

睡莲花总黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的防治作用

张石蕾¹, 由淑萍¹, 刘涛^{1*}, 赵军^{2*}, 吉腾飞³, 徐芳²

¹新疆医科大学公共卫生学院, 乌鲁木齐 830011; ²新疆药物研究所 维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004;

³中国医学科学院药物研究所 天然药物活性成分与功能国家重点实验室, 北京 100050

摘要: 探讨睡莲花总黄酮(NCTF)对四氯化碳(CCl₄)致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制。60只昆明种小鼠随机分为6组: 正常组、模型组、联苯双酯组(150 mg/kg)和NCTF低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg), 灌胃给药, 连续7 d。末次给药1 h后, 除正常组腹腔注射大豆油0.2 mL/10 g外, 其余各组均腹腔注射0.12%的CCl₄大豆油溶液0.2 mL/kg。禁食8 h后, 摘眼球取血, 分离血清, 检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ); 解剖取肝脏、脾脏, 计算肝、脾指数, 制备肝匀浆, 检测超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO), 留取肝左叶行病理组织学检查。与模型组比较, NCTF(100、200 mg/kg)能显著降低小鼠血清ALT、AST、TNF- α 和IL-6水平以及小鼠的肝、脾指数($P < 0.05$); 并可明显提高小鼠肝组织匀浆SOD、GSH-Px的活性($P < 0.05$), 显著降低MDA和NO水平($P < 0.05$)。病理组织学检查结果显示不同剂量NCTF均可减轻小鼠的肝组织损伤程度。结果说明NCTF对CCl₄诱导的小鼠急性肝损伤具有明显的保护作用, 其作用机制可能与抗氧化和抑制炎症因子的释放有关。

关键词: 雪白睡莲; 总黄酮; 四氯化碳; 肝损伤; 保护作用

中图分类号: R965

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.12.029

Preventive Effects of Total Flavonoids from *Nymphaea candida* on CCl₄ Induced Acute Liver Injury in Mice

ZHANG Shi-lei¹, YOU Shu-ping¹, LIU Tao^{1*}, ZHAO Jun^{2*}, JI Teng-fei³, XU Fang²

¹College of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; ²Xinjiang

Key Laboratory for Uighur Medicine, Institute of Materia Medica of Xinjiang, Urumqi 830004, China; ³State

Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Product, Institute of

Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Abstract: To study the preventive effect of total flavonoids from *Nymphaea candida* (NCTF) on carbon tetrachloride (CCl₄) induced liver injury in mice and its mechanism. Sixty mice were equally randomized to six groups: normal group, model group, dimethyl diphenyl bicarboxylate (DDB, 150 mg/kg) group and NCTF (50, 100, 200 mg/kg) group with intragastric administration for seven days. One hour after the last medication, the mice in all groups (except the control group) were intraperitoneal injection of 0.12% CCl₄ soybean oil solution 0.2 mL/10 g. Eight hours later, the eye balls of the mice were removed, blood taken; the mice were then killed, liver and spleen was collected. As compared with the model group, the levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), liver and spleen index in NCTF group (100, 200 mg/kg) as well as liver homogenate malondialdehyde (MDA), and nitric oxide (NO) were notably reduced ($P < 0.05$); the levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were significantly improved ($P < 0.05$). Pretreatment with NCTF at different doses alleviated histopathological changes induced by CCl₄. NCTF had a protective effect on CCl₄ induced acute liver injury in mice, and its mechanism might be related to anti-oxidant and inhibiting of releasing inflammatory cytokines.

Key words: *Nymphaea candida* Presl; total flavonoids; carbon tetrachloride; liver injury; hepatoprotective

收稿日期: 2016-05-25 接受日期: 2016-09-22

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技支撑项目(20133318)

* 通讯作者 Tel: 86-991-2320227; E-mail: xjmult@163.com; zhao-jun21.cn@163.com

睡莲花为睡莲科睡莲属多年生水生草本植物雪

白睡莲 *Nymphaea candida* Presl 的干燥花蕾,具有清热解毒、镇静安神之功效,收载于《中华人民共和国药品标准维吾尔药分册》等医药文献中,被广泛应用于消炎迪娜尔糖浆等维吾尔药抗肝炎复方制剂中^[1]。睡莲属植物具有抗氧化、抗炎、降血压等多种生物活性,酚类及黄酮类成分是其主要的标示性成分^[2,3]。本文作者在前期研究基础上,利用四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤模型对睡莲花总黄酮有效部位进行肝保护作用的评价,以期为该药材的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 实验动物

昆明种小鼠,雄性,体重 18 ~ 22 g, SPF 级,购自新疆医科大学实验动物中心,合格证号为 SYXK(新)2011-0001,使用许可证号为 SYXK(新)2011-0001。

1.2 药品与试剂

睡莲花总黄酮(NCTF,黄酮含量为 67.73%)自制;联苯双酯滴丸(批号:0505010r7,每滴丸含联苯双酯 7.5 mg,北京协和药厂);四氯化碳(批号:20151101,天津永晟化学试剂厂);总蛋白定量(BCA法)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、一氧化氮(NO)试剂盒(批号:20151219、20151207、20150610、20151112、20150605,南京建成生物工程研究所);白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)试剂盒(批号:11611921015、132111031015、24111951015、9711891015,武汉博士德生物有限公司);其它试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

迈瑞全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子有限公司);UV1200 紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);全波长酶标仪(BIO-RAD, Bench Mark PLUS)。FSH-2A 可调高速匀浆机(金坛市医疗仪器厂),MIKR022R 低速冷冻离心机(杭州普瑞特仪器有限公司),电热恒温水浴箱(北京市永光明医疗仪器厂)。

2 实验方法

2.1 小鼠急性化学性肝损伤模型的建立及分组

昆明种小鼠 60 只按体重随机分为正常组、模型

组、联苯双酯组(150 mg/kg)、NCTF 低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg),除正常组和模型组每日给予蒸馏水外,联苯双酯组和 NCTF 各剂量组按 10 mL/kg 体重每日灌胃给药 1 次,连续 7 d。末次给药 1 h 后,正常组小鼠腹腔注射大豆油 0.2 mL/10 g 体重,其他各组腹腔注射 0.12% CCl₄ 大豆油溶液 0.2 mL/10 g 造模。禁食 8 h 后,摘眼球取血,放置 2 h 后以转速 3000 rpm 离心 10 min,取血清待检。颈椎脱臼处死小鼠,解剖,摘取肝脏、脾脏。精确称取 0.5 g 肝脏置于冷生理盐水中,按 1:9(质量体积比)加入生理盐水 4.5 mL,冰浴研磨至浆状,3000 rpm 离心 10 min,取肝匀浆上清液待检。

2.2 指标检测

采用全自动生化仪检测血清 ALT 和 AST 活性。采用 ELISA 法测定血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 水平。按试剂盒说明书测定肝匀浆中 MDA、SOD、GSH 和 NO 含量。

2.3 病理组织学观察

处死小鼠后,解剖,观察肝脏大体变化,取每鼠肝脏左叶距边缘 0.5 cm 处小块组织,用 10% 甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后光镜下观察肝组织病理学变化。

2.4 统计学处理

结果以表示,应用 SPSS13.0 软件包,采用方差分析 ANOVA, LSR 进行统计分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 实验结果

3.1 一般状况

各组小鼠的自主活动、摄食饮水、毛发、粪便等均未见异常,眼、耳、鼻、口也未见异常分泌物。

3.2 NCTF 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠肝脏、脾脏指数及血清 ALT、AST 水平的影响

如表 1 所示,与正常组相比较,模型组小鼠肝脏指数、脾脏指数显著升高,血清 ALT 和 AST 活性显著提高($P < 0.05$),说明 CCl₄ 可致小鼠肝、脾肿胀,肝细胞膜结构和功能受到损伤。与模型组比较,NCTF 中、高剂量组(100、200 mg/kg)可显著降低小鼠肝脏指数、脾脏指数,缓解 CCl₄ 诱导的小鼠肝、脾肿胀($P < 0.05$),并能明显降低小鼠血清 ALT 和 AST 水平($P < 0.05$),且效果优于阳性对照联苯双酯。

表 1 NCTF 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 及肝脏和脾脏指数的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)Table 1 Effects of NCTF on the serum ALT, AST, liver and spleen index in mice ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	肝脏指数 Liver index (mg/g)	脾脏指数 Spleen index (mg/g)	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常组 Normal	-	54.75 ± 5.29	3.12 ± 0.94	42.33 ± 8.16	119.49 ± 32.61
模型组 Model	-	81.79 ± 5.60 [#]	6.21 ± 2.25 [#]	319.69 ± 113.44 [#]	345.3 ± 174.97 [#]
联苯双酯 DDB	150	64.87 ± 4.37 [*]	4.45 ± 1.08 [*]	219.75 ± 165.01	244.76 ± 138.35
NCTF 低剂量 NCTF-L	50	71.68 ± 5.66 [*]	5.26 ± 0.76	244.46 ± 185.66	275.41 ± 162.35
NCTF 中剂量 NCTF-M	100	64.54 ± 5.85 [*]	4.34 ± 0.93 [*]	175.21 ± 35.49 [*]	231.77 ± 112.82 [*]
NCTF 高剂量 NCTF-H	200	60.38 ± 5.54 [*]	3.99 ± 1.04 [*]	101.84 ± 26.71 [*]	132.15 ± 28.01 [*]

注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control,[#] $P < 0.05$; compared with model,^{*} $P < 0.05$ 。

3.3 NCTF 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠肝匀浆 MDA、SOD、GSH 和 NO 的影响

如表 2 所示,与正常组相比较,模型组小鼠肝匀浆 MDA 和 NO 水平显著提高 ($P < 0.05$),SOD 和 GSH 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性对照联苯双酯组可显著升高肝损伤小鼠血清

GSH 水平 ($P < 0.05$),降低 MDA 和 NO 水平 ($P < 0.05$);NCTF 中、高剂量组 (100、200 mg/kg) 能同时显著提高肝损伤小鼠血清 SOD 和 GSH 水平 ($P < 0.05$),降低 MDA 和 NO 水平 ($P < 0.05$),且效果优于阳性对照联苯双酯。

表 2 NCTF 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠肝匀浆 MDA、SOD、GSH 和 NO 的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of NCTF on liver homogenate MDA, SOD, GSH and NO in mice ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	MDA (nmol/mgprot)	SOD (U/mgprot)	GSH ($\mu\text{mol/gprot}$)	NO ($\mu\text{mol/gprot}$)
正常组 Normal	-	3.18 ± 0.90	230.82 ± 108.64	19.95 ± 4.94	0.87 ± 0.60
模型组 Model	-	9.20 ± 4.18 [#]	88.29 ± 18.07 [#]	3.39 ± 0.39 [#]	2.52 ± 0.89 [#]
联苯双酯 DDB	150	7.24 ± 3.59 [*]	132.05 ± 75.64	13.65 ± 7.94 [*]	1.92 ± 0.76 [*]
NCTF 低剂量 NCTF-L	50	7.98 ± 2.75	122.63 ± 37.61	10.59 ± 4.85	2.03 ± 1.18
NCTF 中剂量 NCTF-M	100	6.44 ± 2.78 [*]	152.81 ± 44.75 [*]	13.51 ± 5.21 [*]	1.64 ± 0.82 [*]
NCTF 高剂量 NCTF-H	200	4.99 ± 1.94 [*]	199.50 ± 53.35 [*]	17.45 ± 9.94 [*]	1.36 ± 0.79 [*]

注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control,[#] $P < 0.05$; compared with model,^{*} $P < 0.05$ 。

3.4 NCTF 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 的影响

从表 3 可以看出,与正常组相比较,模型组小鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 水平显著提高 ($P < 0.05$)。与模型组相比较,NCTF 低、中、高剂量组 (50、100、200 mg/kg) 能显著降低小鼠血清 TNF- α 和 IL-6 水平 ($P < 0.05$),其中 NCTF 中、高剂量组的

疗效优于阳性对照联苯双酯。与模型组比较,NCTF 中、高剂量组 (100、200 mg/kg) 能明显降低小鼠血清 IL-1 β 水平 ($P < 0.05$),且效果优于阳性对照联苯双酯。此外,与模型组相比较,高剂量组 (200 mg/kg) 的 NCTF 能显著降低小鼠血清 IFN- γ 水平 ($P < 0.05$),中低剂量有降低效果,但无统计学意义。

表 3 NCTF 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 IFN- γ 细胞因子的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of NCTF on the serum IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IFN- γ in mice ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
正常组 Normal	-	17.59 ± 3.36	64.87 ± 7.54	57.72 ± 2.91	287.40 ± 15.46
模型组 Model	-	46.09 ± 10.09 [#]	101.33 ± 7.18 [#]	78.76 ± 8.38 [#]	352.50 ± 40.58 [#]

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IFN- γ (pg/mL)
联苯双酯 DDB	150	34.48 \pm 8.16 *	84.30 \pm 9.44 *	68.04 \pm 3.96 *	321.53 \pm 46.06
NCTF 低剂量 NCTF-L	50	39.58 \pm 10.43	92.45 \pm 10.50 *	72.99 \pm 3.98 *	331.06 \pm 50.60
NCTF 中剂量 NCTF-M	100	30.76 \pm 9.98 *	81.97 \pm 8.05 *	67.88 \pm 7.87 *	320.09 \pm 45.89
NCTF 高剂量 NCTF-H	200	22.49 \pm 7.87 *	70.04 \pm 9.42 *	61.71 \pm 6.89 *	300.07 \pm 37.44 *

注:与空白组比较, # $P < 0.05$;与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, # $P < 0.05$; compared with model, * $P < 0.05$.

3.5 NCTF 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠肝组织病理形态学的影响

光镜下观察可见正常组小鼠肝组织结构完整,肝索排列整齐,肝细胞分界清晰,大小较均一,核圆而清晰,位于细胞中央,未见脂肪变性和炎性细胞浸润。模型组小鼠肝索紊乱,肝细胞出现严重水肿,中央静脉肝血窦扩张充血,细胞嗜酸性变,细胞质疏松化,呈气球样变,可见广泛的肝细胞脂肪变性、点状坏死和片状坏死,并出现汇管区炎细胞、淋巴细胞浸润现象。联苯双酯组(150 mg/kg)小鼠肝索排列较整齐,肝细胞水肿不明显,偶见点状坏死,汇管区只有少量炎细胞浸润。与模型组比较,NCTF 低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg)均能改善 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠肝组织病变程度,肝细胞水肿不明显,可见肝细胞再生现象,少伴有点状坏死,汇管区少量炎细胞浸润,其中高剂量组改善程度尤为明显。

4 讨论

从中药民族药中寻找具有显著活性的抗肝炎药是当今药物研究的热点之一。课题组前期研究显示维吾尔药雪白睡莲花提取物可明显降低卡介苗联合脂多糖诱导原代肝细胞引发的 AST、ALT 和 NO 的增高,显示了明显的保肝作用^[4]。此外,同属植物 *N. stellata* 和 *N. pubescens* 的提取物对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤均有显著的防治作用^[5,6]。CCl₄ 诱导的急性肝损伤模型是抗肝炎实验常用的模型,具有成功率高、方法简单、重复性好的特点,其机理是 CCl₄ 经细胞色素 P450 代谢产生三氯甲烷自由基(-CCl₃),-CCl₃ 所引发的链式过氧化反应是导致肝损伤的重要原因。-CCl₃ 刺激产生活性中间产物(ROI),造成脂质过氧化,与肝细胞蛋白或 DNA 结合破坏肝细胞机能,导致肝细胞损伤坏死^[7]。本实验结果显示,NCTF 干预后,肝损伤小鼠肝组织细胞的病变程度均有不同程度的改善,肝组织坏死和炎症浸润减少。

NCTF(100、200 mg/kg)中高剂量组还可明显提高小鼠肝匀浆中抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 的活性,降低 MDA 和 NO 水平;并显著降低小鼠血清中促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的水平。综上所述,NCTF 对 CCl₄ 诱导小鼠急性化学性肝损伤具有明显的保护作用,其机制可能与抗氧化和抑制炎性因子的释放有关,此结果可为 NCTF 进一步的新药研究提供依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission of Sanitary Ministry of People's Republic of China (中华人民共和国卫生部药典委员会). Chinese Pharmacopoeia, Uigur Pharmacopoeia Fascicule (中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药分册). Xinjiang: Xinjiang Science and Technology Sanitation Publisher, 1999. 111.
- 2 Zhao J(赵军), Xu F(徐芳), Ji TF(吉腾飞), et al. Studies on phenolic compounds from buds of *Nymphaea candida* Presl. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:916-918
- 3 Zhao J(赵军), Xu F(徐芳), Ji TF(吉腾飞), et al. Advances in the study on chemical constituents and biological activities in *Nymphaea* Genus. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:142-147.
- 4 Zhao J, Liu T, Ma L, et al. Antioxidant and preventive effects of extract from *Nymphaea candida* flower on *in vitro* immunological liver injury of rat primary hepatocyte cultures. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011:497673.
- 5 Bhandarkar MR, Khan A. Antihepatotoxic effect of *Nymphaea stellata* Willd. against carbontetrachloride-induced hepatic damage in albino rats. *J Ethnopharmacol*, 2004, 91:61-64.
- 6 Debnath S, Ghosh S, Hazra B, et al. Inhibitory effect of *Nymphaea pubescens* Willd. flower extract on carrageenan-induced inflammation and CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59C:485-491.
- 7 Shen H(沈洪), Zhang B(张蓓). Research progress of acute liver injury. *Mod J Integr Tradit Chin Western Med* (现代中西医结合杂志), 2009, 18:2211.