

茶多酚对雷公藤内酯醇致小鼠肝损害的保护作用

李钦民, 韩真

■背景资料

中草药及其提取物引起的肝损害现已屡见不鲜, 临床表现多样化, 其机制也往往较为复杂。为促进植物药的研究和应用, 人们提取其有效活性成分, 并通过改变药物的剂型、吸收途径以及联合用药等多种方式以达增效减毒的目的, 某些传统解毒中药也受到研究者越来越多的重视。

■研发前沿

雷公藤内酯醇是从经典抗免疫中草药雷公藤分离得到的主要有效成分之一, 在器官移植抗排斥反应方面已显示广阔的应用前景, 但它的毒性限制了临床应用; 茶多酚是同样经典的减毒中草药茶叶中的主要有效成分, 国内外大量报道证实其对多种原因所致的实验性肝损伤有保护作用。本文将二者联合应用于小鼠观察茶多酚的肝肾保护作用, 并初步探讨相关机制。

李钦民, 韩真, 皖南医学院附属弋矶山医院消化内科 安徽省芜湖市 241001

通讯作者: 韩真, 241001, 安徽省芜湖市, 皖南医学院附属弋矶山医院消化内科. liqm1029@sohu.com

电话: 0553-5738856-2316 传真: 0553-573999-2021

收稿日期: 2006-01-20 接受日期: 2006-02-09

Protective effects of tea polyphenols on liver against triptolide-induced hepatic injury in mice

Qin-Min Li, Zhen Han

Qin-Min Li, Zhen Han, Department of Gastroenterology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China

Correspondence to: Zhen Han, Department of Gastroenterology, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui Province, China. liqm1029@sohu.com

Received: 2006-01-20 Accepted: 2006-02-09

Abstract

AIM: To investigate the effects of tea polyphenols (TP) on liver toxicity induced by triptolide (TPI) in mice, and to explore the correlated mechanism.

METHODS: Seventy mice were randomly and averagely divided into five groups: high dose TPI (0.03 mg/kg) group, low dose TPI (0.015 mg/kg) group, high dose TPI (0.03 mg/kg) plus TP (300 mg/kg) group, low dose TPI (0.03 mg/kg) plus TP (300 mg/kg) group, and control group. After treatment with the corresponding methods for 60 d, we observed the levels of serum alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), and the contents of malondialdehyde (MDA) in liver homogenate, as well as the histopathological changes of liver and kidney.

RESULTS: In comparison with those in control group, the level of serum ALT and the content of hepatic MDA were significantly elevated in group A and B (ALT: 63.7 ± 10.9 , 95.8 ± 12.5 $\mu\text{kat/L}$ vs 38.2 ± 5.6 $\mu\text{kat/L}$, $P < 0.01$; MDA:

8.11 ± 1.38 , 12.86 ± 2.01 nmol/mgp vs 6.39 ± 0.98 nmol/mgp, $P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the activities of hepatic SOD and GST were significantly dropped (92.31 ± 10.26 , 75.93 ± 9.11 U/mgp vs 122.23 ± 15.27 U/mgp, $P < 0.05$ or $P < 0.01$; 15.17 ± 4.41 , 11.25 ± 3.46 U/mgp vs 20.53 ± 5.16 U/mgp, $P < 0.05$ or $P < 0.01$). Pathological examination showed degeneration of hepatic and renal cells in group A and B. The level of serum ALT (39.4 ± 5.0 , 43.4 ± 6.3 $\mu\text{kat/L}$), the content of hepatic MDA (6.42 ± 1.04 , 6.58 ± 1.19 nmol/mgp) and the activity of SOD (119.10 ± 12.72 , 109.53 ± 11.58 U/mgp) had no significant difference in group C and D from those of control group. The activity of hepatic GST in group C was higher than that in control group (27.19 ± 5.24 U/mgp vs 20.53 ± 5.16 U/mgp, $P < 0.05$). No marked pathological changes of liver and kidney were observed in group C and D.

CONCLUSION: TPI has toxicity on the liver and kidney in mice, while TP can decrease the toxicity efficiently by inhibiting lipid peroxidation and inducing hepatic drug-metabolizing enzymes.

Key Words: Triptolide; Tea polyphenols; Liver toxicity; Lipid peroxidation

Li QM, Han Z. Protective effects of tea polyphenols on liver against triptolide-induced hepatic injury in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):908-911

摘要

目的: 观察不同剂量雷公藤内酯醇(TPI)致小鼠肝损害的作用以及茶多酚(TP)对其损害的保护作用, 并初步探讨相关机制。

方法: 昆明种小鼠70只, 随机平均分成5组: 低剂量TPI(0.015 mg/kg)组(A)、高剂量TPI(0.03 mg/kg)组(B)、低剂量TPI(0.015 mg/kg)+TP(300 mg/kg)组(C)、高剂量TPI(0.03 mg/kg)+TP(300 mg/kg)组(D)和正常对照组。实验60 d后观察各组小鼠肝功能酶、肝匀浆丙二醛(MDA)含量、过氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽-S转移酶(GST)活性及肝肾病理组织学的特点。

结果: 与对照组相比, A, B组血清ALT、肝匀浆MDA的含量显著提高(ALT: 63.7 ± 10.9 , 95.8 ± 12.5 $\mu\text{kat/L}$ vs 38.2 ± 5.6 $\mu\text{kat/L}$, $P < 0.01$; MDA: 8.11 ± 1.38 , 12.86 ± 2.01 nmol/mgp vs 6.39 ± 0.98 nmol/mgp , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肝匀浆SOD和GST的活性显著降低(92.31 ± 10.26 , 75.93 ± 9.11 U/mgp vs 122.23 ± 15.27 U/mgp , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 15.17 ± 4.41 , 11.25 ± 3.46 U/mgp vs 20.53 ± 5.16 U/mgp , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 病理组织学均可见肝肾细胞变性等改变; C, D组血清ALT(39.4 ± 5.0 , 43.4 ± 6.3 $\mu\text{kat/L}$)、肝匀浆MDA含量(6.42 ± 1.04 , 6.58 ± 1.19 nmol/mgp)、SOD活性(119.10 ± 12.72 , 109.53 ± 11.58 U/mgp)无显著性改变, 肝肾病理组织学未见异常. C组肝匀浆GST的活性增高(27.19 ± 5.24 U/mgp vs 20.53 ± 5.16 U/mgp , $P < 0.05$).

结论: TPI对小鼠肝肾均有一定的损害, 而TP具有很好的保护作用, 其机制与对抗脂质过氧化反应和诱导肝药酶有关.

关键词: 雷公藤内酯醇; 茶多酚; 肝毒性; 脂质过氧化

李钦民, 韩真. 茶多酚对雷公藤内酯醇致小鼠肝损害的保护作用. 世界华人消化杂志 2006;14(9):908-911

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/908.asp>

0 引言

雷公藤内酯醇(triptolide, TPI), 又称雷公藤甲素, 是从卫矛科雷公藤属植物中分离得到的二萜内酯化合物, 是雷公藤中的主要有效成分之一, 具有显著的免疫抑制、抗炎、抗生育及抗肿瘤等多种生物活性, 尤其在器官移植抗排斥反应方面具有广阔的应用前景^[1]. 同时他属于毒性很强的药物, 多系统不良反应限制了他的临床应用. 茶多酚(tea polyphenols, TP)是茶叶中一种主要活性成分, 具有清除自由基和抗氧化等重要生物活性, 对多种原因所致的实验性肝损伤有保护作用^[2]. 本实验旨在观察TPI对小鼠肝脏的毒性作用, 并通过TP的对照干预观察TP的保护作用, 探讨相关机制, 为TPI和TP的进一步临床应用和研究提供实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物用健康成年昆明种小鼠70只(购自南京医药大学实验动物中心), 雌雄各半, 体质量 20 ± 2 克. TPI由中国医学科学院南京皮肤病研究所马鹏程教授惠赠, 纯度99.78%, 用二甲亚砜(DMSO)配成2 g/L原液, -20°C 保存, 用

时配成所需浓度溶液. TP购自安徽茶多酚厂(TP含量为99.1%, 儿茶素含量83.9%, EGCG含量57.2%, 批号: 20050320-2). 相关生化指标测定的试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供.

1.2 方法 实验动物70只随机平均分成5组, 每组14只, 雌雄各半(分笼饲养): A组, 每天灌胃TPI 0.015 mg/kg; B组, 每天灌胃TPI 0.03 mg/kg; C组, 每天灌胃TPI 0.015 mg/kg+TP 300 mg/kg; D组, 每天灌胃TPI 0.03 mg/kg+TP 300 mg/kg; 正常对照组, 每天灌胃生理盐水. 每天给药1次, 连续60 d, 小鼠在实验期间自由进食和饮水, 每周称体质量一次, 根据体质量调整用药量. 末日隔夜禁食不禁水, 次日晨摘眼球取血后处死小鼠, 分离血清测定肝功能, 并取所需器官测定质量计算脏器指数、肝匀浆生化指标及病理组织学检查.

1.2.1 肝功能测定 标本采用空腹12 h以上的动脉血, 取血后立即分离血清, -80°C 保存, 测定血清谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP).

1.2.2 肝匀浆生化指标测定 取肝左叶, 4°C 下制成100 g/L肝匀浆, 分别测定丙二醛(MDA)、过氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽-S转移酶(GST). 结果以每克肝组织蛋白的含量表示. MDA采用硫代巴比妥酸法(TBA法); SOD采用羟胺法; GST采用化学比色法; 组织蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定. 以上均按试剂盒说明书操作方法测定.

1.2.3 病理组织学检查 取肝左叶及右肾, 40 g/L甲醛固定, 石蜡包裹, 切片后常规HE染色, 显微镜下观察肝组织及肾组织病理变化. 每张切片分别随机拍摄2个视野的低倍镜(10×10)和高倍镜(10×40)图像, 观察肝细胞变性情况.

统计学处理 定量资料数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 使用单因素方差分析以及SNK- q 检验进行统计分析.

2 结果

2.1 肝肾脏器指数 实验期间, 各组小鼠活动、进食、毛发正常, 实验4 wk时, B组雌鼠死亡1只; 实验结束时观察各组肝肾脏器指数, B组肝肾脏器指数与对照组相比显著下降($P < 0.01$); A、C、D三组肝肾脏器指数与对照组相比无显著差异($P > 0.05$, 表1).

2.2 血清ALT、ALP AST是肝细胞内非特异性功能酶, 血清ALT是反映肝细胞损伤较灵敏的指标; ALP主要从胆汁中排泄, 胆汁淤积时血清

■ 相关报道

华中科技大学药物研究所梅之南 *et al*利用固体脂质纳米粒降低小鼠雷公藤内酯醇肝毒性取得显著效果, 但固体脂质纳米粒工艺繁琐、价格昂贵, 难以推广使用, 另外, 他们对肾脏等其他脏器的影响也未作探讨.

■ 创新盘点

本文首次运用茶多酚对雷公藤内酯醇致小鼠肝损害进行干预, 发现雷公藤内酯醇的肝脏损害与雷公藤内酯醇自身固有性引起肝细胞脂质过氧化等机制有关; 而茶多酚对肝肾均有很好的保护作用, 其作用与抗氧化、诱导肝药酶的活性等有关.

■应用要点

本研究为雷公藤内酯醇和茶多酚的进一步研究和临床应用提供了实验基础,也为有毒中药的减毒治疗研究提供了新的思路。

ALP增高。如表2所示, A、B两组ALT活性与对照组相比显著升高; C、D两组ALT活性与对照组无显著差异; A组与C组、B组与D组ALT活性相比均有显著升高, B组与A组相比也有显著升高; A、B、C、D组ALP与对照组无显著差异。

2.3 肝匀浆生化指标 SOD、MDA是反映组织脂质过氧化常用的指标, GST是肝药酶的一种, 兼有清除体内过氧化物及解毒双重功能。如表3所示, A、B两组肝组织SOD、GST活性及MDA含量与对照组有显著差异(表现为SOD、GST活性降低, MDA含量增加), 而C、D两组SOD活性及MDA含量与对照组比较变化不明显; C组GST活性高于对照组。

2.4 病理组织学改变 (1)各组肝脏、肾脏大体形态正常, 包膜完整, 色泽鲜红, 未见明显病变。(2)光镜下HE染色显示肝细胞索排列规则, A、B两组可见肝细胞水样变性, 伴片状坏死, 坏死区可见大量淋巴细胞浸润, 以小叶3区带显著; 此外A、B两组还可见肾小球滤过膜细胞显著增生, 部分切片可见肾小球坏死伴淋巴细胞浸润, 同时有肾小管上皮细胞变性和轻度坏死, 部分肾小管管腔内可见蛋白管型; B组病变较A组显著, 雌性较雄性病变显著。C、D、E组肝脏及C、E组肾脏大致正常, D组肾脏亦有肾小球滤过膜细胞增生及肾小管上皮细胞变性, 但程度较轻, 并且无肾小球、肾小管上皮细胞的坏死。

3 讨论

随着中草药及其制剂日益广泛使用, 植物药引起药物性肝病的报道及相关药物种类也逐年增加^[3]。药物一般通过中毒性肝损害、免疫反应介导两种途径引起肝脏损害, 前者呈剂量依赖性, 即剂量越大, 损害越重, 而后者往往和个体体质有关, 无明显剂量依赖性。雷公藤临床使用安全范围比较窄, 不良反应时有报道。TPI是雷公藤主要有效成分, 同时又是毒性成分, 肝损害是其主要副反应之一^[4]。通过本实验观察, TPI肝脏损害主要表现为非特异性肝细胞变性、坏死, 无胆汁淤积, 雌性小鼠肝损害较雄性显著, 且损害程度与剂量呈正比, 提示TPI是通过自身固有毒性直接引起肝脏损害。药物本身含有的或经肝药酶代谢产生的有毒物质如自由基、亲电子基、氧基等, 可通过肝脏SOD、GST等的解毒作用而不产生肝损伤, 当这些有毒活性物质的产生超过了肝脏的代偿水平, 即可发生中毒性肝损害^[5]。本实验中肝匀浆SOD、GST活性降低及MDA含

表 1 实验60 d后小鼠肝肾脏器指数 (mean ± SD)

组别	n	脏器指数(×10 ⁻²)	
		肝	肾(右侧)
A组	14	3.23 ± 0.29	0.67 ± 0.036
B组	13	2.89 ± 0.22 ^b	0.61 ± 0.047 ^b
C组	14	3.40 ± 0.30	0.69 ± 0.043
D组	14	3.47 ± 0.37	0.67 ± 0.033
对照组	14	3.51 ± 0.33	0.70 ± 0.048

^bP<0.01 vs 对照组。

表 2 实验后小鼠血清ALT、ALP活性 (mean ± SD, μkat/L)

组别	n	ALT	ALP
A组	14	63.7 ± 10.9 ^{bc}	72.7 ± 12.5
B组	13	95.8 ± 12.5 ^{bf}	85.9 ± 15.4
C组	14	39.4 ± 5.0	63.6 ± 16.2
D组	14	43.4 ± 6.3	78.1 ± 15.9
对照组	14	38.2 ± 5.6	61.1 ± 15.3

^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05 vs C、B、D组; ^fP<0.01 vs A组。

表 3 肝组织 SOD、GST活性、MDA含量 (mean ± SD)

组别	n	SOD (U/mgp)	MDA (nmol/mgp)	GST (U/mgp)
A组	14	92.31 ± 10.26 ^{ac}	8.11 ± 1.38 ^{ac}	15.17 ± 4.41 ^{ac}
B组	13	75.93 ± 9.11 ^{bc}	12.86 ± 2.01 ^{bc}	11.25 ± 3.46 ^{bc}
C组	14	119.10 ± 12.72	6.42 ± 1.04	27.19 ± 5.24 ^a
D组	14	109.53 ± 11.58	6.58 ± 1.19	18.99 ± 6.31
对照组	14	122.23 ± 15.27	6.39 ± 0.98	20.53 ± 5.16

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组; A和B组、A和C组及B和D组间比较, ^cP<0.05。

量显著增加提示TPI肝毒性应与过量自由基、亲电子基、氧基等产生引起肝细胞脂质过氧化等病变有关。

TP含有多个酚羟基, 极易被氧化成为醌类而提供质子H⁺, 具有较强的供氢能力, 能够显著地清除体内的有害自由基并抑制原来的自由基链锁反应。Lee *et al*^[6]在Fe³⁺诱导的沙鼠脑组织匀浆脂质过氧化过程中, 发现TP单体EGCG抗脂质过氧化能力超过trolox、硫辛酸和褪黑素等常见的抗氧化物质。除了抗氧化作用之外, TP还可通过抑制肠道细菌生长以减少肠源性内毒素产生^[7]、阻断NF-κB活化和TNF-α mRNA及其蛋白表达^[8]等途径参与肝脏保护作用。本实验结果提示, TP可有效降低TPI致肝损害的小鼠肝组织过氧化产物MDA含量、增强SOD活性, 提高肝脏抗氧化能

力. TP同时显著增强GST活性, 提高肝脏解毒能力, 提示TP的肝脏保护作用还与诱导肝药酶的活性有关. 我们同时观察肾脏的变化, 进一步证实TP对肾脏亦有很好的保护作用^[9], 相关保护机制尚有待进一步研究.

总之, TPI在器官移植、抗炎、抗生育及抗肿瘤等领域有很好的疗效, 但对肝肾均有一定的损害; 而TP具有很好的保护作用, 且在我国来源广泛, 价格低廉, 将二者联合使用有很好的应用前景, 也为中药的减毒治疗提供了思路, 但尚需对二者联用后的疗效作进一步的观察.

4 参考文献

- 1 梅之南, 杨祥良, 徐辉碧. 雷公藤内酯醇的药理研究. 中国医院药学杂志 2003; 23: 9
- 2 刘少锋, 韩真. 茶多酚的生物活性及其对实验性肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2429-2431
- 3 Aithal GP. When is a herb a drug? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 391-393
- 4 Mei Z, Li X, Wu Q, Hu S, Yang X. The research on the anti-inflammatory activity and hepatotoxicity of triptolide-loaded solid lipid nanoparticle. *Pharmacol Res* 2005; 51: 345-351
- 5 刘平, 宋东春. 药物性肝损伤的发病机理. 中华肝脏病杂志 2001; 6: 40
- 6 Lee SR, Im KJ, Suh SI, Jung JG. Protective effect of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates. *Phytother Res* 2003; 17: 206-209
- 7 Zhong Z, Froh M, Connor HD, Li X, Conzelmann LO, Mason RP, Lemasters JJ, Thurman RG. Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by green tea extract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G957-G964
- 8 Ooshima T, Minami T, Matsumoto M, Fujiwara T, Sobue S, Hamada S. Comparison of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols in SPF rats. *Caries Res* 1998; 32: 75-80
- 9 陈贵良, 刘惠茹, 姚林, 张艳淑. 茶多酚对关木通所致小鼠肾脏损伤及锌、铜、镁含量的影响. 中国职业医学 2005; 32: 27-29

■同行评价

文章具有一定的科学性, 但创新性不够, 不过仍不失为好的探索.

电编 李琪 编辑 王瑾晖

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

●消息●

技法与经验

本刊讯《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏, 及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验. 我们热烈欢迎本领域主任医师、副主任医师踊跃投稿, 免费刊登彩色照片(附单位证明). 写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法 1.1 原理; 1.2 适应证; 1.3 器材准备; 1.4 步骤; 1.5 实例

2 结果

3 讨论 3.1 并发症; 3.2 优点和缺点; 3.3 经验与技巧

4 参考文献