

广西凌云产川木瓜总黄酮保肝降酶作用的实验研究^①

覃洪含¹, 陈壮^{2②}, 肖刚¹, 黎为能¹, 曾海生³

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: 313770493@qq.com;

2. 广西中医药大学附属瑞康医院药物研发中心, 广西 南宁 530001;

3. 右江民族医学院附属医院药剂科, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 研究广西凌云产川木瓜总黄酮保肝降酶的作用。 **方法** 提取分离出川木瓜总黄酮, 采用四氯化碳、卡介苗 (BCG) 加脂多糖 (LPS) 致小鼠肝损伤模型, 测定小鼠血清中 ALT、AST 水平及肝脏组织 SOD、MDA 活力, 观察肝组织病理学。 **结果** 与模型组比较, 川木瓜总黄酮高、中剂量显著降低四氯化碳急性肝损伤小鼠的 ALT、AST 水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 肝组织病理学也显示川木瓜总黄酮高、中剂量明显改善小鼠肝细胞的损伤。与模型组相比较, 川木瓜总黄酮高、中、低剂量组显著降低免疫性肝损伤小鼠血清 ALT 水平及肝脏 MDA 活力, 明显提高肝脏 SOD 活力, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 广西凌云产川木瓜总黄酮具有保肝降酶的作用。

关键词: 川木瓜; 急性; 免疫性; 肝损伤; 保肝降酶

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2016)03-0268-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.03.008

木瓜来源于蔷薇科植物贴梗海棠的干燥近成熟果实, 习称“皱皮木瓜”, 主产于我国安徽、河南、浙江、湖北、四川等地。其中以安徽宣城木瓜质量最好。四川产量最大, 称川木瓜, 质量亦优, 畅销全国。木瓜性温、味酸, 归肝、脾经。具有平肝舒筋、和胃化湿的作用, 可用于预防和治疗风湿病、霍乱、痢疾、肠炎、脚气病及维生素 C 缺乏症等^[1]。近年来, 有相关木瓜的研究报道, 如王宏贤^[2]研究发现木瓜有保肝降酶的作用。由于木瓜在不同地方有不同的品质特色, 这些木瓜道地起源及道地产区形成的规律影响着药材质量, 不同产地的木瓜的有效成分差异很大^[3]。木瓜中含有丰富的黄酮类化合物^[4-5]。宋亚玲等^[6]实验研究发现木瓜果实的乙酸乙酯提取物 (对苯二酚、3,4-二羟基苯甲酸、槲皮素) 具有抗氧化活性。本课题组前期基础研究发现木瓜提取物 (醇提取物) 对急性肝损伤和免疫性肝损伤小鼠有保护作用^[7], 基于此研究基础, 笔者以考察广西凌云县特产的川木瓜总黄酮是否有保肝作用为目的, 研究广西凌云产川木瓜总黄酮保肝降酶的作用, 为进一步开发本地川木瓜药用价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 EL204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司), 微量加样器, LG-16W 型离心机 (北京医用离心机厂), 岛津 UV-160A 紫外可见分光光度

计 (日本岛津公司), 旋转蒸发器 RE-52A (上海亚荣生化仪器厂), 数显恒温水浴锅 HH-6 (国华电器有限公司), Q/BKYY31-2000 电热恒温鼓风干燥箱 (上海跃进医疗器械厂), 大孔树脂 D101 (天津市光复精细化工有限公司)。

1.2 药物 川木瓜购自广西凌云县, 阴干, 粉碎, 用 80% 乙醇提取, 料液比为 1:6, 浸泡 0.5 h 后回流提取时间 3 h, 其中每次提取 1 h 后纱布滤过, 提取 3 次, 合并滤液, 减压回收乙醇, 浓缩成流浸膏, 将流浸膏水溶、静置、抽滤, 滤液上大孔树脂柱, 先用纯净水 (4 倍柱体积) 洗脱, 再用 70% 乙醇 (4 倍柱体积) 洗脱, 水洗脱部分弃掉, 将 70% 乙醇洗脱液部分回收乙醇、浓缩, 浓缩液在 60℃ 减压真空干燥箱中干燥, 得到的样品放置 -8℃ 冰箱冷藏备用。联苯双酯 (广州星群药业股份有限公司, 批号: KF40026); 四氯化碳 (CCl₄, 分析纯, 天津市北辰方正化学试剂厂, 批号: 20150609); 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (均购自南京建成生物工程研究所, 批号分别为: 20151025、20151025、20151025、20151025)。

1.3 实验动物 昆明种小鼠, 体质量 (18±2) g, 雌雄各半, 购自广西医科大学实验动物中心 (生产许可证号: SCXKG 桂 2009-0002)。

① 基金项目: 右江民族医学院 2012~2013 年度院级科研立项项目 [右医院字 (2013) 66 号]; 广西教育厅课题 (2013LX106)

② 通讯作者

1.4 川木瓜总黄酮对急性肝损伤小鼠的作用 按照随机原则将 70 只小鼠分为 6 个组,分别是空白对照组、模型组、联苯双酯组、川木瓜总黄酮高剂量组、川木瓜总黄酮中剂量组、川木瓜总黄酮低剂量组,空白对照组与模型组每天给予纯净水灌胃,联苯双酯组每天给予联苯双酯(给药剂量:0.6 g/kg)灌胃,川木瓜总黄酮高、中、低组每天给予川木瓜总黄酮(剂量分别为 8 g/kg、4 g/kg、2 g/kg)灌胃,连续给药或纯净水 12 d。于第 12 d 晚上 8:00,空白对照组除外,其余各组腹腔注射 0.08% CCl₄ 花生油溶液(1 周前配好,每天振摇)0.1 ml/10 g,造成小鼠急性肝损伤模型,禁食不禁水。于 12 h 后(第 2 d 早上 8:00),小鼠眼眶取血,全血静置 2~3 h,析出血清,离心(4 000 r/min),分离血清,测定血清 ALT、AST 的吸光度;取肝大叶,用 10% 甲醛固定,做病理组织学检查。

1.5 川木瓜总黄酮对免疫性肝损伤小鼠的作用 动物分组及给药方法同“1.4”项,连续给药 10 d,除了空白对照组外,其余各组在每次给药前均于小鼠尾静脉注射卡介苗(BCG)。于第 10 d 晚上 8:00,除了空白对照组外,其余各组均于小鼠尾静脉注射脂多糖(LPS),造成小鼠免疫性肝损伤模型,禁食不禁水 12 h,测定 ALT 法同“1.4”项,另外在肝脏同一部位取约 0.5 g 肝组织做匀浆(冰浴条件下按照 1:9 比例以 0.9% 生理盐水稀释,在玻璃匀浆管中匀浆),匀浆液在低温离心机下离心(4 000 r/min),测定匀浆上清液的 SOD、MDA 吸光度。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,计量资料均以($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐性采用单因素 ANOVA 分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验;如方差不齐,采用完全随机设计多个样本比较的秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 川木瓜总黄酮对急性肝损伤小鼠的作用 各组的 ALT、AST 值比较总体上差异有统计学意义($P<0.001$)。与空白对照组比较,模型组小鼠血清 ALT、AST 活力明显提高,差异有统计学意义($P<0.05$),提示本实验急性肝损伤模型建立成功。联苯双酯组小鼠血清 ALT、AST 明显低于模型组($P<0.05$),提示本次实验结果可靠。川木瓜总黄酮高、中剂量组小鼠血清 ALT、AST 均明显低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。从小鼠肝组织病理切片看,空白对照组小鼠肝小叶结构正常,而模型组小鼠肝小叶结构紊乱,肝细胞出现明显水肿,体积增大,呈现弥漫

性气球样变,小叶区出现肝细胞片坏死伴有炎性细胞浸润,汇管区也出现炎性细胞浸润。联苯双酯组小鼠肝小叶、汇管区病变程度及炎性细胞明显变少;川木瓜总黄酮高、中剂量组小鼠肝组织没有明显坏死,但是小部分肝细胞仍有水肿,大部分肝细胞正常,低剂量组小鼠肝还看到细胞水肿、坏死、气球样变或炎性细胞浸润,提示了川木瓜总黄酮具有保护肝细胞损伤的作用,见图 1。

表 1 川木瓜总黄酮对急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	ALT (u/L)	AST (u/L)
空白对照组	—	32.36±14.11 ^a	39.10±15.25 ^a
模型组	—	259.54±35.67	200.21±31.31
联苯双酯组	0.6	65.81±28.32 ^a	77.35±28.39 ^a
川木瓜总黄酮			
高剂量组	8	213.42±27.37 ^a	134.72±30.07 ^a
中剂量组	4	199.09±37.81 ^a	140.28±35.76 ^a
低剂量组	2	234.05±39.26	160.33±37.01 ^a
<i>F</i>		89.32	36.36
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与模型组比较,a: $P<0.01$

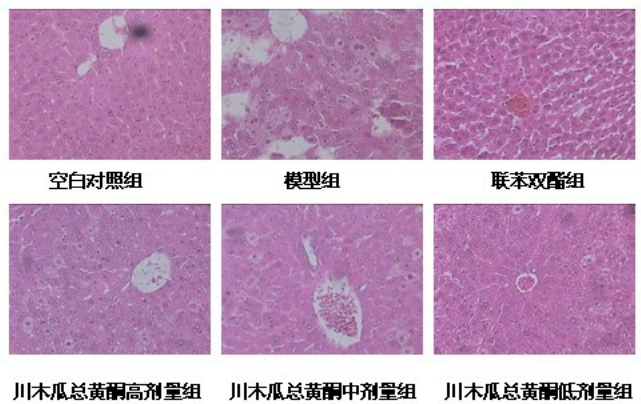


图 1 各组急性肝损伤小鼠的肝组织病理学结果(HE,×40)

2.2 川木瓜总黄酮对免疫性肝损伤小鼠的作用 6 个组 ALT、SOD、MDA 的值总体上比较,差异有统计学意义($P<0.001$)。与空白对照组比较,模型组小鼠的 ALT、MDA 明显提高,SOD 明显下降,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$),提示本次实验造模成功。与模型组比较,联苯双酯组的 ALT、MDA 明显提高,SOD 明显下降,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$),提示本次实验的结果可靠。与模型组比较,川木瓜总黄酮高、中剂量组 ALT 明显降低($P<0.05$);与模型组比较,川木瓜总黄酮高、中、低剂量组 SOD 明

显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 川木瓜总黄酮高、中、低剂量组 MDA 明显下降 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 川木瓜总黄酮对免疫性肝损伤小鼠血清 ALT、肝组织 SOD、MDA 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	ALT (u/L)	SOD (nmol/ml)	MDA (u/mg)
空白对照组	—	22.66±6.27 ^a	40.38±3.62 ^a	20.81±2.10 ^a
模型组	—	185.27±47.93	24.46±4.95	37.65±6.03
联苯双酯组	0.6	95.18±27.52 ^a	35.12±4.55 ^a	25.09±4.94 ^a
川木瓜总黄酮				
高剂量组	8	129.30±40.62 ^b	34.00±6.07 ^a	28.49±5.74 ^a
中剂量组	4	133.53±43.53 ^b	31.38±6.36 ^b	31.27±5.46 ^b
低剂量组	2	158.39±54.15	30.62±6.36 ^a	31.23±5.93 ^b
Z/F		24.815	9.58	12.33
P		<0.001	<0.001	<0.001

注: 与模型组比较, a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$

3 讨论

肝脏是人体内最大的、功能最多的实质性腺体器官, 被比喻为人体最大的化工厂。其参与了体内消化、代谢、排泄、解毒和免疫等过程, 是重要而复杂的代谢器官。肝脏氧化损伤是动物与人体所面临的一个非常常见和严重的损伤, 可引起动物和人体的衰老和其他疾病的发生, 加重了机体的衰老和病变^[8]。常用四氯化碳、D-半乳糖胺、对乙酰氨基酚及乙醇四种诱导剂来制造动物急性肝损伤模型^[9-12]。四氯化碳诱导肝损伤可能的致病机制是与氧化应激和脂质过氧化有关, 氧化应激反应生成醛类等副产物(如丙二醛)能与细胞内的蛋白质及 DNA 结合而使得细胞受损伤; 脂质过氧化反应生成的产物(三氯甲基自由基及过氧化甲基自由基)能刺激 kupffer 细胞释放促炎性反应因子, 使细胞内的 ALT 及 AST 溢出^[13]。BCG 与 LPS 联合诱导的免疫性肝损伤模型类似于人类肝炎发生的病理生理过程, 故其为筛选保肝药物理想的模型之一, 其损伤肝脏的机制是肝巨噬细胞介导的免疫性肝损伤^[14]。另外预先注射 BCG 的目的是使多核中性粒细胞或巨噬细胞聚集于肝脏, 之后再注射 LPS 攻击的目的是激发这些细胞释放多种对肝细胞有毒性作用的细胞因子、氧自由基等免疫效应分子, 从而引起免疫性肝损伤^[15]。

当动物肝脏受到损伤以后, ALT 及 AST 释放并进入血液, 使得血液中 ALT 及 AST 的活力升高, 因此 ALT、AST 被视为肝功能重要的、敏感指标; SOD 是反映机体防御氧自由基和破坏的重要金属酶, 具有保护细胞作用, 从而具有保护肝脏的作用; MDA 是一种

脂质过氧化反应次产物^[7]。本次研究发现广西凌云特产川木瓜总黄酮具有降低急性肝损伤小鼠及免疫性肝损伤小鼠的 ALT、AST、MDA 及提高 SOD 活力的作用。

本实验采用 80%乙醇提取川木瓜, 用大孔树脂分离得到总黄酮, 成分多, 如果想进一步确定川木瓜中哪一个具体成分具有保肝降酶作用, 必须分离提纯出具体各个成分并分别做其保肝降酶作用实验才能验证。这也是我们下一步将要研究的方向。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科技出版社, 2006:3.

[2] 王宏贤. 木瓜保肝降酶作用的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(4): 213—214.

[3] 吴平妹, 韦力心, 周圆圆, 等. 微波法提取广西凌云特产新鲜川木瓜总酚的优化工艺[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(24): 235—237, 240.

[4] 李静, 王成永, 张婷婷, 等. 木瓜中总黄酮成分的提取和含量测定[J]. 中医药临床杂志, 2008, 20(6): 617—619.

[5] 严睿文, 丁毅. 宣木瓜中黄酮的提取分离及含量的测定[J]. 生物学杂志, 2008, 25(3): 62—64.

[6] 宋亚玲, 封智兵, 程永现, 等. 木瓜化学成分的研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(4): 831—833.

[7] 陈壮, 肖刚, 覃洪含. 木瓜提取物对实验性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 医药导报, 2013, 32(5): 596—599.

[8] 厉有名. 药物性肝损伤的临床类型及诊断策略[J]. 中华肝脏病志, 2004, 12(7): 445.

[9] 张玥, 杨楚枫, 杨洋, 等. 豆茶决明对小鼠 CCl₄ 和乙醇急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(10): 137—140.

[10] 贾双仙, 骆红飞, 黄丽娜, 等. 四种基源郁金对小鼠肝损伤保护作用的研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(4): 963—965.

[11] 尹学哲, 金延华, 王玉娇, 等. 草苈蓉不同溶剂萃取物对对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(6): 469—472.

[12] 秦亚东, 钟正灵, 汪荣斌, 等. 白芍多糖对 D-半乳糖胺/脂多糖诱导小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(8): 854—858.

[13] 周博, 贾竞波, 李佳铭. 薄层色谱法鉴定蓝狐胆汁及其牛磺熊去氧胆酸对四氯化碳肝损伤的保护作用[J]. 武警医学, 2015, 26(8): 783—786.

[14] 王嫦鹤, 耿庆光, 王雨轩. 白术内酯 I 对免疫性肝损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1809—1812.

[15] 汪永忠, 姜辉, 张家富, 等. 三七总皂苷对免疫性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 159—162.

收稿日期: 2016—05—12; 修回日期: 2016—05—23