

改变,进而影响睾丸及 AGD 的发育^[13]。

综上所述,DEHP 对新生雄性仔鼠体重增长和睾丸及 AGD 的发育有不同程度的抑制作用,并且对雄仔鼠睾丸 FLC 也有毒性作用,可引起雄性仔鼠睾丸 FLC 形态学的改变,其可能机制高剂量 DEHP 宫内暴露后,通过抑制睾丸 FLC LHR 及 StAR 蛋白的表达途径从而对睾丸及 AGD 的发育。

参考文献

- 1 Mahood IK, Hallmark N, McKinnell C, *et al.* Abnormal Leydig cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di(n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis [J]. *Endocrinology*, 2005,146(2):613-623
- 2 Ge R, Chen G, Sottas CM, *et al.* Effects of prenatal exposures to phthalate on fetal Leydig cell numbers and distribution in the testis of the Long Evans rat [C]. Boston, The Endocrine Society's 88th Annual Meeting, 2006;12171
- 3 Ge RS, Chen GR, Tanrikut C, *et al.* Phthalate ester toxicity in Leydig cells; developmental timing and dosage considerations [J]. *Reprod Toxicol*, 2007,23(3):366-373
- 4 Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, *et al.* Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate [J]. *Hum Reprod*, 2003,18(7):1383-1394
- 5 Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, *et al.* The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat [J]. *Toxicol Sci*, 2000,58(2):339-349
- 6 Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Critical period for adverse

effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy [J]. *Toxicol Lett*, 2000,111(3):271-278

- 7 Gray LE Jr, Ostby J, Furr J, *et al.* Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat [J]. *Toxicol Sci*, 2000,58(2):350-365
- 8 Stroheker T, Regnier JF, Lassarguere J, *et al.* Effect of in utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate: distribution in the rat fetus and testosterone production by rat fetal testis in culture [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006,44(12):2064-2069
- 9 Lin H, Ge RS, Chen GR, *et al.* Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after exposure to phthalate in utero [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008,105(20):7218-7222
- 10 Ge RS, Chen GR, Dong Q, *et al.* Biphasic effects of postnatal exposure to diethylhexylphthalate on the timing of puberty in male rats [J]. *J Androl*, 2007,28(4):513-520
- 11 王文艳,吴亮,牛三强,等. 银杏叶提取物对 2 型糖尿病大鼠睾酮水平、LHR 和 StAR mRNA 表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008,24(5):867-872
- 12 Dong L, Jelinsky SA, Finger JN, *et al.* Gene expre during development of fetal and adult Leydig cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007,1120:16-35
- 13 郑海红,王维维,王晓雅,等. DEHP 对雄性仔鼠胚胎 Leydig 细胞雄激素合成的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010,26(8):1627-1632

(收稿:2011-07-06)

(修回:2011-07-22)

三叶青多糖抗肝损伤作用的研究

马丹丹 李伟平 马哲龙 何良艳 蒋福升 丁志山

摘要 目的 测定三叶青中多糖的含量,并研究三叶青多糖抗四氯化碳(CCl_4)致急性肝损伤的作用。**方法** 采用硫酸-苯酚法测定三叶青多糖的含量,然后将 ICR 小鼠随机分为 5 组,即空白组、模型对照组、阳性对照组,三叶青多糖高、低剂量组,分别灌胃等容积的生理盐水、联苯双酯和三叶青多糖,给药一段时间后给小鼠腹腔注射四氯化碳致其肝损伤,检测其血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)水平。**结果** 三叶青中多糖的含量为 8.69%;与模型组比较,三叶青多糖治疗组 ALT、AST 及 MDA 含量均明显降低($P < 0.01$),而 SOD 水平显著提高($P < 0.01$)。**结论** 三叶青多糖对 CCl_4 造成的小鼠急性肝损伤具有阻抗作用。

关键词 三叶青 多糖 含量 肝损伤 四氯化碳

Anti-liver Damage Activity Analysis of Polysaccharide in *Radix Tetrastigmatis Hemsleyani*. Ma Dandan, Li Weiping, Ma Zhelong, He Liangyan, Jiang Fusheng, Ding Zhishan. Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang 310053, China

基金项目:“重大新药创制”科技重大专项“十二五”计划资助项目(2011ZX09102-011-07)

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学(马丹丹、李伟平、马哲龙、何良艳、蒋福升、丁志山)

通讯作者:丁志山,教授,硕士生导师,电子信箱:zjtcmdzs@163.com

Abstract Objective To determine the content of polysaccharide in *radix tetrastigmatis hemsleyani*, then to observe the effects of polysaccharide in *radix tetrastigmatis hemsleyani* on acute liver injury in mice. **Methods** The content of polysaccharide in *radix tetrastigmatis hemsleyani* was determined by phenol – sulfuric acid method. Then 40 mice of ICR species into were randomly divided 5 groups: blank control group, model group, positive control group, lowdose group and highdose group. These mice were given physiological saline, bifendate and polysaccharide in *radix tetrastigmatis hemsleyani* by intragastric administration every day. After a week, carbon tetrachloride was injected to cause liver injury in mice. Then serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA) and uperoxide dismutase (SOD) levels was determined. **Results** The content of polysaccharide in *radix tetrastigmatis hemsleyani* was 8.69%. Compared with model group, ALT, AST and MDA levels were significantly reduced ($P < 0.01$), while SOD levels were significantly increased in treatment group of polysaccharide ($P < 0.01$). **Conclusion** Polysaccharide in *radix tetrastigmatis hemsleyani* has good impedance function on CCl_4 – induced liver injury in mice.

Key words *Radix tetrastigmatis hemsleyani*; Polysaccharide; Content; Liver damage; Carbon tetrachloride (CCl_4)

三叶青 (*radix tetrastigmae*) 为葡萄科植物三叶崖爬藤 (*tetrastigma hemsleyanum diels et gilg*) 的干燥块根, 是我国特有的植物^[1], 分布于浙江、江西、福建、湖北、广东、四川、贵州及云南等省区。主要用于治疗高热惊厥、肺炎、哮喘、肝炎、风湿、咽痛、痢疮疮疖等症^[2]。有研究者发现^[3], 三叶青具有良好的保肝降酶及抗肝纤维化作用。钟晓明等^[4]通过研究表明三叶青对四氯化碳 (CCl_4) 引起的小鼠急性肝损伤具有保护作用, 并且证明了三叶青小鼠灌胃给药的最大耐受量为 80g/kg 体重, 相当于人每天临床用量的 445 倍, 说明三叶青用于临床是安全的。多糖是三叶青中重要的成分, 越来越多的研究证明^[5], 多糖具有复杂的多方面的生物活性和功能, 如抗肿瘤、抗溃疡、抗肝硬化、调节免疫等。检索国内外文献, 尚未发现有关三叶青多糖治疗肝损伤的报道。因此, 我们测定了三叶青多糖的含量, 并对三叶青多糖抗四氯化碳致小鼠急性肝损伤的作用进行了研究, 为其临床应用提供了药理学依据。

材料与方法

1. 实验材料试剂和仪器设备: (1) 实验材料: 三叶青, 产地为广西, 由浙江中医药大学饮片生产, 批号 071124。葡萄糖标准品购自中国生物制品检验所 (110833200302)。ICR 小鼠 (清洁级), 体重 18 ~ 22g, 购于浙江中医药大学实验动物中心。(2) 实验试剂: ALT 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20080917); AST 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20080917); MDA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20080802); SOD 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20080802)。(3) 实验仪器设备: LDZ5 – 2 低速自动平衡离心机 (北京医用离心机厂); R201 旋转式蒸发器 (上海申顺生物科技有限公司); UV8500 可见 – 紫外分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司); 循环水式真空泵 [SHZ – (Ⅲ) 巩义市英峪予华仪器厂]; 电子精密天平 (AR2130 Ohaus Corp. Pine Brook, NJ, USA); 电热恒温水浴锅 (DK – S24 上海森信实验仪器有限公司)。

2. 标准品溶液的配制: 称取 105℃ 干燥至恒重的葡萄糖 20mg, 置于 100ml 容量瓶中, 蒸馏水定容至刻度, 摇匀即得, 浓度为 0.2mg/ml, 4℃ 保存备用。

3. 三叶青多糖含量的测定: (1) 供试品溶液的制备: 精密称定三叶青粉末 2.00g, 加 100ml 蒸馏水, 加热回流 1.5h (保持微沸), 冷却, 用蒸馏水补足减失的重量, 摇匀滤过。精密量取续滤液 1ml, 用蒸馏水定容至 50ml, 摇匀即得。(2) 测定波长的选择: 精密吸取标准品溶液和供试品溶液各 500μl, 用苯酚 – 硫酸比色法测定, 二者紫外光谱相似, 在 490nm 处均有一特征性最大吸收峰, 故选择 490nm 为测定波长。(3) 标准曲线的制备: 精密吸取葡萄糖标准液 250、500、750、1000、1250、1500、1750、2000μl, 分别定容至 3ml, 得系列对照品溶液, 各取 1ml 加入 1ml 5% 苯酚及 5ml 浓 H_2SO_4 , 100℃ 水浴 30min, 冷却至室温 (各组样品颜色逐渐加深, 结果见图 2); 另取 1ml 蒸馏水做相应处理作为空白对照, 于 490nm 测吸光度。以吸光度 A 为纵坐标, 葡萄糖浓度 C (mg/ml) 为横坐标, 对测得的数据进行线性回归, 绘制标准曲线。(4) 方法学考察: 按照含量测定的要求, 对所用的测定方法进行稳定性考察、精密度考察和加样回收试验。(5) 换算系数的测定: 取供试品溶液适量, 苯酚 – 硫酸比色法测定 490nm 处吸光度, 计算换算系数 f, 测得 $f = 1.806$ 。(6) 三叶青中多糖含量的测定: 取供试品溶液 1ml, 稀释 5 倍后吸取 1ml, 用苯酚 – 硫酸比色法测定 490nm 处吸光度值, 按下式计算多糖含量: 多糖含量 (%) = $\frac{\text{CDf}}{\text{W}} \times 100\%$ 。

式中 W 为三叶青样品重量 (μg), C 为多糖溶液中葡萄糖的浓度 (μg/ml), D 为多糖的稀释倍数, f 为换算系数。

4. 三叶青多糖的提取: 称取三叶青粉末 200g, 加 15 倍水, 回流提取 3 次, 每次 1.5h, 收集 3 次滤液并合并, 浓缩至 200ml 左右。然后用 seavage 法脱蛋白, 醇沉获得三叶青多糖, 真空干燥备用。

5. 三叶青多糖抗 CCl_4 肝损伤作用的研究: (1) 动物分组、造模及给药^[6]: 将 40 只 ICR 小鼠随机分成 5 组, 每组 8 只, 雌雄各半; 分别为空白组, 四氯化碳损伤模型组, 三叶青多糖高、低剂量组, 联苯双酯阳性对照组。低、高剂量组, 分别灌胃给予三叶青多糖 2.5、5.0 毫克/只; 阳性对照组, 灌胃给予联苯

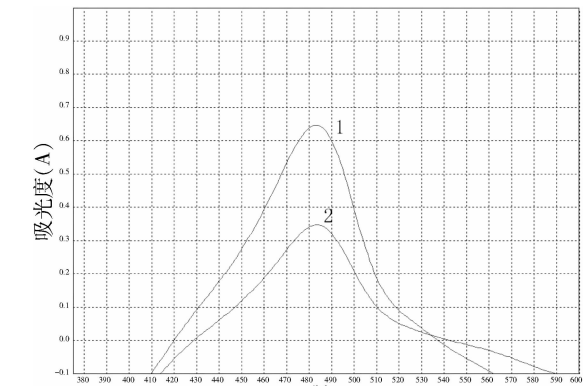


图 1 多糖显色后全波长扫描图

- 1. 三叶青多糖显色后紫外吸收曲线；
- 2. 葡萄糖标准溶液显色后紫外吸收曲线

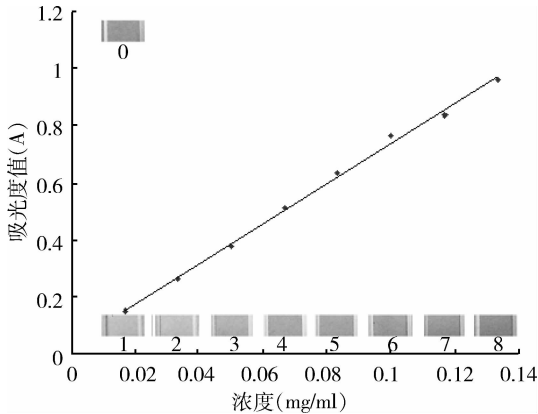


图 2 葡萄糖标准曲线图

图中 0~8 色条分别对应空白管和 8 个葡萄糖标准梯度液显色后的体系颜色

双酯 4.0 毫克/只;空白组和模型组均灌胃给以蒸馏水。每只小鼠灌胃体积均为 0.2ml。

连续灌胃给药 7 天,每天 1 次,于末次给药后 1h,空白组腹腔注射花生油 0.2 毫升/只,其余各组均腹腔注射含 0.5% CCl₄ 花生油溶液 0.2 毫升/只。造模后禁食不禁水,24h 后所有小鼠采用眼眶放血法采血取样,样品置于 37℃ 水浴中保温 15min,3000r/min 离心 10min 分离血清,待测。另外,取血后小鼠立即颈椎脱臼处死,解剖取肝组织,观察肝组织的颜色及其变化,拍照记录。(2)小鼠血清生化指标测定:血清中 ALT、AST、MDA 及 SOD 的活性按照各试剂盒要求,采用 UV8500 紫外分光光度计进行测定。

6. 统计学方法:实验数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组间均数比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 标准曲线及多糖含量测定结果:标准曲线的测定得线性回归方程为 $A = 7.016C + 0.0352$,相关系数为 0.9973,葡萄糖浓度在 0.02 ~ 0.14mg/ml 范围内线性关系良好(图 2)。三叶青中多糖的含量为 8.69% (*n* = 3),RSD 为 1.69%。

2. 三叶青多糖对小鼠肝脏指数的影响:正常对照组小鼠肝脏大小正常,色泽暗红,质地光滑柔软,细腻;模型组小鼠肝脏大多颜色灰白,质地变硬,边缘变钝,表面呈粗糙桔皮状,可见明显的、均匀分布的小结节;各给药组相比模型组色泽明显转红、细腻,结节变

小或消失,多糖高剂量组和阳性对照组尤为明显。正常对照组、模型对照组、多糖低剂量组、多糖高剂量组、阳性对照组的肝脏指数分别为 46.02 ± 3.36 、 53.02 ± 6.91 、 50.73 ± 2.04 、 48.52 ± 5.41 、 49.27 ± 6.74 mg/g 体重,存在显著性差异 (*P* < 0.05)。从各组小鼠肝脏指数变化看,模型组肝脏指数明显较正常组高,表现为肝大,而给药组相应肝指数虽然与模型组比较没有显著性差异,但均有所下降;该结果与血清结果基本一致,表明三叶青多糖对 CCl₄ 所致肝损伤确实有阻抗作用,且高剂量三叶青多糖组药效与阳性对照联苯双酯组相当。

3. 三叶青多糖对 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠血清生化指标的影响:从表 1 结果可以看出,模型组 ALT、AST 及 MDA 水平显著高于正常组 (*P* < 0.01),而 SOD 水平显著低于正常组 (*P* < 0.01),表明造模成功;各给药组 ALT、AST 及 MDA 水平显著低于模型组 (*P* < 0.01),而 SOD 水平显著高于模型组 (*P* < 0.01),表明药物对 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠有保护作用;此外,三叶青多糖给药组与阳性对照联苯双酯组比较,低剂量组不及联苯双酯药效强,而高剂量组与联苯双酯组药效相当。上述结果表明,三叶青多糖对 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠有保护作用,并且在一定程度上存在量效关系。

表 1 三叶青多糖对 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST、MDA 及 SOD 的影响

组别	ALT(卡门单位)	AST(卡门单位)	MDA (nmol/ml)	SOD(NU/ml)
正常对照组	41.12 ± 8.66 ^{##}	47.04 ± 7.95 ^{##}	6.25 ± 0.64 ^{##}	161.81 ± 8.87 ^{##}
模型对照组	151.51 ± 15.57	134.87 ± 13.80	23.67 ± 3.62	75.28 ± 18.88
多糖低剂量组	97.39 ± 12.27 ^{##}	113.85 ± 9.74 ^{##}	18.23 ± 2.36 ^{##}	105.00 ± 11.73 ^{##}
多糖高剂量组	77.55 ± 13.98 [*]	84.42 ± 14.27 [*]	12.18 ± 2.16 [*]	126.39 ± 17.72 [*]
阳性对照组	64.24 ± 15.04 [*]	83.98 ± 18.03 [*]	12.78 ± 2.33 [*]	120.14 ± 17.72 [*]

与模型组比较,^{*} *P* < 0.01,存在显著性差异;与阳性对照组比较,^{##} *P* < 0.01;CCl₄. 四氯化碳;ALT. 谷丙转氨酶;AST. 谷草转氨酶;MDA. 丙乙醛;SOD. 超氧化物歧化酶

讨 论

腹腔注射 CCl_4 植物油溶液致肝损伤是传统的肝毒模型。 CCl_4 是一种毒性很强的化学物质,进入体内后,在肝脏内经肝细胞色素 P450 激活,生成活泼的三氯甲基自由基和氯自由基。三氯甲基自由基还可以进一步氧化反应形成具有更强活性的基团,从而产生脂质过氧化作用,破坏肝细胞的膜性结构^[7,8]。上述自由基可与细胞内和细胞膜高分子发生共价结合,使酶的功能丧失,细胞膜脂质过氧化,胞质 Ca^{2+} 浓度升高,导致肝细胞损伤坏死,胞质内转氨酶渗入血液,使血清中转氨酶的活性升高,同时还可能导致肝脏内胶原的大量沉积,最终导致肝纤维化。

ALT 是存在于肝细胞质内的可溶性酶,肝细胞损伤后被释放入血,血清 ALT 活性变化常作为判定肝损伤程度的重要指标,血清 ALT 水平高低可以反映肝细胞损伤程度。脂质过氧化物及其代谢产物 MDA 可以破坏细胞膜结构,导致细胞肿胀坏死,其含量可反映机体过氧化损伤程度和细胞受损程度。SOD 是细胞内主要的抗氧化酶,能够清除自由基,并可抑制自由基引发的脂质过氧化反应,从而起到保护细胞膜结构与功能的完整作用。

三叶青多糖是三叶青中一种含量较高的活性成分,本实验通过紫外分光光度法对三叶青多糖的含量进行了测定,发现三叶青中多糖的含量高达 8.69%。在本实验中,通过腹腔注射 CCl_4 植物油溶液造成小鼠肝损伤,测定血液中谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性,结果发现 CCl_4 模型组小鼠血液中两种转氨酶的活性明显升高,而给予三叶青多糖后能明显改善这种

状况,表明三叶青多糖对小鼠具有一定的抗 CCl_4 所致的急性肝损伤作用;同时,三叶青多糖给药后,肝损伤小鼠血液中的 SOD 活性升高,MDA 的浓度降低,这表明,三叶青多糖能提高肝脏的解毒能力,对肝脏产生一定的保护作用。

本实验对三叶青多糖的含量进行了测定,而且还证实这种含量较高的活性物质具有一定的抗 CCl_4 所致的急性肝损伤作用,为三叶青多糖的进一步开发利用提供了很好的实验依据,但三叶青多糖抗肝损伤的机制目前尚未完全阐明,需要做进一步的研究。

参考文献

- 1 郑军献,胡铁娟,梁卫青,等. 紫外可见分光光度法测定三叶青中总黄酮的含量[J]. 中国中医药科技,2009,16(5):386-387
- 2 张立明,张霞,郑传莉,等. 响应曲面法优化三叶青总黄酮提取工艺研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):2588-2591
- 3 张同远,倪荷芳. 三叶青抗慢性肝损伤实验研究[J]. 南京中医药大学学报,2008,24:37-39
- 4 钟晓明,毛庆秋,黄真,等. 三叶青提取物对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用及急性毒性实验[J]. 中成药,2006,28(3):422-423
- 5 Parakashtha G, Tom EG, Anders R, et al. Polysaccharides isolated from the malian medicinal plant *syzygium guineense* [J]. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy, 2010, 2(6):76-85
- 6 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:346
- 7 Lu YR, Chu YJ. Effects of spirulina in prevention of liver fibrosis in rats[J]. Chin J New Drugs Clin Rem, 2001, 20(3):198
- 8 Zhong M, Yu SM, Huang L, et al. The effect of total desmodium pulchellum alkaloids on the relevant markers of Ex2 perimental hepatic fibrosis animals [J]. Chinese Hepatology, 2001, 6(3):168
(收稿:2011-04-17)
(修回:2011-11-22)
- 9 (上接第5页)
- 7 The CREATE Trial Group Investigators. Effects of riviparin, a low-molecular-weight heparin, on mortality, reinfarction, and strokes in patients with acute myocardial infarction presenting with ST-segment elevation[J]. JAMA, 2005, 293:427-436
- 8 Antman EM, Morrow DA, McCabe CH, et al. Enoxaparin versus unfractionated heparin with fibrinolysis for ST-elevation myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2006, 354:1477-1488
- 9 Giraldez RR, Nicolau JC, Corbalan R, et al. Enoxaparin is superior to unfractionated heparin in patients with ST elevation myocardial infarction undergoing fibrinolysis regardless of the choice of lytic: an EXTRACT-TIMI 25 analysis[J]. Eur Heart J, 2007, 28:1566-1573
- 10 White HD, Braunwald E, Murphy SA, et al. Enoxaparin versus unfractionated heparin with fibrinolysis for ST-elevation myocardial infarction in elderly and younger patients: results from EXTRACT-TIMI 25[J]. Eur Heart J, 2007, 28:1066-1071
- 11 Yusuf S, Mehta SR, Chrolavicius S, et al. Effects of fondaparinux on mortality and reinfarction in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the OASIS-6 randomized trial[J]. JAMA, 2006, 295:1519-1530
- 12 Peters RJ, Joyner C, Bassand JP, et al. The role of fondaparinux as an adjunct to thrombolytic therapy in acute myocardial infarction: a subgroup analysis of the OASIS-6 trial[J]. Eur Heart J, 2008, 29:324-331
- 13 Carswell CI, Plosker GL. Bivalirudin: a review of its potential place in the management of acute coronary syndromes[J]. Drugs, 2002, 62(5):841-870
- 14 Vermeer F, Vahanian A, Fels PW, et al. Argatroban and alteplase in patients with acute myocardial infarction: the ARGAMI study[J]. J Thromb Thrombolysis, 2000, 10(3):233-240
- 15 Becker RC, Meade TW, Berger PB, et al. The primary and secondary prevention of coronary artery disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition) [J]. Chest, 2008, 133:776-814
- 16 Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance among patients with heart disease: a prospective, comprehensive assessment [J]. Circulation. 2000, 102(suppl I):2033
(收稿:2010-09-05)
(修回:2010-09-17)