

# 贡菊黄酮抗小鼠急性肝损伤作用的研究

张宽朝, 文 汉\*, 胡雅萍, 王 雪

安徽农业大学生命科学院, 合肥 230036

**摘要:** 为研究黄山贡菊中黄酮的提取纯化方法及其抗小鼠急性肝损伤作用, 采用乙醇回流法从黄山贡菊中提取粗黄酮, 聚酰胺柱层析纯化, 真空冷冻干燥获得黄酮粉末。对以四氯化碳造模的急性肝损伤小鼠分别给予联苯双酯及不同剂量的贡菊黄酮灌胃, 测定血清中 GPT/ALT、GOT/AST 活性, 测定肝组织中 SOD 活性和丙二醛含量, HE 染色观察肝组织病理形态学的改变。结果表明, 黄山贡菊黄酮可以降低急性肝损伤小鼠血清中 GPT/ALT、GOT/AST 活性, 提高肝组织的 SOD 活性, 降低丙二醛含量, 对减轻肝脏病理组织损伤有积极作用。

**关键词:** 黄山贡菊; 黄酮; 四氯化碳; 急性肝损伤

中图分类号: R967

文献标识码: A

## Effects of Flavonoids of *Chrysanthemum Morifolium* cv. Gongju Against Acute Liver Injury of Mice

ZHANG Kuan-chao, WEN Han\*, HU Ya-ping, WANG Xue

School of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China

**Abstract:** The objective of this study was to explore the extraction and purification technique of flavonoids from *Chrysanthemum Morifolium* cv. Gongju and to investigate the effect of flavonoids against acute liver injury of mice. The flavonoids were extracted with aqueous ethanol refluxing, purified by column chromatography of polyamide, and flavone powders were obtained by vacuum freeze-drying method. An acute liver injury model of mice induced by carbon tetrachloride was established. The model mice were given bifendate and flavonoids from *C. Morifolium* cv. Gongju respectively. The GPT/ALT and GOT/AST in blood serum, the activity of SOD and the content of MDA in liver were determined, and the morphology changes of hepatic tissue were observed by HE. The results showed that flavonoids from *C. Morifolium* cv. Gongju reduced the activity of GPT/ALT and GOT/AST in blood serum of acute liver injury of mice, increased the activity of SOD and decreased the content of MDA in hepatic tissue, and relieved the damage of liver pathological tissue.

**Key words:** *Chrysanthemum Morifolium* cv. Gongju; flavonoids; carbon tetrachloride; acute liver injury

黄山贡菊, 又称徽菊, 是从菊花群体中选育出的优良品种, 因在古代被作为贡品献给皇帝, 故名“贡菊”<sup>[1]</sup>。其品质优良, 色、香、味、型集于一体, 既有观赏价值, 又有药用功能, 是安徽黄山市特有的地方名贵中药材, 也是高级保健饮料佳品, 在国内外有很大影响<sup>[1-3]</sup>。黄山贡菊气芳香, 味甘微苦, 具有疏风散热、养肝明目、清凉解毒之功能, 可治伤风感冒、疔疮肿毒、血压偏高及动脉硬化等症, 被“中国药典”誉为“菊中之冠”、“民族瑰宝”<sup>[2,3]</sup>。

黄酮类化合物是植物中分布最广泛的一类物质, 具有多种生理和药理活性; 可以防治心脑血管系

统疾病和呼吸系统疾病, 具有镇痛作用、抗凝血作用、利胆及保肝作用、抗氧化作用、抗病毒、抗癌作用等; 具有对神经、内分泌、免疫系统的作用、对消化系统的作用等<sup>[4,5]</sup>。已有研究表明, 黄山贡菊中含有丰富的黄酮类化合物。因此, 对黄山贡菊中黄酮类化合物成分进行生物学活性评价等方面的研究具有重要的意义。

实验采用乙醇回流法从黄山贡菊中提取粗黄酮, 以聚酰胺柱层析进一步纯化, 真空冷冻干燥获得黄酮粉末, 对受试组小鼠灌胃给予不同剂量的贡菊黄酮和联苯双酯, 测定 GPT/ALT、GOT/AST、MDA、SOD 值变化, 对比不同剂量贡菊黄酮保肝效果, 并对各组小鼠肝左叶石蜡进行切片及 HE 染色, 观察其病理学效应, 研究贡菊黄酮的保肝作用。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

贡菊粉由安徽农业大学生命科学学院生物化学实验室提供,经处理成粉末状,120 °C 烘干备用。

四周龄 ICR 雄性小鼠(体重  $20 \pm 2$  g),由安徽农业大学动物科技学院提供。

## 1.2 仪器与试剂

### 1.2.1 仪器

UV-1600 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);HL-2S 恒流泵(上海青浦沪西仪器厂);自动部分收集器(上海青浦沪西仪器厂);TH-500A 梯度混合器(上海沪西分析仪器厂);旋转蒸发器 RE-52(上海亚荣生化仪器厂);722S 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);冷冻干燥机(北京德天佑公司);轮转式(SHANDONAS25)切片机;生物显微镜(model microscope BM2000)。

### 1.2.2 试剂

聚酰胺:浙江台州市路桥四青生化材料厂,芦丁:中国药品生物制品检定所,丙二醛(MDA)试剂盒:南京建成生物工程研究所,超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒:南京建成生物工程研究所,谷丙转氨酶(GPT/ALT)试剂盒及谷草转氨酶(GOT/AST)试剂盒:长春汇力生物技术有限公司,氯仿、乙醇、HAc、NaOH、二甲苯、苏木精、石蜡等均为国产分析纯。

## 1.3 方法

### 1.3.1 芦丁标准曲线的绘制

准确吸取 0.10 mg/mL 芦丁标准液 0、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL、加 30% 乙醇溶液至 5 mL,再加 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL,震荡后放置 5 min,加入 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL,摇匀后放置 6 min,加 1.0 mol/L NaOH 溶液 2 mL,30% 乙醇定容至 10 mL,摇匀,以零管为空白,510 nm 测定吸光度。以芦丁含量( $\mu\text{g}$ )为横坐标,吸光度为纵坐标作标准曲线: $Y = 0.001X - 0.0017$ , $R^2 = 0.998$ 。

### 1.3.2 回流法粗提贡菊黄酮

参照文献方法,有改动<sup>[6,7]</sup>。称取干燥的贡菊粉末,以滤纸包裹,放入 250 mL 烧瓶并加入 150 mL 70% 乙醇,80 °C 水浴回流提取 2 h。提取液减压抽滤,并对滤液减压蒸馏至呈无醇味。滤液于分液漏斗中分别以等体积氯仿、1/2 体积氯仿、1/3 体积氯仿进行三次萃取,收集上层水溶液,待聚酰胺层析纯

化。

### 1.3.3 贡菊黄酮的聚酰胺层析纯化

#### 1.3.3.1 装柱与预处理

聚酰胺常规处置与常规装柱。以 3~4 倍柱体积的 95% 乙醇洗脱,至洗脱液透明,再依次用 2~2.5 倍体积的 5% NaOH 溶液、1 倍体积的蒸馏水、2~2.5 倍体积的 10% HAc 溶液洗脱,最后用蒸馏水洗脱至 pH 中性备用。

#### 1.3.3.2 加样、洗脱与收集

常规加样。蒸馏水 1 mL/min 洗脱至无色。加入 70% 乙醇溶剂洗脱,待洗脱下来的液体带有醇味时,隔 5 min 用  $\text{FeCl}_3$  溶液检验,待洗脱液与  $\text{FeCl}_3$  反应呈绿色全自动部分收集器开始收集(1 管/5 min),待洗脱液与  $\text{FeCl}_3$  反应不显绿色时停止收集。

#### 1.3.3.3 洗脱曲线的绘制

每隔 4 管取 1 管,按 1.3.1 方法测吸光度,绘制洗脱曲线。

### 1.3.4 贡菊黄酮及芦丁紫外吸收光谱

取贡菊黄酮水溶液及芦丁溶液,190~600 nm 进行扫描,以蒸馏水为空白对照。

### 1.3.5 贡菊黄酮抗小鼠急性肝损伤作用的研究

#### 1.3.5.1 小鼠急性肝损伤模型的构建

将 ICR 小鼠分成两组,10 只小鼠注射 0.15 mL 的豆油溶液,其它小鼠注射 0.15 mL 2%  $\text{CCl}_4$  豆油溶液。禁食 12 h 后采血测所有小鼠(GPT/ALT)含量,取造模成功小鼠。

#### 1.3.5.2 实验小鼠分组及处理

将造模成功小鼠随机分为空白对照组、肝损伤模型组、阳性对照组、黄酮低剂量组、黄酮高剂量组,共计 5 组。按黄酮低剂量组、黄酮高剂量组、阳性对照组分别给予 5 mg/mL 低剂量黄酮溶液、15 mg/mL 高剂量黄酮溶液、联苯双脂灌胃,空白对照组、肝损伤模型组给予等体积生理盐水灌胃,连续 8 d,剂量均为每只 0.2 mL。第 8 d 灌胃给药 1 h 后,空白对照组腹腔注射 0.15 mL 10 mg/mL 豆油溶液,肝损伤模型组、黄酮给药组、阳性对照组腹腔注射 0.15 mL 2%  $\text{CCl}_4$  豆油溶液。禁食 12 h 后,黄酮组、阳性对照组分别给予相应剂量黄酮液和联苯双脂灌胃,模型组和空白对照组等量生理盐水灌胃。30 min 后,测定相关指标。

#### 1.3.5.3 小鼠血清谷丙转氨酶(GPT/ALT)及谷草转氨酶(GOT/AST)活性的测定

摘除小鼠眼球取血,3000 rpm 离心 5 min,得上

清即血清。按试剂盒说明书测定血清谷丙转氨酶(GPT/ALT)活性、谷草转氨酶(GOT/AST)活性。

#### 1.3.5.4 小鼠肝组织丙二醛(MDA)含量的测定

按试剂盒说明书操作,计算组织中MDA含量。

#### 1.3.5.5 小鼠肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定

小鼠颈椎脱臼处死,解剖,肝脏置于冷生理盐水中,滤纸吸干水分,按1:9(质量体积比)加入生理盐水,冰浴研磨至浆状。3000 rpm离心10 min,上清液按试剂盒说明书测定SOD活性。

#### 1.3.5.6 小鼠肝组织的石蜡切片与HE染色

取1.3.5.2中处理后小鼠肝脏左叶切一组织块,立即置于标本5倍总体积的10%中性甲醛中,25℃固定48 h,梯度乙醇(30%乙醇-无水乙醇)脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋切片,HE染色,光学树脂封片,光镜下观察、拍照研究肝脏组织学病理改变。

### 1.4 数据处理以及分析

实验数据通过DPS数据处理系统进行统计分析,利用EXCEL 2003进行作图。

## 2 结果与分析

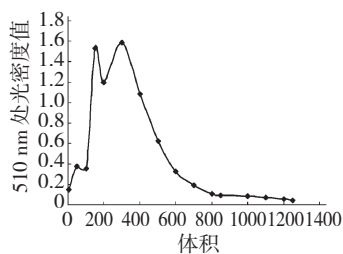


图1 聚酰胺层析纯化黄酮洗脱曲线

Fig. 1 The elution curve of flavonoids by column chromatography of polyamide

### 2.1 聚酰胺层析纯化贡菊黄酮

聚酰胺层析纯化乙醇回流法从黄山贡菊中提取的粗黄酮,并按1.3.1检测纯化过程,得黄山贡菊黄酮聚酰胺层析纯化洗脱曲线如图1所示。从图1中可以看出,经聚酰胺层析后,在1000 mL洗脱液以内时,贡菊黄酮分布相对集中,在约150 mL和300 mL处出现贡菊黄酮洗脱最大值,其后,随着洗脱的进行,贡菊黄酮含量逐渐减少,至1000 mL以后黄酮含量达到极低值。

### 2.2 贡菊黄酮提取液紫外吸收光谱

大多数黄酮类化合物的紫外光谱中均有两个主

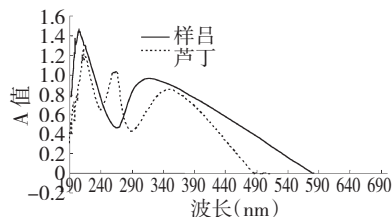


图2 贡菊黄酮和芦丁标品紫外吸收光谱

Fig. 2 UV absorption spectrum of flavonoids and rutin standard

要的吸收峰组成,分别在240 nm~280 nm范围内(带II)和300 nm~400 nm范围内(带I),但不同类型黄酮化合物的带I或带II峰位、峰形和吸收强度存在一定不同。以芦丁和贡菊黄酮提取液紫外吸收光谱对比研究,可得图2。从图2可以看出,芦丁标准溶液在212、261、356 nm处共有三处吸收峰,而黄山贡菊黄酮分别在204、326 nm集中出现两处吸收峰。因此,贡菊黄酮的紫外吸收峰性质符合天然黄酮类化合物的紫外吸收峰特征。

### 2.3 贡菊黄酮抗小鼠急性肝损伤的作用

#### 2.3.1 贡菊黄酮对小鼠血清(GPT/ALT)活性的影响

表1 贡菊黄酮对小鼠血清(GPT/ALT)活性的影响( $n=7, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of flavonoids from *C. Morifolium* cv. Gongju on GPT/ALT activity ( $n=7, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	谷丙转氨酶 GPT/ALT (mmol/L)
肝损伤模型组 Liver injury group	1.5519 ± 0.0300
低剂量组 Low dose group	1.4393 ± 0.0415
高剂量组 High dose group	1.3323 ± 0.0659 <sup>b</sup>
阳性对照组 Positive group	1.0135 ± 0.0983 <sup>b</sup>
空白对照组 Blank control group	0.5603 ± 0.1104 <sup>b</sup>

注:a,  $P < 0.05$ , b,  $P < 0.01$ , 差异显著,与肝损伤模型组比较。  
Note: a,  $P < 0.05$ , b,  $P < 0.01$ , compared with liver injury group.

谷丙转氨酶,即GPT/ALT,主要存在于肝细胞浆内,被世界卫生组织推荐为肝功能损害最敏感的检测指标。作为目前最常用的肝功能指标,GPT/ALT升高的程度与肝细胞受损的程度相一致。贡菊黄酮对小鼠血清(GPT/ALT)活性的影响见表1。从表1可以看出,肝损伤模型组的小鼠血清(GPT/ALT)酶活高于空白对照组,达1%极显著水平,说明实验小鼠经腹腔注射 $CCl_4$ 后,造成小鼠肝细胞的损伤,引起血清中的(GPT/ALT)含量上升。黄酮低剂量组小鼠血清(GPT/ALT)酶活低于肝损伤模型组,证明贡菊黄酮对于抗小鼠肝损伤有一定效果,但

作用不显著;黄酮高剂量组小鼠血清的(GPT/ALT)活性明显低于肝损伤模型组,且作用显著,达1%极显著水平,说明贡菊黄酮剂量的增加可以逐步增强抗小鼠肝损伤的效果。

### 2.3.2 贡菊黄酮对小鼠血清(GOT/AST)活性的影响

表2 贡菊黄酮对小鼠血清(GOT/AST)活性的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of flavonoids from *C. Morifolium* cv. Gongju on GOT/AST activity ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	谷草转氨酶 GOT/AST (mmol/L)
阳性对照组 Positive group	1.7000 ± 0.1036
低剂量组 Low dose group	1.5763 ± 0.0810
肝损伤模型组 Liver injury group	1.4361 ± 0.1147
高剂量组 High dose group	1.3429 ± 0.1349
空白对照组 Blank control group	1.0920 ± 0.2156 <sup>b</sup>

注:a,  $P < 0.05$ , b,  $P < 0.01$ , 差异显著, 与肝损伤模型组比较。

Note: a,  $P < 0.05$ , b,  $P < 0.01$ , compared with liver injury group.

### 表3 贡菊黄酮对小鼠肝组织MDA含量和SOD活性的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of flavonoids from *C. Morifolium* cv. Gongju on the content of MDA and SOD activity ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	丙二醛 MDA (nmol/mg prot)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mg prot)
肝损伤模型组 Liver injury group	5.2740 ± 0.7550	201.1340 ± 20.7832
空白对照组 Blank control group	4.3005 ± 0.5911	274.4040 ± 77.0113
低剂量组 Low dose group	3.2454 ± 2.1046	216.2775 ± 31.0911
高剂量组 High dose group	2.9791 ± 0.7395 <sup>a</sup>	259.0713 ± 47.4911
阳性对照组 Positive group	2.5739 ± 1.1298 <sup>b</sup>	189.1763 ± 42.8522 <sup>a</sup>

注:a,  $P < 0.05$ , b,  $P < 0.01$ , 差异显著, 与肝损伤模型组比较。

Note: a,  $P < 0.05$ , b,  $P < 0.01$ , compared with liver injury group.

丙二醛(MDA)是机体内氧自由基代谢过程中产生的脂质过氧化产物,它可以反映该体系中脂质过氧化自由基的存在及反应的程度,是脂质过氧化和细胞氧化损伤的重要检测指标。贡菊黄酮对肝组织MDA含量的影响见表3。由表3看出,肝损伤模型组MDA含量高于空白对照组,说明 $\text{CCl}_4$ 豆油溶液引起了小鼠肝脏内氧自由基水平的上升,发生了脂质过氧化反应。与肝损伤模型组相比,黄酮低剂量组、黄酮高剂量组与阳性对照组的小鼠肝组织MDA含量均有下降,表明贡菊黄酮对降低氧自由基具有一定效果,但黄酮低剂量组作用不显著,黄酮高剂量组达5%显著水平,说明高剂量贡菊黄酮可以降低氧自由基水平、抑制脂质过氧化反应,具有较为明显的抗肝损伤作用。

SOD是广泛存在于需氧生物体内的一种金属

谷草转氨酶,即GOT/AST,又名天门冬氨酸氨基转移酶,主要存在于肝细胞线粒体内。当肝脏发生严重坏死或破坏时,将引起谷草转氨酶在血清中浓度的偏高。贡菊黄酮对小鼠血清(GOT/AST)活性的影响见表2。从表2可以看出,肝损伤模型组的小鼠血清(GOT/AST)酶活高于空白对照组,达1%极显著水平,说明腹腔注射 $\text{CCl}_4$ 造成小鼠肝细胞的损伤,引起小鼠血清(GOT/AST)含量的上升。同时,阳性对照组和黄酮低剂量组的血清(GOT/AST)活性均高于肝损伤模型组,说明联苯双脂和低剂量贡菊黄酮灌胃处理均不能降低血清(GOT/AST)活性,而黄酮高剂量组处理后,(GOT/AST)酶活低于肝损伤模型组,但未达显著水平,表明高剂量黄酮能够一定程度上促进肝损伤小鼠(GOT/AST)水平的降低。

### 2.3.3 贡菊黄酮对肝组织MDA含量和SOD活性的影响

### 表3 贡菊黄酮对小鼠肝组织MDA含量和SOD活性的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of flavonoids from *C. Morifolium* cv. Gongju on the content of MDA and SOD activity ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	丙二醛 MDA (nmol/mg prot)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mg prot)
肝损伤模型组 Liver injury group	5.2740 ± 0.7550	201.1340 ± 20.7832
空白对照组 Blank control group	4.3005 ± 0.5911	274.4040 ± 77.0113
低剂量组 Low dose group	3.2454 ± 2.1046	216.2775 ± 31.0911
高剂量组 High dose group	2.9791 ± 0.7395 <sup>a</sup>	259.0713 ± 47.4911
阳性对照组 Positive group	2.5739 ± 1.1298 <sup>b</sup>	189.1763 ± 42.8522 <sup>a</sup>

酶,是生物体内清除自由基的首要物质,是体内脂质氧化的敏感指标,能催化超氧阴离子自由基产生歧化反应,可抑制黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶,减少体内自由基的产生,减轻肝细胞损伤程度<sup>[8-10]</sup>。由表3可以看出,肝损伤模型组SOD活力水平明显低于空白对照组,说明 $\text{CCl}_4$ 损伤小鼠肝细胞,造成SOD活性的降低。贡菊黄酮低剂量组和高剂量组肝组织SOD活性均高于肝损伤模型组,表明贡菊黄酮具有提高小鼠肝组织SOD活性,清除超氧阴离子自由基的能力,但未达显著水平。同时,由表3可以发现,联苯双脂对于提高肝脏细胞SOD活力没有效果。

### 2.3.4 贡菊黄酮对急性化学性肝损伤小鼠肝脏病理组织学的影响

贡菊黄酮对急性化学性肝损伤小鼠肝脏病理组织学的影响结果见图3。从中可以看出,光镜下观

察发现,空白对照组小鼠肝组织的结构正常,肝细胞形态正常,排列整齐,且基本无炎性细胞浸润;急性肝损伤模型组小鼠的肝细胞肿胀,细胞膜破裂,结构不完整,胞浆呈疏松化,核深染,可见明显的点状和

灶状坏死。与肝损伤模型组相比,贡菊黄酮低、高剂量组和联苯双酯阳性对照组肝脏组织细胞结构较为完整,基本正常,损伤明显减少,坏死和炎性细胞浸润明显减少。

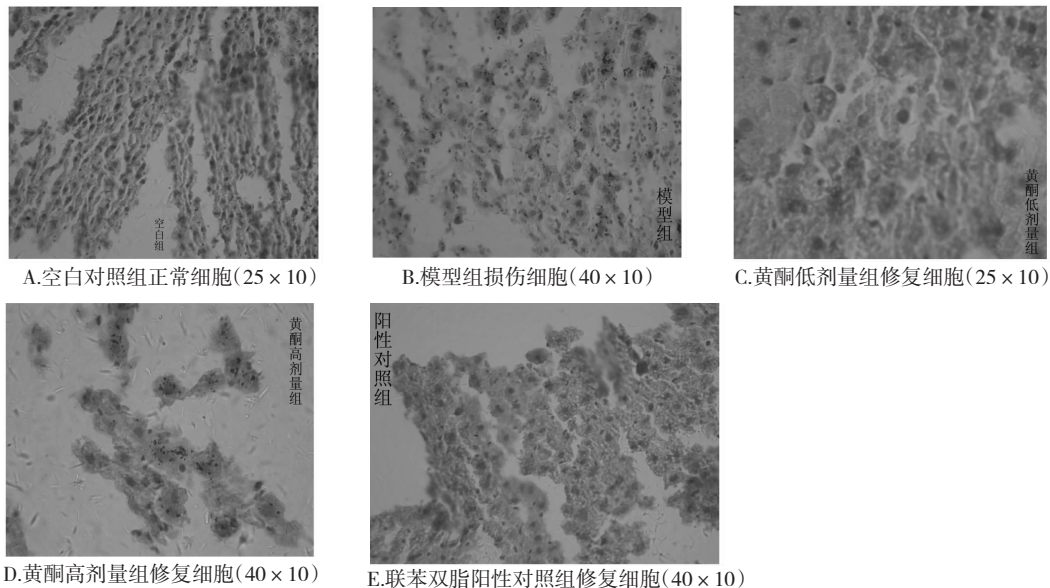


图3 化学性肝损伤小鼠肝脏病理组织学切片

Fig. 3 Histopathology of biopsies of mice with chemical liver injury

### 3 讨论与结论

四氯化碳慢性肝损伤模型是研究抗肝炎药物保肝作用的一个常用的动物模型,其主要是  $\text{CCl}_4$  进入机体后,经肝脏细胞色素 P450 代谢为三氯甲基自由基攻击肝脏生物大分子,产生脂质过氧化反应,引起肝细胞损伤,导致血清中 ALT、AST 释出升高<sup>[9,10]</sup>。

本研究采用乙醇回流法从黄山贡菊中提取粗黄酮,聚酰胺柱层析纯化,真空冷冻干燥获得黄酮粉末,对以四氯化碳造模的急性肝损伤小鼠分别给予联苯双酯及不同剂量的贡菊黄酮灌胃,测定了血清中 GPT/ALT、GOT/AST 活性,测定了肝组织中 SOD 活性和丙二醛含量,HE 染色观察肝组织病理形态学的改变,实验结果表明,黄山贡菊黄酮可以降低急性肝损伤小鼠血清中 GPT/ALT、GOT/AST 活性,提高肝组织 SOD 活性,降低丙二醛含量,可不同程度地改善肝脏病理组织损伤。

联苯双酯是治疗病毒性肝炎和药物性肝损伤引起转氨酶升高的常用药物,可减轻因四氯化碳所致的肝脏损害和谷丙转氨酶(GPT/ALT)升高,对四氯化碳所致的肝脏微粒体脂质过氧化、四氯化碳代谢

转化为一氧化碳有抑制作用,并降低四氯化碳代谢过程中还原型辅酶 II 及氧的消耗,从而保护肝细胞生物膜的结构和功能。比较贡菊黄酮和联苯双酯的用药效果可以发现,联苯双酯对(GPT/ALT)和MDA作用明显,而贡菊黄酮不仅能降低血清(GPT/ALT)和(GOT/AST)活性,减少肝组织MDA含量,还能提高肝组织SOD活性。

因此,贡菊黄酮对抗小鼠急性肝损伤作用有明显药理学效果,具有良好的保肝作用,其作用机理可能与提高清除自由基酶的活性、增强机体清除自由基能力、减少自由基引起的脂质过氧化反应、保护肝细胞、维持肝细胞膜结构和功能完整性等有关。贡菊黄酮的研究对保肝药物的研发具有重要意义。

#### 参考文献

- 1 Hu ZM(胡智明), Zhou J(周菁). Cultivation and processing in production place of florists *Chrysanthemum*. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1999, 24: 724-724.
- 2 Wen H(文汉), Wu Q(吴琦). The physiological and biochemical characters of an annual two seasons Florists *Chrysanthemum* and the determination of its functional composition. *Crop Res*(作物研究), 2006, (3): 249-252.