

甜茶颗粒剂对小鼠急性肝损伤的保护作用研究

刘英¹, 徐永莉², 冯世鑫², 闫志刚²

(1. 广西城市职业大学, 广西 崇左 530000;

2. 广西壮族自治区药用植物园, 广西 南宁 530023)

摘要:目的 探索甜茶颗粒剂对小鼠四氯化碳(CCl₄)急性肝损伤的预防和保护作用。方法 实验小鼠分为6组, 给药组小鼠按低中高剂量给药, 空白组与模型组给予等量生理盐水, 给药1周, 用0.125% CCl₄花生油溶液进行腹腔注射造模。取材, 检测小鼠血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)生化指标, 小鼠肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)生化指标, 及对小鼠肝组织进行病理切片观察。结果 甜茶颗粒剂低、中、高剂量组分别与模型组相比较, 中剂量组小鼠生化指标 ALT、AST、SOD 差异均具有统计学意义($P < 0.05$), 高剂量组小鼠生化指标 ALT、AST、SOD、MDA 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 甜茶颗粒剂对小鼠 CCl₄ 急性肝损伤具有预防保护的作用。

关键词:甜茶颗粒剂; 急性肝损伤; 保护作用

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2020)02-0155-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.02.005

Study on the protective effect of Sweet Tea Granules on acute liver injury in mice

Liu Ying¹, Xu Yongli², Feng Shixin², Yan Zhigang²

(1. Guangxi City Vocational University, Chongzuo 532100, Guangxi, China;

2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Medicinal Botanical Garden, Nanning 530023, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the preventive and protective effect of Sweet Tea Granules on acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in mice. **Methods** The experimental mice were divided into 6 groups. The mice in the drug administration groups were respectively given a low-, medium- and high-dose of the drug, and the mice in the blank group and the model group were given the same amount of normal saline for one week, then the models were made by intraperitoneal injection with 0.125% CCl₄ peanut oil solution. Experimental samples were collected for determining biochemical indexes of the serum alanine aminotransferase (ALT) and glutamic oxalacetic transaminase (AST), and of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in mouse liver tissues, and the pathological section of liver tissues of mice were observed. **Results** The low-, medium- and high-dose groups of Sweet Tea Granules were compared with the model group, and the differences in biochemical indexes of ALT, AST and SOD between the medium-dose group and the model group were statistically significant ($P < 0.05$), the differences in biochemical indexes of ALT, AST, SOD and MDA between the high-dose group and the model group were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion**

Sweet Tea Granules have a preventive and protective effect on acute liver injury induced by CCl₄ in mice.

Key words: Sweet Tea Granules; acute liver injury; protective effect

甜茶是一种在中国西南地区广泛种植蔷薇科灌木, 其具有天然的甜味, 故其叶子通常用作凉茶。随着人们生活水平的提高, 因高脂、高糖饮食而引发的慢性

疾病在人群中的比例也随之上升。甜茶作为一种传统民间茶饮植物, 由于其在降低三高、抗氧化、抗血管生成、增强免疫力和抗过敏等方面的药理作用而备受专

基金项目: 广西重点研发计划项目(桂科 AB16380346)

第一作者简介: 刘英(1992-), 女, 硕士, 研究方向: 天然药物化学, E-mail: 13100503601@163.com

通讯作者简介: 闫志刚(1978-), 男, 硕士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药资源学, E-mail: lzg7898@163.com

家学者的广泛关注。

目前甜茶的研究内容主要分布在药理毒理、化学成分、生物学、组织培养、栽培繁殖技术以及应用研究等方面,其中甜茶的应用研究与药理毒理研究比较广泛,集中体现在甜茶的降血糖、降血脂、抗氧化和抗过敏作用的研究,但对甜茶保肝、护肝方面的作用研究较少。甜茶保肝护肝药理作用研究较多,但未见有甜茶颗粒剂对肝损伤保护方面的研究报道。本研究以自制甜茶颗粒剂为原料,探究其对四氯化碳(Carbon tetrachloride, CCl_4)诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 广西医科大学实验动物中心提供的SPF级别雄性昆明小鼠,体重(18.00 ± 2.00)g,实验动物生产许可证为:SCXK桂2014-0002,实验动物中心单位使用许可证号为:SYXK桂2014-0003。

1.2 实验耗材 甜茶颗粒剂(自制); CCl_4 ,AR(成都市科龙化工试剂厂);联苯双酯滴丸(广西星群药业股份有限公司);甲醛,AR(成都市科龙化工试剂厂);无水乙醇,AR(成都市科龙化工试剂厂);BCA法蛋白定量试剂盒,批号:20190215(南京建成生物工程研究所);丙二醛(MDA)试剂盒,批号:20190124(南京建成生物工程研究所);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,批号:20190128(南京建成生物工程研究所);TGL-16G-A高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);TDL-5台式低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂);全自动血生化仪,型号:7100(株式会社日立制作所)。

1.3 甜茶颗粒剂急性毒性试验 量取5ml蒸馏水放入烧杯中,最大限度地溶解甜茶颗粒剂,能够溶解12g甜茶颗粒剂,溶解后的颗粒剂为粘稠状,灌胃针能够抽吸出来。清洁级雄性昆明种小鼠30只,随机分为3组:空白组、24克颗粒剂/千克、48克颗粒剂/千克。以最大口服剂量(0.2ml/10g)灌胃小鼠,观察两个给药组与空白组小鼠的情况,实验过程中,两个给药组的小鼠与正常组小鼠相比较,给药组小鼠灌胃给药5min后的活动较为缓慢,12h后活动能力恢复正常,呼吸正常,大小便正常,正常饲养两周未见小鼠死亡,表明小鼠最大耐受量大于48克颗粒剂/千克。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠分组及急性肝损伤模型制备 SPF级别雄性昆明种小鼠60只,体重(18.00 ± 2.00)g,自然通风的环境下,让小鼠自由饮水及普通饮食^[1-4],适应性饲养3d,随机分为6组,每组10只:空白对照(生理盐水)组、 CCl_4 模型组、联苯双酯阳性药(150mg/kg)组、甜茶颗粒剂低剂量(3.375克生药/千克)组、甜茶颗粒剂中剂量(6.75克生药/千克)组、甜茶颗粒剂高剂量(13.50克生药/千克)组。每组小鼠用苦味酸做好相

应的编号标记,称量小鼠体重并做好相关实验记录。空白对照组和 CCl_4 组分别按照0.1ml/10g生理盐水灌胃,药物组分别按照0.1ml/10g药物灌胃,每天1次,连续给药7d。最后一次给药后1h,开始对小鼠进行造模,空白对照组注射等量的生理盐水,模型组和其他各剂量组按照给药容量0.1ml/10g腹腔注射0.125% CCl_4 花生油溶液。造模完成后,对小鼠禁食不禁水,22h后,摘取小鼠眼球进行取血并取其肝脏、脾、胸腺进行称量,分装,试验测定^[5-9]。

1.4.2 样本采集 用镊子快速摘取小鼠眼球,取血装于1.5mlEP管中,取完血后,离心机4℃离心10min,转速为3000r/min,使血清分离。用移液枪量取出上层血清,装入EP管中并放入-80℃冰箱中保存备用。快速解剖取血后的小鼠,取其肝脏、脾脏和胸腺等器官,用生理盐水清洗并用滤纸吸干表面水分和残血,称量记录其重量。在肝右叶相同部位取黄豆大小组织,放入10%甲醛溶液中固定,保存待用于组织病理观察试验。

1.4.3 脏器指数 取材之前称量记录各组小鼠的体重及取材后相应的肝、脾和胸腺的重量,所得相应的脏器重量在小鼠体重的占比即为脏器指数,各脏器指数按照以下公式计算:

$$\text{小鼠肝脏指数}(\%) = [\text{肝重}(\text{g}) / \text{体重}(\text{g})] \times 100\%$$

$$\text{小鼠脾脏指数}(\%) = \text{脾重}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g}) \times 100\%$$

$$\text{小鼠胸腺指数}(\%) = \text{胸腺质量}(\text{mg}) / \text{体质量}(\text{g}) \times 100\%$$

1.4.4 检验小鼠血清AST和ALT活性 小鼠眼球采血分离取血清后,上层血清放入-80℃冰箱保存待测。利用广西医科大学全自动血生化仪对小鼠血清中的AST与ALT活性进行检测。

1.4.5 检验小鼠肝组织中SOD和MDA活性 准备待测备用的肝脏组织,匀浆,离心,按照SOD试剂盒和MDA试剂盒说明书操作规程步骤来检验SOD活性和MDA活性,其中肝脏中的蛋白含量浓度用BCA法检验。

1.4.6 HE染色检验小鼠肝脏病理变化 在肝脏相同部位取黄豆大小组织块,置于10%甲醛溶液固定24h,脱水,浸蜡包埋,切片烤片,HE染色观察肝组织受损情况。

1.5 统计学方法 实验数据用SPSS 21统计软件进行分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,组与组之间采用单因素分析方法分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 甜茶颗粒剂对小鼠 CCl_4 诱导的急性肝损伤脏器

指数的影响 药物 CCl_4 导致小鼠急性肝损伤后,小鼠肝组织肿胀,表面不平滑,具有白色小颗粒。从脏器指数实验结果来看, CCl_4 模型组小鼠肝脏指数、脾脏指数和胸腺指数都高于正常组的脏器指数,其中肝脏指数差异具有统计学意义($P < 0.01$),脾和胸腺指数差

异无统计学意义($P > 0.05$)。联苯双酯阳性组、甜茶颗粒低剂量组和甜茶颗粒中剂量组的肝脏系数差异有统计学意义($P < 0.05$),而甜茶颗粒高剂量组差异有统计学意义($P < 0.01$)。试验结果见表1。

表1 甜茶颗粒剂对 CCl_4 诱导的小鼠急性肝损伤脏器指数影响

组别	n	肝脏指数/%	脾脏指数/%	胸腺指数/%
正常空白组	10	4.07±0.14	3.57±0.32	2.77±0.43
CCl_4 模型组	10	5.37±0.40 ^a	4.56±1.29 ^b	3.81±1.43
联苯双酯阳性药组(150 mg/kg)	10	4.89±0.40 ^c	4.01±0.92	3.68±1.44
甜茶颗粒低剂量组(3.375克生药/千克)	10	4.83±0.56 ^c	4.13±0.86	3.23±0.74
甜茶颗粒中剂量组(6.75克生药/千克)	10	4.95±0.55 ^c	4.37±1.50	3.63±1.22
甜茶颗粒高剂量组(13.50克生药/千克)	10	4.67±0.37 ^d	3.70±0.95	2.96±0.81

注:①与正常空白组比较,a: $P < 0.01$,b: $P < 0.05$;与 CCl_4 模型组比较,c: $P < 0.05$,d: $P < 0.01$;②表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示

2.2 甜茶颗粒剂对 CCl_4 急性肝损伤小鼠 ALT、AST 活力的影响 模型组小鼠的肝功能生化指标 ALT 与 AST 活力远超过正常空白组小鼠活力,其差异具有统计学意义($P < 0.01$)。联苯双酯阳性药组与模型组相比较,其中 ALT 活性的 $P < 0.05$,AST 活性比较 $P < 0.01$,其差异具统计学意义。甜茶颗粒剂低、中、高剂量组分别与模型组相比较,甜茶颗粒低剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$),中剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$),而高剂量组差异有统计学意义($P < 0.01$)。实验结果见表2。

统计学意义($P < 0.01$)。从小鼠肝组织 MDA 活性比较,模型组小鼠肝组织 MDA 活性较高,甜茶颗粒剂高剂量组较模型组 MDA 活性低($P < 0.05$),差异有统计学意义。各组小鼠 SOD 与 MDA 活性结果见表3。

表3 甜茶颗粒剂对 CCl_4 急性肝损伤小鼠 SOD、MDA 活性的影响

组别	n	MDA/ (nmol·mgprot ⁻¹)	SOD/ (U·mgprot ⁻¹)
正常空白组	10	1.25±0.48	50.82±8.55
CCl_4 模型组	10	1.64±0.58	25.42±17.73 ^a
联苯双酯阳性药组(150 mg/kg)	10	0.95±0.37 ^a	45.99±16.07 ^b
甜茶颗粒			
低剂量组(3.375克生药/千克)	10	1.30±0.53	39.87±14.32
中剂量组(6.75克生药/千克)	10	1.31±0.58	52.96±24.36 ^a
高剂量组(13.50克生药/千克)	10	1.01±0.38 ^b	55.11±22.61 ^a

注:①与正常空白组比较,a: $P < 0.05$;与 CCl_4 模型组比较,b: $P < 0.05$;②表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示

表2 甜茶颗粒剂对 CCl_4 急性肝损伤小鼠 ALT、AST 活力的影响 单位:U·L⁻¹

组别	n	ALT	AST
正常空白组	10	48.00±5.48	137.75±14.49
CCl_4 模型组	10	1742.25±429.10 ^a	686.00±439.35 ^a
联苯双酯阳性药组(150 mg/kg)	10	1362.75±363.47 ^b	322.00±237.20 ^c
甜茶颗粒			
低剂量组(3.375克生药/千克)	10	1452.75±403.83	511.13±266.01
中剂量组(6.75克生药/千克)	10	1278.50±581.42 ^b	334.50±206.11 ^b
高剂量组(13.50克生药/千克)	10	1066.13±337.57 ^c	260.50±98.94 ^c

注:①与正常空白组比较,a: $P < 0.01$;与 CCl_4 模型组比较,b: $P < 0.05$,c: $P < 0.01$;②表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示

2.3 甜茶颗粒剂对 CCl_4 急性肝损伤小鼠 SOD、MDA 活性的影响 小鼠肝组织受损伤后,其 SOD 活性有所下降,模型组小鼠肝组织 SOD 活性较正常组小鼠肝组织低,其差异具有统计学意义($P < 0.05$)。联苯双酯阳性药组与模型组的 SOD 活性比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),甜茶颗粒中剂量组与甜茶颗粒高剂量组分别与 CCl_4 模型组比较 SOD 活性,差异均具有

2.4 HE 染色病理切片结果 正常空白组小鼠的肝组织中肝细胞排列沿中央静脉呈现出放射索状,整个肝小叶结构较清晰完整; CCl_4 模型组小鼠的肝组织中肝细胞排列较紊乱,肝小叶结构较为模糊,具有充血及炎性细胞浸润症状,肝损伤症状较为明显;联苯双酯阳性药组相比模型组的肝细胞结构较为清晰整齐,只有微量炎症性细胞浸润;甜茶颗粒剂低剂量组、甜茶颗粒剂中剂量组、甜茶颗粒剂高剂量组的小鼠肝细胞结构与模型组相比,肝小叶结构逐渐清晰完整,炎症性细胞浸润症状不明显,损伤程度逐渐减轻,病理组织切片见图1。

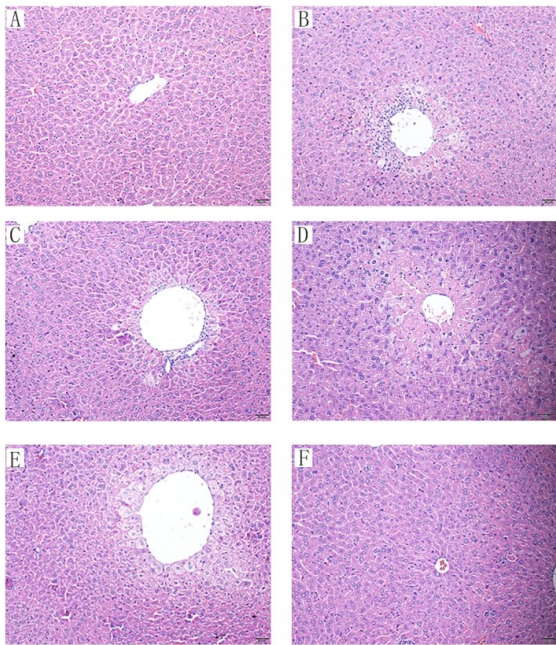


图1 各组小鼠 HE 染色切片镜下表现(400倍)

注:图 A. 正常空白组;图 B. CCl_4 模型组;图 C. 联苯双酯阳性药组;图 D. 甜茶颗粒剂低剂量组(3.375克生药/千克);图 E. 甜茶颗粒剂中剂量组(6.75克生药/千克);图 F. 甜茶颗粒剂高剂量组(13.50克生药/千克)

3 讨论

肝脏是人体系统中的重要五脏器官之一,是人体健康成分中不可缺少的部分。肝炎的机制和原因主要涉及到的环节为自由基损伤、病毒制作以及炎症性介质因子的释放等^[10]。肝损伤类型主要有酒精性、化学性、药物性和免疫性损伤,临床表现主要有肝损伤坏死、变性、肝纤维化、肝组织硬化、肝脏癌症等。

本实验通过建立化学试剂 CCl_4 诱导小鼠化学性急性肝损伤模型,目前保肝护肝药物药理作用及机制研究普遍用此法造模。小鼠 CCl_4 造模实验方法较为成熟,造模成功率较高,具有较高的可行性和可操作性。 CCl_4 造模机制是化合物进入体内从而氧化肝微粒体细胞色素 P450 后,生成三氯甲烷自由基和氯自由基,使肝微粒体的脂质过氧化,致使自由基增加,SOD 活性降低和 MDA 升高,进而破坏细胞膜结构,导致细胞肿胀、坏死,肝细胞内 ALT 和 AST 逸出,进入血液,含量升高^[11-12]。实验过程中给药 7 d 后造模,造模后检测各给药组与空白组、阳性药组生化指标及病理切片,通过统计学软件分析各给药组与空白组、阳性药组之间的意义,探究甜茶颗粒剂对小鼠肝脏的预防保护作用。

造模后小鼠的生化指标 ALT 活性大于正常组的两倍,表明小鼠急性肝损伤^[13-15]造模成功。以此模型探讨自制的甜茶颗粒剂对小鼠的保肝护肝的作用效果,通过对实验小鼠的生化指标与病理组织学测定,甜

茶颗粒剂低、中、高剂量组均能降低小鼠生化指标 ALT 和 AST 的活性,其中剂量组(6.75克生药/千克)、高剂量组(13.50克生药/千克)与模型组比较差异有统计学意义,甜茶中剂量组与甜茶颗粒剂高剂量组的小鼠病理组织形态中肝细胞和肝小叶具有较为完整清晰的结构,表明甜茶颗粒剂中剂量组与甜茶颗粒剂高剂量组保肝护肝的药理作用显著。

本实验结果表明甜茶颗粒剂对小鼠的急性肝损伤具有保护作用,至于其如何发挥保肝护肝作用尚未明确,其作用机制有待下一步深入研究。

参考文献:

- [1] Reckanagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, et al. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity[J]. *Pharmacy Ther*, 1989, 43(1):139-154.
- [2] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京:北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1998:1397.
- [3] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991:459.
- [4] 农志欢, 杨有彬, 陈春霞, 等. 杨桃果提取物对 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *广西医科大学学报*, 2015, 32(2):179-182.
- [5] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学(第三版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:1346.
- [6] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学(第四版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2010:1346.
- [7] 谢秋巧, 黄湘, 李菊满, 等. 龙胆木水提取物对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用研究[J]. *广西医科大学学报*, 2017, 34(2):181-184.
- [8] 张均田, 杜冠华. 现代药理实验方法[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2012:1397.
- [9] Wang FS. Clinical immune characterization of hepatitis B virus infection and implications for immune intervention: Progress and challenges[J]. *Hepatology Research*, 2007, 37(3):339-346.
- [10] 王越, 沈连忠, 李波. 临床前研究中肝损伤的临床病理指标的选择及意义[J]. *中国药事*, 2009, 23(8):813-816, 825.
- [11] 韦贤彬, 潘乔丹, 黄元河, 等. 壮药扁担藤醇提取物对 CCl_4 所致小鼠肝损伤的保护作用[J]. *右江民族医学院学报*, 2016, 38(1):17-19.
- [12] 董妹灵, 潘乔丹, 阮艳娥, 等. 古钩藤提取液对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *右江民族医学院学报*, 2014, 36(3):358-360.
- [13] 黄士兰, 葛文漪, 禚霏霏, 等. 相思藤水提取物对小鼠化学性及酒精性肝损伤保护作用的研究[J]. *广西医科大学学报*, 2016, 33(3):401-404.
- [14] 中华医学会消化病学分会肝胆疾病协作组. 急性药物性肝损伤诊治建议(草案)[J]. *中华消化杂志*, 2007, 27(11):765-767.
- [15] Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, et al. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury[J]. *The American Journal of Gastroenterology*, 2014, 109(7):950-966.

收稿日期:2019-10-21;修回日期:2019-11-25