

鱼腥草多糖对小鼠肝、肾、心肌和脑组织 抗氧化作用的研究

刘光建¹, 王璐¹, 王菲菲¹, 王彩红¹, 孙设宗^{2*}

(1. 湖北医药学院第一临床学院麻醉学系, 湖北 十堰 442000;

2. 湖北医药学院生化与免疫学实验室, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的: 探讨鱼腥草多糖对小鼠肝、肾、心和脑组织体内外的抗氧化作用。方法: 昆明种小鼠 50 只随机分空白对照组、病理模型组; 鱼腥草多糖各保护组, 每天分别给 30, 60, 120 mg·kg⁻¹ 剂量的鱼腥草多糖 ig, 连续 7 d, 末次 ig 2 h, 空白对照组腹腔 ip 调和油溶液, 其余各组 ip 0.15% CCl₄ 调和油溶液, 24 h 眼球取血测定血清中 ALT, AST 活性。处死小鼠取出肝脏称质量计算肝体指数; 制备肝、肾、心、脑组织匀浆测定 MDA 的含量, 经 fenton 反应诱导产生自由基检测各组织, 吸光度 ($A_{532\text{ nm}}$) 值。结果: 鱼腥草多糖可减轻实验性肝损伤所致炎症浸润, 降低肝体指数, 降低血清中 ALT, AST 活性 ($P < 0.05$) 和各组织 MDA 的含量 ($P < 0.01$); 体外抗氧化实验表明鱼腥草多糖能抑制脂质过氧化物的生成, $A_{532\text{ nm}}$ 明显降低 ($P < 0.01$)。结论: 鱼腥草多糖能降低 CCl₄ 损伤小鼠血清 AST, ALT 活性, 降低各组织 MDA 的含量, 对小鼠肝、肾、心肌、脑组织体内外有抗氧化作用, 尤其对肝、肾抗氧化作用较强。

[关键词] 鱼腥草多糖; 自由基; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0207-04

Anti-oxidant Effect of Houttuyniae Herba Polysaccharide on Mouse Liver, Kindey, Heart and Brain Tissues

LIU Guang-jian¹, WANG Lu¹, WANG Fei-fei¹, WANG Cai-hong¹, SUN She-zong^{2*}

(1. Department of Anesthesiology, First Clinical College,

Hubei Medical University, Shiyan 442000, China;

2. Biochemistry and Immunology Laboratory, Hubei Medical University, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-oxidant effect *in vitro* and *in vivo* of Houttuyniae Herba polysaccharide on mouse liver, kidney, and heart and brain tissues. **Method:** Kunming mice were divided into model group, control group and Houttuyniae Herba polysaccharide group. Three Houttuyniae Herba Polysaccharide subgroups were given Houttuyniae Herba polysaccharide for 7 days with doses of 30, 60, 120 mg·kg⁻¹ respectively. The control group was ip injected blend oil, and the other groups was ip given 0.15% CCl₄ mixed with blend oil at 2 h after last administration. After 24 hours blood serum of mice was separated and ALT and AST were determined. The liver index was calculated and MDA in liver homogenate were determined. Free radicals induced by the fenton reaction were determined by absorption at wavelength of 532 nm ($A_{532\text{ nm}}$). **Result:** Houttuyniae Herba Polysaccharide could alleviate the inflammation in response to experimental liver injury. Different concentrations of Houttuyniae Herba Polysaccharides can reduce ALT and AST in serum ($P < 0.05$) and lower the content of the MDA in tissue ($P < 0.01$). Anti-oxidation experiments of Houttuyniae Herba polysaccharide *in vitro* showed that it

[收稿日期] 20101107(004)

[第一作者] 刘光建, 博士生, E-mail: 474414873@qq.com

[通讯作者] * 孙设宗, 副教授, 实验室主任, 从事生化药理研究, Tel: 13872803818, E-mail: sunshezong@yahoo.com.cn

inhibited the production of lipid peroxidates and significantly decrease A_{532nm} ($P < 0.01$). **Conclusion:** Houttuyniae Herba polysaccharides can reduce serum AST, ALT activity, has antioxidant effect in liver, kidney, heart and brain. The antioxidant effect is especially strong for kidney and liver.

[Key words] Houttuyniae Herba polysaccharide; free radicals; antioxidation

传统中草药中活性成分的研究已成为当前药学研究的热点,鱼腥草是常用的药食同源药物。鱼腥草多糖(Houttuyniae Herba polysaccharide)是从鱼腥草根叶茎中分离提取的活性成分,具有抗肿瘤、抗衰老和抗氧化作用^[1-2],但鱼腥草多糖对诱导小鼠体内外自由基的产生,有无清除或抑制的研究报道甚少。 CCl_4 是经典的小鼠肝损伤的毒物,其损伤机制是经机体生物转化后生成三氯甲基自由基($\cdot CCl_3$)、超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)和氢氧阴离子自由基($OH\cdot$)有关^[3],在组织匀浆中加入 $FeSO_4$ 和 H_2O_2 可诱导自由基的生成^[4-5]。本研究用不同浓度鱼腥草多糖 ig 旨在探讨鱼腥草多糖在体内外对肝、肾、心肌和脑组织抗氧化作用,为鱼腥草多糖的临床应用提供实验依据和理论基础。

1 材料

1.1 动物 3 月龄昆明种小鼠 50 只,由本院实验动物中心提供,雌雄性各半分笼饲养。动物质量合格证号 SCXK(鄂)2005-2008。

1.2 药品及试剂 丙二醛(MDA)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、蛋白质检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号 20100715),鱼腥草购自十堰宏康大药房,其余试剂均为国产纯生化试剂。

1.3 仪器 ZS83.1 型内切式组织匀浆机(浙西机械厂),MDF-382E 型超低温冰箱(日本 Sony 公司)722S 型分光光度计(上海第二光学仪器厂)。

1.4 鱼腥草多糖的提取 干鱼腥草粉碎,按 1:15 加双蒸水 80℃ 提取 6 h,用 4 层纱布过滤冷却后取上清 4 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min 去杂质,于 90℃ 浓缩,加乙醇浓度至 80% 时多糖析出,静置后出现沉淀,4 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min,回收乙醇,沉淀用无水乙醇提取 3 次,冷冻干燥后为灰白褐色鱼腥草粗多糖,用蒽酮法测定鱼腥草多糖的含量为 16.4%。

2 方法

2.1 分组与造模 50 只小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,分空白对照组:常规饲养,自由饮水;模型组:常规饲养,自由饮水,每天用 0.2 mL 生理盐水 ig 1

次;鱼腥草多糖保护组分高、中、低 3 组,常规饲料,自由饮水,每天按 30,60,120 $mg\cdot kg^{-1}$ 鱼腥草多糖 ig 1 次,连续给药 7 d,末次 ig 2 h,正常对照组 ip 调和油溶液,其余各组 ip 0.15% CCl_4 调和油溶液(10 $mL\cdot kg^{-1}$),12 h 后禁食不禁水,24 h 眼球取血,分离血清,用赖氏法测 ALT,AST。

2.2 检测指标 处死小鼠,取出肝脏置冰生理盐水中洗净血液,用滤纸吸去水分称质量计算肝体指数,然后用 PBS 按 1:10 稀释冰浴下匀浆,4 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 5 min,取上清液用双缩脲法测各组织匀浆中蛋白质含量,按试剂盒要求测各组织 MDA 的含量。取上述各组织匀浆 500 μL 置相应的试管中,除正常对照组外,其余各组加入 6 $mmol\cdot L^{-1}$ $FeSO_4$ 60 μL ,50 $mmol\cdot L^{-1}$ H_2O_2 40 μL ,pH 7.4 的 PBS 缓冲液 500 μL ,正常对照组用 PBS 补充容量至等量,各管至 37℃ 水浴中保温 30 min 启动反应,产生脂质过氧化物,加 15% 三氯醋酸 1.5 mL,结束反应,加 0.67% 的硫代巴比妥酸溶液 1.5 mL,置沸水中 15 min 取出,冷却后离心,用 722S 分光光度计检测 532 nm 处的吸光度(A),以 A_{532nm} 反应 MDA 的含量。按公式(抑制率 = $(A_{模型组} - A_{多糖保护组}) / A_{模型组} \times 100\%$)计算鱼腥草多糖对脂质过氧化物 MDA 产生的抑制率^[4]。

2.3 统计学分析 所得数据用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 鱼腥草多糖对 CCl_4 肝损伤小鼠血清 ALT,AST 和肝体指数的影响 模型组能显著升高 ALT,AST 活性和肝体指数,与正常对照组比较有统计学意义($P < 0.01$),说明造模是成功的。不同浓度的鱼腥草多糖保护组可显著降低血清中 ALT,AST 的活性和肝体指数,与模型组比较有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),说明鱼腥草多糖对自由基引起的肝损伤有保护作用,其保护作用与鱼腥草多糖含量呈正相关。见表 1。

表1 鱼腥草多糖对 CCL₄ 肝损伤小鼠血清 ALT、AST 活性和肝体指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	肝体指数
空白对照	—	18.74 ± 20.56 ²⁾	27.00 ± 4.82 ²⁾	0.042 2 ± 0.003 6 ²⁾
病理模型	—	242.50 ± 57.08	114.10 ± 36.52	0.050 3 ± 0.003 0
鱼腥草多糖	30	196.83 ± 70.64 ¹⁾	82.28 ± 27.53	0.046 8 ± 0.004 1 ¹⁾
	60	191.90 ± 33.94 ²⁾	81.89 ± 22.50 ¹⁾	0.046 0 ± 0.007 1 ²⁾
	120	169.00 ± 82.02 ²⁾	75.09 ± 41.64 ¹⁾	0.045 4 ± 0.003 7 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表2~3同)。

3.2 鱼腥草多糖对肝、肾、心肌、脑 MDA 含量的影响

模型组与其他各组比较 MDA 显著升高 ($P < 0.01$), 说明 CCl₄ 进入体内产生三氯甲基($\cdot\text{CCl}_3$), 后者攻击细胞膜产生脂质过氧化物(LPO), 导致 LPO 的代谢产物 MDA 显著升高。虽然四氯化碳主要在肝脏解毒, 但在肝内代谢产生的自由基对其他组织器官仍

有影响, 引起模型组肾脏、心肌和脑中 MDA 含量明显升高, 3 种浓度的鱼腥草多糖保护组与模型组比较, 可显著降低肝、肾、心肌和脑中 MDA 的含量, 与模型组比较 ($P < 0.01$), 说明鱼腥草多糖具有对抗自由基的生成和清除自由基的作用。见表2。

表2 鱼腥草多糖对小鼠肝、肾、心肌、脑 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肝 MDA	肾 MDA	心 MDA	脑 MDA
空白对照	—	3.38 ± 1.16 ²⁾	2.80 ± 1.61 ²⁾	5.53 ± 0.32 ²⁾	4.14 ± 0.54 ²⁾
病理模型	—	6.02 ± 1.12	5.20 ± 0.73	8.30 ± 1.03	7.30 ± 0.84
鱼腥草多糖	30	3.70 ± 0.96 ²⁾	3.52 ± 0.62 ²⁾	4.57 ± 0.21 ²⁾	3.57 ± 0.59 ²⁾
	60	3.40 ± 1.11 ²⁾	3.17 ± 0.72 ²⁾	4.18 ± 0.55 ²⁾	3.81 ± 0.66 ²⁾
	120	3.44 ± 1.17 ²⁾	3.38 ± 0.08 ²⁾	4.22 ± 0.30 ²⁾	3.59 ± 0.55 ²⁾

3.3 鱼腥草多糖对体外诱导肝脂质过氧化物抑制作用的测定 将上述肝、肾、心肌及脑组织匀浆加入 6 mmol·L⁻¹ FeSO₄ 60 μL, 50 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 40 μL, 在保温过程中可诱导脂质过氧化物的生成, 因 A_{532 nm} 值可反映脂质过氧化产物 MDA 的含量。模型组各组织 A_{532 nm} 明显的高于正常对照组, 说明诱导肝脂质过氧化物是成功的, 用不同浓度的鱼腥草多糖保护

组小鼠肝、肾、心肌及脑组织匀浆与模型组比较可明显的抑制脂质过氧化物的生成, A_{532 nm} 显著降低证明鱼腥草多糖可对抗自由基抑制脂质过氧化物的生成, 不同浓度的鱼腥草多糖对不同脂质过氧化物生成的抑制率存在一定的差异, 对肝、肾抑制作用较强, 对心、脑脂质过氧化物生成抑制作用较弱。见表3。

表3 鱼腥草多糖各组织对体外诱导脂质过氧化物产生的抑制作用的比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	肝		肾		心		脑	
		A _{532 nm}	抑制率 /%	A _{532 nm}	抑制率 /%	A _{532 nm}	抑制率 /%	A _{532 nm}	抑制率 /%
空白对照	—	0.372 ± 0.126 ²⁾	—	0.561 ± 0.068 ²⁾	—	0.826 ± 0.080 ¹⁾	—	0.908 ± 0.044 ¹⁾	—
病理模型	—	0.882 ± 0.329	0	0.966 ± 0.065	0	0.965 ± 0.088	0	1.059 ± 0.088	0
鱼腥草多糖	30	0.611 ± 0.257 ¹⁾	30.7	0.838 ± 0.111 ¹⁾	13.3	0.935 ± 0.053	3.1	0.961 ± 0.051	9.3
	60	0.496 ± 0.188 ¹⁾	44.1	0.799 ± 0.128 ¹⁾	17.3	0.905 ± 0.028	6.2	0.940 ± 0.071 ¹⁾	11.2
	120	0.463 ± 0.109 ¹⁾	47.5	0.749 ± 0.147 ¹⁾	22.5	0.889 ± 0.054	7.9	0.923 ± 0.173 ¹⁾	12.8

4 讨论

CCl₄ 所致实验性肝损伤, 其机制主要是通过脂质过氧化作用引起肝损伤。CCl₄ 进入机体后由肝微粒体细胞色素 P450 代谢, 生成三氯甲基自由基

($\cdot\text{CCl}_3$), 氯离子自由基($\cdot\text{Cl}$)攻击肝细胞膜上磷脂分子引起脂质过氧化, 导致脂质过氧化产物丙二醛(MDA)升高; 此外在 $\cdot\text{CCl}_3$ 启动的过氧化连锁反应中, 尚可产生毒性更强的超氧阴离子(O_2^-)和氢氧

阴离子($\cdot\text{OH}$)自由基,无选择性的损伤肝细胞的各个组分引起膜性损伤,严重时可导致肝细胞变性坏死。本研究表明, CCl_4 所致化学性肝损伤通过脂质过氧化作用产生过量的自由基广泛损伤肝细胞,导致模型组小鼠血清 ALT,AST,MDA 显著升高,肝脏 MDA 增高。正常状态下,ALT 和 AST 主要存在肝细胞的胞液和线粒体中血清中含量很低,所以血清中 ALT 和 AST 可反映膜损伤和程度; CCl_4 在肝内代谢产生自由基,攻击肝细胞膜和线粒膜引起膜通透性增加^[8],致使 ALT,AST 逸出细胞;由 CCl_4 所致急性肝损伤引起炎性病变,导致模型组肝细胞肿胀,肝体指数增大,血清 ALT,AST 活性升高。鱼腥草多糖各保护组肝体指数明显减小,血清 ALT,AST 活性降低,与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);说明鱼腥草多糖可对抗和清除自由基,减轻肝细胞炎性病变的发生,且保护作用与鱼腥草多糖浓度有关。

虽然肝脏是生物转化的主要器官,四氯化碳主要在肝脏解毒,但对其他组织器官也有损伤作用^[7]。本研究表明,病理模型组肝、肾、心肌、脑组织中 MDA 含量明显升高,鱼腥草多糖低、中、高保护组可降低肝、肾、心肌、脑组织中 MDA 含量,与模型组比较有统计学意义($P < 0.01$)见表 2,说明鱼腥草多糖具有对抗自由基的生成和清除自由基的作用^[5],对肝、肾、心肌、脑自由基损伤有保护作用^[5]。

在肝、肾、心肌和脑组织匀浆中加入 FeSO_4 和 H_2O_2 , H_2O_2 是活性氧,如遇 Fe^{2+} 则可诱导产生自由基,攻击不饱和脂肪酸产生脂质过氧化物,脂质过氧化物的代谢终产物-MDA 在 $A_{532\text{nm}}$ 处有最大吸收峰。所以 $A_{532\text{nm}}$ 可反应 MDA 的含量,其含量可反应膜损伤和脂质过氧化程度^[6];体外抗氧化实验表明,模型组与正常组比较 $A_{532\text{nm}}$ 明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明经 fenton 反应诱导产生自由基是成功

的,不同浓度的鱼腥草多糖保护组使 $A_{532\text{nm}}$ 明显降低,与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$)。肝、肾、心肌和脑组织匀浆对 MDA 生成的抑制率存在差异,鱼腥草多糖对肝、肾脂质过氧化物产生有较强的抑制作用,但对脑组织和心肌抑制作用相对较弱。

总之,用不同浓度的鱼腥草多糖给小鼠 ig,可显著降低 CCl_4 损伤小鼠血清中 AST,ALT 的含量,抑制脂质过氧化物的生成,降低肝、肾、心肌和脑组织中 MDA 含量;体外抗氧化实验表明鱼腥草多糖对心肌、肾、肝、脑组织对脂质过氧化物生成有抑制作用,其中鱼腥草多糖对肝、肾引起的氧化损伤有良好的保护作用。

[参考文献]

- [1] 何士敏,方平,郭利佳. 鱼腥草抗氧化成份的研究[J]. 西南农业学报,2009,22(3):625.
- [2] 程超,李伟. 几种植物水溶性多糖的体外抗氧化作用[J]. 食品工业科技,2006(9):63.
- [3] 张怡,张伟,田玉璋,等. 秃疮花有效成分对小鼠 CCl_4 肝损伤的保护作用[J]. 青海医学院学报,2004,25(1):7.
- [4] 孙设宗,卢方安,朱名安,等. 镁离子、维生素 E 对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国现代医学杂志,2006,16(3):339.
- [5] 张建新. 微波法提取鱼腥草水溶性多糖清除自由基特性的研究[J]. 食品工业科技,2006,31(8):115.
- [6] 孙设宗,毛达勇,卢方安,等. 镁离子抗氧化作用的研究[J]. 邵阳医学院学报,2005,24(5):260.
- [7] 潘洪志,万丽葵,胡万胜,等. 番茄红素对四氯化碳肝肾损伤的保护作用[J]. 营养学报,2005,27(5):435.
- [8] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京:科学出版社,1997:17.

[责任编辑 聂淑琴]