

野菊花中萜类和黄酮类化合物保肝作用研究

李国栋², 陈园园¹, 王盼¹, 关若飞¹, 叶玉廷¹, 赵静¹, 阿有梅¹, 毕跃峰^{1*}

1. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450001

2. 郑州大学生命科学学院, 河南 郑州 450001

摘要: **目的** 研究野菊花中萜类和黄酮类化合物对刀豆蛋白 A (Con A) 诱导的小鼠免疫性肝损伤的保护作用。**方法** 将小鼠随机分成对照组, 模型组, 野菊花各提取部位 (CIF-A, 主要含萜类化合物; CIF-B, 主要含萜类和黄酮类化合物; CIF-C, 主要含黄酮类化合物) 高、中、低剂量组, 联双酯滴丸阳性对照组。小鼠首日上下午和次日下午各 ig 给药 1 次, 以后每天给药 1 次, 连续 7 d, 末次给药后, 除对照组外, 其他组小鼠尾 iv Con A 制备小鼠免疫性肝损伤模型。检测小鼠血清中天冬氨酸转氨酶 (AST)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 的水平; 测定肝组织中 MDA 的量, 观察肝脏病理组织学变化。**结果** 与模型组比较, CIF-A、CIF-B 均抑制血清中 AST、ALT、TNF- α 水平的升高; CIF-C 抑制 AST、ALT、IFN- γ 水平的升高; CIF-B 可降低肝组织中 MDA 的量, 明显改善肝组织病变, 作用优于 CIF-A 和 CIF-C。**结论** 野菊花中萜类和黄酮类化合物对 Con A 致小鼠免疫性肝损伤均具有一定的保肝作用, CIF-B 作用更强。

关键词: 野菊花; 萜类; 黄酮类; 免疫性肝损伤; 肝保护

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)24-3510-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.24.015

Protection of terpenes and flavonoids from *Chrysanthemi Indici Flos* on immunological liver injury

LI Guo-dong², CHEN Yuan-yuan¹, WANG Pan¹, GUAN Ruo-fei¹, YE Yu-ting¹, ZHAO Jing¹, A You-mei¹, BI Yue-feng¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

2. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To study the protection of the terpenes and flavonoids from *Chrysanthemi Indici Flos* (CIF) on immunological liver injury (ILI) induced by concanavalin A (Con A) in mice. **Methods** Mice were divided into control, model, CIF-A (terpenes), CIF-B (terpenes and flavonoids), and CIF-C (flavonoids in high-, mid-, and low-dose) groups, and with Bifendate Pills as positive control group. Mice were ig administered with the three extracts from CIF each once in the morning and afternoon of the first day and the next afternoon, then once daily for consecutive 7 d. The model of ILI was prepared by iv injection of Con A in the tail of mice in each group except the control group. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), interferon- α (TNF- α), and interferon- γ (IFN- γ) in serum of mice were analyzed, the level of MDA in liver was measured, and the histopathological changes of hepatic tissue were observed. **Results** Compared with the model group, CIF-A and CIF-B could obviously inhibit the increased levels of AST, ALT, and TNF- α in serum, while CIF-C could mainly reduce the levels of AST, ALT, IFN- γ , and CIF-B could decrease the level of MDA in the liver tissue with the significant amelioration of liver lesions. The effect of CIF-B was stronger than that of CIF-C and CIF-A. **Conclusion** Terpenes and flavonoids from CIF have a certain protective effect on the liver of mice with ILI induced by Con A, and CIF-B has stronger effect.

Key words: *Chrysanthemi Indici Flos*; terpenes; flavonoids; immunological liver injury; liver protection

野菊花 *Chrysanthemi Indici Flos* (CIF) 为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序^[1]。其性微寒, 味苦辛, 归心、肝二经, 具有疏

风、清热解毒的功效, 主要含萜类、黄酮类等化合物^[2]。野菊花中总黄酮对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤具有保护作用^[3], 其提取液对急性酒精性肝损伤也具

收稿日期: 2013-04-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30973872, 81273392); 河南省基础与前沿技术研究项目 (09230041010)

作者简介: 李国栋, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为肿瘤药理。E-mail: ligd@zzu.edu.cn

*通信作者 毕跃峰 Tel: 13939091607 E-mail: 2000byf@sins.com

有保护作用^[4]。前期实验发现,野菊花中主要活性成分为萜类(以倍半萜类为主)和黄酮类^[5-7],经提取得到了3个部位,即CIF-A部位(主要含萜类化合物,质量分数约80.3%)、CIF-B部位、CIF-C部位(主要含黄酮类化合物,质量分数约75.8%),其中CIF-B为经过工艺优化得到富含萜类(质量分数为41.7%)和黄酮类(质量分数为38.8%)的部位。本实验研究野菊花上述3个萃取部位对刀豆蛋白A(Con A)致小鼠免疫性肝损伤的保护作用,以确定野菊花肝损伤保护作用的有效部位。

1 材料

1.1 药材与试剂

野菊花,采自河南省信阳大别山地区,经郑州大学药学院潘成学副教授鉴定为菊科植物野菊花 *Chrysanthemum indicum* L. 干燥头状花序,标本存于郑州大学药学院标本室,标本号201010。联苯双酯滴丸(批号100719),浙江万邦药业有限公司;羧甲基纤维素钠、丙二醇、甲醛,AR级,烟台市双双化工有限公司;天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)检测试剂盒(赖氏法),丙二醛(MDA)检测试剂盒,南京建成科技有限公司;小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫分析试剂盒、小鼠 γ 干扰素(IFN- γ)酶联免疫分析试剂盒,郑州鼎国生物技术有限公司进口分装;Con A,美国Sigma公司,使用前溶解于磷酸盐缓冲液(PBS)溶液。

1.2 动物

Balb/c 雌性小鼠,清洁级,体质量(20 $\pm$ 2)g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,合格证号:SCXK(鄂)2010-0007。

1.3 仪器

318C MICROPLATE READER 双波长酶标仪,上海三科仪器有限公司;BP211D 分析天平,德国赛多利斯公司;UV-Vis 分光光度计,日本岛津公司;501型温育箱,上海市实验仪器厂;TGL-16G 型台式离心机,上海安亭科学仪器厂;Motic BA 300 显微镜。

2 方法

2.1 药液配制

取自制的野菊花各萃取部位 CIF-A(含萜类化合物80.3%)、CIF-B(含萜类化合物41.7%、黄酮类化合物38.8%)、CIF-C(含黄酮类化合物75.8%)以及阳性对照药联苯双酯滴丸,以1,2-丙二醇和二甲基亚砜(DMSO)溶解,加入1%羧甲基纤维素钠,各药液均含1,2-丙二醇20%、DMSO 1%。所有药

物均现配现用。

2.2 分组与给药

将小鼠随机分成12组:对照组,模型组,CIF-A高、中、低剂量(2.0、1.0、0.5 g/kg)组,CIF-B高、中、低剂量(3.0、1.5、0.75 g/kg)组,CIF-C高、中、低剂量(4.0、2.0、1.0 g/kg)组,联苯双酯滴丸(0.15 g/kg)阳性对照组,每组8只。对照组和模型组小鼠给予1% CMC-Na 混悬液(含20%丙二醇和1% DMSO),药物组给予相应的药液。小鼠首日上、下午和次日下午各ig给药1次,以后每天给药1次,连续7 d。末次给药后小鼠禁食不禁水4 h,尾iv Con A 20 mg/kg,禁食不禁水12 h,建立免疫性肝损伤模型^[8-9]。

2.3 检测指标

小鼠摘眼球采血,分离血清待测,于-20℃冰箱保存,按照试剂盒说明检测血清中AST、ALT、TNF- α 、IFN- γ 的水平。小鼠脱颈处死,立即解剖,取肝脏称质量,选取病变部位,4%甲醛中固定,制备肝组织切片,进行肝组织病理学观察($\times 200$);剩余部分于-20℃冰箱保存,用于肝组织MDA量的检测。

2.4 统计学处理

结果采用SPSS 14.0软件进行统计,采用One-way ANOVA 进行分析。方差齐,以LSD法进行组间多重比较;方差不齐,选择Welch法;组间多重比较采用Dunnett T3法。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 肝损伤模型评价

造模后,模型组小鼠血清中AST、ALT、IFN- γ 、TNF- α 水平及肝组织中MDA的量均明显升高;病理组织学观察可见肝细胞有空泡变性和坏死,呈弥散性分布,有炎性细胞浸润,且细胞排列紊乱。表明造模成功。

3.2 对免疫性肝损伤小鼠血清中ALT和AST水平的影响

与模型组比较,野菊花3个萃取部位不同程度地抑制免疫性肝损伤小鼠血清中ALT、AST水平的升高,且呈剂量相关性,其中高剂量和中剂量的作用更为显著($P < 0.05$ 、 0.01);联苯双酯滴丸也有显著作用($P < 0.01$)。结果见表1。

3.3 对免疫性肝损伤小鼠血清中IFN- γ 、TNF- α 水平的影响

与模型组比较,野菊花3个萃取部位不同程度地抑制免疫性肝损伤小鼠血清中TNF- α 水平的升

高, CIF-C 4.0、2.0 g/kg 能显著抑制 IFN- γ 水平的升高 ($P<0.05$)。结果见表 1。

3.4 对免疫性肝损伤小鼠肝脏指数及 MDA 量的影响

与模型组比较, CIF-B 3.0 g/kg 组, CIF-C 4.0、

2.0 g/kg 组小鼠肝脏指数显著降低 ($P<0.05$); CIF-B 3.0 g/kg 组及联苯双酯滴丸组小鼠肝组织中 MDA 的量显著降低 ($P<0.05$), 而 CIF-A 与 CIF-C 无明显作用。结果见表 2。

表 1 野菊花不同萃取部位对免疫性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST、IFN- γ 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effects of different extracts from CIF at various concentration on levels of ALT, AST, IFN- γ , and TNF- α in serum of mice with ILI ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	ALT / (U·L ⁻¹)	AST / (U·L ⁻¹)	IFN- γ / (ng·L ⁻¹)	TNF- α / (ng·L ⁻¹)
对照	—	19.24 ± 4.58	18.71 ± 4.97	131.79 ± 10.30	144.58 ± 4.60
模型	—	55.17 ± 4.63 ^{△△}	70.09 ± 4.50 ^{△△}	165.27 ± 6.57 ^{△△}	171.41 ± 5.52 ^{△△}
CIF-A	0.5	50.10 ± 8.99	63.65 ± 8.08	190.32 ± 28.52	160.43 ± 5.18
	1.0	41.01 ± 8.87*	28.73 ± 5.76*	177.63 ± 11.02	140.61 ± 2.76*
	2.0	37.37 ± 10.49*	23.35 ± 7.41*	171.16 ± 8.96	133.21 ± 6.47*
CIF-B	0.75	52.57 ± 6.25	65.21 ± 6.04	156.69 ± 3.51	150.63 ± 7.99*
	1.5	36.90 ± 5.58*	49.81 ± 6.85*	158.45 ± 11.16	153.52 ± 8.58*
	3.0	25.68 ± 4.25*	19.76 ± 4.34**	164.31 ± 6.33	148.01 ± 7.46*
CIF-C	1.0	49.87 ± 4.98	49.15 ± 8.39*	154.92 ± 12.15	157.76 ± 2.65*
	2.0	36.48 ± 8.95*	32.45 ± 8.11**	127.65 ± 13.07*	149.55 ± 8.50*
	4.0	25.57 ± 5.69*	22.24 ± 7.51**	123.36 ± 6.03*	148.04 ± 9.35*
联苯双酯滴丸	0.15	20.59 ± 7.46**	19.68 ± 3.66**	177.77 ± 12.37	153.79 ± 4.99*

与对照组比较: ^{△△} $P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下表同

^{△△} $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs model group, same as below

表 2 野菊花不同萃取部位对免疫性肝损伤小鼠肝脏指数及 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of different extracts from CIF at various concentration on liver indexes and MDA level in liver of mice with ILI ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	肝脏指数 / %	MDA / (nmol·mg ⁻¹)
对照	—	4.76 ± 0.17	1.26 ± 0.19
模型	—	5.66 ± 0.13 ^{△△}	2.71 ± 0.18 ^{△△}
CIF-A	0.5	4.98 ± 0.17	2.09 ± 0.55
	1.0	5.08 ± 0.36	1.50 ± 0.64
	2.0	5.00 ± 0.32	1.41 ± 0.36
CIF-B	0.75	5.19 ± 0.31	1.76 ± 0.86
	1.5	4.98 ± 0.31	1.93 ± 0.23
	3.0	4.81 ± 0.35*	1.29 ± 0.28*
CIF-C	1.0	5.20 ± 0.20	1.64 ± 0.55
	2.0	4.73 ± 0.12*	1.86 ± 0.95
	4.0	4.57 ± 0.27*	1.72 ± 0.64
联苯双酯滴丸	0.15	5.07 ± 0.19	1.25 ± 0.26*

3.5 病理组织学观察

对照组小鼠肝小叶结构清晰, 细胞排列整齐, 以中央静脉为中心向周围放射状排列, 肝细胞无变性、坏死, 胞核大而圆, 居中, 间质纤维结缔组织无增生。模型组大鼠肝组织有空泡变性和嗜伊红病变, 肝索排列紊乱, 肝细胞肿大、点状坏死, 成弥散性分布, 有炎性细胞浸润。联苯双酯滴丸组大鼠仅见个别肝细胞点状坏死, 损伤基本恢复。CIF-A 2.0 g/kg 组大鼠部分肝细胞嗜伊红增强, 核浓缩, 成退行性改变, 肝损伤得到中等程度的改善; CIF-A 1.0 g/kg 组大鼠肝细胞胞浆疏松, 颗粒变性呈片状分布, 部分肝细胞点状坏死, 肝损伤得到轻度改善; CIF-A 0.5 g/kg 组肝损伤无明显改善。CIF-B 3.0 g/kg 组大鼠仅见个别肝细胞核浓缩、嗜伊红增强, 其余未见异常; CIF-B 1.5 g/kg 组大鼠少量肝细胞嗜伊红增强, 其改善肝损伤情况略低于 CIF-B 3.0 g/kg 组; CIF-B 0.75 g/kg 组部分肝细胞核浓缩、嗜伊红增强, 见点状坏死, 肝损伤得到中等程度改善。CIF-C 4.0 g/kg 组大鼠部分肝细胞嗜伊红增强, 核浓缩, 见点状坏死, 肝

损伤得到中等程度改善; 2.0 g/kg 组大鼠大量肝细胞嗜伊红增强、核浓缩, 点状坏死, 对肝损伤具有轻度改善作用; 1.0 g/kg 组大鼠肝细胞嗜伊红增强,

点状坏死, 成弥散分布, 对肝损伤改善不明显。对免疫性肝损伤改善作用的强度为 CIF-B>CIF-C>CIF-A。结果见图 1。

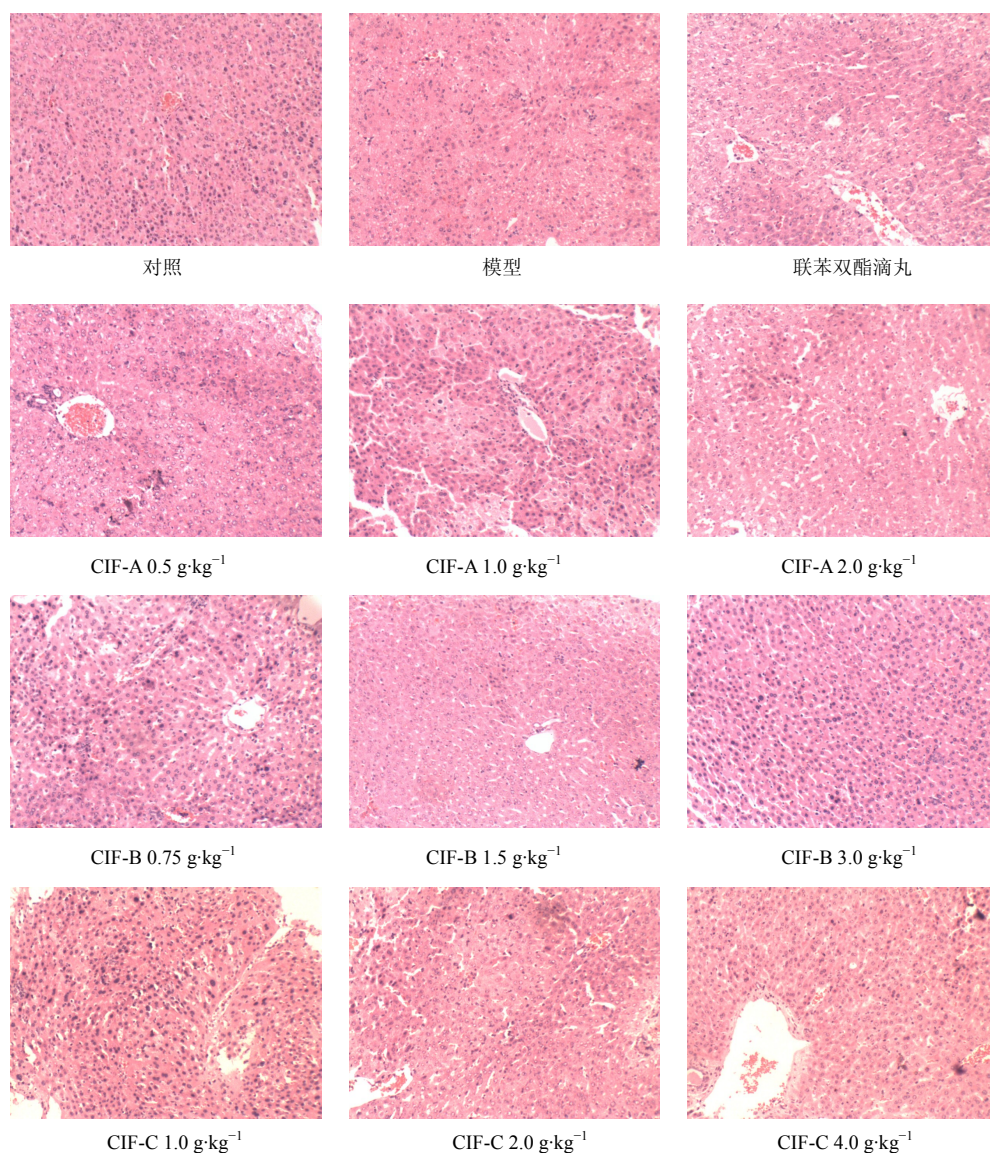


图 1 各组小鼠肝脏病理学变化

Fig. 1 Histopathological changes of liver of mice in each group

4 讨论

Con A 致小鼠免疫性肝损伤是 T 淋巴细胞介导的肝损伤模型之一, 能很好地模拟人病毒性肝炎、自身免疫性肝疾病的病理变化, 主要特征是在短时间内小鼠肝脏有大量炎性细胞浸润 (中性粒细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞等), 血液中 AST、ALT 水平升高, 大量的促炎细胞因子 (IL-4、TNF- α 、INF- γ 等)、趋化性因子参与该模型的发病过程。凋亡机制也在该模型的肝脏损伤中起非常重要的作用^[10-12]。

野菊花为传统中药, 具有清热解毒, 疏肝明目的功能, 其乙醇提取物能显著降低急性酒精性肝损伤小鼠血清中升高的 ALT、AST、三酰甘油 (TG) 水平以及肝组织匀浆中的 MDA 的量, 提高肝组织匀浆液中谷胱甘肽 (GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 及超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, 抑制 IL-1 β 、TNF- α 的升高, 改善肝脏脂肪变性, 减轻肝组织的炎症^[4]。

前期研究发现, 野菊花醇提物对免疫性肝损伤

具有一定的保护作用。本实验结果显示,野菊花各部位对免疫性肝损伤大鼠血清中AST、ALT、TNF- α 、IFN- γ 水平的升高具有不同程度的抑制作用,病理组织学观察可见其对免疫性肝损伤病变均有改善作用,其中CIF-B的作用强于CIF-A和CIF-C,提示野菊花中的萜类与黄酮类对ConA致免疫性肝损伤可能具有协同作用。

抑制免疫细胞及细胞因子的分泌、协同抑制肝细胞凋亡野菊花保肝作用机制之一。TNF是介导多种炎症反应和免疫调节反应的细胞因子,具有广泛的生物学活性。TNF- α 是造成肝炎肝细胞坏死的重要介质之一,本实验结果显示野菊花萃取部位CIF-A和CIF-B抑制大鼠血清TNF- α 的升高,进而对改善大鼠肝损伤起一定作用。然而其是如何影响TNF- α 表达的,尚需进一步探讨。细胞因子是在Th1/Th2细胞分化中最重要的影响因素,其中以产生白细胞介素2(IL-2)和IFN- γ 为主的Th1细胞可诱导巨噬细胞依赖性免疫反应,增强杀伤细胞的细胞毒作用,介导细胞免疫应答,但反应过度时也会引起组织损伤;以产生IL-4、IL-10为主的Th2细胞则可促进体液免疫应答,且Th2也可以通过负性调节机制抑制Th1细胞介导的免疫反应而发挥抗炎作用。本实验结果表明,野菊花萃取部位CIF-A、CIF-B主要抑制免疫性肝损伤大鼠血清中TNF- α 的升高,CIF-C主要抑制IFN- γ 的升高,因此野菊花对免疫性肝损伤的改善作用可能是通过调节细胞因子网络的异常功能状态,使Th1/Th2细胞恢复到正常的相对平衡状态实现的。

肝损伤过程中,T淋巴细胞介导的免疫反应会导致肝细胞内大量氧自由基产生,这些活性氧作用于细胞膜脂质,进行脂质过氧化的链反应。本实验结果表明,野菊花各萃取部位组大鼠血清中ALT、AST的水平不同程度地降低,表明其可促进损伤的细胞膜的修复,抑制细胞内酶的大量释放。MDA是脂质过氧化反应过程中的稳定产物,具有很强的生物毒性,其量直接反映组织氧化损伤的程度,间

接反映肝细胞受自由基攻击后损伤的程度。野菊花萃取部位CIF-B中剂量组能降低免疫性肝损伤大鼠中肝组织中MDA的量,表明其能增强机体抗脂质过氧化的能力,抑制MDA的过量产生。

综上所述,野菊花中萜类和黄酮类化合物对Con A致小鼠免疫性肝损伤均具有一定的保肝护肝作用,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010
- [2] 毕跃峰,符玲,王蒲菊,等.不同市售野菊花药材的RP-HPLC指纹图谱[J].郑州大学学报:理学版,2010,42(4):92-94.
- [3] 张玲,李俊,王建青,等.野菊花总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J].安徽医科大学学报,2007,42(4):412-415.
- [4] 安徽医科大学.野菊花乙醇提取物在制备防治酒精性肝病的药物中的应用:中国,CN 101112407A[P].2008-01-30.
- [5] Bi Y F, Jia L, Shi S P, *et al.* New sesquiterpenes from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. [J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 93(10): 1953-1959.
- [6] 毕跃峰,贾陆,孙孝丽,等.野菊花化学成分的研究(II)[J].中国药学杂志,2010,45(13):980.
- [7] 毕跃峰,潘成学,王普菊.野菊花化学成分的研究[J].中国药学杂志,2009,44(12):894-897.
- [8] 于英男,郭江,李烨,等.双环醇对刀豆蛋白A引起肝损伤小鼠肝脏基因表达谱的影响[J].药学报,2008,43(6):596-600.
- [9] 刘巧丽,高月求.刀豆球蛋白A诱导小鼠免疫性肝损伤的凋亡机制研究[J].中国免疫学杂志,2008,10(24):876-878.
- [10] Kusters S, Gantner F, Kunstle G, *et al.* Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by Concanavalin A [J]. *Gastroenterology*, 1996, 111: 462-471.
- [11] 邱冰. TNF- α 、TAP基因多态性及其抗原表达与肝癌患病的相关性研究[D].长春:吉林大学,2010.
- [12] 何培元.慢性乙肝病毒感染者血清IFN- γ 、IL-4和IL-12的检测及临床意义[D].石家庄:河北医科大学,2007.