

绿原酸对小鼠急性肝损伤的保护作用

史秀玲*, 高银辉

(河北省唐山市乐亭县医院, 河北 乐亭 063600)

[摘要] **目的:**研究绿原酸对四氯化碳(CCl_4)所致肝损伤小鼠的保护作用。**方法:**将 60 只昆明种小鼠随机分为 6 组, 各组每天 ig 给药容量为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 10 d。正常组和模型组给予蒸馏水, 阳性组给予联苯双酯 $0.60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 绿原酸高、中、低剂量组分别给予绿原酸 14, 7, 3.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。末次给药后禁食不禁水, 8 h 后, 除正常组外, 其余各组均 ip 0.08% CCl_4 花生油溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 12 h 后眼球取血, 分离血清, 检测血清中的谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST), 同时测定肝匀浆中的超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性和丙二醛 (MDA) 的水平。将肝大叶 HE 染色, 观察绿原酸对小鼠肝脏组织病理学的影响。**结果:**绿原酸 14, 7, 3.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组小鼠的肝指数依次为 (2.00 ± 1.16) , (2.40 ± 1.52) , $(3.20 \pm 1.09)\%$, 脾指数为 (0.29 ± 2.61) , (0.36 ± 0.19) , $(0.49 \pm 1.21)\%$; 小鼠血清中 ALT, AST 活性依次分别为 (40.01 ± 7.14) , (51.19 ± 9.45) , $(62.66 \pm 9.01) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, (43.59 ± 4.32) , (52.99 ± 5.97) , $(66.97 \pm 7.34) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, 小鼠肝组织中 MDA 的水平依次为 (21.68 ± 10.28) , (28.54 ± 6.84) , $(35.51 \pm 9.87) \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$, 均明显低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。绿原酸 14, 7, 3.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组, 小鼠肝组织中 SOD 活性依次为 (112.98 ± 8.41) , (98.36 ± 11.18) , $(81.76 \pm 9.88) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, GSH-Px 活性依次为 (196.19 ± 10.56) , (169.77 ± 13.61) , $(141.57 \pm 15.11) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 均明显高于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。同时, 绿原酸各剂量组肝组织病变程度明显减轻, 肝细胞再生明显, 偶伴有点状坏死, 汇管区少量炎细胞浸润。**结论:**绿原酸具有显著的抗肝损伤的作用, 其作用可能与其能清除体内自由基和抗氧化的作用有关。

[关键词] 杜仲叶; 绿原酸; 四氯化碳; 肝损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0199-04

Protective Effects of Chlorogenic Acid on Liver Injury in Mice

SHI Xiu-ling*, GAO Yin-hui

(Laoting County Hospital, Laoting 063600, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protect effects of chlorogenic acid on liver-injury of mice induced by Carbon Tetrachlotide (CCl_4). **Methods:** Animals were devided into 6 groups: normal group, model group, solvent group, the chlorogenic acid high-dose group, middle-dose group, low-dose group. The dose of chlorogenic acid is ig 14, 7, 3.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ respectively. The mice models of acute chemical liver injury was induced by CCl_4 . The indexes of the live and spleen, alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) activity in serum were examined. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, MDA level in liver tissue were determined by immunological liver injury. Meanwhile liver pathological examination was observed by light microscope. **Result:** The chlorogenic acid (14, 7, 3.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) could remarkably resist the increase of ALT (40.01 ± 7.14) , (51.19 ± 9.45) , $(62.66 \pm 9.01) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, AST (43.59 ± 4.32) , (52.99 ± 5.97) , $(66.97 \pm 7.34) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, decreased the MDA level (21.68 ± 10.28) , (28.54 ± 6.84) , $(35.51 \pm 9.87) \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$, and could improve SOD activity (112.98 ± 8.41) , (98.36 ± 11.18) , $(81.76 \pm 9.88) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ and GSH-Px level (196.19 ± 10.56) , (169.77 ± 13.61) , $(141.57 \pm 15.11) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.01$ versus model group for above

[收稿日期] 20110601(011)

[基金项目] 河北省唐山市科技局科研项目 (10150204A-6)

[通讯作者] * 史秀灵, 本科, 副主任药师, 从事中药药效和有效成分筛选研究, E-mail: xuefanone@sohu.com

results). **Conclusion:** Chlorogenic acid has remarkable protective effects on liver - injury in mice.

[**Key words**] Eucommiae Folium; chlorogenic acid; carbon tetrachloride (CCl₄); liver-injury

绿原酸(chlorogenic acid),是植物体在有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素类化合物,其具有广泛生理活性和药理活性,如利胆、抗菌、降压、增加白血球及兴奋中枢神经系统、抗肿瘤、降脂、清除自由基等多种药理作用,对消化系统、血液系统和生殖系统疾病均有显著疗效^[1-2]。因此,绿原酸在医药制剂上应用越来越广泛,是目前国际公认的“植物黄金”。绿原酸主要存在于杜仲、金银花、葵花籽粕、元宝枫等植物中,尤其是近几年研究发现,杜仲叶(*Eucommiae Folium* leaves)中含有较高的绿原酸,其含量为 1% ~ 5.5%^[3]。

目前西医非常缺乏有效的抗肝损伤的药物,而中药在抗肝损伤、肝纤维化方面有着广阔的应用前景,因此从天然药物中发掘抗肝损伤、肝纤维化药物已成为国内外研究的热点^[4]。我们在前期的实验研究中发现杜仲具有良好的抗肝损伤和抗肝纤维化的作用^[5-7],绿原酸又为其主要化学成分之一,因此本文拟采用四氯化碳(CCl₄)导致小鼠肝损伤等方法对绿原酸抗肝损伤的作用进行系统的深入的研究,以期将其开发成抗肝损伤的新药。

1 材料

1.1 动物 清洁级昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18 ~ 22 g。由河南省实验动物中心提供,合格证号 SCXK 豫 2005 ~ 0001。

1.2 药品与试剂 谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)试剂盒(批号 20100731),超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(批号 20100625),以上试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。联苯双酯,为浙江医药股份有限公司新昌制药厂产品,批号 110101。四氯化碳(CCl₄,分析纯),为天津市药通化学试剂有限公司,批号 20100930,实验时用花生油配成 0.08% CCl₄ 溶液。绿原酸原料药(四川九章生物化工科技发展有限公司,从杜仲叶中提取纯化而得,批号 20101012,含量 > 99%)。

1.3 仪器 Biofuge strutos 型高速低温离心机(Kendro Laboratory products)。JY92-2D 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所)。YKH-I 型液体

快速混合器(江西医疗器械厂)。TU-180 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。普通电子天平(型号 FA2104N,上海民桥精密仪器厂)。PTHW 型电热套(巩义市英裕予华仪器厂)。电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂)。予华 SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(河南省巩义市英峪予华仪器厂)。

2 方法^[8]

2.1 绿原酸抗肝损伤的作用 小鼠 60 只,雌雄各半,随机分为 6 组,每组 10 只,即正常组、模型组、阳性药组、绿原酸高、中、低剂量组。各组每天 ig 给药容量为 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹,连续 10 d。正常组和模型组给予蒸馏水,阳性药组给予联苯双酯 600 mg·kg⁻¹,高、中、低剂量组分别给予绿原酸 14, 7, 3.5 mg·kg⁻¹。末次给药后禁食不禁水,8 h 后,除正常组外,其余各组 ip 0.08% CCl₄ 花生油溶液 10 mL·kg⁻¹,12 h 后眼球取血,分离血清。

2.2 检测指标 检测血清中的 ALT,AST 的活性;迅速取肝脏和脾脏,将周围结缔组织剔除后放入冰冷的生理盐水中清洗血污,称量肝脏湿重,计算肝脾指数,肝脾指数 = 肝脾湿重/体质量 × 100%;将肝脏大叶 HE 染色,并进行病理检查;取肝右叶相同位置一小块肝组织,以冰冷生理盐水制成 10% 肝组织匀浆,3 000r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清测定 MDA, SOD, GSH-Px。AST, ALT 水平测定采用赖氏法;MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法;SOD, GSH-Px 活性测定分别采用亚硝酸盐法和 5,5-双硫代对硝基苯甲酸(DTNB)显色法。

2.3 数据处理 各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 13.0 进行统计分析。模型对照组与空白对照组比较用 *t* 检验,各剂量组与模型对照组比较用方差分析, *P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对肝脏整体病变的肉眼观察 正常组小鼠肝脏色泽暗红,肝边缘轮廓清晰,表面光滑,未见异常改变。与正常组比较,模型组肝脏颜色较浅,表面无光泽,有明显的斑点及出血点。与模型组比较,绿原酸高剂量组,轮廓较清晰,有光泽,未见斑点和出血

点;绿原酸中、低剂量组,肝脏颜色介于空白组和模型组之间,但基本正常,轮廓较清晰,有光泽,有少许斑点,未见出血点。

3.2 绿原酸对小鼠肝脏、脾脏系数的影响 结果见表1。与正常组比较,模型组小鼠肝脾重量明显增加,肝脾指数显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,绿原酸各剂量组小鼠肝脾指数显著降低($P < 0.01$),并呈现良好的剂量依赖性。

表1 绿原酸对 CCl₄ 致肝损伤小鼠的肝脾重量及肝脾指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肝指数/%	脾指数/%
正常	-	1.95 ± 1.21	0.28 ± 0.69
模型	-	3.20 ± 0.26 ¹⁾	0.55 ± 0.048 ¹⁾
联苯双酯	600	2.10 ± 0.34 ²⁾	0.28 ± 1.06 ²⁾
绿原酸	14	2.00 ± 1.16 ²⁾	0.29 ± 2.61 ²⁾
	7	2.40 ± 1.52 ^{2,3)}	0.36 ± 0.19 ^{2,3)}
	3.5	3.20 ± 1.09 ^{1,4)}	0.49 ± 1.21 ^{1,4)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与绿原酸 14 mg·kg⁻¹组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2,3同)。

3.3 绿原酸对小鼠血清中 ALT,AST 的影响 结果见表2。与正常组比较,模型组小鼠血清中 ALT,

AST 活性显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,绿原酸各剂量组大鼠血清中 ALT,AST 活性的显著降低($P < 0.01$),并呈现良好的剂量依赖性。

表2 绿原酸对 CCl₄ 致小鼠肝损伤血清中 ALT,AST 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
正常	-	32.90 ± 0.69	35.17 ± 2.61
模型	-	76.21 ± 6.19 ¹⁾	85.13 ± 6.89 ¹⁾
联苯双酯	600	37.98 ± 6.53 ²⁾	41.12 ± 2.14 ²⁾
绿原酸	14	40.01 ± 7.14 ²⁾	43.59 ± 4.32 ²⁾
	7	51.19 ± 9.45 ^{2,3)}	52.99 ± 5.97 ^{2,3)}
	3.5	62.66 ± 9.01 ^{2,4)}	66.97 ± 7.34 ^{2,4)}

3.4 绿原酸对小鼠肝组织中 SOD 活性,MDA,GSH-Px 水平的影响 结果见表3。与正常组比较,模型组小鼠肝组织中 SOD 活性、GSH-Px 水平显著降低($P < 0.01$),MDA 水平显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,绿原酸各剂量组小鼠肝组织中 MDA 的含量显著降低($P < 0.01$),肝组织中的 SOD 的活力和 GSH-Px 的水平显著增强($P < 0.01$),并且绿原酸各剂量组效果呈现良好的剂量依赖性。

表3 绿原酸对 CCl₄ 致肝损伤小鼠肝组织中 SOD 活性的影响和肝组织中 MDA,GSH-Px 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·g ⁻¹	MDA/nmol·g ⁻¹	GSH-Px/U·g ⁻¹
正常	-	120.19 ± 5.99	21.26 ± 5.89	200.01 ± 10.64
模型	-	62.69 ± 6.76 ¹⁾	46.31 ± 5.49 ¹⁾	85.35 ± 8.97 ¹⁾
联苯双酯	600	116.59 ± 10.26 ²⁾	19.06 ± 1.99 ²⁾	195.09 ± 21.59 ²⁾
绿原酸	14	112.98 ± 8.41 ²⁾	21.68 ± 10.28 ²⁾	196.19 ± 10.56 ²⁾
	7	98.36 ± 11.18 ^{2,3)}	28.54 ± 6.84 ^{2,3)}	169.77 ± 13.61 ^{2,3)}
	3.5	81.76 ± 9.88 ^{2,4)}	35.51 ± 9.87 ^{2,4)}	141.57 ± 15.11 ^{2,4)}

3.5 绿原酸对肝脏组织病理学的影响 正常对照组,小鼠肝组织 HE 染色结果结构正常,肝小叶结构清楚,肝细胞正常,未见明显病理改变。与正常组相比,模型组小鼠肝细胞呈多发灶状坏死,肝细胞体积明显增大,广泛水肿,部分肝细胞脂肪变性;汇管区小叶周边充血和有大量炎细胞浸润,偶见碎屑状坏死,提示造模成功。与模型组比较,绿原酸各剂量组的病变程度明显减轻,肝细胞再生明显,但肝细胞仍然存在一定程度的水肿、脂肪变性,偶伴有点状坏死,汇管区少量炎细胞浸润。

4 讨论

一般认为,中草药为天然的物质,比较安全,不良反应少,且对某些西药无效的疾

病有一定的疗效,因此无论在东方和西方国家中应用日趋广泛^[9-10]。因此本人对绿原酸抗肝损伤的实验进行了研究。肝脏是人体内重要的代谢场所及解毒器官,肝损伤严重威着人类的健康。近年来,越来越多的环境毒物或药物引起肝伤,虽然治疗手段在不断发展,但这一问题仍得不到解决,是一世界性的难题^[11]。研究表明,中医防治肝损伤、肝纤维化是多途径、多层次、多靶点的^[12],其在治疗肝损伤、肝纤维化方面有自身的优势,而且副作用小、经济适用,极具开发价值。许多中药诸如当归、莪术、葫芦巴、丹参、桃仁、虫草菌丝、汉防己、姜黄等,在临床和实验研究中已被证实具有较好的抗肝损伤、肝纤维化作用。因此我们在前期的实验基础上,对杜仲叶中含有的绿原酸进

行了抗肝损伤的深入和系统的研究。

CCl_4 损伤肝组织机制是 CCl_4 经肝细胞色素 P450 代谢激活后生成三氯甲基($\cdot\text{CCl}_3$) 自由基和氯自由基($\cdot\text{Cl}$), 引起生物膜脂质过氧化, 造成膜结构和功能损伤, 蛋白质等物质合成代谢发生障碍, 导致肝细胞损伤坏死, 胞浆内转氨酶渗入血液, 肝细胞脂质过氧化或坏死。 CCl_4 在体内对肝细胞亲和力大, 自由基的形成及引发的链式反应是 CCl_4 损伤肝组织的主要机制^[13]。

笔者在以前的实验研究和调查中就已显示杜仲具有较好的抗肝损伤的作用, 本实验结果亦显示, 绿原酸具有明显的抗肝损伤的作用, 并且高剂量组效果最好, 与低剂量组呈现良好的剂量关系。因在实验过程中发现绿原酸可对抗 SOD, GSH 的降低, 并可对抗 MDA 的升高, 因此推测其抗肝损伤的机理可能与能增强小鼠清除自由基的能力有关, 同时绿原酸亦可抑制自由基启动的脂质过氧化反应, 从而使肝细胞受到自由基攻击时可因其过度消耗而减少, 因此对肝细胞有良好的保护作用, 上述结果也可以说绿原酸抗肝损伤的作用是多层次、多多靶点的^[14]。本实验的研究将为绿原酸抗肝损伤进一步深入和系统的研究提供科学依据, 有望将绿原酸开发成为抗肝损伤的新药。

[参考文献]

[1] 张伟农, 刘大川, 胡小泓. 葵花籽仁中提取绿原酸的研究[J]. 中国油脂, 2002, 27(2): 76.
[2] Hai-Tao Lu. Application of preparative high-speed counter-counter chromatography for separation of chlorogenic acid from Flos Lonicerae [J]. J Chromatogr A, 2004, 1026: 185.
[3] 尉芹, 马希汉, 景谦平. 杜仲叶中绿原酸的提取工艺

条件研究[J]. 林产化学与产业, 2001, 21(4): 27.
[4] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社(1986), 2090.
[5] 周程艳, 余海平, 王树华, 等. 杜仲醇提物对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1173.
[6] 周程艳, 余海平, 陶志彬, 等. 杜仲水提物对四氯化碳所致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2321.
[7] 戚晓渊, 史秀灵, 高银辉, 等. 绿原酸抗肝纤维化作用的实验研究. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 88.
[8] 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 2002. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1346.
[9] Wang J, Ji L, Liu H, et al. Study of the hepatotoxicity induced by Dioscorea bulbifera L. rhizome in mice [J]. Biosci Trends, 2010, 4(2): 79
[10] Chau T N. Drug-induced liver injury: an update [J]. Hong Kong Med Diary, 2008, 13(3): 23.
[11] Park S W, Lee C H, Kim Y S, et al. Protective effect of baicalin against carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice [J]. J Pharmacol Sci, 2008, 10(6): 136.
[12] van Zonneveld M, Honkoop P, Hansen BE, et al. Long-term follow-up of alpha-interferon treatment of patients with chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 2004, 39(3): 804.
[13] 吴诚, 吕著海, 沈存思, 等. 养元饮对酒精性肝损伤大鼠解酒和保肝作用. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 150.
[14] 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. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 247.

[责任编辑 聂淑琴]