

文章编号:1673-1689(2009)06-0768-05

仙草提取物对 CCl₄ 致小鼠肝损伤的保护作用

刘小玲¹, 李艳¹, 赵鹏², 覃辉艳²

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004; 2. 广西壮族自治区疾病预防控制中心卫生毒理与功能检验科, 广西南宁 530021)

摘要: 将 70 只雄性昆明小鼠随机分成 7 组: 正常对照组、模型对照组、阳性对照组、醇提组、水提低、中、高剂量组。醇提组按 500 mg/kg 灌胃仙草醇提物, 低、中、高剂量组分别按 200、500、1 000 mg/kg 灌胃仙草水提物, 阳性对照组按 200 mg/kg 灌胃联苯双酯, 正常对照组和模型对照组以等体积蒸馏水灌胃, 连续 30 d。以 CCl₄ 制成小鼠肝脏损伤模型, 检测并比较各组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性和血清白蛋白 (Alb)、甘油三酯 (TG) 含量, 肝组织匀浆中丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性。仙草水提物低、中、高剂量组与模型对照组相比均能显著降低 ALT ($P < 0.05$)、AST、TG 值 ($P < 0.01$), 显著增加 Alb 含量 ($P < 0.05$), 极显著降低小鼠肝组织匀浆 MDA 值 ($P < 0.01$), 极显著升高 GSH、GSH-PX 值 ($P < 0.01$), 对 SOD 酶活性 ($P > 0.05$) 无显著影响; 同时, 仙草水提物低、中、高剂量组与联苯双酯阳性对照组相比各指标无显著差异 ($P > 0.05$), 而仙草醇提物与模型对照组相比上述各生化指标无显著差异 ($P > 0.05$)。仙草水提物对 CCl₄ 所致的小鼠肝损伤具有一定保护作用。

关键词: 仙草; 提取物; 肝损伤; CCl₄; 保护作用

中图分类号: R 965

文献标识码: A

Protective Effects of Extracts of *Mesona blumes* on Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Mice

LIU Xiao-ling¹, LI Yan¹, ZHAO Peng², QIN Hui-yan²

(1. School of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Department of Health Toxicology and Functional Laboratory, Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530021, China)

Abstract: The objective of this study was to explore the protective effects of *Mesona blumes* extracts on carbon tetrachloride induced liver injury in mice. Seventy male mice were randomly divided into seven groups (model control group, positive control group, ethanol extracts group, low dosage, middle dosage and high dosage of water extracts groups). The mice in the above groups were fed for 30 days. ALT, AST, Alb, TG in serum and SOD, MDA, GSH, GSH-PX in liver tissue were measured and compared. It was found that water extracts of *Mesona blumes*

收稿日期: 2009-01-05

基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金项目 (0728009)。

作者简介: 刘小玲 (1972-), 女, 壮族, 广西凌云人, 教授, 主要从事天然药食资源开发、功能性食品及食品配料研究。Email: xiaolingliu@hotmail.com

significantly increased the values of AST ($P < 0.01$), ALT ($P < 0.05$), Alb ($P < 0.05$), TG ($P < 0.01$) in serum and MDA ($P < 0.01$), GSH, GSH-PX ($P < 0.01$) in liver tissue, respectively. However, no obvious difference was detected at the SOD activities ($P > 0.05$). Also, There is no remarkable difference between different dosage of water extracts groups and bifendate pills groups ($P > 0.05$). Ethanol extracts of *Mesona blumes* wasn't found to effectively decreased liver damage in terms of above mentioned biochemical parameters compare to model control group. Those results indicated that water extracts of *Mesona blumes* plays a significant protective role on liver injury which induced by carbon tetrachloride.

Key words: *Mesona blumes*; extract; liver injury; CCl₄; protective effect

仙草(*Mesona blumes*), 俗称凉粉草、仙人草, 为唇形科仙草属一年生草本植物, 分布于我国南方福建、江西、广东、广西、云南和台湾等地。其他国家如印度、印度尼西亚、马来西亚也有分布, 是一种重要的药食兼用资源^[1-3]。据《中药大辞典》记载: 仙草性味涩、甘、寒, 具清暑解渴、凉血之功效。仙草中含有多糖、色素、皂甙、黄酮、酚类、熊果酸、齐墩果酸及与它们极为相似的五环三萜酸化合物等生理活性物质^[4], 目前对仙草的生理活性及药理作用研究较少, 临床证实了仙草具有降血糖作用且有效部位为水溶性部分^[5], 从仙草中提取分离出来的多糖成分, 经药理实验证明, 具有增强小白鼠机体免疫机能的功效, 对小白鼠肠癌 S180 呈抑制作用, 抑制率可达 60% 左右^[6], 研究表明, 仙草多糖对大鼠肝匀浆具有抗脂质过氧化作用, 能在一定浓度范围内保护细胞免受氧自由基对 DNA 的氧化损伤^[7-8]。作者从护肝的角度, 观察了仙草水提取物及醇提取物对 CCl₄ 致小鼠肝损伤的保护效果, 为仙草的开发利用提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 仙草提取物的制备

仙草水提取物的制备: 取 350 g 干燥仙草全草, 粉碎, 加入蒸馏水浸泡 30 min 后用强火煮沸, 沸腾后保持微沸 30 min, 搅拌过滤, 滤渣重复处理两次, 合并滤液, 浓缩, 真空干燥粉碎, 得到仙草水提取物 78.35 g。

仙草醇提取物的制备: 取 400 g 干燥仙草全草, 粉碎, 用体积分数 95% 乙醇 80 °C 抽提 1 h, 过滤, 滤渣重复处理 3 次, 合并滤液, 浓缩, 挥干溶剂, 干燥得到仙草醇提取物 22.55 g。

1.2 实验动物及地点

实验动物: SPF 级昆明种雄性小鼠 70 只, 体重 (20 ± 2) g, 由广西医科大学医学实验动物中心提

供, 生产许可证为 SCXK 桂 2003-0003。

实验地点: 广西壮族自治区疾病预防控制中心卫生毒理与功能检验实验室, 实验动物房合格证号: 桂医动字第 23003 号, 动物房温度: 22~25 °C, 相对湿度 55%~70%。

1.3 仪器与试剂

仪器: 半自动生化分析仪: KY2000, 日本日立公司产品。

试剂: 联苯双酯滴丸: 浙江医药股份有限公司新昌制药厂; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒、白蛋白 (Alb) 试剂盒、甘油三酯 (TG) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 试剂盒: 南京建成生物工程研究所; 其他试剂为分析纯。

1.4 实验方法

1.4.1 模型的建立及给药 小鼠在 SPF 级动物实验室内喂饲基础饲料观察 3 d 后, 根据体重随机分为 7 组, 即: 空白对照组、模型对照组、联苯双酯阳性对照组 (200 mg/(kg·d))、醇提组 (500 mg/(kg·d))、水提物低、中、高剂量组 (200、500、1 000 mg/(kg·d)), 每组 10 只。开始实验后, 各剂量组小鼠灌胃给予受试溶液, 阳性对照组灌胃联苯双酯混悬液, 模型对照组和阴性对照组给予蒸馏水, 灌胃量为 20 mL/kg, 灌胃 1 次/d, 连续 30 d。每周称重一次, 按体重调整灌胃量。实验至第 30 天时, 将各组动物隔夜禁食 16 h, 模型组及各样品组一次灌胃给予体积分数 1% 的 CCl₄ 植物油, 灌胃量为 5 mL/kg, 建立肝损伤模型; 空白对照组给植物油, 间隔 4 h 后, 受试组继续给予受试样品。

给予 CCl₄ 24 h 后, 摘除眼球取血, 分离血清, 处死小鼠, 快速取出肝脏, 制成肝匀浆用于指标测定。

1.4.2 生化指标的检测 血清 ALT、AST、Alb、

TG,肝组织匀浆 SOD、MDA、GSH、GSH-PX,均严格按照试剂盒使用说明书操作,采用半自动生化分析仪检测。

1.5 统计学分析

用 SPSS11.5 软件进行方差分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 血清生化检验结果

CCl_4 所致化学性肝损伤的机理在于其在肝内主要被微粒体细胞色素 P-450 氧化酶代谢,生成两个活性自由基($\text{CCl}_3 \cdot$ 和 $\text{Cl} \cdot$)及一系列氧活性物并与蛋白质共价结合导致蛋白合成障碍、脂质分解代谢紊乱,引起肝细胞内甘油三酯(TG)蓄积。 $\text{CCl}_3 \cdot$ 能迅速与氧结合转化为过氧化三氯甲烷自由基($\text{CCl}_3\text{O}_2 \cdot$)导致脂质过氧化,从而引起细胞膜的变性伤害,致使酶渗漏以及各种类型的细胞病变,甚至坏死^[9-11]。丙氨酸氨基转移酶(ALT)为可溶性酶,主要分布在细胞浆内,而天门冬氨酸氨基转移酶(AST)主要分布在线粒体内,少部分分布在细胞浆内。当肝细胞破坏、细胞通透性增高及线粒体损伤时,ALT、AST 大量渗入血液,而使血中酶活性增高^[12],ALT、AST 活性的高低变化与肝细胞受损的程度相一致。因此,血清中的 ALT、AST 是

用于诊断肝实质损害的主要酶类。肝脏是合成转氨酶、白蛋白、球蛋白的主要场所,血清白蛋白代表肝的储备功能,能反映肝脏的病变程度^[13]。因此,小鼠血清中的 ALT、AST 活性的高低变化及 Alb、TG 含量的水平可用于预测小鼠的肝脏损伤性指标。

不同受试组的小鼠血清生化指标见表 1。从表 1 可见,空白对照组动物血清 ALT、AST、Alb 及 TG 均处于正常值范围,而四氯化碳肝损伤模型对照组动物的血清 ALT、AST 和 TG 明显增高,Alb 明显降低,与空白对照组比较均有极显著性差异($P < 0.01$),说明化学性肝损伤模型建立成功。

与模型对照组相比,仙草水提取物低剂量组能显著降低 CCl_4 所致急性肝损伤小鼠血清 ALT 的升高($P < 0.05$),水提取物中剂量组及高剂量组均能极显著降低 CCl_4 所致急性肝损伤小鼠血清 ALT 的升高($P < 0.01$),水提取物 3 个剂量组均能极显著的降低 AST、TG 值($P < 0.01$),能显著增加 Alb 含量($P < 0.05$);而仙草醇提组与模型对照组相比,数据差异无统计学意义($P > 0.05$)。水提取物的不同剂量组均与阳性对照联苯双酯组无显著差异($P > 0.05$)。水提取物的剂量越大,与模型对照组的差异越大,说明仙草水提取物灌胃剂量越大,其保肝效果越好。

表 1 仙草提取物对化学性肝损伤小鼠血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 1 Effect of the extracts of *Mesona blumes* on biochemical parameters in mice serum from CCl_4

组别	剂量/ (mg/(kg·d))	ALT/ (U/L)	AST/ (U/L)	Alb/ (g/L)	TG/ (mmol/L)
空白对照组	—	56.5±19.2★	163.7±33.2★	41.1±3.9★	2.02±0.13★
模型对照组	—	2653.4±427.1	1795.3±256.3	33.1±1.7	8.54±0.81
联苯双酯组	200	1451.6±273.6	1374.8±113.7	39.8±3.1	6.36±0.57
醇提组	500	2134.2±309.3	1540.5±141.2	35.9±2.8	7.46±0.82
水提低剂量组	200	1984.3±413.2■▲	1407.1±121.3★▲	36.2±2.3■▲	5.47±0.46★▲
水提中剂量组	500	1767.3±329.3★▲	1379.4±132.5★▲	37.1±3.2■▲	5.08±0.54★▲
水提高剂量组	1000	1656.2±244.2★▲	1272.0±159.6★▲	38.4±3.2■▲	5.78±0.61★▲

注:与模型组比较,★表示 $P < 0.01$;■表示 $P < 0.05$;与阳性对照联苯双酯组比较,▲表示 $P > 0.05$

2.2 肝匀浆指标检测结果

肝脏脂质过氧化的程度可通过测定脂质过氧化物等来评价,MDA 是氧自由基与细胞膜表面不饱和脂肪酸反应(脂质过氧化反应)的产物,可严重破坏细胞膜结构,导致细胞肿胀、坏死。它在血清及组织中的含量高,间接反映了机体细胞受自由基攻击时组织的过氧化损伤程度^[14]。GSH 可清除

H_2O_2 、超氧阴离子,是 GSH-PX 的底物,为 GSH-PX 分解氢过氧化物所必需,能激活多种酶,具有多种生理活性^[15]。很多能形成亲电子代谢产物的化学毒物如四氯化碳能直接或间接地攻击 GSH,使其耗竭^[16],GSH 含量的多少是衡量机体抗氧化能力的重要因素。SOD 是细胞内天然的氧自由基清除酶,又是超氧阴离子的底物诱导酶,它可使超氧阴

离子歧化为 H₂O₂。GSH-PX 是灭活氧自由基的一种酶,可将 H₂O₂ 转化为无任何毒性的水,还能阻断体内脂质过氧化物的进程,使脂质过氧化物还原成无害的羟基化合物。因此,测定肝匀浆中 MDA、GSH、GSH-PX 含量的水平可反映肝脏损伤情况。

不同受试组的小鼠肝匀浆生化指标见表 2。从表 2 可知,与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织匀浆 SOD、GSH、GSH-PX 含量显著降低,MDA 含量增加,说明模型建立成功,CCl₄ 已致肝损伤。

仙草水提物低、中、高剂量组可使肝损伤小鼠肝组织匀浆 MDA 降低,使 GSH、GSH-PX 含量升高,MDA、GSH、GSH-PX 含量均与模型组比较差

异有统计学意义 ($P < 0.01$); 仙草醇提组 MDA、GSH、GSH-PX 值与模型组相比,数据差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明仙草水提物可对小鼠 CCl₄ 致肝损伤有保护作用,而仙草醇提物对小鼠 CCl₄ 致肝损伤没有保护作用。仙草水提物的灌胃剂量越高,对肝损伤小鼠的肝组织匀浆 MDA 值降低程度越显著 ($P < 0.01$)。而仙草水提物的 SOD 含量与模型组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。与阳性对照组相比,水提物组的各项指标均无显著差异 ($P > 0.05$),表明仙草的水提物可起到与药物联苯双酯的相似保肝效果。

表 2 仙草提取物对化学性肝损伤小鼠肝组织化学检验结果的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 2 Effect of the extracts of Mesona Blumes on chemical tests in mice liver tissue from CCl₄

组别	剂量/ (mg/(kg·d))	MDA/ (nmol/g)	SOD/ (U/g)	GSH/ (μ mol/g)	GSH-PX/ (U/g)
空白对照组	—	33.3±3.9*	430.6±17.4*	26.4±2.8*	109.5±12.5*
模型对照组	—	71.3±8.3	365.2±27.2	4.1±1.8	59.6±6.1
联苯双酯组	200	44.2±5.5	375.0±19.7	11.8±2.1	90.95±8.6
醇提组	500	58.8±7.6	359.3±22.1 [▲]	6.4±2.3	70.67±7.9
水提低剂量组	200	46.4±3.9* [▲]	367.3±28.8 [▲]	8.8±1.2*	8.1±11.7* [▲]
水提中剂量组	500	43.6±4.4* [▲]	377.3±22.0 [▲]	9.3±1.0* [▲]	90.1±11.4 [▲]
水提高剂量组	1000	37.8±5.6* [▲]	372.9±29.3 [▲]	11.9±1.8* [▲]	78.8±7.3 [▲]

注:与模型组比较,★表示 $P < 0.01$; ■表示 $P < 0.05$; 与阳性对照联苯双酯组比较,▲表示 $P > 0.05$

3 讨论

研究表明,仙草水提物低、中、高剂量组均能显著的降低模型小鼠血清中的 ALT、AST、TG 值,提高血清 Alb 含量,说明仙草水提物可减轻小鼠由 CCl₄ 所致肝损伤。仙草水提物低、中、高剂量组均能显著降低小鼠肝组织匀浆 MDA 值,显著升高 GSH、GSH-PX 值,但对 SOD 酶活性的影响无明显差异,说明 CCl₄ 导致的小鼠肝损伤的保护作用可能是提高 GSH-PX 等其他酶活,增加 GSH 含量等

途径,以清除自由基,抑制肝脏细胞脂质过氧化反应,稳定细胞膜而达到的,而可能不是通过提高 SOD 酶活性达到。与药物对照组相比,仙草水提物不同剂量组对受损小鼠的血清及肝匀浆各指标的影响与药物组没有显著差异,说明仙草水提物具有与化学药物相类似的护肝效果。而仙草醇提物则没有显著的护肝作用。

由此可见,仙草具有一定的保肝作用,可以有效地保护由 CCl₄ 导致的小鼠肝损伤。仙草中的主要保肝物质为水溶性物质,而非醇溶性物质。

参考文献(References):

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海科学技术出版社,1997.
- [2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 人民出版社,1986.
- [3] 刘晓晓,方园平. 凉粉草资源的开发利用[J]. 中国野生植物资源,1998,17(1):27-30.
LIU Xiao-geng, FANG Yuan-ping. The exploitation of mesona chinensis benth[J]. Chinese Wild Plant Resources,1998,17(1):27-30. (in Chinese)
- [4] 谟国莲,孙远明,黄晓钰,等. 中国凉粉草资源的研究与利用[J]. 农牧产品开发,2000,(5):6-8.
CHEN Guo-lian, SUN Yuan-ming, HUAN Xiao-yu, et al. The research and exploitation of Chinese mesona blumes gum

- resources[J]. *Agriculture Products Development*, 2000, (5): 6-8. (in Chinese)
- [5] 黄钦, 许赖灿. 凉粉草降糖制剂的研制与临床应用[J]. 海峡药学, 1995, (1): 778-79.
HUANG Qin, XU Lai-can. Manufacture and clinical application of Chinese mesona blumes antidiabetic preparation [J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 1995, (1): 778-79. (in Chinese)
- [6] 潘三元. 治癌中药处方 700 种[M]. 台北: 台湾八德教育出版社, 1986.
- [7] 杨敏. 仙草提取物的体外抗氧化实验研究[J]. 中华预防医学杂志, 2006, 3(40): 203-204.
YANG Min. Antioxidant property of extracts of hsian-tsoo (mesona procumbens hemsl) evaluated in vitro [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2006, 3(40): 203-204. (in Chinese)
- [8] 杨敏. 仙草提取物对小鼠脾淋巴细胞 DNA 氧化损伤保护作用的研究[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2006, 1(35): 34-38.
YANG Min. Protection of hsian-tsoo (Mesona procumbens Hemsl) on H₂O₂-induced DNA damage of primarily cultured mice spleen lymphocytes [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences*, 2006 1(35): 34-38. (in Chinese)
- [9] 卫监发[1996]38, 保健食品功能学评价程序和检验方法[S].
- [10] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998, 1397.
- [11] Kalt F G, Past G B, Snyder R. Sewent toxicology recent advances in the toxicology of benzene, the glycolethers, and carbon tetrachloride [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1987, 27: 379.
- [12] 白新鹏, 裘爱泳. 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)
- [13] 舒思洁, 闵清, 吴基良. 脂糖舒对肝损伤大鼠血清生化指标的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2002 12(2): 87-88.
SHU Si-jie, MIN Qing, WU Ji-liang. Effect of Zhitangshu On Serum Biochemical Indexes in Rat [J]. *Zhejiang Journal of Integrated Traditional Chinese And Western Medicine*, 2002, 12(2): 87-88. (in Chinese)
- [14] ZHANG Z, YU C X. Effect of melatonin leaing and memory impairment induced by aluminum chloride and its mechanism [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2002, 37: 682.
- [15] 石小枫, 刘纪, 郭树华. 还原型谷胱甘肽对大鼠慢性肝损伤的保护作用[J]. 重庆医科大学学报, 2003, 28(5): 592-595.
SHI Xion-feng, LIU Qi, GUO Shu-hua. Protective effect of reduced glutathione on chronic liver injury of rats [J]. *Journal of ChongQing Medical University*, 2003, 28(5): 592-595. (in Chinese)
- [16] 童英, 同向东, 高珊, 等. 四氯化碳急性肝损伤敏感指标的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(6): 10-11.
TONG Ying, YAN Xiang-dong, GAO Shan, et al. Study on sensitivity index on acute liver injury induced by carbon tetra-chloride [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2000, 12(6): 10-11. (in Chinese)

(责任编辑: 朱明)