

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.24.009

白花蛇舌草粗黄酮对小鼠肝损伤保护作用的研究*

郑岳¹,徐梅梅¹,孙伟¹,卢坤玲¹,郑继尧¹,王益民^{1△},李健²(1. 秦皇岛市第一医院消化科,河北秦皇岛 066000;2. 燕山大学环境与化学工程学院
生物技术与工程系,河北秦皇岛 066004)

[摘要] **目的** 探讨白花蛇舌草黄酮对小鼠肝损伤的保护作用及机制。**方法** 昆明种雄性小鼠 40 只随机分为空白对照组、阴性对照组、阳性对照组、白花蛇舌草粗黄酮低剂量组和高剂量组,灌胃给药 14 d。空白对照组腹腔注射豆油溶液,阴性对照组、低高剂量白花蛇舌草粗黄酮处理组及阳性对照组使用 2% 四氯化碳(CCl₄)豆油溶液给予腹腔注射诱导小鼠急性肝损伤模型,24 h 后眼球取血分离血清,测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)和谷氨酰转氨酶(GGT)活性;处死小鼠制备肝匀浆,测定肝匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)水平,同时取肝脏组织进行病理学检查。**结果** 高低剂量白花蛇舌草粗黄酮均可显著降低血清 ALT、AST、ALP 和 GGT 水平,显著升高肝脏组织 SOD、CAT 和 GSH 活性,降低肝组织 MDA 水平,白花蛇舌草粗黄酮对肝脏组织结构也显示显著保护作用。**结论** 白花蛇舌草粗黄酮对 CCl₄ 诱导急性肝损伤有显著保护作用,可能是通过增加肝组织抗氧化能力而实现的。

[关键词] 肝损伤保护;白花蛇舌草;粗黄酮;抗氧化;疾病模型,动物**[中图分类号]** R575.2+9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)24-3340-03

Study on crude flavonoids from Oldenlandia diffusa on protection against liver injury in rats*

Zheng Yue¹, Xu Meimei¹, Sun Wei¹, Lu Kunling¹, Zheng Jiyao¹, Wang Yimin^{1△}, Li Jian²

(1. Department of Gastroenterology, the First Hospital of Qinhuangdao City, Qinhuangdao, Hebei 066000, China;

2. Department of Biological Engineering, College of Environment and Chemical Engineering,

Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of crude flavonoids from Oldenlandia diffusa (CFOD) on acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄). **Methods** Forty Kunming mice were divided into blank control group, negative control group, positive control group, CFOD low dose treatment group and CFOD high dose treatment group. The experiment mice were treated by intragastric administration for 14 days. And the mice in blank control group were treated with soya-bean oil by intraperitoneal injection, and the other groups were got the 2% CCl₄ soya-bean solution by intraperitoneal injection to induce the liver injury of the mice. After 24 hours, the serum was collected and the ALT, AST, ALP and GGT activities were measured. After the mice were sacrificed, the homogenate of liver was prepared to determine the levels of SOD, MDA, CAT and GST. **Results** Both of the high and low doses of CFOD could reduce the levels of ALT, AST, ALP and GGT in serum significantly, and the activities of SOD, CAT and GST in liver homogenate were up-regulated by the treatments of low and high CFOD. Furthermore, both of the treatments of low and high CFOD could decrease the MDA level in liver homogenate and showed significant protective effect on the microstructure of the mice liver. **Conclusion** CFOD has a significant protective effect on the acute liver injury induced by CCl₄, which could promote the liver antioxidant activity.

[Key words] liver injury protection; Oldenlandia diffusa; crude flavonoids; antioxidant; disease models, animal

一些化学毒物和药物常常导致急性肝细胞损伤,临床上可见肝功能异常,严重时可能发生肝功能衰竭。四氯化碳(CCl₄)模型是肝损伤的经典模型,能准确反映肝细胞的功能、代谢及形态学变化,重复性好^[1-2]。黄酮类化合物广泛存在于多种植物中,具有多种药理活性和较低的毒性^[3]。其对多种原因造成的肝损伤均有不同程度的保护作用,是近年来肝损伤治疗研究的热点。现代药理研究证明,白花蛇舌草黄酮类化合物具有调节免疫、抗化学诱变、抗肿瘤、抗菌抗炎、抗氧化等作用^[4]。而关于其对化学性肝损伤的研究,目前缺少系统性研究。本研究以 CCl₄ 诱导肝损伤小鼠为模型,探讨白花蛇舌草粗黄酮对小鼠

急性肝损伤的保护作用。

1 材料与方

1.1 实验材料 实验动物雌性昆明种小鼠(6 周龄,18~22 g) 40 只购自中国医学科学院实验动物中心,颗粒饲料喂养,自由饮水。主要试剂白花蛇舌草购于秦皇岛市唐人药店(产地:河北安国),丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)和谷氨酰转氨酶(GGT)检测试剂盒和超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)检测试剂盒购于南京建成试剂公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购于北京中杉金桥公司;所有其他

* 基金项目:河北省国际合作项目(14397702D)。 作者简介:郑岳(1965-),硕士,主任医师,主要从事消化系统疾病肝损伤和消化道肿瘤的研究。 △ 通讯作者, Tel:18603359028; Email:gdsd0513@126.com。

试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 白花蛇舌草黄酮的提取 取干燥的白花蛇舌草 30 g, 加入 600 mL 70% 的无水乙醇, 80 °C 水浴条件下回流提取 2 h, 重复提取 2 次, 获得白花蛇舌草醇提取物。将醇提取物溶解于水中, 加入 1/3 体积的石油醚, 震荡静置分层, 弃去石油醚溶解物, 萃取 4 次除脂溶性杂质, 得水相加 1/3 体积的乙酸乙酯萃取 4 次, 收集乙酸乙酯相后减压回收得白花蛇舌草粗黄酮浸膏^[5]。

1.2.2 实验小鼠的分组 将要处理的 40 只小鼠随机分为 5 组, 分别为空白对照组、阴性对照组、阳性对照组(双环醇, 150 mg/kg)、低剂量组(白花蛇舌草粗黄酮 50 mg/kg)、高剂量组(白花蛇舌草醇提取物 100 mg/kg), 每组 8 只。连续灌胃给药 14 d, 空白组和阴性对照组灌胃给予等体积的生理盐水, 剂量为每只 0.3 mL。第 14 天灌胃给药 1 h 后, 空白组使用豆油溶液给予腹腔注射, 阴性对照组、高低剂量组及阳性对照组使用 2% CCl₄ 豆油溶液给予腹腔注射, 注射体积均为 0.2 mL。禁食 12 h 后, 高、低剂量组灌胃给予相应剂量的粗黄酮, 阳性对照组灌胃给予双环醇, 阴性对照组和空白组灌胃给予等量的生理盐水。30 min 后, 摘除眼球取血, 取肝脏进行指标检测^[6]。

1.2.3 小鼠血清肝功能生化指标的测定 处死小鼠前摘眼球取血, 离心获血清, 用 AST、ALT、ALP、GGT 检测试剂盒进行检测。

1.2.4 小鼠肝组织匀浆抗氧化指标测定 摘取肝脏, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗两遍, 准确称取组织质量, 加入 9 倍体积的

生理盐水研磨成组织匀浆(g : mL = 1 : 9), 离心取上清液, 制备成 10% 的组织匀浆。用 MDA、SOD、CAT、GSH-PX 检测试剂盒进行检测。

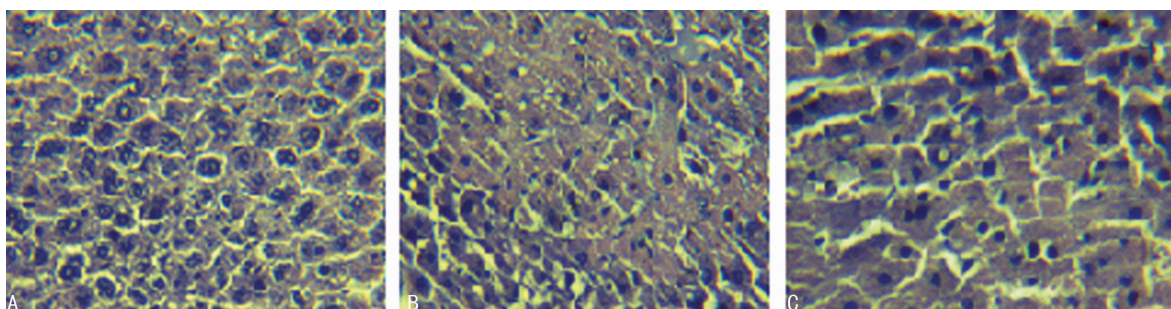
1.2.5 肝组织形态及显微结构观察 解剖观察肝脏形态、颜色, 留取相同部位约 5 mm × 5 mm × 3 mm 肝组织, 通过中性缓冲甲醛固定、梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片后作常规 HE 染色, 光镜下观察肝组织结构、肝细胞坏死等病理变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行统计分析, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析或 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝脏形态及显微结构观察 解剖肝脏组织发现, 空白对照组小鼠肝脏表面光滑, 轮廓清晰; 阴性对照组小鼠肝脏组织较粗糙, 颜色较暗; 而高剂量组表面较光滑, 色泽较鲜亮。光镜下可见空白对照组小鼠肝组织结构正常, 肝小叶结构完整, 基本无炎性细胞浸润, 肝细胞形态正常(图 1A)。阳性对照组肝细胞肿胀, 胞浆疏松化, 核深染, 可见明显的点状和灶状坏死(图 1B)。高剂量组肝脏组织损伤明显减少, 偶尔可见到单个坏死肝细胞, 炎性细胞浸润明显减少(图 1C)。

2.2 各组小鼠血清 ALT、AST、ALP 和 GGT 水平比较 与空白对照组相比, 阴性对照组血清 ALT 水平增高(*P* < 0.05), AST、ALP 和 GGT 水平均明显升高(*P* < 0.01); 与阴性对照组相比较, 高、低剂量组和阳性对照组类似, 血清 ALT、AST、ALP 和 GGT 水平均明显降低(*P* < 0.01), 见表 1。



A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 高剂量组。

图 1 各组小鼠肝组织病理切片观察(×200)

表 1 各组小鼠血清中 ALT、AST、ALP、GGT 活力比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	GGT(U/L)
空白对照组	5.800 ± 0.566	30.050 ± 6.718 ^d	38.150 ± 3.606 ^c	1.250 ± 0.071 ^d
阴性对照组	7.325 ± 0.618 ^a	69.875 ± 17.382 ^b	168.250 ± 28.148 ^b	9.375 ± 1.459 ^b
低剂量组	5.575 ± 1.658 ^d	31.400 ± 8.678 ^d	100.700 ± 16.619 ^{bd}	6.160 ± 1.620 ^{bd}
高剂量组	3.800 ± 0.566 ^d	18.600 ± 2.546 ^d	105.250 ± 11.101 ^{bd}	5.700 ± 0.849 ^{bd}
阳性对照组	5.733 ± 0.693 ^d	33.200 ± 32.017 ^d	69.567 ± 6.822 ^d	3.050 ± 0.545 ^d

^a: *P* < 0.05, ^b: *P* < 0.01, 与空白组比较; ^c: *P* < 0.05, ^d: *P* < 0.01, 与阴性对照组比较。

表 2 各组小鼠 SOD、MDA、CAT、GSH 水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mg)	CAT(U/mg)	GSH(U/mg)
空白对照组	50.575 ± 1.082	1.250 ± 0.605 ^d	488.820 ± 40.671 ^c	4 713.188 ± 381.427
阴性对照组	42.674 ± 3.246	8.200 ± 1.201 ^b	267.834 ± 78.842 ^a	3 568.484 ± 599.353

续表 2 各组小鼠 SOD、MDA、CAT、GSH 水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mg)	CAT(U/mg)	GSH(U/mg)
低剂量组	77.891±3.430 ^d	4.373±0.089 ^d	559.485±121.941 ^d	7487.556±583.138 ^{bd}
高剂量组	59.676±6.553 ^c	3.286±2.785 ^{ad}	987.339±48.641 ^{bd}	5123.885±634.578 ^c
阳性对照组	58.997±13.276 ^c	2.560±0.873 ^d	495.091±93.105 ^d	4962.446±823.667 ^c

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与空白组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与阴性对照组比较。

2.3 各组小鼠肝脏组织 MDA、CAT 水平和 SOD、GST 活性比较 与空白对照组相比,阴性对照组小鼠血清中 MDA 水平升高($P < 0.01$)。与阴性对照组小鼠相比,低剂量组可明显升高肝脏 SOD、CAT、GSH 活性($P < 0.01$),高剂量组可升高肝脏 SOD、GSH 活性($P < 0.05$),明显升高 CAT 活性($P < 0.01$),见表 2。

3 讨论

CCl₄ 引起肝损伤是传统的肝毒模型,CCl₄ 对肝损伤的毒性作用是通过脂质过氧化作用进行的^[1-2]。CCl₄ 在肝微粒体细胞色素 P450 酶激活下产生活性自由基 CCl₃,这些自由基可与肝细胞内大分子发生共价结合,可攻击肝细胞膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,损伤肝细胞膜的结构和功能,使膜通透性升高,导致细胞肿胀坏死^[7-8]。

肝细胞变性坏死,可使肝细胞内 ALT、AST 大量释放,导致血清中 ALT、AST 水平升高^[9]。阻塞性黄疸、原发性肝癌、继发性肝癌、胆汁淤积性肝炎都会使 ALP 升高。GGT 在急性肝炎、慢性活动性肝炎及肝硬化失代偿时轻中度升高。本实验中 CCl₄ 造模末次采血测定,发现小鼠血清中 ALT、AST、ALP 和 GGT 活性升高,证明 CCl₄ 致小鼠肝损伤造模成功。其他学者用此法造模出现了相似结果^[10-11]。CCl₄ 诱导肝损伤小鼠通过高、低剂量白花蛇舌草粗黄酮干预,血清中肝酶水平显著降低,说明白花蛇舌草粗黄酮能显著降低 CCl₄ 引起的急性肝损伤。实验小鼠肝脏解剖观察结果和病理切片大致正常,也证明其具有保肝活性。

通过肝匀浆 SOD、MDA、CAT 和 GSH 联合检测可以反映机体细胞受自由基攻击的严重程度^[12]。通过 CCl₄ 对小鼠造模显示,阴性对照组小鼠肝组织 SOD、GSH、CAT 活性明显下降,MDA 水平明显增加,提示肝组织中氧化应激明显,说明 CCl₄ 造成的肝损伤与氧化应激有明显的关系。高、低剂量白花蛇舌草粗黄酮处理组,可显著降低肝组织中 MDA 水平,上调 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性,说明白花蛇舌草粗黄酮对 CCl₄ 诱导肝损伤的保护作用可能是通过增加小鼠肝脏组织抗氧化能力来实现的。

参考文献

[1] Bagban IM, Roy SP, Chaudhary A, et al. Hepatoprotective activity of the methanolic extract of *Fagonia indica* Burm in Carbon tetra chloride induced hepatotoxicity in albino rats[J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 2(3): 1457-1460.

[2] Brai BI, Adisa RA, Odetola AA. Hepatoprotective properties of aqueous leaf extract of *Persea Americana*, Mill (Lauraceae) 'avocado' against CCl₄-induced damage in rats[J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2014, 11(2): 237-244.

[3] 陈柳萌. 半枝莲、白花蛇舌草药对提取浸膏中抗氧化活性成分研究[D]. 南昌:南昌大学, 2010.

[4] Sunwoo YY, Lee JH, Jung HY, et al. Oldenlandia diffusa promotes antiproliferative and apoptotic effects in a rat hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015(1): 501-508.

[5] 徐宝才, 丁霄霖. 苦荞黄酮的测定方法[J]. *无锡轻工大学学报(食品与生物技术)*, 2003, 22(2): 98-101.

[6] 冯芹, 夏文凯, 王现珍, 等. 连翘苷元对四氯化碳大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(3): 426-430.

[7] Moreira PR, Maioli MA, Medeiros H, et al. Protective effect of bixinon Carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats[J]. *Biol Res*, 2014, 47(1): 1-7.

[8] Andritoiu CV, Andritoiu V, Cuciureanu M, et al. Effect of apitherapy products against Carbon tetrachloride-induced toxicity in Wistar rats [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2014, 55(3): 835-847.

[9] Lv D, Zhu CQ, Liu L. Sesamin ameliorates oxidative liver injury induced by Carbon tetrachloride in rat[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 5733-5738.

[10] Bera TK, Chatterjee K, Jana K, et al. Antihepatotoxic effect of "Livshis", a polyherbal formulation against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in male albino rat [J]. *J Nat Pharm*, 2012, 3(1): 17-24.

[11] Mistry S, Dutt KR, Jena J. Protective effect of *Sida cordata* leaf extract against CCl₄ induced acute liver toxicity in rats [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2013, 6(4): 280-284.

[12] Raza H, John A, Shafarin J, et al. Exercise-induced alterations in pancreatic oxidative stress and mitochondrial function in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *Physiol Rep*, 2016, 4(8): 14814-14824.

(收稿日期:2016-02-15 修回日期:2016-06-30)