

桑叶黄酮对四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤保护作用

周军¹, 张福华²

(1. 驻马店市卫生学校, 河南 驻马店 463000; 2. 漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002)

[摘要] 目的: 探讨桑叶黄酮对四氯化碳(CCl₄)致小鼠急性肝损伤的保护作用。方法: 小鼠随机分为空白组, 模型组, 联苯双酯 100 mg·kg⁻¹组、桑叶黄酮 200, 400, 800 mg·kg⁻¹组, 连续 ig 给药 14 d, 1 次/d。电镜观察 CCl₄ 急性肝损伤模型小鼠肝组织形态学变化, 分光光度法测定小鼠血清中门冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT), 肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力及丙二醛(MDA)含量。结果: 桑叶黄酮能显著降低 CCl₄ 所致小鼠血清 ALT 和 AST 活性的升高($P < 0.01$), 并能显著升高 SOD 和 GSH-Px 活性($P < 0.01$), 降低 MDA 含量($P < 0.01$), 保护肝细胞。结论: 桑叶黄酮对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤有很强的保护作用。

[关键词] 桑叶黄酮; 急性肝损伤; 四氯化碳

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0269-04

[doi] 10.11653/syjf2013150269

Protection Effects of Flavonoids from *Morus alba* Leaves on Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Mice

ZHOU Jun¹, ZHANG Fu-hua²

(1. Zhumadian Health School, Luohe 463000, China;

2. Luohe Medical College, Luohe 462002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protection effects of Flavonoids extraction from *Morus alba* leaves (FE) on carbon tetrachloride (CT) induced liver injury mice and investigate the possible mechanisms. **Method:** Kunming mice were randomized into six groups ($n = 10$, each), The blank group, the model group, bifendate group (100 mg·kg⁻¹), high dose of FE group (200 mg·kg⁻¹), middle dose of FE group (400 mg·kg⁻¹) and low dose of FE group (800 mg·kg⁻¹). Mice were orally administered corresponding drugs one time daily for 14 days, the same volume of saline was infused in blank group and model group. The treated groups and model group were ip given 0.15% CCl₄ in peanut oil (0.01 mL·g⁻¹) once to produce acute liver injury on the 15th day. The morphological changes of the liver tissue were observed by HE stain. the serum activity of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and content of malondialdehyde (MDA) in liver were detected by spectrophotometry. **Result:** Compared with the model group, the activity of ALT, AST and content of MDA in serum were obviously decreased ($P < 0.01$), the activity of SOD, GSH-Px were increased markedly ($P < 0.01$). **Conclusion:** FE has protective effects against acute liver injury induced by CCl₄ in mice.

[Key words] Flavonoids extraction from *Morus alba* leaves; carbon tetrachloride; acute injury of liver

桑叶中含有黄酮类, 生物碱类, 多糖类等化学物

质^[1-2]。现代研究表明, 桑叶提取液有降血糖、抗氧化、抗肿瘤等作用^[3], 其机制可能与抗氧化有关^[4]。为进一步研究桑叶黄酮的功效, 本研究初步探讨了桑叶黄酮对 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用, 并阐述可能的机制, 为桑叶黄酮的进一步研究提

[收稿日期] 20121109(002)

[第一作者] 周军, 讲师, 从事中药有效成分分离活性鉴定工作, Tel: 13783327993, E-mail: zhoujun007@163.com

供理论依据。

1 材料

1.1 药材与试剂 桑叶(1 月份,采自漯河)经漯河医学高等专科学校任亮副教授鉴定为桑树 *Morus alba* L. 的叶。冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,批号 20110722。CCl₄(北京化学试剂公司,批号 20091110),联苯双酯(北京协和药厂,批号 11020980),其他试剂均为市售分析纯。

1.2 动物 昆明种小鼠 60 只,雌雄各半,体重(20±2)g,SPF 级,由河南省实验动物中心提供,许可证号 SCXK(豫)2005-008。

1.3 仪器 722s 型分光光度仪(上海第三分析仪器厂),RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),BT25S 型电子天平(赛得利斯集团,德国),HH-8 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司),CKX41 型荧光倒置显微镜(Olympus 公司)。

2 方法

2.1 桑叶黄酮的提取 桑叶→烘干→粉碎→乙醇回流→抽滤→粗提黄酮→树脂 AB-8→乙醇洗脱→黄酮。

2.2 正交试验方案设计 桑叶黄酮的提取受很多因素影响,在查阅资料的基础上^[4-5],以浸提温度 A,提取时间 B,乙醇浓度 C,物料比 D 4 种因素,每个因素设 3 个水平进行 L₉(3⁴)正交试验设计。设计见表 1。

表 1 L₉(3⁴)正交试验因素水平

水平	因素			
	A/℃	B/h	C/%	D/g·mL ⁻¹
1	60	1	50	10
2	70	2	60	15
3	80	3	75	20

2.3 动物分组与药物处理 小鼠统一条件饲养 3 d 后,随机分为 6 组:空白对照组(生理盐水),模型组(生理盐水),桑叶黄酮低,中,高剂量组(200,400,800 mg·kg⁻¹),联苯双酯组(100 mg·kg⁻¹),每组 10 只。ig 给药,1 次/d,连续 14 d。第 14 天隔夜禁食 12 h 后,各组小鼠以 0.15% CCl₄ 花生油溶液 10 mL·kg⁻¹ip,空白对照组给予等量花生油。24 h 后摘眼球取血(取血前 12 h 禁食不禁水)。然后处死小鼠,取肝脏称重,冷生理盐水冲洗干净,制备肝组织匀

浆,测定各项指标。

2.4 肝病理学观察 观察肝脏颜色、形态,留取肝右叶约 5 mm×5 mm×3 mm,放入甲醛溶液固定,常规制片,HE 染色,光镜下观察肝组织形态学变化。

2.5 血清 ALT,AST 及肝脏 SOD,MDA,GSH-Px 活性测定 按试剂盒说明书进行。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 15.0 软件统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 桑叶黄酮的提取纯化工序筛选 从正交试验看出,影响因素的主次顺序为 A > C > D > B,也就是温度对提取效率影响最大,其次为料液比、乙醇浓度、提取时间。试验确定桑叶总黄酮的最佳提取工艺 A₃B₁C₃D₂,即在浸提温度 80℃,75%乙醇,物料比为 15,回流提取 2 次,每次 1.5 h 提取 1 h。得率为 18.64%。见表 2。

表 2 桑叶黄酮类物质提取工艺正交试验

No.	A	B	C	D	黄酮提取率/%
1	1	1	1	1	9.26
2	1	2	2	2	12.30
3	1	3	3	3	14.24
4	2	1	2	3	13.21
5	2	2	3	1	14.95
6	2	3	1	2	14.56
7	3	1	3	2	18.64
8	3	2	1	3	16.52
9	3	3	2	1	15.84
K ₁	11.93	13.70	13.44	13.35	
K ₂	14.24	14.59	13.78	15.17	
K ₃	17.00	15.94	15.94	14.66	
R	5.07	1.18	2.50	1.82	

3.2 肝组织形态学观察 对照组小鼠肝脏呈健康的红褐色,光泽鲜亮且有弹性,镜下可见肝小叶结构清晰,肝细胞形态正常,细胞核大而圆。模型组小鼠肝脏色泽无光,表明粗糙,镜下观察有一部分肝细胞体积增大,中央静脉周围的肝细胞成片坏死,小叶结构紊乱。桑叶黄酮低剂量组和模型组相比,坏死区域要小,但肝细胞仍部分肿大。联苯双酯组、桑叶黄酮中、高剂量组肝脏轮廓相对完整,颜色相对正常,镜下见没有明显细胞坏死,但仍然出现轻度水肿。结果显示 桑叶黄酮对小鼠 CCl₄ 肝损伤具有明显的保护作用。见图 1。

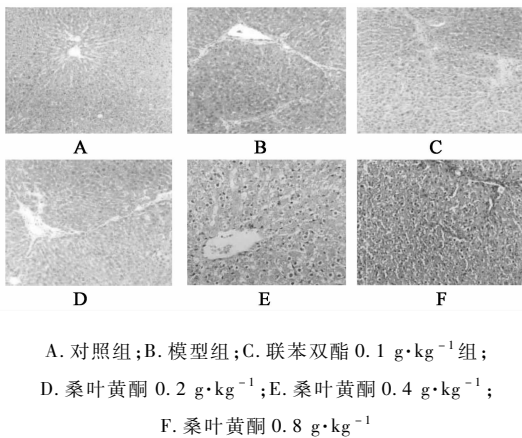


图1 桑叶黄酮对模型小鼠肝脏病变的影响(HE染色, ×100)

3.3 对模型小鼠血清中AST和ALT水平的影响

模型组小鼠血清ALT, AST活性与正常组相比明显升高,说明造模成功。与模型组相比,桑叶黄酮高、中、低剂量能明显降低ALT, AST活性,并呈剂量依赖关系。结果提示桑叶黄酮对CCl₄导致的肝细胞损伤有一定保护作用。见表3。

表3 桑叶黄酮对肝损伤小鼠血清ALT和AST水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$) U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT	AST
正常	-	62.35 ± 15.36	48.68 ± 12.79
模型	-	352.21 ± 75.28 ²⁾	254.12 ± 21.23 ²⁾
联苯双酯	0.1	146.39 ± 48.47 ⁴⁾	159.54 ± 21.03 ⁴⁾
桑叶黄酮	0.2	225.89 ± 58.95 ³⁾	179.36 ± 42.39 ⁴⁾
	0.4	186.17 ± 41.08 ⁴⁾	146.80 ± 19.36 ⁴⁾
	0.8	102.58 ± 15.72 ⁴⁾	124.32 ± 28.99 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表4同)。

3.4 对小鼠肝组织SOD, GSH-Px活性及MDA含量的影响 模型组小鼠肝组织SOD, GSH-Px活性比正常组显著降低($P < 0.01$), MDA水平明显增加($P < 0.05$),造模成功。与模型组比较,桑叶黄酮中、高剂量组小鼠肝组织MDA含量显著降低($P < 0.01$),肝组织SOD, GSH-Px活性显著升高($P < 0.01$)。结果提示,桑叶黄酮水提物能显著抵抗CCl₄导致的肝损伤小鼠肝组织中MDA的升高,同时能显著抑制肝组织中SOD, GSH-Px活性的降低。显示桑叶黄酮有比较强的抗氧化能力。

4 讨论

正交试验确定桑叶黄酮的最佳提取条件是浸提温度80℃, 75%乙醇,物料比为15,回流提取2次,每次1.5h提取1h。得率为18.64%。

表4 桑叶黄酮对肝损伤小鼠肝组织SOD, GSH-Px活性及MDA含量影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD /U·g ⁻¹	GSH-Px /U·g ⁻¹	MDA /pmol·g ⁻¹
正常	-	163.98 ± 21.30	197.19 ± 24.83	5.23 ± 1.14
模型	-	71.09 ± 5.28 ²⁾	91.05 ± 9.53 ²⁾	8.26 ± 1.23 ¹⁾
联苯双酯	0.1	139.17 ± 17.47 ⁴⁾	169.35 ± 8.69 ⁴⁾	7.34 ± 1.08
桑叶黄酮	0.2	85.34 ± 58.95	123.02 ± 12.08	7.64 ± 1.32
	0.4	98.52 ± 4.02 ⁴⁾	138.56 ± 14.58 ⁴⁾	6.84 ± 1.25 ⁴⁾
	0.8	122.55 ± 5.92 ³⁾	165.21 ± 7.64 ⁴⁾	6.27 ± 1.89 ⁴⁾

CCl₄肝损伤模型是筛选具有保肝降酶作用药物的常用模型之一。研究表明CCl₄一方面在肝脏经细胞色素P₄₅₀激活为·CCl₃自由基和·Cl自由基。这2种自由基会攻击肝细胞膜上的磷脂分子,然后和位于细胞膜上的脂质和蛋白质大分子进行共价结合,引起蛋白质代谢障碍,引起脂质过氧化反应,从而破坏膜的完整性,导致细胞内酶外流。所以转氨酶ALT, AST可以在一定程度上反映肝细胞的损伤程度,另一方面·CCl₃抑制细胞膜和微粒体膜上钙泵活性,引起钙离子内流^[6-9]。在这2种作用下,导致肝细胞膜的变化,继而引起生化指标改变。SOD, GSH-Px是体内重要的抗氧化物质,可以清除自由基,减弱氧化应激状态。MDA为脂质过氧化物,其含量越高,说明肝细胞膜脂质过氧化越强。本研究发现桑叶黄酮能明显降低CCl₄诱导的血清ALT, AST的增高,并和剂量有一定关系。研究还发现桑叶黄酮能显著抑制SOD, GSH-Px的降低同时也一直MDA含量的增加。机制可能与黄酮直接清除自由基作用有关。提示桑叶黄酮对CCl₄所致肝细胞损伤的保护作用。

[参考文献]

- [1] 刘利,殷志琦,张现涛,等. 桑叶几种化学物质的分离鉴定[J]. 蚕业科学, 2005, 31(3): 331.
- [2] 刘利,殷志琦,张雷红,等. 桑叶次生代谢产物分析[J]. 蚕业科学, 2005, 31(4): 413.
- [3] 赵保胜,高晓燕,刘洋,等. 桑叶治疗2型糖尿病药效及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 263.
- [4] 王芳,乔璐,淡小艳,等. 桑叶黄酮的提取及抗氧化研究[J]. 广东农业科学, 2011(15): 76.
- [5] 迟晓喆,曹光群. 桑叶总黄酮的提取及其抑菌活性研究[J]. 林产化学与工业, 2012, 3(2): 163.

血必净注射液对宫内感染致早产脑损伤仔鼠脑 TNF- α 和 GFAP 表达的影响

马丙祥^{1,2*}, 党伟利¹

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000; 2. 南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] 目的: 观察血必净注射液对宫内感染致早产脑损伤仔鼠脑组织肿瘤坏死因子(TNF- α)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达的影响。方法: ① 12 只孕第 16 天脂多糖(LPS)组大鼠予 LPS 450 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip, 连续 2 d, 8 只生理盐水组孕鼠等量生理盐水 ip。孕 22 d 前分娩的仔鼠为早产仔鼠。随机选取生理盐水组足月产仔鼠 8 只作为空白对照组和 LPS 组早产仔鼠 24 只。LPS 组仔鼠随机分为 3 组, 每组 8 只, 分别为血必净高、低剂量(4, 2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组, 模型组。7 日龄时开始分别给予血必净注射液或生理盐水, ip, 共 14 d。② 21 日龄时对 4 组大鼠进行神经行为学检测(悬吊试验), 并取脑组织, 用免疫组化方法测定 GFAP, TNF- α 水平。结果: 与模型组比较, 血必净注射液高、低剂量组干预治疗后脑损伤仔鼠行为学方面得到改善($P < 0.05$); 与模型组比较, 血必净注射液高、低剂量组干预治疗后, 早产脑损伤仔鼠脑组织 TNF- α 阳性表达减少而 GFAP 阳性表达增加($P < 0.05$)。结论: 化瘀解毒中药血必净注射液可改善宫内感染所致早产脑损伤, 其作用机制可能与降低脑组织 TNF- α 表达和使 GFAP 表达升高有关。

[关键词] 脑性瘫痪; 宫内感染; 脑白质损伤; 胶质纤维酸性蛋白; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0272-04

[doi] 10.11653/syfy2013150272

Influence of Xuebijing Injection on Expression of GFAP and TNF- α During Cerebral Damage in the Prematured Neonatal Rat Induced by Intrauterine Infection

MA Bing-xiang^{1,2*}, DANG Wei-li¹

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;
2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of Xuebijing injection on expression of glial fibrillary acidic

[收稿日期] 20120728(006)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2010B360011)

[通讯作者] * 马丙祥, 在读博士, 教授, 从事小儿神经系统疾病防治工作, Tel: 0371-66211081, E-mail: mbx1963@126.com

- [6] Anke Buchholz, Christine Laskov, Stefan B. Haderlein. Effects of zwitterionic buffers on sorption of ferrous iron at goethite and its oxidation by CCl_4 [J]. Environ Sci Technol, 2011, 45(8): 3355.
- [7] San-Qiang Li, Hong-Ye Meng, Shou-Min Xi, et al. The effect of CCl_4 -induced acute liver injury on the ADAM8 expression in the mice [C]. ICBE '12 Proceedings of the 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology, 2012, 23(7): 589
- [8] 赵艳玲, 蔡光明, 刘军, 等. 正交试验法优选小鼠四氯化碳肝损伤模型 [J]. 解放军药理学学报, 2011, 17(4): 215.
- [9] 郭又嘉, 蒙明瑜, 焦扬, 等. 玉郎伞黄酮对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 198.
- [10] 刘协, 顾呈华, 胡启之, 等. 甘草甜素脂质体对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(36): 8260.

[责任编辑 李玉洁]