

广西藤茶总黄酮保肝作用的实验研究*

Experimental Research on Total Flavone of *Ampelopsis grossedentata* from Guangxi in Liver Protection

钟正贤 覃洁萍** 周桂芬 陈学芬

Zhong Zhengxian Qin Jiepin Zhou Guifen Chen Xuefen

(广西中医药研究所 南宁市东葛路 20-1号 530022)

(Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences,
20-1 Donggeliu, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要 为了解广西藤茶总黄酮 (GXTF) 的保肝作用, 进行 GXTF 对四氯化碳 (CCL₄)、D-半乳糖胺和异硫氰酸萘酯 (ANIT) 致小鼠急性肝损伤保护试验、单核巨噬细胞吞噬功能试验、免疫低下小鼠溶血素生成试验和毒性试验。各试验用小鼠 50 只, 体重 23~ 25 g, 雌雄兼用, 其中单核巨噬细胞吞噬功能试验用鼠 40 只; 毒性试验用鼠 20 只, 雌雄各半。血清中的 ALT、AST、T-BIL 含量作为测定指标。结果: 与 CCL₄ 模型组相比, GXTF (0.1 g/kg) 显著降低 ALT、AST、T-BIL 含量 ($P < 0.05$); 与 D-半乳糖胺和 ANIT 模型组相比, GXTF (0.1 g/kg, 0.05 g/kg) 显著降低 ALT、AST、T-BIL 含量 ($P < 0.05$)。单核巨噬细胞吞噬功能试验表明, GXTF (0.1 g/kg) 显著提高单核巨噬细胞吞噬指数 ($P < 0.05$)。溶血素生成试验表明, GXTF (0.1 g/kg, 0.05 g/kg) 显著提高免疫低下小鼠溶血素含量 ($P < 0.05$)。毒性试验表明, 小鼠最大耐受量为 22.5 g/kg。提示, 广西藤茶总黄酮具有保肝降酶和退黄, 提高免疫功能作用。

关键词 藤茶 总黄酮 保肝 退黄 免疫功能

中图分类号 Q949.756.3; R967

Abstract To study effect of the total flavone of *Ampelopsis grossedentata* from Guangxi (GXTF) on liver protection, the mouse models induced by carbon tetrachloride (CCL₄), D-galactosamine (D-Gla) and naphthyl isothiocyanate (ANIT) are used. The assay of mononuclear macrophage phagocytosis and hemolysin formation in immune-lowering mice and toxicity test are also conducted. Each test has 50 mice with body weight of 23 to 25 g, male and female together, except for 40 mice for assay of mononuclear macrophage phagocytosis, and 20 mice for toxicity test with half female. Alt, AST and T-BIL are tested as indicators. Compared with CCL₄ models, GXTF at 0.1 g/kg can decrease the contents of ALT, AST and T-BIL at $P < 0.05$. Compared with D-Gla and ANIT models, GXTF at 0.1 g/kg and 0.05 g/kg can decrease the contents of ALT, AST and T-BIL at $P < 0.05$. GXTF at 0.1 g/kg can increase phagocytosis index of mononuclear macrophages at $P < 0.05$. GXTF at 0.1 g/kg and 0.05 g/kg can increase the content of hemolysin in immune-lowering mice at $P < 0.05$. The fatal quantity of GXTF to mice is 22.5 g/kg. It is suggested that GXTF could enhance immunity and protection of liver, and eliminate jaundice.

Key words *Ampelopsis grossedentata*, total flavone, liver protection, eliminating jaundice, immunity function

2001-06-04收稿。

* 国家中医药管理局中医药科学技术研究基金资助项目 (国中医药科 00-01L(M)) 和广西青年科学基金资助项目 (桂科青 0007025)。

** 广西中医学院药理学。

广西藤茶系葡萄科蛇葡萄植物显齿蛇葡萄 [*Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. Wang] 的茎叶, 其性味甘淡, 具有清热解毒功效, 主治黄疸型肝炎, 感冒风热, 咽喉肿痛^[1,2]。广西藤茶总黄酮 (GXTF) 是从广西瑶族藤茶中提取的有效成分, 为双

氢杨梅树皮素和杨梅树皮素的混合物^[3],前文^[4]已报道, GX TF具有明显的活血化瘀和抗氧化作用。从 GX TF中分离得到的双氢杨梅树皮素具有止咳、祛痰和降血糖作用^[5,6]。前人的研究也证明,黄酮类化合物对心血管、呼吸、消化等系统具有广泛的生理活性^[7]。为此,本文试图寻找抗肝炎药物,对 GX TF进行了保肝作用实验研究

1 实验材料

1.1 药物及试剂

广西藤茶总黄酮 (GX TF) 为微黄粉末结晶,由广西中医学院药学系提供。使用时加数滴吐温-80研磨成乳浊液供实验用。联苯双酯,北京协和药厂产品。盐酸左旋咪唑片,桂林制药厂产品。D-半乳糖胺, Sigma公司产品。异硫氰酸萘酯, Sigma公司产品。丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天冬氨酸氨基转移酶 (AST), 总胆红素 (T-BIL) 等试剂盒均为上海荣盛生物技术有限公司产品。

1.2 动物

昆明种小鼠, 体重 23~ 25 g, 雌雄兼用, 由广西医科大学实验动物中心提供。

1.3 仪器

722型光栅分光光度计, 上海分析仪器三厂。

2 方法与结果

2.1 对小鼠 CCL₄致急性肝损伤的保护作用^[8]

取小鼠 50只, 分为 5组。设对照组、CCL₄模型组、阳性药联苯双酯 (0.1 g/kg) 组、GX TF大小剂量 (0.1 g/kg和 0.05 g/kg) 组。用药组每天胃灌给

表 1 GX TF对小鼠 CCL₄致急性肝损伤的保护作用 (n= 10, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of GX TF on liver protection of mice induced by carbon tetrachloride (n= 10, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dosage (g/kg)	ALT (u)	AST (u)	T-BIL (μ mol/L)
对照组 Control		24.3 \pm 7.3	122.6 \pm 25.3	2.5 \pm 1.18
模型组 Model		203.0 \pm 18.3	259.5 \pm 33.6	6.0 \pm 1.91
联苯双酯 Bifendate	0.1	126.5 \pm 54.1*	212.3 \pm 52.4	4.65 \pm 2.83
GX TF	0.1	167.7 \pm 50.6	215.0 \pm 60.7	3.78 \pm 2.52
GX TF	0.05	175.5 \pm 43.8	226.4 \pm 39.5	4.35 \pm 2.31

与模型组比较 Compared with model * P < 0.05; ** P < 0.01

表 2 GX TF对 D-半乳糖胺致小鼠急性肝损伤的保护作用 (n= 10, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of GX TF on liver protection of mice induced by D-galactosamine (n= 10, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dosage (g/kg)	ALT (u)	AST (u)	T-BIL (μ mol/L)
对照组 Control		25.6 \pm 6.4	121.6 \pm 22.2	2.43 \pm 1.21
模型组 Model		232.2 \pm 22.8	252.6 \pm 17.7	6.15 \pm 3.81
联苯双酯 Bifendate	0.1	60.2 \pm 39.5*	215.4 \pm 47.6	2.60 \pm 2.36*
GX TF	0.1	207.7 \pm 20.6	220.2 \pm 24.1	2.86 \pm 1.29*
GX TF	0.05	210.4 \pm 21.3	235.4 \pm 31.5	3.24 \pm 2.34

与模型组比较 Compared with model * P < 0.05; ** P < 0.01

药 (ig) 1次, 对照组和模型组给予等体积蒸馏水, 连续 7d 末次给药约 10h, 除对照组外, 其他各组小鼠腹腔注射 (ip) 0.1% CCL₄液体石蜡油溶液 10 ml/kg, 同时禁食, 自由饮水。16h后由眼眶静脉丛取血, 分离血清, 采用试剂盒测定血清 ALT、AST和 T-BIL, 并取肝组织按常规作病理学检查。结果见表 1。GX TF大小剂量组和联苯双酯组能明显抑制 CCL₄致急性肝损伤小鼠血清中 ALT和 AST活性升高, 并对 T-BIL含量有一定的降低作用, 减轻肝组织的变性和坏死, GX TF大剂量组肝组织的坏死程度与 CCL₄模型组比较具有显著性差异 (P < 0.05), 显示保肝降酶作用。

2.2 对 D-半乳糖胺致小鼠急性肝损伤的保护作用^[8]

取小鼠 50只, 分空白对照组、模型组、联苯双酯 (100 mg/kg) 组、GX TF大小剂量 (0.1 g/kg和 0.05 g/kg) 组。分别 ig给药, 每天 1次, 空白对照组和模型组给予等量蒸馏水, 连续用药 8d 末次给药 1h后, 除空白对照组外, 其他各组腹腔注射 D-半乳糖胺 650 mg/kg, 20h后, 摘除小鼠眼球取血, 分离血清, 按试剂盒方法测定 AST、ALT和 T-BIL, 并取肝组织按常规作病理学检查, 结果见表 2。GX TF大小剂量组和联苯双酯组能明显抑制 D-半乳糖胺致急性肝损伤小鼠血清中的 ALT和 AST活性的升高, 并对 T-BIL有明显的降低作用, 减轻肝组织的变性和坏死, GX TF大小剂量组肝组织的坏死程度与 CCL₄模型组比较具有显著性差异 (P < 0.05), 显示保肝降酶作用。

2.3 退黄试验^[9]

分组同 2.1, 连续 ig 给药 6 d, 第 7 天除对照组外, 其余各组 ig 0.6% 异硫氰酸萘酯 (ANIT, 90 mg/kg) 中毒, 中毒后继续给药 2 d, 对照组和模型组给予同体积蒸馏水。各组于中毒 48 h 后摘眼球取血, 分离血清, 同上述方法测定 ALT 和 T-BIL, 结果见表 3。GXTF 大小剂量组和联苯双酯组能明显抑制 ANIT 致急性肝损伤小鼠血清中的 ALT 升高和降低 T-BIL 含量, 显示保肝降酶退黄作用。

表 3 GXTF 对小鼠 ANIT 致急性肝损伤的保护作用

Table 3 Effect of GXTF on liver protection of mice induced by naphthyl isothiocyanate

组别 Group	剂量 Dosage (g/kg)	动物数 Animal (只 Individual)	ALT ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)	T-BIL ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$)
对照组 Control		10	23.4 ± 5.8	2.3 ± 1.16
模型组 Model		10	428.4 ± 46.3	119.7 ± 23.16
联苯双酯 Bifendate	0.1	10	158.0 ± 73.4 *	87.8 ± 25.68 *
GXTF	0.1	10	336.8 ± 87.1	90.3 ± 30.03 *
GXTF	0.05	10	354.3 ± 69.4	98.4 ± 36.52 *

与模型组比较 Compared with model * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2.4 对单核巨噬细胞吞噬功能实验

取小鼠 40 只, 分对照组, 左旋咪唑 (0.05 g/kg) 组, GXTF 大小剂量 (0.1 g/kg 和 0.05 g/kg) 组。连续 ig 给药 7 d, 末次给药 1 h 后, 于尾静脉注入印度墨汁 0.1 ml/10 g 体重, 分别在注射后 2 min 和 10 min, 从眼眶静脉丛取血 20 μl , 置于 2.0 ml 0.1% NaCO₃ 溶液中摇匀, 722 型分光光度计 600 nm 处比色测定 OD 值, 按公式: $K = \log OD_1 - \log OD_2 / t_1 - t_2$ 计算吞噬指数 K 值, 结果见表 4。GXTF 大剂量组和左旋咪唑组均能明显提高单核巨噬细胞吞噬指数 K 值, 提示 GXTF 具有提高非特异性免疫功能作用。

表 4 GXTF 对单核巨噬细胞吞噬功能影响

Table 4 Effect of GXTF on mononuclear macrophage phagocytosis

组别 Group	剂量 Dosage (g/kg)	动物数 Animal (只 Individual)	吞噬指数 Phagocytosis index K ($\bar{x} \pm s$)
对照组 Control		10	0.03 ± 0.009
左旋咪唑 L-imidazole	0.05	10	0.052 ± 0.008
GXTF	0.1	10	0.042 ± 0.007
GXTF	0.05	10	0.032 ± 0.008

与对照组比较 Compared with Control * $P < 0.05$

2.5 对免疫功能低下小鼠溶血素生成的影响^[8]

取小鼠 50 只, 分为正常对照组、环磷酰胺组、左旋咪唑 (0.05 g/kg) 组、GXTF 大小剂量 (0.1 g/kg 和 0.05 g/kg) 组。连续 ig 给药 10 d, 第 5 天每鼠 ip 5% 鸡血红细胞混悬液 0.2 毫升/只, 同时, 除正常对照组

外, 其他组均皮下注射环磷酰胺 (CY) 20 mg/kg 1 次。免疫第 4 天后, 摘除眼球取血, 测定各组血清溶血素水平 (OD) 值, 结果见表 5。GXTF 大小剂量组和左旋咪唑组均能明显提高免疫功能低下小鼠溶血素含量, 提示 GXTF 具有体液免疫增强作用。

表 5 GXTF 对免疫功能低下小鼠溶血素生成的影响

Table 5 Effect of GXTF on hemolysin formation in immunolowering mice

组别 Group	剂量 Dosage (g/kg)	动物数 Animal (只 Individual)	溶血素 Hemolysin (OD, $\bar{x} \pm s$)
对照组 Control		10	0.34 ± 0.109
环磷酰胺 (cy) Cyclophosphamide		10	0.29 ± 0.113
左旋咪唑+ cy Limidazole	0.05	10	0.423 ± 0.070 *
GXTF+ cy	0.1	10	0.429 ± 0.106
GXTF+ cy	0.05	10	0.395 ± 0.092

与环磷酰胺组比较 Compared with cyclophosphamide * $P < 0.05$;

** $P < 0.01$

2.6 急性毒性试验

用小鼠预试后, 另取小鼠 20 只, 雌雄各半。GXTF 以最大浓度和最大体积 (0.3 ml/10 g), 给小鼠 ig 给药, 24 h 连续用药 3 次, 连续观察 7 d, 记录动物体重、死亡及毒副反应情况。结果小鼠全部存活, 体重正常增长 (24%), 计算其最大耐受量为 22.5 g/kg。表明 GXTF 毒性很小。

3 讨论

现代医学认为, CCL₄ 进入肝细胞后, 经还原活化产生自由基, 通过脂质过氧化物的破坏, 使线粒体膜脂质溶解, 影响线粒体结构和功能, 使酶蛋白合成减少, 造成酶的破坏, 因而影响代谢功能和能量的生成, 致使肝细胞变性坏死。而 D-Gla 为肝细胞的磷酸尿嘧啶核苷的干扰剂, 可造成肝弥漫性坏死和炎症与临床病毒性肝炎的肝脏病理变化极为相似^[10]。GXTF 大小剂量组均能显著地抑制 CCL₄ 和 D-Gla 所致急性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 和 T-BIL 的升高, 减轻肝组织的病理损害程度, 其改善肝功能可能与抗氧化作用有关^[4]。ANIT 主要是损害肝内胆管上皮细胞, 产生胆汁郁积性黄疸, 出现高胆红素症和胆汁分泌减少, 因此, 治疗黄疸与胆汁的排泄, 尤其是与胆红素排泄有着密切的关系, GXTF 能降低 ANIT 所致总胆红素和 ALT 的升高, 显示有一定的退黄作用。

检测小鼠单核巨噬细胞的吞噬功能和用环磷酰胺复制免疫功能低下模型检测溶血素生成, 观察药物对免疫功能影响的实验表明, GXTF 可促进单核巨噬

(下转第 63 页 Continue on page 63)

5 结语

综上所述,转基因植物药物的开发研究还刚刚起步,还有许多具体问题有待于解决和规范化,相信,随着人们对植物再生系统、基因转移系统的完善和基因表达调控机制的深入了解,转基因植物药物的开发研究会在新的世纪里获得更大的发展。

参考文献

- 1 邵宏波. 分子生物学发展前沿与展望. 北京: 中国农业科技出版社, 1993.
- 2 刘 涂. 转基因植物——生产药物的新型生物反应器. 生物技术通报, 1999, 15(3): 23~ 27.
- 3 邱德有, 韩一凡. 红豆杉器官组织、细胞培养和基因工程的研究进展. 天然产物研究与开发, 1998, 10(1): 90~ 97.
- 4 高国庆, 李杨瑞, 林文雄. 转基因作物产业与风险评价. 广西农业科学, 2001, 1: 36~ 39.
- 5 沈桂芳, 苏 宁. 农业高新技术产业化发展趋势. 生物技术通报, 2001, 1: 1~ 15.
- 6 常 钰, 刘 涂, 胡之壁. 植物细胞和器官大规模培养研究的进展. 生物技术通报, 2001, 1: 31~ 35.
- 7 张银定, 王琴芳. 2000年全球转基因作物商品化概述. 生物技术通报, 2001, 3: 41~ 44.
- 8 林 琳, 李 青, 马贵宏等. 生物技术领域取得令人瞩目的成就. 生物工程进展, 2001, 21(3): 3~ 7.
- 9 王新国, 肖成祖. 用转基因植物生产基因工程疫苗. 生物工程进展, 1998, 18(1): 51~ 54.
- 10 洪 琅. 现代生物技术制药工业发展概况. 生物工程进展, 1998, 18(6): 4~ 9.
- 11 丁锡申. 中国基因工程药物产业化发展历史、现状、存在问题与国外的差距和发展战略. 生物工程进展, 1999, 19(1): 1~ 5.
- 12 Goddijn O J M, Pen J. Plants as bioreactors. TIBTECH, 1995, 13(9): 378~ 387.
- 13 Miele L. Plants as bioreactors for biopharmaceuticals

regulatory consideration. TIBTECH, 1997, 15(2): 45~ 50.

- 14 Walden R, Wingender R. Gene transfer and plant regeneration techniques. TIBTECH, 1995, 13(9): 324~ 331.
- 15 Hialt A, Cafferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. Nature, 1989, 342(6245): 76~ 78.
- 16 Songstad D D, Somers D A, Griesbach R J. Advances in alternative DNA delivery techniques. Plant Cell Tiss Org Cul, 1995, 40(1): 1~ 5.
- 17 Hamamoto H, Sugiyama Y, Nakagawa N et al. A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic and tomato. Biotechnol, 1993, 11(8): 930~ 932.
- 18 Duning K, Hippe S, Krenzler F et al. Synthesis and Self-assembly of a functional antibody in transgenic Nicotiana tobacco. Plant Mol Biol, 1995, 15(2): 281~293.
- 19 邵宏波, 初立业, 姜恩来. 转基因技术在果树抗性育种中的应用. 北方园艺, 1994, 3: 1~ 4.
- 20 Zuo W N, Weissinger A K, Boston R S. Expression of a maize ribosome-inactivating protein gene in transgenic tobacco plants. Plant physiol Suppl, 1995, 108(2): 150.
- 21 安成才, 李 毅, 陈章良. 核糖体失活蛋白研究进展. 生物技术通报, 1999, 15(2): 1~ 6.
- 22 周北雁, 李 毅, 陈章良. 北京大学的抗病毒转基因作物. 生物技术通报, 1999, 15(3): 42~ 45.
- 23 Matsumoto S, Ishi A, Ikura K et al. Expression of human erythro protein in cultured tobacco cells. Plant Mol Biol, 1995, 27(6): 1163~ 1172.
- 24 May G D, Afza R, Mason HS et al. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via Agrobacterium-mediated transformation. Biotechnol, 1995, 13(5): 486~ 492.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 59 页 Continue from page 59)

细胞的吞噬作用和提高免疫功能低下小鼠溶血素含量, 显示其能增强小鼠非特异性免疫功能和体液免疫功能, 因而起到保肝作用. 以上结果为 CX TF 的临床应用提供了依据

参考文献

- 1 全国中草药汇编编写组. 中草药汇编. 下册. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 788.
- 2 广西医药研究所. 广西药用植物名录. 南宁: 广西民族出版社, 1974. 203.
- 3 覃洁萍, 许学健, 李剑江. 广西瑶族藤茶化学成分的研究. 天然产物研究与开发, 1997, 9(4): 41.
- 4 钟正贤, 陈学芬, 周桂芬. 广西产藤茶总黄酮的药理研究. 广西科学, 1999, 6(3): 216~ 218.
- 5 钟正贤, 覃洁萍, 陈学芬等. 双氢杨梅树皮素对链脲霉素所

致糖尿病大鼠的降血糖作用. 广西科学, 2000, 7(3): 203~ 205.

- 6 钟正贤, 覃洁萍, 周桂芬等. 广西瑶族藤茶中双氢杨梅树皮素的药理研究. 中国民族医药杂志, 1998, 7(3): 42.
- 7 韩公羽, 沈企华编著. 植物药有效成分的研究与开发. 杭州: 杭州大学出版社, 1991. 94~ 102.
- 8 郭建生, 吴勇军, 王小娟等. 摄生肝泰胶囊对肝损伤动物治疗作用的实验研究. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 87.
- 9 施顺清, 任建伟, 李 健等. 虎杖、小田基黄煎剂的动物实验. 中成药研究, 1983, 6: 36.
- 10 李仪奎. 中药药理实验方法学. 上海: 上海科学技术出版社, 1999. 158~ 463.

(责任编辑: 蒋汉明)