论著

文章编号:1000-5404(2005)14-1456-03

荞麦种子总黄酮对四氯化碳所致急性肝损伤的保护作用

辛 念,熊建新,韩淑英,朱丽莎,刘淑梅,储金秀 (华北煤炭医学院药理学教研室,唐山 063000)

提 要:目的 研究荞麦种子总黄酮(total flavonoids of buckhwheat seed, TFBS)对四氯化碳造成的小鼠急性肝损伤的保护作用。**方法** 四氯化碳造成小鼠急性肝损伤模型,测定肝脏指数(liver index,LI):血清谷丙转氨酶(serum glutamic pyruvic transaminase, SGPT)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC),肝组织谷丙转氨酶(liver glutamic pyruvic transaminase, LGPT)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxidase dismutase, SOD)以及谷胱甘肽(glutathione,GSH)等指标,采用光镜观察肝脏组织学变化。**结果** 与四氯化碳模型组比较,经TFBS预防性治疗后,SGPT、LGPT、TG、TC和MDA含量均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),而GSH含量有所升高,同时SOD活力明显增强($P<0.05$)。通过病理学切片观察,TFBS能明显改善肝组织的病理变化。**结论** TFBS对四氯化碳造成的小鼠急性肝损伤具有保护作用。

关键词:荞麦;黄酮;急性肝损伤;四氯化碳

中图法分类号: R285.5; R575; R595 **文献标识码**: A

Protective effect of total flavonoids of buckwheat seed on acute hepatic injury by carbon tetrachloride

XIN Nian, XIONG Jian-xin, HAN Shu-ying, ZHU Li-sha, LIU Shu-mei, CHU Jin-xiu (Department of Pharmacology, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective To study the protective effects of total flavonoids of buckwheat seed (TFBS) on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl_4) in mice. **Methods** Fifty Kunming mice were randomized into five groups. The normal control group and the model control group were intragastically administrated with tap water at the dose of 20 ml/kg, the high and low TFBS groups with 0.2% and 0.1% TFBS, the positive control group with 1% methionine once daily for a week. After the last administration, all groups except the normal control were intraperitoneally injected with 0.2% CCl_4 solution to induce acute hepatic injury. Thereafter, the liver index (LI), the contents of SGPT, TG, TC, LGPT, MDA, GSH, and the activity of SOD were measured and the hepatic histological changes were observed by optical microscope. **Results** As compared with the model group, the contents of SGPT, LGPT, TG and TC obviously decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), the MDA content lowered, but the GSH content increased, the SOD activity improved ($P<0.05$) after preventive treatment with TFBS. What's more, TFBS could ameliorate the hepatic pathological changes. **Conclusion** TFBS have protective effects on acute hepatic injury induced by CCl_4 in mice.

Key words: buckwheat; flavone; acute hepatic injury; carbon tetrachloride

荞麦(buckwheat)为蓼科本草植物,在我国北方广泛种植,资源十分丰富,主要包括甜荞麦(荞麦)、苦荞麦(金荞麦)和翅荞麦等,其全草含有较高的黄酮类化合物。本课题组前期研究了TFBS提取工艺及药理学活性[1~4],发现其水及乙醇提取物具有良好的调血脂[5]以及抗脂质过氧化等作用。在此基础上,我们研究了TFBS对四氯化碳造成的小鼠急性肝损伤的保护作用,并探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 小白鼠昆明株50只,清洁级Ⅱ级,体质量(20

作者简介:辛 念(1978-),女,黑龙江省密山市人,助教,主要从事药理学教学工作,以及中药防治糖尿病及心血管疾病方面的研究。电话:(0315)3725870, E-mail:shuyinghan@ncmc.edu.cn

收稿日期:2004-07-19;修回日期:2004-12-15

±2)g,雌雄各半,由河南省实验动物中心提供,合格证号:医动字第 410115 号。饲养环境:温度 22 ~ 25 ℃,湿度 70%。

1.1.2　药品与试剂　　荞麦种子(来自内蒙古库伦旗)为荞麦成熟的种子;TFBS 为本教研室自制(制备方法:称取一定量的荞麦种子,加入 6 ~ 7 倍量 70% 乙醇,加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,趁热离心除去不溶性杂质,用旋转蒸发器回收乙醇,将最后的沉淀干燥即得荞麦种子总黄酮,黄酮含量 > 60%);四氯化碳(上海长江化工厂);GPT 测定试剂,批号:20040323,TG 测定试剂,批号:2004010019,TC 测定试剂,批号:20040305,SOD 测定试剂,批号:20040323,MDA 测定试剂,批号:20040322,GSH 测定试剂,批号:20040322,考马斯亮蓝蛋白测定试剂,批号:20040318,以上试剂均来自南京建成生物工程研究所;阳性对照药甲硫氨酸,批号:020502(成都利尔药业有限公司);其它试剂为国产分析纯。

1.1.3　仪器　　721 分光光度计(上海第三分析仪器厂),离心沉淀机(型号:LXJ-Ⅱ,上海医用分析仪器厂),MP200A 型电子天平(上海第二天平仪器厂),旋转蒸发器(天津)等。

1.2　方法

1.2.1　实验动物分组　　小鼠 50 只,按随机数字表法分为 5 组,每组 10 只:①组为正常对照组,按 20 ml/kg 灌胃常用水;②组为模型对照组,灌胃等容积常用水;③、④组分别为 TFBS 高、低剂量治疗组,分别灌胃等容积 0.2% 和 0.1% 的 TFBS;⑤组为阳性对照药组,灌胃等容积 1% 的甲硫氨酸。上述各组均每天给药 1 次,连续 1 周。末次给药后,② ~ ⑤组小鼠按 10 ml/kg 腹腔注射 0.2% 四氯化碳豆油溶液 1 次,建立急性肝损伤模型。禁食 24 h,称体质量,眼球取血,离心得血清,并快速处死取肝脏,称肝重,同时取肝左叶组织约 0.5 g,在冰冷的生理盐水中漂洗,滤纸拭干,以生理盐水用内切式组织匀浆器制成 10% 肝组织匀浆,离心,取上清液,准备检测各指标。

1.2.2　生化指标检测　　血液检测指标:SGPT、TG 和 TC,按试剂盒要求进行测定。肝匀浆检测指标:LGPT、MDA、SOD 和 GSH,按试剂盒要求进行测定;并按公式:肝脏指数 = 肝质量(g)/体质量(g) ×100% 计算 LI。

1.2.3　病理学检查　　取部分肝右叶组织做病理学检查,将其放于 10% 甲醛溶液中,石蜡包埋切片,HE 染色,光镜下观察。

1.3　统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示均采用 Instat 软件进行处理,采用 t 检验。

2　结果

2.1　急性肝损伤小鼠生化指标检测

由表 1 可以看出,四氯化碳可致小鼠肝脏指数明显升高($P < 0.01$),其中模型组最高,而各给药组对肝脏指数影响不大。由表 2 可以看出,TFBS 能显著降低血清和肝脏 GPT 活力($P < 0.01$);还能明显降低 TG 含量($P < 0.05$);对 TC 也有降低作用,但与模型组比较无统计学意义。由表 3 可以看出,与模型组相比较,TFBS 能明显降低 MDA 的含量($P < 0.05$),还能明显提高 SOD 活性($P < 0.05$),高低剂量之间没有显著性差异;同时,TFBS 能增加肝脏 GSH 的含量,与模型组比较,无统计学意义。

表 1　TFBS 对急性肝损伤小鼠肝脏指数的影响($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Effects of TFBS on liver index in mice of acute hepatic injury ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Body weight (g)	Liver weight (g)	LI (%)
Normal control	18.90 ± 1.00	0.82 ± 0.21	4.35 ± 0.20
Model control	19.00 ± 1.00	0.95 ± 0.16	4.99 ± 0.23 **
High TFBS	19.70 ± 0.90	0.96 ± 0.15	4.88 ± 0.25 **
Low TFBS	20.10 ± 0.70	0.97 ± 0.71	4.82 ± 0.22 **
Positive control	19.10 ± 0.90	0.94 ± 0.15	4.90 ± 0.30 **

** : $P < 0.01$, *vs* normal control group

表 2　TFBS 对急性肝损伤小鼠 SGPT, LGPT, TG and TC 的影响($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Effects of TFBS on SGPT, LGPT, TG and TC in mice of acute hepatic injury ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	SGPT(IU/L)	LGPT(IU/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)
Normal control	50.51 ± 12.90	20.17 ± 3.51	3.04 ± 1.14	22.04 ± 5.83
Model control	119.14 ± 17.11 **	49.90 ± 4.24 **	4.85 ± 1.41 **	30.06 ± 8.30 *
High TFBS	73.43 ± 9.71 *##	30.55 ± 2.92 **##	3.33 ± 1.60#	24.90 ± 8.53
Low TFBS	75.21 ± 8.96 *##	40.16 ± 4.56 **##	3.62 ± 1.85#	25.58 ± 8.97
Positive control	75.63 ± 10.27 **##	32.61 ± 3.97 **##	3.29 ± 1.69#	25.80 ± 11.22

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *vs* normal control group ; #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$, *vs* model control group

表 3　TFBS 对急性肝损伤小鼠 MDA, SOD and GSH 的影响($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

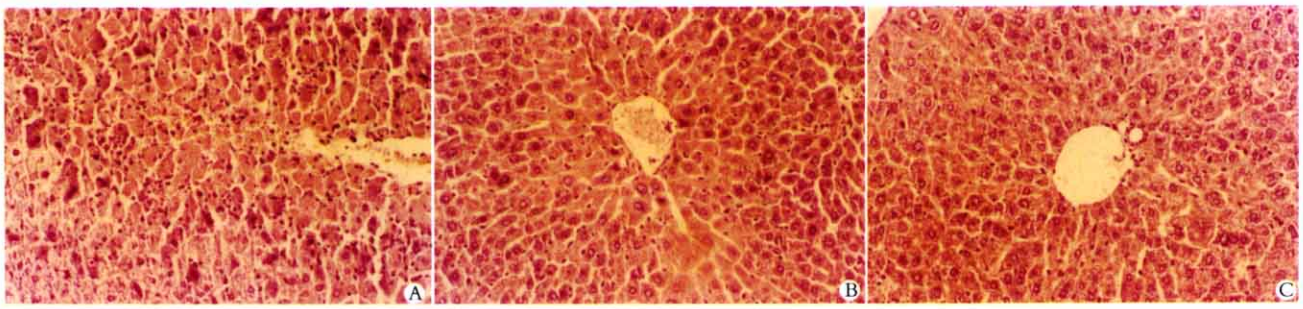
Tab 3　Effects of TFBS on MDA, SOD and GSH in mice of acute hepatic injury ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Group	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	GSH (mg/g)
Normal control	11.66 ± 4.15	15.55 ± 3.93	206.80 ± 14.21
Model control	22.07 ± 6.63 **	9.15 ± 2.97 **	179.40 ± 18.01 **
High TFBS	16.15 ± 4.75 **#	13.70 ± 5.97#	195.01 ± 27.63
Low TFBS	16.33 ± 5.21 *#	14.55 ± 5.60#	202.39 ± 30.07
Positive control	16.57 ± 4.92 *#	13.48 ± 5.01#	190.88 ± 31.40

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *vs* normal control group; #: $P < 0.05$, *vs* model control group

2.2　急性肝损伤小鼠肝脏病理学改变

正常对照组小鼠肝脏外观呈红褐色,质地软而富有弹性;镜下见肝小叶结构清晰,细胞排列整齐,大小均匀,分界清楚,细胞核位于细胞中央,圆而清晰。模型对照组小鼠肝脏体积增大,质脆,边缘钝而厚,表面呈黄褐色;镜下见肝小叶结构破坏,排列紊乱,部分肝细胞变性、坏死或细胞核溶解,可见大量炎细胞浸润(图 1A)。TFBS 高、低剂量组肝脏略有水肿,质地柔软;镜下见肝小叶结构基本完整,细胞排列较整齐,偶见炎细胞浸润,较模型组显著改善,高、低剂量组无明显差异(图 1B、C)。



A: Model control group; B: High TFBS group; C: Low TFBS group

图1 各组小鼠肝组织染色 (HE ×250)

Fig 1 Staining of liver tissue in 3 groups (HE ×250)

3 讨论

肝病是一种发病率高、难以根治的疾病,对人类健康危害极大,而且不良的饮食习惯、药物、毒物等均能导致肝脏疾病,损害肝细胞。大量研究表明,在肝细胞病变过程中,自由基、酶以及脂质过氧化等均发挥重要作用。四氯化碳致小鼠肝损伤模型,一直被广大学者所应用,其机制为:四氯化碳在肝内经微粒体细胞色素P450分解活化,形成三氯甲基自由基($CCl_3\cdot$)和氯自由基($Cl\cdot$),导致肝微粒体的脂质过氧化[6]。由于脂质过氧化反应增强而抗氧化能力下降,导致自由基生成增加,通过氧化细胞膜脂质,使肝细胞结构和功能受到损害[7]。文献[8]报道化合物中的酚羟基是抗脂质过氧化作用的功能基团,荞麦所含黄酮类化合物芸香苷、槲皮素、黄烷醇等,含有酚羟基结构基团,因而发现黄酮类化合物具有保肝护肝作用。

本课题组在前期工作中,通过大量预实验,结合量效关系曲线,发现剂量在0.2%和0.1%左右的TFBS对急、慢性肝损伤具有最佳防治作用,所以本实验治疗组采用此剂量。实验显示,TFBS能显著降低血清和肝脏GPT活力($P<0.01$),从而减少丙酮酸生成,使还原型NADPH含量增高,以此增强肝细胞抗氧化、清除自由基、抑制脂质过氧化的能力。TFBS还能明显降低TG($P<0.05$)和TC含量,这可能是黄酮类化合物通过降低毛细血管通透性、增加维生素C,从而改善脂质代谢,使其紊乱趋于平衡,以减少TG、TC的蓄积。TFBS还明显降低MDA含量($P<0.05$),增加GSH含量,是由于所含酚羟基的抗脂质过氧化作用,直接捕捉、清除自由基,生成自由基中间体,阻断或终止自由基连锁反应链,从而阻止或抑制氧自由基反应和脂质过氧化反应,最终抑制脂质过氧化终产物MDA的生成,减轻肝脏还原型GSH的耗竭[9]。但GSH含量增加不明显,与模型组比较,无统计学意义。TFBS同时明显提高肝脏SOD活力($P<0.05$),这与黄酮类化合物参与调节和提高体内抗氧化酶的活性有关[10]。病理学检查表明,TFBS能明显防治急性肝损伤,减轻肝细胞形态结构的损伤,提示TFBS具有保护损伤肝细胞的作用。

黄酮类化合物广泛存在于自然植物中,有多种生物学活性,近年来国内外学者对其颇为重视。荞麦种子中含有多种黄酮类化合物,而且北方荞麦种植区广泛,资源丰富,值得开发利用。

参考文献:

[1] 韩淑英, 吕 华, 朱丽莎, 等. 荞麦种子总黄酮降血脂、血糖及抗脂质过氧化作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2001,17(6): 694-696.

[2] 韩淑英, 朱丽莎, 刘淑梅, 等. 荞麦叶总黄酮调血脂及抗脂质过氧化作用[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2002,5(7): 711-712.

[3] 朱莉莎, 韩淑英, 吕 华, 等. 荞麦种子提取物对糖尿病小鼠的降血糖作用[J]. 中成药, 2002, 24(4): 307-308.

[4] 刘淑梅, 韩淑英, 贾秀荣, 等. 荞麦提取物对血脂及脂质过氧化产物丙二醛的影响[J]. 华北煤炭医学院学报, 2002, 4 (3): 282-283.

[5] 刘淑梅, 韩淑英, 崔国金, 等. 甜荞麦叶总黄酮降糖、降脂作用及机制[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(19): 1815-1857.

[6] 戴志强, 俞月桂, 袁幸菊, 等. 氧代赖氨酸抗四氯化碳所致小鼠肝细胞损害的超微结构观察[J]. 中国药理学和毒理学杂志, 1994, 8(2): 139-142.

[7] Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, *et al*. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology[J]. Hepatology,1997, 25(2): 351-355.

[8] Husain S R, Cillard J, Cillard P. Hydroxy radical scavenging activity of flavonoids[J]. Phytochemistry, 1987, 26(9): 2489-2491.

[9] 王颖芳, 王宇亮. 中药治疗肝损伤作用机理的实验研究进展[J]. 河南中医学院学报, 2003,18(1): 33-34.

[10] 先 宏, 吴 可, 孙存普. 中药抗氧化活性的主要成分及其自由基清除作用[J]. 国外医学中医中药分册, 2003, 25(3): 150-153.

(编辑 王 红)