

三叶青总氨基酸对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用

黄真, 毛庆秋 (浙江中医药大学 药学院, 杭州 310053)

摘要:目的 观察三叶青总氨基酸 (TAART)对四氯化碳 (CCl₄)诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用。方法 选用 CCl₄致小鼠急性肝损伤模型,以测定小鼠血清丙氨酸转氨酶 (ALT)和天冬氨酸转氨酶 (AST)活性,肝脏系数,肝组织中超氧化物歧化酶 (SOD)活性和丙二醛 (MDA)含量及对肝组织进行病理学检查等指标观察 TAART对肝损伤的保护作用。结果 TAART能明显降低 CCl₄致小鼠肝损伤血清 ALT, AST值,降低肝脏系数及肝组织中 MDA的含量,增加肝组织中 SOD活性,减轻 CCl₄对肝细胞的病理损伤。结论 三叶青总氨基酸对 CCl₄致小鼠急性肝损伤具有保护作用,其机制可能与其抗氧化作用相关。

关键词:三叶青总氨基酸;四氯化碳;肝损伤;小鼠

中图分类号: R282.710.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)03-0190-03

Protective Effects of Total Amino Acids from Radix Tetrastigmae on Acute Hepatic Injury Induced by CCl₄

HUANG Zhen, MAO Qing-qiu (Zhejiang Chinese Medicine University College of pharmaceutical sciences, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effects of total amino acids from Radix Tetrastigmae (TAART) on hepatic injury induced by CCl₄. **METHODS** Mice were administered with TAART ig 500, 250 mg•kg⁻¹ daily for 7 d respectively, and then acute hepatic injury model was induced by 0.1% carbon tetrachloride ip 20 mL•kg⁻¹. The protective effects of TAART on the model were evaluated by the determination of the activity of serum alanine and aspartate aminotransferase (AST and ALT) activity, liver index, the activity of SOD and the MDA content in liver, and the hepatic tissue pathology was observed. **RESULTS** Following the treatment with TAART, AST and ALT activities, liver index and the content of MDA in liver were obviously reduced; the activity of SOD in live was obviously increased. Furthermore, the pathological changes were also improved significantly. **CONCLUSION** TAART holds protective effects on the acute hepatic injury induced by CCl₄ in mice. The mechanisms may be related with their reducing anti-oxidation.

KEY WORDS: total amino acids from Radix Tetrastigmae; CCl₄; hepatic injury; mice

三叶青 Radix Tetrastigmae 为葡萄科植物三叶崖爬藤 Tetrastigma hemsleyanum Diels et Gilg 的干燥块根,是我国特有的植物资源,分布于浙江,江西,福建,台湾,湖北,广东,广西,四川,贵州及云南等省区^[1],民间常用于治疗肝炎、高热惊厥、肺炎及哮喘等症^[2],但其化学成分及药理作用尚不清楚。笔者此前观察到三叶青提取物有消炎、镇痛、解热^[3]以及保护肝损伤的作用^[4],在此基础上,作者进一步提取分离了三叶青有效部位总氨基酸 (Total Amino Acids from Radix Tetrastigmae TAART),观察其对 CCl₄致小鼠肝损伤的保护作用,为拓展三叶青的临床应用及开发奠定基础。

1 实验材料

1.1 药物和试剂

三叶青干品,购于浙江省中医院中药房,经浙江中医药大学药学院资源鉴定教研室陈孔荣副教授鉴定为三叶青 (Radix Tetrastigmae)。三叶青总氨基酸 (TAART)由浙江中医药大学资源工程重点实验室制备提供,纯度 ≥ 80%。AST试剂盒、ALT试剂盒、SOD试剂盒及MDA试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;四氯化碳 (CCl₄):分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司,批号 050322,使用时用花生油配制成 0.1%

的油溶液;联苯双酯滴丸:浙江医药股份有限公司新昌制药厂生产,批号 041213。

1.2 动物

昆明种小鼠,18~22 g,♀♂兼用,由浙江中医药大学实验动物中心提供。实验动物使用许可证号 SYXK(浙)2003-0003。

1.3 仪器

奥林巴斯 AU-600 全自动生化分析仪,日本奥林巴斯公司出品;CHS-313 生物显微镜,日本奥林巴斯公司出品;752型紫外分光光度计,无锡新龙科技有限公司。

2 方法

2.1 动物分组和造模方法

取 50 只小鼠,随机分成 5 组,每组 10 只,分别为正常组、四氯化碳损伤模型组、TAART 高、低剂量组 (500, 250 mg•kg⁻¹)及联苯双酯组 (150 mg•kg⁻¹)。给药组连续灌胃给药 7 d,正常组及四氯化碳模型组给予同量的生理盐水,于末次给药后 1 h,除正常组 ip NS 20 mL•kg⁻¹外,其余各组均 ip 0.1% CCl₄花生油溶液 20 mL•kg⁻¹。染毒 17 h 后,小鼠采用眼眶放血法采血,测定血清中 ALT 及 AST 的活性;测定每

只小鼠的肝脏指数(肝脏重量/体重);另取相同部位的1小块肝组织用生理盐水制备成10%的肝匀浆,测定肝组织中SOD活性及MDA含量。

2.2 生化指标测定

在全自动生化分析仪上测定血清AST、ALT活性;用黄嘌呤氧化酶法测定肝组织SOD活性,用硫代巴比妥酸法测定肝组织中MDA含量,肝组织中蛋白含量以考马斯亮蓝法测定,所有的测定方法按试剂盒说明进行。

2.3 组织切片观察

取小鼠相同部位肝组织,用10%的福尔马林溶液固定,石蜡包埋切片,常规HE染色,光镜下观察肝组织病理学变化。将肝组织损伤程度分为4级:0级(-),肝组织结构正常,无明显变性,坏死及炎症细胞浸润;1级(+),肝小叶结构尚正常,可见明显的混浊肿胀,气球样变或脂肪变性,散在点状坏死;2级(++),肝小叶结构不清,可见明显的灶状坏死,伴有炎症细胞浸润;3级(+++),肝小叶结构不清,可见明显的片状坏死,伴有炎症细胞浸润。

2.4 统计学分析

实验结果数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5分析应用软件处理分析数据,组间样本比较采用*t*检验;肝脏组织病理学变化用Ridit法分析统计处理, $P < 0.05$ 具有显著性差异。

3 结果

3.1 TAART对CCl₄致肝损伤小鼠血清ALT、AST活性的影响

实验结果表明,模型组小鼠血清中ALT、AST活性明显高于正常组($P < 0.01$, $P < 0.01$),肝脏系数亦明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,TAART(500 mg·kg⁻¹, 250 mg·kg⁻¹)能明显降低小鼠血清ALT($P < 0.01$, $P < 0.01$)及AST($P < 0.05$, $P < 0.05$)活性;TAART(500 mg·kg⁻¹)还能明显降低小鼠肝脏系数($P < 0.05$);TAART(500 mg·kg⁻¹)效果与阳性对照药联苯双酯效果相当。见表1。

表1 TAART对CCl₄致肝损伤小鼠血清AST和ALT活性及肝脏系数的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of TAART on liver index, the activities of AST and ALT in serum($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	AST	ALT	Liver index
		/U·L ⁻¹	/U·L ⁻¹	/mg·g ⁻¹
Control	-	95.6 ±13.0 ²⁾	30.1 ±5.4 ²⁾	43.7 ±4.8 ¹⁾
Model	-	144.3 ±11.9 ⁴⁾	97.8 ±15.1 ⁴⁾	48.6 ±2.1 ³⁾
TAART	500	111.4 ±14.5 ¹⁾	37.3 ±10.0 ²⁾	45.5 ±2.9 ¹⁾
	250	124.4 ±9.5 ¹⁾	43.9 ±15.9 ²⁾	46.8 ±2.7
Bifendate	150	107.4 ±17.1 ¹⁾	37.8 ±8.9 ²⁾	45.7 ±2.3 ¹⁾

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较,³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

Note: vs the model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; vs the control group,

³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

3.2 TAART对CCl₄致肝损伤小鼠肝匀浆SOD活性及MDA含量的影响

实验结果表明,与正常组比较,CCl₄中毒后小鼠肝中MDA含量显著升高($P < 0.01$),SOD活性明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,TAART(500 mg·kg⁻¹, 250 mg·kg⁻¹)皆能剂量依赖性的抑制肝中MDA含量($P < 0.01$, $P < 0.05$)及升高SOD活性($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表2。

表2 TFRT及TAART对CCl₄致肝损伤小鼠肝中SOD活性及MDA含量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of FRT on the activity of SOD and the content of MDA in liver($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	SOD	MDA
		/U·mg ⁻¹ Prot	/nmol·mg ⁻¹ Prot
Control	-	116.1 ±9.9 ²⁾	3.4 ±0.9 ²⁾
Model	-	92.3 ±7.1 ³⁾	7.1 ±1.8
TAART	500	109.7 ±10.7 ²⁾	4.0 ±0.7 ²⁾
	250	102.9 ±8.1 ¹⁾	5.0 ±0.9 ¹⁾
Bifendate	150	107.0 ±11.7 ²⁾	4.0 ±0.8 ²⁾

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较,³⁾ $P < 0.01$

Note: vs the model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; vs the control group, ³⁾ $P < 0.01$

3.3 TAART对CCl₄致小鼠急性肝损伤肝组织病理学的影响

病理观察结果表明,正常对照组小鼠肝组织结构正常,无变性、坏死等病理改变,而CCl₄模型组小鼠肝组织结构镜下可见肝细胞不同程度的变性(以细胞水肿为主)与坏死,坏死呈凝固性,并以环中央静脉分布为主,伴中性粒细胞、单核细胞等炎性细胞浸润,而TAART各剂量组的肝细胞坏死、变性及炎性细胞浸润程度均有所减轻。经Ridit法统计处理,均有统计学意义,表明TAART有保护肝损伤作用。见表3。

表3 TAART对CCl₄致小鼠肝组织损伤的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of FRT on pathological changes in mice($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Dose /mg·kg ⁻¹	Grade of injury				<i>P</i>
		-	+	++	+++	
Control	-	10	0	0	0	<0.01
Model	-	0	0	3	7	
TAART	500	3	5	2	0	<0.01
	250	2	3	4	1	<0.05
Bifendate	150	4	3	3	0	<0.01

4 讨论

腹腔注射CCl₄植物油溶液是目前国际上常用的制备肝损伤模型的方法。CCl₄是一种强毒性化学物质,进入体内后,在肝脏内经肝细胞色素P450激活,生成活泼的三氯甲基自由基和氯自由基。这些自由基可与细胞内和细胞膜的大分子发生共价结合,使酶的功能丧失,细胞膜脂质过氧化,胞浆Ca²⁺浓度升高,导致肝细胞损伤坏死,胞浆内转氨酶渗入血液,使血清中该酶的活性升高等^[5-6]。本实验结果亦表明,CCl₄中毒后,小鼠血清ALT、AST活性及肝中MDA含量明显升高,肝中SOD活性明显下降,肝脏外观呈土黄色,病理检查可见肝脏炎症细胞浸润、脂肪性变、混浊肿胀、气球样变和肝细胞坏死。

TAART能够明显降低 CCl_4 致小鼠肝损伤后 ALT, AST活性升高;降低肝脏指数及肝中 MDA生成量,提高肝中 SOD活性;减轻肝细胞变性、炎症浸润及坏死等病变,提示 TAART对 CCl_4 所致肝损伤具有一定的保护作用,其作用机制可能与其提高肝细胞抗氧化能力相关。上述实验结果表明,三叶青所含的总氨基酸是三叶青保肝作用的有效活性部位,为拓展三叶青的临床应用及开发奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences. Traditional Chinese Medicine Will(The second volume) [M]. Beijing: People's Health Publisher, 1984: 219.
- [2] New medical college of Jiangsu. Voluminous dictionary of traditional Chinese medicine [M]. Shanghai: Shanghai People's Press, 1977: 2123.

- [3] HUANG Z, MAO Q Q, WEI J P. Evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic actions for the extracts from Radix Tetraastigmae [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2005, 14(7): 861-864.
- [4] ZHONG X M, MAO Q Q, HUANG Z, *et al.* Experimental study on the protective effects on acute hepatic injury induced by CCl_4 and Acute Toxicity of extract of Radix Tetraastigmae [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2006, 28(3): 422-423.
- [5] PHAA G L. Chlorinated methanol and liver injury: highlights of the past 50 years [J]. Annu Rev Pharmacol, 2000, 40: 42-4065.
- [6] SAUER J M, STINE E R, GUNAWARHANA L, *et al.* The liver as a Target for chemical-chemical interactions [J]. Pharmacol, 1997, 43: 37-4363.

收稿日期: 2006-11-23