

文章编号:1001-6880(2016)5-0771-04

黔产毛蒟水提物对急性肝损伤小鼠的保护作用

杨艳^{1*}, 吴芹², 龚其海², 石京山²¹遵义医学院附属医院药剂科, 遵义 563003; ²遵义医学院药理学教研室, 遵义 563002

摘要:探讨黔产毛蒟水提物(PTE)对四氯化碳(CCl_4)诱导小鼠急性肝损伤的保护作用及其作用机制。本研究中将50只昆明种小鼠随机分为5组,各组10只,分别为空白组、模型组(0.01 g/kg的0.15% CCl_4 菜油溶液造模)、PTE组(低剂量组0.5 g/kg和高剂量组1.0 g/kg)和阳性对照组(联苯双酯0.15 g/kg)。检测各组小鼠谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、肿瘤坏死因子($TNF-\alpha$)含量;测定肝组织匀浆中脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性;计算肝脏的湿重指数;HE染色法观察肝脏组织的病理学变化。与空白对照组相比,模型组血清ALT、血清AST、肝脏指数、肝组织MDA含量以及血清TNF- α 明显增高(均 $P < 0.01$),肝组织SOD活性明显降低($P < 0.01$),肝组织病理损伤明显。与模型组相比,PTE高剂量组和阳性对照组血清ALT显著降低($P < 0.01$),PTE低、高剂量组和阳性对照组血清AST、肝脏指数、肝组织MDA含量以及血清TNF- α 含量均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),肝组织SOD活性明显升高($P < 0.01$),并减轻了肝组织病理损害。PTE可减轻 CCl_4 诱导的急性肝损伤,其机制可能与抗氧化、抑制TNF- α 的产生有关。

关键词:毛蒟;抗氧化;自由基;肝损伤;四氯化碳

中图分类号:R961.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.024

Protective Effect of Water Extracts of *Piper puberulum* (Benth.) Maxim from Guizhou Province Against Acute Liver Injury in Mice

YANG Yan^{1*}, WU Qin², GONG Qi-hai², SHI Jing-shan²¹Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563003, China;²Pharmacy College of Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563002, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the protective effects of *Piper puberulum* (Benth.) Maxim water extract (PTE) on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced acute liver injury and to explore the possible mechanism. Fifty KM mice were randomly divided into five groups ($n = 10$ in each) including blank group, model group (induced by 0.01 g/kg, 0.15% CCl_4 vegetable oil solution), PTE groups (0.5 g/kg and 1.0 g/kg) and positive control group (bifendate 0.15 g/kg). Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) activity, tumor necrosis factor ($TNF-\alpha$), liver wet weight index and HE staining of liver tissue pathological changes were detected in each group. Compared with blank group, the serum ALT, serum AST, liver index, MDA content and serum $TNF-\alpha$ increased significantly ($P < 0.01$), SOD decreased significantly ($P < 0.01$) and hepatic tissue pathology injured significantly ($P < 0.01$) in model group. Compared with model group, the serum ALT decreased significantly in PTE high dose group and positive control group. The serum AST, liver index, MDA content and serum $TNF-\alpha$ decreased significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), SOD increased significantly ($P < 0.01$) and hepatic tissue pathology relieved significantly in PTE low dose group, PTE high dose group and positive control group. In conclusion, *P. puberulum* water extract attenuated the CCl_4 -induced acute liver injury and the underlined mechanisms were, at least partly, due to their anti-oxidant actions and inhibitions of $TNF-\alpha$ production.

Key words: *Piper puberulum* (Benth.) Maxim; antioxidant; radical; liver injury; carbon tetrachloride

毛蒟为胡椒科胡椒属藤本植物,主要分布在广东、云南、贵州,生于林下或潮湿谷地,常攀援于石上

或树上,全株药用,传统用于行气止痛、活血祛风、治胃痛等^[1]。同时,毛蒟也具有明显的抗炎、镇痛和抗血小板聚集等药理作用。毛蒟在贵州民间广泛用于肝病的治疗,并取得了较好的疗效,其具有来源广泛,价格便宜,容易采集等特点,但目前关于毛蒟植

物保肝作用的研究笔者未见文献报道。本文拟观察毛蒟水提物(PTE)对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠的肝保护作用,并探索其作用机制,从而为毛蒟提取物用于肝损伤治疗的开发研究提供基础药理学参考数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:721型紫外-可见分光光度计(上海申化仪表自控公司),-80℃低温冰柜(德国Forma Scientific公司),Milli QA纯水处理器(Millipore公司),3K30型高速冷冻离心机(德国Sigma公司),电子分析天平(北京赛多利斯电子天平有限公司),SHHW电热恒温三用水浴锅(北京永光明医疗仪器厂),Leica光学显微镜(德国Leica Microsystems Ltd),WH-1微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂),Model 550型酶标仪(美国BIO-Tek公司),全自动生化分析仪au5400(日本Olympus)。

试剂:菜油(购于普通超市),PTE(贵州省基础药理重点实验室,专利号:201010276394.5),联苯双酯滴丸(浙江医药股份有限公司,批号111013),TNF- α (ELISA)试剂盒(Bender MedSystems, CA, USA,批号20121009),谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和考马斯亮蓝试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20121124)。

1.2 实验动物

昆明种小鼠,雌雄兼用,清洁级,体重20~22 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,许可证号:SexK(渝)2007-0005。饲养环境安静,室温22~23℃,光照/暗时间为12/12 h循环,各组实验小鼠自由进食、饮水。

1.3 实验方法

1.3.1 PTE的制备

准确称取10 g毛蒟干燥粗粉末放置于圆底烧瓶中,按一定比例加入蒸馏水(料液比1:30),浸泡2 h,加热提取3 h,加热结束后,趁热真空抽滤,收集滤液。残渣用蒸馏水洗入圆底烧瓶中,再次加热回流提取,提取3次后,同样趁热真空抽滤,合并滤液。滤液于旋转蒸发仪减压回收溶剂,浓缩至膏状,放置于冷冻干燥机干燥得毛蒟水提物。平均质量提取率为27.31%。

1.3.2 动物分组及处理

小鼠分笼饲养,自由进飮水。在实验环境下给予适应性喂养1周后,按照体重随机分为5组,每

组1只。空白组(Control group,C):每日ig生理盐水(10 mL/kg)一次,ig(7 d;模型组(Model group,M):每日ig生理盐水(10 mL/kg)一次,ig(7 d;联苯双酯阳性组(Bif group,Bif)每日(0.15 g/kg)ig一次,ig(7 d;PTE低剂量组(Low dose water extract group,LTEP)每日(0.5 g/kg)ig一次,ig(7 d;PTE高剂量组(High dose water extract group,HTEP):每日(1.0 g/kg)ig一次,ig(7 d;在末次ig给药后30 min,除正常组一次性ip菜油溶液(10 mL/kg)外,其余各组均一次性ip 0.15%CCl₄菜油溶液(10 mL/kg),禁食不禁水。

1.3.3 标本的制备

小鼠于腹腔注射CCl₄20 h后,摘除眼球取血,一部分送检AST、ALT,一部分置于-80℃冰箱保存备用。小鼠取血完毕,迅速取出肝脏,用预冷的生理盐水漂洗3~4次去除积血,称重;取小鼠肝组织左叶相同部位,用10%中性福尔马林溶液固定,余下的肝脏留存置于-80℃冰箱保存用于后述制备肝匀浆测定相关指标。

1.3.4 指标检测

小鼠肝脏湿重指数的测定^[2]:小鼠处死前称重,处死后取出肝脏,称重,肝脏指数=肝脏重(g)/小鼠体重(g)×100%;血清ALT、AST的测定:取“1.3.3”项下制备的血清送至遵义医学院附属医院检验科用全自动生化分析仪进行ALT、AST的检测;肝脏组织中丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、TNF- α 含量的测定:根据试剂盒说明书测定肝组织的SOD、MDA活性及血清的TNF- α 含量;肝脏组织的病理标本制备:将固定于10%中性福尔马林溶液中的肝脏取出,流水冲洗24 h,酒精逐级脱水和二甲苯透明。常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(hematoxylin and eosin,HE)染色。

1.4 数据统计分析

实验数据用SPSS13.0统计软件分析,所有数据以Mean±SE表示,多组间比较采用One-way ANOVA处理,方差齐使用LSD法,方差不齐Games-Howell法,P<0.05有统计学意义。

2 实验结果

2.1 PTE对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠血清ALT、AST及肝脏指数的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠血清ALT、AST及肝脏指数明显增高(均P<0.01),证明小鼠急性肝损伤模型复制成功;与模型组比较,PTE高剂量组

和阳性对照组血清 ALT 显著降低 ($P < 0.01$) ; PTE 低、高剂量组和阳性对照组血清 AST 和肝脏指数均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) , 结果见表 1。

表 1 PTE 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 及肝脏指数的影响 (Mean ± SE)

Table 1 The effects of PTE on serum ALT,AST and liver index in acute hepatic injury mice induced by CCl₄ (Mean ± SE)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	谷丙转氨酶 ALT (U/L)	谷草转氨酶 AST (U/L)	肝脏指数 liver index (g/g)
空白对照组 Control	-	35.29 ± 4.72	215.86 ± 24.98	3.53 ± 0.18
模型组 Model	-	1459.29 ± 358.48 *	1537.5 ± 337.11 *	5.14 ± 0.28 *
PTE 低剂量组 PTE - L	0.5	1143.29 ± 311.42	834.29 ± 99.82 *	4.90 ± 0.17
PTE 高剂量组 PTE - H	1	515.86 ± 155.20 **	657.71 ± 146.75 **	3.99 ± 0.14 **
阳性对照组 Positive control	0.15	343.29 ± 129.04 **	794.57 ± 73.39 *	3.73 ± 0.13 **

注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.01$; Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 PTE 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠肝脏病理变化的影响

显微镜下可见,正常组小鼠肝细胞排列整齐,无水肿、坏死、无炎症细胞浸润等病理改变;模型组部分肝小叶结构欠清、肝细胞弥漫性气球样变,可见散

在小灶性坏死伴炎细胞浸润。PTE 低剂量组可见肝组织中度浑浊肿胀;PTE 高剂量组可见肝细胞排列基本有序,肝细胞略肿胀;阳性对照组肝小叶轮廓清晰,肝细胞轻微肿胀,未见明显炎症细胞浸润。结果见图 1。

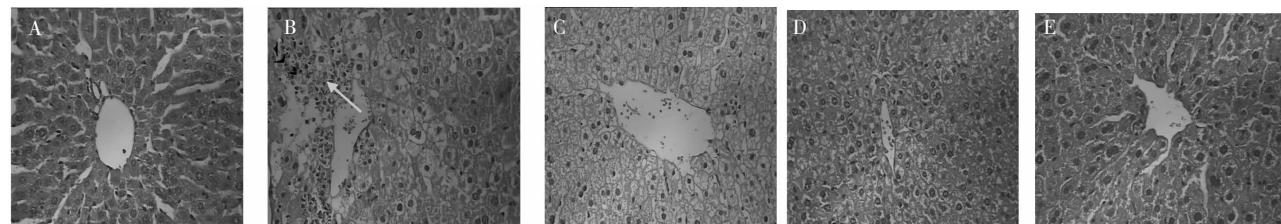


图 1 正常组(A)、CCl₄ 模型组(B)、PTE 1 g/kg 组(C)、PTE 0.5 g/kg 组(D)及 Bif 0.015 g/kg 组(E)中急性肝损伤小鼠肝组织的病理改变(HE 染色, 200×)

Fig. 1 Histologic examination of liver sections in acute liver injury mice of normal group (A), CCl₄ model control group (B), PTE 1 g/kg group (C), PTE 0.5 g/kg group (D) and Bif 0.015 g/kg group (E) (HE staining, 200×)

注:红箭头代表气球样变;黄箭头代表坏死灶伴炎细胞浸润

Note: The red arrow represented ballooning degeneration; yellow arrow represented focal necrosis with inflammatory cells infiltration

2.3 PTE 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠肝组织中 MDA 含量、SOD 活性的影响

与空白对照组比较,模型组 MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$), SOD 活性明显降低 ($P < 0.01$);与模

型组比较,PTE 低、高剂量组和阳性对照组均能显著降低肝组织 MDA 含量 ($P < 0.01$);以及均能显著升高 SOD 活性 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 2 PTE 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠肝组织中 MDA 含量、SOD 活性和血清 TNF- α 的影响 (Mean ± SE)

Table 2 Effects of PTE on liver tissue MDA content, SOD activity and serum TNF- α in mice subjected to CCl₄-induced acute liver injury (Mean ± SE)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	丙二醛 MDA (nmol/mL)	超氧化物歧化酶 SOD (U/mL)	肿瘤坏死因子- α TNF- α (ng/mL)
空白对照组 Control	-	3.72 ± 0.92	10.00 ± 1.19	191.90 ± 94.33
模型组 Model	-	17.69 ± 3.32 *	2.4 ± 0.74 *	1012.82 ± 190.62 *
PTE 低剂量组 PTE - L	0.5	9.02 ± 1.84 **	6.06 ± 0.98 **	640.74 ± 89.60 **
PTE 高剂量组 PTE - H	1	8.62 ± 1.54 **	6.19 ± 0.89 **	595.14 ± 107.3 **
阳性对照组 Positive control	0.15	8.58 ± 0.94 **	6.03 ± 0.87 **	267.10 ± 97.08 **

注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.01$; Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 PTE 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠血清中 TNF- α 的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠血清中 TNF- α 含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,PTE 低、高剂量组和阳性对照组小鼠血清中 TNF- α 含量均明显降低($P < 0.01$)。结果见表 2。

3 讨论与结论

目前,动物肝脏疾病模型较多,主要有化学药物中毒性肝炎动物模型(主要包括 CCl₄ 急、慢性肝损伤模型、D-氨基半乳糖胺急性肝损伤模型、硫代乙酰胺肝损伤模型、扑热息痛肝损伤模型、异硫氰酸苯酯和硝硫氰胺肝损伤模型、免疫性肝损伤模型和其他肝损伤模型^[3-5])。本实验采用的是 CCl₄ 诱导急性肝损伤模型。该模型的优点在于成功率高,试验方法简便,价格低廉。因此利用 CCl₄ 构建的急性肝损伤动物模型是目前研究和开发保肝护肝类药物的首选实验动物模型之一^[6]。CCl₄ 为经肝微粒体细胞色素 P₄₅₀代谢生成的自由基攻击肝细胞膜上磷脂分子引起脂质过氧化或与肝微粒体脂质和蛋白质发生共价结合,破坏肝细胞膜结构和功能完整性的破坏,最终导致肝细胞死亡^[7,8]。肝脏病理可见炎性细胞浸润、混浊肿胀、气球样变和肝细胞坏死。本实验通过一次性腹腔注射 CCl₄ 诱导小鼠急性肝损伤,模型组小鼠血清中 ALT、AST、TNF- α 较空白组明显升高,其肝脏组织中的 SOD 酶活性显著低于空白对照组,MDA 水平明显高于空白对照组;肝重指数显著性高于空白组;同时,CCl₄ 诱导的小鼠肝脏组织发生了明显的病理性改变。以上结果表明,我们成功建立了急性肝损伤小鼠模型。在此基础上我们观察了 PTE 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠模型的影响。实验结果显示 PTE 对四氯化碳引起的小鼠急性肝损伤有一定的保护作用。

近年研究表明,炎性细胞因子增加也是肝损伤发生的因素之一。TNF- α 被认为可能处于多种病原致肝损伤时细胞因子网络核心而备受重视^[9]。TNF- α 来源广泛,主要由上活化单核吞噬细胞产生。本实验结果表明,模型组小鼠血清中 TNF- α 含量明显升高,提示 TNF- α 参与了 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤,而 PTE 各剂量组均能显著降低小鼠血清中的 TNF- α 含量,提示抑制 TNF- α 的产生也可能是 PTE

对肝脏保护作用的药理作用机制之一。总之,本实验研究表明 PTE 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤具有保护作用,其机制与抗氧化,抑制 TNF- α 产生有关。

参考文献

- Shi JS(石京山), Yang Y(杨艳), Wu Q(吴芹). The application of *Piper puberulum* (Benth.) Maxim water extracts to cure or prevent acute and chronic liver damage. CN201010276394.5, 2010-09-09.
- Yang SH(杨社华), Ge B(葛斌), Wang YH(王艳红), et al. Effects of extracts of European Hippocastanum seeds on contents of free radicals and TNF-a in liver injury induced by carbon tetrachloride. *Chin J Hospital Pharm*(中国医院药学杂志), 2014, 17:1453-1456.
- Maditz KH, Benedito VA, Oldaker C, et al. Feeding soy protein isolate and n-3 PUFA affects polycystic liver disease progression in a PCK rat model of autosomal polycystic kidney disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2015, 60:467-473.
- Zabala V, Tong M, Yu R, et al. Potential contributions of the tobacco nicotine-derived nitrosamine ketone (NNK) in the pathogenesis of steatohepatitis in a chronic plus binge rat model of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*, 2015, 50: 118-131.
- Li XF(李喜凤), Hu CY(胡春月), Hu LX(胡利欣), et al. Effect of alcohol extract of *Radix Echinopsis* on acute liver injury mice induce by carbon tetrachloride. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26:178-182.
- Cao L, Ding W, Du J, et al. Effects of curcumin on antioxidative activities and cytokine production in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) with CCl4-induced liver damage. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 43:150-157.
- Ponmari G, Annamalai A, Gopalakrishnan V K, et al. NF-kappa B activation and proinflammatory cytokines mediated protective effect of *Indigofera caerulea* Roxb. on CCl4 induced liver damage in rats. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23: 672-680.
- Zhao Y, Ma X, Wang J, et al. Curcumin protects against CCl4-induced liver fibrosis in rats by inhibiting HIF-1alpha through an ERK-dependent pathway. *Molecules*, 2014, 19: 18767-18780.
- Ji L, Xue R, Tang W, et al. Toll like receptor 2 knock-out attenuates carbon tetrachloride (CCl₄) -induced liver fibrosis by down-regulating MAPK and NF-kappa B signaling pathways. *FEBS Lett*, 2014, 588:2095-2100.