

桑椹提取物对小鼠急性肝损伤保护作用

张兰兰, 何承辉*, 古丽斯坦·阿吾提, 帕依曼·亥米提, 刘宣麟
(新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的:** 研究桑椹提取物对四氯化碳(CCl_4)及乙醇致小鼠急性肝损伤的保护作用。**方法:** 分别取昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 随机分为 6 组, 分别为正常组和模型组(*ig* 给予蒸馏水), 阳性药(联苯双酯滴丸)组($0.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 桑椹提取物低、中、高剂量组($1.525, 3.050, 6.100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 除正常组外分别采用 CCl_4 和乙醇建立小鼠急性肝损伤模型, 造模成功后各组连续 *ig* 给药 7 d。给药后测定小鼠肝脏系数, 测定 CCl_4 肝损伤小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)活性, 以及酒精性肝损伤小鼠肝组织匀浆中甘油三酯(TG), 还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的含量, 苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理切片。**结果:** 与正常组比较, 模型组 CCl_4 肝损伤小鼠血清中 ALT, AST 活性明显升高($P < 0.01$), 酒精性肝损伤小鼠肝组织中 MDA 和 TG 含量明显升高, GSH 含量明显降低($P < 0.01$), 模型组病理学观察肝损伤均较为明显; 与模型组比较, 桑椹提取物能降低 ALT, AST 活性, 能明显降低 MDA 和 TG 含量, 明显升高 GSH 含量, 均具有明显的统计学差异($P < 0.05, P < 0.01$), 病理检查结果显示玉热买提取物有明显的保肝作用。**结论:** 桑椹提取物对小鼠四氯化碳、酒精肝损伤有良好的保护作用。

[关键词] 玉热买; 四氯化碳; 酒精性肝损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0149-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150149

Protection Effect of Extract From Xinjiang Mulberry on Acute Liver Injury in Mice

ZHANG Lan-lan, HE Cheng-hui*, Gulisitan·Awuti, Payiman·Hamiti, LIU Xuan-lin
(Xinjiang Institute of Meteria Medica, Urumqi 830000)

[Abstract] **Objective:** To observe the protection effect of extract from Xinjiang mulberry on carbon tetrachloride (CCl_4) and alcohol-induced acute liver injury in mice. **Method:** Totally 60 Kunming mice (30 males and 30 females) were randomly divided into 6 groups: normal group and model group with intragastric administration of distilled water, positive group (bifendate pills, $0.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Xinjiang mulberry extract low dose group, middle dose group and high dose group ($1.525, 3.050, 6.100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). All the other mice except those in normal group received CCl_4 and alcohol to establish acute liver injury models in mice. After successful modeling, the mice in all groups received intragastric administration for continuous 7 days. The liver coefficient in mice was determined after drug administration, and colorimetric method was used to determine the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum of CCl_4 liver injury mice, and the contents of triglyceride (TG), malondiadehyde (MDA) and glutathione (GSH) in liver homogenate of alcoholic liver injury mice. HE staining method was used to observe the pathological section of liver tissues in mice. **Result:** As compared with the normal group, the activities of ALT and AST in serum of CCl_4 liver injury mice in model group were significantly increased ($P < 0.01$); the contents of MDA and TG in liver tissues of alcoholic liver

[收稿日期] 20150902(017)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经项目(KY201503)

[第一作者] 张兰兰, 硕士, 助理研究员, 从事中药民族药药理学研究, Tel:0991-2318172, E-mail:applechi0505@163.com

[通讯作者] * 何承辉, 硕士, 副研究员, 从事中药、天然药物药理学研究, Tel:0991-2318172, E-mail:1369467054@qq.com

injury mice in model group were significantly increased while the content of GSH was significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the liver injury was more obvious in the model group during the pathological observation. As compared with the model group, the extract from Xinjiang mulberry could reduce the activities of ALT and AST in serum, significantly reduce the contents of TG and MDA, and significantly increase the content of GSH, with statistically significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The pathological examination results indicated that the extract from Xinjiang mulberry had obvious liver-protecting effect. **Conclusion:** The extract from Xinjiang mulberry has notable protective effect for the CCl_4 and alcohol-induced liver injury in mice.

[**Key words**] extract from Xinjiang mulberry; carbon tetrachloride; alcohol liver injury

桑椹,维吾尔族名玉热买,在新疆维吾尔自治区巴州、和田、喀什、阿克苏等地区广泛栽植。桑椹中生物碱、活性多糖、白藜芦醇、花色苷等药理成分丰富,历来具有食用及中药材之用,很早就被作为水果和中药材得到广泛应用。1993年,国家卫生部就把桑椹列为“既是食品又是药品”的农产品之一^[1]。随着桑椹资源的挖掘与利用,其功能成分的高效提取将得到进一步发展,桑椹的医药利用前景十分广阔。维吾尔医对桑椹也有着广泛的应用,维吾尔医认为新疆桑椹为一级末热,二期末湿,具有补血,润脑,清阻塞,利肝脾,利尿,润便,壮阳的作用。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,SPF级,120只,雌雄各半,体重16~18g,新疆实验动物中心提供,实验动物合格证号SCXK(新)2011-0001。

1.2 药物及试剂 四氯化碳(CCl_4 ,分析纯,天津市致远化学试剂有限公司,批号20140102),联苯双酯滴丸(浙江万邦药业股份有限公司,批号A02121012),丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号分别为132161,131091),无水乙醇(分析纯,安徽安特食品股份有限公司出品,批号1112073601),冰乙酸(天津市福晨化学试剂厂,批号20120105),过氧化脂质降解产物丙二醛(MDA)试剂盒和还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20140729,20140728),甘油三酯(TG)试剂盒(北京北化康泰临床试剂有限公司,批号20130115),蛋白定量测试盒(南京建成生物工程研究所,批号20140725)。

1.3 仪器 SABA18型全自动生化仪(意大利SABA公司),TDL80-2B型台式离心机和TDL80-16B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),BS323S型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),LT1000B型电子天平(常熟市天量仪器有限公司),UV-2501PC型紫外分光光度计(日

本岛津公司)。

2 方法^[2]

2.1 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤模型的建立与观察 小鼠60只,实验动物适应性饲养3d,按性别体重分层随机分为6组,分别为正常组和模型组,给予 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 的蒸馏水;阳性药组(联苯双酯滴丸)($0.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$);桑椹提取物低、中、高剂量组(1.525,3.050,6.100 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),各组连续ig 7d,期间对实验动物称重2次。于实验第6天,将各组动物隔夜禁食不禁水16h,正常组小鼠ip 橄榄油 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,其他各给药组小鼠ip 0.1%的 CCl_4 (橄榄油配制) $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,注射橄榄油与 CCl_4 后4h后末次给药。末次给药24h后,处死动物取血,全血放入离心管中, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10min,分离血清,用全自动生化仪测定AST,ALT活性。同时剖取肝脏,计算脏器系数,并用10%甲醛溶液固定,制作切片,苏木素-伊红(HE)染色,进行病理学检查,病理评分标准:分别记录每只动物每个视野各种病变所占视野的面积,将各种病理变化的得分相加,肝细胞坏死评分2倍计入,以总分进行统计结果分析。

2.2 乙醇诱导的小鼠急性肝损伤模型的建立与观察 小鼠60只,实验动物适应性饲养3d,按性别体重分层随机分为6组,分别为正常组, $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 的蒸馏水+蒸馏水 $0.012 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$;模型组, $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 的蒸馏水+50%的乙醇 $0.012 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,阳性药(联苯双酯滴丸)组($0.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)+50%乙醇 $0.012 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$;桑椹提取物低、中、高剂量组(1.525,3.050,6.100 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)分别+50%乙醇 $0.012 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,各组连续ig 给药3d,正常组日2次ig 蒸馏水间隔2h,其余各组给药与给乙醇间隔2h。于实验第3天结束后,禁食不禁水12h,处死动物,剖取肝脏,计算脏器系数,取小鼠肝脏0.4g左右,按质量体积比1:9加生理盐水制成10%的肝匀浆,按试剂盒说明测定组织中MDA,SOD,TG含量,其余肝脏

用 10% 甲醛溶液固定,制作切片,HE 染色,进行病理学检查,病理评分标准:分别记录每只动物肝脏细胞的病理变化,观察脂滴在肝脏的分布、范围和面积,以评分进行统计结果分析。

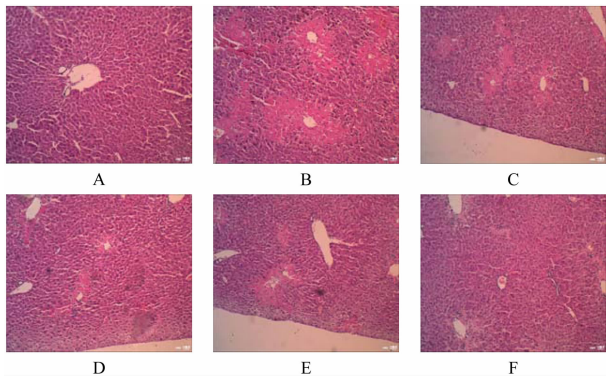
2.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间差采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 桑椹提取物对 CCl₄ 致肝损伤小鼠体重,ALT,AST 及肝脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体重/g	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	肝脏系数/%
正常	-	32.2 ± 2.4	136.0 ± 18.1	57.5 ± 7.0	5.31 ± 0.50
模型	-	27.4 ± 2.7 ¹⁾	570.0 ± 181.3 ¹⁾	580.3 ± 146.0 ¹⁾	5.50 ± 0.27
联苯双酯滴丸	0.40	28.3 ± 3.1	341.2 ± 100.4 ²⁾	301.2 ± 136.4 ²⁾	5.22 ± 0.96
桑椹提取物	1.525	26.9 ± 2.6	482.1 ± 131.1	501.7 ± 176.1	5.10 ± 0.55
	3.050	27.2 ± 4.1	462.5 ± 53.5	440.5 ± 86.9	5.30 ± 0.54
	6.100	28.2 ± 2.3	427.4 ± 85.2 ²⁾	404.3 ± 58.2 ²⁾	5.67 ± 0.31

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.1.2 对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝脏组织病理学的影响 正常组可见肝细胞形态基本正常,模型组小鼠肝脏可见肝小叶中央静脉周围肝细胞部分坏死,肝细胞气球样变、胞浆嗜伊红增强、水样变性,部分可见散在脂质空泡;桑椹提取物给药组低、中、高剂量小鼠肝脏病变程度与模型组比较有轻微的改善,高剂量组尤为明显($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 联苯双酯滴丸组;D. 桑椹 1.525 g·kg⁻¹组;E. 桑椹 3.050 g·kg⁻¹组;F. 桑椹 6.100 g·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 桑椹提取物对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig.1 Effects of Mori Fructus on liver tissue pathology of CCl₄ induced liver injury in mice (HE, ×200)

3.2 对乙醇致肝损伤小鼠的保护作用

3.2.1 对乙醇致肝损伤小鼠体重, TG, MDA, GSH 及肝脏系数的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝

3 结果

3.1 对 CCl₄ 致肝损伤小鼠的保护作用

3.1.1 对 CCl₄ 致肝损伤小鼠体重, ALT, AST 及肝脏系数的影响 与正常组比较,模型组小鼠体重明显降低,小鼠血清中 ALT, AST 水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,桑椹提取物高、中、低剂量组明显降低 ALT, AST 水平,其中桑椹提取物高剂量组较为明显($P < 0.01$)。见表 1。

组织 TG 和 MDA 明显升高($P < 0.05, P < 0.01$), GSH 明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,桑椹提取物中、高剂量组明显降低 TG 含量($P < 0.05$),桑椹提取物中、高剂量组与模型组比较明显降低 MDA ($P < 0.01$);桑椹提取物低、中、高剂量组 GSH 与模型组比较均显著升高($P < 0.01$)。见表 2。

3.2.2 对乙醇致肝损伤小鼠肝脏组织病理学的影响 正常组可见肝细胞形态基本正常,造模小鼠出现急性肝损伤反应,肝脏可见部分肝细胞内含有脂滴;其中联苯双酯滴丸组小鼠肝脏病变程度与模型组比较有轻微的改善,桑椹提取物给药高剂量组小鼠肝脏病变程度与模型组比较有明显改善($P < 0.01$)。见图 2。

4 讨论

CCl₄ 是进入小鼠体内,通过细胞色素 P450 将 CCl₄ 分解为 CCl₃ 自由基,能选择性地损伤小叶中央区的肝细胞,引起脂质过氧化反应,破坏细胞膜结构,使肝细胞变性坏死,细胞内转氨酶、自由基渗入血液而活性升高^[3-5]。

乙醇代谢过程中产生的乙醛可作为黄嘌呤氧化酶的底物激活黄嘌呤氧化酶,使超氧阴离子和自由基生成增加,引起脂质过氧化,使细胞质膜磷脂溶解,破坏膜的结构和通透性,使 Ca²⁺ 内流增加,排出受阻, Ca²⁺ 在细胞内、线粒体和核内储留,激活酶类,损坏细胞的结构和功能,甚至最终引起细胞死

表 2 桑椹提取物对乙醇致肝小鼠损伤体重, TG, MDA 和 GSH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Mori Fructus on weight, TG, MDA and GSH of alcohol induced liver injury in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	体重/g	肝脏系数/%	TG/nmol·g ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹	GSH/μmol·g ⁻¹
正常	-	24.0 ± 2.8	5.9 ± 0.4	12.46 ± 1.88	13.47 ± 4.93	39.12 ± 17.05
模型	-	24.1 ± 2.8	5.9 ± 0.5	19.42 ± 8.93 ¹⁾	24.56 ± 5.36 ¹⁾	20.07 ± 10.43 ¹⁾
联苯双酯滴丸	0.40	22.6 ± 2.5	5.8 ± 0.5	16.78 ± 4.91	17.18 ± 8.31 ²⁾	31.13 ± 14.12
桑椹提取物	1.525	24.0 ± 2.0	5.7 ± 0.6	14.68 ± 4.29	21.93 ± 14.72	46.50 ± 25.90 ³⁾
	3.050	23.2 ± 2.1	5.6 ± 0.4	12.96 ± 1.89 ²⁾	15.46 ± 4.51 ³⁾	42.51 ± 18.54 ³⁾
	6.100	23.1 ± 1.7	5.6 ± 0.7	12.29 ± 1.99 ²⁾	13.34 ± 8.96 ³⁾	55.32 ± 31.44 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.01;与模型组比较²⁾ P < 0.05, ³⁾ P < 0.01。

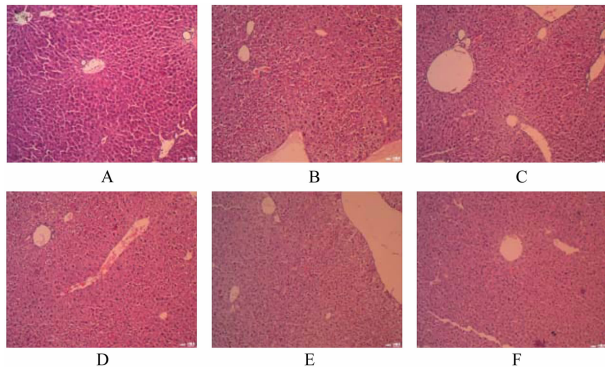


图 2 桑椹提取物对乙醇致肝损伤小鼠肝脏组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig.2 Effects of Mori Fructus on liver tissue pathology of alcohol induced liver injury in mice (HE, ×200)

亡^[6-7]。乙醇对肝脏毒性作用的机制有很多,目前认为大量或高浓度的乙醇进入机体后,首先在肝脏微粒体中被代谢成乙醛,之后进一步被氧化成乙酸,使得 ADH/NAD⁺ 比率增大。TG 是乙醇肝损伤的一个特征指标,乙醇在肝脏内代谢过程中,导致 NADH/NAD⁺ 比率失调,使脂肪酸的氧化及 TG 的转运受到抑制,致使 TG 含量升高。乙醇经 CYP2E1 代谢时,伴随产生大量的氧自由基,消耗众多的还原性保护物质如 GSH,引起脂质过氧化反应,导致肝损伤,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中发挥作用,GSH 量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素^[8]。

本次实验结果表明,桑椹提取物能降低 CCl₄ 引

起的 ALT,AST 升高,能降低乙醇肝损伤模型小鼠肝组织中过氧化脂质降解产物 MDA 的含量,增加 GSH 的含量,降低 TG 的含量。因此,桑椹提取物对 CCl₄ 和乙醇导致的小鼠肝损伤有良好的保护作用。

[参考文献]

[1] 李冬香,陈清西. 玉热买功能成分及其开发利用研究进展[J]. 中国农学通报,2009,25(24):293-297.

[2] 国家食品药品监督管理局食品许可司. 保健食品审评专家培训资料汇编[M]. 2011:169-176.

[3] 孙设宗,唐微,张红梅,等. 镁离子、山药多糖对四氯化碳肝损伤的保护作用[J]. 中国现代医学杂志,2009,19(18):2780-2783.

[4] 陈明,王英锋. 肝毒清复方对 BCG/LPS 所致小鼠免疫性肝损伤免疫功能的影响[J]. 中国医药学报,2004,19(5):273-275.

[5] 赵敏,杨杏芬,池莉平,等. 小鼠急性四氯化碳肝损伤模型的建立及在保健食品筛选中的应用[J]. 华南预防医学,2002,28(5):5-8.

[6] 周俊英,姚树坤. NADPH 氧化酶在酒精性肝病发病机制中的作用[J]. 中华肝脏病杂志,2005,13(8):633-635.

[7] 周俊英,周东方,王玮. 缺氧诱导因子 1 及下游 NADPH 氧化酶在酒精性肝病大鼠肝组织中的表达及意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2010,19(3):263-268.

[8] 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.

[责任编辑 周冰冰]