灵芝肽对小鼠半乳糖胺致肝损伤的保护作用

石燕玲，何 慧*，梁润生，张 胜，郭 辉，黄迪惠
(华中农业大学食品科技学院,湖北 武汉 430070)

摘 要：目的：研究灵芝肽(GLP)对D-半乳糖胺(D-Gal)诱导的小鼠化学性肝损伤的保护作用。方法：将小鼠随机分成正常组、模型组、GLP低、中、高剂量组，每天灌胃一次，GLP组分别灌胃GLP 60、120、180mg/kg bw，正常组、模型组灌胃等量生理盐水，2周后模型组和GLP组腹腔内注射D-Gal (750mg/kg bw)，诱导小鼠肝损伤。通过试剂盒的方法分别检测各组小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活力，肝组织中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活力；并进行肝组织病理学镜检。结果：与模型组比，以180mg/kg bw给予GLP，可显著降低小鼠血清ALT、AST的活性和肝组织中MDA含量，提高肝组织中SOD的活力与GSH的含量($p < 0.05 \sim 0.01$)，肝组织病理学镜检结果显示已接近正常组。结论：GLP对D-Gal诱导的小鼠肝损伤有很好的保护作用。

关键词：灵芝肽；D-氨基半乳糖；肝损伤；保肝

Hepatoprotective Effects of *Ganoderma lucidum* Peptides Against D-galactosamine-induced Liver Injury in Mice

SHI Yan-ling, HE Hui*, LIANG Run-sheng, ZHANG Sheng, GUO Hui, HUANG Di-hui
(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective: To research the hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* peptides (GLP) against D-galactosamine (D-Gal) induced liver damage in mice. Method: Mice were randomly divided into five groups, namely normal, model and three GLP-treated groups. GLP-treated groups were daily given (ig) the doses at 60, 120 and 180 mg GLP /kg bw respectively. Normal and model groups simultaneously received the same amount of physiological saline for 2 weeks. Then the mice from model group and GLP-treated groups were treated with 750 mg/kg bw D-Gal (ip). Aspartate transaminase/alanine transaminase (AST/ALT) activities in serum, malondialdehyde/glutathione (MDA/GSH) levels and superoxidedismutase (SOD) activity in liver were measured by the detection kits according to the manufacturer's protocols. The liver histopathological characters were observed under light microscopy. Results: At the dose of 180mg/kg bw GLP, the ALT/AST activities in serum and MDA lever in liver were significantly reduced, SOD activity and GSH content in liver were significantly increased ($p<0.05 \sim 0.01$) when compared to model group. The liver histopathological characters were close to normal groups'. Conclusion: GLP possesses potent hepatoprotective effects against D-Gal-induced liver damage in mice.

Key words: *Ganoderma lucidum* peptides (GLP); liver damage; D-Galactosamine (D-Gal); hepatoprotective effect
中图分类号：Q939.16 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)05-0416-04

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是具有极高的药用价值及多种生理活性的药用菌和食用菌，已被广泛地用作治疗各种病因引起的肝炎[1]。灵芝中多糖和三萜类化合物被认为是对化学毒物所致肝损伤有保护作用的活性成分。灵芝多糖能抗酒精性肝损伤[2]和病毒性肝炎[1]；而灵芝三萜类化合物对CCl_4，D-半乳糖胺(D-Gal)及卡介苗加脂多糖肝损伤模型鼠显示出了有效的保护作用[3]。多糖是大分子化合物，三萜类是脂溶性化合物；而有关灵芝中水溶性肽类具有保肝作用的研究则鲜见文献报道。本研究利用D-Gal致小鼠肝损伤模型，通过测定血清转氨酶和肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)的活性及谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量等生化指标，结合小鼠肝组织病理学观察，探讨了灵芝肽(GLP)对肝损伤的保护作用。

收稿日期：2007-04-24
基金项目：国家自然科学基金项目(30570190)；国家科技支撑计划项目(2006BAD27B09-4)
作者简介：石燕玲(1982-)，女，硕士研究生，研究方向为天然产物化学。E-mail：foodgoods@sina.com
*通讯作者：何慧(1960-)，女，教授，研究方向为食品化学和天然产物化学。E-mail：hehui@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与设备

灵芝粉 枣庄健保生物有限公司。

昆明种小鼠，体重20±2g，雌性，购自湖北省疾病预防控制中心实验动物中心。

D-半乳糖胺盐酸盐 启东久丰工贸有限公司；谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、MDA、GSH、SOD、考马斯亮蓝测定蛋白质试剂盒 南京建成生物工程研究所；SephadexG-25 美国Sigma公司。

UV-102-02FW紫外可见分光光度计 日本岛津公司；2032自动柱层析仪 瑞典LKB公司；超滤装置 瑞士Millipore公司；中空纤维膜组件 武汉世方水处理科技有限公司；XK/11216半自动生化分析仪 四川旭康医疗电器有限公司；HPIAS系列高清晰度彩色病理图文分析系统 华海医疗信息技术股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 灵芝肽(*Ganoderma lucidum* peptides，GLP)的制备[4-5]

灵芝粉用蒸馏水以料液比为1:2.5于室温下浸提3次后，采用中空纤维膜(截留分子量＞6000～10000D)对灵芝水提液进行超滤分离，膜透过物经活性炭脱色后，采用Cu^{2+}-SephadexG-25配位色谱法(一种分离肽和氨基酸的方法)[5]，用50mmol/L pH11.0的硼砂缓冲液洗脱，收集肽级份，经螯合树脂柱脱铜、大孔树脂脱盐[6]、冷冻干燥制得灵芝肽粗品，用氨基酸自动分析仪测定水解前后的氨基酸含量，两者之差即为粗品中肽的含量，为91.0%。

1.2.2 小鼠D-半乳糖胺肝损伤模型的建立[3,7]

将小鼠随机分为正常组、D-Gal肝损伤模型组、GLP低、中、高剂量组，每组10只。GLP低、中、高剂量组分别每天灌胃GLP 60、120、180mg/kg bw，连续给GLP 2周；正常组、模型组灌胃等量生理盐水。末次给药后禁食不禁水，8h后模型组和GLP组小鼠均按750mg/kg bw腹腔内注射D-Gal，诱导肝损伤；正常组腹腔内注射等体积生理盐水。

1.2.3 生化指标检测

D-Gal肝损伤小鼠于腹腔内注射半乳糖胺16h后，眼眶取血，分离血清备测；立即摘取肝脏，右叶组织用4 ℃的生理盐水漂洗，除去血液与结缔组织、滤纸拭干，以1:9(W/V)的生理盐水制成肝匀浆。按试剂盒说明书方法分别测定血清中ALT、AST，肝组织中MDA、GSH、蛋白质含量，SOD酶活力。

1.2.4 组织病理学检查

摘取肝脏后，肝脏左叶组织用10%中性福尔马林固定，制作病理切片，HE染色，于光镜下观察肝组织切片的组织病理学变化。

1.2.5 统计学分析

采用SAS V8统计软件，所有的数据都以$\bar{X} \pm SD$表示，组间t检验对实验结果进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 GLP对D-Gal致肝损伤小鼠血清中ALT、AST活性的影响

表1 灵芝肽对D-GalN致肝损伤小鼠血清中ALT、AST活性的影响(n=10)

Table 1 Effects of GLP on ALT and AST activity in Gal-injured mice serum (n=10)

组别	剂量(mg/kg)	AST(U/L)	ALT(U/L)
正常组	—	45±10^{c}	16±5^{c}
模型组	—	201±93	249±161
GLP	60	137±44	187±109
	120	119±50^{b}	113±49^{a}
	180	47±13^{c}	41±21^{c}

注：与D-Gal模型组比较，$^{a}p<0.05$，$^{b}p<0.01$，$^{c}p<0.001$。

表1结果显示，模型组血清中ALT、AST活性极显著高于正常组($p<0.001$)，说明造模很成功。与模型组相比，高剂量GLP组血清ALT、AST活性的下降达极显著水平($p<0.001$)；且随着GLP剂量升高呈现出一定的量-效关系。

2.2 GLP对D-Gal致肝损伤小鼠肝匀浆中SOD活性和MDA、GSH含量的影响

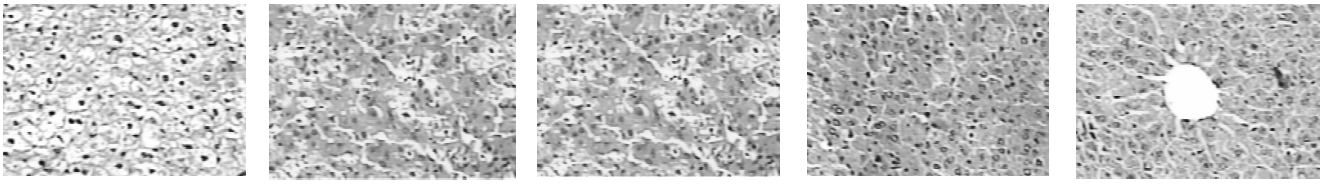
表2 GLP对D-Gal致肝损伤小鼠肝匀浆中SOD活性和MDA、GSH含量的影响(n=10)

Table 2 Effects of GLP on SOD activity, GSH and MDA content in Gal-injured mice liver (n=10)

组别	剂量(mg/kg)	SOD(U/mg蛋白)	GSH(mg/g蛋白)	MDA(nmol/mg蛋白)
正常组	—	131±12^{b}	451±113^{b}	21±3^{b}
模型组	—	114±7	276±88	41±12
GLP	60	119±14	383±22	27±10^{a}
	120	126±4	419±99^{a}	23±13^{b}
	180	129±5^{a}	433±63^{b}	20±11^{b}

注：与D-Gal模型组比较，$^{a}p<0.05$，$^{b}p<0.01$。

由表2可知，模型组a肝组织中SOD活性及MDA、GSH含量与正常组有极显著的差异($p<0.01$)，进一步说明造模是成功的。与模型组比较，高剂量GLP组中SOD活性显著提高($p<0.05$)；中、高剂量GLP组中GSH含量明显升高($p<0.05$～$p<0.01$)；各剂量GLP对D-Gal致肝损伤小鼠肝匀浆中MDA含量的升高具有明显的拮



A B C D E

A：正常组；B：模型组；C:GLP(60mg/kg bw)；D:GLP(120mg/kg bw)；E:GLP(180mg/kg bw)。

图1 GLP对D-GalN致肝损伤小鼠肝组织形态学变化的影响

Fig.1 Effect of GLP on liver histopathological changes in Gal-injured mice(HE × 100)

抗作用($p < 0.05 \sim p < 0.01$)；随着GLP剂量的提高，对肝损伤的保护作用呈现逐步增强的趋势。

2.3 肝脏组织病理学检查

剖检时，观察肝脏外观，发现D-Gal模型组肝脏异常肿大。镜检小鼠肝组织切片时，观察到正常组的肝小叶分界清楚，肝细胞索呈放射状，肝窦、中央静脉清晰，肝细胞核清楚，胞浆均匀(图1A)；模型组的肝小叶界线不清，肝细胞索排列紊乱，肝窦变窄至消失，肝细胞肿大呈气球样，脂肪变性，胞浆不匀，存在较大的坏死灶，肝组织不同程度坏死(图1B)，组织形态学变化也说明造模是很成功的；低剂量GLP组散在大小不一的坏死灶，但肝小叶结构基本一致，肝细胞肿胀、变性的程度较模型组有所减轻(图1C)；中剂量GLP组明显好于低剂量组，肝小叶结构基本一致，肝细胞索比较清晰，肝细胞清楚，但仍存在细胞肿胀，少量的肝细胞坏死，炎性细胞浸润(图1D)；高剂量GLP组肝小叶基本完整，肝细胞索排列整齐，肝窦清晰，肝细胞稍有肿胀，但变性坏死少见，趋近正常组(图1E)。肝组织病理学的变化说明，GLP对D-Gal肝损伤小鼠肝细胞有显著的保护作用，而且存在一定的剂量-效应关系。

3 讨 论

病毒性肝炎具有传染性，易发展成肝硬化和肝癌，危害极大，是所有肝炎中发病率最高的一种，已成为当今社会的公害。Keppler报道了D-Gal肝损伤模型中肝组织病理学改变和生化指标的变化均与人类病毒性肝炎极为相似[8]，且D-Gal肝毒性的专一性较其它肝毒物为佳，对实验人员也较安全，是目前公认的比较好的研究病毒性肝炎的发病机制及有效治疗药物的实验动物模型[9]。D-Gal损伤肝细胞的机制是其在肝细胞内代谢时与尿苷酸结合致使尿苷酸耗竭，导致核酸、糖蛋白和糖脂等物质合成受阻，引起肝细胞损伤，甚至凋亡；Mg^{2+}/Ca^{2+}的比例失调、机体对内毒素吸收增加、自由基的产生和脂质过氧化反应等也是D-Gal致肝损伤的重要因素[9]。

与正常组比较，D-Gal模型组的生化指标及组织病理学形态的改变，均说明造模成功。ALT、AST是存在于肝细胞浆内的可溶性酶，肝细胞损伤后，细胞膜的通透性增加，导致ALT、AST释放入血，故血清ALT、AST水平高低可以反映肝细胞损伤程度[10]。与模型组比较，GLP各剂量组不同程度地抑制了D-Gal致肝损伤导致的血清AST、ALT活性的升高，应与GLP的抗磷脂氧化保护生物膜[11]的作用有关。脂质过氧化物及其代谢物MDA可以破坏细胞膜结构，导致细胞肿胀坏死，MDA含量可反映过氧化损伤程度和细胞受损程度[12]；SOD是动物机体内的抗氧化酶，能清除自由基，防止自由基对细胞结构的损伤，其活力的大小反映了机体抗氧化、清除自由基的能力[13]。GSH可直接消除活性氧自由基，同时作为谷胱甘肽过氧化物酶的底物，在清除细胞内过氧化氢及脂过氧化物上发挥作用，GSH量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素[14]。与模型组比较，GLP各剂量组不同程度地抑制了D-GaI致肝损伤导致的肝组织中MDA含量的升高、SOD活性与GSH含量的下降，应与GLP良好地清除自由基能力[15]和还原能力[11]有关，因而能较好地保持SOD酶的活性，减少MDA的生成及还原性GSH的耗竭。GLP各剂量组生化指标及组织病理学形态的改变，均呈现出一定的剂量-效应关系；而高剂量组各生化指标及组织病理学形态变化均基本接近正常组。

综上所述，180mg/kg bw剂量的灵芝肽对半乳糖胺致肝损伤具有很好的拮抗作用，提示灵芝的保肝活性因子除多糖、三萜类化合物外，还有灵芝肽。其保肝的药理学作用机制还有待深入研究。

参考文献：

[1] GAO Y H, LIN Z B, HUANG M, et al. Hepatoprotective activity and the mechanisms of action of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi Mushroom) (Aphyllophoromycetideae)[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms,2003, 5(2) :111-131.

[2] 周昌艳, 贾薇, 杨焱, 等. 几种真菌多糖预防酒精性肝损伤的实验研究[J]. 食用菌, 2002, 24(5): 36-37.

[3] 王明宇,刘强,车庆,等,灵芝三萜类化合物对3种小鼠肝损伤模型的影响[J]. 药学学报, 2000, 35(5): 326-329.
[4] 何慧, 孙颉, 谢笔钧. 灵芝生物活性肽的分离及组成研究[J]. 食品科学, 2001, 22(5): 56-58.
[5] ROTHENBUHLER E, WALBEL R, SOLMS J. An improved method for the separation of peptides and amino acids on copper-Sephadex[J]. Anal. Biochem, 1979, 97:367-375.
[6] 刘健敏, 钟芳, 麻建国. 大豆生理活性肽的研究(I)-酶法水解的工艺[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 23(3):41-44.
[7] WILLS P J, ASHA V V. Protective effect of *Lygodium exuosum* (L.) Sw. (Lygodiaceae) against D-galactosamine induced liver injury in rats[J]. Ethnopharmacology, 2006, 108: 116-123.
[8] KEPPLER D, LESCH R, REUTTER W, et al. Experimental hepatitis induced by D- galactosamine[J]. Exp Mol Pathol, 1968(9): 279-290.
[9] 唐云安, 刘玉清, 王国钦. 肝损伤动物模型研究进展[J]. 卫生毒理学杂志, 2002, 16(4): 236-238.
[10] 王晓东, 刘永刚, 苏薇薇. 红景天苷对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中药材, 2004, 27(3): 198-200.
[11] 何慧, 谢笔钧, 刘扬虎. 灵芝肽在卵磷脂体系中的抗氧化作用研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(增刊): 163-166.
[12] 张秀明, 陈科力, 李翰明, 等. 蛇葡萄根的抗肝降酶及抗自由基损伤作用[J]. 中国药师, 1999, 2(5): 225.
[13] 王艳林. 枳椇子抗脂质过氧化作用的实验研究[J]. 中草药, 1994, 25(6):306.
[14] 高姝娟, 刘锡锰, 高贵, 等. 谷胱甘肽的抗线粒体脂质过氧化作用[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(3): 287-290.
[15] 何慧, 谢笔钧, 吕玉华, 等. 发酵灵芝粉中肽类化合物的分离及其生物活性研究[J]. 华中农业大学学报, 1997, 16(5): 416-421.