹荪的化学成分及生理活性研究进展. *食品科学技术学报*, 2013(31):39-45.
- [6] 段小明,刘升,贾丽娥,等. 竹荪属食用菌国内研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2015(11):4433-4440.
- [7] 周素娟,张晓娜. 食用菌保健功能及保健食品应用与开发 [J]. *中国食用菌*, 2015(1):4-6.
- [8] 姚茂琳,张爱华,于春,等. 高砷煤烘玉米粉致大鼠砷中毒模型的建立 [J]. *中华预防医学杂志*, 2013(9):799-805.
- [9] 王丹丹. 多糖药理作用的研究进展 [J]. *黑龙江科技信息*, 2015(8):32.
- [10] 张海涛,倪娜. 砷中毒治疗的研究现状 [J]. *中国地方病学杂志*, 2011(1):113-114.
- [11] 叶敏,文竹,潘文芳,等. 红托竹荪多糖抗衰老和降血糖作用研究 [J]. *食品工业科技*, 2016(7):343-345.
- [12] 叶敏,文竹,黄家振,等. 红托竹荪多糖抗疲劳和耐缺氧作用研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2016(3):416-419.
- [13] 王宪伟. 竹荪多糖的抑菌活性研究 [J]. *安徽农业科学*, 2013(4):1415.
- [14] Jomova K, Jenisova Z, Feszterovaet M, et al. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease [J]. *Journal Of Applied Toxicology*, 2011(2):95-107.
- [15] 邓青芳,周欣,陈华国. 多糖抗肝损伤作用及其机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2016(16):2958-2967.
- (2016-08-11 收稿,2016-10-29 修回)
中文编辑: 潘 娅; 英文编辑: 刘 华