

垂盆草(*Sedum sarmentosum*)水提物对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)脂肪性肝损伤治疗效果研究*

吴春艳^{1,2} 汪开毓¹ 任思宇^{1,2} 王均¹ 苗常鸿³

(1. 四川农业大学鱼病研究中心 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室 成都 611130;
2. 重庆三峡职业学院动物科技系 重庆 404155; 3. 四川省动物卫生监督所 成都 610000)

摘要 为了研究景天科中药植物垂盆草(*Sedum sarmentosum*)水提物对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)脂肪性肝损伤治疗作用及机理,本试验通过对连续投喂 6 周 8.1% (鱼油 5%+大豆油 3.1%)高脂饲料建立的草鱼脂肪性肝损伤模型,投喂添加 1200mg/kg、300mg/kg 浓度的垂盆草饲料进行 6 周治疗,测定血清主要脂肪代谢相关生化指标、制作肝脏病理切片及应用半定量 RT-PCR 技术检测肝细胞脂肪代谢相关酶肉碱棕榈酰转移酶 I(CPT-1)、过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR- α)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 相对表达量变化。结果表明:连续投喂 6 周的高脂饲料草鱼血清生化指标发生显著变化,组织病理学观察肝细胞发生严重的脂肪变性,故已成功建立了草鱼脂肪性肝损伤模型。通过 6 周治疗,1200mg/kg 剂量组、300mg/kg 剂量组均可显著降低模型动物的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)和总胆固醇(CHO)($P<0.01$);组织病理学观察显示,1200mg/kg、300mg/kg 剂量组的肝细胞脂肪变性程度与高脂组相比有一定程度的改善;同时半定量 RT-PCR 检测结果表明:用药 1200mg/kg、300mg/kg 剂量组草鱼肝脏 CPT-1 mRNA、PPAR- α mRNA 相对表达量均显著高于高脂组($P<0.01$),且 1200mg/kg 剂量组 TNF- α mRNA 表达量显著低于高脂组($P<0.01$)。本研究结果表明肝脏是草鱼脂肪沉淀的主要场所,饲料中添加垂盆草水提物可对 8.1%高脂饲料引起的草鱼肝脂肪性组织损伤具有治疗作用,该治疗作用与促进肝细胞脂质代谢途径有关。

关键词 垂盆草;脂肪性肝损伤;草鱼

中图分类号 S941 doi: 10.11693/hyhz20150500136

自 20 世纪 80 年代以来,我国水产养殖业取得显著性发展,但随着水产养殖进入规模化 and 集约化模式后,促使养殖密度过高、水环境恶化及饵料营养不均衡等原因,造成了水产动物的大面积发病和死亡,严重阻碍了水产养殖业的健康发展。随着科技的发展,脂类食谱已广泛应用于鲑科鱼类的饲料中,但在一些植食性鱼类,特别是草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*),由于长期摄入这种饲料后会出现肝脏脂肪代谢机能的紊乱,导致食欲下降,影响生长性能(Du *et al.*, 2005)。目前生产上主要通过添加氯化胆碱

(Choline choride)、甜菜碱(Betaine)等抗脂因子(向朝林, 2011),但因此类物质仅可作为饲料添加剂而限制其用量,使得治疗效果不理想(Wilson *et al.*, 1988),故在治疗鱼类脂肪肝疾病的领域里,开发廉价高效的新型中草药具有重要的意义。

保肝中药景天科植物垂盆草(*Sedum sarmentosum*)可有效抑制由 D-半乳糖苷(D-galactoside, D-GalN)、脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)导致的小鼠爆发性肝衰竭引起的小鼠血液谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平的升高,且因其可有效抑制人肝癌细胞

*四川省科技厅科技支撑项目, 2014NZ0003 号。吴春艳, 硕士研究生, E-mail: 281368189@qq.com

通讯作者: 汪开毓, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: kywangsicau@126.com

收稿日期: 2015-05-08, 收修改稿日期: 2015-05-27

增殖而被民间广泛应于慢性病毒性肝病的治疗(Lian *et al*, 2010), 但目前有关其对肝脏脂质代谢等方面的研究少有报道, 仅有 Morikawa 等(2012)和 Muraoka 等(2009)报道了关于垂盆草影响人肝癌细胞内脂质代谢活性的研究中, 证实了垂盆草可有效促进人肝癌细胞积累脂质的代谢并同时具有抑制脂质合成的作用, 因此, 本试验主要以在饲料中添加垂盆草水提物后, 通过血液学指标测定、病理学观察及肝脏肉碱棕榈酰转移酶 I (Carnitine Palmitoyl Transferase-1, CPT-1)、过氧化物酶体增殖物激活受体- α (Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α , PPAR- α) 及肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α) mRNA 的表达量变化来评估和研究垂盆草对草鱼脂肪肝的保护作用及机理, 旨在为探索更有效的治疗草鱼脂肪肝疾病提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试剂: 垂盆草提取物(CPC.TC10), 由成都三阳科技有限公司提供(将 20kg 生药, 传统水提浓缩, 真空冻干, 最终得到 3kg 粉末状提取物); 鱼油, 购自青岛永丰生物科技有限公司; 大豆油, 购自益海嘉里食品营销有限公司。

谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)和总胆固醇(CHO)的检测试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所。Trizol plus 购自 TaKaRa 公司。

实验动物: 购自成都市邛崃水产养殖场。

1.2 方法

1.2.1 饲养管理 试验草鱼为同一批孵化草鱼, 购自成都市邛崃水产养殖场, 初始体重为(12 \pm 1.5)g, 经氯化钠溶液浸泡消毒后暂养在 80 \times 75 \times 60cm 的静水水族箱中, 控制水体水温在 26—28 $^{\circ}$ C 之间, pH 7.5, 溶氧为 5 mg/L 左右, 氨氮低于 0.02 mg/L。试验过程中每 2 天换水 1 次, 换水量为原来水量的 1/4—1/3, 换水的同时抽去残饵和粪便, 水源为经曝气后的自来水, 试验周期为 12 周。

1.2.2 造模期间试验分组与饲料配制 造模 1—6 周期间, 选取规格均一健康草鱼 360 尾, 随机平均分到 12 个水族箱中, 然后将 12 个水族箱随机分为 4 组, 每组设置 3 个重复。四个处理组分别为: 基础组、高脂组、1200mg/kg 剂量组和 300mg/kg 剂量组。参考汪开毓等(2012)报道的饲料中脂肪比例进行配合饲料设计并进行制作四组等氮饲料。造模过程中: 基础组

投喂基础饲料(粗蛋白 30.5%), 其中高脂组(粗蛋白 30.5%)、1200mg/kg (粗蛋白 30.5%) 剂量组和 300mg/kg (粗蛋白 30.5%) 剂量组投喂高脂饲料, 共饲喂 6 周, 每天投喂率为 3%。造模第 6 周结束后, 各组分别进行称重、临床及组织病理学观察, 当高脂组、1200mg/kg 剂量组和 300mg/kg 剂量组均出现明显的内脏脂肪堆积和血清学指标发生明显升高及肝细胞脂肪变性时, 进行治疗试验。

1.2.3 治疗期间试验分组与饲料配制 治疗 1—6 周期间, 1200mg/kg 剂量组、300mg/kg 剂量组开始投喂加药饲料(高脂饲料+1200mg/kg 垂盆草水提物、高脂饲料+300mg/kg 垂盆草水提物), 进行 6 周的治疗, 其余两组饲料仍按造模期间饲料投喂。在每天的 9: 00 am, 12: 00 am, 6: 00 pm, 按草鱼体重的 3% 投喂饲料, 并在投喂加药饲料后每隔 2 周检测一次血清指标并称重, 随时观察鱼体健康状况, 记录死亡情况。

1.3 血清采集与相关指标的测定

试验期间, 在造模结束的第 6 周和治疗的第 2、4 和 6 周进行取样检测, 取样前将试验草鱼禁食 24h, 各组随机抽取 6 尾, 进行尾静脉采血。血液样品置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 静置 3 h 后, 4 $^{\circ}$ C 下, 4000 r/min 离心 10min, 采集上层血清, 4 $^{\circ}$ C 存放, 用于谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)和总胆固醇(CHO)含量的测定。

1.4 肝脏采样与病理切片制作

在无菌条件下剥离肝脏, 单独将治疗 6 周后所取的部分肝脏组织固定于 4% 中性福尔马林中, 制作病理切片后进行 H.E. 染色和苏丹染色, 并将其余部分于 -80 $^{\circ}$ C 中冻存, 用于总 RNA 的提取, 以进行 CPT-1、PPAR- α 、TNF- α 表达量的半定量检测。

1.5 CPT-1、PPAR- α 和 TNF- α 基因 mRNA 表达的半定量检测

1.5.1 引物设计 参考 GenBank 已公布的草鱼 CPT-1(登录号: JF728839)、PPAR- α (登录号: FJ231987, FJ849065)、TNF- α (登录号: HQ696609, JQ040498)使用 Primer 5.0 和 Oligo 7.0 软件设计 RT-PCR 引物, 引物序列送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。 β -actin 基因应用本实验室已报道的序列(表 1)(汪开毓等, 2012)。

1.5.2 PCR 扩增和产物半定量分析 反转录: 称取 0.1g 肝脏组织, 采用 Trizol 试剂(TaKaRa 公司), 提取治疗 6 周各组草鱼肝脏总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析总 RNA 提取效果, 用紫外分光光度计测定

表1 RT-PCR引物序列
Tab.1 List of primers used for the RT-PCR

基因	引物(5'—3')	退火温度(°C)	产物长度(bp)
CPT-1	F: AATTCTGCTTGACTTATGAG R: CCTGTCCAAGGTACTTAGAC	55	255
PPAR- α	F: GATACCCCAATCTGAGAAGC R: CAGCAGCTGGGTAAGTAGTT	55	250
TNF- α	F: TCTGTAAGCATAGATGGACAT R: TTTCACCCACATAACATCATA	55	216
β -actin	F: TCTGCTATGTGGCTCTTGACT R: TACCGCAAGACTCCATACCCAA	59.4	174

RNA 浓度。提取的总 RNA 经过 37°C 15min, 85°C 5s 的反转录后, 合成 cDNA (TaKaRa 公司: DRRO14S)。各组的 cDNA 样品保存于-20°C。

以合成的 cDNA 为模板, 扩增目的片段。反应体系为 50 μ L; CPT-1、PPAR- α 、TNF- α 基因的反应参数为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 共 30 个循环; 72°C 5 min。 β -actin 反应参数为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 59.4°C 30 s, 72°C 1 min, 共 30 个循环; 72°C 5 min。PCR 产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳分析后, 用 Quantity One 462 软件分析条带丰度, 并计算各基因相对表达量。

1.6 统计分析

Quantity One 462 软件分析所得数据采用 Spss16.0 软件进行统计学分析, 各组相同指标的数据进行单因素方差分析, 结果用“ $\bar{X} \pm SD$ ”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。

2 结果

2.1 试验期间草鱼生长情况及血清生理与生化指标变化

2.1.1 造模 6 周草鱼生长情况及血清生理与生化指标测定 由表 2 可知, 在造模第 6 周结束时基础组草鱼体重显著高于高脂饲料投喂的高脂组、1200mg/kg

剂量组和 300mg/kg 剂量组($P < 0.01$)。高脂组草鱼各生理生化指标的检测结果表明: 高脂组、1200mg/kg 剂量组、300mg/kg 剂量组各生化指标与基础组相比出现显著性变化, ALT、AST、TG 和 CHO 指标分别表现为不同水平的显著升高($P < 0.01$)。

2.1.2 治疗 6 周血清生理与生化指标的测定 由表 3 可知, 整个治疗期间, 高脂组体重显著低于其它三组($P < 0.01$), 试验第 2、4 周时, 1200mg/kg 剂量组与 300mg/kg 剂量组草鱼体重差异不显著, 而试验的第 6 周, 1200mg/kg 剂量组体重显著高于 300mg/kg 剂量组($P < 0.01$)。

治疗第 2 周结束后, 1200mg/kg 剂量组与 300mg/kg 剂量组草鱼血清 ALT 水平为 5.89 U/L 和 7.53 U/L, 均同时极显著低于高脂组的 23.71 U/L ($P < 0.01$)。其中, 1200mg/kg 剂量组与 300mg/kg 剂量组 ALT 水平差异具有统计学意义($P < 0.01$); AST 水平分别为 7.35 U/L 和 9.56 U/L, 均同时极显著低于高脂组 43.68 U/L ($P < 0.01$), 且 1200mg/kg 剂量组与 300mg/kg 剂量组差异显著($P < 0.05$); TG 水平分别为 1.96mmol/L 和 2.55mmol/L, 与高脂组无显著性差异($P > 0.05$); CHO 含量分别为 3.97mmol/L 和 4.91mmol/L 均显著低于高脂组的 5.86mmol/L ($P < 0.01$)。

治疗第 4 周结束后, 1200mg/kg 剂量组与

表2 造模 6 周后各组草鱼生理指标的变化
Tab.2 The physiological changes of *C. idellus* after modeling for 6 weeks

指标	时间点	组别			
		基础组	高脂组	1200mg/kg	300mg/kg
体重	week 6	50.86 \pm 1.37 ^B	45.22 \pm 0.89 ^A	45.12 \pm 0.83 ^A	46.32 \pm 0.55 ^A
谷丙转氨酶 ALT(U/L)	week 6	4.19 \pm 0.11 ^B	15.26 \pm 0.30 ^A	16.20 \pm 0.23 ^A	15.73 \pm 0.17 ^A
谷草转氨酶 AST(U/L)	week 6	4.23 \pm 0.02 ^B	23.76 \pm 1.11 ^A	22.25 \pm 0.09 ^A	24.17 \pm 0.11 ^A
甘油三酯 TG(mmol/L)	week 6	1.23 \pm 0.04 ^B	2.55 \pm 0.19 ^A	2.25 \pm 0.09 ^A	2.22 \pm 0.14 ^A
总胆固醇 CHO(mmol/L)	week 6	3.23 \pm 0.13 ^B	5.69 \pm 0.44 ^A	5.25 \pm 0.09 ^A	5.21 \pm 0.04 ^A

同行标注不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)

300mg/kg 剂量组草鱼血清 ALT 水平为 4.97 U/L 和 5.76 U/L, 均同时极显著低于高脂组的 49.60 U/L($P<0.01$)。其中, 1200mg/kg 剂量组 ALT 水平与 300mg/kg 剂量组, 差异不具有统计学意义($P>0.05$); AST 水平分别为 6.63 U/L 和 7.59 U/L, 均极显著低于同期高脂组的 57.94 U/L($P<0.01$), 其中 1200mg/kg 剂量组与 300mg/kg 剂量组 AST 水平差异具有统计学意义($P<0.05$); TG 水平分别为 1.77mmol/L, 和 1.91mmol/L, 均极显著低于同期高脂组的 2.56mmol/L ($P<0.01$); CHO 含量分别为 4.07mmol/L 和 4.55mmol/L, 均极显著低于同期高脂组的 6.14mmol/L ($P<0.01$), 其中, 1200mg/kg 剂量组与 300mg/kg 剂量组 CHO 水平差异具有统计学意义($P<0.05$)。

治疗第 6 周结束后, 1200mg/kg 剂量与 300mg/kg

剂量组草鱼血清 ALT 水平为 4.60 U/L 和 5.39 U/L, 均同时极显著低于高脂组的 53.30 U/L($P<0.01$)。其中, 1200mg/kg 剂量组 ALT 水平与 300mg/kg 剂量组, 差异具有统计学意义($P<0.05$); AST 水平分别为 6.60 U/L 和 7.13 U/L, 均极显著低于同期高脂组的 59.61 U/L($P<0.01$), 其中 1200mg/kg 剂量组与 300mg/kg 剂量组 AST 水平差异不具有统计学意义($P>0.05$); TG 水平分别为 1.51mmol/L 和 1.60mmol/L, 均极显著低于同期高脂组的 2.62mmol/L ($P<0.01$), 其中 1200mg/kg 剂量与 300mg/kg 剂量组 SOD 水平差异不具有统计学意义($P>0.05$); CHO 含量分别为 3.97mmol/L 和 4.67mmol/L, 均极显著低于同期高脂组的 6.41mmol/L ($P<0.01$), 其中, 1200mg/kg 剂量组与 300mg/kg 剂量组 CHO 水平差异具有统计学意义($P<0.01$)。

表 3 治疗 6 周内各组草鱼生理指标的变化
Tab.3 The physiological changes of *C. idellus* within 6 weeks of treatment

指标	时间点	组别			
		基础组	高脂组	1200mg/kg	300mg/kg
体重	week 2	60.22±1.78 ^B	55.66±2.47 ^A	56.93±3.32 ^C	57.89±1.79 ^C
	week 4	71.84±2.45 ^B	65.89±1.15 ^A	69.97±2.71 ^C	70.89±1.76 ^C
	week 6	84.20±3.37 ^B	70.48±2.27 ^A	78.79±1.65 ^C	75.52±2.16 ^D
谷丙转氨酶 ALT(U/L)	week 2	4.31±0.13 ^D	23.71±0.20 ^A	5.89±0.13 ^C	7.53±0.18 ^B
	week 4	4.26±0.06 ^C	49.60±0.58 ^A	4.97±0.05 ^{BC}	5.76±0.11 ^B
	week 6	4.42±0.09 ^{Bc}	53.30±0.25 ^{Aa}	4.60±0.04 ^{Bc}	5.39±0.07 ^{Bb}
谷草转氨酶 AST(U/L)	week 2	4.37±0.11 ^{Cd}	43.68±0.79 ^{Aa}	7.35±0.25 ^{Bc}	9.56±0.13 ^{Bb}
	week 4	4.41±0.09 ^{Cd}	57.94±0.38 ^{Aa}	6.63±0.12 ^{Bc}	7.59±0.14 ^{Bb}
	week 6	4.39±0.11 ^C	59.61±0.62 ^A	6.60±0.39 ^B	7.13±0.18 ^B
甘油三酯 TG(mmol/L)	week 2	1.45±0.06 ^{Bc}	2.49±0.10 ^{Aab}	1.96±0.11 ^{Ab}	2.55±0.20 ^{Aa}
	week 4	1.42±0.04 ^{Cd}	2.56±0.11 ^{Aa}	1.77±0.09 ^{Bb}	1.91±0.05 ^{Bc}
	week 6	1.47±0.13 ^B	2.62±0.09 ^A	1.51±0.19 ^B	1.60±0.23 ^B
总胆固醇 CHO(mmol/L)	week 2	3.19±0.03 ^D	5.86±0.14 ^A	3.97±0.08 ^C	4.91±0.10 ^B
	week 4	3.27±0.07 ^{Cd}	6.14±0.13 ^{Aa}	4.07±0.02 ^{Bc}	4.55±0.13 ^{Bb}
	week 6	3.47±0.07 ^{Cd}	6.41±0.15 ^{Aa}	3.97±0.08 ^{Cc}	4.67±0.16 ^{Bb}

同行标注不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

2.2 治疗 6 周草鱼肝脏组织形态学观察

组织病理学观察结果表明, 经过加药饲料的投喂, 在治疗的第 6 周结束后基础组(图 1a, b): 肝细胞大小一致, 细胞核蓝染, 位于细胞中央; 胞浆均质红染, 内有少量脂滴。高脂组(图 1c, d): 肝细胞形似脂肪细胞, 胞核被挤向边缘, 胞内脂滴融合为大空泡, 苏丹染色呈现大量脂滴; 与高脂组相比, 1200mg/kg 剂量组(图 1e, f)与 300mg/kg 剂量组(图 1g, h)在治疗 6 周后取样观察时, 发现肝细胞脂肪变性的程度有所

降低, 脂滴有一定程度的减少。

2.3 治疗 6 周总 RNA 的鉴定及样品检测

总 RNA 经紫外分光光度计检测纯度和定量 A_{260}/A_{280} 值在 1.8—2.0 之间, 表明纯度高、污染低且无降解, 可以作为逆转录模版。各组 CPT-1、PPAR- α 、TNF- α 和 β -actin 基因扩增产物如图 2 所示。

利用 Quantity One 462 软件对 β -actin、CPT-1、PPAR- α 及 TNF- α 的 RT-PCR 扩增产物进行进一步的数据分析, 结果可知: 试验治疗第 6 周结束后 1200mg/kg

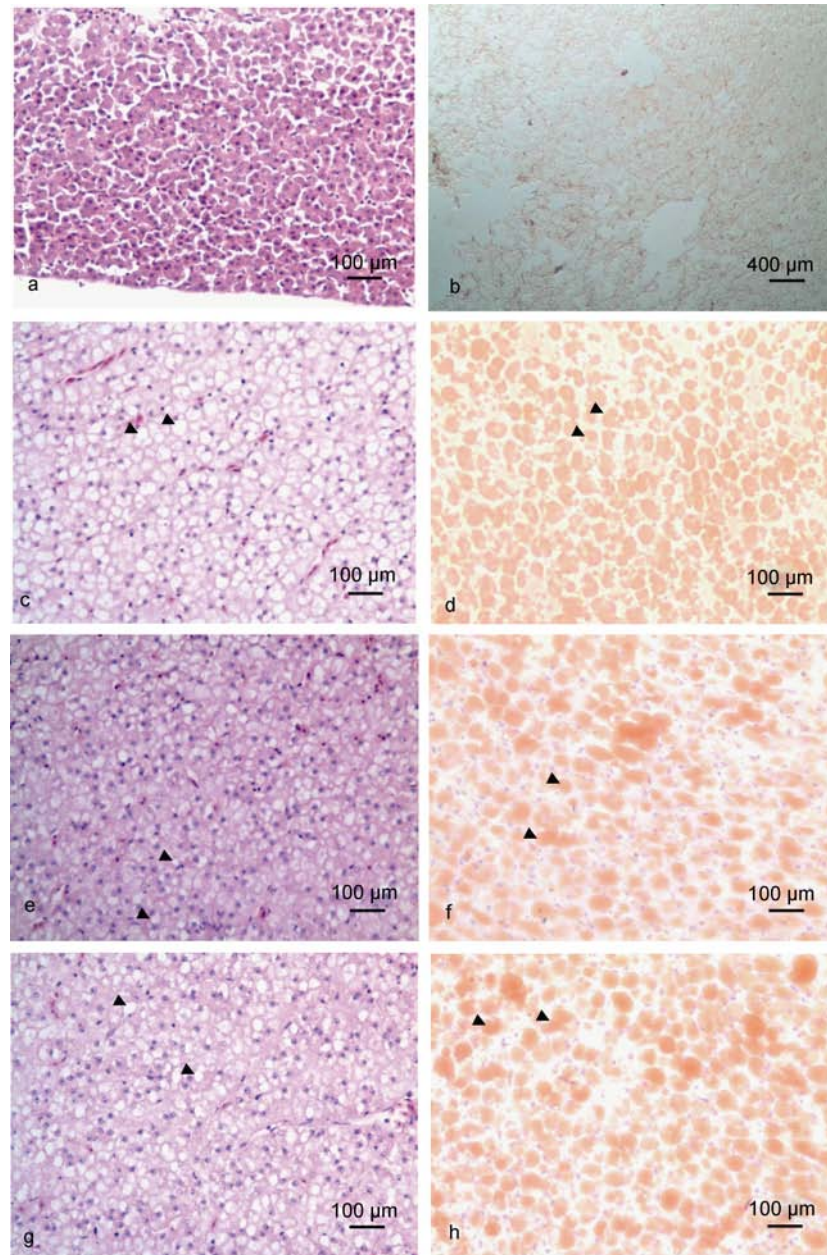


图 1 治疗 6 周后草鱼肝脏病理组织学变化

Fig.1 Pathological changes of the *C. idellus* hepatopancreas after treatment for 6 weeks

a. 基础组: 肝细胞形态正常, 细胞核居中, 胞质均质红染(H.E.); b. 基础组: 肝细胞红染脂滴体积较小(Sudan); c. 高脂组: 肝细胞形似脂肪细胞, 胞核边移, 胞浆内出现大的脂滴空泡(H.E.); d. 高脂组: 肝细胞内出现大量红染脂滴(Sudan); e. 1200mg/kg 剂量组(第 12 周): 肝细胞肿胀, 胞浆内脂滴空泡相对于高脂组有所减少(H.E.); f. 1200mg/kg 剂量组(第 12 周): 肝细胞内红色脂滴有所减少(Sudan); g. 300mg/kg 剂量组(第 12 周): 肝细胞肿胀, 胞浆内脂滴空泡轻微减少(H.E.); h. 300mg/kg 剂量组(第 12 周): 肝细胞内红色脂滴相对减少(Sudan)

剂量组和 300mg/kg 剂量组的肝脏 CPT-1 mRNA 相对表达量为 1.42 和 1.15 均高于同期高脂组相对表达量且差异极显著($P<0.01$); PPAR- α mRNA 表达量分别为 1.49 和 1.43 均高于同期高脂组且差异极显著($P<0.01$); 1200mg/kg 剂量组 TNF- α mRNA 表达量为 1.11, 低于同期高脂组且差异极显著($P<0.01$)(表 4)。

3 讨论

本研究中, 通过对健康草鱼进行连续 6 周投喂高脂饲料, 使得鱼体 ALT、AST、TG 和 CHO 血液指标升高, 说明肝组织出现了严重的损伤, 部分细胞内的酶进入血液, 导致血液中相应酶含量增加, 并由于持

表 4 治疗 6 周结束后草鱼肝脏不同基因 mRNA 表达的情况
Tab.4 The effect of *C. idellus* hepatopancreas on different gene mRNA expressions after 6 weeks of treatment

组别	时间点	基因			
		β -actin	CPT-1/ β -actin	PPAR- α / β -actin	TNF- α / β -actin
基础组	week 6	253.18±0.15 ^A	1.56±0.06 ^A	1.65±0.07 ^A	1.13±0.02 ^B
高脂组	week 6	254.32±0.09 ^A	0.55±0.03 ^D	0.49±0.08 ^C	2.83±0.01 ^A
1200mg/kg	week 6	255.28±0.13 ^A	1.42±0.11 ^B	1.49±0.05 ^B	1.11±0.03 ^B
300mg/kg	week 6	253.86±0.12 ^A	1.15±0.1 ^C	1.48±0.03 ^B	2.65±0.03 ^A

同列标注不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)

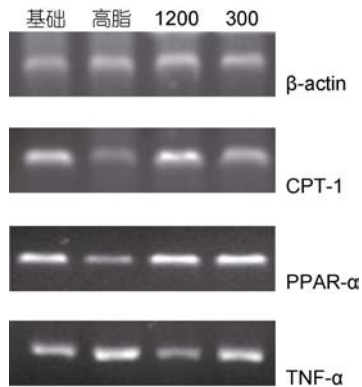


图 2 治疗第 6 周结束草鱼肝脏不同基因 mRNA 表达情况
Fig.2 The effect of *C. idellus* epatopancreas on different gene mRNA expressions after 6 weeks of treatment

续的高脂饮食导致鱼体摄入过量的脂肪酸,使血清 TG 和 CHO 水平升高,另外病理组织学显示肝细胞严重脂肪变性,说明本次研究成功建立了草鱼脂肪性肝损伤模型(Du *et al.*, 2006)。作为保肝降酶特效药景天科植物垂盆草(*Sedum sarmentosum* Bunge),近年来主要用于慢性病毒性肝炎的治疗,其有效成分对人肝癌细胞脂质代谢具有调控作用,并同时抑制癌细胞的增殖(Huang *et al.*, 2010; Morikawa *et al.*, 2012),且通过抑制炎症渗出而有效降低血清中 ALT 水平(Jung *et al.*, 2008);除此之外,Oh 等(2004)报道了垂盆草黄酮成分可抑制血管紧张素转化酶(ACE)的活性,有效缓解高血压等一系列心血管疾病。但这些研究结果主要是针对小鼠等哺乳类动物,而关于草鱼脂肪肝脂质代谢调控等方面的研究,本文尚属首次报道。

投喂加药饲料 6 周后,1200mg/kg 剂量组、300mg/kg 剂量组的 ALT、AST 水平显著降低($P<0.01$),说明垂盆草可通过降低血清 ALT、AST 水平对肝细胞起保护作用。由于持续投喂高脂饲料导致草鱼肝脏摄取脂肪酸增多,造成草鱼血清 TG 和 CHO 水平的升高,出现类似哺乳动物的高血脂症症状(汪开毓等, 2012),是引起草鱼脂肪肝的重要因素。本试验在投喂

添加垂盆草的药物饲料治疗 4 周后,血清 TG 和 CHO 已经开始显著降低($P<0.05$),且在试治疗 6 周结束时 1200mg/kg 剂量组 TG 和 CHO 水平已降低到基础组正常水平,说明垂盆草水提取物可通过促进肝细胞内脂肪酸氧化,抑制其积累而减少 TG 和 CHO 释放入血,来有效降低持续高脂饲料导致的患病草鱼 TG 和 CHO 的升高,与 1200mg/kg 剂量组改善肝细胞脂肪变性组织病理学观察结果一致。

CPT-1、PPAR- α 作为体内脂肪代谢过程中重要的调控酶类,其表达量的变化可反应体内脂类代谢情况(Hsu *et al.*, 2007),治疗 6 周后 1200mg/kg、300mg/kg 剂量组 CPT-1 mRNA 的相对表达量显著升高,与 Kuwashiro 等(2011)研究替米沙坦改善高脂造成的青鳉鱼非酒精性脂肪肝模型中的结果相符,这说明了垂盆草水提取物可促进脂肪酸代谢,从而使得大量堆积的脂肪酸进入线粒体进行 β -氧化,这初步反应了垂盆草水提取物对草鱼脂肪肝的保护作用。PPAR- α 主要在肝脏表达,可通过对肝内脂肪酸氧化相关基因表达的调控,对肝脏脂质转运中起重要作用(Reddy, 2001),治疗 6 周后,1200mg/kg 剂量组、300mg/kg 剂量组 PPAR- α mRNA 的相对表达量均显著升高($P<0.01$),与 Zhou 等(2008)报道的小檗碱缓解大鼠高脂血症肝脏 PPAR- α 的表达中结果一致,这说明垂盆草可通过促进 PPAR- α mRNA 的表达,从而使得一系列与肝内脂肪酸代谢有关的蛋白质、酶基因的转录水平相应的升高,最终提高脂肪酸的氧化与脂蛋白的合成,有效缓解了鱼类肝脏的脂肪病变(Kuwashiro *et al.*, 2011)。此外,已有研究表明,肝细胞 TNF- α 的表达量的变化,可直接反应出脂类和葡萄糖的代谢情况,对脂肪肝发病早期及其进展均有作用,是肝细胞坏死的一个关键步骤,其致病机制主要是通过自身高表达来降低 PPAR-a mRNA 的表达量进而促进脂肪肝的形成(Valenti *et al.*, 2002; Glosli *et al.*, 2005);本研究中,投喂高脂饲料 6 周后,高脂组 TNF- α mRNA 表

达量显著于基础组, 而经过投喂 6 周的加药饲料治疗后, 1200mg/kg 剂量组 TNF- α mRNA 相对表达量极显著低于高脂组($P < 0.01$), 这反映出垂盆草可通过抑制 TNF- α mRNA 的表达从而抑制高脂饮食造成的脂质积累, 佐证了垂盆草高剂量组显著改善草鱼肝细胞脂肪变性的结果。

综上所述, 以上三个基因半定量检测结果说明垂盆草可通过促进 CPT-1 和 PPAR- α 的表达, 抑制 TNF- α 表达, 来提高肝细胞内脂肪酸的代谢速率; 同时文中组织病理学观察与血液生化指标的变化均显示, 垂盆草可缓解草鱼由高脂饮食造成的脂肪性肝病。以上结果可为生产上解决鱼类脂肪性肝病提供理论依据, 进而为后期试验研究提供有效数据。

参 考 文 献

- 向朝林, 2011. 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)硫代乙酰胺肝损伤实验模型建立及其应用研究. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 11—12
- 汪开毓, 苗常鸿, 黄锦炉等, 2012. 投喂高脂饲料后草鱼主要生化指标和乙酰辅酶 A 羧化酶 1 mRNA 表达的变化. 动物营养学报, 24(12): 2375—2383
- Du Z Y, Clouet P, Zheng W H *et al*, 2006. Biochemical hepatic alterations and body lipid composition in the herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed high-fat diets. *British Journal of Nutrition*, 95(5): 905—915
- Du Z Y, Liu Y J, Tian L X *et al*, 2005. Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 11(2): 139—146
- Glosli H, Gudbrandsen O A, Mullen A J *et al*, 2005. Down-regulated expression of PPAR α target genes, reduced fatty acid oxidation and altered fatty acid composition in the liver of mice transgenic for hTNF α . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1734(3): 235—246
- Hsu S-C, Huang C-J, 2007. Changes in liver PPAR α mRNA expression in response to two levels of high-safflower-oil diets correlate with changes in adiposity and serum leptin in rats and mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(2): 86—96
- Huang D D, Zhang W Y, Huang D Q *et al*, 2010. Antitumor activity of the aqueous extract from *Sedum sarmentosum* bunge *In vitro*. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 25(1): 81—88
- Jung H-J, Kang H-J, Song Y S *et al*, 2008. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of *Sedum sarmentosum* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1): 138—143
- Kuwashiro S, Terai S, Oishi T *et al*, 2011. Telmisartan improves nonalcoholic steatohepatitis in medaka (*Oryzias latipes*) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation. *Cell and Tissue Research*, 344(1): 125—134
- Lian L H, Jin X J, Wu Y L *et al*, 2010. Hepatoprotective effects of *Sedum sarmentosum* on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure. *Journal of Pharmacological Sciences*, 114(2): 147—157
- Morikawa T, Ninomiya K, Zhang Y *et al*, 2012. Flavonol glycosides with lipid accumulation inhibitory activity from *Sedum sarmentosum*. *Phytochemistry Letters*, 5(1): 53—58
- Muraoka O, Morikawa T, Zhang Y *et al*, 2009. Novel megastigmanes with lipid accumulation inhibitory and lipid metabolism-promoting activities in HepG2 cells from *Sedum sarmentosum*. *Tetrahedron*, 65(21): 4142—4148
- Oh H, Kang D-G, Kwon J-W *et al*, 2004. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(12): 2035—2037
- Reddy J K, 2001. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(6): G1333—G1339
- Valenti L, Fracanzani A L, Dongiovanni P *et al*, 2002. Tumor necrosis factor α promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 122(2): 274—280
- Wilson R P, Poe W E, 1988. Choline nutrition of fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 68(1): 65—71
- Zhou J Y, Zhou S W, Zhang K B *et al*, 2008. Chronic effects of berberine on blood, liver glucolipid metabolism and liver PPARs expression in diabetic hyperlipidemic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(6): 1169—1176

THERAPEUTIC EFFECTS OF *SEDUM SARMENTOSUM* WATER EXTRACTION ON *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* WITH FATTY LIVER INJURY

WU Chun-Yan^{1,2}, WANG Kai-Yu¹, REN Si-Yu^{1,2}, WANG Jun¹, MIAO Chang-Hong³

(1. Fisheries Disease Research Center, Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Department of Animal Science and Technology, Chongqing Three Gorges Vocational Colleges, Chongqing 404155, China; 3. Sichuan Animal Health Inspection, Chengdu 610000, China)

Abstract In order to gain more knowledge about the therapeutic effects of *Sedum sarmentosum* on *Ctenopharyngodon idellus* with fatty liver injury. The *C. idellus* were fed with a 8.1 percent of high-fat-diet within six weeks to build the fatty liver model, which contained with 5 percent of fish oil and 3.1 percent of soy bean oil. And then, the *C. idellus* were treated with two doses of the *S. sarmentosum* water extraction, 1200 mg/kg and 300 mg/kg respectively. The fatty metabolism related biochemical indexes, the pathological section of the liver and pancreas, the trend of CPT-1, PPAR- α and TNF- α were detected. The results showed that the biochemical indexes were significantly changed, and the histopathological of liver cells have serious adipose degeneration. Within the six weeks of treatment with 1200mg/kg and 300mg/kg, ALT, AST, TG and CHO had remarkable decreased. Histopathological observation showed that both groups had improvement on the level of adipose degeneration of liver cell. Meanwhile, RT-PCR results showed that fish fed with 1200mg/kg and 300mg/kg had significantly increased in CPT-1 mRNA, PPAR- α , mRNA ($P < 0.01$). And, TNF- α mRNA was significantly decreased in the fish fed with 1200mg/kg than that of other three groups ($P < 0.01$). The results also pointed out that the *S. sarmentosum* could play an important role in the treatment of liver fatty tissue injury, and this treatment have a relation with the lipid metabolic pathways of liver cells.

Key words *Sedum sarmentosum*; fatty liver injury; *Ctenopharyngodon idellus*