

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2023-02-006

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

## 桑叶提取物对 APAP 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用<sup>①</sup>

冯郁江<sup>1②</sup>, 曾义期<sup>1</sup>, 陈 坚<sup>1</sup>, 朱万权<sup>1</sup>, 周军媚<sup>2ab③</sup>

(1. 桂林医学院临床医学院, 广西 桂林 541001; 2. 桂林医学院附属医院 a. 广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室, b. 广西神经鞘脂代谢相关疾病基础研究重点实验室, 广西 桂林 541001)

**摘要** 目的: 探究桑叶提取物对对乙酰氨基酚 (APAP) 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用。方法: 选取 30 只健康雄性昆明小鼠 (KM), 分为对照组、APAP 模型组、桑叶提取物组, 每组 10 只。桑叶提取物组预防性连续给药 7 d, 末次给药 2 h 后桑叶提取物组和 APAP 模型组腹腔注射 300 mg/kg APAP, 建立急性肝损伤模型。24 h 后取材, 观察肝脏损伤情况, 生化法检测血清中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 水平, HE 染色观察肝脏组织病理损伤程度。结果: 与对照组相比, APAP 模型组的肝组织肉眼可见部分点状瘀血坏死, 血清中 AST、ALT 明显升高, HE 染色镜检见肝脏组织有凝固样坏死; 而桑叶提取物组的肝脏损伤较 APAP 模型组明显减轻。结论: 桑叶提取物对 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤具有保护作用。

**关键词:** 桑叶提取物; 对乙酰氨基酚; 急性肝损伤; 保护作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2023)02-0038-05

## The protective effect of mulberry leaf extract on acute liver injury induced by APAP in mice<sup>①</sup>

FENG Yujiang<sup>1②</sup>, ZENG Yiqi<sup>1</sup>, CHEN Jian<sup>1</sup>, ZHU Wanquan<sup>1</sup>, ZHOU Junmei<sup>2ab③</sup>

(1. Clinical Medical College, Guilin Medical University, Guilin 541001; 2. a. Guangxi Key Laboratory of Molecular Medicine for Liver Injury and Repair, b. Guangxi Health Commission Key Laboratory of Basic Research in Sphingolipid Metabolism Related Diseases, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China)

**Abstract** Objective: To explore the protective effect of mulberry leaf extract on acute liver injury induced by paracetamol (APAP) in mice. Methods: 30 healthy male Kunming mice (KM) were selected and divided into the control group, APAP model group and mulberry leaf extract group, with 10 mice in each group. The mulberry leaf extract group were given prophylactic administration for 7 days, and the APAP model group and the mulberry leaf extract group were given intraperitoneal injection of 300 mg/kg APAP

① 基金项目: 广西自然科学基金面上项目 (2019JJA140718); 国家自然科学基金地区项目 (82062124); 自治区级大学生创新创业训练计划项目 (S20210601072)。

② 第一作者简介: 冯郁江, 就读于桂林医学院临床医学院 2019 级临床医学专业。

③ 通信作者: 周军媚, E-mail: 6376994@qq.com。

after 2 hours, the last administration to establish the acute liver injury model. 24 hours later, the samples were collected to observe the liver injury. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected by biochemical method, and the pathological injury degree of liver tissue was observed by HE staining. Results: Compared with the control group, the liver tissue of APAP model group was partially punctate blood stasis and necrosis, the serum AST and ALT were significantly increased, and the liver tissue showed coagulation necrosis by HE staining and microscopy. However, the liver injury of mulberry leaf extract group was significantly less than that of APAP model group. Conclusion: Mulberry leaf extract has protective effect on APAP induced acute liver injury in mice.

**Keywords:** mulberry leaf extract; paracetamol; acute liver injury; protective effect

对乙酰氨基酚(paracetamol, APAP)是非甾体类抗炎药中较常用的一种,能使生成的前列腺素减少,发挥解热镇痛作用。APAP 应用广泛,是 600 多种处方药和非处方药的活性成分,常用于缓解普通及流行性感冒引起的高热,减轻中度疼痛症状,因而存在不知不觉中过量服用的风险。而过量服用 APAP 常引起固有性肝损伤,其损害程度与剂量呈正相关,特别是给孕妇使用可能会增加胎儿的神经发育、生殖和泌尿系统疾病的风险<sup>[1]</sup>。在美国,50%的急性肝损伤由 APAP 过量使用造成,每年约有 500 人因此死亡<sup>[2]</sup>。国内药物性肝损伤流行病学研究结果显示,APAP 类药物占 22.1%<sup>[3]</sup>。APAP 所致的急性药物性肝损伤作用机制复杂,主要表现为氧化应激作用。因此,研究 APAP 引起的药物性急性肝损伤的预防与治疗有着重要的临床意义。

从中药中寻找预防或治疗 APAP 引起的急性肝损伤不失为一种策略。桑叶是桑科植物桑的干燥叶,全国大部分地区多有生产,桑叶味苦、甘,性寒,归肝、肺经,富含维生素、黄酮、多酚、类生物碱等多种营养物质和活性成分<sup>[4]</sup>。在药效上具有疏散风热、清肺润燥、平肝明目、凉血止血的作用;在细胞分子水平上具有抗炎、抗氧化等功效<sup>[5-6]</sup>。虽然桑叶已经被广泛用于糖尿病治疗<sup>[7]</sup>,但在对 APAP 所致的药物性肝损伤的保护作用方面研究较少。据此,本研究旨在分析桑叶在肝脏损伤预防治疗领域的药用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品、试剂与仪器

20%桑叶黄酮购买于河南信阳市沐凡生物科技有限公司;纯度(AR)99%的 APAP 购买于上海麦克

林生化科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)检测试剂盒及 BS-460 全自动生化分析仪,均购自广西南宁市博美生物科技有限公司;苏木素染色液、伊红染色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司;TKD-BMB 型石蜡包埋机,冷冻工作台,TKD-TK 摊片、烤片机为湖北康强医疗器械有限公司制造;轮转切片机 RM2245 为 Leica Biosystems Nussloch GmbH 制造。

### 1.2 实验动物

健康雄性 KM 30 只,适应性喂养至 8~10 周龄,体重 30~40 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证:SCXK(湘)2019-0004 号,实验动物使用合格证:SYXK(桂)2020-0005 号。动物饲养于 SPF 级动物房,12 h 昼夜交替,环境室温(22±2)℃,相对湿度 40%~70%。动物实验经桂林医学院实验动物伦理委员会审批。

### 1.3 动物分组、给药及造模

将 30 只雄性 KM 随机分为对照组、APAP 模型组、桑叶提取物组(50 mg/kg),每组各 10 只。桑叶提取物组以桑叶提取物灌胃连续给药 7 d,1 次/d,药物浓度为 3.75 mg/ml,给药体积为 15 ml/kg。对照组及 APAP 模型组以清水灌胃(15 ml/kg)。腹腔注射前 12 h 禁食不禁水,末次给药 2 h 后,APAP 模型组及桑叶提取物组腹腔注射 300 mg/kg APAP 生理盐水溶液(APAP 溶解于 70℃水浴加热的生理盐水 1 h,APAP 浓度为 20 mg/ml、给药体积为 15 ml/kg,溶解后于 42℃水浴保温析出)建立急性药物性肝损伤模型,对照组小鼠腹腔注射生理盐水溶液(15 ml/kg,42℃水浴保温),注射 24 h 后取材进行实验。

## 1.4 指标测定

1.4.1 肝脏系数测定 雄性 KM 急性肝损伤模型建立 24 h 后,处死各组小鼠,分离并取出肝脏组织,用生理盐水冲洗肝脏表面残留血液,滤纸拭干,电子天平精密称量质量,计算肝脏系数。

$$\text{肝脏系数}(\%) = \frac{\text{肝质量}}{\text{体质量}} \times 100\%$$

1.4.2 血清 ALT、AST 水平测定 各组小鼠采取眼眶静脉取血,静置 30 min,离心(3 000 r/min, 15 min, 4 ℃),分离血清,生理盐水稀释到 1/10 后,参照说明书,使用 BS-460 全自动生化分析仪进行各组 ALT、AST 水平检测。

1.4.3 肝组织病理学 观察后取小鼠肝右叶,在 4%多聚甲醛中 4 ℃摇床固定 24 h,清水漂洗 3 次,2~3 h/次,后清水静置过夜,经石蜡包埋,切片(5 μm),烤片,苏木精-伊红(HE)法染色后,通过显微镜观察小鼠肝组织。

## 1.5 统计学方法

采用 SPSS 23.0 进行数据分析,非正态分布计量资料以四分位数[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]表示,多组间比较采用非参数检验,事后两两比较采用 Kruskal-Wallis,  $\alpha = 0.05$  为统计基准。

## 2 结果

### 2.1 桑叶提取物对 APAP 诱导小鼠急性肝损伤的肝脏指数和肝脏形态的影响

脏器系数是指动物某脏器的重量与其体重之

比,正常时较为恒定,当脏器受损时脏器系数随之发生改变,因而是毒理实验常用指标<sup>[8]</sup>。从表 1 中可见,对照组的肝脏系数比 APAP 模型组的肝脏系数低,两组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 APAP 急性肝损伤使得脏器系数增高;而桑叶提取物组的肝脏指数与对照组相近,两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明桑叶提取物有助于肝脏指数的恢复。预实验及正式实验得出死亡率数据相似,从整体上说,桑叶提取物组死亡率相较于 APAP 模型组有显著下降。

表 1 桑叶提取物对急性肝损伤小鼠肝脏系数、死亡率的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	肝脏系数	死亡率
对照组	5.59 ± 0.59	0
APAP 模型组	5.90 ± 0.60*	23.0
桑叶提取物组	5.53 ± 0.47 <sup>#</sup>	7.6

与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与 APAP 模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$

与对照组相比,APAP 模型组肝脏明显肿大,颜色暗红不均一,表面可见点状坏死灶,被膜稍欠光滑,呈颗粒感。桑叶提取物组与 APAP 模型组相比,肿胀明显减轻,颜色较均一,未见表面明显坏死灶,被膜光滑,见图 1。



图 1 桑叶提取物对急性肝损伤小鼠肝脏形态的影响

## 2.2 桑叶提取物对 APAP 诱导小鼠急性肝损伤血清中 ALT、AST 水平的影响

与对照组相比, APAP 模型组小鼠血清 ALT、AST 水平显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 APAP 模型组相比, 桑叶提取物组小鼠血清 ALT、AST 水平显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 各组间比较 ALT 与 AST, 其差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); APAP 模型组的 ALT 高于对照组, APAP 模型组、桑叶提取物组的 AST 均高于对照组, 见表 2。

表 2 桑叶提取物对小鼠血清中 ALT、AST 水平的影响 [50% (25%, 75%), (U/L),  $n = 10$ ]

	ALT	AST
对照组	6.00 (5.00, 9.03)	18.60 (15.75, 24.93)
APAP 模型组	61.60 (10.60, 1399.53)*	47.20 (26.78, 1208.33)*
桑叶提取物组	7.95 (5.35, 9.43)#	22.45 (19.38, 28.93)#

与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 APAP 模型组比较, # $P < 0.05$

## 2.3 桑叶提取物对 APAP 诱导小鼠急性肝损伤的影响

对照组小鼠肝组织细胞以中央静脉区为中心, 呈放射状排列, 肝小叶结构、形态正常, 肝板排列整齐, 肝细胞排列紧密, 未见有变性、坏死以及炎细胞浸润。APAP 模型组可见肝小叶结构排列紊乱, 肝细胞以中央静脉区为中心, 出现向四周呈局灶性环状凝固样坏死的分布, 可见细胞核固缩、碎裂, 伴有轻微的炎细胞浸润。与 APAP 模型组相比, 桑叶提取物组肝脏小叶结构有所恢复, 肝细胞结构清晰, 呈条索状密集排列, 肝组织中央静脉区出现凝固性坏死程度明显减轻, 肝细胞细胞核出现碎裂的程度明显下降, 有中等程度的炎细胞浸润于汇管区, 见图 2。

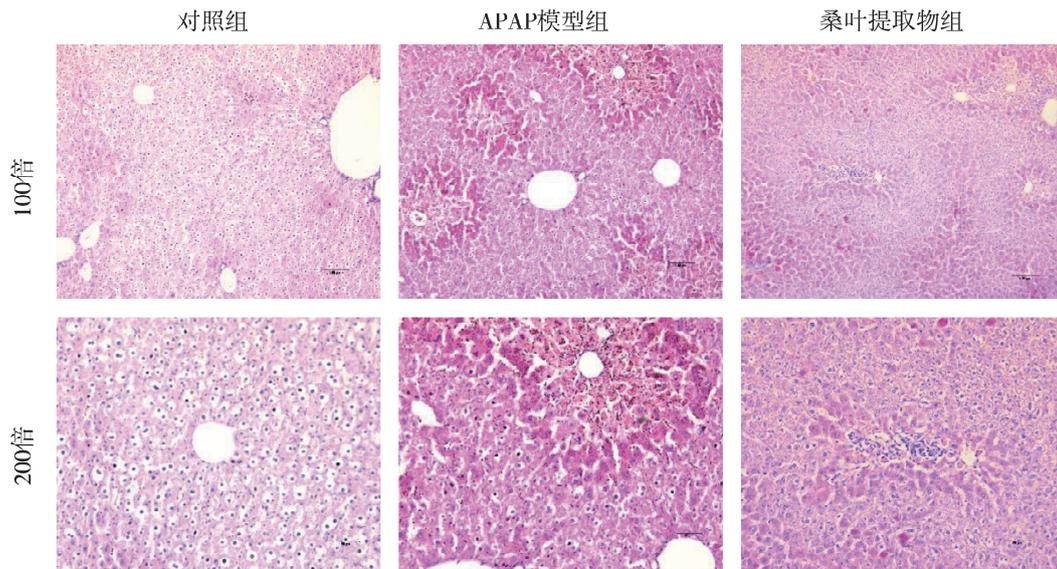


图 2 显微镜下观察小鼠肝组织形态

## 3 讨论

本实验通过使用桑叶提取物灌胃预防性干预后, 建立 APAP 急性药物性肝损伤模型, 从肝组织情况、肝功能指标、肝脏病理组织切片等方面, 发现桑

叶提取物对小鼠急性肝损伤具有保护作用。预实验发现, APAP 雄性 KM 模型中存在一定的个体差异性, 但通过夜间禁食 12 h 后可提高稳定性, 而在雌性小鼠中, 同剂量出现耐受性较好的现象, 推测可能与

雌激素相关受体有关,需进一步实验证明,故选用雄性 KM。

有研究表明,脂肪肝患者通常表现为血清抗氧化剂浓度较低,脂质的过氧化和自由基的抗氧化剂消耗使得肝脏更易因药物而发生氧化损伤<sup>[9]</sup>;而桑叶提取物中黄酮类化合物兼具有高抗氧化性和低毒性的特点,可作为抗氧化剂的替代物<sup>[10]</sup>。实验数据证明,桑叶提取物组的肝脏形态、大小以及肝脏系数与对照组相似,且较 APAP 模型组损伤的程度显著降低,可能是桑叶黄酮通过抗氧化作用,减轻氧化应激所产生的不良后果,起到保护肝的作用;同时又因桑叶具有降脂作用<sup>[11]</sup>,可减轻肝脏脂肪的堆积,起到改善肝功能和保护肝的作用。桑叶提取物具备降脂和抗氧化的双重优势,故脂肪肝患者可选择使用 APAP 药物。

AST、ALT 分别存在于细胞的线粒体和胞浆中,当肝细胞损伤严重时,细胞膜通透性增加,肝细胞胞浆内的 ALT、线粒体内的 AST 会被释放入血液中,致血清中的 AST、ALT 含量增多,因此,血清中 AST、ALT 的变化可反映生物体肝脏组织的受损程度<sup>[12]</sup>。实验数据表明,桑叶提取物组的 ALT、AST 虽然有所升高,但较 APAP 模型组升高程度低,且病理切片中,APAP 模型组凝固性坏死严重,而桑叶提取物组未见明显的凝固性坏死,表明桑叶提取物对 APAP 诱导的肝细胞损伤具有保护作用,机制可能与黄酮类物质可修复肝细胞因自身线粒体异常造成自身氧化导致细胞凋亡的肝细胞有关。

综上所述,桑叶提取物对 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤具有保护作用,可能与其抗氧化应激、稳定肝细胞内环境稳定及改善肝功能有关,详细机制还需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] BAUER A Z, SWAN S H, KRIEBEL D, et al. Paracetamol use during pregnancy-a call for precautionary action[J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(12): 757-766.
- [2] LEE W M. Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away? [J]. J Hepatol, 2017, 67(6): 1324-1331.
- [3] 沈毅,黄昕,王誉雅,等.我国药物性肝损伤流行病学研究现状[J].临床肝胆病杂志,2018,34(6):1152-1155.
- [4] 李来成,张士凯,许方舟,等.桑叶综合利用的研究进展[J].食品工业科技,2022,43(2):397-404.
- [5] 黄思雨.绿茶、桑叶和臭黄荆叶细粉抗氧化、抗炎及肠道益生性探究[D].重庆:西南大学,2020.
- [6] WEN L R, SHI D D, ZHOU T, et al. Identification of two novel prenylated flavonoids in mulberry leaf and their bioactivities[J]. Food Chem, 2020, 315: 126236.
- [7] 韦芳媚.桑叶提取物、茶多酚及其复配物的抗氧化和降血糖活性[D].广州:华南理工大学,2019.
- [8] 赵文俊.九里香叶总黄酮对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用及机制研究[D].长春:吉林大学,2022.
- [9] 马小璐,于健.中西医药物治疗非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J].华夏医学,2019,32(5):160-163.
- [10] 夏鑫,余曼荣,曾青华,等.桑叶提取物及其在动物生产上的应用研究进展[J].中国饲料,2019,(7):4-8.
- [11] 何德华,王家佩,次旺仁真,等.桑叶功效成分与作用的研究[J].农业科技与装备,2022(2):39-41.
- [12] 朱平生,孟玉,付双楠,等.CCl<sub>4</sub>致大鼠肝损伤 24 h 生物标志物水平的变化规律[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(2):124-128.

[收稿日期:2022-11-07]

[责任编辑:桂根浩 英文编辑:李佳睿]