

董艳珍,郝应芬,王思芦,等. 2 种彝药对 CCl_4 诱导小鼠肝脏损伤的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(7):214–216.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.040

2 种彝药对 CCl_4 诱导小鼠肝脏损伤的影响

董艳珍¹, 郝应芬², 王思芦¹, 肖文渊¹, 吉木阿洛¹

(1. 西昌学院, 四川西昌 6150131; 2. 西昌彝医药研究所, 四川西昌 615000)

摘要:为探讨天胡荽(MT)和虎杖(JC)对四氯化碳诱导小鼠肝损伤的影响,分别以 2 种彝药的不同浓度对模型小鼠连续 7 d 灌胃给药,7 d 后通过酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测小鼠血清中总胆红素(TBIL)、丙二醛(MDA)含量和肝匀浆中的超氧化物歧化酶(SOD)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷草氨酸转氨酶(AST)活性。结果表明,MT 和 JC 均能不同程度地下调各项指标,JC 效果总体优于 MT。与模型组比,JC 各浓度均可显著下调 TBIL 和 MDA 含量,且均以低浓度效果最好,使 TBIL 下降了 30.73% ($P < 0.05$),MDA 下降了 22.42% ($P < 0.05$),JC 低浓度组对 TBIL 的下调作用优于联苯双酯($P < 0.05$);联苯双酯与不同浓度的 2 种彝药均能显著降低 ALT 和 AST 水平,其中 JC 高浓度组的效果最好,使 ALT 比模型组和阳性组分别降低了 32.37% ($P < 0.05$)和 14.55% ($P < 0.05$),使 AST 比模型组和阳性组分别降低了 26.95% ($P < 0.05$)和 8.31% ($P > 0.05$)。JC 具有显著的保肝效果,可为临床应用提供依据。

关键词:彝药;天胡荽;虎杖;四氯化碳;肝功能

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)07-0214-03

肝脏作为动物机体最大的代谢器官,其功能的完善是保障动物机体健康的重要前提。肝细胞常因病原微生物的侵入或有毒有害物质的摄入及代

谢而造成损伤,引起肝炎、肝硬化、肝癌等疾病。现代研究表明,许多天然草药对肝功能具有调节作用,彝医临床对肝病的诊治具有一定的特色,如天胡荽(*Hydrocotyle sibthorpioides*,彝药名为满天星,简称 MT)、虎杖(*Polygonum cuspidatum*,彝药名为几初,简称 JC)均为四川凉山州特产,当地彝医常用其治疗肝病和黄疸。本研究探讨了 2 种彝药的水煎剂对 CCl_4 诱导的急性肝炎中相关生化指标的影响,以评价其作用机制。

收稿日期:2019-04-18

基金项目:四川省应用基础研究面上项目(编号:2017JY0108);四川省西昌市技术研究开发与推广应用项目(编号:16JSYJ17)。

作者简介:董艳珍(1977—),女,硕士,副教授,主要从事水产养殖和疾病防治研究。E-mail:513804974@qq.com。

通信作者:郝应芬,副研究员,主要从事彝族医药研究。E-mail:431908646@qq.com。

acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology,2016,156:1–9.

[6] 李金章,张彦山,马杰,等. 5 种杀虫剂对苹果绵蚜的田间防效和安全性综合评价[J]. 植物保护,2017,43(5):205–209,220.

[7] Ein-Mor E, Ergaz-Shaltiel Z, Berman T, et al. Decreasing urinary organophosphate pesticide metabolites among pregnant women and their offspring in Jerusalem: impact of regulatory restrictions on agricultural organophosphate pesticides use[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health,2018,221(5):775–781.

[8] Harley K G, Engel S M, Vedar M G, et al. Prenatal exposure to organophosphorous pesticides and fetal growth: pooled results from four longitudinal birth cohort studies[J]. Environmental Health Perspectives,2016,124(7):1084–1092.

[9] European Chemicals Agency. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.10: characterisation of dose concentration-response for environment[Z]. 2008:37–41.

[10] European Chemicals Agency. Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.16: environmental exposure assessment, version 3.0[Z]. 2016:120–128.

[11] Backhaus T, Faust M. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework[J]. Environmental Science & Technology,2012,46(5):2564–2573.

[12] 符鑫,梁延鹏,覃礼堂,等. 桂林会仙岩溶湿地水体中有机氯农药分布特征及混合物环境风险评估[J]. 农业环境科学学报,2018,37(5):974–983.

[13] 杨璐,赵博,陈平,等. 模拟氮沉降与蚯蚓添加对油松和辽东栎幼苗生态系统呼吸的影响[J]. 生态学杂志,2019,38(1):44–50.

[14] 罗洁文,黄玫英,殷丹阳,等. 蚯蚓在土壤污染风险评估中的应用研究进展[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):24–29.

[15] University of Hertfordshire. Pesticide Properties DataBase[DB/OL]. [2019-02-10]. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.html>.

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

天胡荽(MT)、虎杖(JC)(西昌彝医药研究所);联苯双酯滴丸(万邦健制药集团股份有限公司);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷草氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、Elisa 试剂盒均购自武汉纯度生物科技有限公司。

1.2 试验动物

90 只质量为(20±2) g 的清洁级健康昆明(KM)小鼠,由西昌学院动物科学学院动物医学实验室提供,常规饲养。

1.3 方法

1.3.1 药物制备 彝药水煎剂制备:将 2 种彝药充分干燥至恒重后,分别取 100 g 粉碎后过 80 目筛,以适量去离子水分别煎煮 15 min,过滤收集滤液,滤渣重复煎煮 1 次,合并滤液浓缩至 100 mL,加入乙醇至其终浓度为 75%,冷藏过夜后 2 000 r/min 离心 10 min,取上清液回收掉乙醇后,用去离子水配制成浓度为 1 g/mL,4℃ 冷藏备用。

联苯双酯悬液制备:将联苯双酯滴丸以适量去离子水研磨,配制成浓度为 0.01 mg/mL 的悬液。

1.3.2 动物分组与处理 将 90 只健康 KM 小鼠,随机分为 15 个组,每组 10 只,雌雄各半。空白组和模型组每天以 0.2 mL 去离子水灌胃;2 种彝药各设高、中、低 3 个剂量组(1.00、0.50、0.25 g/mL),每天灌胃 0.2 mL;阳性组以联苯双酯悬液 0.2 mL 灌胃;各组均连续灌胃 7 d。除了空白组外,其余各组于分别于第 3、5、7 天对小鼠腹腔注射 0.1% CCl₄ 橄榄油 0.2 mL/只。

各组均于最后一次给药 12 h 后,摘眼球采血,分离血清待测;同时颈椎脱臼处死小鼠,精确称取 0.1 g 肝组织,加入 1 mL 4℃ 生理盐水,用球磨仪匀浆器 300 次/min 的振动频率研磨 90 s,于 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液待测。

1.3.3 肝功能指标测定 按照 Elisa 试剂盒使用说明,以酶标仪测定各指标的标准曲线,计算各组小鼠血清或肝脏匀浆中的 TBIL、MDA 含量和 AST、ALT、SOD 活性。

1.3.4 数据处理 各组数据均以平均值±标准差表示,并对数据进行组间方差分析,以 $P<0.05$ 表示组间差异显著。

2 结果与分析

2.1 2 种彝药对小鼠血清 TBIL、MDA 水平的影响

结果表明,与空白组比,模型组的 TBIL 含量升高了 11.68% ($P>0.05$),差异不显著;MDA 含量升高了 11.91% ($P<0.05$),差异显著,表明 CCl₄ 可能诱导小鼠肝脏处理 TBIL 的能力有下降的趋势,而肝脏的抗氧化能力则显著降低。与模型组比,阳性组的联苯双酯可显著提高肝细胞抗氧化功能,降低 TBIL($P>0.05$)和 MDA($P<0.05$)含量,而 MT 组高、中浓度均能显著降低血清 TBIL 含量,其中高浓度效果最好,使血清 TBIL 含量降低了 22.13% ($P<0.05$),同时比阳性组效果好,且差异显著 ($P<0.05$);不同浓度的 MT 组均可显著降低血清 MDA 含量,其中高浓度效果最好,使 MDA 含量比模型组降低了 19.43%;表明 MT 对 CCl₄ 诱导肝损伤小鼠的血清 TBIL、MDA 含量具有下调作用,且呈剂量依赖性。

与模型组比,各浓度 JC 组均可显著下调 TBIL ($P<0.05$)和 MDA ($P<0.05$)含量,且均以低浓度效果最好,使 TBIL 含量下降了 30.73%,MDA 含量下降了 22.42%,JC 低浓度组对 TBIL 的下调作用优于联苯双酯。表明 JC 可能通过促进肝脏代谢及抗氧化功能,从而抑制 CCl₄ 损伤肝细胞(表 1)。

表 1 2 种彝药对小鼠血清中 TBIL、MDA 含量的影响

组别	TBIL 含量 (ng/mL)	MDA 含量 (pmol/mL)
空白组	10.100±0.522	35.745±1.275*
模型组	11.280±0.528	40.003±0.898 ^{#Δ}
阳性组	10.600±0.577	33.563±1.531*
MT 高浓度组	8.784±0.333* ^Δ	32.229±0.936*
MT 中浓度组	9.961±0.385*	33.668±1.823*
MT 低浓度组	10.367±0.404	37.336±1.565*
JC 高浓度组	9.998±0.460*	33.012±1.058*
JC 中浓度组	9.225±0.528* ^Δ	31.908±1.574*
JC 低浓度组	7.814±0.347 ^{#**Δ}	31.035±2.215 ^{#*}

注:同列数据后#、*、Δ 分别表示与空白组、模型组、阳性组在 0.05 水平差异显著。下表同。

2.2 2 种彝药对小鼠肝脏匀浆 ALT、AST、SOD 活性的影响

试验结果表明,与空白组比,CCl₄ 未引起小鼠肝脏的 SOD 表达发生变化,但使模型组 ALT 和 AST 在肝匀浆中的活性均显著升高 ($P<0.05$),表明肝

细胞出现显著的损伤。与模型组比,阳性药物联苯双酯与 2 种彝药不同剂量均能显著降低 ALT 和 AST 活性,其中 JC 高浓度组的效果最好,使 ALT 比模型组和阳性组分别降低了 32.37% ($P < 0.05$) 和 14.55% ($P < 0.05$),使 AST 比模型组和阳性组分别

降低了 26.95% ($P < 0.05$) 和 8.31% ($P > 0.05$),说明 MT 和 JC 均可能通过抵抗或抑制 CCl_4 代谢的某环节发挥不同程度的保肝效果,且 JC 组的效果整体优于 MT 组,但二者与联苯双酯均对肝脏 SOD 的活性无显著影响(表 2)。

表 2 2 种彝药对小鼠肝脏匀浆中 ALT、AST、SOD 活性的影响

组别	ALT 活性 (mU/mL)	AST 活性 (mU/mL)	SOD 活性 (U/mL)
空白组	1.734 ± 0.068 *	2.152 ± 0.109 *	9.757 ± 0.205
模型组	2.292 ± 0.093 #	2.794 ± 0.136 # ^Δ	9.185 ± 0.301
阳性组	1.814 ± 0.067 *	2.226 ± 0.084 *	9.555 ± 0.308
MT 高浓度组	1.832 ± 0.075 *	2.312 ± 0.128 *	9.593 ± 0.348
MT 中浓度组	1.764 ± 0.078 *	2.421 ± 0.119 *	9.524 ± 0.230
MT 低浓度组	1.732 ± 0.061 *	2.095 ± 0.136 *	9.440 ± 0.199
JC 高浓度组	1.550 ± 0.109 * ^Δ	2.041 ± 0.091 *	9.581 ± 0.103
JC 中浓度组	1.699 ± 0.050 *	2.336 ± 0.083 *	9.865 ± 0.347
JC 低浓度组	1.827 ± 0.039 *	2.472 ± 0.066 #*	9.452 ± 0.343

3 讨论

研究表明, CCl_4 在肝脏内被细胞色素 P450 激活产生具有毒性的三氯甲基自由基和三氯甲基过氧自由基,对肝细胞膜和细胞器膜均有破坏作用,从而导致肝细胞坏死。阳性药物联苯双酯可以通过对抗自由基,发挥保肝降酶、减轻肝脏损伤的作用。

天胡荽的现代药理研究表明,其主要的活性成分为黄酮类槲皮素,具有抗炎活性^[1]。天胡荽具有抗乙型肝炎病毒表面抗原的活性^[2],以及抗肝纤维化作用^[3],在临床用于治疗病毒性肝炎及黄疸。虎杖的药理研究表明,其大黄素等蒽醌类化合物具有病毒、抗菌活性^[4]。虎杖苷的分子结构中含有许多共轭双键,清除自由基是虎杖苷抗氧化的途径之一,因此具有显著的抗氧化性^[5];同时虎杖苷通过阻断 NF- κ B 途径,下调肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素 6(IL-6)和白介素 1b(IL-1b)的表达发挥抗炎活性^[6-7]。目前这 2 种草药对肝脏功能的影响报道较少,洪照友等研究表明,虎杖水煎剂可能通过降低肝缺血性损伤组织中氧自由基的含量,减少其对肝组织的损伤^[8]。

本试验中,由 CCl_4 代谢产生的自由基引起细胞膜脂质发生过氧化反应产生 MDA,而血清 MDA 含量在一定程度可以反映细胞的损伤程度,试验结果表明,2 种彝药对血清 MDA 含量具有下调作用,但对肝脏组织 SOD 的活性没有显著影响,说明 2 种彝药的保肝作用可能与 SOD 活性无关,而是通过抑制

代谢 CCl_4 的氧化酶活性或者含有能与自由基反应的抗氧化活性基团实现的。同时,本试验结果表明,MT 和 JC 的水煎剂均可不同程度地降低小鼠肝脏中的 ALT 和 AST 的活性,说明二者可能通过对抗自由基维护肝细胞膜稳定性,减少肝细胞损伤,同时还能促进肝细胞对间接胆红素的转化,有利于直接胆红素的排泄,从而降低血清 TBIL 含量,发挥临床治疗肝炎性黄疸的作用。

参考文献:

[1]董关涛,宋良科,李小锋,等. 天胡荽及其近缘植物的槲皮素含量测定[J]. 安徽农业科学,2010,38(10):5101-5103.

[2]郑民实,李 文,李 蓉,等. 使用 ELISA 技术筛选 270 种中草药抗 HBsAg 作用[J]. 中医研究,1996,9(1):51-54.

[3]彭震宇,王一奇,戚虎昶,等. 天胡荽有效成分 HAS 抗大鼠免疫性肝纤维化的实验研究[J]. 中华中医药学,2009,27(8):1654-1656.

[4]时圣明,潘明佳,王文倩,等. 虎杖的化学成分及药理作用研究进展[J]. 2016,39(2):317-321.

[5]苏 丹,张邦乐,宦梦蕾,等. 白藜芦醇与白藜芦醇苷抗氧化活性比较[J]. 中国药师,2010,13(4):471-473.

[6]Xie X, Peng J, Huang K, et al. Polydatin ameliorates experimental diabetes-induced fibronectin through inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway in rat glomerular mesangial cells[J]. Mole Cell Endocrinol,2012,362(1/2):183-193.

[7]Yao J, Wang J Y, Liu L, et al. Polydatin ameliorates DSS-induced colitis in mice through inhibition of nuclear factor- κ B activation[J]. Planta Med,2011,77(5):421-427.

[8]洪照友,高 毅,詹兴海. 中药虎杖对大鼠肝缺血性损伤保护的形态学观察[J]. 世界华人消化杂志,2000(2):162-164.