

剑叶耳草水提物对急性肝损伤小鼠的保护作用

蒙明瑜, 郭又嘉, 文坎, 黄仁彬*
(广西医科大学药学院, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 研究剑叶耳草水提物(JYECA)对小鼠急性肝损伤的保护作用。方法: 分别采用四氯化碳(CCl₄)、D-半乳糖胺盐酸盐(D-GalN) ip 建立小鼠急性肝损伤模型, 用比色分析法测定小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的活性; 测定小鼠肝匀浆超氧化物歧化酶(SOD)的活性及丙二醛(MDA)的含量; HE 染色观察各组小鼠肝细胞损伤程度。结果: JYECA 能显著降低因 CCl₄、D-GalN 所致急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 的升高; 对急性肝损伤小鼠肝匀浆 SOD 的活性有明显的升高作用及降低 MDA 的含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 能够减轻肝细胞损伤程度。结论: JYECA 对 CCl₄、D-GalN 所致小鼠急性肝损伤有保护作用, 其机制可能与其抗氧自由基、抑制脂质过氧化作用有关。

[关键词] 剑叶耳草水提物; 急性肝损伤; 四氯化碳; D-半乳糖胺

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0185-04

Protective Effect of *Hedyotis lance* Aqueous Extract on Acute Liver Injury in Mice

MENG Ming-yu, GUO You-jia, WEN Kan, HUANG Ren-bin*

(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of *Hedyotis lance* aqueous extract (JYECA) on acute liver injury in mice. **Method:** The models of carbon tetrachloride (CCl₄) and D-GalN-induced acute liver injury in mice with the method of intraperitoneal injection were used to study the protective effects of JYECA. The colorimetric assay was used to measure the activity of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in blood serum, and the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in liver homogenate were determined. Hematoxylin and eosin (HE) stain was used to examine the degree of hepatic injury. **Result:** JYECA could obviously reduce the activity of AST and ALT and the content of MDA in acute hepatic injury mice, and increase the activity of SOD ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). JYECA could reduce the degree of hepatic injury. **Conclusion:** JYECA has protective effect on acute hepatic injured mice. The mechanism may be related to attenuating free radical and inhibiting lipid peroxidation.

[Key words] *Hedyotis lance*; acute hepatic injury mice; carbon tetrachloride; D-GalN

剑叶耳草(JYEC), 原植物经考证为双子叶植物药茜草科植物剑叶耳草 *Hedyotis lance* (Thunb) O. Kuntze [oldenladia lancea(Thunb) O. Kuntze] 的全

草, 是一种广西民间草药, 有止咳化痰; 健脾消积等功效, 用于治疗支气管哮喘、支气管炎、肺癆咯血、小儿疳积等。民间常用于治疗乙型肝炎, 效果显著。目前, 对于 JYEC 的研究尚未见报道, 本课题组经实验研究发现, JYECA 对四氯化碳(CCl₄)、D-半乳糖胺盐酸盐(D-GalN)诱导的急性肝损伤有显著的保护作用。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, SPF 级, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22 g, 由广西医科大学实验动物中心提供。试

[收稿日期] 20110929(001)

[基金项目] 广西科学研究与科技开发攻关项目(桂科攻0992003A-2); 广西研究生科研创新项目

[第一作者] 蒙明瑜, 硕士研究生, 从事抗乙肝药药理学研究, Tel: 15994356706, E-mail: mengmingyu-mmy@163.com

[通讯作者] * 黄仁彬, 博士生导师, 从事药理学研究, Tel: 13807713926, E-mail: huangrenbin518@163.com

验动物生产许可证 SCXK(桂)2009-0002, 试验动物使用许可证 SYXK(桂)2009-0004。

1.2 药物与试剂 JYECA 为广西医科大学药理学教研室自行提取。用蒸馏水配置成 JYECA 高剂量组($0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ig}$, 相当于生药 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 简称为 JYECA_H), JYECA 中剂量组($0.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ig}$, 相当于生药 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 简称为 JYECA_M), JYECA 低剂量组($0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ig}$, 相当于生药 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 简称为 JYECA_L), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。CCl₄(成都市科龙化工试剂厂, 分析纯, 批号 20100925), D-GalN (Sigma-Aldrich Company, CAS 号 157297-00-2), 联苯双酯滴丸(广州星群(药业)股份有限公司, 批号 HF40060), 天冬氨酸转氨酶(AST)检测试剂盒(批号 20110226), 丙氨酸转氨酶(ALT)检测试剂盒(批号 20110317), 丙二醛(MDA)检测试剂盒(批号 20110323); 超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(批号 20110221), 均购自南京建成生物工程研究所; 其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器与设备 722SP 型可见光分光光度计(上海棱光技术有限公司), EL204 型电子天平(METTLER TOLEDO 公司), TDL-5 型台式低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂), RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), SHH. W21. Cr600 型三用电热恒温水箱(北京长源实验设备厂)。

2 方法

2.1 对 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠的影响^[1-5] 取体重为 $18 \sim 22 \text{ g}$ 的昆明小鼠 60 只, 随机分成 6 组, 每组 10 只, 即: 正常对照组、CCl₄ 模型组、联苯双酯($0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, LBSZ) 阳性对照组、JYECA_H, JYECA_M, JYECA_L($8, 4, 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。正常对照组和 CCl₄ 模型组按照 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的给药容量 ig 给予生理盐水, 其他给药组小鼠按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ig}$ 给予相应药物, 每日 1 次, 共 7 d。末次给药 1 h 后, 正常对照组动物按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ip}$ 生理盐水, 其余各组 ip $0.2\% \text{ CCl}_4$ 花生油溶液($20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)。禁食不禁水 20 h 后, 摘眼球取血, 处死动物, 剖腹取出肝脏, 取肝大叶相同部位的小块肝组织固定于 $10\% \text{ 甲醛}$ 溶液中, 作病理组织学检查, 经石蜡包埋切片和 HE 染色后在显微镜下观察病理改变; 另外切取适量肝组织, 以生理盐水制备成 $10\% \text{ 匀浆}$, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min , 吸取上清液, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存, 作测定肝组织中 SOD, MDA 用, 蛋白含量测定按考马斯亮蓝法。将凝固的血液于 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 分离血清,

按试剂盒说明书测定血清中的 AST, ALT。

2.2 对 D-GalN 所致急性肝损伤小鼠的影响^[1-5]

取与实验 2.1 相同规格的昆明种小鼠, 随机分成 6 组, 每组 10 只, 即: 正常对照组、D-GalN 模型组、联苯双酯($0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, LBSZ) 阳性对照组、JYECA_H, JYECA_M, JYECA_L($8, 4, 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。正常对照组和 D-GalN 模型组按照 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的给药容量 ig 给予生理盐水, 其他给药组小鼠按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ig}$ 给予相应药物, 每日 1 次, 共 7 d。末次给药后 1 h, 正常对照组动物按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ip}$ 生理盐水, 其余各组动物按相同的给药容量 ip D-GalN 溶液($0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 禁食不禁水约 20 h, 取血及肝脏进行测定, 操作方法同 2.1。

2.3 肝组织病理学检查 肝组织经过 $10\% \text{ 甲醛}$ 溶液固定, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋, 切片, HE 染色, 光学树脂封片, 以光学显微镜观察组织病理学变化。肝组织损伤程度病理分级标准如下: 0 级(-): 肝细胞、肝细胞索、肝窦均正常、未见肝细胞水肿(或空泡)的异常改变; I 级(+): 表示在一个肝小叶中, 有 $1/3$ 以内肝细胞水肿, 中央静脉周围的肝细胞核浓染成黑色固缩, 分布散在; II 级(++): 表示在一个肝小叶中, 有 $1/3 \sim 1/2$ 以内的肝细胞水肿, 中央静脉周围出现点状坏死, 分布较广; III 级(+++): 表示在一个肝小叶中, 有 $1/2$ 以上的肝细胞水肿, 汇管区出现炎细胞浸润, 点状坏死灶。

2.4 统计学方法 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的显著性采用 *t* 检验, 计数资料采用秩和检验, 应用 SPSS 13.0 软件进行分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠血清 ALT, AST 和肝组织 SOD, MDA 的影响 对于 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠, JYECA_H, JYECA_M 均能显著降低血清 ALT, AST ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。经 CCl₄ 诱导肝损伤后, JYECA 各剂量均能降低 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 其中 JYECA_H 和 JYECA_M 作用最明显 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对 D-GalN 所致急性肝损伤小鼠血清 ALT, AST 和肝组织 SOD, MDA 的影响 对于 D-GalN 所致急性肝损伤小鼠, JYECA_H, JYECA_M 均能显著降低血清 ALT, AST, 其中以 JYECA_H, JYECA_M 最显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。经 D-GalN 诱导肝损伤后, JYECA 各剂量均能降低 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 其中 JYECA_H 和 JYECA_M 作用最明显 ($P < 0.01$)。见表 2。

表1 剑叶耳草水提物(JYECA)对CCl₄诱导所致急性肝损伤小鼠血清ALT,AST,MDA,SOD的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹
正常对照	-	37.32 ± 5.79	19.17 ± 4.85	91.92 ± 10.60	69.85 ± 12.78
CCl ₄ 模型	-	342.18 ± 52.51 ²⁾	43.89 ± 10.11 ²⁾	128.72 ± 32.92 ²⁾	55.21 ± 7.86 ²⁾
联苯双酯	0.15	181.24 ± 37.10 ⁴⁾	20.79 ± 6.77 ⁴⁾	89.62 ± 19.43 ⁴⁾	72.35 ± 17.68 ⁴⁾
JYECA	8	110.75 ± 15.00 ⁴⁾	23.41 ± 6.60 ⁴⁾	72.49 ± 19.69 ⁴⁾	66.87 ± 7.20 ⁴⁾
	4	181.53 ± 30.25 ⁴⁾	32.76 ± 11.65 ³⁾	84.13 ± 16.37 ⁴⁾	65.13 ± 6.86 ⁴⁾
	2	333.11 ± 51.52	35.62 ± 10.66	100.10 ± 14.72 ³⁾	61.72 ± 11.01

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

表2 剑叶耳草水提物(JYECA)对D-GalN诱导所致急性肝损伤小鼠血清ALT,AST,MDA,SOD的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹
正常对照	-	37.32 ± 5.79	19.17 ± 4.85	91.92 ± 10.60	69.85 ± 12.78
D-GalN模型	-	284.24 ± 38.97 ²⁾	45.34 ± 13.29 ²⁾	134.72 ± 32.60 ²⁾	53.89 ± 10.82 ²⁾
联苯双酯	0.15	91.92 ± 19.22 ⁴⁾	22.03 ± 7.75 ⁴⁾	99.24 ± 22.98 ³⁾	84.82 ± 14.24 ⁴⁾
JYECA	8	120.94 ± 28.03 ⁴⁾	24.59 ± 6.63 ⁴⁾	85.57 ± 17.11 ⁴⁾	94.17 ± 15.62 ⁴⁾
	4	196.18 ± 30.76 ⁴⁾	31.06 ± 7.86 ⁴⁾	109.66 ± 14.62 ³⁾	82.85 ± 14.41 ⁴⁾
	2	279.20 ± 49.39	33.27 ± 7.91 ³⁾	119.16 ± 25.12	66.62 ± 15.01 ³⁾

3.3 JYECA对CCl₄,D-GalN所致急性肝损伤小鼠肝组织病理组织学观察 显微镜下,正常小鼠肝小叶结构正常,血管、汇管区清晰。肝细胞排列整齐呈多角形,细胞分界清楚,核仁明显,细胞质丰富,胞质内无脂滴,结构正常,未见脂肪变、肿胀、炎细胞浸润等病理组织学改变。经CCl₄诱导急性肝损伤后,模型组动物肝组织镜下可见肝小叶结构紊乱,肝细胞大部分肿胀,细胞质疏松,部分气球样变,脂肪变,汇管区有炎细胞浸润,伴有灶性坏死。对于CCl₄引起的肝脏组织病理病变,JYECA_H和JYECA_M均能减轻肝细胞肿胀,对CCl₄引起的急性损伤肝脏有明显的保护作用。见表3。

表3 剑叶耳草水提物(JYECA)对CCl₄诱导所致急性肝损伤小鼠肝组织病理改变的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	各级病变动物数/只			
		0级	I级	II级	III级
正常对照	-	10	0	0	0
CCl ₄ 模型	- ²⁾	0	1	4	5
联苯双酯	0.15 ⁴⁾	0	9	1	0
JYECA	8 ⁴⁾	0	8	2	0
	4 ³⁾	0	6	4	0
	2	0	5	4	1

注:与正常对照组比较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)。

在D-GalN引起的急性肝损伤中,模型组动物肝小叶内大部分肝细胞肿胀,细胞质疏松化,少数呈气球样变,伴点状坏死,汇管区炎细胞浸润。JYECA_H

和JYECA_M组动物肝细胞肿胀、炎细胞浸润程度明显轻于模型组动物,能减轻D-GalN引起的肝脏损伤。见表4。

表4 剑叶耳草水提物(JYECA)对D-GalN诱导所致急性肝损伤小鼠肝组织病理改变的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	各级病变动物数/只			
		0级	I级	II级	III级
正常对照	-	10	0	0	0
D-GalN模型	- ²⁾	0	1	6	3
联苯双酯	0.15 ⁴⁾	0	8	2	0
JYECA	8 ⁴⁾	0	8	2	0
	4 ³⁾	0	7	3	0
	2	0	5	5	0

4 讨论

肝损伤是由多种因素引起,自由基和脂质过氧化反应在肝脏损伤及肝脏疾病的发生过程中起着十分重要的作用。经CCl₄和D-GalN诱导所致的小鼠急性肝损伤的机制各不相同。

CCl₄诱导急性肝损伤模型是经典的实验性肝损伤的动物模型之一。CCl₄是一种亲肝性很强的毒物,它引起肝损害的作用机制主要是过氧化损伤所致^[6]。在机体的各个器官和细胞内都有抗氧化机制,但肝细胞比其他细胞有更强的抗氧化功能。因此肝细胞内一旦有活性氧的过量产生和抗氧化机制低下,就容易导致氧化应激状态,发生细胞膜脂质过氧化等的损伤^[7]。一方面,CCl₄在体内经肝微粒依赖于细胞色素P450的混合功能酶的激活代谢

后^[8],生成的超氧化物能引起脂质过氧化;另一方面,此超氧化物在体内能快速与分子氧发生作用,形成的过氧自由基脂质过氧化作用更强,可直接引发肝细胞脂质过氧化作用,诱发细胞死亡^[9]。此外,这些自由基还可与细胞内大分子发生共价结合,也可攻击膜不饱和脂质,导致肝细胞膜结构和功能的破坏,最终引起肝损伤^[10]。肝细胞损伤时,其胞质液成份 ALT,AST 释放,血清 ALT,AST 活性增高,且其活性的高低在一定范围内可反映肝细胞损伤程度的大小^[11]。

D-GalN 所致肝损伤模型的肝组织病理学特征与人类病毒性肝炎极为相似,且有极好的重现性和一定的可逆性^[12]。*D*-GalN 所致的肝损伤主要损害胞质内细胞器,引起肝脏代谢紊乱,从而使细胞中毒甚至死亡。此外,*D*-GalN 进入体内还可产生自由基,自由基是启动脂质氧化的关键因素,其含量越高则肝损伤程度就越严重。过多的氧自由基加重肝细胞和线粒体的损伤,肝细胞和线粒体破损后释放 ALT 和 AST^[13]。本实验结果表明,对于 CCl₄,*D*-GalN 所致急性肝损伤,JYECA 各剂量组对 ALT,AST 活性均有显著的降低作用,尤其 JYECA_H 和 JYECA_M 效果显著,但 JYECA_L 对 ALT 活性的降低作用不明显。

自由基是人体正常生化过程的中间产物,产生过多或者机体内的酶系统过少时,体内的动态平衡将被破坏,这是引起许多疾病的分子病理基础^[14]。机体中存在的一些酶,如 SOD 是机体防御自由基损伤的重要成分,存在于有氧代谢的细胞内,构成体内第一道抗氧化酶防御体系,其功能是清除氧自由基,也是体内唯一清除氧自由基的抗氧化酶^[15]。SOD 活性的增加,可以加速清除自由基。而 MDA 为脂质氧化的终产物,其含量的变化可以反映毒性基团引起氧化应激的程度^[16]。CCl₄,*D*-GalN 诱导肝损伤后,JYECA 各剂量组可以不同程度地增强小鼠肝组织中 SOD 活性,并降低 MDA 的含量。说明 JYECA 能增强 SOD 活性,降低 MDA 含量,提高机体抗氧化水平,避免脂质过氧化物的发生。

肝脏病理组织学检查结果表明,对急性肝损伤诱导剂 CCl₄,*D*-GalN 引起的肝细胞肿胀或坏死、脂肪变、炎细胞浸润等病理学变化,不同剂量的 JYECA 表现出不同程度的减轻作用,提示其对化学性急性肝损伤有一定的保护作用。

[参考文献]

- [1] 张均田. 现代药理实验方法 [M]. 北京:北京医科大学协和医科大学联合出版社,1998:1397.
- [2] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:1346.
- [3] Reckanagel R O, Glende E A, Dolak J A, et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity [J]. Pharmac Ther, 1989, 43 (5): 139.
- [4] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1991:460.
- [5] 卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则 [S]. 1993:92.
- [6] Boll M, Weber L W, Becker E, et al. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity [J]. Z Naturforsch, 2001, 56(7/8): 649.
- [7] 王君明,崔瑛,申玲玲,等. 中药致药源性肝损伤的氧化应激机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 247.
- [8] 叶应妩. 全国临床检验操作规程 [M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:206.
- [9] 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): 134.
- [10] Maezono K, Kajiwarra K, Mawatari K, et al. Alanine protects liver from injury caused by F-galactosamine and CCl₄ [J]. Hepatology, 1996, 24(1): 185.
- [11] Kem M C. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage [J]. Lancet, 2000, 355(204): 591.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社,1993:851.
- [13] 张岫美,张斌,魏欣冰. 安络化纤丸对急慢性肝损伤的保护作用 [J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(1): 27.
- [14] 杨欣,王丽慧,罗旭艳,等. 乙肝转阴颗粒对 *D*-半乳糖胺诱导小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 152.
- [15] 王君明,崔瑛,王峥涛,等. 超氧化物歧化酶参与肝损伤的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 265.
- [16] 姚莹华,刘强,陈育尧,等. 丹参多糖对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 227.

[责任编辑 聂淑琴]