

葛根总黄酮对小鼠急性肝损伤保护作用的实验研究

★ 喻松仁^{1*} 程绍民¹ 刘春燕² 指导:高书亮¹ (1. 江西中医学院 南昌 330004;2. 新建县中医院 新建 330100)

摘要:目的:探讨葛根总黄酮对 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤的保护作用,同时进一步探讨葛根总黄酮抗肝损伤可能的作用机制。方法:用四氯化碳(CCl₄)制备急性肝损伤动物模型。测定血清中天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)、肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA)含量,并观察肝组织形态学变化。结果:葛根总黄酮能显著降低 CCl₄ 所致小鼠血清 AST、ALT 含量的升高($P < 0.01$),并能升高 SOD 的活性,降低 MDA 含量($P < 0.05$);减轻对肝细胞的病理性损害。结论:葛根总黄酮对 CCl₄ 所致的小鼠急性肝损伤具有一定的保护作用,其机制可能与清除氧自由基和抗脂质过氧化有关。

关键词:葛根总黄酮;急性肝损伤;保护作用

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

3.3 梯形面积法求得两种升温方式中各时间点的 AUT

表1 100 V 与 220 V 升温方式各时间点的 AUT

加热方式	时间 /min													
	0	3	6	9	12	15	18	38	58	78	98	118	129	138
100V	0	83	194	348	545	786	1 069	3 070	5 070	7 070	9 070	11 070	/	13 070
220V	0	92	257	529	829	1129	1429	3429	5429	7429	9 429	11 429	12 529	13 429

3.4 AUT 与峰面积的相关性研究结果

运用线形回归法考察两种升温方式下 AUT、AUT0.5、logAUT 与六个主要峰峰面积的函数相关性。综合表2和表3的统计结果得出各峰的峰面积与 AUT0.5 的相关性较好,所得的12个相关系数中有11个大于0.97。

表2 100 V 升温方式的 AUT 与各峰面积的回归相关系数

处理模式	峰号					
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6
AUT	0.9926	0.9423	0.9237	0.9212	0.9075	0.9909
AUT0.5	0.9549	0.9868	0.9794	0.9791	0.9713	0.9757
logAUT	0.8644	0.9713	0.9768	0.9751	0.9708	0.9045

表3 220 V 升温方式的 AUT 与各峰面积的回归相关系数

处理模式	峰号					
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6
AUT	0.9921	0.9657	0.9010	0.8969	0.9185	0.9826
AUT0.5	0.9742	0.9931	0.9720	0.9708	0.9781	0.9738
logAUT	0.9012	0.9431	0.9857	0.9849	0.9738	0.8874

4 讨论

在提取车间提取中药时,冬天和夏天的中药提取物质量有明显差别,主要在于冬天和夏天的升温速度不同,导制产品批次间有较明显的差异。传统的提取过程控制只是控制提取时间,当升温速度不

一样时,即达到提取所需温度前的升温过程有差异,显然会导致整个提取过程的差异化。本文研究了 AUT 与丹参诸峰峰面积的相关性,设想控制 AUT 来代替控制提取时间,通过控制 AUT 与起点温度和升温速度无关,提取过程的终止是由提取前设定好的 AUT 值来决定的。

六个主要峰峰面积与 AUT1/2 的相关性较好,绝大部分的相关系数大于0.97,表明温度-时间曲线下面积参数用于控制中药提取过程具有可行性。本文只研究了水提丹参一例,其它中药材的提取是否有同样的结果还有待研究。

参考文献

- [1]唐铁军,陈镜合,刘中球,等. 开心胶囊不同提取工艺对大鼠血清心肌酶及心电图的影响[J]. 中药新药与临床药理,1999,10(1):45-47.
- [2]王建农,刘建勋,李欣志等. 调变山楂叶有效成分比例对犬血流动力学的影响[J]. 中国新药杂志,2004,13(7):608-612.
- [3]谢培山. 中药指纹图谱在中药新药开发研究中的作用[J]. 中药新药杂志,2002,11(12):905-90.

(收稿日期:2009-04-28)

* 作者简介:喻松仁(1976-),男,汉族,江西九江人,硕士,讲师,江西中医学院从事教学及研究工作。Tel:13807003650。

Experimental Study on Protective Effects of Radices Puerarire Total Flavone against Mice Acute Liver Injury

YU Song-ren¹, CHENG Shao-min¹, LIU Chun-yan², GAO Shu-liang¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004;

2. Traditional Chinese Medicine hospital of Xinjian, Xinjian, 330100

Abstract: Objective: To observe the protective effects of Radices Puerarire Total Flavone on carbon tetrachloride (CCl₄) induced acute hepatic injury of mice, and to explore its Possible mechanisms. Methods: Acute hepatic injury model was induced by CCl₄. then the activities of aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) in blood serum were detected. Besides, the activities of superoxide dismutase (SOD) and the contents of malondialdehyde (MDA) in hepatic tissues were also measured. Meanwhile the pathology of the liver was observed with microscopy. Results: Radices Puerarire Total Flavone significantly decreased CCl₄ induced acute hepatic injury with increasing the activities of AST, ALT and the content of MDA, increased the activities of SOD in serum, relieved the level of liver injury. Conclusion: It is revealed that Radices Puerarire Total Flavone could prevent CCl₄ from inducing acute liver injury. The mechanisms are possibly related with inhibiting lipid peroxidation and scavenging oxygen free radicals.

Key words: Radices Puerarire Total Flavone; Liver injury; Protective effect

中药葛根为豆科多年生落叶藤本植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd) Ohwi 或甘葛藤 *Pueraria thomsonii* Benth 的根,始载于《神农本草经》列为中品,分布于我国南北各地,春秋两季采挖,切片,晒干,生用或煨用。具有解肌退热,生津透疹,升阳止泻的功效,可用于麻疹初起,发热,恶寒,疹出不畅,湿热泻痢及脾虚腹泻,热病烦渴及口渴多饮之症。现代药理研究表明其体内的葛根总黄酮具有松弛血管平滑肌、对脑缺血的保护、雌激素样及抗肿瘤等^[1]作用,可用于防治脑缺血、萎缩性咽炎和抗肿瘤等^[2~4]疾病。为了进一步探究葛根总黄酮的使用范围,根据肝损伤的生理病理特点,结合葛根总黄酮的功效,本实验初步探讨葛根总黄酮对急性肝损伤的保护作用及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 昆明种小鼠,普通级,雌雄各半,体重 18~22 g,由江西省动物医学实验中心提供,合格证号:江医动字 92010402。

1.1.2 药物及试剂 葛根总黄酮(含量 60%),西安赛邦医药科技有限公司,临用时于 0.5% 羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na)中混悬。联苯双酯(批号:000493),北京协和药厂,临用前用蒸馏水配成 2 mg/ml 溶液;丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定试剂盒(批号:20060311),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)测定试剂盒(批号:

20060311),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号:20060322),丙二醛(MDA)试剂盒(批号:20060320)均为南京建成生物工程研究所产品;四氯化碳(批号:20030218)分析纯,天津市博迪化工有限公司产品;实验所需的其它药品及试剂均为国产分析纯,由江西中医学院基础医学形态学科组提供。

1.1.3 主要仪器与设备 BE-3200D 精密电子天平(d=0.01 g),日本岛津;722 光栅分光光度计,上海分析仪器厂;恒温水箱,常州国华电器有限公司;匀浆器,宁波新芝生物科技服务公司;离心机:LD74-0.8,北京医用离心机厂;OLYMPUS 显微镜-附带 JVC 摄像机,日本;Leica 切片机,德国。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药 取健康的昆明小鼠 60 只,适应环境 5 天后,按性别、体重分层,再随机分为 6 组,即正常对照组、模型对照组、联苯双酯组、葛根总黄酮低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组 10 只。葛根总黄酮低剂量组、中剂量组和高剂量组分别按照 30 mg/kg·d、60 mg/kg·d、120 mg/kg·d 量灌胃给药,联苯双酯组按照 100 mg/kg·d 量灌胃给药,每天 1 次,连续 9 天。正常对照组和模型对照组灌予等体积的生理盐水,方法同上。

1.2.2 小鼠急性肝损伤模型的制备^[5~6] 小鼠于末次给药后 2 h,模型对照组、葛根总黄酮低剂量组、葛根总黄酮中剂量组、葛根总黄酮高剂量组和联苯双酯组按文献方法一次性腹腔注射 0.1% CCl₄ 花生

油,剂量 $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重,禁食不禁水。正常对照组注射等容积的蒸馏水。实验过程中,所有动物均食用标准条状饲料,饮冷开水;并常规观察各组小鼠的精神状态、活动情况、毛发光泽度、进食以及排便等情况。24 h 后,眼球后静脉丛取血;处死小鼠,打开腹腔,取出肝脏,每只小鼠在肝大叶相同部位取 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.4 \text{ cm}$ 大小的肝组织,修剪干净,放入 10% 的甲醛中浸泡固定,用于肝脏病理组织学检查;剩余肝组织放入冷生理盐水中,供制备肝组织匀浆。

1.2.3 测定血清中 ALT 和 AST 活性 血液以 2000 r/min 离心 20 分钟,收集上清,按照试剂盒标注的方法(赖氏法)测定小鼠血清内 ALT 和 AST 的活性。

1.2.4 测定肝组织中 SOD 活力和 MDA 含量 将取得的肝组织块在冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,称重,放入 5 ml 的小烧杯内,用移液管量取预冷的 0.9% 冷生理盐水,生理盐水的体积总量是组织块重量的 9 倍,用移液管取总量 $2/3$ 的生理盐水于烧杯中,用眼科小剪刀尽快剪碎组织块。将剪碎的组织块倒入玻璃匀浆器中,再将剩余的 $1/3$ 冷生理盐水冲洗残留在烧杯中的碎组织块,一起倒入匀浆器中进行匀浆,上下转动,使肝组织匀浆化,然后倒入试管中,即制备好了 10% 的组织匀浆。将制备好的 10% 组织匀浆用离心机 3 000 r/min, 4°C 离心 15 min,取上清,按试剂盒说明书测定待测肝组织 SOD(嘌呤氧化酶法)和 MDA(硫代巴比妥酸法)。

1.2.5 统计学处理方法 数据采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行方差检验。

1.3 结果

1.3.1 葛根总黄酮对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠一般状态的影响 造模前,各组小鼠状态良好,进食饮水正常,毛色润泽;造模后,除正常对照组外,其余各组小鼠均易激惹,聚堆,反抗性增强,反抗力减弱,进食及饮水量减少,毛色不润泽,稍竖立,但各组均没有出现死亡情况。

1.3.2 葛根总黄酮对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠血清转氨酶的影响 小鼠注射 CCl_4 后,血清中的 ALT、AST 明显升高,模型组与正常对照组比较均有极显著差异($P < 0.01$)。联苯双酯、葛根总黄酮高、中剂量均能明显的使升高的 ALT、AST 下降,与模型组比较均有极显著差异($P < 0.01$)。葛根总黄酮低剂量组能使升高的 AST 明显下降,与模型组比较有极显

著差异($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 葛根总黄酮对小鼠急性
肝损伤血清中 ALT 和 AST 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT / $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST / $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照组	—	67.6 ± 9.54	122.7 ± 23.33
模型组	—	$322.5 \pm 60.69^{\Delta\Delta}$	$471.3 \pm 68.94^{\Delta\Delta}$
联苯双酯组	100	$199.7 \pm 31.00^{**}$	$303.2 \pm 56.05^{**}$
葛根总黄酮高剂量组	120	$201.4 \pm 37.73^{**}$	$305.2 \pm 57.79^{**}$
葛根总黄酮中剂量组	60	$217.3 \pm 28.54^{**}$	$315.7 \pm 57.29^{**}$
葛根总黄酮低剂量组	30	278.3 ± 48.23	$371.7 \pm 64.49^{**}$

与正常对照组比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较 $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ 。

1.3.3 葛根总黄酮对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠肝匀浆 SOD 活力和 MDA 含量的影响 小鼠注射 CCl_4 后,小鼠肝匀浆中的 SOD 明显下降,模型组与正常对照组比较有显著性差异($P < 0.05$),小鼠肝匀浆中的 MDA 明显升高,模型组与正常对照比较有显著性差异和极显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。联苯双酯和葛根总黄酮高剂量能明显的升高肝匀浆中的 SOD,且能明显的降低肝匀浆中的 MDA,与模型组比较差异均有统计学意义。葛根总黄酮低剂量能明显升高肝匀浆中的 SOD,且能明显的使肝匀浆中的 MDA 下降,与模型组比较差异有统计学意义(见表 2)。

表 2 葛根总黄酮对小鼠急性
肝损伤 SOD 和 MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA / $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$
正常对照组	—	154.9 ± 27.22	2.35 ± 0.05
模型组	—	$134.2 \pm 11.52^{\Delta}$	$4.83 \pm 0.46^{\Delta\Delta}$
联苯双酯组	100	$153.7 \pm 12.30^{*}$	$2.69 \pm 0.50^{**}$
葛根总黄酮高剂量组	120	$162.0 \pm 15.49^{**}$	$3.70 \pm 0.72^{**}$
葛根总黄酮中剂量组	60	151.5 ± 7.45	$2.43 \pm 0.26^{**}$
葛根总黄酮低剂量组	30	$159.2 \pm 7.37^{**}$	$3.89 \pm 0.46^{**}$

与正常对照组比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较 $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ 。

1.3.4 葛根总黄酮对 CCl_4 致急性肝损伤小鼠肝脏病理学的影响 正常对照组肝小叶清晰,肝细胞索排列规整,肝细胞大小、形态无异常,肝汇管区无炎细胞浸润,未见明显肝细胞变性、水肿、肝细胞坏死(图 1-1)。模型对照组肝小叶和肝索排列紊乱,可见多个点状较大肝坏死灶,灶内肝细胞明显肿胀、胞浆疏松、细胞结构不清,病变主要位于肝细胞中央区,病灶内可见炎性细胞浸润,肝汇管区可见少量炎细胞浸润(图 1-2)。联苯双酯组肝小叶和肝索结构排列整齐,肝细胞肿胀和胞质疏松程度较模型组明显减轻,点状坏死病灶少见,肝汇管区可见少量炎细胞浸润(图 1-3)。葛根总黄酮高剂量和中剂量组肝小叶和肝索排列较规整,点状坏死病灶少见,肝细胞肿胀和胞浆疏松程度较模型组显著减轻,肝汇

管区炎细胞浸润程度减轻(图1-4,1-5)。葛根总黄酮低剂量组肝小叶和肝索结构不规整。可见点状坏死灶,肝细胞肿胀、胞浆疏松、结构不清。病灶内可见炎细胞浸润,肝汇管区可见少量炎细胞浸润(图1-6)。

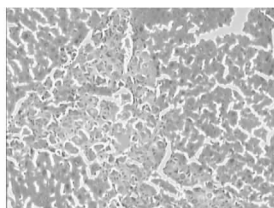
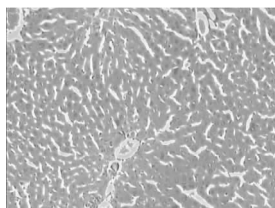


图1-1 小鼠正常对照组(400×) 图1-2 小鼠模型对照组(400×)

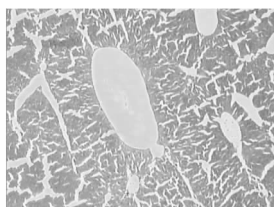
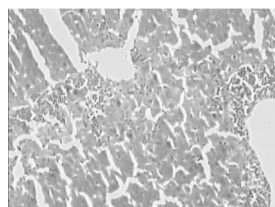


图1-3 小鼠联苯双酯组(400×) 图1-4 小鼠高剂量组(400×)

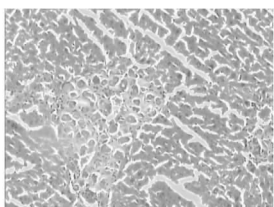
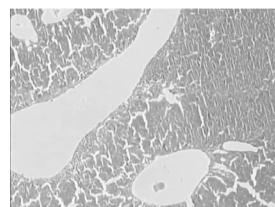


图1-5 小鼠中剂量组(400×) 图1-6 小鼠低剂量组(400×)

2 讨论

为研究葛根总黄酮的保肝作用,我们采用 CCl_4 作为肝毒剂,诱导急性肝损伤模型。四氯化碳是一种趋肝性化学毒物,经肝细胞内细胞色素 P_{450} 依赖的单加氧酶系代谢后 CCl_4 分子中的 C-Cl 键均裂,产生三氯甲基自由基($\text{CCl}_3^\cdot$)和氯自由基($\text{Cl}^\cdot$),前者在有氧条件下进一步形成高度活性的三氯甲基过氧化自由基($\text{CCl}_3\text{O}_2^\cdot$)^[7~8],这两种自由基可攻击肝细胞膜上的磷脂分子,引起脂质过氧化反应,膜磷脂大量降解,从而破坏肝细胞膜结构和功能的完整,导致肝细胞内的一些酶类进入血液血清中转氨酶(ALT、AST等)水平升高,血清转氨酶的升高在一定程度上反映了肝细胞的损伤程度^[9]。实验结果表明葛根总黄酮对 CCl_4 诱导的血清 ALT、AST 的异常增高有显著降低作用,且高剂量组的降低程度较中、低剂量组明显,呈现出正相关性,提示葛根总黄酮对 CCl_4 所致肝细胞损伤有明显保护作用。SOD 含量的变化可作为衡量肝损伤程度的指标之一^[10~11]。 CCl_4 致肝损伤过程中产生了过量的氧自由基,自由基的清除需要消耗大量的 SOD。实验结果表明葛

根总黄酮能增加机体 SOD 含量,增强机体抗氧化能力,加速自由基的清除,抑制脂质过氧化反应。MDA 是脂质过氧化反应过程中的稳定产物。MDA 具有很强的生物毒性,可严重破坏细胞膜结构,导致细胞肿胀、坏死,其含量直接反映了组织氧化损伤的程度,间接反映了肝细胞受自由基攻击后损伤的程度^[12]。实验中各用药组小鼠肝组织内 MDA 含量明显低于模型组,表明联苯双酯与葛根总黄酮有抑制肝组织脂质过氧化反应、保护抗氧化活性的作用,其肝组织的病理检查结果也证实了这一点。

总之,本实验研究发现葛根总黄酮对急性肝损伤动物模型具有明显的保护作用,其机制可能与保护肝细胞膜、清除自由基、抗脂质过氧化等作用有关。但其对免疫组织化学以及对细胞超微结构的影响须待进一步研究,深入研究葛根总黄酮的肝保护作用,可望将其开发为新的治疗肝损伤的药物。

参考文献

- [1] 潘洪平. 葛根总黄酮和葛根素的药理作用和临床应用研究进展[J]. 广西医学, 2003, 25(10): 1941-1944.
- [2] 禹志领, 张广钦, 赵红旗. 葛根总黄酮对脑缺血的保护作用[J]. 中国药科大学学报, 1997, 28(11): 310-312.
- [3] 戚本明, 王正强, 郑明秀, 等. 葛根总黄酮治疗去势大鼠萎缩性咽喉炎的实验研究[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2002, 10(6): 267-270.
- [4] 王庆瑞, 江金花, 孙文欣. 葛根总黄酮预防肿瘤的研究进展[J]. 河南肿瘤学杂志, 1999, 12(1): 84-86.
- [5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理学实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1346.
- [6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 836.
- [7] 陈廷玉, 卢春风, 王培军, 等. 三七对四氯化碳肝损伤小鼠的保护作用及形态学研究[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26(5): 30-31.
- [8] YANG Y, STEPHEN A. Kupffer cells are a major source of increased platelet activating factor in the CCl_4 -induced cirrhotic rat liver[J]. J Hepatol, 2003, 39(2): 200-207.
- [9] 王小莺, 胡国良, 张彩英, 等. 保肝护脾液对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中兽医学杂志, 2006, (2): 10-11.
- [10] 丁克祥. SOD 临床研究集[M]. 北京: 原子能出版社, 1992: 176.
- [11] Sun MA, Wang BE, Annoni A, et al. Two rat models of hepatic fibrosis. Amorphologic and molecular comparison[J]. Lab Invest, 1990, 163(4): 467.
- [12] 刘成, 胡义扬, 王润平, 等. 丹酚酸 A 抗过氧化肝损伤的作用[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(7): 570.

(收稿日期: 2009-04-28)