

广西藤茶双氢杨梅树皮素对小鼠肝细胞凋亡的影响

阎莉¹, 卫智权², 郑作文^{1*}, 郝二伟¹

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 广西医科大学, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 探讨藤茶双氢杨梅树皮素(Vine tea dihydromyricetin, VTD)对撤除苯巴比妥钠(sodium Phenobarbital, SP)诱导的小鼠肝细胞凋亡的影响, 揭示其抗肝损伤作用的机制。方法: 采用撤除 SP 诱导肝细胞凋亡的小鼠模型, 予以高、低剂量 VTD(200, 50 mg·kg⁻¹) ig, 并设置正常对照、SP 不撤对照及 SP 撤除模型组。以 HE 染色镜检观察肝组织病理形态变化, 以流式细胞术、细胞原位 TUNEL 法检测肝细胞凋亡率, 评估 VTD 对肝细胞凋亡的影响。结果: HE 染色镜检可见正常对照组与 SP 不撤对照组肝组织形态大致正常, SP 撤除模型组与 VTD 高、低剂量组均见不同程度肝细胞凋亡。流式细胞术分析、细胞原位 TUNEL 法检测结果显示, VTD 低剂量组肝细胞凋亡率分别为 17. 7%, 2. 9%, 均显著低于 SP 撤除模型组(分别为 27. 4%, 4. 5%), 差异具有统计学意义(*P* < 0. 01)。VTD 高剂量组肝细胞凋亡率与 SP 撤除模型组比较其差异无统计学意义。结论: 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹的 VTD ig 可显著抑制 SP 撤除诱导的小鼠肝细胞凋亡, 提示抑制肝细胞凋亡可能为 VTD 肝保护作用的机制之一。

[关键词] 藤茶; 双氢杨梅树皮素; 肝细胞凋亡

[中图分类号] R285. 5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 16-0102-03

Effects of Dihydromyricetin from Guangxi Vine Tea on Hepatocellular Apoptosis in Mice

YAN Li¹, WEI Zhi-quan², ZHENG Zuo-wen^{1*}, HAO Er-wei¹

(1. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of dihydromyricetin from *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. Wang (Vine tea dihydromyricetin, VTD) on hepatocyte apoptosis induced by the cessation of phenobarbital sodium (SP) injection treatment in mice, and to explore its mechanism of hepatoprotective effect. **Method:** The mouse model with hepatocellular apoptosis induced by removing SP was established. The mice were randomly divided into blanks, negative controls, positive controls and test groups. Test groups of mice were given intragastric gavage of 200, 50 mg·kg⁻¹ VTD. Hepatic apoptosis was detected by flow cytometry, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end (TUNEL), and pathological changes in the liver tissue were observed after HE staining. **Result:** The histopathological analysis of the liver showed normal liver morphology in blanks and negative controls, and varying degrees of liver cell apoptosis in positive controls and low- and high-dose VTD groups. The outcome from flow cytometry and TUNEL showed hepatocellular apoptosis rate in low dose of VTD group were 17. 7%, 2. 9% respectively. All of these values were lower than those in positive controls (*P* < 0. 01). **Conclusion:** The mouse hepatocellular apoptosis induced by removing SP can be markedly inhibited by treating with VTD in 50 mg·kg⁻¹, and it might be one of the hepatoprotective mechanisms for VTD to inhibit the hepatocellular apoptosis.

[Key words] vine tea; dihydromyricetin; hepatocellular apoptosis

[收稿日期] 20100511(005)
[基金项目] 广西自然科学基金项目(桂科自 0542100)
[第一作者] 阎莉, 医学硕士, 讲师, 研究方向为中药、民族药的活性成分筛选和研发, Tel: 13878868617, E-mail: mimao00@ 163. com
[通讯作者] * 郑作文, Tel: 13877173116, E-mail: zzw_nn@ 163. com

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^[1]。全株药用,味甘、淡,性凉,具有清热解毒、祛风湿、强筋骨等功效^[2],为瑶族民间常用的草药之一。多项药理学研究表明,藤茶有保护肝脏、抑制人乙型肝炎病毒等作用^[3-4]。本实验首次采用撤除苯巴比妥钠(Sodium phenobarbital, SP)诱导肝细胞凋亡的小鼠模型,探讨藤茶双氢杨梅树皮素(Vine tea dihydromyrcetin, VTD)对肝细胞凋亡的影响,以进一步揭示其肝保护作用的机制。

1 材料

1.1 药物 VTD 由广西中医学院抗病毒实验中心提供,纯度 >90%,批号 20080910。

1.2 动物 SPF 级昆明小鼠,体重 18 ~22 g,雌雄各半。由广西壮族自治区药品检验所提供,许可证号 SCXK 桂 2003-0003。

1.3 试剂 注射用 SP(上海新亚药业有限公司,批号 061204),细胞凋亡 PI 染色试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),RNA 酶(美国 Sigma),TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(Roche 公司),其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 动物分组及处理 50 只小鼠分为 5 组,每组 10 只,分别为正常对照组,细胞凋亡阴性对照组(SP 不撤除对照组,即阴性组),细胞凋亡模型组(SP 撤除对照组,即模型组)和 VTD 高、低剂量组(200, 50 mg·kg⁻¹)。正常组、阴性组动物分别 ip 无菌生理盐水和 0.5% SP 80 mg·kg⁻¹,1 次/d,连续 7 d;阳性组和 VTD 各给药组动物均 ip 0.5% SP 80 mg·kg⁻¹,1 次/d,连续 6 d 后停药。给药组动物撤除 SP 后立即 ig 给高、低剂量的 VTD,给药容积为 20 mL·kg⁻¹,1 次/6 h,共给药 6 次。撤除 SP 后 36 h 将所有小鼠脱颈椎处死,取肝组织备检。

2.2 HE 染色镜检 取肝组织,中性福尔马林固定,石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下随机选取 10 个高倍视野(×400),观察肝组织病理形态变化。

2.3 流式细胞术分析 取小鼠肝组织,分离肝细胞,用 PBS 洗涤细胞一次,离心(2 000 r·min⁻¹, 5 min),收集并调整细胞密度为 1 ×10⁶/mL⁻¹;细胞加 9 倍体积的 70% 冰乙醇,于 -20℃ 固定至少 12 h;离心收集细胞后,用 PBS 洗涤细胞以除去乙醇,细胞重悬于 500 μL PBS 中;加入 RNA 酶,使其终浓度为 0.25 g·L⁻¹,37℃ 反应 30 min;加入 5 μL PI 室温避光染色 30 min,于流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.4 TUNEL 法检测 按照 Roche Applied Science 公司 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作步骤进行。光镜下观察,凋亡细胞胞核呈棕黄色或棕褐色,核固缩或染色质边集。细胞核呈黄色或棕黄色为阳性细胞(即凋亡细胞)。随机观察 10 个高倍视野(×400)中阳性细胞数和总细胞数,阳性细胞数占总细胞数的比例即为肝细胞凋亡率。

2.5 统计学处理 所有数据均以 SPSS for Windows 11.0 统计软件包处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均值比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肝组织变化 光镜下可见正常组和阴性组肝小叶结构大致正常,肝索肝窦较清晰,个别切片可见肝细胞有轻、中度浊肿变性,肝细胞间散在个别淋巴细胞浸润,无坏死。模型组肝小叶结构尚可辨认,肝索肝窦结构不清,大部分肝细胞中、重度浊肿变性,以中度为主,有散在灶状淋巴细胞浸润和点状坏死,汇管区较多炎症细胞浸润,可见细胞核染色质浓缩、边集呈新月体样,胞质明显嗜酸性,有或没有胞质的浓缩的凋亡细胞。VTD 高剂量组肝小叶结构欠清,肝细胞轻、中度浊肿变性,以中度浊肿变性为主,少部分重度浊肿变性,肝细胞间散在淋巴细胞浸润,无坏死,汇管区少量炎细胞浸润,凋亡细胞可见。VTD 低剂量组肝小叶结构大致正常,大部分肝索肝窦结构较清晰,肝细胞部分轻度浊肿变性,少量中度浊肿变性,肝细胞间散在淋巴细胞浸润,无坏死,汇管区少量炎细胞浸润,可见少量的凋亡细胞。结果见图 1。

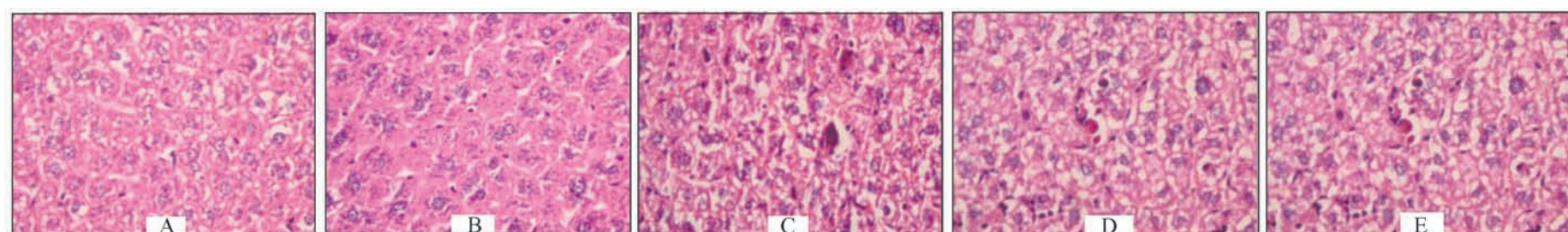


图 1 藤茶双氢杨梅树皮素对撤除苯巴比妥钠诱导肝细胞凋亡小鼠肝脏病理变化的影响(HE 染色, ×200)

A. 正常组; B. SP 不撤除组; C. 撤除 SP 组; D. 撤除 SP + VTD 200 mg·kg⁻¹; E. 撤除 SP + VTD 50 mg·kg⁻¹

3.2 肝细胞凋亡率 流式细胞仪分析表明, SP 撤除模型组凋亡率明显高于正常组及阴性组($P < 0.01$), 提示 SP 撤除凋亡模型复制成功。与 SP 撤除模型组相比较, VTD 低剂量组肝细胞凋亡率降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$), VTD 高剂量组肝细胞凋亡率虽低于 SP 撤除模型组, 但差异无统计学意义。提示 VTD 能降低 SP 撤除引起的肝细胞凋亡, 特别是在给药剂量为 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时效果显著。结果见表 1。

表 1 流式细胞术检测肝细胞凋亡率($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	凋亡率 / %
正常对照	-	$11.8 \pm 5.66^{1)}$
SP 不撤除	-	$16.9 \pm 5.57^{1)}$
SP 撤除	-	27.4 ± 7.54
VTD	200	22.2 ± 8.64
	50	$17.7 \pm 9.18^{1)}$

注: 与 SP 撤除组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 细胞原位 TUNEL 法检测肝细胞凋亡率 模型组可见单个散在分布的凋亡细胞。正常组、阴性组及 VTD 低剂量组则无明显凋亡现象, 凋亡细胞数与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。VTD 高剂量组仍有散在凋亡小体, 凋亡细胞数与模型组比较, 差异无统计学意义。结果见表 2。

表 2 细胞原位 TUNEL 法检测细胞凋亡率($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	凋亡率 / %
正常对照	-	$2.2 \pm 1.93^{1)}$
SP 不撤除	-	$2.5 \pm 0.97^{1)}$
SP 撤除	-	4.5 ± 1.27
VTD	200	4.0 ± 0.94
	50	$2.9 \pm 0.99^{1)}$

4 讨论

肝细胞凋亡异常增多是多种肝脏疾病的重要发病机制之一, 其直接后果是肝细胞数量减少, 肝功能受损^[5-8]。因此, 抑制肝细胞凋亡异常增多也是研究肝细胞保护药物时常用的重要作用靶点与考察药物保护肝细胞能力的指标之一。以体外细胞培养方法研究肝细胞凋亡存在一些固有缺陷, 如细胞的膜蛋白改变、缺乏细胞间以及细胞与间质间相互作用、细胞反应性变化等, 与机体发生急慢性肝病时在整体环境中发生的肝细胞凋亡存在较大差别, 降低了研究结果的可信性。与之相比较, 采用整体动物模型则能够更好地模拟急慢性肝病时肝细胞凋亡的情况, 故本研究采用了苯巴比妥撤除诱导的肝细胞凋亡小鼠模型。苯巴比妥能够明显加强肝细胞增殖, 停药后肝细胞增殖迅速减少, 并伴随典型的肝细胞

凋亡过程^[8]。本研究也表明该模型稳定性好, 重复性强, 是研究肝细胞凋亡的较好的整体动物模型。

藤茶在广西民间常用于治疗各种肝病, VTD 是藤茶的主要有效成分, 已经证实 VTD 具有抑制乙肝病毒、减轻肝脏组织学损伤、保护肝功能等作用。本研究结果显示, VTD 以 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量给药时能够显著抑制苯巴比妥撤除诱导的小鼠肝细胞凋亡, 提示抑制肝细胞凋亡可能是 VTD 减轻肝脏组织学损伤、保护肝功能等药理效应的重要机制之一; 而在 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量给药时则未能观察到类似的结果, 提示 VTD 的给药剂量与其抑制肝细胞凋亡的作用之间的关系不是简单的线性关系, 可能只是在某个剂量范围之内 VTD 才具有我们期望的药理效应。鉴于肝细胞凋亡在肝脏组织学损伤机制中的重要性, 而 VTD 可能只是在某个剂量范围之内发挥减轻肝脏组织学损伤、保护肝细胞的药理效应, 因而应当进行更为深入的量效关系研究以及 VTD 抑制肝细胞凋亡机制研究以揭示二者之间的复杂关系。当然, 如果延长苯巴比妥撤除后 VTD 干预时间, 也许对于明确是否存在这样的非线性量效关系更为有利, 毕竟较短的药物干预时间可能无法充分反映药物对机体的长期影响。

[参考文献]

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(二册) 补编[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 349.

[2] 广西植物研究所. 广西药用植物名录[M]. 南宁: 广西民族出版社, 1974: 202.

[3] 钟正贤, 覃洁萍, 周桂芬, 等. 广西藤茶总黄酮保肝作用的实验研究[J]. 广西科学, 2002, 9(1): 57.

[4] 郑作文. 藤茶总黄酮在 2.2.1.5 细胞培养中对乙型肝炎病毒 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的抑制作用[J]. 山东中医杂志, 2003, 22(9): 561.

[5] 王俊学, 王国俊, 蔡雄, 等. 氧化苦参碱及甘草甜素对小鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(4): 222.

[6] 李平, 陈东鸿, 程建峰, 等. 地塞米松及甘草酸对小鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(2): 143.

[7] 陈东鸿, 李平, 程建峰, 等. 柴胡及甘草酸对小鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(3): 279.

[8] Schulte H R, Timmermann T I, Barthl G, et al. DNA synthesis, apoptosis and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion[J]. Cancer Res, 1990, 50: 5127.

[责任编辑 聂淑琴]