金丝桃苷对 CCl_4 诱导大鼠急性肝损伤抗氧化应激研究

黄明春,陈剑鸿,胡小刚,夏培元,蔡永青,王 强 (第三军医大学西南医院药剂科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究金丝桃苷(Hyp)对四氯化碳(CCl_4)诱导大鼠急性肝损伤的治疗作用。**方法** 采用大鼠 CCl_4 急性肝损伤模型,观察 Hyp 对急性肝损伤大鼠肝脏组织病理学改变的影响;检测肝组织匀浆中超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽(GSH)的活性及丙二醛(MDA)含量变化。**结果** CCl_4 模型组大鼠肝组织 HE 染色病理检测结果见明显炎症变性坏死及纤维组织增生现象;Hyp 高剂量 60 mg/kg、中剂量 30 mg/kg 治疗组的肝组织病理改变明显改善;Hyp 治疗组肝组织中 T-SOD、GSH 活性明显升高,MDA 含量明显降低,并存在量效关系。**结论** Hyp 对 CCl_4 引起的大鼠急性肝损伤有较好的治疗作用,其机制可能与其抗氧化活性有关。

[关键词] 金丝桃苷;CCl_4;急性肝损伤;抗氧化活性

[中图分类号] R575;R285;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)06-0588-03

Effect of hyperin on acute liver injury in rats against oxidative stress-induced by CCl_4

HUANG Ming-chun, CHEN Jian-hong, HU Xiao-gang, XIA Pei-yuan, CAI Yong-qing, WANG Qiang (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of hyperin(Hyp) on the acute liver injury in rats induced by CCl_4. **Methods** The acute liver injury model was induced by CCl_4. The effect of Hyp on acute liver injury of rat liver histopathology was observed; and the impact of changes of homogenates total superoxide dismutase (T-SOD), glutathione (GSH) activity and malondialdehyde (MDA) in liver were detected. **Results** The acute liver injury of tissue induced by CCl_4, apparent pathological inflammation and fibrous tissue degeneration and necrosis were observed by HE staining; At the high doses of 60 mg/kg and medium doses of 30 mg/kg treated by Hyp, liver pathology changes was significantly obvious. The T-SOD, GSH activity of liver tissue was significantly increased in the groups of Hyp treatment, MDA content was significantly decreased, which related to the dosages. **Conclusion** In the rat model of acute liver injury induced by CCl_4. A better therapeutic effect of Hyp was shown, the mechanism may be related to its antioxidant activity.

Keywords: hyperin; CCl_4; acute liver injury; against oxidative stress

金丝桃苷(hyperin, Hyp)为黄蜀葵花[Abelmoschus manihot (L.) Medic]中提取的有效成分,属黄酮醇苷类化合物,结构为槲皮素-3-半乳糖苷[1-2]。本课题组前期研究发现,采用 L02 细胞进行体外研究,以 H_2O_2 为造模剂构建细胞氧化损伤模型,结果显示 Hyp 可通过 MAPK 途径激活 $Keap_1$-Nrf_2-ARE 信号通路,诱导 HO-1 基因表达,是 Hyp 发挥细胞保护效应的重要机制[3-4]。有研究报道 Hyp 具有抗 H_2O_2 损伤心肌细胞的药理学活性,能提高心肌细胞膜的 Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性,减轻细胞内钙超载,并调节不同亚型 NOS 活性,从而达到保护心肌细胞损伤[5-6]。但 Hyp 对 CCl_4 引起的化学性急性肝损伤的治疗作用目前鲜见报道。本研究采用 CCl_4 制备大鼠急性肝损伤模型,以联苯双酯滴丸作为阳性对照药,考察不同剂量 Hyp 对 CCl_4 引起大鼠急性肝损伤的治疗作用,探讨其可能的抗氧化机制,为植物黄酮类抗氧化性肝损伤药物的开发提供有效数据,为急性肝损伤的治疗决策提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和药品试剂

Allegra-64R 型高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司);CX21 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);Multiskan Spectrum 全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);Scientz-48 型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。Hyp(纯度为 98.6%,分子式为 $C_{21}H_{20}O_{12}$,相对分子质量为 463.3,上海阿拉丁试剂有限公司,批号:E1309050);联苯双酯滴丸(每丸 1.5 mg,浙江医药股份有限公司新昌制药厂,批号:120303);CCl_4(分析纯,成都市科龙化工试剂厂,批号:20090115);BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司,批号:SK3021);总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物模型和分组

健康 SD 大鼠雌雄各半共 30 只,6 ~ 8 周龄,体质量(200 ±

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201306003

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273608;30973493);国家科技重大专项(2011ZXJ09106-06B)

[通讯作者] 陈剑鸿,电话:(023)68754463,E-mail:chenjh-110@263.net

[收稿日期] 2013-08-26 [修回日期] 2013-09-15

20) g,购于第三军医大学实验动物中心,实验动物许可证号:SYXK(渝)2007-0002。实验大鼠,适应环境 1 d 后,采用植物油 1∶1 稀释的 CCl_4 溶液,按 3 mL/kg 一次性腹腔注射致大鼠急性肝损伤。采用随机方法将大鼠分成空白对照组(植物油)和实验组。实验组又分为急性肝损伤模型组(模型组)、Hyp 高、中、低剂量治疗组(分别为 60 mg/kg、30 mg/kg、15 mg/kg)。空白对照组腹腔只注射植物油溶液,每组各 5 只。联苯双酯阳性对照药物组和 3 个 Hyp 剂量治疗组按每 100 g 体质量 0.8 mL 灌胃给药,正常对照组和模型组用等体积生理盐水灌胃。每天 1 次,连续 3 d,于末次给药后禁食不禁水 24 h 后断颈处死大鼠,收集肝脏组织进行生化指标检测和组织学检查。

1.3 观察指标

1.3.1 肝脏标本大体观察 大鼠处死后肉眼观察肝脏的外形、大小、色泽、质地、切面情况。

1.3.2 组织病理学观察 大鼠戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,从不同肝大叶处剪下 1 cm × 1 cm × 0.5 cm 的肝组织,用 10% 的甲醛固定。将固定好的肝组织做组织切片,HE 染色,光镜观察肝脏组织病理学变化。

1.3.3 肝组织氧化和抗氧化指标检测 剪取一块肝组织于预冷生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸吸干,分别称取 0.13 g 放入匀浆管,加入 9 倍预冷生理盐水,采用 50 Hz,25 s 研磨后,3 500 r/min,4 ℃,离心 10 min,取上清制备 10% 组织匀浆,测定肝匀浆中 GSH、T-SOD 和 MDA 活力和含量,具体操作按试剂盒要求。

1.4 统计学处理

各实验组数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 21.0软件进行数据分析。分析方法采用单因素方差分析,方差齐性事后检验采用 Tukey 方法进行两两比较,方差不齐事后检验采用 Games-Howell 法。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏标本大体观察

空白对照组大鼠肝脏被膜表面光滑质软,肝组织红润呈红褐色,质地中等,肝体积正常。模型组大鼠肝脏体积增大明显、肝脏呈奶黄色、包膜紧张、切面油腻感,肝表面有较多灰白色小结节,色暗红,呈典型脂肪肝外观,被膜与邻近器官有轻度粘连。阳性对照组和 Hyp 治疗组大鼠肝脏质地较空白对照组硬,色泽暗淡,肝脏体积稍大、偏黄色,部分肝脏切面有油腻感,肝表面有少量散在灰白色小结节,质地接近正常肝组织(图 1)。

2.2 Hyp 对 CCl_4 肝损伤大鼠肝组织病理变化的影响

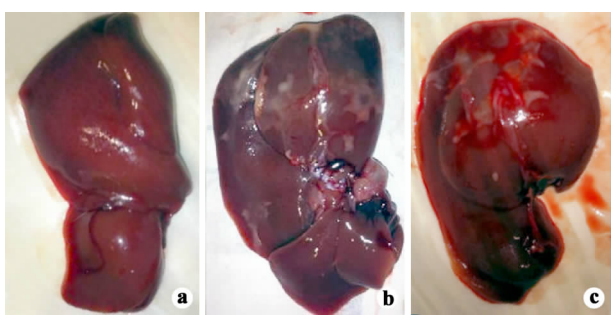
实验大鼠的肝组织病理切片光镜观察结果显示,空白对照组的肝组织形态、结构正常,肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐,形态大小一致,肝索呈明显的放射状,汇管区无肿胀脂变坏死和血管周围无炎细胞浸润等病变(图 2a)。CCl_4 模型组的肝组织结构混乱,肝小叶不完整,有散在的点灶状坏死,肝细胞浊肿,排列紊乱,中央静脉周围肝细胞脂肪变,可见少数嗜酸小体形成及小灶性肝细胞坏死,汇管区有明显炎细胞浸润(图 2b)。联苯双酯阳性对照组肝小叶较完整,汇管区比较清晰,血管周围偶见少量炎细胞浸润,肝细胞变性、坏死与 CCl_4 模型组相比有明显减轻(图 2c)。15 mg/kg 的 Hyp 治疗组肝小叶不完整,可见中等程度的细胞水肿和脂变,偶见炎细胞浸润,但程度比 CCl_4 模型组较轻(图 2d)。30 mg/kg 的 Hyp 治疗组肝小叶较完整,肝细胞浊肿变性轻于模型组,汇管区可见少量炎细胞浸润(图 2e)。60 mg/kg 的 Hyp 治疗组肝小叶完整,未见肝细胞坏死,极少量炎细胞浸润(图 2f)。上述结果表明 Hyp 对 CCl_4 所引起的急性肝脏病理学变化具有明显的改善作用。

2.3 Hyp 对肝组织氧化和抗氧化指标的影响

肝组织氧化和抗氧化指标实验结果表明(图 3),空白对照组大鼠肝匀浆组织中 GSH、T-SOD 和 MDA 水平与模型组相比,具有统计学差异($P < 0.05$)。GSH 检测结果显示,Hyp 15 mg/kg组明显低于于空白对照组($P < 0.05$),Hyp 30 mg/kg 和 60 mg/kg 组及联苯双酯组与空白对照组比较无统计学差异($P > 0.05$),联苯双酯组和 Hyp 30mg/kg 和 60 mg/kg 组明显高于模型组($P < 0.05$)。T-SOD 检测结果显示,Hyp 60 mg/kg 组明显高于模型组($P < 0.05$)。MDA 检测结果显示,联苯双酯组和Hyp 60 mg/kg、30 mg/kg、15 mg/kg 组明显低于模型组($P < 0.05$)。

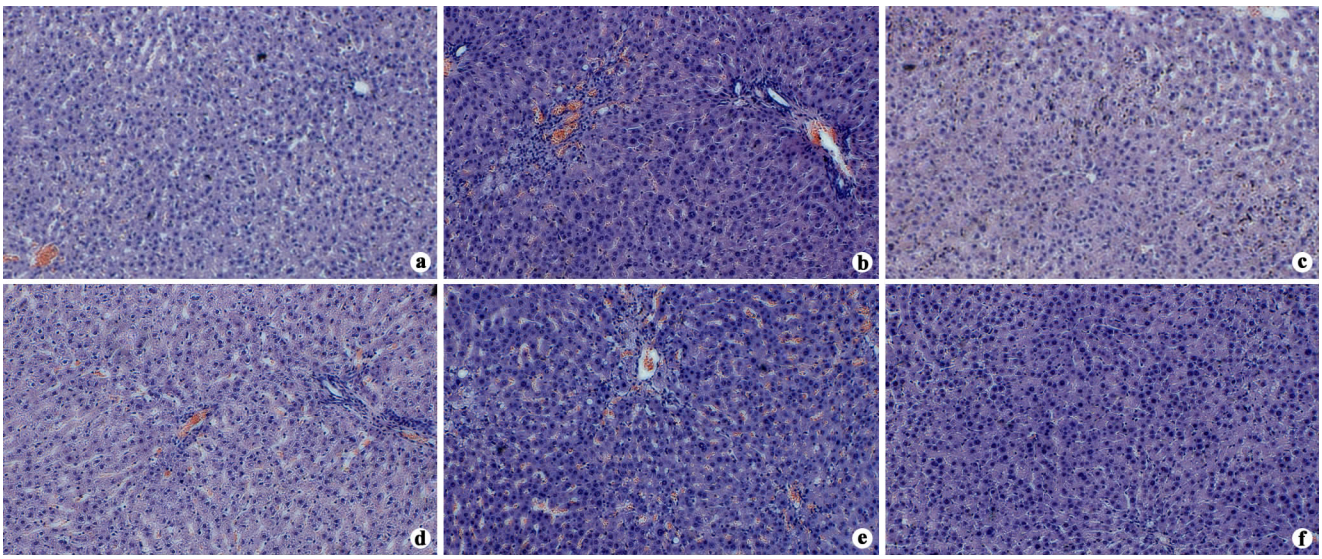
3 讨论

金丝桃苷具有镇痛、免疫调节、心肌保护和胃黏膜保护等广泛的药理学活性,但其对急性肝损伤的治疗作用鲜见报道。我们前期的体外研究显示 Hyp 可通过 MAPK 途径激活 $Keap_1$-Nrf_2-ARE 信号通路,诱导 HO-1 基因表达而发挥细胞保护效应。在此基础上,本实验进一步采用 CCl_4 致大鼠急性肝损伤模型,证实 Hyp 对化学性急性肝损伤的治疗作用及抗氧化机制。CCl_4 是经典而且常用的化学性肝损伤诱导剂,腹腔注射和皮下注射均能引起肝脏损伤,建立的损伤模型重现性好,不仅可造成肝细胞变性和坏死,还可引起肝功能异常[7-8]。在大鼠 CCl_4 急性肝损伤模型中,脂质过氧化是其主要的肝损伤形成机制[9]。CCl_4 进入肝细胞后,被肝微粒体酶和细胞色素 P450 激活生成三氯甲基自由基(CCl_3·)和氯自由基(Cl·),然后通过氢吸附攻击肝脏内质网膜与细胞膜磷脂质上的不饱和脂肪



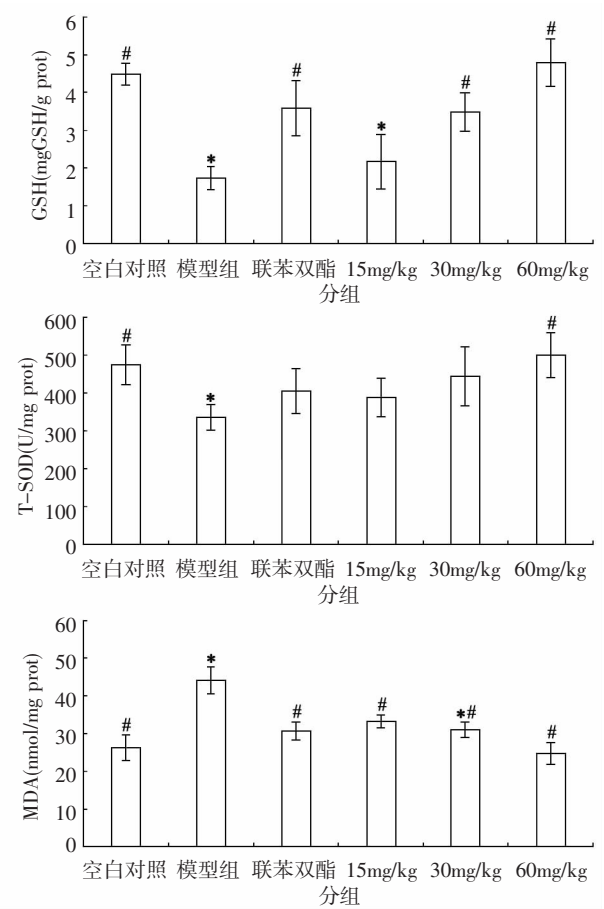
a:空白对照组;b:模型组;c:实验组

图 1 肝脏标本大体观察



a:空白对照组;b:模型组;c:联苯双酯阳性对照组;d:15 mg/kg Hyp 治疗组;e:30 mg/kg Hyp 治疗组;f:60 mg/kg Hyp 治疗组

图 2 Hyp 对 CCl_4 诱导的急性肝损伤病理学变化的影响(HE ×100)



*:与空白对照组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图 3 大鼠肝组织中 GSH、T-SOD 活性和 MDA 含量比较

酸,在氧气存在下诱发脂质过氧化反应,产生的过氧化物裂解后会产生醛、酮等物质或直接与糖类、蛋白质、醣蛋白产生不可逆的共价结合,引起膜结构和功能完整性的破坏,使肝细胞损伤。

三氯甲基(CCl_3·)自由基能与膜脂质和蛋白质大分子结合,造成膜结构和功能的破坏[10]。MDA 是脂质过氧化的终产物,它不仅能反映机体内氧化反应水平,也能作为损害因子对机体进行攻击[11]。GSH 是以半胱氨酸、谷氨酸与甘氨酸为原料的多肽物质,是 GSH-PX 的底物,具有多种生理功能,解毒功能是其功能之一,对脂自由基及脂质过氧化自由基等基团具有较强的清除作用[12-13]。肝组织氧化和抗氧化指标检测结果表明,空白对照组大鼠肝匀浆组织中 GSH、T-SOD 和 MDA 水平与模型组相比具有统计学差异,证实实验动物模型构建成功。采用药物处理的 GSH 检测结果说明,Hyp 30 mg/kg 和 60 mg/kg 治疗组及联苯双酯组与空白对照组相比无统计学差异,Hyp 中、高剂量组对 CCl_4 引起的大鼠急性肝损伤具有较好治疗效果。对 T-SOD 的检测结果显示 Hyp 60 mg/kg 治疗组明显高于模型组,MDA 检测显示联苯双酯组和 Hyp 低、中、高剂量组明显低于模型组,说明 Hyp 具有提高 T-SOD 活性和明显抑制 MDA 水平的增多的药理学活性,对肝损伤出现的 MDA 含量的增多具有明显的抑制作用,进一步说明 Hyp 对 CCl_4 引起的大鼠急性肝损伤有保护作用,也提示了其作用与抗自由基脂质过氧化密切相关。

综上所述,Hyp 对 CCl_4 引起的大鼠急性肝损伤治疗作用研究结果表明,Hyp 能显著抑制自由基脂质过氧化、增强机体抗氧化能力,加速机体对脂自由基及脂质过氧化自由基等清除的作用,其深入机制有待进一

(下转第 593 页)

亡及抑制肿瘤细胞生长,从而用于抗肿瘤治疗[11-12],hTNF-α 具有广泛的生物学作用,包括细胞的增殖、分化、凋亡以及介导免疫反应,在肿瘤的发生与发展过程中起重要作用。许多具有抗瘤活性的生物制剂与 TNF-α 合用也产生协同作用,如白细胞介素Ⅱ与 TNF-α合用,对杀伤肿瘤细胞起相辅相成的作用。鉴于肿瘤坏死因子在体内外对多种肿瘤有明显的抑制和杀伤作用,国内外学者通过大量的实验和临床研究证明,应用 hTNF-α 治疗肿瘤是对临床手术和化疗等常规治疗手段的有效补充[13]。综上所述 hTNF-α 细胞能抑制结肠癌细胞的增殖,为结肠癌基因治疗和化学药物联合治疗提供了理论基础,从而对结肠癌在临床上生物治疗具有潜在的应用价值。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cance rstatistics[J]. CA Cancer J Clin ,2011,61(2):69 - 90.

[2] Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD)[J]. Lancet Oncol,2008,9(8):730 - 756.

[3] Chen Q, Liu ZC, Cheng LP, et al. An analysis of incidence and mortality of color ectal cancer in China, 2003-2007[J]. China Cancer, 2012, 21(3):179 - 182.

[4] Houghton AN. LIGHTing the way for tumor immunity[J]. Nat Immunol, 2004,5(2):123 - 124.

[5] Thomas, Kilibanov AM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2003,62(1):27 - 34.

[6] Asensio AC, Rodríguez-Ferrer CR, Oaknin S, et al. Biochemical and immunochemical characterisation of human diadenosine triphosphatase provides evidence for its identification with the tumour suppressor Fhit protein[J]. Biochimie,2006,88(5):461 - 471.

[7] 谢光军,郭云虎,张 励,等. 结肠癌并急性肠梗阻的诊断与治疗[J]. 内蒙古中医药,2010,12(5):94 - 95.

[8] 毛大力,刘明强. 结肠癌并急性肠梗阻的诊断与治疗体会[J]. 局解手术学杂志,2009,18(5):362 - 363.

[9] Assämäki R, Sarlomo-Rikala M, Lopez-Guerrero JA, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of chromosomal imbalances and their target genes in gastrointestinal stromal tumors[J]. Genes Chromosomes Cancer,2007,46(6):564 - 576.

[10] 顾 晋,李 明. 我国直肠癌诊断和治疗的现状[J]. 中华消化外科杂志,2007,8(5):321 - 322.

[11] Campochiaro PA. Gene therapy for ocular neovascularization[J]. Curr Gene Ther,2007,7(1):25 - 33.

[12] Xu Z, Vu T, Lee H, et al. Population pharmacokinetics of golimumab, an anti-tumor necrosis factor-alpha human monoclonal antibody, in patients with psoriatic arthritis[J]. J Clin Pharmacol,2009,49(9):1056 - 1070 .

[13] Vandenbroucke K, de Haard H, Beirnaert E, et al. Orally administered L. lactis secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis[J]. Mucosal Immunol,2010,3(1):49 - 56.

(编辑:杨 颖)

(上接第 590 页)

步研究。本研究结果能为植物黄酮类抗氧化性肝损伤药物的开发提供有效数据和理论依据。

[参考文献]

[1] 林 萍,易宏伟,张 斐. 金丝桃苷药理作用研究进展[J]. 中国现代中药,2012,14(10):23 - 26.

[2] Li FR, Yu FX, Yao ST, et al. Hyperin extracted from Manchurian rhododendron leaf induces apoptosis in human endometrial cancer cells through a mitochondrial pathway[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2012,13(8):3653 - 3656.

[3] Xing HY, Liu Y, Chen JH, et al. Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent $Keap_1$-Nrf_2-ARE signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2011,410(4):759 - 765.

[4] Wu S, Yue Y, Tian H, et al. Carthamus red from Carthamus tinctorius L. exerts antioxidant and hepatoprotective effect against CCl_4-induced liver damage in rats via the Nrf_2 pathway[J]. J Ethnopharmacol,2013,148(2):570 - 578.

[5] Nurrochmad A, Margono SA, Sardjiman, et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of pentagamavunon-0 against carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats[J]. Asian Pac J Trop Med,2013,6(6):438 - 442.

[6] Ai G, Liu Q, Hua W, et al. Hepatoprotective evaluation of the total flavonoids extracted from flowers of Abelmoschus manihot (L.) Medic: In vitro and in vivo studies[J]. J Ethnopharmacol,2013,146(3):794 - 802.

[7] 田冬冬,任 艳,郑素军. 急性肝损伤动物模型的研究动态[J]. 北京医学,2012,34(3):211 - 214.

[8] 刘赴平,师玲玲. 四氯化碳造成急性肝损伤大鼠模型的实验研究[J]. 中国输血杂志,2012,25(5):446 - 448.

[9] Lin X, Huang R, Zhang S, et al. Methyl helicterate protects against CCl_4-induced liver injury in rats by inhibiting oxidative stress, NF-κB activation, Fas/FasL pathway and cytochrome P4502E1 level[J]. Food Chem Toxicol,2012,50(10):3413 - 3420.

[10] Pinto C, Duque AL, Rodríguez-Galdón B, et al. Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats[J]. Food Chem Toxicol,2012,50(10):3405 - 3412.

[11] 郭又嘉,文 坎,张士军,等. 玉郎伞皂苷对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响[J]. 中国药理学通报,2012,28(4):554 - 558.

[12] Anand KV, Anandhi R, Pakkiyaraj M, et al. Protective effect of chrysin on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced tissue injury in male Wistar rats[J]. Toxicol Ind Health,2011,27(10):923 - 933.

[13] 孙雅煊,刘 婷,戴雪伶,等. 高山离子芥水提物对四氯化碳诱导的急性肝损伤的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(4):864 - 866.

(编辑:余汇洋)