

鬼针草总黄酮对 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠的保护作用

程新燕*

(广西壮族自治区人民医院, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**研究鬼针草总黄酮(TFB)对急性肝损伤小鼠的保护作用。**方法:**以 *D*-半乳糖胺盐酸盐(*D*-GalN) ip 建立小鼠急性肝损伤模型。小鼠随机分为 5 组:模型组、联苯双酯阳性药组($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、TFB 低、中、高剂量组(60, 120, 240 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 并设正常对照组。连续 ig 给药 7 d 后造模, 24 h 后测量各组小鼠胸腺、脾脏和肝脏指数。比色法检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、门冬氨酸转氨酶(AST)以及碱性磷酸酶(AKP)活性, 血清白蛋白(Alb)含量以及总抗氧化能力(T-AOC), Western blot 法检测肝脏中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达。HE 染色观察肝组织病理学改变。**结果:**与模型组比较, TFB 能明显提高 *D*-GalN 致急性肝损伤小鼠胸腺、脾脏、肝脏指数($P < 0.01$), 同时降低血清中 ALT, AST, AKP 活性($P < 0.01$), 并增加 Alb, T-AOC 含量($P < 0.01$), 降低 iNOS 的表达($P < 0.01$), 并减轻肝损伤程度。**结论:**鬼针草总黄酮对 *D*-GalN 所致急性肝损伤小鼠有一定保护作用, 其机制可能与抗氧化作用和抑制细胞毒作用有关。

[关键词] 鬼针草总黄酮; 肝损伤; 抗氧化作用; 一氧化氮合酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0268-04

[doi] 10.11653/syfy2013140268

Protective Effect of Total Flavonoids of Bidens on Acute Liver Injury Induced by *D*-GalN in Mice

CHENG Xin-yan*

(The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of the total flavonoids of bidens (TFB) on the *D*-GalN induced acute liver injury in mice. **Method:** Acute liver injury in mice was established by intraperitoneal injection of *D*-GalN. The mice were randomly divided into five groups: model group, bifendate group ($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), low, medium, high-dosage groups of TFB (60, 120, 240 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). A normal control group was set up also. The index of thymus, spleen and liver were measured. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (AKP), serum contents of albumin (Alb) and total antioxidant capacity (T-AOC) were examined using colorimetric detection. And the expression of inducibility nitric oxide synthase (iNOS) in liver tissue was determined by western blot analysis. Pathomorphological changes in microscopic slides were observed by hematoxylin-eosin staining (HE). **Result:** Compared to model group, TFB markedly increased the index of thymus, spleen, and liver ($P < 0.01$), and lowered the serum levels of ALT, AST and AKP ($P < 0.01$), while elevated the contents of Alb, T-AOC ($P < 0.01$), down-regulated the expression of iNOS ($P < 0.01$), and alleviated the liver damage condition. **Conclusion:** The total flavonoids of bidens has protective effect on the *D*-GalN induced liver injury in mice. The mechanism may be related to antioxidation and inhibition of cytotoxicity.

[Key words] total flavonoids of bidens; liver injure; antioxidation; iNOS

鬼针草(*Bidens bipinnata* L.)经广西中医药研究院考证为菊科植物全草,资源丰富,在民间已广

[收稿日期] 20121018(018)

[通讯作者] *程新燕,主管药师,硕士,从事肝损伤药物研究, Tel:13977184535, E-mail:chengxinyan201210@163.com

为使用。研究表明,鬼针草含生物碱、皂苷、黄酮等活性成分^[1],具有清热解毒、舒肝健脾、抗菌消炎的功效^[2]。实验发现,鬼针草提取物具有改善肝功能、提高机体免疫能力,从而增强机体抵抗肝炎病毒的能力^[3]。本实验拟采用 *D*-半乳糖胺盐酸盐(*D*-GalN)复制急性肝损伤小鼠模型,探讨鬼针草总黄酮(TFB)对 *D*-GalN 所致肝损伤小鼠的干预机制。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,SPF 级,雌雄各半,体重 18~20 g,由广西医科大学动物实验中心提供。动物使用许可证 SCXK(桂)2009-0002。常规鼠饲料喂养,自由饮水。

1.2 药物与试剂 *D*-GalN(成都贝斯特试剂有限公司,批号 BRS120936),联苯双酯(武汉第四制药厂,批号 120604),丙氨酸转氨酶(ALT)、门冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(批号 20120916)、碱性磷酸酶(AKP)、血清白蛋白(Alb)以及总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒(批号 20120908),均为南京建成生物工程研究所,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA)ELESA 测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 120921),SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术研究所,批号 DZ12094),多克隆抗体(批号 SC-1236),HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体(批号 SC-1258)。均为 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.3 仪器 DFM-96 型多管放射免疫计数器(众成机电技术公司),DDL-5 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),WBZ-2 型微波真空干燥机(贵阳新奇微波工业有限责任公司),722S 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限责任公司),DMR + 550 型病理图像分析仪(德国莱卡公司),垂直电泳仪、转膜及显影设备(Bio-Rad 公司)。酶联免疫分析仪(美国 Thermo Forma 公司)。

2 方法

2.1 鬼针草总黄酮提取^[4] 鬼针草粗粉 500 g,加 80% 乙醇 4 500 mL,回流 3 次,每次 3 h,趁热过滤,滤液经旋转蒸发器减压浓缩,将浓缩物溶解后,高速离心 10 min,重复 3 次,所得沉淀物加适量 95% 乙醇溶解后过滤,滤液用 1:3 石油醚萃取,弃上层醚相,萃取液用旋转蒸发器浓缩,再经蒸发皿用水浴蒸发至析出沉淀,沉淀重结晶即得鬼针草总黄酮。Sevage 法除去蛋白质,以芦丁作为对照品,用紫外-可见分光光度法检测总黄酮含量为 4.2 mg·g⁻¹。

2.2 急性肝损伤小鼠模型 参照文献[5]方法,各

给药组均于 7 d 末次 ig 给药 1 h 后,ip *D*-GalN (800 mg·kg⁻¹)新配置溶液诱发肝毒性,禁食不禁水 24 h 后眼球取血,并快速取肝脏保存待测。

2.3 分组及给药 将小鼠随机分为 5 组:模型组、联苯双酯阳性组(1 mg·kg⁻¹)、TFB 低、中、高剂量组(60,120,240 mg·kg⁻¹),并设正常对照组。连续 ig 给药 7 d。

2.4 观测指标 给药 7 d 后采血制备血清,处死小鼠测量各组小鼠胸腺、脾脏和肝脏指数。比色法检测血清 ALT,AST,AKP 活性,血清 Alb 含量以及总抗氧化能力(T-AOC),Western blot 法检测肝脏中 iNOS 的表达。HE 染色观察肝组织病理学改变。所有实验操作步骤均严格按照试剂盒说明书进行。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为统计有意义。

3 结果

3.1 对急性肝损伤小鼠脏器指数的影响 与正常组比较,*D*-GalN 所致的急性肝损伤小鼠胸腺、脾脏、肝脏指数明显升高($P < 0.01$)。给药后,鬼针草总黄酮各组和联苯双酯组均能降低胸腺、脾脏、肝脏等指数($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 鬼针草总黄酮对急性肝损伤小鼠脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	胸腺	脾脏	肝脏
	/mg·kg ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/%
模型	-	3.85 ± 0.87	4.58 ± 0.97	5.67 ± 1.08
正常	-	2.51 ± 0.46 ¹⁾	3.42 ± 0.58 ¹⁾	4.29 ± 0.61 ¹⁾
鬼针草总黄酮	60	3.42 ± 0.71 ¹⁾	4.19 ± 0.82 ¹⁾	5.26 ± 0.87 ¹⁾
	120	3.18 ± 0.62 ¹⁾	3.81 ± 0.73 ¹⁾	4.95 ± 0.79 ¹⁾
	240	2.73 ± 0.51 ¹⁾	3.68 ± 0.62 ¹⁾	4.48 ± 0.65 ¹⁾
联苯双酯	120	2.92 ± 0.54 ¹⁾	3.72 ± 0.68 ¹⁾	4.61 ± 0.71 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

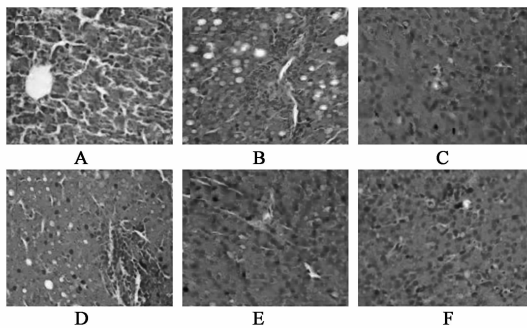
3.2 对急性肝损伤小鼠肝功能的影响 与正常组比较,*D*-GalN 所致急性肝损伤小鼠血清 ALT,AST,AKP 明显升高,而 Alb, T-AOC 水平均降低($P < 0.01$)。与模型组比较,鬼针草总黄酮各组和联苯双酯组小鼠血清 ALT,AST,AKP 水平明显降低,而 Alb, T-AOC 水平升高($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对急性肝损伤小鼠肝组织病变的影响 HE 染色发现,正常小鼠肝小叶肝细胞排列整齐有序,细胞质丰富,核仁明显,细胞数量较多。急性损伤小鼠肝小叶结构紊乱,胞浆有水样变性并发空泡变性。

表 2 鬼针草总黄酮对急性肝损伤小鼠肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	AKP/U·L ⁻¹	Alb/g·L ⁻¹	T-AOC/U·mL ⁻¹
模型	-	112.86 ± 5.26	105.36 ± 9.82	50.14 ± 9.86	11.25 ± 1.84	7.95 ± 1.86
正常	-	47.92 ± 3.05 ¹⁾	61.48 ± 4.05 ¹⁾	29.62 ± 5.79 ¹⁾	30.82 ± 4.36 ¹⁾	18.69 ± 4.13 ¹⁾
鬼针草总黄酮	60	82.59 ± 4.78 ¹⁾	95.17 ± 8.04 ¹⁾	42.78 ± 9.05 ¹⁾	19.45 ± 2.46 ¹⁾	9.37 ± 2.06 ¹⁾
	120	74.84 ± 4.16 ¹⁾	83.65 ± 7.26 ¹⁾	36.58 ± 8.23 ¹⁾	21.72 ± 3.09 ¹⁾	12.09 ± 3.12 ¹⁾
	240	63.28 ± 3.13 ¹⁾	71.32 ± 5.24 ¹⁾	32.04 ± 7.31 ¹⁾	25.46 ± 3.87 ¹⁾	16.74 ± 3.97 ¹⁾
联苯双酯	120	69.15 ± 3.47 ¹⁾	76.84 ± 5.59 ¹⁾	34.69 ± 7.58 ¹⁾	23.93 ± 3.63 ¹⁾	15.26 ± 3.54 ¹⁾

汇管区有明显炎细胞浸润,细胞坏死显著。鬼针草总黄酮各组 and 联苯双酯组均不同程度减轻肝细胞损伤,并伴有细胞修复或再生。其中高剂量鬼针草总黄酮效果最明显,肝细胞/结构恢复较好,中央静脉周围点状坏死减少,炎细胞浸润减轻,见图 1。



A. 正常组; B. 模型组;

C. 联苯双酯 120 mg·kg⁻¹组; D. 鬼针草总黄酮 60 mg·kg⁻¹组;

E. 鬼针草总黄酮 120 mg·kg⁻¹组; F. 鬼针草总黄酮 240 mg·kg⁻¹组

图 1 鬼针草总黄酮对小鼠肝组织病变的影响(HE 染色, ×200)

3.4 对急性肝损伤小鼠肝脏中 iNOS 蛋白表达的影响 急性肝损伤小鼠肝组织中 iNOS 蛋白表达明显增多 ($P < 0.01$)。鬼针草总黄酮各组 and 联苯双酯有效下调肝损伤小鼠的肝脏中 iNOS 蛋白表达,与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 鬼针草总黄酮对急性肝损伤小鼠肝脏中 iNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	iNOS 蛋白	
		/A	/% (iNOS/β-actin)
模型	-	0.78 ± 0.13 ¹⁾	57.9 ± 6.8
正常	-	0.19 ± 0.02	8.4 ± 1.3 ¹⁾
鬼针草总黄酮	60	0.65 ± 0.10 ¹⁾	49.4 ± 5.7 ¹⁾
	120	0.54 ± 0.07 ¹⁾	32.8 ± 4.3 ¹⁾
	240	0.36 ± 0.04 ¹⁾	24.9 ± 2.3 ¹⁾
联苯双酯	120	0.48 ± 0.05 ¹⁾	30.6 ± 2.9 ¹⁾

4 讨论

急性肝损伤是指由各种病因导致的肝脏细胞损伤,并会出现严重并发症甚至肝衰竭^[6]。肝损伤由

一系列理化因素所介导,其发生发展是各种肝病病因的主要病理状态^[7]。D-GalN 是特异性肝毒性干扰剂,能很好地复制急性肝损伤病变,并造成有关脏器的破坏以及系列酶的代谢异常^[8]。本研究显示 D-GalN 致急性肝损伤模型小鼠胸腺、脾脏、肝脏等指数明显升高,同时血清 ALT,AST,AKP 活性升高,经鬼针草总黄酮和联苯双酯干预后,能明显地逆转该功能紊乱,说明鬼针草总黄酮可有效恢复急性肝损伤小鼠的免疫和肝功能。

总抗氧化能力 (T-AOC) 是指机体抗氧化体系的整体水平,通过清除活性自由基来维持生理稳态。当肝损伤发生时,机体抗氧化能力明显降低。而血清白蛋白 (Alb) 主要由肝细胞合成,它也可以作为肝损伤监测的指标^[9]。本研究显示,肝损伤小鼠血清中 T-AOC,Alb 的含量明显降低。鬼针草总黄酮能明显提高 T-AOC,Alb 水平。提示鬼针草总黄酮能通过增强机体抗氧化能力来保护肝脏组织。

内源性 iNOS 的异常表达通过介导大量 NO 释放造成肝细胞的破坏^[10]。NO 介导的肝损伤主要涉及诱发超氧化自由基对肝细胞的攻击,并干扰 DNA 的复制,触发肝细胞代谢紊乱引发相关并发症;激活 NF-κB/COX-2 途径诱导系列炎症反应^[11-12]。因此,抑制 iNOS 的活性是对抗急性肝损伤的有效策略之一。本研究结果表明,肝损伤小鼠肝组织中 iNOS 蛋白表达明显上调,推测其介导肝损伤而造成肝功能障碍。鬼针草总黄酮能有效减少肝组织中 iNOS 蛋白水平,逆转 NO 对肝脏的细胞毒作用,从而恢复肝功能。

[参考文献]

[1] 李勇,蒋海强,巩丽丽. 基于顶空静态进样技术的中药鬼针草挥发性成分 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(20):70.
[2] 黄桂红,邓航,付翔,等. 鬼针草醇提物对糖尿病小鼠糖耐量及胸腺、脾脏指数的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):183.

虫草菌丝水煎液及其有效组分 C12 对肝纤维化大鼠 HGF- α 及肝细胞凋亡的影响

李风华¹, 刘平^{2*}, 王春树², 张幸¹

(1. 上海中医药大学科技实验中心, 上海 201203;

2. 上海中医药大学肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

[摘要] 目的: 研究虫草菌丝治疗二甲基亚硝胺(DMN)模型大鼠肝纤维化有效组分及其作用机制。方法: 大鼠 ip 0.5% DMN 5 mg·kg⁻¹, 每周连续 3 d, 共 4 周。造模结束后, 模型大鼠随机分组, 治疗组分别以虫草菌丝水煎液(CsB)及其组分(C12)以生药 800 mg·kg⁻¹ ig, 每日 1 次, 共 2 周; 正常组及模型组以等量生理盐水 ig。疗程结束后, 分别检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)及天冬氨酸转氨酶(AST), 血清白蛋白(Alb)及血清总胆红素(TBil)含量, 检测肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量、观察肝组织病理及胶原沉积变化, Western 印迹法检测肝细胞生长因子 α (HGF- α) 的表达, TUNEL 染色检测大鼠肝细胞凋亡并计算凋亡数量。结果: 与 6 周模型组比较, CsB 及 C12 治疗组大鼠血清 ALT, AST 活性, TBil 含量和大鼠肝组织 Hyp 含量显著降低, Alb 含量显著升高($P < 0.05$)。与 6 周模型组比较, CsB 及 C12 治疗组的坏死出血、炎性细胞浸润、胶原增生、纤维间隔形成有所改善。与模型组比较, CsB 及 C12 治疗组大鼠肝组织的蛋白表达量显著升高($P < 0.01$)。与 6 周模型组比较, CsB 及 C12 治疗组大鼠肝细胞凋亡数量显著降低($P < 0.01$)。结论: CsB 及 C12 能够显著改善肝功能, 有显著抗肝纤维化作用。CsB 和 C12 能促进 HGF- α 表达, 抑肝细胞凋亡, 使肝细胞凋亡和增殖达到平衡状态, 阻断和逆转肝纤维化。

[关键词] 肝纤维化; 虫草菌丝; 有效组分; 肝细胞生长因子; 肝细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0271-05

[doi] 10.11653/syfyj2013140271

[收稿日期] 20130122(009)

[基金项目] 上海市科委自然科学基金(12ZR1431700); 上海市教育委员预算内科研项目(2010JW25); 上海市教育委员会 E 研究院建设计划项目(E03008); 上海市医学领军人才项目(2007A 卫 01); 上海市卫生局中医药科研基金(2012J007A)

[第一作者] 李风华, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药及其复方有效物质基础的研究, Tel: 021-5132391, E-mail: lfh@hotmail.com

[通讯作者] * 刘平, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合治疗肝病的临床及机制研究, Tel: 021-51322391, E-mail: liuliver@vip.sina.com

- [3] 邵毅, 余瑶, 黄国栋, 等. 鬼针草治疗更年期女性中重度干眼症临床研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2985.
- [4] 许慧, 陈飞虎, 邵旭. 鬼针草总黄酮提取工艺中试研究[J]. 安徽医药, 2012, 16(6): 738.
- [5] 徐雪钰, 于珊, 胡克章, 等. 灵五颗粒对 D-半乳糖胺盐酸盐致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 解放军药学学报, 2010, 26(5): 413.
- [6] Wlodzimirow K A, Eslami S, Abu-Hanna A, et al. A systematic review on prognostic indicators of acute on chronic liver failure and their predictive value for mortality[J]. Liver Int, 2012, 19(10): 1478.
- [7] Wlodzimirow K A, Eslami S, Abu-Hanna A, et al. Systematic review: acute liver failure one disease, more than 40 definitions[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 35(11): 1245.
- [8] Lu Y, Bao X, Sun T, et al. Triptolide attenuate the oxidative stress induced by LPS/D-GalN in mice[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(3): 1022.
- [9] Musana K A, Yale S H, et al. Abdulkarim AS Tests of liver injury[J]. Clin Med Res, 2004, 2(2): 129.
- [10] Hsu C M, Wang J S, Liu C H, et al. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism[J]. Shock, 2002, 17(4): 2803.
- [11] Abrams G A, Trauner M, Nathanson M H. Nitric oxide and liver disease [J]. Gastroenterologist, 1995, 3(3): 2209.
- [12] Chen T, Zamora R, Zuckerbraun B, et al. Role of nitric oxide in liver injury [J]. Curr Mol Med, 2003, 3(6): 5192.

[责任编辑 李玉洁]