

文章编号:1673-1689(2006)06-0115-04

美味猕猴桃根正丁醇提取物对小鼠 急性肝损伤的保护作用

白新鹏, 裘爱泳

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:为研究美味猕猴桃根正丁醇提取物(BEAD)对四氯化碳(CCl_4)、D-半乳糖胺致肝损伤小鼠血清转氨酶活性的影响。采用 CCl_4 、D-半乳糖胺灌胃建立小鼠实验性肝损伤模型,以不同剂量 BEAD 和阳性对照药联苯双酯灌胃治疗,测定小鼠血浆中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)活性。结果表明不同剂量 BEAD 对 CCl_4 、D-半乳糖胺造成的小鼠急性肝损伤 ALT、AST 活性升高具有降低作用, BEAD 中、高剂量能显著降低 ALT、AST 的含量,与模型对照组相比, $P < 0.01$ 。说明 BEAD 中高剂量对小鼠急性肝损伤具有保护作用。

关键词:美味猕猴桃根;提取物;保肝作用

中图分类号:R 963

文献标识码:A

The Liver-protective Effect of the Extracts from the *Actinidia deliciosa* Root

BAI Xin-peng, QIU Ai-yong

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Effect of the n-Butanol extraction of *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Ling et A. R. Ferguson root (BEAD) on the alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in injured mice serum was investigated. The experimental mouse models was induced by carbon tetrachloride (CCl_4), and D-galactosamine (D-Gla). ALT and AST in serum were determined by biochemical method. Compared with CCl_4 and D-Gla models, BEAD at 120 mg/kg and 60 mg/kg could decrease the contents of ALT and AST ($P < 0.01$). These results indicated that the BEAD was a novel effective liver protection ingredient.

Key words: *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Ling et A. R. Ferguson root; Extract product; Liver protective

美味猕猴桃(*Actinidia deliciosa* C. F. Liang et A. R. Ferguson)为猕猴桃科植物。猕猴桃的根,又称藤藜根。具有清热利尿、活血消肿的功效。民间

常用于治疗肝炎、水肿、跌打损伤、风湿关节痛、乳汁不足、淋虫、带下、疮疖、瘰癧^[1]。干品常用量 30~60 g,配方水煎服。实验表明,猕猴桃果可预防

收稿日期:2006-01-13; 修回日期:2006-02-28.

作者简介:白新鹏(1963-),男,河南南阳人,高级工程师,粮食、油脂和植物蛋白工程博士研究生。

癌症^[2-3],果汁对小鼠肝损伤具有保护作用^[4]。根的乙醇粗提物,在体内外具有抗肿瘤作用^[5-7]。但美味猕猴桃根提取物保肝作用的研究尚未见报道。

本文从美味猕猴桃根中分离得到正丁醇提取物(BEAD),使用四氯化碳(CCl_4)和D-半乳糖胺诱发小鼠急性肝细胞损伤,观察不同剂量BEAD对肝脏的保护作用,为研究美味猕猴桃根保肝作用提供实验数据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 ICR种小白鼠雌雄各半,6~8周龄,体重18~22 g,由无锡山禾药业实验动物中心提供,合格证号:SCXK(苏)2003-0004。分笼饲养,自由饮食,观察3 d后用于试验。

1.1.2 主要试剂与仪器 丙氨酸氨基转移酶(ALT批号:010581)测定试剂盒,天门冬氨酸氨基转移酶(AST批号:020261)测定试剂盒:中生北控生物科技股份有限公司产品;四氯化碳(AR级):上海试剂公司产品,批号:20041238;大豆色拉油(食品级):上海嘉里粮油工业有限公司产品,批号:20040906;联苯双酯,北京协和药厂产品;D-半乳糖胺,Sigma公司产品;用生理盐水配制受试药,超声助溶或助悬。

5810R 冷冻高速离心机:德国 EPPENDORF 公司产品;BTS-370 plus 全自动生化仪:西班牙 BIOSYSTEMS 公司产品;722 型光栅分光光度计:上海分析仪器三厂制造。

1.1.3 猕猴桃根正丁醇提取物(BEAD)制备 美味猕猴桃根 9.8 kg,切碎为片状,80℃以下烘干至水分小于质量分数 10%,粉碎小于 20 目,用工业乙醇(体积分数 65%)45℃以下回流提取 3 次,提取液于 50℃减压浓缩,得 360 g 深黄色流浸膏,然后取 180 g 膏状物,加入适量蒸馏水,搅成糊状混合液,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取 3 次(每次 500 mL),分别合并提取液,减压回收溶剂得石油醚提取部分浸膏 20 g,乙酸乙酯提取部分浸膏 40 g 和正丁醇提取部分的浸膏 60 g。

1.2 方法

1.2.1 CCl_4 致小鼠急性肝损伤模型的建立 雌雄 ICR 种小鼠分笼饲养于 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 明暗各 12 h 的动物实验室内,自由饮水和进食。动物按体重随机分成 6 组,每组 10 只:正常对照组(NOR)、模型对照组(MOD)、联苯双酯阳性对照组(DGL 120 mg/kg)、BEAD 低剂量组(E-L 30 mg/kg)、BEAD 中剂

量组(E-M 60 mg/kg)、BEAD 高剂量组(E-H 120 mg/kg)。用药组每天按 10 mL/kg 体积灌胃给药(IG)1 次,正常组和模型组给予等量生理盐水,连续 7 d。于最后一次给药后 10 h,正常组按 0.1 mL/10 g 腹腔注射大豆色拉油,其余组给予等量 0.1% CCl_4 大豆色拉油溶液。同时禁食,自由饮水,动物禁食 17 h 后经眼眶取血,常规制备血浆后测定血清 ALT、AST,并取肝按常规作组织病理学检查。

1.2.2 D-半乳糖胺致小鼠急性肝损伤模型的建立

该模型的建立方法同 1.2.1,只是致肝损伤的试剂由 D-半乳糖胺(600 mg/kg)代替了四氯化碳(0.1%),其它处理方法相同。

1.2.3 检测指标 采用速率法以全自动生化分析仪测定血清中 ALT 及 AST 活性,检测法参照说明进行。

1.2.4 数据处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间两两比较方差分析进行统计学处理。

2 结果与讨论

2.1 病理剖检

模型组、提取物组可见实质器官不同程度的变化,肝脏肿大,颜色灰黄或见到表面有针尖到米粒大小的点状病灶,有的似煮熟样,质地软脆;胆囊扩大,充满胆汁;肾脏肿大,质地柔软,颜色灰黄或灰白;心脏灰白,质地软;脾脏肿大,色变暗质软;在腹腔、心包腔可见少量积液。两组小鼠均见胃胀气,部分小鼠胃浆膜可见点状出血,腹腔渗出液稍增多。对照组小鼠未见异常。

2.2 血清中 ALT、AST 的活性变化

2.2.1 BEAD 对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤血清 ALT、AST 的影响 BEAD 对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤血清 ALT、AST 的影响见表 1。

表 1 结果表明:与正常对照组相比,模型组 CCl_4 肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 值明显升高($P < 0.01$)。与阳性对照组(联苯双酯组 + CCl_4)相似,正丁醇提取物各剂量组均程度不同地使 CCl_4 肝损伤小鼠升高的血清 ALT 和 AST 不同程度的降低,中、高剂量组与阳性对照组效果相当,具有明显的降低作用。说明建模成功。显示 BEAD 对 CCl_4 急性肝损伤小鼠具有保肝降酶作用。

2.2.2 BEAD 对 D-半乳糖胺诱导的小鼠肝损伤血清 ALT、AST 的影响 BEAD 对 D-半乳糖胺诱导的小鼠肝损伤血清 ALT、AST 的影响见表 2。

表 1 BEAD 对 CCL₄急性肝损伤小鼠血清 ALT/AST 的影响($n=10 \bar{x}\pm s$)
Tab. 1 Effect of BEAD on ALT/AST in mice serum from CCL₄ ($n=10 \bar{x}\pm s$)

组别	动物数量/只	剂量/(mg/kg)	ALT/(IU/L)	AST/(IU/L)
空白对照组	10		58.6±15.8	130.6±32.5
模型组 CCL ₄	10		542.3±88.6	202.8±25.6
联苯双酯组 + CCL ₄	10	120	309.8±78.6**	138.2±46**
低剂量组 + CCL ₄	10	30	436.6±62.5*	148.3±35*
中剂量组 + CCL ₄	10	60	365.8±61.2*	136.7±14.3*
高剂量组 + CCL ₄	10	120	323.6±71.8*	127.6±8.53*

注:与模型组比较:* $P<0.05$;** $P<0.01$

表 2 BEAD 对 D-半乳糖胺诱导的小鼠肝损伤血清 ALT/AST 的影响($n=10 \bar{x}\pm s$)
Tab. 2 Effect of BEAD on ALT/AST in mice serum from D-Gla ($n=10 \bar{x}\pm s$)

组别	动物数量/只	剂量/(mg/kg)	ALT/(IU/L)	AST/(IU/L)
空白对照组	10		36.6±15.8	128.6±27.5
模型组 D-Gla	10		246.2±21.8	282.6±14.7
联苯双酯组 + D-Gla	10	120	58.2±36.5**	198.4±35.6*
低剂量组 + D-Gla	10	30	219.7±23.6*	231±26.1*
中剂量组 + D-Gla	10	60	198.4±25.3*	216.4±31.5
高剂量组 + D-Gla	10	120	179.7±27.6*	202.2±25.1*

注:与模型组比较:* $P<0.05$;** $P<0.01$ 。

表 2 结果表明:与正常对照组相比,模型组 D-Gla 肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 值明显升高($P<0.01$)。与阳性对照组(联苯双酯组 + D-Gla)相似,正丁醇提取物各剂量组均使 D-Gla 肝损伤小鼠升高的血清 ALT 和 AST 不同程度的降低,中、高剂量组与阳性对照组一样,具有明显的降低作用。说明 BEAD 对 D-Gla 急性肝损伤小鼠具有保肝降

酶作用。
2.3 小鼠肝脏的病理组织学检查
为了观察病理组织学变化,我们分别选取对照组、模型组和中剂量提取物组(E-M 60 mg/kg)小鼠的肝作切片电镜图,观察病理组织学变化,结果见图 1。

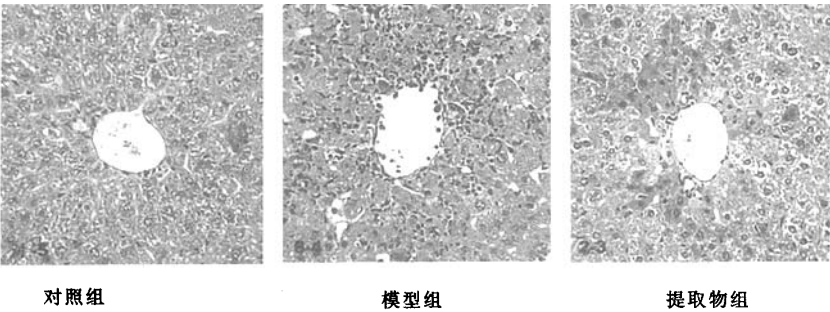


图 1 肝切片电镜图
Fig. 1 Microscopic examination of mice liver

从图 1 可以看出:模型组小鼠肝索排列紊乱, 浓染成黑色固缩, 并有中央性坏死、少量中性粒细胞质中空泡增多, 围绕中央静脉周围许多肝细胞核 胞浸润、中央静脉出血和肝窦淤血现象, 中央坏死

的肝小叶较多。而提取物组肝脏受 CCl_4 损伤明显减轻,肝小叶结构清楚,仅有少量肝细胞颗粒变性和脂肪变性,无明显肝细胞坏死和炎性细胞浸润和淤血,中央坏死的肝小叶数量较攻毒组少。对照组小鼠肝组织学观察未见异常。进一步验证了部位 BEAD 对肝脏损伤有保护作用。

2.4 机理分析

近年许多文献指出肝组织细胞的损伤与自由基毒性反应关系极为密切^[8]。在肝脏中,ALT 主要分布于肝细胞浆的可溶性部分,AST 分布于肝细胞浆的可溶性部分及线粒体中。当肝细胞受到损害时,大部分的 ALT 和 AST 被释放入血液造成转氨酶活性增高。而 CCl_4 致毒机制^[9] 为经肝微粒体细胞色素 P450 代谢生成自由基 $\cdot\text{CCl}_3$ 攻击肝细胞膜上磷脂分子引起脂质过氧化, $\cdot\text{CCl}_3$ 继而与膜脂质和蛋白质大分子进行共价结合,引起膜结的和功能完整性的破坏,使肝细胞膜通透性升高,胞内酶从细胞中大量溢出,因此,通过测定血清或血浆中 ALT 和 AST 活性的变化能反应肝脏损害的程度^[10-11]。

现代医学认为, CCl_4 进入肝细胞后,经还原活化产生自由基,通过脂质过氧化物的破坏,使线粒体膜脂质溶解,影响线粒体结构和功能,使酶蛋白

合成减少,造成酶的破坏,因而影响代谢功能和能量的生成,致使肝细胞变性坏死。而 D-Gla 为肝细胞的磷酸尿嘧啶核苷的干扰剂,可造成肝弥漫性坏死和炎症与临床病毒性肝炎的肝脏病理变化极为相似^[12]。ERAD 大小剂量组均能显著地抑制 CCl_4 和 D-Gla 所致急性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 的升高,减轻肝组织的病理损害程度,其改善肝功能可能与抗氧化作用有关^[13]。

在肝保护试验中,我们采用 1% CCl_4 大豆色拉油溶液给小鼠腹腔注射,成功地建立了肝损伤模型。从解剖与组织学变化来看,模型组肝脏肿大,可见较多的坏死灶,提取物组在病理变化,尤其在组织学变化上相对较轻;从转氨酶活性来看,模型组 ALT 活性显著高于提取物组,说明正丁醇提取物对肝脏具有一定的保护作用。

3 结 论

通过对美味猕猴桃根的正丁醇提取物保肝降酶实验,发现其根确实具有保肝作用,活性物质主要集中在正丁醇提取物部位。具体什么成分是保护作用的主要生理活性物质,我们正在进一步的研究中。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(下)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977. 2211.
- [2] 宋圆菊. 阻断大鼠和健康人体内 N-亚硝基脯氨酸的合成[J]. 营养学报,1988,10(1):50.
- [3] 苑翠柳. 抗癌食果研究的进展[J]. 林业科技通讯,1999, 6: 20-22.
- [4] 黄倬伟. 猕猴桃果汁的小鼠肝损伤的作用和影响[J]. 中药通报,1987,12(3): 52.
- [5] 钟振国,张凤芬,甄汉深,等. 美味猕猴桃根提取物抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中医学刊 2004, 22(9): 1705-1707.
- [6] 李延. 8 种中草药的抗肿瘤作用实验[J]. 时珍国医国药,2001, 2(7): 587-588.
- [7] 邹益友,谭桂山,谢兆霞. 猕猴桃根抑制肿瘤细胞的实验研究[J]. 湖南中医导报,1999, 5(4): 37.
- [8] Vaie nzuel A. Sily marin protection against hepatic lipid petoxodation induced by acute ethanol intoxication in the rat[J]. *Biochem pharmacol*, 1985, 34: 2209.
- [9] Perriseond D,Festa B. Pharmacology; mechanisms of action and classification of antinecrotic hepatiprotective agents tips [J]. *Biochem phanmacol*, 1982, 29: 371.
- [10] 张德权,吕飞杰,台建祥,等. 栀子黄色素对四氯化碳肝损伤小鼠的影响[J]. 营养学报,2002, 24(3): 269-272.
- [11] 胡怡秀,刘秀英,胡余明,等. 甘泰康对小鼠四氯化碳肝损伤的影响及其机理探讨[J]. 中国热带医学,2002, 2(3): 303-306.
- [12] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999. 158-463.
- [13] 钟正贤,陈学芬,周桂芬. 广西产藤茶总黄酮的药理研究[J]. 广西科学,1999, 6(3): 216-218.

(责任编辑:杨 萌)