

过山蕨总黄酮对肝损伤的保护作用

黄秀曼, 杜钢军*, 孙 婷, 张亚平, 王莹莹, 李佳桓, 刘伟杰

河南大学药学院 药物研究所, 河南 开封 475004

摘要: 目的 观察过山蕨总黄酮对肝损伤的保护作用, 探讨其可能的肝保护机制。方法 采用 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠模型、扑热息痛致急性肝损伤小鼠模型、地塞米松联合酒精致脂肪性肝损伤小鼠模型、ConA 致免疫性肝损伤小鼠模型, 考察过山蕨总黄酮的肝保护作用; 并考察过山蕨总黄酮体外对 H₂O₂ 损伤的人肝细胞 L02 的影响。结果 过山蕨总黄酮对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠、扑热息痛致急性肝损伤小鼠、ConA 致免疫性肝损伤小鼠及地塞米松联合酒精致脂肪性肝损伤小鼠均有降低血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的作用, 还可增加肝组织过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性, 降低肝组织丙二醛(MDA)、转化生长因子 β1 (TGF-β1)、组织金属蛋白酶抑制物(TIMP-1)及层黏连蛋白(LN)的量。过山蕨总黄酮对 L02 细胞 H₂O₂ 损伤有抑制作用, 可刺激肝细胞血红素氧化酶(HO-1)活性, 抑制 H₂O₂ 所致的细胞还原型谷胱甘肽(GSH)耗竭及乳酸脱氢酶(LDH)释放, 对 DPPH 自由基的清除作用相当于维生素 E 的 68.55%。结论 过山蕨总黄酮对肝损伤有保护作用, 其机制可能与清除自由基和增强细胞抗氧化功能有关。

关键词: 过山蕨总黄酮; 肝损伤; 抗氧化; 清除自由基; 丙氨酸转氨酶; 天冬氨酸转氨酶

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2458-06

Protection of total flavonoids from *Camptosorus sibiricus* on hepatic injury

HUANG Xiu-man, DU Gang-jun, SUN Ting, ZHANG Ya-ping, WANG Ying-ying, LI Jia-huan, LIU Wei-jie

Institute of Pharmacy, Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and possible mechanism of total flavonoids from *Comptosorus sibiricus* (TFCS) on hepatic injury (HI). **Methods** The acute hepatic injury (AHI) in mice induced by carbon tetrachloride (CCl₄) and Paracetamol, immunologic hepatic injury (IHI) induced by concanavalin A (ConA), and fatty hepatic injury (FHI) induced by Dexamethasone combined with ethanol (DCE) were used to examine the protective effect of TFCS on hepatic injury. The effect of TFCS on the damage of human hepatic cell L02 induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) was observed *in vitro*. **Results** TFCS showed a protective effect on mice with AHI induced by CCl₄ and Paracetamol, IHI induced by ConA, and FHI induced by DCE by decreasing the contents of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum, increasing the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in hepatic tissue, and decreasing the levels of malondialdehyde (MDA), transforming growth factor-β1 (TGF-β1), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and laminin (LN) in hepatic tissue. TFCS prevented L02 cells from damaging induced by H₂O₂, stimulated the activity of heme oxygenase-1 (HO-1) in liver cells, and inhibited the depletion of glutathione hormone (GSH) and the release of lactate dehydrogenase (LDH) induced by H₂O₂. The scavenging effect of TFCS on free radical caused by DPPH was equal to 68.55% of vitamin E. **Conclusion** TFCS has a protective effect on HI and its mechanism is probably related to the scavenging of free radical and increasing of cell anti-oxidative function.

Key words: total flavonoids from *Camptosorus sibiricus* Rupr. (TFCS); hepatic injury (HI); anti-oxidation; free radical scavenging; alanine aminotransferase (ALT); aspartate aminotransferase (AST)

肝细胞作为肝脏中主要的实质性和功能性细胞, 对化学物质、药物、免疫性疾病、酒精等损伤因素非常敏感, 肝细胞损伤程度可表现为肝组织坏

死、肝脂肪化、肝纤维化、肝硬化, 甚至肝癌^[1]。肝损伤的治疗原则为维护肝细胞功能的稳定性, 减少肝细胞组织炎症的程度, 促进损伤组织的修复等^[2]。目

收稿日期: 2012-02-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173094); 河南省科技厅重点攻关项目(112101310308); 河南大学省部共建项目(SBGJ090704); 河南省高校青年骨干教师项目(2010GGJS-025)

作者简介: 黄秀曼(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: yuehcome123@163.com

*通讯作者 杜钢军 E-mail: dgjlh@163.com

前治疗肝损伤的药物很多,如抗炎保肝类、修复肝细胞膜性结构类、解毒保肝类、抗肝纤维化类、利胆保肝类等。但这些药物在治疗肝损伤时往往存在单一用药疗效较差、联合用药增加肝脏代谢负荷的矛盾^[3]。因此挖掘治疗肝损伤多功能药物十分必要。

过山蕨,又名马蹬草、还阳草、过桥草,为铁角蕨科植物过山蕨 *Camptosorus sibiricus* Rupr. 的地上全草,主产于东北、华北、西北、内蒙古等地,历代本草未见其药用记载^[4],河南民间用其治疗肝炎和肝硬化,效果良好。现代药理学研究表明,过山蕨水提醇沉提取液对兔耳血管、蟾蜍后肢血管以及家兔肢体后肢血管有扩张作用,其有效部位为总黄酮和有机酸^[5]。过山蕨总黄酮对大鼠血栓闭塞性脉管炎有改善作用^[6]。对过山蕨水煎液及不同体积分数乙醇浸提液进行肝损伤保护作用的初步筛选发现,70%乙醇浸液对 CCl₄ 致小鼠肝损伤有较好的保护作用。鉴于过山蕨的保肝作用和黄酮类化合物对多种类型的肝损伤具有保护作用^[7],推测过山蕨黄酮类成分可能是民间用过山蕨治疗肝病的物质基础。为此本研究采用多种肝损伤小鼠模型,考察过山蕨总黄酮对肝损伤的保护作用,并探讨该作用是否与其抗氧化作用有关。

1 材料

1.1 药品与试剂

过山蕨,购自开封市天济堂药店,经河南大学药学院中药鉴定室丛悦教授鉴定为过山蕨 *Camptosorus sibiricus* Rupr. 的地上全草,并由河南大学药物研究所提取其总黄酮,分光光度法测定(以芦丁计)质量分数>65%。ConA、MTT、胰蛋白酶、DPPH,美国 Sigma 公司;CCl₄,天津市永大化学试剂开发中心;丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;转化生长因子β1(TGF-β1)、组织金属蛋白酶抑制物(TIMP-1)、层黏连蛋白(LN)、血红素氧化酶(HO-1)ELISA 试剂盒,进口分装;RPMI 1640 培养基,美国 Gibco 公司;胎牛血清(PBS),杭州四季青生物工程中心。总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)试剂盒,南京建成生物工程研究所产品。维生素 E, Sigma 公司。

1.2 动物

昆明种小鼠,雌雄兼用,体质量 18~22 g,河

南省医学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(豫)2010-1-0002。

1.3 细胞

人肝细胞 L02,河南大学天然药物与免疫工程重点实验室谢松强博士惠赠,生长于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中。

1.4 仪器

UV-2000 型紫外可见分光光度计,上海尤尼柯仪器有限公司;LGR16-W 型高速冷冻离心机,北京京立离心机有限公司;800 型酶标仪,Bio-Tek 公司。

2 方法

2.1 对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤的影响^[8]

30 只小鼠适应性喂养 1 周后随机分为 3 组,分别为对照组、模型组、过山蕨总黄酮(20 mg/kg,预试验确定的较佳剂量)组,每组 10 只,雌雄各半。对照组和模型组小鼠 ig 10 mL/kg 0.5% CMC-Na 水溶液,过山蕨总黄酮组小鼠 ig 同等容量的相应药物(用 0.5% CMC-Na 混悬),每天 1 次,连续给药 10 d。第 9 次给药后 1 h,模型组和过山蕨总黄酮组小鼠 ip 10% CCl₄ 橄榄油溶液 0.2 mL/只,对照组 ip 等量橄榄油。注射 CCl₄ 后,小鼠禁食不禁水 24 h,摘除眼球取血,制备血清,按试剂盒说明检测 ALT、AST 活性。处死小鼠,随即取部分肝脏,用生理盐水(1:5)制备肝组织匀浆,按照试剂盒说明测定 CAT、SOD、MDA 的量。另取部分肝组织,置于 10%甲醛溶液中固定,制备切片,苏木精-伊红染色,显微镜下观察(×400)肝组织病理学变化。

2.2 对扑热息痛致小鼠急性肝损伤的影响^[9]

小鼠分组、给药同“2.1”项。第 9 次给药后 1 h,模型组和过山蕨总黄酮组小鼠 ip 3%扑热息痛(用 0.5% CMC-Na 混悬)溶液 0.2 mL/只,对照组给予 0.5% CMC-Na 混悬液。扑热息痛注射后 24 h,按“2.1”项下操作过程检测 ALT、AST 的活性,观察肝组织病理学变化。

2.3 对 ConA 致小鼠免疫性肝损伤的影响^[10]

小鼠分组、给药同“2.1”项。末次给药后 1 h,模型组和过山蕨总黄酮组小鼠尾 iv ConA 15 mg/kg(生理盐水配制),对照组给予等体积生理盐水。注射 ConA 8 h 后,按“2.1”项下操作过程检测 ALT、AST 的活性,观察肝组织病理学变化。

2.4 对地塞米松联合酒精致小鼠脂肪性肝损伤的影响^[11]

小鼠分组、给药剂量和次数同“2.1”项,连续

给药 9 d。从给药第 1 天起,除对照组外,其他 2 组小鼠于给药后 1 h ig 用纯净水稀释乙醇体积分数至 35% 的泸州老窖白酒(原乙醇体积分数为 52%), 0.2 mL/只,每天 1 次,连续 9 d。从给药第 5 天起,除对照组外,其他 2 组小鼠在 ig 泸州老窖白酒后 ip 地塞米松注射液 10 mg/kg,每天 1 次,连续 4 d。全程造模给药结束后,小鼠禁食不禁水 24 h,摘除眼球取血,制备血清,按试剂盒说明检测 ALT、AST 的活性以及 TC、TG 水平。处死小鼠,随即取部分肝脏,用生理盐水(1:5)制备肝组织匀浆,按试剂盒说明测定 TGF- β 1、TIMP-1、LN 等的水平。另取部分肝组织,按“2.1”项下操作,观察肝组织病理学变化。

2.5 对 H₂O₂ 致人肝细胞 L02 损伤的影响

将 L02 细胞 1×10^5 /mL 置于 96 孔板中,每孔 100 μ L,用 RPMI 1640 完全培养基培养,24 h 后补充含 H₂O₂ 60 μ mol/L 及不同质量浓度的过山蕨总黄酮的 RPMI 1640 完全培养基,每孔 100 μ L,使过山蕨总黄酮终质量浓度分别 50、25、10、5 μ g/mL,对照组每孔补充 100 μ L 0.3% DMSO 的 RPMI 1640 完全培养液,每个质量浓度设 6 个复孔。继续培养 48 h 后收集上清液用于 LDH 检测。每孔加入 100 μ L 含 MTT 0.5 mg/mL 的 PBS,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,去上清液,每孔加入 100 μ L DMSO,震荡 10 min,酶标仪检测波长 570 nm 处吸光度(A)值,计算细胞存活率。

存活率 = 给药组 A 值 / 对照组 A 值

另在 6 孔板中每孔接种 1×10^5 /mL 细胞悬液 2 mL,用 RPMI 1640 全培养基 2 mL 培养 24 h 后,补充含 H₂O₂ 60 μ mol/L 及不同质量浓度的过山蕨总黄酮的 RPMI 1640 完全细胞培养基,每孔 2 mL,使过山蕨总黄酮的终质量浓度分别 50、25、10、5 μ g/mL,每个质量浓度设 3 个复孔(分布于 3 块培养板中)。培养 48 h 后收集细胞,用 1% Triton X-100 裂解、离心后,按试剂盒说明检测 HO-1、GSH,最终结果以每毫克蛋白所含的量表示。

2.6 对 DPPH 自由基的影响

2.6.1 DPPH 溶液的配制 准确称取 7.89 mg DPPH,用无水乙醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中,使 DPPH 浓度为 2 mmol/mL,避光、0~4 $^{\circ}$ C 保存。

2.6.2 对 DPPH 自由基的影响 取无水乙醇溶解的不同质量浓度维生素 E (5、10、20、30、40 μ g/mL) 或无水乙醇溶解的过山蕨总黄酮 (7.5、15、30、45、60 μ g/mL) 2 mL 及浓度为 0.25 mmol/mL 的 DPPH 溶液 2 mL,先后加入同一具塞试管中,摇匀,在黑暗中 37 $^{\circ}$ C 放置 20 min,以无水乙醇作为空白对照,测定 517 nm 处吸光度(A_i)值。取浓度为 0.25 mmol/mL 的 DPPH 溶液 2 mL,与 2 mL 无水乙醇混合,摇匀,在黑暗中 37 $^{\circ}$ C 放置 20 min,以无水乙醇作为空白对照,测定 517 nm 处吸光度(A₀)值。计算 DPPH 清除率,计算 IC₅₀。

清除率 = $1 - A_i / A_0$

2.7 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件包分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤的影响

模型组小鼠出现 CCl₄ 致急性肝损伤,血清中 ALT、AST 的活性显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比,过山蕨总黄酮组急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活性及肝组织 MDA 的量明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01),肝组织 CAT 与 SOD 活性明显升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 1。

肝组织病理学观察可见,模型组小鼠肝小叶界限不清,肝小叶内有大片灶性坏死区,肝细胞广泛水样变性;过山蕨总黄酮组小鼠肝小叶结构清晰、完整,肝细胞轻度浊肿,炎细胞浸润明显减轻,灶状坏死范围明显减小。结果见图 1。

3.2 对扑热息痛致小鼠急性肝损伤的影响

扑热息痛注射后 24 h,模型组小鼠出现急性肝损伤,肝脏体积增大,呈粉色,表面有明显的斑点

表 1 过山蕨总黄酮对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of TFCS on biochemical indexes in mice with AHI induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	ALT / (U·L ⁻¹)	AST / (U·L ⁻¹)	SOD / (U·g ⁻¹)	CAT / (U·g ⁻¹)	MDA / (nmol·g ⁻¹)
对照	—	25.9 ± 5.8	47.7 ± 5.6	79.6 ± 6.4	14.6 ± 1.6	1.79 ± 0.69
模型	—	239.2 ± 26.8 ^{##}	175.9 ± 29.5 ^{##}	57.0 ± 8.6 ^{##}	9.2 ± 2.9 ^{##}	3.83 ± 1.51 ^{##}
过山蕨总黄酮	20	140.4 ± 35.1 ^{####}	104.7 ± 32.8 ^{####}	70.4 ± 9.8 ^{###}	12.5 ± 2.3 [*]	2.30 ± 1.39 [*]

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

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

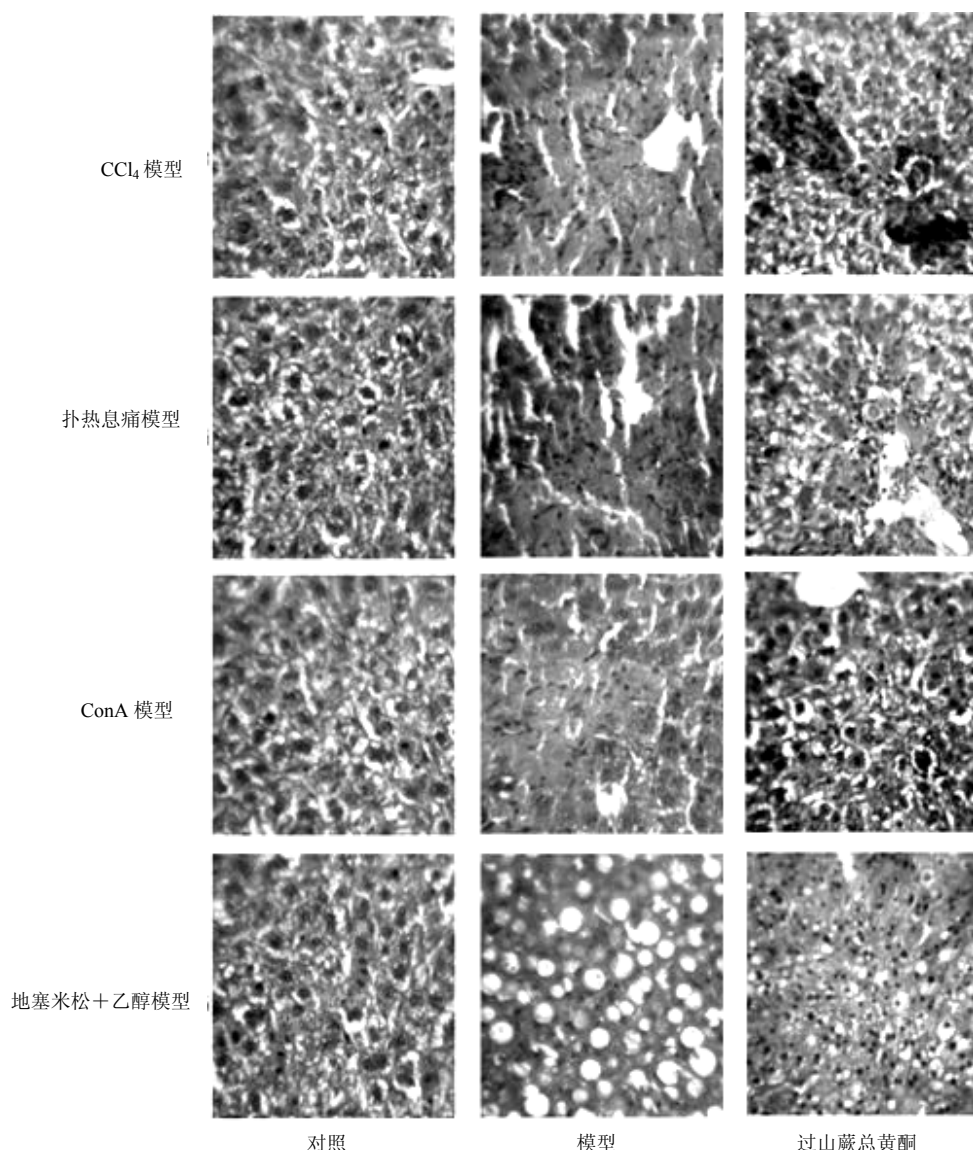


图1 过山蕨总黄酮对 CCl₄、扑热息痛、ConA、地塞米松联合酒精致小鼠肝损伤的组织病理学的影响
 Fig. 1 Effect of TFCS on pathological changes of mice with HI induced by CCl₄, Paracetamol, ConA, and DCE

状花纹，无光泽，血清中 ALT、AST 的活性显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比，过山蕨总黄酮组急性肝损伤程度明显减轻，小鼠血清中 ALT、AST 活性明显降低 ($P < 0.01$)。结果见图 2。

肝组织病理学观察可见，模型组肝小叶中央静脉周围的肝细胞有不同程度的变性与坏死，胞核固缩或已溶解破碎，伴中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润，肝细胞索正常形态被破坏；过山蕨总黄酮组小鼠肝细胞水肿明显减轻，肝窦已变宽，炎性细胞浸润明显减少，肝细胞再生明显。结果见图 1。

3.3 对 ConA 致小鼠免疫性肝损伤的影响

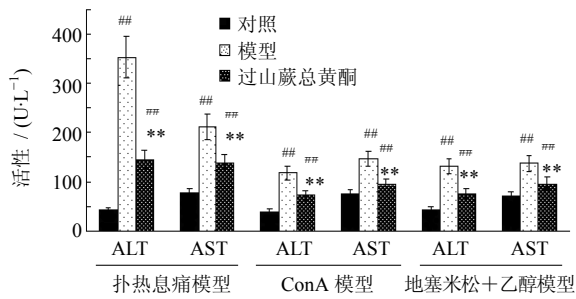
ConA 注射后 8 h，模型组小鼠出现免疫性肝损伤，肝脏体积增大，无光泽，血清中 ALT、AST 的

活性显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比，过山蕨总黄酮组小鼠免疫性肝损伤程度明显减轻，血清 ALT、AST 活性均明显降低 ($P < 0.01$)，结果见图 2。

肝组织病理学观察可见，模型组小鼠肝索排列紊乱，肝小叶结构破坏，有较多淋巴细胞和单核细胞浸润，可见小灶状肝细胞坏死；过山蕨总黄酮组小鼠肝小叶结构基本保留，肝索排列基本规整，门管区有少量淋巴细胞、单核细胞浸润，未见明显肝细胞坏死。结果见图 1。

3.4 对地塞米松联合酒精致小鼠脂肪性肝损伤的影响

模型组小鼠血脂、ALT 和 AST 升高，并伴随肝组织纤维化增殖现象，即 TGF- β 1、TIMP-1、LN 的量明显增加。与模型组相比，过山蕨总黄酮组小鼠



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$
[#] $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图 2 过山蕨总黄酮对扑热息痛、ConA、地塞米松联合酒精致肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effects of TFCS on serum ALT and AST in mice with HI induced by Paracetamol, ConA, and DCE ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 2 过山蕨总黄酮对地塞米松联合酒精致脂肪性肝损伤小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of TFCS on biochemical indexes in mice with HI induced by DCE ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	TG / (mmol·L ⁻¹)	TC / (mmol·L ⁻¹)	TGF-β1 / (μg·g ⁻¹)	TIMP-1 / (μg·g ⁻¹)	LN / (μg·g ⁻¹)
对照	—	0.72 ± 0.16	3.81 ± 0.43	144.2 ± 10.1	14.2 ± 2.3	23.3 ± 4.3
模型	—	1.13 ± 0.24 ^{##}	6.55 ± 0.85 ^{##}	783.1 ± 116.4 ^{##}	36.2 ± 4.3 ^{##}	158.6 ± 25.2 ^{##}
过山蕨总黄酮	20	0.81 ± 0.18 ^{**}	4.62 ± 0.51 ^{**}	565.1 ± 99.4 ^{###}	27.6 ± 4.4 ^{###}	108.5 ± 21.3 ^{###}

表 3 过山蕨总黄酮对 H₂O₂ 致人肝细胞 L02 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of TFCS on human hepatic cell L02 injury induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	ρ / (μg·mL ⁻¹)	细胞存活率 / %	HO-1 / (μg·mg ⁻¹)	GSH / (μg·mg ⁻¹)	LDH / (U·L ⁻¹)
对照	—	100	6.3 ± 0.8	4.2 ± 0.6	317 ± 53
模型	60 μmol·L ⁻¹	54.2 ± 2.8 ^{##}	3.8 ± 0.9 ^{##}	1.9 ± 0.7 ^{##}	725 ± 83 ^{##}
过山蕨总黄酮	50	83.4 ± 3.1 [*]	5.6 ± 0.9 ^{**}	3.9 ± 0.8 ^{**}	421 ± 63 ^{**}
	25	85.1 ± 3.0 ^{**}	5.8 ± 0.9 ^{**}	4.0 ± 0.8 ^{**}	372 ± 65 ^{**}
	10	78.4 ± 3.0 ^{**}	5.2 ± 0.8 ^{**}	3.5 ± 0.7 ^{**}	534 ± 64 ^{**}
	5	65.7 ± 3.1 ^{##}	4.9 ± 0.8 ^{##}	3.2 ± 0.6 [*]	613 ± 61 ^{##}

3.6 对 DPPH 自由基的清除作用

过山蕨总黄酮质量浓度大于 30 μg/mL 时, 对 DPPH 自由基的清除率达 90%, IC₅₀ 为 (13.26 ± 2.08) μg/mL (95% 置信区间 11.18 ~ 15.34 μg/mL), 相当于维生素 E 作用的 68.55% [IC₅₀ 为 (9.09 ± 1.25) μg/mL, 95% 置信区间 7.83 ~ 10.35 μg/mL]。结果见表 4。

4 讨论

目前对肝损伤的防治仍是一个重要课题, 通过实验性肝损伤动物模型筛选治疗肝损伤药物, 探讨其作用机制, 具有重要的现实意义^[12]。肝损伤过程大多与氧化应激和免疫有关, 化学物质、药物、酒精等能直接或间接诱导肝细胞生物膜系统发生脂质

ALT、AST、TC、TG 均明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), TGF-β1、TIMP-1、LN 的量均有明显减少 ($P < 0.01$)。结果见图 2、表 2。

肝组织病理学观察可见, 模型组小鼠肝脏出现大泡性的肝细胞脂肪变性, 变性肝细胞弥漫累及几乎所有肝小叶, 肝细胞肿胀呈圆形, 细胞核被挤向一边, 胞浆内充满大量脂肪空泡, 界限不清楚; 过山蕨总黄酮组肝脏脂肪变性明显改善, 脂滴减少或消失, 肝细胞结构基本恢复正常。结果见图 1。

3.5 对 H₂O₂ 致人肝细胞 L02 损伤的影响

与对照组相比, 模型组 L02 细胞存活率仅为 54.2%。与模型组相比, 过山蕨总黄酮各质量浓度组对 H₂O₂ 肝细胞损伤均有不同程度的抑制作用, 提高肝细胞 HO-1 活性 ($P < 0.05, 0.01$), 抑制 H₂O₂ 所致的 GSH 耗竭及 LDH 释放 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见表 3。

表 4 过山蕨总黄酮对 DPPH 自由基清除作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Scavenging effect of TFCS on free radical caused by DPPH ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	ρ / (μg·mL ⁻¹)	清除率 / %
过山蕨总黄酮	7.5	25.65 ± 1.45
	15	56.13 ± 1.48
	30	72.43 ± 0.81
	45	93.38 ± 1.78
	60	94.15 ± 2.30
维生素 E	5	24.67 ± 1.26
	10	56.08 ± 1.99
	20	79.48 ± 0.90
	30	90.97 ± 1.01
	40	92.54 ± 0.75

过氧化, 干扰细胞内的能量代谢, 活化细胞死亡程序等, 最终以转氨酶升高为表现形成不同程度的肝功能失常^[13]。近年来, 中医药在治疗肝损伤研究中表现出了稳定的疗效, 较少的不良反应等优势^[14-15], 因此加大中药治疗肝损伤的研究具有重要的现实意义。本实验采用 CCl₄ 致化学急性肝损伤模型、扑热息痛致药物急性肝损伤、ConA 致免疫性肝损伤、地塞米松联合酒精致脂肪性肝损伤模型, 研究过山蕨总黄酮的肝损伤保护作用及其途径。在预试验中, 过山蕨总黄酮剂量大于 5 mg/kg 以上均为小鼠肝损伤治疗有效剂量, 日剂量高达 5 g/kg 时也未见明显不良反应, 但超过 20 mg/kg 时疗效不再增加, 故在本实验中仅采用 20 mg/kg 单一剂量, 目的是观察过山蕨总黄酮对多途径肝损伤有无保护作用。结果表明, 过山蕨总黄酮对上述因素引起的肝损伤均有保护作用, 明显抑制转氨酶升高, 改善肝组织病理状态。

肝脏受到外界刺激后引起细胞因子释放, 细胞因子-细胞-细胞外基质相互作用, 使肝细胞外基质代谢紊乱, 狄氏间隙过沉积, 继之肝窦毛细血管化, 形成肝纤维化的分子病理学基础^[16]。黄酮类化合物主要是通过抗炎、提高肝组织抗氧化水平、消除自由基等作用保护肝脏^[17]。本研究结果表明, 过山蕨总黄酮明显降低 CCl₄ 致化学性急性肝损伤小鼠肝组织 MDA 的量、提高肝组织 CAT、SOD 活性, 显示了黄酮类化合物抗氧化保肝的共同特点; 在体外实验中, 过山蕨总黄酮刺激肝细胞 HO-1 活性、阻止 H₂O₂ 对肝细胞的损伤, 对 DPPH 自由基有清除作用, 进一步证实其有较好的抗氧化作用。在地塞米松联合酒精引起的脂肪性肝损伤模型的实验中, 过山蕨总黄酮对肝组织 TGF- β 1、TIMP-1、LN 等纤维化增殖指标也有降低作用, 结合其对涉及多种免疫细胞因子的 ConA 免疫性肝损伤^[18]和以线粒体功能异常为主的扑热息痛致肝损伤^[19]均有较好改善作用, 推断过山蕨总黄酮对肝损伤的保护作用是多途径、全方位的。

过山蕨总黄酮对肝损伤的多途径保护作用还鲜有报道, 其原药材过山蕨尚未纳入临床使用中药行列, 鉴于其显示良好的治疗肝损伤的潜力, 有必要对过山蕨进行深入研究和开发。

参考文献

[1] 毛颖婕, 徐 彭, 刘清华, 等. 肝损伤的中药治疗研究进展 [J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(1): 91-94.

- [2] 杨 佼, 吕文良. 药物性肝损伤临床研究及治疗进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(12): 1359-1363.
- [3] 师照敏. 药物性肝损伤治疗体会 [J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(10): 154.
- [4] 李 宁, 吴永军, 李 锐, 等. 过山蕨的化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2008, 39(1): 34-36.
- [5] 李 宁, 李 锐, 冯志国, 等. 过山蕨中黄酮类成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(14): 1049-1052.
- [6] 梁大连, 程艳玲, 董世波, 等. 过山蕨总黄酮对大鼠血栓闭塞性脉管炎的改善作用 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(6): 481-484.
- [7] 李满妹, 江 涛, 黄杰昌, 等. 知母总黄酮对溴酸钾诱发小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 252-255.
- [8] 贲 亮, 郭伟康, 袁红艳, 等. 叶底珠枝叶水提物对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 四川中医, 2010, 28(2): 25-26.
- [9] 伍义行, 郝冰洁, 胡少青, 等. 六棱菊提取物对醋氨酚致小鼠肝损伤的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(7): 711-715.
- [10] 徐汝明, 邓克敏, 陆 阳. 墨旱莲活性成分对刀豆蛋白 A 诱导的小鼠肝损伤的作用 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(1): 50-54.
- [11] 张建军, 谢梅林, 王恒斌. 蛇床子素对小鼠酒精性脂肪肝的治疗作用 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2011, 31(1): 62-65.
- [12] 张锦雀, 黄丽英. 肝损伤动物模型研究进展 [J]. 福建医科大学学报, 2009, 43(1): 86-88.
- [13] 钟卫卫, 林世德. 内质网应激与肝损伤研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(10): 1021-1025.
- [14] 徐利霞. 急性肝损伤的中医药治疗进展 [J]. 山东中医杂志, 2010, 29(2): 141-143.
- [15] 倪春艳, 郑仕中, 陆 茵, 等. 以瘦素为靶点中药单体成分防治肝纤维化研究策略及进展 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1837-1841.
- [16] 王心童, 王虹蛟, 王 强, 等. 抑肽酶对实验性慢性肝损伤肝组织纤维化影响的研究 [J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(12): 2033-2034.
- [17] 郭菁菁, 杨秀芬. 黄酮类化合物对动物实验性肝损伤保护作用的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 5-10.
- [18] 邢 杰, 陈英利, 陶淑华, 等. 免疫性肝损伤相关细胞因子研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(1): 71-72.
- [19] 顾兴丽, 孙继红, 季 晖. 扑热息痛肝损伤机制研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(5): 596-600.