

藤茶提取物抗慢性肝纤维化作用

欧贤红¹, 吕林艳², 郑作文^{2*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 观察藤茶提取物(TF)抗慢性肝纤维化的作用及机制。方法: 将 Wistar 大鼠随机分为 TF 高(200 mg·kg⁻¹)、中(100 mg·kg⁻¹)、低(50 mg·kg⁻¹) 剂量组, 秋水仙碱(colchicine, Colc, 0.1 mg·kg⁻¹) 组, 模型组和正常组, ig 给药。给药同时各组皮下注射(sc)四氯化碳(CCl₄)造模, 每周 2 次。于 10 周后, 检测大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT), 天冬氨酸转氨酶(AST), 碱性磷酸酶(AKP), 白蛋白(ALB), 球蛋白(GLB), 肝组织羟脯氨酸(Hyp), 丙二醛(MDA), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 及苏木精-伊红(HE)染色后的肝组织病理变化。结果: 与模型组比较, TF 高、中、低剂量组均能明显降低肝纤维化大鼠血清中 ALT, AST, AKP, GLB 的含量($P < 0.01$)及肝组织中 MDA 和 Hyp 的含量($P < 0.05$), 明显提高血清 ALB 水平($P < 0.01$)及肝组织 GSH-Px 活性($P < 0.01$); 肝脏组织学检查表明, TF 可明显改善肝组织病理损伤程度, 其作用呈剂量依赖性。结论: TF 对实验性慢性肝损伤具有保护肝细胞, 减少肝损伤, 抗肝纤维化作用。

[关键词] 藤茶; 肝纤维化; 四氯化碳

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0132-03

Anti-hepatofibrosis Effects of Tengcha Extract from *Ampelopsis grossedentata*

OU Xian-hong¹, LV Lin-yan², ZHENG Zuo-wen^{2*}

(1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Tengcha extract(TF) on hepatofibrosis induced by chronic hepatic injury. **Method:** Wistar rats were randomized into six groups: TF treatment (200, 100 and 50 mg·kg⁻¹) groups, colchicines treatment(Colc, 0.1 mg·kg⁻¹) group, model group and normal control group. Rats were injected carbon tetrachloride (CCl₄) subcutaneously two times a week to induce hepatofibrosis as well as ig administration of TF or colchicines. After 10 weeks, the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (AKP), albumin (ALB), globulin (GLB) in serum and hydroxyproline(Hyp), malondialdehyde(MDA), glutathione peroxidase(GSH-Px) in liver tissue were determined, and liver histological changes were investigated by hematoxylin-eosin(HE) staining. **Result:** Compared with model group, TF significantly reduced the levels of ALT, AST, AKP and GLB in serum($P < 0.01$), and decreased Hyp, MDA level in liver tissue ($P < 0.05$) while ALB, A/G, GSH-Px were elevated significantly ($P < 0.01$). Pathological examination revealed that TF had therapeutical effect on experimental hepatofibrosis. **Conclusion:** TF has better effects on protecting hepatocyte, relieving liver injury and against hepatofibrosis.

[Key words] Tengcha; hepatofibrosis; carbon tetrachloride(CCl₄)

[收稿日期] 20100709(008)

[基金项目] 广西科技厅攻关课题(0322024-5B)

[第一作者] 欧贤红, 博士生, 讲师, 研究方向: 抗肿瘤中草药研究, Tel: 13217804787, E-mail: blueeye8081@163.com

[通讯作者] * 郑作文, 硕士, 教授, 主要从事抗肿瘤中草药研究, Tel: 13877173116, E-mail: oxh1980@163.com

瑶族藤茶系葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand. -Mazz.) W. T. Wang 的嫩茎叶经传统加工揉制、干燥而成。广泛分布于广西各地以及云南、广东、湖南等地^[1]。其性凉味甘、淡, 具有清热解毒、消肿止痛、祛风湿、强筋骨等功效, 主治皮肤癣癩、黄疸型肝炎、感冒风热、咽喉肿痛、急性结膜炎、痢疾等^[2]。从藤茶中提取的主要活性成分(TF), 前期研究表明其有明显的保肝降酶作用。本文报告 TF 抗慢性肝损伤肝纤维化作用及机理的研究结果。

1 材料

1.1 动物 180 ~230 g 清洁级健康 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 由广西区药品检验所提供, 生产许可证号 SCXK(桂) 2003-0001。

1.2 药品与试剂 TF 由广西中医学院中药化学教研室提供, 含量为 89%。秋水仙碱片: 昆明制药集团股份有限公司生产, 批号 20040266。CCl₄: 天津市博迪化工有限公司生产, 批号 20040710。本实验所用试剂及试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 批号分别为丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST) 试剂盒, 批号 050823; 肝组织羟脯氨酸(Hyp) 试剂盒, 批号 20051103; 丙二醛(MDA) 试剂盒, 批号 20051015; 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 试剂盒, 批号 050823, 考马斯亮蓝、碱性磷酸酶(AKP)、白蛋白(ALB) 试剂盒, 批号 20051021。

1.3 仪器 紫外-可见分光光度计(型号 Agilent8453); 高速低温离心机(德国 Biofuge stratos); 半自动生化分析仪(德国, 型号 Chem300); JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所)。

2 方法^[3]

2.1 肝纤维化模型的建立 每只大鼠首次于背部 sc 纯 CCl₄ 5 mL·kg⁻¹, 以后 sc 40% CCl₄ 花生油溶液 3 mL·kg⁻¹, 每周 2 次, 共 10 周。

2.2 动物分组及给药 将动物随机分为 6 组, 空白组 10 只, 模型组 26 只, 其余各组各 20 只。分别为 A ~C TF 3 个剂量组(剂量分别为 200, 100, 50 mg·kg⁻¹)、D 秋水仙碱组(0.1 mg·kg⁻¹)、E 模型组、F 正常组。除 F 组外, 其余各组按 2.1 中方法造模。在造模同时, A ~D 组 ig 给药, E, F 组 ig 同等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 10 周。实验期间所有大鼠标准饮食。

2.3 标本的采集 大鼠实验前禁食 24 h, 用锥子固

定于蛙板上, 经股动脉取血, 处死后于平卧状态下剖腹, 去肝脏筋膜, 将肝脏置于冰生理盐水中充分洗涤后, 一部分固定于 10% 甲醛溶液中, 一部分做肝组织匀浆。

2.4 检测方法

2.4.1 血清指标 均参照试剂盒说明书方法检测。

2.4.2 肝组织中 Hyp, MDA, GSH-Px 的检测 均参照试剂盒说明书方法检测。

2.4.3 光镜检查 取肝组织石蜡包埋, Sam 连续切片, 常规 HE 染色, 光镜观察括肝小叶结构、纤维增生情况、间隔是否形成、汇管区是否扩大、肝细胞排列, 肝细胞变性坏死、间质炎性细胞浸润和肝细胞的再生情况。

2.5 数据处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐性检验采用 *F* 检验, 两组间差异用 *t* 检验(方差不齐时采用 *t* 检验校正公式)。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对肝功能相关指标的影响 从表 1 ~2 可知, 与模型组比较, TF 各剂量组 ALT, AST, AKP, MDA 均显著降低, GSH-Px 活性明显升高。

表 1 藤茶提取物对大鼠血清中 ALT, AST, AKP 的影响($\bar{x} \pm s$) U·L⁻¹

组别	剂量 /ng·kg ⁻¹	<i>n</i>	ALT	AST	AKP
正常	-	10	57.85 ±3.45 ²⁾	95.88 ±10.96 ²⁾	16.96 ±3.16 ²⁾
模型	-	11	699.41 ±128.76	888.43 ±192.03	47.96 ±10.86
秋水仙碱	0.1	11	381.39 ±130.89 ²⁾	508.74 ±197.08 ²⁾	19.09 ±9.56 ²⁾
藤茶提取物	200	10	418.69 ±194.58 ²⁾	502.09 ±91.06 ²⁾	20.87 ±9.68 ²⁾
	100	10	367.99 ±125.43 ²⁾	580.94 ±379.77 ²⁾	25.24 ±8.78 ²⁾
	50	13	403.64 ±127.22 ²⁾	522.72 ±280.05 ²⁾	21.76 ±3.26 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01 (表 2 ~3 同)。

表 2 藤茶提取物对大鼠肝组织中 MDA, GSH-Px 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	<i>n</i>	MDA /μmol·g ⁻¹	GSH-Px /U·mg ⁻¹
正常	-	10	9.80 ±6.31 ²⁾	223.82 ±62.22 ²⁾
模型	-	11	38.04 ±11.98	37.48 ±3.41
秋水仙碱	0.1	11	17.46 ±8.67 ²⁾	62.27 ±12.63 ²⁾
藤茶提取物	200	10	24.75 ±10.66 ¹⁾	86.25 ±23.82 ²⁾
	100	10	27.23 ±10.07 ¹⁾	96.21 ±18.28 ²⁾
	50	13	29.37 ±6.09 ¹⁾	82.36 ±11.37 ²⁾

3.2 对肝纤维化相关指标的影响 从表 3 可看出, 与模型组相比, TF 各剂量组的 ALB 显著升高, GLB 和 Hyp 显著降低。

表 3 藤茶提取物对大鼠 ALB, GLB, A/G, Hyp 的影响 (珣±s)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	ALB /g·L ⁻¹	GLB /g·L ⁻¹	A/G	Hyp /mg·g ⁻¹
正常	-	10	44.25 ±7.36 ²⁾	43.74 ±12.14 ²⁾	1.11 ±0.42 ²⁾	14.85 ±3.10 ²⁾
模型	-	11	26.53 ±4.32	60.21 ±6.47	0.44 ±0.086	21.47 ±4.87
秋水仙碱	0.1	11	38.32 ±5.50 ²⁾	39.88 ±5.66 ²⁾	0.99 ±0.27 ²⁾	15.24 ±4.51
藤茶提取物	200	10	54.35 ±11.84 ²⁾	19.33 ±13.44 ²⁾	1.57 ±5.01 ²⁾	17.00 ±4.38 ¹⁾
	100	10	48.13 ±5.09 ²⁾	28.90 ±7.90 ²⁾	1.82 ±0.78 ²⁾	18.15 ±5.05 ¹⁾
	50	13	38.66 ±5.85 ²⁾	34.81 ±8.53 ²⁾	1.20 ±0.44 ²⁾	17.47 ±4.07 ¹⁾

3.3 肝组织病理学变化 正常组肝细胞结构正常, 未见有脂肪变性、肿胀、纤维组织增生等明显的病理组织学改变。模型组大部分肝组织间质有不同程度的纤维组织增生, 有大量脂肪细胞堆积, 肝细胞水肿, 炎症细胞浸润, 伴肝细胞碎片状坏死。与模型对照组比较, TF 高剂量组肝细胞肿胀程度明显减轻, 未见纤维化增生; TF 中剂量组纤维化增生明显减轻。

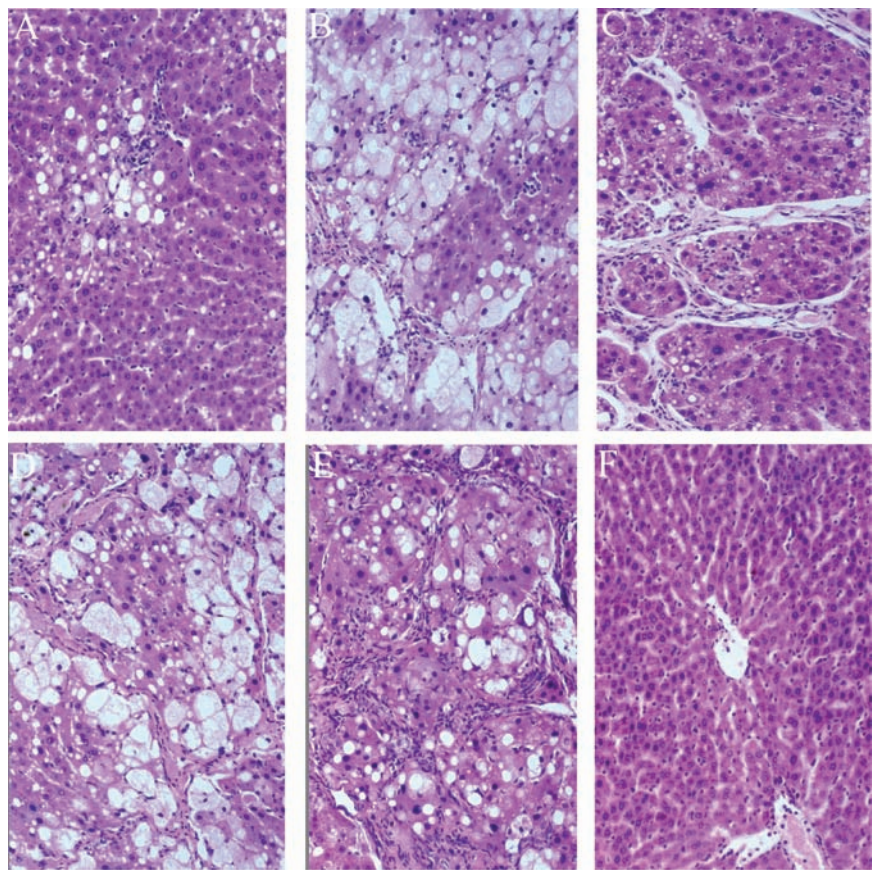


图 1 大鼠肝组织变化情况(HE 染色, ×20)

A. 藤茶提取物 200 mg·kg⁻¹组; B. 藤茶提取物 100 mg·kg⁻¹组; C. 藤茶提取物 50 mg·kg⁻¹组; D. 秋水仙碱 0.1 mg·kg⁻¹组; E. 模型组; F. 正常组

4 讨论

肝纤维化是肝脏受到慢性损伤时的一种修复反应, 同时也是多种慢性肝病发展至肝硬化的必经阶段。本研究显示 TF 可显著抑制血清 ALT, AST, 扭转 CCl₄ 引起的 A/G 倒置, 使 ALB 回升, GLB 合成减

少。抑制肝 Hyp 水平的升高, 胶原纤维主要由胶原蛋白所构成, Hyp 为胶原蛋白所特有的氨基酸成分, 其在肝中的含量可反映胶原代谢的变化情况, 与肝纤维化程度平行^[4]。病理观察提示 TF 可以明显减轻肝细胞脂肪变性及炎性细胞浸润, 抑制胶原纤维的增生, 说明 TF 确能抑制肝脏胶原纤维的合成与沉积, 具有抗肝纤维化的作用。

脂质过氧化是 CCl₄ 造成肝损伤的主要机制。近年研究显示, 脂质过氧化是肝纤维化形成机制的一个重要学说, 肝纤维化时, 肝脏脂质过氧化程度与肝纤维化程度相一致。脂质过氧化正成为治疗肝纤维化方面一个新的靶点^[5]。本研究结果显示, TF 能明显降低肝纤维化大鼠血清中异常升高的 MDA 含量并使 GSH-Px 含量提高, 提示 TF 抑制肝纤维化可能与抗氧化有关, 其作用机制及在临床上是否有抗肝纤维化的疗效有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 广西中医药研究所. 广西药用植物名录 [M]. 南宁: 广西人民出版社, 1986: 300.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 下册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1976: 789.
- [3] 齐洪军, 胡曼菁, 王长松, 等. “祛瘀化痰汤”抗大鼠肝纤维化的作用及其机制 [J]. 江苏中医药, 2003, 24 (7): 55.
- [4] 刘永刚, 陈厚昌, 蒋毅萍. 姜黄素抗肝纤维化的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2002, 13 (5): 273.
- [5] Dan Li, Friedman S L. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy [J]. J Gastroenterol Hepatol, 1999, 14 (3): 618.

[责任编辑 聂淑琴]