

忍冬叶总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用

马俊利^{1*}, 商克勇², 周艳红¹

(1. 唐山职业技术学院基础医学部, 河北 唐山 063004; 2. 乐亭县医院, 河北 乐亭 063600)

[摘要] **目的:** 研究忍冬叶总黄酮(TFLLJ)对四氯化碳(CCl₄)致小鼠急性肝损伤的保护作用。**方法:** 将60只昆明种小鼠随机分为正常组、模型组、TFLLJ高、中、低剂量组(400, 200, 100 mg·kg⁻¹)和联苯双酯组(150 mg·kg⁻¹), 除正常组和模型组外, 其余各组小鼠每日ig给药1次, 共10 d。末次给药1 h后, 除正常组外其余各组ip 0.1% CCl₄花生油溶液(0.01 mL·g⁻¹)1次, 造成急性肝损伤。测定血清中谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)含量, 计算肝脏指数(LI), 测定肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量, 观察肝组织病理改变。**结果:** TFLLJ(400, 200, 100 mg·kg⁻¹)剂量组可降低CCl₄致小鼠肝损伤血清中的ALT和AST($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。可降低小鼠肝组织中MDA和SOD活性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。TFLLJ各剂量组能明显改善肝组织的病理变化。**结论:** 忍冬叶总黄酮对CCl₄致小鼠急性肝损伤具有一定的保护作用, 可能与抗脂质氧化有关。

[关键词] 忍冬叶; 黄酮; 四氯化碳; 肝损伤; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0304-04

Protective Effects of Total Flavonoids from Leaves of *Lonicera japonica* on CCl₄-induced Acute Liver Injury in Mice

MA Jun-li^{1*}, SHANG Ke-yong², ZHOU Yan-hong¹

(1. Tangshan Vocational & Technical College, Tangshan 063004, China;

2. Laoting Country Hospital, Laoting 063600, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of total flavonoids from leaves of *Lonicera Japonica* (TFLLJ) on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in mice. **Method:** Sixty mice were randomly divided into six groups: the normal group, the model group, high-dose TFLLJ group (400 mg·kg⁻¹), middle-dose TFLLJ group (200 mg·kg⁻¹) and low-dose TFLLJ group (100 mg·kg⁻¹), bifendate group (150 mg·kg⁻¹). Except for normal group and model group, the other mice were orally administered corresponding drugs once per day for ten days. Then, the treated groups and model group were ip given 0.1% CCl₄ (0.01 mL·g⁻¹) once to produce acute liver injury on the tenth day. The liver injury was evaluated by the indexes of serum alanine aminotransferase (AST), aspartate aminotransferase (ALT), liver index (LI), liver superoxidedismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA), and the morphological changes of liver tissue. **Result:** FLLJ (400, 200, 100 mg·kg⁻¹) could remarkably resist the increase of ALT and AST, decrease the MDA level and could improve SOD activity ($P < 0.01$ or $P < 0.05$ versus model group). Furthermore, TFLLJ could ameliorate the hepatic pathological changes. **Conclusion:** TFLLJ have protective effects on acute hepatic injury induced by CCl₄ in mice. It may be related to its anti-oxidative effect for lipids.

[Key words] Leaves of *Lonicera japonica*; flavonoids; CCl₄; liver injury; antioxidation

忍冬叶为忍冬属忍冬的干燥叶。李时珍谓：“忍冬茎叶及花功用皆同”，具有清热解毒，疏风通

[收稿日期] 20120325(001)

[基金项目] 河北省唐山市科技局科研项目(10150204A-1)

[通讯作者] * 马俊利, 硕士, 讲师, 从事中药活性成分研究, Tel: 0315-2736327, E-mail: woshimajunli@163.com

络之功效^[1]。在前期工作中,作者对其有效成分进行了系统的提取分离^[2-3],发现忍冬叶主要含有黄酮类、有机酸类、环烯醚萜类等活性成分,其中黄酮类化合物含量较高,黄酮类化合物具有抗脂质过氧化、抗衰老、清除自由基、抗菌抑菌、增强免疫力等作用。本实验采取大孔树脂吸附法富集忍冬叶总黄酮部位,以四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型,探讨了忍冬叶总黄酮对肝脏的保护作用,为进一步开发应用忍冬叶总黄酮提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 实验用药材采自江西省,由沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定为忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥叶。忍冬叶总黄酮的制备工艺为忍冬叶用 75% 乙醇回流提取,提取液浓缩回收乙醇,配制成一定浓度的溶液后,通过 D101 大孔吸附树脂柱,用 10% 乙醇除杂,再用 50%、70% 乙醇洗脱,洗脱液干燥即得忍冬叶总黄酮提取物,采用高效液相色谱法测定其中总黄酮的含量为 80.1%。天冬氨酸转氨酶(AST),丙氨酸转氨酶(ALT),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所,批号分别为 20110520, 20110511, 20101227, 20101228;四氯化碳(CCl_4),分析纯,天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号 20100701,实验时用花生油配制成 0.1% 的花生油溶液;联苯双酯滴丸,浙江医药股份有限公司,批号 100806。

1.2 动物 昆明种小鼠 60 只,SPF 级,雌雄各半,体重 18~22 g。购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证号 SCXK-(京)2009-004。

1.3 仪器 Agilent1100 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);722S 分光光度仪(上海精密科学仪器有限公司);光学显微镜及摄像系统(日本 Nikon 公司产品);LXJ-II 型离心沉淀机(上海医用分析仪器厂)。

2 方法

2.1 动物分组和造模 小鼠 60 只,随机分为 6 组,每组 10 只,即正常组、模型组、TFLLJ 高、中、低剂量组及阳性对照组。各组每天 ig,连续 10 d。正常组和模型组给予生理盐水,阳性对照组给予联苯双酯 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,高、中、低剂量组分别给予忍冬叶总黄酮 400,200,100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。于末次给药后 1 h,除正常组外,其余各组均 ip 0.1% CCl_4 花生油溶液 0.01 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$,注射 16 h 后,眼眶静脉丛采血,离心(3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)分离血清,待测血清中 AST 和 ALT 含量。

取血后每只小鼠颈椎脱臼处死,立即剖腹,取肝组织称重,计算肝脏指数[肝重(g)/体重(g)×100%]。称取 100 mg 肝组织,加预冷生理盐水 0.9 mL 制成 10% 匀浆并离心(3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),待测肝组织 SOD 活性和 MDA 的含量。取肝大叶组织固定于 10% 福尔马林,做病理切片检查。

2.2 生化指标检测 分离得到的各组小鼠血清,按照试剂盒说明测定 ALT 和 AST 的活性。10% 肝组织匀浆离心后取上清液,按照试剂盒说明测定 SOD 活性和 MDA 的含量。

2.3 病理学检查 所取小鼠肝组织用 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察肝组织病理结构改变。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 生化指标 由表 1,2 可见,与正常组比较,模型组血清中 ALT,AST 活性和肝匀浆中 MDA 含量均显著升高,SOD 活性显著降低($P < 0.01$),说明本次实验的小鼠急性肝损伤造模成功。TFLLJ 的高、中剂量组与联苯双酯组血清 ALT,AST 与模型组比较具有显著性差异($P < 0.01$),见表 1。TFLLJ 的高、中剂量组与联苯双酯组肝匀浆中 MDA 含量及 SOD 活性与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 2。模型组小鼠的肝脏指数显著高于正常组($P < 0.01$),说明模型组肝脏增大。TFLLJ 高、中剂量组能显著降低由 CCl_4 升高的肝脏指数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 TFLLJ 对 CCl_4 致小鼠肝损伤血清 ALT, AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	剂量 $/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	ALT	AST
正常	-	59.23 ± 8.50 ²⁾	72.56 ± 3.48 ²⁾
模型	-	252.15 ± 2.34	175.20 ± 10.35
TFLLJ	400	83.66 ± 3.64 ²⁾	89.43 ± 9.78 ²⁾
	200	129.47 ± 2.59 ²⁾	96.56 ± 7.25 ²⁾
	100	195.79 ± 6.36 ¹⁾	124.56 ± 3.06 ¹⁾
联苯双酯	150	67.28 ± 4.05 ²⁾	69.78 ± 8.90 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

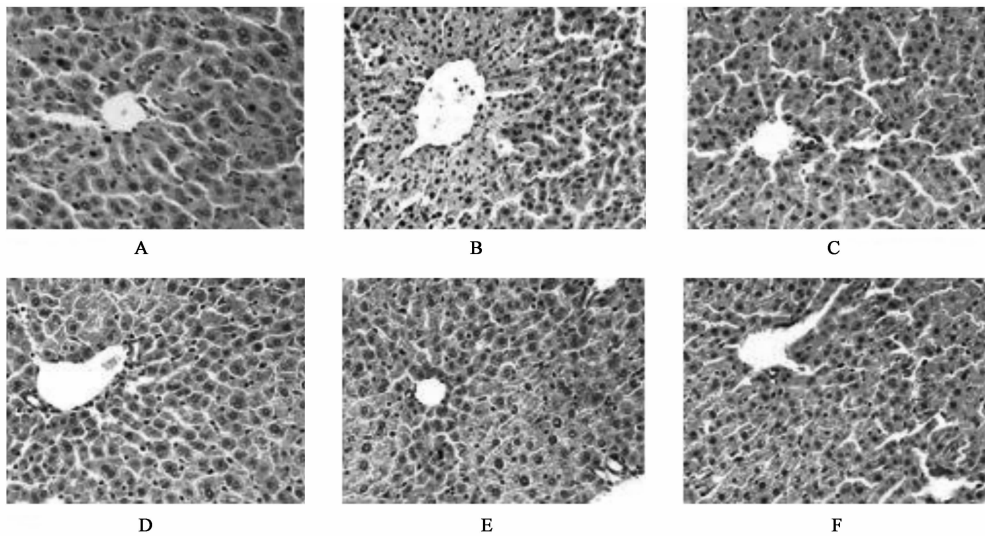
3.2 对急性肝损伤小鼠肝组织病理学的影响 病理切片结果表明,正常组小鼠肝组织结构正常,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞索、肝血窦排列规则,肝小叶结构完整,未见肝细胞变性、坏

死等病理变化。CCl₄ 模型组小鼠肝组织结构镜下可见大多数肝细胞浑浊肿胀, 细胞质疏松化, 以环中央静脉分布的肝细胞灶性或片状坏死, 伴炎性细胞

浸润等病理改变。TFLJJ 高、中剂量组的肝细胞坏死, 变性及炎性细胞浸润程度均有明显减轻, 表明 TFLJJ 高、中剂量组均有较强保护肝损伤作用。

表 2 TFLJJ 对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝组织中 SOD, MDA 和肝指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·g ⁻¹	肝脏指数 /%
正常	-	124.50 ± 9.15 ²⁾	20.78 ± 9.42 ²⁾	1.13 ± 0.21 ²⁾
模型	-	75.23 ± 4.73	48.94 ± 6.24	2.63 ± 0.46
TFLJJ	400	104.86 ± 8.65 ²⁾	19.94 ± 5.71 ²⁾	1.46 ± 0.24 ²⁾
	200	95.27 ± 3.27 ²⁾	26.52 ± 5.44 ¹⁾	1.62 ± 0.23 ¹⁾
	100	88.65 ± 7.32 ¹⁾	37.96 ± 2.27 ¹⁾	1.96 ± 0.34 ¹⁾
联苯双酯	150	102.06 ± 5.64 ²⁾	19.26 ± 8.92 ²⁾	1.44 ± 0.15 ²⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 联苯双酯 150 mg·kg⁻¹组; D. TFLJJ 400 mg·kg⁻¹组; E. TFLJJ 200 mg·kg⁻¹组; F. TFLJJ 100 mg·kg⁻¹组

图 1 忍冬叶总黄酮对肝脏组织病理学的影响(HE 染色, ×200)

4 讨论

肝损伤是多因素参与的复杂病理过程, 各种病因引起的急性肝病及有毒物质所致的肝脏损伤均可引起肝细胞炎症或坏死, 并继发纤维化的病理过程。大量研究表明, 在肝细胞病变过程中, 自由基、酶及脂质过氧化等均发挥重要作用^[4]。CCl₄ 所致急性肝损伤模型是最常用的经典模型之一^[5], 其机制为 CCl₄ 在肝内经微粒体细胞色素 P450 分解活化, 生成活泼的三氯甲基自由基和氯自由基, 导致血清中转氨酶活性显著升高, 引起急性肝损伤^[6]。本实验中 CCl₄ 使小鼠血清 ALT, AST 活性显著升高, 说明本实验急性肝损伤模型成功。实验结果显示, TFLJJ 不同剂量组均能有效降低 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 的水平, 提示 TFLJJ 具有肝脏保护作用。

自由基和过氧化物, 从而降低脂质过氧化物的生成并加速其清除, 减少其对细胞和组织的损伤。MDA 是不饱和脂肪酸过氧化作用的终产物, 可严重破坏细胞膜结构, 它在血清及组织中的含量高低, 间接反映了机体细胞受自由基攻击时组织的破坏程度。研究表明^[7], 黄酮类化合物可增强机体抗氧化能力, 减少自由基产生, 并且能提高机体清除自由基的能力。本实验结果表明, TFLJJ 高、中剂量组能显著降低肝组织 MDA 的含量, 提高了 SOD 的活性, 同时明显减轻肝细胞的变性坏死和炎性浸润等病理改变, 这些结果提示 TFLJJ 对 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤的保护作用, 可能与其通过提高机体抗氧化酶的生物合成而增加酶活力, 清除自由基抑制脂质过氧化反应, 降低脂质过氧化主要产物 MDA 的产生, 提高肝细胞抗氧化能力, 从而拮抗 CCl₄ 引起的膜脂质过氧化作用, 促进肝细胞的再生和修复有关。

SOD 是体内重要的抗氧化酶系, 其作用是清除

雷公藤多苷对糖尿病大鼠结缔组织生长因子异常表达及肾功能的影响

常景芝,王琛*,沈永杰,尤利菊,郭辉

(商丘医学高等专科学校基础医学部,河南 商丘 476100)

[摘要] 目的:研究雷公藤多苷对实验性糖尿病大鼠结缔组织生长因子(CTGF)异常表达及肾功能指标的影响,探讨其保护肾功能的机制。方法:雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组和雷公藤多苷治疗组(1.8 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,1 次/d,连续 8 周),链脲佐菌素(STZ)腹腔注射建立糖尿病大鼠模型,给药第 4,8 周末分别测定大鼠体重、血糖、血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)及 24 h 尿蛋白定量;HE 染色法观察大鼠肾脏病理学变化;免疫组化染色测定肾组织中 CTGF 蛋白表达。结果:与正常对照组比较,模型组血糖、BUN、Cr、24 h 尿蛋白定量在第 4,8 周末显著增加($P < 0.01$),肾脏 CTGF 蛋白表达增加($P < 0.01$),雷公藤多苷干预后可显著抑制模型组的病理改变($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:CTGF 表达与糖尿病肾病的进展有关,雷公藤多苷可能通过下调 CTGF 的表达,减少糖尿病大鼠尿蛋白排泄量,改善肾脏功能,延缓糖尿病肾病肾脏的损害。

[关键词] 雷公藤多苷;糖尿病肾病;结缔组织生长因子;血糖;血尿素氮;肌酐清除率;24 h 尿蛋白定量

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0307-05

Study of TG in CTGF Abnormal Expression and the Effect in the Renal Cortex of DM Rats

CHANG Jing-zhi, WANG Chen*, SHEN Yong-jie, YOU Li-ju, GUO Hui

(Department of Biochemistry, Shangqiu Medical College, Shangqiu 476100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of tripterygium glycosides (TG) in protecting the kidney by observing the effect of TG in abnormal expression of connective tissue growth factor (CTGF) and some factors of kidney function in artificial diabetes rats. **Method:** Forty-five Male SD rats were randomly divided into normal control group, diabetic nephropathy (DN) and diabetic nephropathy group treated with tripterygium

[收稿日期] 20120320(007)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011C310003)

[第一作者] 常景芝,讲师,从事生物化学及分子生物学教学与研究,Tel:13503703669,E-mail: chnsqzjs@163.com

[通讯作者] *王琛,硕士,高级实验师,从事药理学教学与研究,Tel:13598376582, E-mail: sikaixu050129@163.com

[参考文献]

- [1] 林国通. 中药学[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 1985:64.
- [2] 马俊利,李宁,李铎. 忍冬叶的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26(11):868.
- [3] 马俊利,李宁,李铎. 忍冬叶中咖啡酰奎宁酸类化学成分[J]. 中国中药杂志,2009,34(18):2346.
- [4] 郑荣梁. 自由基生物学[M]. 北京:高等教育出版社, 1992:142.
- [5] Chang M L, Yeh C T, Chang P Y, et al. Comparison of

murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation [J]. World J Gastroentero, 2005, 11(27): 4167.

- [6] 闫冰,丁安伟,张丽. 二至丸水提物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(14):131.
- [7] Materska M, Perucka I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L) [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(5): 1750.

[责任编辑 李玉洁]