

文章编号: 1673 1689(2010)05-0730-05

刺梨果汁对拘束负荷诱发小鼠肝损伤的保护作用

于丽伟, 王聪智, 何蓉蓉*

(暨南大学 中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632)

摘要: 研究新鲜刺梨果汁和刺梨胶原饮料对拘束负荷诱发小鼠肝损伤的保护作用。将雄性昆明种小鼠分为正常对照组、应激模型组、刺梨果汁组、刺梨胶原饮料组, 每天灌胃给药一次, 连续 7 d, 最后一次给药 30 min 后模型组和给药组给予一次性拘束负荷 18 h。检测小鼠血浆谷丙转氨酶 (ALT) 水平、抗氧化能力指数 (ORAC)、肝组织丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、谷胱甘肽 (GSH) 含量以及刺梨果汁和胶原饮料的体外抗氧化水平。结果与应激模型组相比, 刺梨果汁及胶原饮料明显降低小鼠血浆 ALT 水平和肝组织中 MDA 含量, 改善血浆 ORAC 及肝组织 SOD 活性。其中, 刺梨胶原饮料还能显著提高肝组织 GSH 含量。此外, 体外实验结果证明刺梨果汁及胶原饮料均显示一定的抗氧化活性。刺梨果汁和刺梨胶原饮料对拘束负荷诱发的小鼠肝损伤具有一定的保护作用, 其作用机制可能部分来自于清除自由基和抑制脂质过氧化过程。

关键词: 刺梨果汁; 刺梨胶原饮料; 拘束负荷; 肝损伤保护作用

中图分类号: R 967

文献标识码: A

Protective Effect of *Rosa roxburghii* Tratt Drink Against Liver Injury in Mice Loaded with Restraint Stress

YU Li wei, WANG Cong zhi, HE Rong rong*

(Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jínan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: OBJECTIVE To investigate the protective effect of *Rosa roxburghii* Tratt juice (100% raw juice) and *Rosa roxburghii* Tratt collagen drink on restraint-stress induced liver injury of mice. METHODS The male KM mice were randomly divided into normal control group, stress model group, *Rosa roxburghii* Tratt juice group and *Rosa roxburghii* Tratt collagen drink group. The mice were orally administered samples once a day successively for 7 days, then restrained for 18 h after 30 min of the last intragastric administration. Data were obtained including activities of Alanine aminotransferase (ALT) and the Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) value in plasma, the content of Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and activities of superoxide dismutase (SOD) in liver. Antioxidant capacity of *Rosa roxburghii* Tratt juice and collagen drink in vitro were also determined. RESULTS *Rosa roxburghii* Tratt juice and collagen drink can markedly decrease activities of ALT in plasma, reduced MDA level in liver and effectively increase ORAC value in plasma of mice compared with the model group. They can also increase SOD activities in mice liver. Apart from the above roles, *Rosa roxburghii* Tratt collagen drink

收稿日期: 2009-11-25

* 通信作者: 何蓉蓉 (1983-), 女, 汉族, 江西吉安人, 博士研究生, 讲师, 主要从事中药药理学研究。

Email: rongronghe66@163.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

can increase GSH content in mice liver compared with model group. Additionally, *Rosa roxburghii* Tratt juice and collagen drink can effectively increase the ORAC value in vitro. **CONCLUSION** The results indicate that *Rosa roxburghii* Tratt and collagen drink had the effect of protecting liver from damage induced by stress in mice. It is considered that this protective effect may be related to its free radical scavenging activity and lipid peroxidation inhibitory effects.

Key words: *Rosa roxburghii* Tratt juice, *Rosa roxburghii* Tratt collagen drink, restraint stress, protective effect against liver injury

刺梨是生长在云贵高原及攀西高原的一种蔷薇科蔷薇属多年生落叶丛生灌木刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt.)的果实,是我们西南区域特有的野生植物资源。刺梨含有丰富的VC、超氧化物歧化酶(SOD)、刺梨黄酮、刺梨多糖及多种人体必须氨基酸^[1],民间多用于消食、止泻、解暑及治疗积食腹胀。至今为止的研究证明刺梨含有的一些活性成分还具有抗肿瘤^[2],调节机体免疫功能、解毒、镇静、延缓衰老^[3-4]及抗动脉粥样硬化^[5]等功能。但有关刺梨制品与肝组织保护方面的研究尚不多见,为此本实验通过建立小鼠急性拘束负荷模型探讨刺梨果汁和刺梨胶原饮料对应激性肝损伤的影响,旨在揭示刺梨果汁和刺梨胶原饮料对人体健康调节功效的科学内涵,同时为刺梨植物资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级昆明种雄性小鼠,体重(18~22)g,购自广东省医学实验动物中心,许可证号SCXK(粤)2008-0002。小鼠在饲养温度(23±2)℃和照明时间12h/d(7:00~19:00开灯)的条件下,饲养一周后进行实验。

1.2 试剂

刺梨果汁为新鲜刺梨果实的生榨汁;刺梨胶原饮料为贵州卡璐丽卡生物医药科技有限公司产品(批号:20090511);丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒及考马斯亮兰蛋白测定试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品;谷胱甘肽(GSH)标准品购自日本东京Kohjin公司;抗氧化标准物Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid,维生素E的水溶性衍生物)、自由基产生剂AAPH(2,2'-azobis(2-amidinopropane)-dihydrochloride)及荧光素钠(三者均为

分析纯)为日本大阪Wako Pure Chemical Industries公司产品;辛酸磺酸钠(SOS)(色谱纯)购自美国DIMA科技有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA)(分析纯)购自天津市大茂化学试剂厂;甲醇(色谱纯)为天津市科密欧化学试剂有限公司产品。

1.3 仪器

高效液相色谱仪:日本Hitachi公司产品;ECD-100型电化学检测器:日本Eicom公司产品;N2000色谱数据工作站:浙江大学,25μL微量进样器:上海高鸽工贸有限公司生产;MK3型酶标仪:芬兰雷博产品;GENios型多功能荧光酶标仪:Magellan工作站;ULTRA-TURRAX T8型组织匀浆机:德国IKA公司产品;3-18K型台式高速冷冻离心机:德国Sigma公司产品;BS210S电子分析天平:德国Sartorius公司产品;WH-861型漩涡混合器:太仓市科教器材厂产品;pH S-25型酸度计:上海伟业仪器厂生产。

1.4 方法

1.4.1 分组造模及给药 实验将小鼠随机分为4组,每组7只,分别为正常对照组、拘束模型组、刺梨果汁组、刺梨胶原饮料组。按刺梨胶原饮料的建议服用量计算为每人每天0.86mL/kg,按动物剂量换算公式确定每只小鼠每天的给药剂量为7.83mL/kg。刺梨果汁组灌胃等剂量刺梨果汁,正常对照组和拘束模型组均灌胃等剂量水溶液,每天1次,给药第7d的30min后,模型组和给药组给予一次性拘束负荷18h。小鼠拘束装置中参考文献[6]改制,为通风良好的50mL尖底聚丙烯塑料离心管,拘束期间小鼠不能进食饮水,正常对照组小鼠为非拘束禁食禁水小鼠。

1.4.2 抗氧化能力指数ORAC值的测定 本实验参照Davalos等人方法^[7-8]并加以改进。其原理为荧光素钠在485nm光激发下,发射527nm荧光,可以被AAPH释放的过氧自由基氧化而使荧光特性消失。当抗氧化剂存在时,可与荧光素钠竞争氧

化剂,减缓其荧光消退的速度。根据这一特性,可用来测定样品氧自由基清除活性。具体测定方法是将96孔板每个微孔中加入待测样品溶液20 μL ,再加入磷酸钾缓冲液20 μL 和AAPH140 μL (终浓度12.8 mmol/L),最后添加荧光素钠20 μL 至终浓度为63 nmol/L,立即启动反应并迅速将酶标板置于预温37 $^{\circ}\text{C}$ 的荧光酶标仪中开始测定。采用动力学方式,每2 min测定一个点,至荧光强度衰减为零为止。ORAC值是以1 $\mu\text{mol/L}$ 的Trolox在荧光衰减曲线上对应的保护积分面积作为标准对照计算。

1.4.3 血浆中ALT的测定 小鼠乙醚麻醉后心脏采血,并置于肝素处理过的离心管中以5000 r/min离心5 min分离血浆,以赖氏法(Reitman-Frankel)测定血浆中ALT活性。测定原理为利用ALT在37 $^{\circ}\text{C}$ 及pH 7.4条件下作用于丙氨酸及 α -酮戊二酸组成的底物可生成丙酮酸及谷氨酸。反应半小时后,加入2,4-二硝基苯肼(DNPH)盐酸溶液终止反应。由于DNPH与酮酸中羰基加成生成丙酮酸苯腙,而苯腙在碱性条件下呈红棕色,因此可在492 nm下采用比色法进行测定。

1.4.4 肝组织中MDA含量的测定 肝组织的10%生理盐水匀浆在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以9000 r/min离心10 min,取上清液稀释成2%后以考马斯亮兰蛋白试剂盒测定蛋白含量。小鼠肝组织匀浆中MDA含量采用MDA检测试剂盒测定。测定原理为MDA与硫代巴比妥酸(Thiobarbituric Acid, TBA)缩合,形成在532 nm处有最大吸收峰性质的红色产物,通过比色法进行测定并计算MDA含量。

1.4.5 肝组织中SOD活性的测定 小鼠肝组织制成质量分数1%的生理盐水匀浆,采用SOD检测试剂盒测定SOD活性。测定原理为通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$),后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色,用可见光分光光度计测其吸光度。当被测样品中含SOD时,则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值,通过公式计算可求出被测样品中的SOD活力。

1.4.6 肝组织中GSH含量的测定 小鼠肝组织在添加终浓度为质量分数3%高氯酸(PCA)的条件下匀浆,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以12000 r/min离心15 min,取上清液用0.45 μm 微孔滤膜过滤后20 $^{\circ}\text{C}$ 保存用于GSH分析。GSH含量是利用HPLC方

法进行测定,方法为使用日本Nacalai Tesque公司Cosmosil系列5C18柱(4.6 mm $\times$ 150 mm),流动相为99 mmol/L磷酸二氢钠缓冲液(pH=2.2),体积分数1%甲醇,200 mg/L SOS,5 mg/L EDTA,用磷酸调节pH值至2.24后用于本实验^[9]。柱温为25 $^{\circ}\text{C}$,流速设定为1 mL/min,电压为600 mV,制备好的样品进样10 μL 测定其峰面积,并以峰面积 y ($\text{mV} \cdot \text{s}$)依据回归方程和蛋白含量,算出样品的浓度 x ($\mu\text{g/g}$)。

1.5 数据统计处理方法

实验数据以Mean $\pm$ SD表示,采用SPSS13.0软件,利用ANOVA检验和Dunnett's t 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 刺梨果汁和刺梨胶原饮料对拘束小鼠血浆ALT水平,ORAC值;肝组织MDA含量,SOD活性,GSH含量的影响

与正常对照组相比,拘束模型组小鼠的血浆ALT水平显著升高($P < 0.01$),说明拘束负荷诱发了小鼠急性肝细胞损伤。我们在检测氧化应激水平时发现拘束负荷小鼠肝组织的MDA含量明显升高($P < 0.01$)的同时,血浆ORAC值有意的降低($P < 0.01$),显示拘束负荷引起小鼠机体处于一种氧化损伤状态。此外,我们在实验中确认拘束负荷小鼠的肝组织SOD活性显著降低($P < 0.01$),GSH含量明显下降($P < 0.01$),这一结果可能是来自拘束负荷诱发的氧化应激增加了对肝组织中抗氧化系统的破坏作用。与拘束模型组相比,刺梨果汁和刺梨胶原饮料能显著降低因应激负荷引起的小鼠ALT水平上升($P < 0.01$),具有缓解急性肝损伤的效果。此外,刺梨果汁和刺梨胶原饮料也显示改善机体的氧化应激状态,缓解MDA水平和显著增加血浆ORAC作用($P < 0.05$)。同时,刺梨果汁和刺梨胶原饮料也能明显的改善小鼠肝组织SOD活性($P < 0.05$, $P < 0.01$),其中刺梨胶原饮料对拘束引起的肝组织GSH含量下降具有明显的改善作用($P < 0.05$),表明刺梨果汁和刺梨胶原饮料能够提高肝组织的抗氧化能力水平(见表1)。

2.2 刺梨果汁和刺梨胶原饮料的体外ORAC值测定 刺梨果汁和胶原饮料在体外均能明显延缓荧光物质被活性氧自由基淬灭的速度(见图1)。我们的实验结果显示,刺梨果汁的抗氧化能力指数ORAC值(样本数为3的均值 $\pm$ 标准误)为(90.271.20 $\pm$ 11.987.49) U/mL,刺梨胶原饮料为(104

392.9±15.068 26) U/mL,说明刺梨果汁和胶原饮 料在体外具有一定的抗氧化能力。

表 1 刺梨果汁和刺梨胶原饮料对拘束小鼠血浆 ALT 水平 ORAC 值的影响(均值±标准差, n= 7)

Tab. 1 Effects of Rosa roxburghii Tratt juice and collagen drink on ALT, ORAC in plasma and MDA, SOD, GSH in liver of mice loaded with restraint stress (Mean±SD, n= 7)

组别	ALT/ (IU/L)	ORAC/ (U/mL)	MDA/ (nmol/mg)	SOD/ (U/mg)	GSH/ (μg/g)
正常 对照组	30.30±4.36	15247.68±1829.72	8.02±1.95	10.63±1.76	200.58±36.74
拘束 模型组	107.28±12.87 ^{△△}	10948.48±1423.30 [△]	27.38±4.00 ^{△△}	7.92±0.91 ^{△△}	107.58±29.02 ^{△△}
刺梨 果汁组	37.50±4.13 [*]	13421.76±1275.07 [*]	17.97±7.27 [*]	9.59±1.30 [*]	108.31±31.11
刺梨胶原 饮料组	38.01±4.37 [*]	13609.92±1497.09 [*]	14.76±5.69 ^{**}	10.51±1.45 [*]	153.64±23.59 [*]

注:与正常对照组比[△]P<0.05,^{△△}P<0.01,与应激对照组相比^{*}P<0.05,^{**}P<0.01

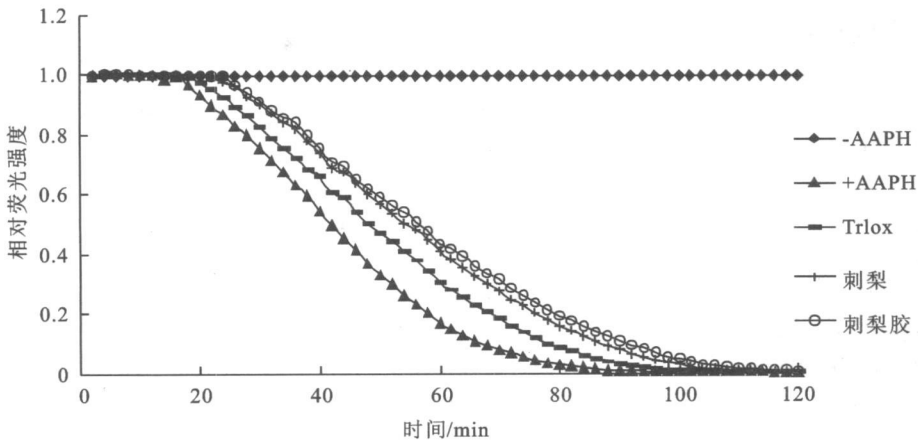


图 1 刺梨果汁和胶原饮料体外 ORAC 荧光衰减曲线

Fig. 1 Inhibition effects of Rosa roxburghii Tratt juice and collagen drink on fluorescence decay in vitro

2.3 讨论

一般认为应激反应是机体在负荷身心压力时表现的一种适应性生理过程,但持续性应激负荷会引发机体在机能和代谢上发生病理变化^[10]。应激负荷不仅会影响激素水平,增加脂质过氧化,也会降低内源性抗氧化物质的含量^[11-12]。Rauen^[13]等的研究证明肝脏在应激负荷状态下大量生成活性氧自由基,使机体内自由基的生成和消除失去平衡,过多的活性氧自由基攻击生物膜中的不饱和脂肪酸而发生脂质过氧化反应,破坏脂肪酸链和细胞膜的完整性,损伤肝脏细胞,引起血浆 ALT 活性升高。我们在检测氧化应激水平时发现,与正常对照组相比,拘束负荷小鼠的血浆 ALT 水平显著升高,表明应激负荷诱发小鼠肝组织损伤。肝组织的 MDA 含量明显升高的同时,血浆抗氧化能力指数 ORAC 值显著降低,显示拘束负荷引起小鼠机体处于氧化应激状态。同时,拘束负荷使 SOD 和 GSH

等机体抗氧化系统重要成分^[14]的水平也显著下降。力量量化激化系统的我们探讨刺梨果汁和刺梨胶原饮料的抗应激作用发现,刺梨果汁和刺梨胶原饮料具有改善机体的氧化应激状态,提高肝组织抗氧化系统能力,缓解急性肝损伤的效果。

刺梨是我国西南区域特有的野生植物资源,不仅含有维生素、多糖等多种活性成分^[1],也富含 SOD 及刺梨黄酮等抗氧化物质^[15],我们的体外实验结果确认刺梨果汁和刺梨胶原饮料有较强的抗氧化能力,提示刺梨果汁和刺梨胶原饮料对肝组织的保护作用可能是通过其富含小分子抗氧化活性物质及提高内源性抗氧化能力实现的。

3 结 语

研究结果表明刺梨果汁和刺梨胶原饮料能有效缓解拘束负荷小鼠机体的氧化应激状态,减轻拘

束负荷诱发的自由基对肝组织的损伤,改善肝组织质过氧化来实现保护肝组织的作用。机能,其作用机制可能是通过清除自由基和防止脂

参考文献(References):

- [1] 董李娜,潘苏华. 刺梨的研究进展[J]. 江苏中医药, 2007, 39(8): 78– 79.
DONG Li na, PAN Su hua. Development of study on rosa roxburghii [J]. **Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine**, 2007, 39(8): 78– 79. (in Chinese)
- [2] 戴支凯,余丽梅. 刺梨的药理作用[J]. 中国药房, 2007, 18(21): 1668– 1669.
DAI Zhì kai, YU Li mei. Pharmacological study on rosa roxburghii [J]. **China Pharmacy**, 2007, 18(21): 1668– 1669. (in Chinese)
- [3] 杨娟,陈付学,梁光义. 刺梨多糖 RRT P- 1 的理化性质及抗缺氧活性[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(23): 1775– 1778.
YANG Juan, CHEN Fu xue, LIANG Guang yi. Studies on physicochemical properties and anti hypoxia activity of polysaccharide RRT P 1 from rosa roxburghii [J]. **Chin Pharm**, 2005 40(23): 1775– 1778. (in Chinese)
- [4] 张晓玲,瞿伟菁,孙斌,等. 刺梨黄酮的体外抗氧化作用[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(4): 396– 400.
ZHANG Xiao ling , QU Wei jing , SU N Bin , et al, The antioxidative activity of flavonoids from rosa roxburghii tratt [J]. **Natural Product Research And Development**, 2005, 17(4) 396– 400. (in Chinese)
- [5] Prior RL, Hoang H, Gu L, et al, Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples [J]. **Agric Food Chem**, 2003, 51(11): 3273– 3279.
- [6] 何蓉蓉,栗原博,宝丽,等. 王老吉凉茶对应激小鼠糖代谢机能和体内过氧化状态的影响[J] 中成药, 2008, 30 (8): 1111– 1114.
HE Rong- rong, KURIHARA Hiroshi, BAO Li, et al, Effect of wanglaoji cool tea on plasma gluco metabolism and peroxidative state in stress mice [J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**, 2008, 30 (8): 1111– 1114. (in Chinese)
- [7] Davalos A, Gomez Cordoves C, Bartolome B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC Fluorescein) assay [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2004, 52: 48– 54.
- [8] Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S. Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2002, 1570(1): 47.
- [9] Ou B, Hampsch – Woodill M, Prior R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2001, 49: 4619– 4626.
- [10] Rosch P. J. Stress and memory loss: some speculations and solutions [J]. **Stress Med**, 1997, 13(1): 1– 6.
- [11] Sharma K K, Mediratta P K, Reeta K H, et al. Effect of L- arginine on restraint stress induced modulation of immune responses in rats and mice [J]. **Pharmacol Res**, 2004, 49(5): 455– 460.
- [12] Kurihara H, Fukami H, Asami S, et al. Effects of oolong tea on plasma antioxidant capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay [J]. **Biol Pharm Bull**, 2004, 27(7): 1093– 1098.
- [13] Rauen U, Reuters I, Fuchs A, et al, Oxygen free radical mediated injury to cultured rat hepatocytes during cold incubation in preservation solutions [J]. **Hepatology**, 1997, 26: 351– 357.
- [14] 鲁军,任迪峰,王建中,等. 钝顶螺旋藻的体内抗氧化和护肝作用[J] 食品与生物技术学报, 2009, 28(6): 777– 780.
LU Jun, REN Di feng, WANG Jiang zhong, et al, Antioxidant and hepatoprotective effect of spirulina platensis in vivo [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(6): 777– 780. (in Chinese)
- [15] 王薇,夏炳南. 刺梨的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 1996, 31(11): 643– 645.
WANG Wei, XIA Bing nan, Development of study on rosa roxburghii [J]. **Chin Pharm**, 1996, 31(11): 643– 645. (in Chinese)

(责任编辑: 杨萌)