

文章编号:1673-1689(2009)05-0764-04

## 山茱萸多糖的生理活性研究

姚运香, 李冠业, 丁霞\*

(南京农业大学 化学系, 江苏 南京 210095)

**摘要:**以肾阴虚小鼠模型、CCl<sub>4</sub>急性肝损伤小鼠模型及小鼠免疫低下模型探讨山茱萸多糖补益肝肾的作用。以负重游泳时间、耐缺氧时间、血清超氧化歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量为指标,考察山茱萸多糖对肾阴虚小鼠模型的作用;以丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、SOD和MDA含量为指标,考察山茱萸多糖对CCl<sub>4</sub>急性肝损伤小鼠模型的作用;以小鼠血清溶血素水平,考察山茱萸多糖对机体特异性免疫功能的影响。研究结果表明:山茱萸多糖能显著增强肾阴虚小鼠的负重游泳时间、耐缺氧时间,提高血清中SOD活性,降低血清中MDA含量;降低肝损伤小鼠血清ALT、AST水平和肝脏组织中MDA含量,提高肝脏组织中SOD活性;提高免疫低下小鼠血清溶血素水平。山茱萸多糖能增强小鼠免疫功能、保护肝脏组织和改善肾阴虚症状,并以此实现补益肝肾的作用。

**关键词:**山茱萸多糖;肾阴虚;急性肝损伤;免疫功能

中图分类号:R 965

文献标识码:A

## Studies on Nourishing Effects of Cornel Polysaccharide on Liver and Kidney

YAO Yun-xiang, LI Guan-ye, DING Xia\*

(Department of Chemistry, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The target of this research was to investigate the tonic effects of Cornel polysaccharide on liver and kidney in mice through kidney-yin deficiency model, CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury model and low-immunity model. It was found that cornel polysaccharide significantly (1) increase the swimming time, hypoxia tolerance time, serum SOD activity; (2) decrease MDA level and the serum hemolysin level; (3) decrease ALT, AST in injured mice serum and MDA in injured liver tissue; (4) but increase SOD activity in injured liver tissue. Those results strongly suggested that Cornel polysaccharide significantly enhance the body-specific immune function, inhibit acute liver injury and improve the symptoms of kidney-yin deficiency significantly. Furthermore, the results proven that Cornel polysaccharide has the nourishing effect on the liver and kidney in mice.

**Key words:** cornel polysaccharide; kidney-yin deficiency; acute liver injury; immune function

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸的干燥果肉,文献报道山茱萸多糖具有增强免疫功能及抗氧化性

活性<sup>[1-3]</sup>,被认为是一类重要的活性物质。作者就山茱萸生品与酒制品多糖对肾阴虚小鼠的滋阴补

收稿日期:2009-01-07

基金项目:国家“十五”科技计划重点项目(2001BA701A11)。

\* 通讯作者:丁霞(1963-),女,江苏扬州人,药学博士,副教授,主要从事中药化学研究。

Email:jsnndx405@yahoo.com.cn

肾作用、对肝组织的保护作用及对机体特异性免疫功能几个方面的影响作一探讨,以此研究山茱萸多糖补益肝肾的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 实验动物** 昆明种小鼠,20~25 g;豚鼠,(200±20)g;均由南京中医药大学实验动物中心提供;当年生健康仔公鸡;市售。

**1.1.2 原料** 山茱萸药材购于河南西峡县山茱萸医药公司,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为山茱萸(*Conrus officinalis* Sieb. et Zucc.)的干燥成熟果肉;山茱萸酒制品由南京中药饮片厂按 2005 版中华人民共和国药典加工制得。

**1.1.3 主要试剂** 氯化可的松:天津金耀氨基酸有限公司产品;六味地黄丸:河南省宛西制药股份有限公司产品;SOD、MDA、ALT、AST、考马斯亮兰试剂盒:南京建成生物工程研究所产品;钠石灰:上海五四化学试剂有限公司产品;联苯双酯片:江苏鹏鹞药业有限公司产品;香菇菌多糖:福建省闽东力捷迅药业有限公司产品;环磷酰胺:江苏恒瑞医药股份有限公司产品;四氯化碳、葡萄糖、氯化钠、柠檬酸钠、柠檬酸、碳酸氢钠、高铁氰化钾、氰化钾均为 AR 级试剂。

阿氏液(鸡红细胞保存液)制备:葡萄糖 2.05 g,氯化钠 0.42 g,柠檬酸钠 0.8 g,柠檬酸 0.055 g,蒸馏水 100 mL,10 min 灭菌后备用。

鸡红细胞制备与保存:健康仔公鸡翼下静脉取血,置血液于有玻璃珠的三角烧瓶中轻摇 10 min 除去纤维蛋白,加入 2 倍量的保存液,置 4℃下备用。临用时用生理盐水洗涤 3 次,经 2 000 r/min 离心 10 min 得压积红细胞,再按体积分数 5%生理盐水稀释。

都氏试剂:碳酸氢钠 1.0 g,高铁氰化钾 0.2 g,氰化钾 0.05 g,蒸馏水 1 000 mL,现用现配。

抗体制备与保存:豚鼠颈动脉取血,分离血清,将血清以体积比 10:1 加入压积鸡红细胞中,于 4℃吸收 30 min 后(除去非特异性补体参与的溶血),置 -20℃以下备用。临用时 2 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,用生理盐水稀释成体积比 1:10 血清备用。

**1.1.4 实验仪器** Spectra max 190 酶标仪:美国 AD 公司产品;WH-2 微型旋涡混合仪:上海沪西分析仪器厂产品;FJ-200 高速分散均质机:上海标本模型厂产品。

### 1.2 方 法

**1.2.1 山茱萸多糖的制备** 山茱萸生品、制品干燥

果肉以体积分数 95%的乙醇回流脱脂,药渣干燥后以热水(90~100℃)提取 3 次,合并提取液,浓缩,体积分数 80%醇沉,醇沉物加水溶解,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>法脱色,Savage 法脱蛋白质,透析,浓缩,体积分数 80%醇沉,沉淀用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,50℃真空干燥,得山茱萸生品与制品多糖,加水制成多糖溶液。

**1.2.2 对肾阴虚模型小鼠的影响** 分组、造模<sup>[4]</sup>及给药:小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,雄性。空白组和模型组给予生理盐水 20 mL/(kg·d),阳性对照组给予六味地黄丸 7 g/(kg·d),S 组给予山茱萸生品多糖 1 970 mg/(kg·d)(折合成原药材为 10 g/(kg·d)),Z 组给予山茱萸制品多糖 1 111 mg/(kg·d)(折合成原药材为 10 g/(kg·d)),各组每日按 20 mL/kg 剂量灌胃给药 1 次,连续 11 d。除空白组外,其它组于给药第 7 d 皮下注射氯化可的松 50 mg/kg,连续 4 d。

对肾阴虚小鼠负重游泳时间的影响:末次给药后 1 h,按体重的 10%负重,并放入程控水迷宫中游泳,立即用秒表计时,直到小鼠头部沉入水中 10 s 不能浮出水面时,结束计时,此为游泳时间。

对肾阴虚小鼠耐缺氧时间的影响:末次给药 2 h 后,单个置于容积为 250 mL 的盛有 40 g 钠石灰的广口瓶内,将瓶盖紧,立即用秒表记录各组存活时间。

对肾阴虚小鼠血清中 SOD 活力、MDA 含量的影响:末次给药 1 h 后,小鼠眼眶取血 3 000 r/min 离心 10 min,取血清依照试剂盒说明书上要求检测血清总 SOD、MDA。

**1.2.3 对急性肝损伤模型小鼠的影响** 分组、造模<sup>[5,6]</sup>及给药:小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半。空白组和模型组给予生理盐水 20 mL/(kg·d),阳性对照组给予联苯双酯 100 mg/kg,S 组与 Z 组同 1.2.2。各组每日按 20 mL/kg 剂量灌胃给药 1 次,连续 14 d。末次给药后 2 h,空白组腹腔注射豆油 0.01 mL/g,其它组腹腔注射 0.1% 四氯化碳 0.01 mL/g。

对 CCl<sub>4</sub>急性肝损伤小鼠血清及肝脏组织中 ALT、AST、SOD 及 MDA 水平的影响:造模后 18 h,眼眶取血,离心血清,测定 ALT、AST 含量;处死小鼠,取出肝脏,用冰冷生理盐水洗净血污,滤纸吸干,称质量。取肝右叶,用生理盐水制成质量分数 10%肝匀浆,3 000 r/min,离心 10 min,留上清液弃下面沉淀,用于测定 MDA 含量。取质量 10%的肝匀浆,用生理盐水稀释,制成质量分数 1%肝匀浆,用于测定 SOD 含量、蛋白质含量。ALT、AST、MDA 含量,SOD 活力、蛋白含量的测定按试剂盒方法测定。

**1.2.4 对小鼠特异性免疫功能的影响** 分组、造模<sup>[7]</sup>及给药:小鼠随机分为5组,每组10只,雌雄各半。空白组和模型组给予生理盐水 20 mL/(kg·d),阳性组给予香菇多糖 100 mg/(kg·d),S组与Z组同上。各组每日按 20 mL/kg 灌胃给药1次,连续9 d。给药第2天除空白组外,各组每只小鼠腹腔注射环磷酰胺 100 mg/kg,连续3 d,制备免疫功能低下的小鼠模型。第3天每只小鼠腹腔注射体积分数10%的鸡红细胞 0.2 mL 致敏。

对免疫低下小鼠血清溶血素水平的影响:第9 d 给药2 h后,眼眶取血,2 000 r/min 离心10 min,取血清。用生理盐水稀释500倍后,取1 mL,加体积分数5%鸡红细胞 0.5 mL,10% 补体 0.5 mL,置37℃恒温水浴中保温30 min,然后移至冰浴中终止反应,1 500 r/min 离心5 min,取上清液1 mL加都氏试剂3 mL,摇匀放置10 min,于540 nm处测定吸光度。

**1.2.5 数据统计学处理** 实验所得数据采用SPSS 10.0 软件进行组间t检验,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 山茱萸多糖对肾阴虚模型小鼠的影响

山茱萸多糖对肾阴虚小鼠负重游泳时间,耐缺氧时间,血清中SOD和MDA的影响见表1。结果表明:与正常对照组相比,模型组小鼠负重游泳时间与耐缺氧时间显著降低,血清中SOD值明显降

低,MDA值显著升高。与模型组相比,酒蒸山茱萸多糖与阳性对照组(六味地黄丸)相似,使肾阴虚小鼠降低的负重游泳时间与耐缺氧时间显著增高,使降低的SOD值明显提高,使升高的MDA值显著降低,而山茱萸生品多糖与模型组无显著性相异。

中医理论认为,肾阴虚时机体疲劳乏力,负重游泳时间明显缩短,耐缺氧能力亦降低,同时体内清除氧自由基的SOD活力降低,伴随不饱和脂肪酸氧化作用的终产物MDA含量增加。实验结果说明山茱萸经酒蒸制后提取的多糖,改善了小鼠肾阴虚症状,说明具有一定的滋阴补肾作用。

### 2.2 山茱萸多糖对急性肝损伤模型小鼠的影响

经统计学分析,酒蒸山茱萸多糖组与阳性对照组(联苯双酯组)相似,与模型组相比血清AST、ALT值,肝脏SOD、MDA值具有显著性差异,山茱萸生品多糖无显著性差异,结果见表2。实验结果表明:酒蒸山茱萸多糖使CCl<sub>4</sub>所致肝损伤小鼠升高的血清明显降低,与ALT和AST与阳性对照组一样,使CCl<sub>4</sub>所致肝损伤小鼠降低的肝脏SOD显著提高,升高的MDA值显著降低。

CCl<sub>4</sub>具有良好的亲肝性,被广泛的用于急性肝损伤模型,其致毒机制<sup>[8]</sup>被认为是CCl<sub>4</sub>经肝微粒体细胞色素P450代谢生成自由基·CCl<sub>3</sub>,该自由基攻击肝细胞膜上磷脂分子引起脂质过氧化,导致膜结构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,使肝组织或血清中ALT和AST活性明显增高。MDA是脂质过氧化的终产物,

表1 山茱萸炮制前后多糖对肾阴虚模型小鼠的影响

Tab. 1 Effect of polysaccharide in crude and processed Fructus Corni on kidney-yin deficiency mice

组别	剂量	负重游泳 时间/s	耐缺氧 时间/s	SOD/ (U/mL)	MDA/ (nmol/mL)
空白组	20 mL/kg	151.01±25.44*	2 163.0±350.5**	132.12±11.37*	4.72±1.26**
模型组	20 mL/kg	116.43±37.72	1 275.4±181.2	116.12±8.90	10.02±0.68
阳性组	7 g/kg	160.2±46.25**	1 727.9±145.6**	146.27±9.25**	6.21±1.42**
S组	10 g/kg	129.63±51.02	1 313.4±264.4	132.03±10.27*	8.96±3.02
Z组	10 g/kg	168.1±41.28***	1 824.5±263.0***	149.02±5.76***	6.04±1.76***

注:与模型组比较,\*表示 $P < 0.05$ ,\*\*表示 $P < 0.01$ ;与同剂量生品组比较,#表示 $P < 0.05$ ,##表示 $P < 0.01$ 。

表2 山茱萸炮制前后多糖对急性肝损伤模型小鼠的影响

Tab. 2 Effect of polysaccharide in crude and processed Fructus Corni on acute liver injure mice

组别	剂量	ALT/ (U/L)	AST/ (U/L)	SOD/ (U/mL)	MDA/ (nmol/mL)
空白组	20 mL/kg	23.96±11.42**	37.06±19.08**	336.71±30.42**	4.24±1.09**
模型组	20 mL/kg	111.84±5.06	128.35±13.22	296.06±5.53	10.22±1.46
阳性组	100 mg/kg	78.16±18.43**	84.15±19.82**	331.23±18.19**	6.22±1.35**
S组	10 g/kg	108.92±10.18	118.81±16.18	317.84±60.57	8.39±2.59
Z组	10 g/kg	72.90±14.13***	90.12±23.44***	334.8±16.54**	6.09±3.42*

注:与模型组比较,\*表示 $P < 0.05$ ,\*\*表示 $P < 0.01$ ;与同剂量生品组比较,#表示 $P < 0.05$ ,##表示 $P < 0.01$ 。

ALT 和 AST 的活性及 MDA 的含量高低在一定范围内可反映肝细胞损伤程度的大小。SOD 是体内重要的以氧自由基为底物的抗氧化酶,此酶对氧自由基的清除显示专一性,SOD 活性提高对保护肝脏损伤起到重要作用。

实验结果显示酒蒸山茱萸多糖保肝抑酶作用,其作用机理可能与提高抗氧化活性有关。

### 2.3 山茱萸多糖对免疫低下小鼠特异性体液免疫的影响

经统计学分析,酒蒸山茱萸多糖组的小鼠血清溶血素的水平与模型组相比具有显著性差异,山茱萸生品多糖无显著性差异,实验结果见表3。

表3 山茱萸炮制前后多糖对免疫低下小鼠特异性体液免疫的影响

Tab.3 Effect of polysaccharide in crude and processed Fructus Corni on low-immunity mice

组别	剂量	血清溶血素水平(OD值)
空白组	20 mL/kg	1.122 3±0.303 3**
模型组	20 mL/kg	0.013 0±0.008 3
阳性组	100 mg/kg	0.033 2±0.024 1*
S组	10 g/kg	0.020 7±0.010 5
Z组	10 g/kg	0.031 0±0.003 2***

注:与模型组比较,\*表示 $P<0.05$ ,\*\*表示 $P<0.01$ ;与同剂量生品组比较,#表示 $P<0.05$ ,##表示 $P<0.01$ 。

### 参考文献(References):

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005:20.
- [2] 李平,王艳辉,马润宇. 碱提山茱萸多糖的理化性质及抗氧化活性研究[J]. 中草药,2003,34(11):973-976.  
LI Ping,WANG Yan-hui,MA Run-yu. Study on physiochemical characteristic and antioxidation activity of polysaccharide extracted with sodium hydroxide from fruit of Cornus officinalis[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2003,34(11):973-976. (in Chinese)
- [3] 苗明三,方晓燕,杨云. 山茱萸多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 河南中医,2002,22(2):12-13.  
MIAO Mien-san,FANG Xiao-yan,YANG Yun. Cornel polysaccharide's effect on the immunologic function of small rats [J]. Henan Traditional Chinese Medicine,2002,22(2):12-13. (in Chinese)
- [4] 付晓伶,方肇勤. 阴虚证动物模型的造模方法及评析[J]. 上海中医药大学学报,2004,18(2):51-54.  
FU Xiao-ling, FANG Zhao-qin. Modeling methods and appraisal of yin-deficiency syndrome in animals [J]. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,2004,18(2):51-54. (in Chinese)
- [5] 赵艳玲,蔡光明,刘军,等. 正交试验法优选小鼠四氯化碳肝损伤模型[J]. 解放军药学学报,2001,17(4):215-217.  
ZHAO Yan-Ling, CAI Guang-ming, LIU Jun. Optimum method selection of  $CCl_4$  injured liver model in mice by orthogonal test [J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2001,17(4):215-217. (in Chinese)
- [6] 白新鹏,裴爱泳. 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[J]. 食品与生物技术学报,2006,25(6):115-118.  
BAI Xin-peng, QIU Ai-yong. The liver protective effect of the extracts from the actinidia deliciosa root [J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2006,25(6):115-118. (in Chinese)
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:752.
- [8] Yadav N P, Dixit V K. Hepatoprotective activity of leaves of Kalanchoe pinnata pers [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003,86:197.
- [9] 高荫榆,罗丽萍,洪雪娥,等. 甘薯叶柄藤多糖的免疫调节作用研究[J]. 食品科学,2006,27(6):200-202.  
GAO Yin-yu, LUO Li-ping, HONG Xue-e, et al. Study on immunoregulation effect of polysaccharides from sweet potato vines in mice [J]. Food Science, 2006,27(6):200-202. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)