

藤茶总黄酮对酒精性肝损伤小鼠的保护作用

陈发菊^{1,2}, 彭梅^{1,2}, 王丽^{1,2}, 杨艳^{1,2}, 李立郎^{1,2}, 王瑜^{1,2}, 杨小生^{1,2*}

(1. 贵州医科大学药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州 贵阳 550014; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014)

摘要: 目的 探究藤茶总黄酮对小鼠酒精性肝损伤的保护作用。方法 随机将50只小鼠随机分为空白组、模型组及藤茶总黄酮低、中、高(50、75、100 mg/kg)给药组, 每组10只, 除正常组外, 其余各组按16 mL/kg剂量灌胃56%白酒, 每天1次, 灌酒1 h后各剂量组灌胃给药, 正常组和模型组灌胃等体积蒸馏水, 连续给药21 d。对肝脏进行HE染色, 生化法检测肝脏匀浆上清液的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)的活性及超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、还原型谷胱甘肽(GSH)水平, 酶联免疫吸附法检测血清中白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。结果 与空白组比较, 模型组呈现典型酒精肝组织病变特征, 肝组织ALT、AST、MDA、IL-4、IL-6及TNF- α 水平升高($P<0.05$), 而SOD、T-AOC及GSH水平降低($P<0.05$)。与模型组比较, 藤茶总黄酮各剂量组对酒精性肝组织炎性程度、水肿程度及脂变程度均呈现不同程度的减轻, 肝组织ALT、AST、MDA、IL-4、IL-6、TNF- α 水平降低($P<0.05$), 而SOD、T-AOC、GSH水平升高($P<0.05$)。结论 藤茶总黄酮对酒精性肝损伤小鼠具有一定保护作用, 其可能机制与增加肝组织抗氧化酶的活性、降低脂质过氧化水平、降低肝组织IL-4、IL-6、TNF- α 等炎症因子水平有关。

关键词: 藤茶总黄酮; 酒精性肝损伤; 谷丙转氨酶; 谷草转氨酶; 总抗氧化能力。

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2021)01-0200-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.01.041

随着人们生活水平的提高, 越来越多的人习惯饮酒, 但长期饮酒所致酒精性肝病的发病率和死亡率最高, 患者脂肪会变性, 10%~35%引发成肝炎, 其中8%~20%最终转化为肝硬化^[1-5]。酒精性肝病严重影响人们的经济基础及健康状况, 到目前为止没有药物能有效治疗^[6]。氧化应激被认为是酒精性肝病受损的主要发病机制之一^[7]。

藤茶系葡萄科蛇葡萄植物显齿蛇葡萄 [*Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz.) W. T. Wang] 的茎叶, 主要分布于广西、广东、云南等各地区, 其性味甘淡, 具有清热解毒功效, 主治咽喉肿痛、感冒风热、黄疸型肝炎^[8]。总黄酮是从藤茶茎叶中提取的有效成分, 具有抗血栓、降脂、保肝、降血糖等作用^[9-12]。有研究报道, 藤茶总黄酮对小鼠的拘束负荷引起的肝损伤、免疫性肝损伤及四氯化碳致急性肝损伤有保护作用, 但尚未见对酒精性肝损伤有保护作用。本研究旨在通过藤茶总黄酮对酒精性小鼠肝组织病理损伤的影响, 观察其对酒精性肝损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 藤茶总黄酮制备 藤茶来源于贵州省铜仁市梵净山, 经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为正品。取药材嫩叶干燥粗粉90 g, 1 899 mL 75%乙醇加热回流提取3次, 滤过, 合

并滤液, 减压浓缩, 冷却后低温放置3 d使其充分析出沉淀, 收集沉淀并反复重结晶, 即得(8 g), 得率为8.9%。

1.2 动物 雄性KM小鼠, 体质量(25±5)g, 购于重庆腾鑫生物技术有限公司, 动物生产许可证号SCXX(军)2012-0011, 饲养于温度(22±2)℃、相对湿度(55±5)%的清洁级动物房, 控制照明时间为每天12 h, 自由进食与饮水。

1.3 试剂 习酒购于贵阳沃尔玛超市(批号750813602S)。BCA蛋白浓度测定试剂盒(索莱宝生物科技有限公司, 批号20180429); T-AOC(南京建成生物工程研究所, 批号20171218); ALT(南京建成生物工程研究所, 批号20180216); AST(南京建成生物工程研究所, 批号20180416); SOD(南京建成生物工程研究所, 批号20180521); GSH(南京建成生物工程研究所, 批号20180711); IL-4(南京建成生物工程研究所, 批号20180226); IL-6(南京建成生物工程研究所, 批号20180714); TNF- α (南京建成生物工程研究所, 批号20180424)。

1.4 仪器 TP1020自动阻止脱水机、包埋机、CM2245轮转式石蜡切片机、光学显微镜(德国Leica公司); 电子天

收稿日期: 2019-06-10

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2018]2769、[2019]2819, 黔科合人才[2015]4027, 黔科合服企[2020]4013, 黔教合KY字[2020]018)

作者简介: 陈发菊(1990—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为药理学。Tel: 15186736528, E-mail: 1054446528@qq.com

*通信作者: 杨小生(1966—), 男(仡佬族), 博士, 研究员, 博士生导师, 从事天然产物化学研究。E-mail: gzenp@sina.cn

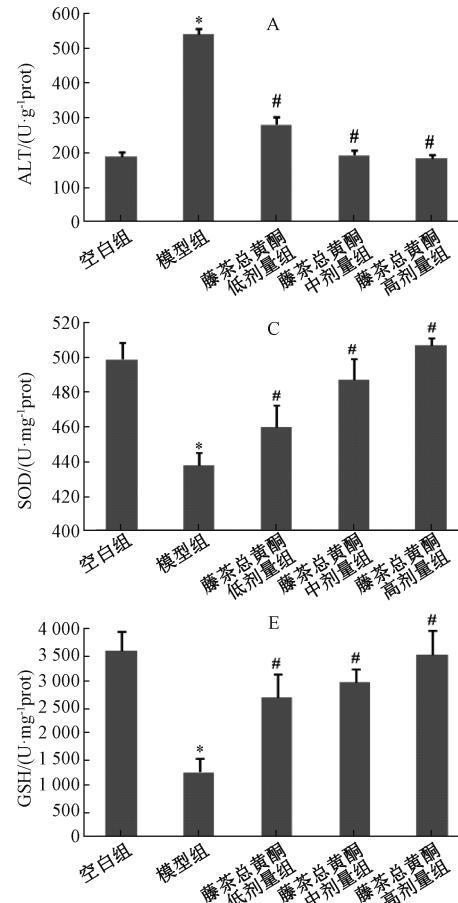
平 [赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; W-80A型漩涡混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂);电子天平(赛多利斯电子公司);Milli QA纯水处理器(法国Millipo Trading公司);电热鼓风干燥机(上海博讯实业公司);离心机(德国Eppendorf公司);-80℃低温冰箱(日本三洋公司);酶标仪(美国Bio-Rad公司);光学显微镜(德国Leica公司)。

1.5 分组及给药 将50只小鼠随机分为空白组,模型组及藤茶总黄酮低、中、高(50、75、100 mg/kg)给药组,每组10只,除正常组外各组按16 mL/kg剂量灌胃56%白酒,每天1次,灌酒1 h后给药组大鼠灌胃给予相应药物,空白组、模型组大鼠灌胃给予等体积蒸馏水,连续21 d。

1.6 HE染色 将末次灌胃结束后禁食24 h的小鼠颈椎脱臼处死,取右叶肝脏组织,切成1 cm×1 cm,显微镜观察其病理情况,并拍照记录。

1.7 肝组织ALT、AST、SOD、MDA、GSH、T-AOC、IL-4、IL-6、TNF- α 检测 灌胃给药后,小鼠颈椎脱臼处死,取肝组织称定质量,加入9倍量生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆后2 500 r/min离心10 min,取上清液待测。

1.8 统计学分析 通过SPSS13.0软件进行处理,结果以($\bar{x}\pm s$)表示,组间均数比较采用t检验。P<0.05表示差异具有统计学意义。



注:与空白组比较,*P<0.05;与模型组比较,#P<0.05。

图1 藤茶总黄酮对小鼠肝组织ALT(A)、AST(B)、SOD(C)、MDA(D)、GSH(E)、T-AOC(F)的影响

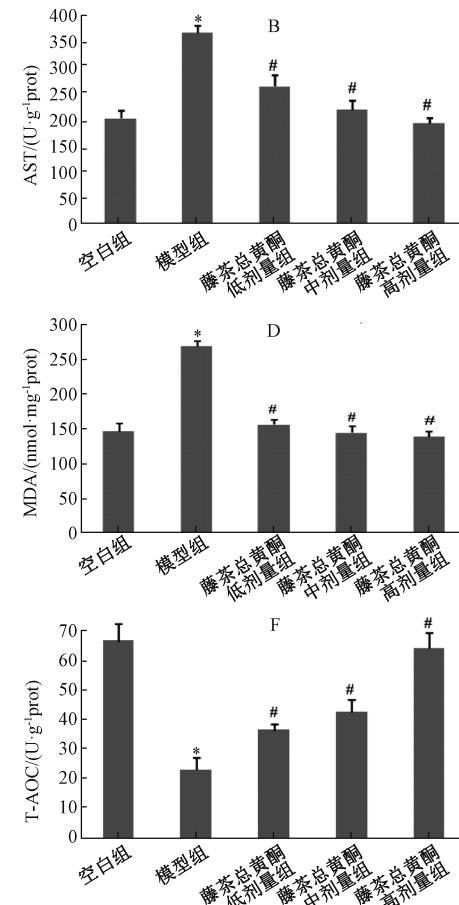
2 结果

2.1 藤茶总黄酮对酒精性肝损伤小鼠死亡率的影响 各组小鼠死亡率见表1。死亡的小鼠均为灌胃后第2天发现,解剖时未发现胸腔有淤血或胃穿孔,但胃里有大量液体,大肠内有大量气体而无食物存在,死前均表现步履蹒跚、抽搐、烦躁、肚子胀气等现象。

表1 藤茶总黄酮对酒精性肝损伤小鼠死亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	死亡数/只	剩余数/只	死亡率/%
空白组	—	0	10	0
模型组	—	6	4	60
藤茶总黄酮低剂量组	50	3	7	30
藤茶总黄酮中剂量组	75	2	8	20
藤茶总黄酮高剂量组	100	2	8	20

2.2 藤茶总黄酮对小鼠肝组织ALT、AST、SOD、MDA、GSH、T-AOC的影响 如图1所示,与空白组比较,模型组小鼠肝组织ALT、AST、MDA水平升高($P<0.05$),而SOD、GSH、T-AOC活性降低($P<0.05$);与模型组比较,藤茶总黄酮各剂量组小鼠肝组织ALT、AST、MDA水平降低($P<0.05$),SOD、GSH、T-AOC活性升高,且具有统计学差异($P<0.05$)。



2.3 藤茶总黄酮对小鼠肝组织 IL-4、IL-6、TNF- α 水平的影响 如表2所示,与空白组比较,模型组小鼠肝组织 IL-4、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.05$);与模型组比较,藤

茶总黄酮各剂量组显示肝组织 IL-4、IL-6、TNF- α 水平降低 ($P<0.05$)。

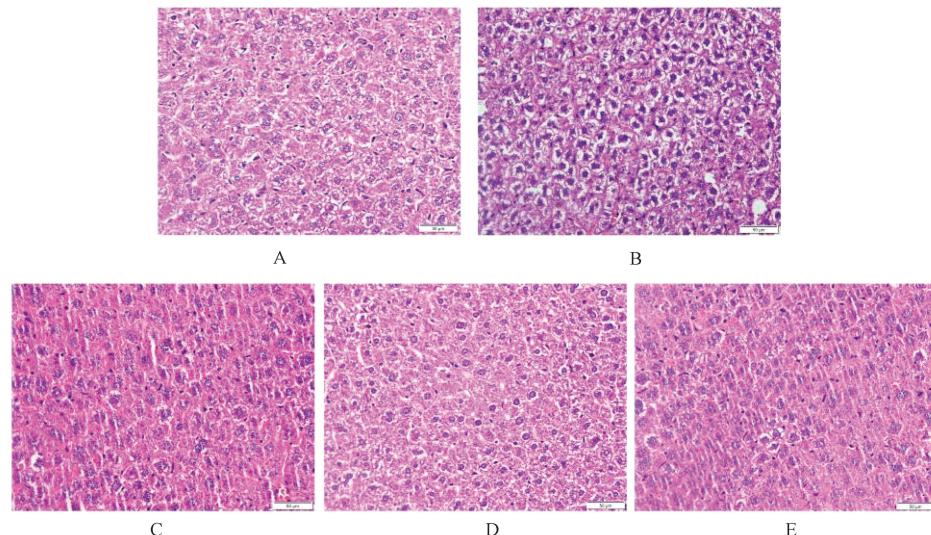
表2 藤茶总黄酮对小鼠肝组织 IL-4、IL-6、TNF- α 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-4/(pg·mg ⁻¹)	IL-6/(pg·mg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mg ⁻¹)
空白组	—	20.46±2.51	19.28±3.64	34.86±6.81
模型组	—	96.65±8.06 [*]	128.48±16.84 [*]	92.16±14.26 [*]
藤茶总黄酮低剂量组	50	46.86±6.75 [#]	92.36±9.48 [#]	70.43±4.68 [#]
藤茶总黄酮中剂量组	75	23.84±3.24 [#]	40.24±6.84 [#]	52.64±6.84 [#]
藤茶总黄酮高剂量组	100	18.57±2.18 [#]	24.38±8.57 [#]	30.21±8.75 [#]

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

2.4 藤茶总黄酮对小鼠肝组织病理形态的影响 如图2所示,空白组显示肝组织结构正常,肝细胞排列整齐、结构清晰,无水肿现象及炎性细胞;模型组小鼠肝组织结构、肝细胞排列紊乱,大多数肝细胞呈水肿现象,炎性细胞浸润,肝细胞纤维化,肝组织中有大小不一的脂肪滴空泡;

藤茶总黄酮低剂量、中剂量组小鼠肝组织结构、肝细胞排列较整齐,肝细胞水肿现象、肝组织内炎性细胞、脂肪滴空泡较模型组有所减轻;藤茶总黄酮高剂量组小鼠肝组织结构清晰,肝细胞排列整齐、大小均一,炎性细胞、脂肪滴空泡较模型组显著减轻。



注: A~E 分别为空白组, 模型组及藤茶总黄酮低、中、高剂量组。

图2 各组小鼠肝组织病理形态 ($\times 200$)

3 讨论

本实验采用习酒对昆明种小鼠按体质量进行灌胃制成立酒性肝损伤的模型,观察藤茶总黄酮对肝脏的保护作用。酒精性肝损伤的组织学特征主要包括肝细胞脂肪滴空泡的积累、脂肪肝(脂肪变性和炎性细胞)及肝硬化^[13-14]。通过HE染色发现,本实验模型组小鼠的肝组织发现有大量炎性细胞和脂肪滴空泡,藤茶总黄酮给药后此现象显著减轻,提示藤茶总黄酮可能对肝脏具有保护作用。

转氨酶参与肝脏的整个过程,肝脏出现问题的一个重要标志是转氨酶升高。ALT 主要存在于肝细胞浆, AST 主要存在于肝细胞的线粒体内,肝细胞最敏感的两种酶是 ALT 和 AST,肝细胞受损时 ALT 和 AST 的活性升高,能够反映肝细胞受损的程度的标志^[15]。本实验结果显示模型组 ALT 及 AST 的活性较高,藤茶总黄酮给药后活性降低。体内自由基能通过内源性抗氧化物酶 SOD 和 GSH 清除,MDA

是一个通过自由基诱导的重要脂质过氧化产物被用作氧化应激的生物标记,组织中 MDA 水平越高,氧化活性越强,组织受损程度越大^[16]。脂质过氧化的主要降解产物 MDA 可严重损伤肝细胞的细胞膜结构,导致肝细胞的肿胀、坏死。T-AOC 是机体内抗氧化力量的总体体现,是机体对抗氧自由基的主要体系^[17]。机体防御体系的抗氧化能力的强弱与健康程度存在密切联系,该防御体系有酶促与非酶促两个体系。本实验结果显示藤茶总黄酮给药后 SOD、GSH 和 T-AOC 的活性明显的活性明显强与模型组,MDA 水平低于模型组。

炎症因子参与肝脏疾病发生、发展整个过程, TNF- α 是由机体单核巨噬细胞等多种免疫细胞所产生的具有重要生物活性的细胞因子,参与炎症反应、免疫调节、细胞周期、细胞活性和细胞凋亡等^[18],因此 TNF- α 表达水平的高低可以反映肝细胞损伤程度及炎症反应程度的大小^[19]。

IL-4细胞因子具有多种生物学功能,可调节T、B淋巴细胞分化、活化过程,并可促进Th2细胞的免疫应答。IL-6参与机体的免疫应答及炎症反应,可通过刺激细胞生长和细胞外基质增生,导致肝上皮细胞变化,IL-6被认为是肝脏疾病炎症的一个重要因素^[20]。本实验结果显示模型组肝组织IL-4、IL-6及TNF- α 水平明显升高,藤茶总黄酮给药后肝组织IL-4、IL-6及TNF- α 水平降低。

综上所述,藤茶总黄酮对肝脏具有保护作用,其可能机制与增加肝组织抗氧化酶的活性、降低脂质过氧化水平、降低IL-4、IL-6及TNF- α 等炎症因子水平有关。

参考文献:

- [1] Ferrere G, Wrzosek L, Cailleux F, et al. Fecal microbiota manipulation prevents dysbiosis and *n* alcohol-induced liver injury in mice[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(4): 806-815.
- [2] Altamirano J, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(9): 491-501.
- [3] Bataller R, Gao B. Liver fibrosis in alcoholic liver disease[J]. *Semin Liver Dis*, 2015, 35(2): 146-156.
- [4] Kirpich I A, Miller M E, Cave M C, et al. Alcoholic liver disease: update on the role of dietary fat[J]. *Biomolecules*, 2016, 6(1): 1.
- [5] O'Shea R S, Dasarathy S, McCullough A J, et al. Practice guideline committee of the american association for the study of liver diseases, practice parameters committee of the american college of gastroenterologyalcoholic liver disease [J]. *Hepatology*, 2010, 51(1): 307-328.
- [6] Chen W Y, Zhang J, Ghare S, et al. Acrolein is a pathogenic mediator of alcoholic liver disease and the scavenger hydralazine is protective in mice[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2016, 2(5): 685-700.
- [7] de la Rosa L C, Moshage H, Nieto N. Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease [J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2008, 100(3): 156-163.
- [8] 袁阿兴, 黄筱美, 陈 劲. 显齿蛇葡萄化学成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(6): 359-360.
- [9] 钟正贤, 陈学芬, 周桂芬, 等. 广西产藤茶总黄酮的药理研究[J]. *广西科学*, 1999, 6(3): 216-218.
- [10] 钟正贤, 覃洁萍, 周桂芬, 等. 广西瑶族藤茶中双氢杨梅树皮素的药理研究[J]. *中国民族医药杂志* 1998, 4(3): 42-44.
- [11] 钟正贤, 覃洁萍, 周桂芬, 等. 广西藤茶总黄酮保肝作用的实验研究[J]. *广西科学*, 2002, 9(1): 57-59; 63.
- [12] 钟正贤, 覃洁萍, 周桂芬, 等. 广西藤茶总黄酮降血糖的实验研究[J]. *中国中药杂志*. 2002, 27(9): 687-689.
- [13] Clouston A D, Jonsson J R, Powell E E. Steatosis as a cofactor in other liverdiseases: hepatitis C virus, alcohol, hemochromatosis, and others [J]. *Clin Liver Dis*, 2007, 11(1): 173-189.
- [14] Carr R M, Correnti J. Insulin resistance in clinical and experimental alcoholic liver disease [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1353: 1-20.
- [15] Guo Y H, Zhao Q S, Cao L L, et al. Hepatoprotective effect of Gan Kang Yuan against chronic liver injury induced by alcohol [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 208: 1-7.
- [16] 蔡天娇, 王瑞珍, 魏君慧, 等. 白桦脂酸与红枣总三萜酸对小鼠酒精肝损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2018, 39(11): 191-195.
- [17] 段丽菊, 王晓平, 严 彦, 等. NO 在甲醛介导的氧化损伤中的协同作用[J]. *环境科学学报*, 2006, 26(3): 505-508.
- [18] Yee S B, Ganey P E, Roth R A. The role of Kupffer cells and TNF- α in monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide-induced liver injury[J]. *Toxicol Sci*, 2003, 71(1): 124-132.
- [19] 罗安玲, 陈心馨, 郑有丽, 等. 葛根、藤茶、玉米低聚肽复合组方对小鼠慢性酒精性肝损伤的保护作用[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(6): 70-76; 69.
- [20] 孔祥民, 李大光, 陈 勃, 等. 酒精性肝病患者血清TGF- β 、IL-6和IL-8水平及临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(7): 1233-1234.