

文章编号: 1005-8982(2015)36-0012-04

· 论著 ·

## 水药酢浆草对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护性研究

陈应康<sup>1</sup>, 罗国忠<sup>2</sup>, 田培燕<sup>3</sup>, 叶劲松<sup>1</sup>, 杨小军<sup>1</sup>

(1. 黔南民族医学高等专科学校 病理教研室, 贵州 都匀 558000; 2. 贵州省黔南州中医院 病理科, 贵州 都匀 558000; 3. 黔南民族医学高等专科学校 生理教研室, 贵州 都匀 558000)

**摘要:**目的 探讨水药酢浆草对四氯化碳 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝损伤的保护作用。方法 将 40 只小鼠随机分为 5 组, 正常组、CCl<sub>4</sub> 模型组、酢浆草低、中、高剂量组, 每组 8 只。正常组和 CCl<sub>4</sub> 模型组给予生理氯化钠溶液, 酢浆草低、中、高剂量组分别给 100、300 及 600 mg/kg 酢浆草灌胃, 连续 5 d。于末次给药 2 h 后, 除正常组外, 其余各组小鼠给予 0.3% CCl<sub>4</sub> 花生油溶液稀释, 按 0.02 ml/g 的剂量皮下注射, 在中毒后 16 h 取血和肝脏组织, 分别检测各组小鼠肝功能相关的生化指标。结果 与 CCl<sub>4</sub> 模型组小鼠比较, 不同剂量酢浆草治疗组小鼠肝脏指数、血清 ALT、AST 及 TNF- $\alpha$  水平不同程度降低 ( $P < 0.05$ ); 肝组织中 CAT、GSH 及 SOD 水平不同程度升高 ( $P < 0.05$ ), MDA 水平不同程度降低 ( $P < 0.05$ )。结论 水药酢浆草对 CCl<sub>4</sub> 所致小鼠肝损伤具有明显的保护作用, 其机制可能与酢浆草降低氧化酶活性和抗脂质过氧化作用有关。

**关键词:** 酢浆草; 四氯化碳; 肝损伤

中图分类号: R-332

文献标识码: A

## Protective effect of Shui ethnic medicine oxalis corniculata on liver injured by carbon tetrachloride in mice

Ying-kang CHEN<sup>1</sup>, Guo-zhong LUO<sup>2</sup>, Pei-yan TIAN<sup>3</sup>, Jin-song YE<sup>1</sup>, Xiao-jun YANG<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, South Guizhou Medical College, Tuyun, Guizhou 558000, P.R. China; 2. Department of Pathology, Qiannan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tuyun, Guizhou 558000, P.R. China; 3. Department of Physiology, South Guizhou Medical College, Tuyun, Guizhou 558000, P.R. China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the liver protective effect of Shui ethnic medicine oxalis corniculata on hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in mice. [Methods] Forty mice were randomly divided into normal group, CCl<sub>4</sub> model group, low-dose oxalis corniculata group, medium-dose oxalis corniculata group and high-dose oxalis corniculata group with 8 in each group. Normal group and CCl<sub>4</sub> model group were given normal saline; low-, medium- and high-dose oxalis corniculata groups were orally given 100, 300 and 600 mg/kg oxalis corniculata respectively for 5 consecutive days. Except the normal group, other groups were given 0.3% CCl<sub>4</sub> (diluted with peanut oil solution) subcutaneously at a 0.02 ml/g dose 2 h after the last administration. Blood and liver tissue were collected 16 h later to detect biochemical indicators related to liver function. [Results] Compared with the CCl<sub>4</sub> model group, serum ALT, AST and TNF- $\alpha$  levels in the oxalis corniculata groups decreased ( $P < 0.05$ ); the levels of CAT, GSH and SOD significantly increased and the content of MDA remarkably reduced to different extent in liver homogenate of the oxalis corniculata groups ( $P < 0.05$ ). [Conclusions] Shui ethnic medicine oxalis corniculata has a good liver protective effect on the hepatic injury induced by CCl<sub>4</sub> in mice, and the mechanism is probably related with the decrease of liver anti-oxidative enzyme activities and the anti-lipid-peroxidation effect.

**Key words:** oxalis corniculata; carbon tetrachloride; liver injury

水族是源于古代“百越”族系,其通过长期与恶劣的自然环境和疾病的斗争中积累疾病防治的丰富经验,水族医药是结合中医及贵州苗族、布依族等多种少数民族医药特点所形成,具有云贵高原药物学特点和民族特色的医药体系。酢浆草是酢浆草科植物酢浆草的全草,其性凉味酸,具有清热解毒、抗炎利尿、清肺化痰的功效,且致死剂量较高,毒性较小。研究报道酢浆草有一定的肝脏保护作用,其活性成分提取物能有效地降低肝损伤小鼠血液红细胞中一氧化氮的含量以达到抗氧化的作用。四氯化碳(carbon tetrachloride,  $\text{CCl}_4$ )是经典的急性肝损伤造模化学物质,其在肝脏经细胞色素 P450 激活后,产生大量自由基及造成脂质过氧化,对肝脏产生损害作用。为探讨酢浆草对肝脏的保护作用,本研究采用  $\text{CCl}_4$  建立小鼠急性肝损伤模型,探讨不同剂量酢浆草对  $\text{CCl}_4$  所致急性肝损伤的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

40 只 SPF 级 6~8 周龄雌性昆明小鼠,平均体重为  $(20.4 \pm 2.7)\text{g}$ , 采购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2007-0001。在  $26^\circ\text{C}$  室温,70%湿度及 12 h 交替照明的标准动物实验室条件下饲养。

### 1.2 实验药物与仪器

将酢浆草干燥全草使用粉碎机中度粉碎,称取 100 g,加入蒸馏水 1 000 ml,经浸泡 30 min、加热、过滤、 $50^\circ\text{C}$  水浴挥干、真空干燥等步骤,得到酢浆草水提取物 18.0 g, 储存于  $4^\circ\text{C}$  冰箱中备用。四氯化碳  $\text{CCl}_4$  (购自北京化工厂,生产批号:20131029)。丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,丙二醛(MDA)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒,超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )放射免疫试剂盒购自上海博宏生物科技有限公司。主要仪器:全自动生化分析仪(日立 7070 型,日本),酶标仪(Bio-Rad,美国),离心机(LDZ-52 型,北京离心机厂)。

### 1.3 实验方法

将 40 只小鼠饲养至 10 周时,平均分成 5 组:正常组、 $\text{CCl}_4$  模型组、低剂量酢浆草组、中剂量酢浆草组及高剂量酢浆草组,每组 8 只。酢浆草低、中、高剂

量组均按 100 mg/kg、300 mg/kg 及 600 mg/kg 灌胃给药,1 次/d,连续 5 d;正常组和  $\text{CCl}_4$  模型组灌胃给予等体积的生理盐水,1 次/d,连续 5 d。末次给药后 2 h,除正常组外,其余各组小鼠给予 0.3%  $\text{CCl}_4$  (花生油溶液稀释)、按 0.02 ml/g 的剂量皮下注射。禁食不禁水,16 h 后称体重,乙醚麻醉后,摘眼球采血;然后处死小鼠,迅速取出肝脏备检。

### 1.4 标本收集及检测

待采取的血液充分凝固,在  $4^\circ\text{C}$  下,3 000 r/min,离心 10 min 分离血清,用于检测 ALT、AST。各组小鼠的肝脏组织采用  $4^\circ\text{C}$  生理盐水清洗干净,滤纸吸干水分,称取肝脏质量并计算肝脏指数(即肝脏重量占体重的百分比)。取小鼠肝脏最大的肝叶称取重量,加入 9 倍  $4^\circ\text{C}$  生理盐水,用玻璃匀浆器在冰水浴中匀浆 10 min,然后于  $4^\circ\text{C}$  下,3 000 r/min,离心 15 min,取上清液测定肝组织匀浆中 CAT、GSH、SOD 及 MDA 的含量,具体操作步骤根据试剂盒说明书进行。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计数资料用率(%)表示。多组间正态分布的计数资料比较用单因素方差分析(ANOVA),采用 LSD 进行组间均数的两两比较, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 酢浆草对 $\text{CCl}_4$ 致肝损伤的肝脏质量和肝脏指数的影响

根据体重及肝脏重量结果显示,各组小鼠平均体重比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。 $\text{CCl}_4$  模型组小鼠肝脏重量较其他各组显著增加( $P < 0.05$ )。与  $\text{CCl}_4$  模型组比较,不同剂量酢浆草组小鼠肝脏指数均显著降低( $P < 0.05$ ),随着剂量的增大肝脏指数逐渐下降,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 酢浆草对 $\text{CCl}_4$ 致肝损伤小鼠血清 ALT、AST 及 TNF- $\alpha$ 水平的影响

$\text{CCl}_4$  模型组小鼠较正常组小鼠血清 ALT、AST 及 TNF- $\alpha$  水平显著升高( $P < 0.05$ )。与  $\text{CCl}_4$  模型组比较,不同剂量酢浆草组小鼠血清 ALT、AST 及 TNF- $\alpha$  水平均显著降低( $P < 0.05$ ),且高剂量酢浆草组小鼠血清 ALT、AST 及 TNF- $\alpha$  水平升高程度高于低剂量组,见表 2。

表 1 酢浆草对 CCl<sub>4</sub> 致肝损伤的肝脏质量和肝脏指数的影响 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	体重 /g	肝脏质量 /g	肝脏指数 /%
正常组	23.9 ± 2.8	1.24 ± 0.28 <sup>†</sup>	5.45 ± 0.32 <sup>†</sup>
CCl <sub>4</sub> 模型组	23.2 ± 3.1	1.63 ± 0.31	6.92 ± 0.51
低剂量酢浆草组	23.4 ± 2.7	1.34 ± 0.41 <sup>†</sup>	5.94 ± 0.53 <sup>†</sup>
中剂量酢浆草组	23.8 ± 2.9	1.28 ± 0.29 <sup>†</sup>	5.78 ± 0.55 <sup>†</sup>
高剂量酢浆草组	22.9 ± 2.5	1.26 ± 0.30 <sup>†</sup>	5.61 ± 0.49 <sup>†</sup>

注:† 与 CCl<sub>4</sub> 模型组比较,  $P < 0.05$

### 2.3 酢浆草对 CCl<sub>4</sub> 致肝损伤小鼠肝组织 CAT、GSH、SOD 及 MDA 的影响

与正常组比较, CCl<sub>4</sub> 模型组小鼠肝组织中 CAT、GSH、SOD 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), MDA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。与 CCl<sub>4</sub> 模型组比较, 不同

表 3 酢浆草对 CCl<sub>4</sub> 至肝损伤小鼠肝组织 CAT、GSH、SOD 及 MDA 的影响 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	CAT/(u/mg)	GSH/(u/mg)	SOD/(u/mg)	MDA/(nmol/g)
正常组	35.4 ± 6.1 <sup>1)</sup>	285.6 ± 49.6 <sup>1)</sup>	234.6 ± 17.9 <sup>1)</sup>	0.82 ± 0.19 <sup>1)</sup>
CCl <sub>4</sub> 模型组	18.5 ± 4.9	187.3 ± 40.7	157.3 ± 16.1	2.43 ± 0.54
低剂量酢浆草组	23.5 ± 5.1 <sup>1)</sup>	223.1 ± 38.3 <sup>1)</sup>	181.5 ± 14.6 <sup>1)</sup>	1.68 ± 0.35 <sup>1)</sup>
中剂量酢浆草组	27.4 ± 5.3 <sup>1)</sup>	241.9 ± 43.1 <sup>1)</sup>	188.7 ± 18.5 <sup>1)</sup>	1.41 ± 0.28 <sup>1)</sup>
高剂量酢浆草组	32.7 ± 5.7 <sup>1)2)</sup>	264.2 ± 37.4 <sup>1)2)</sup>	198.4 ± 21.3 <sup>1)2)</sup>	1.13 ± 0.32 <sup>1)2)</sup>

注:1)与 CCl<sub>4</sub> 模型组比较,  $P < 0.05$ ; 2)与低剂量酢浆草组比较,  $P < 0.05$

## 3 讨论

将化学物质、药物、生物学制剂等注入实验动物体内诱导肝损伤是建立动物肝损伤模型的常用方法。其中 CCl<sub>4</sub> 诱导的急性肝损伤模型是目前对保肝药物的作用及机制研究时最常用的病理模型, CCl<sub>4</sub> 诱导急性肝损伤的机制主要与自由基及活性氧化产物的大量生成, 过量的自由基可迅速攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸, 引发膜脂质过氧化, 破坏细胞膜的结构和功能, 其次自由基干扰细胞蛋白和核酸的合成, 引起细胞中毒死亡。本研究采用单次皮下注射 CCl<sub>4</sub> 建立肝损伤模型, 观察酢浆草对肝损伤的保护作用。

目前随着对中国传统医学深入研究, 中医药逐渐应用于急救医学的临床实践中。酢浆草是贵州省水族族习用药材, 具有清热解毒、抗炎利尿等作用, 常用于治疗急性肝炎及急性黄疸, 其对酒精肝大鼠模型有一定的治疗作用, 但其机制尚不清楚。研究报道酢浆草在 35 ~ 1 120 mg/kg 的剂量范围内各组小

鼠肝组织 CAT、GSH 和 SOD 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), MDA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 并呈一定的剂量依赖性, 见表 3。

表 2 酢浆草对 CCl<sub>4</sub> 致肝损伤小鼠血清 ALT、AST 及 TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	ALT/(u/L)	AST/(u/L)	TNF- $\alpha$ /(pg/ml)
正常组	38.5 ± 18.9 <sup>1)</sup>	139.1 ± 46.3 <sup>1)</sup>	98.7 ± 11.9 <sup>1)</sup>
CCl <sub>4</sub> 模型组	309.6 ± 98.2	452.5 ± 102.4	213.4 ± 32.1
低剂量酢浆草组	168.2 ± 49.2 <sup>1)</sup>	289.0 ± 59.3 <sup>1)</sup>	183.5 ± 22.9 <sup>1)</sup>
中剂量酢浆草组	126.7 ± 44.1 <sup>1)2)</sup>	247.3 ± 53.8 <sup>1)</sup>	168.4 ± 24.3 <sup>1)</sup>
高剂量酢浆草组	102.3 ± 34.2 <sup>1)2)</sup>	189.2 ± 48.4 <sup>1)2)</sup>	128.6 ± 19.2 <sup>1)2)</sup>

注:1)与 CCl<sub>4</sub> 模型组比较,  $P < 0.05$ ; 2)与低剂量酢浆草组比较,  $P < 0.05$

鼠活动正常, 其最大致死剂量大于 1 120 mg/kg。本研究将不同剂量的酢浆草应用于小鼠肝损伤模型, 比较其治疗效果。ALT 和 AST 是有肝细胞膜受损时, 释放入血, 其水平含量是反映肝损伤的敏感且最常用的指标。TNF- $\alpha$  是重要的炎症因子, CCl<sub>4</sub> 诱导的肝损伤发病过程中起重要作用。本研究结果显示, 与 CCl<sub>4</sub> 模型组比较, 正常组小鼠血清肝脏指数、ALT、AST 及 TNF- $\alpha$  水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。表明模型建立成功。不同酢浆草剂量组小鼠肝脏指数、血清 ALT、AST 及 TNF- $\alpha$  水平均有不同程度的降低 ( $P < 0.05$ ), 提示酢浆草对 CCl<sub>4</sub> 引起的肝损伤具有明显的保护作用, 高剂量组的保护效果优于低剂量组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

CAT 和 GSH 的主要作用是催化过氧化氢分解, SOD 是体内重要的自由基清除剂, 这 3 者是体内主要的抗氧化酶, 可激活或调动内源性抗氧化系统, 其表达水平对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用, 可反映机体清除自由基和抗氧化的能力。

MDA 是脂质过氧化的产物,可进一步与生物大分子结合形成加醛复合物,破坏细胞膜的结构和功能,其表达水平可间接反映机体组织或细胞受自由基攻击和损伤的严重程度。本研究中,与正常组比较,CCl<sub>4</sub>模型组小鼠肝脏组织中 CAT、GSH、SOD 水平显著降低( $P<0.05$ ),MDA 表达水平显著升高( $P<0.05$ )。表明 CCl<sub>4</sub> 诱导肝损伤的机制与机体抗氧化酶活性降低和脂质过氧化作用等有关,这与本研究结果一致。与 CCl<sub>4</sub> 模型组比较,不同酢浆草剂量组小鼠肝脏组织 CAT、GSH 和 SOD 水平显著升高( $P<0.05$ ) MDA 表达水平显著降低( $P<0.05$ ),并呈一定的剂量依赖性。表明酢浆草可降低肝脏 CAT、GSH 和 SOD 等抗氧化酶的表达水平,提高机体抗氧化和清除氧自由基的能力,从而抑制脂质过氧化链式反应的启动,减少 MDA 在体内的积累,达到减轻 CCl<sub>4</sub> 对小鼠肝脏造成的损伤。

综上所述,酢浆草能够减轻 CCl<sub>4</sub> 所致的小鼠肝损伤,降低血清 ALT、AST 及 TNF- $\alpha$  水平,降低肝损伤小鼠肝脏组织中 CAT、GSH 和 SOD 的表达水平,抑制脂质过氧化产物 MDA 的产生。因此,本研究认为酢浆草对 CCl<sub>4</sub> 所致的性肝损伤具有一定的保护作用,其作用机制与其能够提高机体清除自由基能力和增强抗脂质过氧化作用有关。但本研究仅为前期的观察实验,在未来的研究中可结合体外实验对酢浆草肝脏保护作用的具体机制进行进一步研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] 崔珺,刘星星,李月婷,等. 贵州苗族药酢浆草不同溶剂提取物的药效比较及 HPLC 测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2): 53-56.
- [2] SREEJITH G, JAYASREE M, LATHA PG, et al. Hepatoprotective activity of oxalis corniculata L. ethanolic extract against paracetamol induced hepatotoxicity in wistar rats and its in vitro antioxidant effects[J]. Indian J Exp Biol, 2014, 52(2): 147-152.
- [3] 丁良,王含玉. 酢浆草对 a- 萘异硫氰酸酯所致大鼠肝损伤的干预作用[J]. 临床医药文献电子杂志, 2014, 1(9): 1495-1496.
- [4] LI L, LI W, KIM YH, et al. Chlorella vulgaris extract ameliorates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice[J]. Exp Toxicol Pathol, 2013, 65(1-2): 73-80.
- [5] 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.
- [6] 周莹,王文,吕飒,等. 急性肝衰竭小鼠 Occludin 表达与血脑屏障通透性的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(8): 31-35.
- [7] 王育红,宋明,李时,等. 丹酚酸 B 对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(2): 24-28.
- [8] SCHOLTEN D, TREBICKA J, LIEDTKE C, et al. The carbon tetrachloride model in mice[J]. Lab Anim, 2015, 49(1 Suppl): 4-11.
- [9] CHEN X, MENG Q, WANG C, et al. Protective effects of calycosin against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury with activation of FXR and STAT3 in mice[J]. Pharm Res, 2015, 32(2): 538-548.
- [10] 吴国清,曹岗,夏云华,等. 酒制山茶茺水煎液对四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 10: 2391-2392
- [11] 朱安妮,李蕊,刘三海,等. 四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤模型的建立和优化[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2014, 1: 27-31.
- [12] 丁良,张丽娜,党志勇,等. 酢浆草总提取物对大鼠酒精性肝病疗效的实验观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 5: 257-260.
- [13] 刘小转,李三强,任江涛,等. HSP70I、L-6 和 TNF- $\alpha$  在 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性肝损伤组织中的表达及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(35): 17-19.
- [14] 王传鹏,杨超,赵骏,等. 芹菜素对雌性小鼠肝脏 SOD、GSH-Px、CAT 活力影响[J]. 中国实用医药, 2013, 8(6): 21-22.
- [15] DOMIJAN AM, RALIC J, RADIC BS, et al. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL-application to various biological samples[J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29(1): 41-46.
- [16] 徐雪钰,刘军,于珊,等. 灵五颗粒对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 解放军药学报, 2012, 28(3): 225-228.

(张蕾 编辑)