

# 镰叶西番莲地上部分水提取物对乙醇诱导小鼠急性肝损伤的保护作用研究

卢传礼<sup>1,2,①</sup>

[1. 广东省生物工程研究所(广州甘蔗糖业研究所), 广东 广州 510316; 2. 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 西双版纳 666303]

**Study on protective effect of water extract from above-ground part of *Passiflora wilsonii* on ethanol-induced acute liver injury in mice** LU Chuanli<sup>1,2,①</sup> [1. Guangdong Bioengineering Institute (Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute), Guangzhou 510316, China; 2. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna 666303, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(1): 72-74

**Abstract:** Liver protective effect of water extract from above-ground part of *Passiflora wilsonii* Hemsl. (WEPW) on ethanol-induced acute liver injury in mice was evaluated. The results show that compared with normal group, alanine aminotransferase activity and contents of triglyceride, total cholesterol and very low-density lipoprotein in serum, liver index, and contents of triglyceride and malondialdehyde in liver tissue of mice in ethanol-induced acute liver injury group (giving volume fraction of 50% ethanol at dose of 12 mL · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> by gavage) increase significantly or obviously significantly. Compared with ethanol-induced acute liver injury group, alanine aminotransferase activity and triglyceride content in serum, liver index, and contents of triglyceride and malondialdehyde in liver tissue of mice given WEPW at doses of 100, 200, and 400 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> by gavage decrease obviously, and there is a concentration-dependent relationship. WEPW can obviously ameliorate liver accumulation of lipid droplets of mice with ethanol-induced acute liver injury by histopathological section of liver. It is suggested that WEPW has obvious preventive and protective effects on ethanol-induced acute liver injury in mice.

**关键词:** 镰叶西番莲地上部分; 急性肝损伤; 护肝

**Key words:** above-ground part of *Passiflora wilsonii* Hemsl.; acute liver injury; liver protection

中图分类号: R285.5; S567.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)01-0072-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.01.10

随着经济的发展,中国酒精性肝病的发病率呈逐年上升的趋势,目前,已成为仅次于传染性肝病的第2大类肝病<sup>[1]</sup>,因此,寻找防治酒精性肝病的有效药物具有重要的临床和社会意义。

镰叶西番莲(*Passiflora wilsonii* Hemsl.)隶属于西番莲科(Passifloraceae)西番莲属(*Passiflora* Linn.),分布于中国云南以及缅甸、泰国、老挝和越南等国家<sup>[2]</sup>,其地上部分又名锅铲叶,为中国西南地区少数民族的常用药物,常与其他药材配伍用于治疗急性黄疸型肝炎、肝硬化、肝炎和肝硬化腹水等肝脏疾病<sup>[3-7]</sup>。镰叶西番莲含有三萜、甾醇和黄酮类成分<sup>[8-10]</sup>。目前,关于镰叶西番莲有效成分及生理活性的报道较少。本研究首次运用乙醇诱导的小鼠急性肝损伤模型对镰叶西番莲的护肝效果进行评价,以期对镰叶西番莲的传统临床应用提供科学依据,并为防治酒精性肝病开拓新资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试镰叶西番莲地上部分于2017年10月采自云南省西双版纳傣族自治州勐遮镇,经中国科学院西双版纳热带植物园肖春芬高级实验师鉴定。凭证标本(HITBC091711)保存于中国科学院西双版纳热带植物园植物标本馆(HITBC)。

供试4周龄雄性NIH小鼠(18~22 g)由广东省医学实验动物中心提供,合格证号SCXK(粤)2013-0002,伦理委员会编号XTBG 2017-07-001。饲养室温度20℃~24℃,空气相对湿度30%~70%。

联苯双酯滴丸(批号NF4006)购自广州白云山星群(药业)股份有限公司;无水乙醇(优级纯)购自广东光华科技股

收稿日期: 2019-04-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81602991); 中国科学院“西部之光”项目; 广东省科学院项目(2019GDASYL-0103039)

作者简介: 卢传礼(1983—),男,安徽颍上人,博士,副研究员,主要从事天然药用植物有效成分的研究与开发。

①通信作者 E-mail: chuanlilu@163.com

份有限公司;血清中谷丙转氨酶活性(批号 20170122)、谷草转氨酶活性(批号 20170212)、甘油三酸酯含量(批号 20171218)和总胆固醇含量(批号 20161222)以及肝脏组织中甘油三酸酯含量(批号 20171228)的 ELISA 检测试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司;血清中极低密度脂蛋白含量(批号 20170725)以及肝脏组织中丙二醛含量(批号 20170712)和超氧化物歧化酶活性(批号 20170713)的 ELISA 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;羧甲基纤维素钠(批号 160072311)购自上海申光食用化学品有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 镰叶西番莲地上部分水提取物(WEPW)的制备 新鲜镰叶西番莲地上部分经 45 °C 鼓风干燥,粉碎后过 60 目筛。取 150 g 粉末,加入 1.5 L 自来水加热回流提取 1.5 h,纱布过滤后收集滤液,滤渣用上述方法重复提取 2 次。合并 3 次滤液,减压浓缩至约 100 mL,冷冻干燥后得到 WEPW 12.3 g。

1.2.2 动物分组、造模和给药 将 60 只小鼠适应性饲养 1 周后,按照体质量随机分为 6 组,每组 10 只。正常组(I)和乙醇诱导急性肝损伤模型组(II)小鼠以 20 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 剂量灌胃给予质量体积分数 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液,阳性对照组(III)小鼠灌胃给予联苯双酯-质量体积分数 0.5% CMC-Na 溶液(联苯双酯剂量为 200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),WEPW 的低剂量组(IV)、中剂量组(V)和高剂量组(VI)小鼠分别灌胃给予不同浓度 WEPW-质量体积分数 0.5% CMC-Na 溶液(WEPW 剂量分别为 100、200 和 400 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。每天 1 次,持续 7 d。从第 5 天开始,给药 4 h 后,除 I 组外,其他 5 组以 12 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 剂量灌胃给予体积分数 50% 乙醇溶液,建立乙醇诱导小鼠急性肝损伤。记录实验开始和结束时小鼠的体质量。末次给予体积分数 50% 乙醇溶液后禁食不禁水 16 h,眼眶取血,于 4 °C、3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上清液,-20 °C 保存、备用。取血完毕后处死小鼠,称量肝脏质

量。然后取部分肝脏组织,-80 °C 保存、备用,另取一部分肝脏组织进行病理学检测。

1.2.3 血清相关指标检测 按照试剂盒说明书进行实验操作,利用 Varioskan<sup>®</sup> Flash 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司)测定波长 510 nm 处的吸光度值,计算血清中谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性以及甘油三酸酯和总胆固醇的含量,测定波长 450 nm 处的吸光度值,计算血清中极低密度脂蛋白含量。

1.2.4 肝脏相关指标检测 取部分肝脏组织剪碎,加入 9 倍质量 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液(pH 7.4),充分匀浆后,于 4 °C、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清液。按照试剂盒说明书检测肝脏组织中甘油三酸酯含量、丙二醛含量和超氧化物歧化酶活性。按照公式“肝脏指数=(肝脏质量/实验结束时体质量)×100%”计算肝脏指数。

1.2.5 肝脏组织病理学检查 取部分肝脏组织,冷冻后切片(5 μm),加入油红 O 进行染色,在 BX41 光学显微镜(日本 Olympus 公司)下观察。

## 1.3 数据统计分析

采用 PASW Statistics 18.0 软件对实验数据进行统计分析,采用单因素方差分析进行显著性检验。

## 2 结果和讨论

镰叶西番莲地上部分水提取物(WEPW)对乙醇诱导急性肝损伤小鼠血清和肝脏相关指标的影响见表 1,对其肝脏组织病理学的影响见图 1。

### 2.1 对血清相关指标的影响

结果(表 1)显示:与正常组相比较,乙醇诱导急性肝损伤模型组小鼠血清中谷丙转氨酶活性以及甘油三酸酯、总胆固醇和极低密度脂蛋白的含量分别显著或极显著升高 2.8、2.6、

表 1 镰叶西番莲地上部分水提取物(WEPW)对乙醇诱导急性肝损伤小鼠血清和肝脏相关指标的影响( $\bar{X}\pm SE$ )<sup>1)</sup>

Table 1 Effects of water extract from above-ground part of *Passiflora wilsonii* Hemsl. (WEPW) on related indexes of serum and liver of mice with ethanol-induced acute liver injury ( $\bar{X}\pm SE$ )<sup>1)</sup>

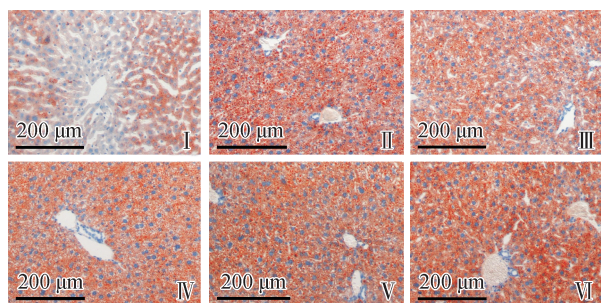
组别 Group	血清相关指标 Related indexes of serum					肝脏相关指标 Related indexes of liver			
	ALT	AST	TG	TC	VLDL	LI	TG	MDA	SOD
I	50.9±9.3	155.5±26.3	1.13±0.30	4.53±0.54	0.17±0.10	4.36±0.23	0.42±0.05	0.53±0.19	403.5±26.5
II	142.0±24.2#	213.9±40.2	2.89±0.90##	7.26±1.26##	1.76±0.44##	6.81±0.41##	0.97±0.27##	1.54±0.34##	236.3±26.6#
III	35.8±16.0**	152.3±44.9	1.12±0.34**	6.96±1.49	0.38±0.22*	5.46±0.39*	0.46±0.08*	0.69±0.24**	377.2±28.9*
IV	96.8±22.3	167.4±51.6	1.35±0.23*	7.61±1.29	0.63±0.42	6.15±0.49*	0.49±0.08	0.83±0.29	269.1±54.6
V	72.1±15.2*	165.7±36.4	1.09±0.24**	6.91±1.24	0.57±0.35	5.89±0.48*	0.40±0.12**	0.76±0.23*	328.2±48.9*
VI	64.7±12.9*	157.6±64.3	1.05±0.13**	7.17±1.02	0.44±0.24*	5.59±0.60*	0.39±0.04**	0.63±0.15*	347.9±26.3*

<sup>1)</sup> I: 正常组 Normal group; II: 乙醇诱导急性肝损伤模型组 Ethanol-induced acute liver injury group; III: 阳性对照组 Positive control group; IV: WEPW 低剂量组 WEPW group at low dose; V: WEPW 中剂量组 WEPW group at middle dose; VI: WEPW 高剂量组 WEPW group at high dose. ALT: 谷丙转氨酶活性 Alanine aminotransferase activity (U·L<sup>-1</sup>); AST: 谷草转氨酶活性 Aspartate aminotransferase activity (U·L<sup>-1</sup>); TG: 甘油三酸酯含量 Triglyceride content (mmol·L<sup>-1</sup>); TC: 总胆固醇含量 Total cholesterol content (mmol·L<sup>-1</sup>); VLDL: 极低密度脂蛋白含量 Very low-density lipoprotein content (μmol·L<sup>-1</sup>); LI: 肝脏指数 Liver index (%); MDA: 丙二醛含量 Malondialdehyde content (nmol·mg<sup>-1</sup>); SOD: 超氧化物歧化酶活性 Superoxide dismutase activity (nmol·mg<sup>-1</sup>). #和##分别表示与 I 组间存在显著(P<0.05)和极显著(P<0.01)差异 # and ## respect significant (P<0.05) and obviously significant (P<0.01) differences with group I, respectively. \* 和 \*\* 分别表示与 II 组间存在显著(P<0.05)和极显著(P<0.01)差异 \* and \*\* respect significant (P<0.05) and obviously significant (P<0.01) differences with group II, respectively.

1.6 和 10.4 倍,但谷草转氨酶活性无显著变化,表明乙醇诱导急性肝损伤模型造模成功。与乙醇诱导急性肝损伤模型组相比较,WEPW 中剂量组和高剂量组小鼠血清中谷丙转氨酶活性和甘油三酸酯含量显著或极显著降低,WEPW 高剂量组血清中极低密度脂蛋白浓度含量显著降低,但 WEPW 3 个剂量组均对血清中总胆固醇含量无显著影响,说明 WEPW 对乙醇诱导小鼠急性肝损伤有明显的预防作用。

## 2.2 对肝脏相关指标的影响及病理学检查结果

结果(表 1)显示:与正常组相比较,乙醇诱导急性肝损伤模型组小鼠的肝脏指数以及肝脏组织中甘油三酸酯和丙二醛的含量极显著升高,超氧化物歧化酶活性显著降低;与乙醇诱导急性肝损伤模型组相比较,WEPW 中剂量组和高剂量组的肝脏指数以及肝脏组织中甘油三酸酯和丙二醛的含量显著或极显著降低,超氧化物歧化酶活性显著升高,且作用强度具有浓度依赖性,说明 WEPW 能够改善乙醇诱导的小鼠肝脏氧化应激状态。此外,肝脏组织病理切片(图 1)显示:WEPW 3 个剂量组能够有效改善乙醇诱导急性肝损伤小鼠肝脏组织脂滴积累的状况。



I: 正常组 Normal group; II: 乙醇诱导急性肝损伤模型组 Ethanol-induced acute liver injury group; III: 阳性对照组 Positive control group; IV: WEPW 低剂量组 WEPW group at low dose; V: WEPW 中剂量组 WEPW group at middle dose; VI: WEPW 高剂量组 WEPW group at high dose.

图 1 镰叶西番莲地上部分水提取物(WEPW)对乙醇诱导急性肝损伤小鼠肝脏组织病理学的影响

Fig. 1 Effects of water extract from above-ground part of *Passiflora wilsonii* Hemsl. (WEPW) on liver histopathology of mice with ethanol-induced acute liver injury

山楂酸是一种天然的五环三萜类化合物,可有效减轻乙醇诱导的小鼠肝脏氧化和炎性损伤<sup>[11]</sup>,抑制高血糖引起的大鼠肝脏氧化损伤<sup>[12]</sup>,抑制四氯化碳诱导的肝细胞损伤<sup>[13]</sup>。镰叶西番莲含有山楂酸<sup>[8]</sup>,且作者测得 WEPW 中总三萜类含量高达  $247.97 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (未发表数据),推测山楂酸是锅铲叶保肝护肝的有效成分之一。

本研究首次证实了 WEPW 能够有效预防乙醇导致的小鼠急性肝损伤,并初步揭示其保肝护肝作用可能与改善肝脏的氧化应激状态有关,为其传统的保肝护肝功效应用提供了科学依据,但镰叶西番莲的临床疗效、药理活性、有效成分和作用机制等方面亟待进一步研究。

致谢:中国科学院西双版纳热带植物园李有云高级实验师在采样过程中给予了大力帮助,在此表示感谢!

## 参考文献:

- [1] 全国酒精性肝病调查协作小组. 全国酒精性肝病的多中心调查分析[J]. 中华消化杂志, 2007, 27(4): 231-234.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第五十二卷第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 107-108.
- [3] 袁凯文, 字 燕. 半截叶治疗急性黄疸型肝炎[J]. 中国民族民间医药杂志, 2006(81): 246-247.
- [4] 张绍云, 付开聪, 倪 亚, 等. 孟连县傣族治疗肝病的药用植物资源[J]. 中国民族医药杂志, 2008(2): 36-37.
- [5] 彭朝忠, 祁建军, 李先恩. 澜沧县傣族治疗肝病的药用植物资源[J]. 中国民族医药杂志, 2009(10): 49.
- [6] 陈 眉, 唐贞力, 杨维光, 等. 民族药锅铲叶临床应用的整理研究[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(18): 5-6.
- [7] 陈祖琨, 蒋 燕, 赵永刚, 等. 哈尼族医药特色初探[J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(1): 42-44.
- [8] 余继华, 李干鹏, 赵静峰, 等. 镰叶西番莲的化学成分[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(1): 27-29.
- [9] 李干鹏, 杨丽娟, 赵静峰, 等. 镰叶西番莲藤茎脂溶性化学成分的研究[J]. 林产化学与工业, 2007, 27(4): 27-30.
- [10] LI G P, ZHAO J F, TU Y Q, et al. A new phytosterone from *Passiflora wilsonii*[J]. Chinese Chemical Letters, 2004, 15(6): 659-660.
- [11] YAN S L, YANG H T, LEE H L, et al. Protective effects of maslinic acid against alcohol-induced acute liver injury in mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 74: 149-155.
- [12] MKHWANAZI B N, SERUMULA M R, MYBURG R B, et al. Antioxidant effects of maslinic acid in livers, hearts and kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats; effects on kidney function [J]. Renal Failure, 2014, 36(3): 419-431.
- [13] RAJOPADHYE A, UPADHYE A S. Estimation of bioactive compound, maslinic acid by HPTLC, and evaluation of hepatoprotective activity on fruit pulp of *Ziziphus jujube* Mill. cultivars in India[J]. Evidence-Based Complementary Alternative Medicine, 2016: 4758734.

(责任编辑: 张明霞)