

甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮 对小鼠实验性肝损伤的保护作用

王志旺^{1,2}, 王瑞琼¹, 郭玫^{1,3*}, 邵晶^{1,3}, 任远^{1,2}

(1. 甘肃中医学院药学系, 兰州 730000; 2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000;
3. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] 目的:研究甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮对小鼠实验性肝损伤的保护作用。方法:取小鼠 55 只,按性别体重随机分为 5 组;各组分别灌胃五脉绿绒蒿总黄酮(0.300, 0.150, 0.075 g·kg⁻¹)以及对对照液 20 mL·kg⁻¹;末次给药 1 h 后,模型对照组及各给药组腹腔注射四氯化碳(CCl₄) 15 mg·kg⁻¹、扑热息痛(AP) 150 mg·kg⁻¹或硫代乙酰胺(TAA) 500 mg·kg⁻¹, 16 h 后采集标本,测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)与天冬氨酸转氨酶(AST)、肝组织中丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性。结果:0.150~0.300 g·kg⁻¹的甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮能降低 CCl₄, TAA 或 AP 诱发肝损伤小鼠的血清 ALT 和 AST($P < 0.01$),提高 CCl₄ 或 TAA 诱发肝损伤小鼠肝组织 SOD 与 GSH-Px 的活性($P < 0.05$, $P < 0.01$),降低 CCl₄ 或 AP 诱发肝损伤小鼠肝组织 MDA 的含量($P < 0.01$);同时在 0.075~0.300 g·kg⁻¹,甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮的肝损伤保护作用显示出一定的量-效关系。结论:甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮对 CCl₄, AP, TAA 造成的小鼠急性肝损伤具有一定的保护作用。

[关键词] 五脉绿绒蒿; 总黄酮; 急性肝损害

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0206-04

Study on Liver Protection of Total Flavones of *Meconopsis quintuplinervia* from Gansu Province in Mice

WANG Zhi-wang^{1,2}, WANG Rui-qiong¹, GUO Mei^{1,3*}, SHAO Jing^{1,3}, REN Yuan^{1,2}

(1. Pharmacy Department of Gansu College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Lanzhou 730000, China;
2. Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology for TCM of Gansu Province, Gansu College

[收稿日期] 20120710(010)

[基金项目] 2010 年度中医药英才基金(2010 年甘肃省中医药科研立项课题)(GZK-2010-52);甘肃省中医药管理局基金项目(GZK-2008-31)

[第一作者] 王志旺,副教授,硕士,从事中藏药药理与毒理学研究, Tel: 13893224972, E-mail: wzw0933@126.com.

[通讯作者] * 郭玫,教授,硕士生导师,从事中藏药有效成分与质量标准研究, Tel: 0931-8765394, E-mail: guomeig@sina.com

- [4] 都广礼,刘平,王磊,等. 下瘀血汤抗猪血清免疫性肝纤维化方证相关的药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(6): 30.
- [5] 中华肝脏学会肝纤维化组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. 中华肝病杂志, 2002, 10(5): 327.
- [6] 周庚寅. 组织病理学技术[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 39.
- [7] 赵治友,林庚庭,张俊杰,等. 加味桃核承气汤对四氯化碳肝纤维化大鼠 α -SMA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(11): 1034.
- [8] 姚光弼. 临床肝脏病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004.
- [9] 代巧妹,贾彦,刘宏,等. 膈下逐瘀汤抗大鼠免疫性肝纤维化的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 187.
- [10] 陈少丽,都广礼,丁娜,等. 下瘀血汤全药与组分处方抗猪血清肝纤维化的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 154.
- [11] 李萍,彭百承,杨政腾,等. 余甘子抗免疫性肝纤维化大鼠的作用(II)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 139.

[责任编辑 聂淑琴]

of TCM, Lanzhou 730000, China; 3. Key Laboratory of Chemistry and Quality for TCM of the College of Gansu Province, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the liver protection of total flavones of *Meconopsis quintuplinervia* Regel (MQR) from Gansu Province in mice. **Method:** Fifty-five Kunming mice were randomly divided into five groups that were orally administered the total flavones of MQR (0.300, 0.150, 0.075 g·kg⁻¹) or contrast solution once per day for 7 d. Except normal mice, all the other mice were injected intraperitoneally 0.15% carbon tetrachloride (CCl₄), 1.5% paracetamol (AP) or 5% thioacetamide (TAA) once. All mice were executed after 16 h and collected serum and liver samples for determining alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum and malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathion peroxidase (GSH-Px) in liver. **Result:** The total flavones of MQR growing in Gansu Province can degrade the levels of ALT and AST in serum and MDA in hepatic tissue, upgrade the SOD and GSH-Px activity in hepatic tissue. Furthermore, their protective effects exhibit the dose-effect relationship. **Conclusion:** The total flavones of MQR from Gansu Province have some protective effects on acute hepatic injury induced by CCl₄, AP or TAA in mice.

[Key words] *Meconopsis quintuplinervia*; the total flavones; liver injury

甘肃产罂粟科绿绒蒿属藏药五脉绿绒蒿 (*Meconopsis quintuplinervia* Regel, MQR), 主要分布于甘南高原、祁连山地及中部黄土高原的最高峰——马衔山, 系藏药欧贝的正品, 在 30 多个藏药复方中配伍使用; 其味甘、涩, 性凉, 具有清热解毒、止痛利尿等功效, 临床用于治疗肝炎、肺炎、肝与肺的热症、水肿等病症^[1]。本课题组前期研究显示甘肃产藏药五脉绿绒蒿及其总黄酮具有明显的镇痛抗炎^[2]、体外抗氧化^[3]等作用; 本次研究分别设计了甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮对四氯化碳 (CCl₄)、硫代乙酰胺 (TAA) 及扑热息痛 (AP) 诱发小鼠急性肝损伤模型的影响, 探讨甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮的保肝作用及其作用机制, 为临床用药提供理论依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 甘肃产藏药五脉绿绒蒿 (*Meconopsis quintuplinervia* Regel) 全草购自甘肃省合作市藏医院, 经甘肃省定西市临洮农校卢通宁高级讲师鉴定。四氯化碳 (CCl₄), 广东汕头市西陇化工厂生产, 批号 20100912; 硫代乙酰胺 (TAA), 天津市大茂化学试剂厂生产, 批号 20090415; 扑热息痛 (AP), 上海化学试剂公司, 批号 20110128。丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒, 均为南京建成生物工程研究所提供。其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器 722 型分光光度计 (上海第三分析仪器

厂产品), BS1103 型 Sartorius 电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司), HH-S 型恒温水浴锅 (金坛市正基仪器有限公司), TGL-16G 高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.3 动物 昆明种小鼠, SPF 级, 雌雄兼用, 体质量 (20 ± 2) g, 由甘肃中医学院实验动物中心提供, 实验动物许可证号 SCXK(甘)2011-0001。

2 方法

2.1 甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮的制备 称取甘肃产藏药五脉绿绒蒿全草粗粉适量, 用 95% 乙醇回流提取, 减压回收乙醇后用石油醚萃取脂溶性较强的杂质, 残留物用 1 mol·L⁻¹ HCl 溶液溶解, 调 pH 2~3, 过滤, 残留物即为黄酮类粗品。将上述黄酮粗品用 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液溶解, 调 pH 至 9~10, 过滤, 碱水层再用 1 mol·L⁻¹ HCl 溶液调 pH 至 2~3, 用乙酸乙酯萃取数次, 合并乙酸乙酯, 减压浓缩即得五脉绿绒蒿总黄酮^[4]。精密称取上述五脉绿绒蒿总黄酮适量置研钵中, 定量加入聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯 (吐温-80), 采用干胶法按“油: 胶: 水 2: 1: 2”的比例制备初乳, 适当稀释即得五脉绿绒蒿总黄酮乳剂; 另取适量吐温-80 制备 0.5% 的溶液作为对照液, 冷藏备用。

2.2 对 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤的影响^[5-7] 取小鼠 55 只, 按性别体重随机分为 5 组, 各给药组动物 ig 甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮 (0.300, 0.150, 0.075 g·kg⁻¹) 20 mL·kg⁻¹, 每日 1 次, 正常对照组和模型对照组 ig 等量对照液, 连续 7 d。末次给药

1 h 后,模型对照组及各给药组 ip 0.15% CCl₄ 花生油溶液 10 mL·kg⁻¹ (15 mg·kg⁻¹),正常对照组 ip 等量花生油。禁食(不禁水)16 h 后,称重,眼眶采血,取血清测定 ALT,AST;脱颈椎处死小鼠,取出完整肝脏,称重,计算肝脏指数;取肝组织适量制成 10% 匀浆液,按试剂盒说明书测定肝组织 SOD 活性及 MDA 含量。

2.3 对 TAA 所致小鼠急性肝损伤的影响^[6] 取小鼠 55 只,按 2.2 项下方法分组、给药。末次给药 1 h 后,模型对照组及各给药组 ip 5% TAA 溶液 10 mL·kg⁻¹ (500 mg·kg⁻¹),正常对照组 ip 等量蒸馏水。禁食(不禁水)16 h 后,眼眶采血,测定血清 ALT,AST 活性;脱颈椎处死小鼠,取新鲜肝脏组织制成 10% 匀浆液,按试剂盒说明书测定肝组织 GSH-Px 活性。

2.4 对 AP 所致小鼠急性肝损伤的影响^[8] 取小鼠 55 只,按 2.2 项下方法分组、给药。末次给药 1 h 后,模型对照组及各给药组 ip 1.5% AP 溶液 10 mL·kg⁻¹ (150 mg·kg⁻¹),正常对照组 ip 等量蒸馏水。禁食(不禁水)16 h 后,眼眶采血,测定血清 ALT,AST 活性;脱颈椎处死小鼠,取新鲜肝脏组织制成 10% 匀浆液,按试剂盒说明书测定肝组织 MDA 的含量。

2.5 数据处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,组间比较采用单因素方差分析,应用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤的影响 与正常对照组比较,模型对照组血清 ALT 与 AST 含量、肝脏指数以及肝组织 MDA 的含量明显升高,肝组织 SOD 的活性明显降低 ($P < 0.01$),显示 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤模型复制成功;与模型对照组比较,甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮各剂量组对实验各项指标有不同程度的改善作用且显示出一定的量-效关系。见表 1。

3.2 对 TAA 所致小鼠急性肝损伤的影响 TAA 引起小鼠 ALT,AST,GSH-Px 明显变化 ($P < 0.01$);甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮能明显减低血清 ALT 与 AST 的水平,提高肝组织 GSH-Px 的活性;同时随着剂量的加大,甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮对 ALT 与 AST 的降低作用增强,显示出一定的量-效关系。见表 2。

3.3 对 AP 所致小鼠急性肝损伤的影响 AP 引起小鼠急性肝损伤:与正常对照组,模型对照组血清 ALT,AST 与肝组织 MDA 的含量明显升高 ($P < 0.01$)。甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮能明显改善上述指标,即减低 ALT,AST 与 MDA 的含量;其改善作用显示出一定的量-效关系。见表 3。

4 讨论

藏药五脉绿绒蒿的记载可追溯到藏医古籍《月王药诊》,作为藏药应用已有千余年的历史;本属植物的化学成分研究始于 20 世纪 60 年代的捷克布尔

表 1 甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮对 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	肝脏指数/mg·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/mol·g ⁻¹
正常对照	-	45.08 ± 4.77 ²⁾	124.08 ± 19.80 ²⁾	38.95 ± 4.10 ²⁾	161.67 ± 20.69 ²⁾	7.58 ± 1.24 ²⁾
模型对照	-	150.43 ± 24.37	250.18 ± 30.08	47.24 ± 5.72	120.69 ± 16.21	13.65 ± 2.27
五脉绿绒蒿黄酮	0.300	94.05 ± 12.86 ^{2,4)}	186.75 ± 20.41 ^{2,4)}	40.93 ± 4.73 ¹⁾	146.01 ± 19.60 ²⁾	8.43 ± 1.84 ^{2,4)}
	0.150	110.70 ± 18.41 ^{2,3)}	199.23 ± 24.96 ²⁾	41.59 ± 5.04 ¹⁾	139.85 ± 18.69 ¹⁾	10.52 ± 1.98 ^{2,3)}
	0.075	127.55 ± 21.57 ¹⁾	220.72 ± 28.40 ¹⁾	44.29 ± 5.54	131.54 ± 17.23	11.13 ± 2.12 ¹⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与黄酮低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮对 TAA 所致小鼠急性肝损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹
正常对照	-	60.58 ± 12.52 ²⁾	132.68 ± 22.33 ²⁾	52.37 ± 10.84 ²⁾
模型对照	-	171.12 ± 20.48	261.35 ± 31.99	34.23 ± 6.53
五脉绿绒蒿黄酮	0.300	109.22 ± 15.48 ^{2,4)}	195.96 ± 25.46 ^{2,4)}	43.94 ± 8.15 ²⁾
	0.150	131.48 ± 18.83 ^{2,4)}	209.32 ± 25.73 ²⁾	40.99 ± 7.02 ¹⁾
	0.075	142.41 ± 18.96 ²⁾	231.25 ± 28.62 ¹⁾	38.71 ± 6.78

表3 甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮对 AP 所致小鼠急性肝损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 11$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
正常对照	-	75.27 ± 10.06 ²⁾	138.39 ± 20.41 ²⁾	7.83 ± 1.68 ²⁾
模型对照	-	182.88 ± 21.75	272.83 ± 31.08	15.19 ± 2.25
五脉绿绒蒿黄酮	0.300	144.75 ± 18.73 ^{2,4)}	210.42 ± 26.74 ^{2,3)}	9.09 ± 1.87 ^{2,4)}
	0.150	155.02 ± 18.99 ²⁾	221.18 ± 29.79 ²⁾	10.94 ± 1.99 ^{2,3)}
	0.075	172.14 ± 20.97	240.30 ± 30.94 ¹⁾	12.93 ± 2.07 ¹⁾

诺 Masarykova 大学的 J. Slavik, 现研究显示藏药五脉绿绒蒿主要含有黄酮类、生物碱类化合物以及少量挥发油和油脂类等成分, 但对其生物活性的研究涉及甚少^[9]。本研究组以甘南高原所产藏药五脉绿绒蒿为研究对象, 运用现代提取分离技术与药理活性相结合的方法, 对甘肃产藏药五脉绿绒蒿的药效物质基础展开研究, 部分实验结果已进行了报道^[2-3]; 本次研究在绿绒蒿治疗肝炎、肝的热症等藏医临床应用的指导下, 结合前期研究的基础, 探讨甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮的保肝降酶活性。

在肝损伤模型的复制中, 利用四氯化碳 (CCl_4)、硫代乙酰胺 (TAA) 以及扑热息痛 (AP) 等化学物质的氧化性损伤是复制动物模型的经典方法^[10]。一般认为, CCl_4 在肝脏经细胞色素 P450 激活为自由基 $\cdot\text{CCl}_3$, 后者与细胞膜脂质和蛋白质结合, 引起膜结构与功能的破坏而导致肝损伤, 同时自由基 $\cdot\text{CCl}_3$ 可加速 Ca^{2+} 内流、细胞内“钙超负荷”而导致肝细胞坏死; TAA 经代谢生成亲电子活性基团产物而干扰细胞核内 RNA 转移、影响蛋白质合成与酶的活性, 小剂量 TAA 可诱发肝细胞凋亡, 大剂量可导致肝脂质氧化和小叶中央坏死; AP 经代谢可生成活性中间代谢物 *N*-乙酰对苯醌亚胺, 后者具有强大的氧化作用, 使生物膜系统发生脂质过氧化, 干扰细胞内的能量代谢, 导致肝细胞变性坏死。本次研究利用上述化合物复制肝损伤模型, 实验结果显示, 0.150 ~ 0.300 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮能降低 CCl_4 , TAA 与 AP 诱发肝损伤小鼠血清中的 ALT, AST ($P < 0.01$), 降低 CCl_4 致肝损伤小鼠的肝脏指数 ($P < 0.05$); 在肝组织抗氧化酶及氧化产物的研究中, 甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮能明显降低受损肝组织 MDA 的含量, 提高 SOD 与 GSH-Px

的活性 ($P < 0.05, P < 0.01$)。研究结果提示甘肃产藏药五脉绿绒蒿总黄酮具有一定的保肝降酶活性, 这可能与提高肝细胞抗氧化能力有关, 至于具体作用机制尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] 杨永昌. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991:465.

[2] 王志旺, 郭枚, 马骏, 等. 五脉绿绒蒿抗炎镇痛作用有效部位的研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17 (1):21.

[3] 王志旺, 张扬, 郭玫, 等. 五脉绿绒蒿总黄酮及其中苜蓿素的体外抗氧化活性 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31 (22):4381.

[4] 匡海学. 中药化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2004:328.

[5] 姚干, 蔡应繁, 江怀仲, 等. 二至丸有效部位群组方对小鼠实验性肝损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2009, 31 (3):461.

[6] 蔡秀江, 丁安伟, 闫冰, 等. 二至丸保肝活性成分群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, 2011, 17 (20):145.

[7] 蒙明瑜, 郭又嘉, 文坎, 等. 剑叶耳草水提物对急性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (11):185.

[8] 王小丽, 黄真, 江丽霞, 等. 黄花倒水莲提取物对小鼠实验性肝损伤的保护作用 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18 (6):1320.

[9] 赵建刚, 郭玫. 藏药绿绒蒿的研究概况 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15 (8):106.

[10] 陈卫华, 郭松超. 肝脏损伤动物模型及观察指标研究现状 [J]. 广西医科大学学报, 2007, 24 (1):156.

[责任编辑 聂淑琴]