

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001469

杠板归总黄酮提取物对 α -萘异硫氰酸脂诱导小鼠胆汁淤积性肝损伤保护作用研究

陈 婧, 张天洪, 万雪梅, 蒋菁蓉, 高 爽
(成都中医药大学附属医院感染科, 成都 610075)

【摘要】目的:通过构建 α -萘异硫氰酸脂(α -naphthylisothiocyanate, ANIT)诱导小鼠肝损伤模型, 研究杠板归总黄酮提取物对小鼠肝脏的保护作用及其作用机制。**方法:**随机将 60 只昆明种小鼠分为 6 组, 分别为空白对照组, 病理模型组, 阳性对照组(联苯双酯 0.15 g/kg), 杠板归总黄酮提取物高、中、低剂量组(1.2、0.6、0.3 g/kg)。除空白对照组外, 采用腹腔注射 ANIT 的方法制造小鼠急性肝损伤模型, 用杠板归总黄酮提取物连续灌胃 9 d, 禁食 20 h 后, 眼球取血、取肝组织, 测定肝组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)的含量及血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate amino transferase, AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、总胆汁酸(total bile acid, TBA)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)水平。**结果:**与模型组相比, 杠板归总黄酮高剂量组小鼠血清 ALT 水平[(243.14 $\pm$ 27.35) U/L]、AST 水平[(345.02 $\pm$ 24.01) U/L]、LDH 水平[(505.97 $\pm$ 68.56) U/L]、TBA 水平[(112.02 $\pm$ 17.16) nmol/mL]、TBIL 水平[(15.08 $\pm$ 4.09) nmol/mL]以及肝组织中 GSH 含量[(63.08 $\pm$ 4.88) μ mol/mg]和 MDA 含量[(3.55 $\pm$ 0.32) nmol/mg]明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 中剂量组小鼠肝组织中血清 ALT 水平[(330.56 $\pm$ 24.74) U/L]、AST 水平[(438.60 $\pm$ 32.51) U/L]、LDH 水平[(597.90 $\pm$ 66.90) U/L]、TBA 水平[(144.62 $\pm$ 16.37) nmol/mL]、TBIL 水平[(27.36 $\pm$ 6.51) nmol/mL]以及肝组织中 GSH 含量[(54.52 $\pm$ 3.80) μ mol/mg]和 MDA 含量[(5.65 $\pm$ 0.35) nmol/mg]与模型组相比也明显降低, 差异也具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**杠板归总黄酮对 ANIT 诱导小鼠胆汁淤积性肝损伤有一定的疗效。

【关键词】杠板归; 总黄酮; 保肝; 胆汁淤积性; α -萘异硫氰酸脂

【中图分类号】R575

【文献标志码】A

【收稿日期】2016-12-21

Protective effect of total flavonoids extracted from Polygonum knotweed L on α -naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in mice

Chen Jing, Zhang Tianhong, Wan Xuemei, Jiang Jingrong, Gao Shuang

(Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To investigate the protective effects and mechanisms of total flavonoids (TF) on α -naphthylisothiocyanate-induced (ANIT-induced) cholestatic liver injury in mice. **Methods:** Sixty Kunming mice were evenly randomized into 6 groups, namely normal group, model group, biphenyl dimethylester group (0.15 g/kg), high-dose, middle-dose, and low-dose TF groups (1.2, 0.6, 0.3 g/kg). Except for the blank control group, the acute liver injury model was established by intraperitoneal injection of ANIT, and went gastric lavage with total flavonoids extracted from *Polygonum knotweed* L. for 9 consecutive days. After fasting for 20 hours, the liver tissue and the blood from eyeballs were taken out, and the content of SOD, MDA and GSH in liver tissue, as well as the serum level of ALT, AST, LDH, TBA, TBIL were measured. **Results:** Compared with the model group, Serum ALT levels in high dose group mice of total flavonoids extracted from *Polygonum knotweed* L. [(243.14 $\pm$ 27.35) U/L], Levels of AST [(345.02 $\pm$ 24.01) U/L], Levels of LDH [(505.97 $\pm$ 68.56) U/L], TBA [(112.02 $\pm$ 17.16) nmol/mL], TBIL [(15.08 $\pm$ 4.09) nmol/mL] and GSH contents in the liver [(63.08 $\pm$ 4.88) μ mol/mg] as well as MDA contents [(3.55 $\pm$ 0.32) nmol/mg] were lower in high-dose TF group than in model group, The difference was statistically significant ($P < 0.05$). Serum ALT levels in medium dose group mice [(330.56 $\pm$ 24.74) U/L], levels of AST [(438.60 $\pm$ 32.51) U/L], LDH [(597.90 $\pm$ 66.90) U/L], TBA [(144.62 $\pm$ 16.37) nmol/mL], TBIL [(27.36 $\pm$ 6.51) nmol/mL] and GSH contents in the liver [(54.52 $\pm$ 3.80) μ mol/mg] as well as MDA content [(5.65 $\pm$ 0.35) nmol/mg] were also lower in middle-dose TF group than in model group, the difference was also statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The total flavonoids extracted from *P. knotweed* exerts therapeutic effect on ANIT-induced liver injury with cholestasis in mice.

【Key words】 *Polygonum knotweed* L.; total flavonoids; hepato-protective; cholestatic; α -naphthylisothiocyanate

作者介绍: 陈 婧, Email: 20365115@qq.com,

研究方向: 中西医结合感染。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180109.0951.004.html>
(2018-01-09)

在预防、治疗疾病和维持人们身体健康方面,传统中药已经为我们服务了数千年。化学药虽然疗效好、药理作用明确,但是副作用也比较大。相比而言,传统中药疗效好、副作用少,为了开发新型保肝药物,越来越多的科研人员把目光转向传统中药。药理学研究表明,传统中药对于治疗肝病,包括胆汁淤积性肝炎有很好的疗效^[1]。杠板归(*Polygonum knotweed* L.)为多年生草本蓼科属植物,生长于路边、沟旁,分布广泛,全国各地均可见。是一种药用价值很高的中草药,民间主要用于吐血、水肿、黄疸、带下、蛇虫咬伤等疾病^[2]。现代植物化学研究表明,杠板归黄酮类成分较多,主要含槲皮素、芦丁等黄酮类化合物^[3]。黄酮类化合物在抗氧化、保护心脏、抗肿瘤及保肝方面有较好的药理活性^[4-5]。有研究表明,杠板归对二甲亚硝胺诱导的肝纤维化的具有较好的保护作用^[6]。本实验建立 ANIT 急性肝损伤模型,通过不同剂量杠板归黄酮提取物的干预作用,考察其对肝组织和血清中抗氧化及肝功能指标的变化,来研究杠板归黄酮提取物对小鼠胆汁淤积性肝损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康的昆明种小白鼠,SPF 级,雌雄各半,6~8 周龄,体重(20±2)g,购自长沙天勤生物技术公司,许可证号:SCXK(湘)2009-0012。杠板归总黄酮提取物,实验自制,药材购自浙江中医药大学中药饮片厂;丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)试剂盒、谷胱甘肽(glutathione,GSH)试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)试剂盒、天冬氨酸转氨酶(aspartate amino transferase,AST)试剂盒、考马斯蓝试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;总胆汁酸(total bile acid,TBA)试剂盒、总胆红素(total bilirubin,TBIL)试剂盒购自南昌百特生物公司;α-萘异硫氰酸脂购自 Sigma 公司;联苯双酯片剂购自北京协和药厂。

1.2 实验仪器

酶标仪购自美国 Molecular 公司;DY89-II 电动匀浆机购自宁波新芝生物科技有限公司;R-200 型旋转蒸发仪购自瑞士 Buchi 公司;高速冷冻离心机(TGL-16M)购自长沙迈佳森仪器设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 杠板归总黄酮提取物制备 称取粉碎药材 2.5 kg,用 70%乙醇回流提取,提取 3 次,过滤,合并提取液,滤液减压

回收乙醇,得浸膏。用适量水充分混匀,加盐酸调 pH 至 5。D101 大孔吸附树脂纯化,上样,静止过夜后,先用 30 %的乙醇洗脱,再收集 70%乙醇洗脱液,回收溶剂,得总黄酮提取物(UV 法测得纯度为 75%左右)。

1.3.2 小鼠给药与分组 随机将 60 只昆明种小鼠分为 6 组,分别为空白对照组,病理模型组,阳性对照组(联苯双酯 0.15 g/kg),杠板归总黄酮提取物高、中、低剂量组(1.2、0.6、0.3 g/kg)。ANIT 使用前用花生油配置成 2%浓度。空白对照组和模型组灌胃等量的 0.5% CMC-Na 溶液,阳性对照组灌胃联苯双酯,高、中、低剂量组灌胃杠板归总黄酮提取物(0.5% CMC-Na 溶解),连续灌胃 9 d。第 7 天,禁食 12 h 后,空白组腹腔注射花生油作为对照,其他所有组腹腔注射 ANIT(50 mg/kg)诱导胆汁淤积模型^[7-8]。最后一次灌胃禁食 20 h 后眼球取血,待血液静止一段时间后于 4 500 r/min 4 ℃下离心 5 min,取上清液保存于 4 ℃冰箱备用。解剖小鼠,取其肝脏组织,先用冰生理盐水将组织上的血液洗去,滤纸吸干,再保存于-20 ℃冰箱备用。

1.3.3 指标检测 试剂盒比色法测定肝组织中 SOD、MDA、GSH 的含量及血清中 ALT、AST、LDH、TBA、TBIL 的含量。

1.4 数据统计、处理

采用 SPSS 18.0 软件处理数据,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 杠板归总黄酮提取物对 ANIT 诱导肝损伤小白鼠血清 AST、ALT、LDH、TBA、TBIL 含量的影响

与空白对照组比较,病理模型组血清 AST($t_D=32.000$, $P=0.002$)、ALT($t_D=120.000$, $P=0.001$)、LDH($t_D=77.000$, $P=0.002$)、TBA($t_D=85.000$, $P=0.000$)、TBIL($t_D=121.000$, $P=0.002$)含量水平明显升高,差异均有统计学意义,表明腹腔注射 ANIT 可诱导小鼠肝损伤和胆汁淤积症,建模成功;与模型组比较,阳性对照组血清 AST($t_D=25.000$, $P=0.002$)、ALT($t_D=173.000$, $P=0.001$)、LDH($t_D=102.000$, $P=0.001$)、TBA($t_D=72.000$, $P=0.002$)、TBIL($t_D=3.500$, $P=0.003$)含量水平明显降低,差异均有统计学意义,说明联苯双酯可减轻 ANIT 致小鼠肝损伤;与模型组比较,杠板归总黄酮提取物高、中剂量组小鼠血清 ALT($t_D=81.000$, $P=0.021$; $t_D=67.000$, $P=0.031$)、AST($t_D=122.000$, $P=0.009$; $t_D=106.000$, $P=0.000$; $t_D=182.000$, $P=0.012$)及 LDH 酶($t_D=110.000$, $P=0.012$; $t_D=89.000$, $P=0.015$)的活性增加速度明显减少,差异均有统计学意义。与空白对照组比较,模型组小鼠血清 TBA($t_D=67.000$, $P=0.024$)、TBIL($t_D=24.000$, $P=0.002$)含量水平明显升高,差异均有统计学意义。与模型组比较,杠板归总黄酮提取物高、中剂量组小鼠血清 TBA($t_D=66.000$, $P=0.022$; $t_D=29.000$, $P=0.037$)、TBIL($t_D=17.000$, $P=0.019$; $t_D=14.000$, $P=0.016$)的水平明显下降,差异均有统计学意义,杠板归总黄酮提取物高剂量组保肝效果最好,见表 1。

表 1 杠板归总黄酮提取物对 ANIT 致肝损伤小鼠血清 ALT、AST、LDH、TBA、TBIL 的影响

Tab.1 Effect of the total flavonoids extracted from *P. knotweed* on serum ALT, AST, LDH, TBA, TBIL in ANIT-induced liver injury mice

组别	剂量 (g/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)	TBA (nmol/mL)	TBIL (nmol/mL)
空白组	—	87.18 ± 12.31	176.54 ± 19.30	328.61 ± 25.52	41.44 ± 10.01	7.02 ± 0.93
模型组	—	506.06 ± 37.74 ^a	752.04 ± 35.77 ^a	1211.39 ± 166.99 ^a	264.81 ± 22.61 ^a	62.97 ± 9.68 ^a
联苯双酯组	0.15	322.04 ± 19.18 ^b	352.04 ± 37.18 ^b	624.07 ± 64.86 ^b	137.59 ± 17.06 ^b	14.97 ± 3.96 ^b
高剂量组	1.20	243.14 ± 27.35 ^b	345.02 ± 24.01 ^b	505.97 ± 68.56 ^b	112.02 ± 17.16 ^b	15.08 ± 4.09 ^b
中剂量组	0.60	330.56 ± 24.74 ^b	438.60 ± 32.51 ^b	597.90 ± 66.90 ^b	144.62 ± 16.37 ^b	27.36 ± 6.51 ^b
低剂量组	0.30	408.43 ± 20.54 ^b	583.32 ± 32.53 ^b	795.27 ± 91.49	185.33 ± 27.17	33.92 ± 3.62 ^b
F 值		33.795	41.381	40.183	48.936	26.379
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: a, 与空白组比较, $P < 0.05$; b, 与模型组比较, $P < 0.05$

表 2 杠板归总黄酮提取物对 ANIT 致肝损伤小鼠肝组织 SOD、GSH、MDA 的影响

Tab.2 Effect of the total flavonoids extracted from *P. knotweed* on liver tissue SOD, GSH, MDA in ANIT-induced liver injury mice

组别	剂量 (g/kg)	SOD (U/mg)	GSH-Px (μmol/mg)	MDA (nmol/mg)
空白组	—	314.31 ± 14.92	73.51 ± 4.46	2.95 ± 0.29
模型组	—	163.97 ± 21.56 ^a	32.47 ± 4.64 ^a	7.86 ± 0.49 ^a
联苯双酯组	0.15	250.97 ± 18.45 ^b	56.27 ± 4.14 ^b	5.74 ± 0.34 ^b
高剂量组	1.20	296.08 ± 15.87 ^b	63.08 ± 4.88 ^b	3.55 ± 0.32 ^b
中剂量组	0.60	235.96 ± 10.78 ^b	54.52 ± 3.80 ^b	5.56 ± 0.35 ^b
低剂量组	0.30	224.92 ± 13.47 ^b	47.52 ± 3.36 ^b	6.59 ± 0.33 ^b
F 值		26.379	21.497	11.538
P 值		0.000	0.000	0.000

注: a, 与空白组比较, $P < 0.05$; b, 与模型组比较, $P < 0.05$

2.2 杠板归总黄酮提取物对小鼠肝脏 SOD、GSH 活性和 MDA 含量的影响

与空白对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 MDA 含量 ($t_D=1.500, P=0.012$; $t_D=3.400, P=0.016$) 增加, 肝组织中 SOD ($t_D=77.000, P=0.023$; $t_D=48.000, P=0.021$) 及 GSH 酶 ($t_D=123.000, P=0.004$; $t_D=148.000, P=0.003$) 的活性降低, 差异均有统计学意义, 表明 ANIT 能导致肝组织脂质过氧化。与模型组比较, 阳性对照组、杠板归总黄酮提取物高、中、低剂量组小鼠肝组织中 MDA ($t_D=4.100, P=0.006$; $t_D=6.200, P=0.012$; $t_D=3.200, P=0.005$; $t_D=1.800, P=0.017$) 的含量明显降低, SOD ($t_D=145.000, P=0.012$; $t_D=173.000, P=0.021$; $t_D=340.000, P=0.004$; $t_D=219.000, P=0.005$) 及 GSH 酶 ($t_D=133.000, P=0.011$; $t_D=79.000, P=0.021$; $t_D=99.000, P=0.007$; $t_D=54.000, P=0.008$) 的活性增高, 差异均有统计学意义。结果表明, 杠板归总黄酮提取物通过提高 SOD、GSH 酶的活性, 降低脂质过氧化产物 MDA 的含量来保护肝组织, 见表 2。

3 讨 论

在流行病学研究报告中, 有很多化学药物具有

肝毒性, 胆汁淤积症与肝细胞损伤是药物诱导肝毒性的严重临床表现。已经有上千年临床经验与实践的传统中药, 由于其良好的疗效及低毒性, 近年来越来越受学界的关注, 但目前尚缺乏对这些中药治疗肝损伤及胆汁淤积症的作用机制的研究。本实验通过建立 ANIT 肝损伤和胆汁淤积性病理模型来探讨不同剂量杠板归总黄酮提取物对 α -萘异硫氰酸脂诱导小鼠胆汁淤积性肝损伤的保护作用, 为深度开发杠板归药材提供理论依据。

由于 ANIT 诱导动物肝损伤在病理学与生物化学方面的改变与胆汁淤积性肝炎的病理改变非常相似, 故 ANIT 常被用于建立胆汁淤积性肝损伤病理模型^[9]。当肝细胞遭到损害时, ALT 和 AST 会从肝细胞中释放出来流入血液, 因此血清 AST、ALT 的含量水平是诊断肝疾病敏感指标^[10]。同时, 当组织损害时, LDH 酶被释放出来, 所以 LDH 也被作为组织损害和疾病的标志性生化指标^[11]。胆道系统异常的直接结果就是导致血清 TBA、TBIL 升高, 因此血清 TBA、

TBIL 往往作为肝脏的病理生化指标^[12]。通过腹腔注射 ANIT, 导致小鼠血清中肝细胞指标(ALT、AST 和 LDH)和胆汁淤积性指标(TBA、TBIL)明显上升, 即为成功制造小鼠肝损伤和胆汁淤积症模型。经不同剂量杠板归总黄酮提取物(1.2、0.6、0.3 g/kg)干预后, 小鼠血清 AST、ALT、LDH、TBA 及 TBIL 肝胆指标明显降低, 且效果呈剂量依赖性。说明杠板归总黄酮可改善 ANIT 诱导的肝细胞损害, 体现了杠板归总黄酮对由 ANIT 所致小鼠肝损伤的保护作用。

在 ANIT 诱导小鼠胆汁淤积性模型中, 氧化应激与胆汁淤积性肝损伤中的脂质过氧化产物有关^[8]。MDA 是多不饱和脂肪酸的脂质过氧化产物, 它是一种高毒性分子, 且被广泛认为是脂质过氧化的标志性产物^[13]。本实验中以 MDA 为脂质过氧化指标, 通过给予杠板归总黄酮能够降低模型小鼠肝组织中 MDA 的水平, 说明杠板归总黄酮是通过抑制 ANIT 诱导脂质过氧化反应的机制保护肝组织的。生物体能够通过自身的抗氧化系统, 抑制氧化应激态, 其中包括谷胱甘肽非酶系统和抗氧化酶系统。这两大系统协调工作, 从而保护生物机体免受自由基的损害^[14]。在本实验中, 与模型组相比, 经高、中剂量杠板归总黄酮干预后, 小鼠肝组织中 SOD 和 GSH 水平升高, 表明杠板归总黄酮能通过抑制氧化自由基和提高抗氧化能力来保护肝细胞。

目前的研究结果表明, 杠板归总黄酮提取物对 ANIT 诱导小鼠胆汁淤积性肝损伤有一定的疗效, 其机理可能是通过抑制脂质过氧化反应和提高机体的抗氧化能力来实现的。

参 考 文 献

- [1] Zhao CQ, Zhou Y, Ping J, et al. Traditional Chinese medicine for treatment of liver diseases: progress, challenges and opportunities[J]. Integr Med, 2014, 12(5):401-408.
- [2] 《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [3] 赵 超, 陈华国, 龚小见, 等. 杠板归的化学成分研究(II)[J]. 中草药, 2010, 41(3):365.
- [4] 陈国有, 齐 鹤, 徐东花. 黄酮类化合物的生物活性研究进展[J]. 黑龙江医药, 2008, 21(3):81-83.
- [5] 汤 泓, 汤丽玲, 徐瑞娟, 等. 部分黄酮类化合物的 II 相代谢产物及其药理活性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(2):144-150.
- [6] 张可锋, 杜正彩, 高雅, 等. 杠板归抗二甲亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16):242-245.
- [7] Ding L, Zhang B, Zhan C, et al. Danning tablets attenuates α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis by modulating the expression of transporters and metabolic enzymes[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1):249.
- [8] Jin F, Cheng D, Tao JY, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of corilagin in a rat model of acute cholestasis[J]. BMC Gastroenterol, 2013, 13(1):79.
- [9] Amin K, Ip C, Sato B, et al. Characterization of ANIT-induced toxicity using precision-cut rat and dog liver slices cultured in a dynamic organ roller system[J]. Toxicol Pathol, 2006, 34(6):776-784.
- [10] Carobene A, Braga F, Roraas T, et al. A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and γ -glutamyl transferase[J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(10):1997-2007.
- [11] Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, et al. The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review[J]. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1997, 35(8):569-579.
- [12] Fevery J. Bilirubin in clinical practice: a review[J]. Liver Int, 2008, 28(5):592-605.
- [13] Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2005, 15(4):316-328.
- [14] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer[J]. Chem Biol Interact, 2006, 160(1):1-40.

(责任编辑: 张辉洁)