

禹州漏芦醇提取物对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的影响

李喜凤, 胡春月, 胡利欣, 方晓艳*, 唐露, 张伟晓, 安硕, 王优滢

河南中医学院, 郑州 450046

摘要: 探讨禹州漏芦乙醇提取物对四氯化碳(CCl_4)诱导小鼠急性肝损伤的保护作用。以 CCl_4 诱导小鼠急性肝损伤模型, 检测血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性, 同时测定肝匀浆中的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性和丙二醛(MDA)的水平。将肝大叶HE染色, 观察各组小鼠的肝组织病理改变。结果表明, 同模型组比较, 禹州漏芦乙醇提取物各剂量组均能降低小鼠血清中ALT、AST及MDA活性, 升高肝组织中GSH-Px和SOD的活性, 并能明显改善肝组织的病理学损伤。禹州漏芦乙醇提取物对 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤具有较好保肝作用, 其作用可能与清除体内自由基和抗氧化的作用有关。

关键词: 禹州漏芦; 醇提取物; 四氯化碳; 肝损伤

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Effect of Alcohol Extract of Radix Echinopsis on Acute Liver Injury Mice Induced by Carbon Tetrachloride

LI Xi-feng, HU Chun-yue, HU Li-xin, FANG Xiao-yan*, TANG Lu, ZHANG Wei-xiao, AN Shuo, WANG You-xu

Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: The objective of this study was to investigate the effect of alcohol extract of Radix Echinopsis on carbon tetrachloride(CCl_4) induced acute liver injury of mice. The experimental model of acute liver injury was induced by administration of CCl_4 into male mice. The activities of alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST) in mice serum were determined. The levels of superoxide dismutase(SOD), MDA and the activity of glutathione peroxidase(GSH-Px) in liver tissue of mice were also determined. In addition, the liver pathological examination was observed by light microscope. Compared with model groups, the contents of ALT, AST in Radix Echinopsis alcohol extract group was significantly decreased, the content of MDA was also significantly lowered, and the activity of SOD and GSH was significantly improved after preventive treatment with extract of Radix Echinopsis. Hence, it was concluded that Radix Echinopsis alcohol extract has the efficacy of protecting liver from injury reflected by its scavenging free radical and antioxidant activities.

Key words: Radix Echinopsis; alcohol extract; carbon tetrachloride; liver injury

禹州漏芦为菊科植物蓝刺头属(*Echinops latifolius* Tausch)或华东蓝刺头(*Echinops griffithii* Hance)的干燥根^[1], 始载于《神农本草经》列为上品, 为河南传统的道地药材。文献报道禹州漏芦主要含有噻吩类、挥发油类及三萜类等化学成分, 其中噻吩类具有抗炎、保肝、抗肿瘤的作用^[2,3], 但对于禹州漏芦药材的药效学目前无人进行系统的研究。该文采用 CCl_4 小鼠急性肝损伤模型, 对禹州漏芦药材的醇提取物进行实验研究, 为禹州漏芦药材药用资源的合理开发和临床应用提供一定的理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量为(20 ± 2)g, 河南省实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(豫)2010-0001。

1.2 药品与试剂

禹州漏芦药材采自新乡市辉县, 经本院生药学科董诚明教授鉴定为菊科蓝刺头属植物蓝刺头单个品种。阳性对照药: 联苯双酯滴丸(浙江万邦药业有限公司); SOD(批号: 20111215)、MDA(批号: 20111215)、GSH-PX(批号: 20111214)、考马斯亮兰蛋白(批号: 20111109)、ALT(生产批号: 20111230)、AST(生产批号: 20111230), 测定试剂盒均为南京建

成生物工程研究所产品;四氯化碳(开封市试剂总厂);其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

LDZA-0.8型低速自动平衡微型离心机(北京医用离心机厂);UV-2000型紫外分光光度仪(上海尤尼柯);数显恒温水浴锅(上海比郎仪器有限公司);FA2004B电子天平(上海越平科学仪器有限公司);DF-1集热式恒温磁力搅拌器(金坛市中大仪器厂)。

1.4 样品的制备

禹州漏芦药材,经粉碎后充分混合,过2号筛,用95%乙醇加热回流提取,加10倍量提取3h后再加入8倍量提取3h,第三次6倍量提取2h,合并3次提取液,挥干,加水配置成醇提取物高剂量(425.21 mg/kg)、醇提取物中剂量(231.94 mg/kg)、醇提取物低剂量(119.70 mg/kg)。

2 实验方法

2.1 CCl₄致小鼠急性肝损伤模型的建立

本实验采用0.2% CCl₄油溶液,以10 mL/kg体重腹腔注射的方法建立急性肝损伤模型。0.2% CCl₄油溶液要现用现配,恒温磁力搅拌器搅拌6h。因CCl₄与油溶液不易互溶,必须充分混匀,减少造模误差。

2.2 动物分组及实验流程

小鼠适应性喂养3d,随机分为6组,每组10只:空白组、模型组、阳性药组、禹州漏芦醇高、中、低剂量组。正常组及模型组给予生理盐水,阳性组给予联苯双酯滴丸(25 mg/kg),禹州漏芦醇提取物高、中、低剂量组灌胃给药,每天一次,连续7d,于末次给药1h后,正常组给予腹腔注射花生油,其余组给予腹腔注射0.2% CCl₄花生油溶液10 mL/kg,禁食不禁水。灌胃期间,供给小鼠食用河南省实验中心提供的标准饲料,自由饮用纯净水。观察记录各组小鼠实验前后的体重及精神状态、活动情况、皮毛光泽、食欲排泄等一般情况。造模16h后摘眼球取全血,3000 rpm离心15 min,血清冷藏,待测。取血后,

表1 实验前后小鼠的体重变化及肝脏系数($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Changes of weight and liver coefficient of mice before and after experiment ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	给药量 Dose(mg/kg)	实验前体重 Weight of before test(g)	实验后体重 Weight of after test(g)	肝脏系数(%) Liver coefficient
正常组 Normal group	-	23.8 ± 0.9	27.3 ± 1.7	4.37 ± 4.8

快速脱颈椎处死。剖腹取肝脏,测定每只小鼠的肝脏湿重。取肝右叶组织0.5g左右,用冷生理盐水冲洗,滤纸拭干,用生理盐水制成10%肝组织匀浆,离心,取上清待测。同时取肝左外叶相同部位,固定于10%甲醛溶液中,经取材修块,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片厚度4 μm,HE染色,光镜下观察肝组织病理学变化。

2.3 生化指标的检测

ALT、AST活性测定采用赖氏法;MDA含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法;SOD、GSH-Px活性测定分别采用亚硝酸盐法和5,5-双硫代对硝基苯甲酸(DTNB)显色法。

2.4 组织病理学观察

根据实验各组肝细胞变性的不同程度,共分为4级,拟定标准如下:0级(-),肝组织结构正常,无明显变性,坏死及炎症细胞浸润;1级(+),肝小叶结构尚正常,可见气球样变或脂肪变性,散在点状坏死;2级(++),肝小叶结构不清,可见明显的灶状坏死,伴有炎症细胞浸润;3级(+++),肝小叶结构不清、可见明显的片状坏死,伴有区域性炎症细胞浸润。

2.5 统计学方法

应用SPSS17.0统计软件对实验资料进行统计分析,所有统计数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用 t 检验,等级资料进行秩和检验。

3 实验结果

3.1 各组小鼠的一般情况

连续观察7d,各组小鼠在造模前,除个别几只雄鼠有掐咬现象,饮食、活动、精神状态,皮毛、大小便等均无异常变化,造模后,大部分小鼠出现倦缩,竖毛懒动、稀样便等异常情况出现。与正常组比较,实验前后各组小鼠的体重无显著性差异($P > 0.05$),造模后,与正常组比较,模型组的小鼠肝脏系数值(小鼠肝脏湿重/处死前小鼠体重)显著性增大($P < 0.01$),禹州漏芦醇提取物的高中低剂量组肝脏系数均较模型组显著降低($P < 0.05$)。结果见表1。

模型组 Model group	-	22.4 ± 1.2	26.7 ± 2.1	5.26 ± 2.1 ^{##}
阳性组 Positive group	25.00	22.9 ± 1.4	27.1 ± 1.5	4.48 ± 2.3 * *
高剂量 High doses group	425.21	21.7 ± 1.7	25.3 ± 1.6	4.62 ± 1.9 *
中剂量 Middle doses group	231.94	22.1 ± 1.3	26.4 ± 1.8	4.72 ± 2.5 *
低剂量 Low doses group	119.70	22.4 ± 2.1	26.9 ± 2.7	4.84 ± 1.9 *

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:^{##} $P < 0.01$ vs normal control group;* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ vs liver injury model group. The same as follow.

3.2 禹州漏芦醇提取物对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤模型血清中 ALT、AST 的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST 活性显著升高($P < 0.01$),显示造模成功。与模型组

比较,禹州漏芦醇提取物各剂量组对小鼠血清中 ALT、AST 含量均有不同程度的降低,具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 禹州漏芦醇提取物对肝损伤小鼠血清中 AST 和 ALT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of alcohol extract of Radix Echinopsion serum AST and ALT in liver injury mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	给药量 Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)
正常组 Nomal group	-	23.50 ± 15.04	9.49 ± 4.42
模型组 Model group	-	72.15 ± 21.93 ^{##}	43.49 ± 20.72 ^{##}
阳性组 Positive group	25	28.74 ± 19.80 * *	12.22 ± 9.78 * *
高剂量 High doses group	425.21	43.97 ± 24.26 * * ##	21.26 ± 10.74 * * ##
中剂量 Middle doses group	231.94	34.78 ± 24.94 * * #	23.24 ± 15.32 * * #
低剂量 Low doses group	119.70	46.61 ± 23.81 * ##	30.99 ± 11.93 * ##

3.3 禹州漏芦醇提取物对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤模型肝组织中 SOD、GSH-Px、MDA 的影响

与空白组比较,模型组小鼠肝组织中 SOD、GSH-Px 活性显著降低,MDA 水平显著增加($P <$

0.05),显示造模成功。与模型组比较,禹州漏芦醇提取物各剂量组对小鼠肝组织中 SOD、GSH-Px 活性显著升高,MDA 水平显著降低($P < 0.05$)。结果见表 3。

表 3 禹州漏芦醇提取物对肝损伤小鼠肝匀浆 SOD、GSH-Px 和 MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of alcohol extract of Radix Echinopsis on the activity of SOD, GSH-Px and MDA in liver tissue of acute injury mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	给药量 Dose (mg/kg)	SOD (U/mg · prot)	GSH-Px (μmol/mg · prot)	MDA (nmol/mg · prot)
正常组 Nomal group	-	106.15 ± 27.24	289.35 ± 95.22	6.25 ± 1.41
模型组 Model group	-	56.03 ± 26.66 ^{##}	102.23 ± 53.71 ^{##}	15.53 ± 10.01 ^{##}
阳性组 Positive group	25.00	101.10 ± 27.07 *	226.09 ± 66.20 * #	7.33 ± 2.34 *
高剂量组 High doses group	425.21	97.30 ± 29.22 *	228.22 ± 71.63 * #	7.90 ± 1.90 *
中剂量组 Middle doses group	231.94	95.29 ± 6.32 *	219.91 ± 43.42 * #	7.95 ± 2.50 *
低剂量组 Low doses group	119.70	88.03 ± 27.84 * #	176.89 ± 2.48 * ##	9.00 ± 4.93 *

3.4 禹州漏芦醇提取物对 CCl₄ 致急性肝损伤模型小鼠的肝组织病理形态学的影响

3.4.1 禹州漏芦醇提取物对肝损伤小鼠肝组织的影响

通过对实验各组小鼠肝细胞变性情况进行半定

量分析,结果表明,空白组小鼠肝细胞无异常改变;模型组小鼠肝细胞变性程度严重,经 Ridit 分析,与空白组比较有显著的统计学意义($P < 0.05$);禹州漏芦醇提取物各剂量及阳性组小鼠肝细胞变性程度均有所改善,其中尤以阳性药组,高、中剂量组效果最

佳,与模型组比较有显著的统计学意义($P < 0.05$), ($P < 0.05$),结果见表4。
且禹州漏芦高中剂量组能够显著性的降低肝脏系数

表4 禹州漏芦醇提取物对肝损伤小鼠肝组织的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of alcohol extract of Radix Echinopsis on the denaturation liver($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	肝细胞变性 Liver cell denaturation					P	炎性浸润 Inflammatory infiltrates				P	肝细胞坏死 Liver cell necrosis				P
	-	+	++	+++	++++		+	++	+++	++++		+	++	+++	++++	
	正常组 Normal group	10	0	0	0			10	0	0		0		10	0	
模型组 Model group	0	1	2	7	##	0	2	1	7	##	0	1	3	6	##	
阳性组 Positive group	6	3	1	0	***	7	2	1	0	***	9	1	0	0	**	
醇提取物(高) Alcohol extract(high)	2	7	1	0	***	5	5	0	0	***	8	2	0	0	**	
醇提取物(高) Alcohol extract(high)	2	7	1	0	***	5	5	0	0	***	8	2	0	0	**	
醇提取物(中) Alcohol extract(middle)	0	8	2	0	***	6	4	0	0	***	7	2	1	0	***	
醇提取物(低) Alcohol extract (low)	0	5	4	1	***	3	5	1	1	***	4	5	0	1	***	

3.4.2 禹州漏芦醇提取物对各组小鼠病理切片光镜观察

空白组小鼠肝脏的肝小叶结构正常,肝细胞索以中央静脉为中心,成辐射状排列,汇管区可见小叶间血管和胆管,肝细胞无变性、坏死等损伤性改变;模型组小鼠肝小叶结构紊乱,中央区肝细胞出现严重的水样变性或脂肪变性,甚至坏死,伴炎症细胞浸润;阳性组小鼠肝小叶结构基本正常,但肝小叶中央区肝细胞排列紊乱,可见肝细胞水样变性或脂肪变性,偶见坏死,伴炎症细胞浸润;禹州漏芦醇提取物给药组小鼠肝小叶结构基本正常,与模型组比较,禹州漏芦醇提取物不同程度地减少 CCl₄ 诱导肝损伤中肝细胞中的炎性细胞浸润、水肿、变性、坏死等。切片结果见图1。

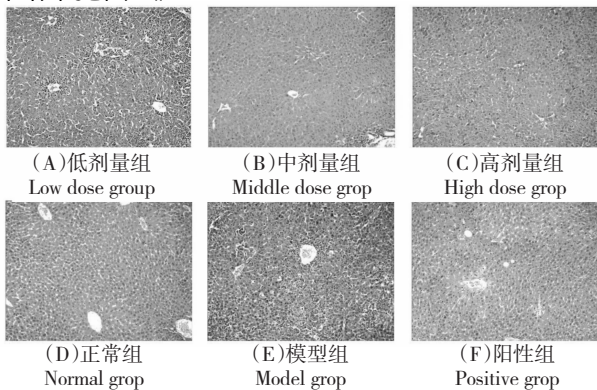


图1 禹州漏芦醇提取物对小鼠急性肝损伤的肝组织病理切片的光镜观察(HE染色, ×100)

Fig. 1 Light microscopic images of biopsies of liver tissues from different groups' acute liver injury mice

4 讨论与结论

肝损伤是现代研究护肝药物作用及作用机制常用病理模型。活体动物上应用 CCl₄ 复制急性肝损伤模型是一个经典方法^[4],其病理过程与肝毒物引起人体肝损伤的病理过程极其相似^[5]。CCl₄ 进入肝细胞后,经肝微粒体细胞色素 P450 激活,生成自由基(·CCl₃ 等),继而引起生物膜脂质过氧化反应,导致肝脂肪变和肝坏死^[6]。而且当肝细胞膜因脂质过氧化反应而结构破坏、功能受损时,细胞内的 ALT、AST 等会释放到血液中,从而血清中 ALT、AST 的活性检测可以评价肝脏损伤的程度和药物治疗肝损伤的效果^[7,8]。自由基是人体正常生物化学过程中的中间产物,在机体正常及病理过程中均存在,同时机体中亦存在可灭活氧自由基的酶,如 SOD、GSH-Px 等,SOD 的含量水平可作为衡量机体抗氧化能力的标准;GSH-Px 能够特异地催化还原性 GSH 对过氧化氢的还原反应,从而起到保护细胞膜结构与功能的完整作用。MDA 可严重破坏细胞膜结构,导致细胞肿胀、破裂及坏死。因此,ALT、AST、MDA 含量和 GSH-Px、SOD 活性间接反映了肝细胞受自由基攻击后损伤的程度,它们的变化可以作为自由基致肝细胞损伤的一种灵敏可靠的诊断性指标及预后疗效的观察;同时肝脏活检能够直观的显示肝脏实质性损害、炎症活动及纤维化。

CCl₄ 是毒性化学制剂,其诱导的肝损伤模型能准确反映肝细胞功能、代谢及形态学变化,经济且重

复性好。但 CCl_4 同时也会损伤动物的心、脾、肺、肾、脑等器官;另外,蒸汽和液体可由呼吸道、皮肤吸收,对人体有一定的毒性,故在配置 CCl_4 油溶液及腹腔注射造模的时候一定要谨慎操作。

本课题采用经典的化学性肝损伤动物模型^[9],从生化指标显示,本实验模型组的 AST、ALT 活性,MDA 含量升高明显高于空白组,同时 GSH-Px、SOD 活性降低;表明造肝细胞损伤模型成功。与模型组比较,禹州漏芦各剂量组能够显著性的抑制 AST、ALT、MDA 含量的升高,增强 GSH-Px、SOD 活性;结合肝脏组织病理学观察,各组的生化指标的数值与病理切片结果相符,均可显示禹州漏芦醇提取物能够减轻肝细胞变性、炎症浸润及坏死的病变,并促进肝细胞的再生及修复,抑制肝损伤敏感酶的升高,提高机体清除氧自由基能力并抑制肝损伤。实验证明:禹州漏芦药材具有保护 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤的作用及其保肝作用与其清除氧自由基,抗脂质过氧化损伤密切相关。对于禹州漏芦药材的保肝活性部位、药效物质基础及其他作用机制,有待以后进一步研究。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing:China Medical Science Press,2010. Vol I:244.
- 2 Wang Y(汪毅),Li X(李铤),Zhang P(张鹏). research advance of chemical composition and pharmacological activities on Radix Echinopsis. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005,36:309-311.
- 3 Wang Y(汪毅),Li X(李铤),Meng D(孟大利), et al. Chemical constituents of thiophenes from *Echinops latifolius* Tausch. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2008,25:194-196.
- 4 Liu JW(刘建文). Pharmacological experiment methodology- New technology and new methods, Volume 2(药理实验方法学—新技术与新方法,第2版). Beijing:Chemical Industry Press,2008. 206.
- 5 Kang WY(康文艺),Huang H(黄嫒),Lian TT(廉婷婷), et al. Protective effect of *Dendranthemamorifolium* on CCl_4 -induced liver injury in mice. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2012,24:1634-1636.
- 6 Yang LF(杨龙飞),Jin JX(金家兴),Gao WX(高文秀), et al. The protective effect of liver purgeextractum on the model of experimental liver injury in rats. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2006,12(6):41-42.
- 7 Ozer J,Ratner M,Shaw M, et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicol*,2008,245:194-205.
- 8 Gao XC(高绪聪),Chai ZH(柴振海),Zhang ZP(张宗鹏). Progress in biomarkers and evaluation of drug-induced liver injury. *Chin J Pharm Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志),2012,26:692-696.
- 9 Guo JJ(郭菁菁),Yang XF(杨秀芬). Research progress of the protective effect of flavanoids on experimental liver injury of animals. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报),2008,24:5-10.
- 10 Lin WH(林伟华),Chen HY(陈华英). The diagnostic value of ALT,AST,GGT,CHE in liver disease. *J Mod Clin Med Bioeng*(现代临床医学生物工程杂志),2005,11:232-233.