

波棱瓜子脂肪油抗免疫性肝损伤的谱效关系研究

陈璐, 张梅*, 雷有成, 李春沁, 何春杨

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**探讨波棱瓜子脂肪油(HO)抗卡介苗(BCG)+脂多糖(LPS)诱导免疫性肝损伤的药理作用与其化学成分之间的关系,揭示其抗肝损伤的有效物质基础。**方法:**采用GC-MS建立9批HO的GC指纹图谱,并对各个峰进行标定,获得HO化学成分数据;采用BCG+LPS诱导造成免疫性肝损伤小鼠模型,分为空白组、模型组及9个给药组,给药组ig给予HO($7\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)连续12 d,测定小鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性,获得HO药理活性数据,将两者进行逐步多元回归分析,揭示HO抗肝损伤的有效物质基础。**结果:**建立了波棱瓜子脂肪油气相指纹图谱,并标定7个色谱峰;抗免疫性肝损伤药效实验中9个给药组均有不同程度的抗肝损伤作用,逐步回归分析表明HO抗免疫性肝损伤药理活性与其亚油酸、油酸、亚麻酸的含量成正相关。**结论:**HO对BCG+LPS诱导小鼠免疫性肝损伤的保护作用,可能与其含有不饱和脂肪酸有关,增强小鼠抗氧化活性。

[关键词] 波棱瓜子脂肪油; 免疫性肝损伤; 谱效关系

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0123-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110123

Profile-effect between Fingerprint and Liver Protection of *Herpetospermum caudigerum* Seed Oil

CHEN Lu, ZHANG Mei*, LEI You-cheng, LI Chun-qin, HE Chun-yang

(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines of Ministry of Education, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To perform the correlation between fingerprint and liver protection of *Herpetospermum caudigerum* seed oil (HO) illuminate the therapeutic basis of liver protection. **Method:** GC Fingerprint of HO was developed, and the protective effects of HO on immunologic liver injury model was observed, the contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and superoxide dismutase (SOD) in the blood serum were measured. The correlation analysis between the GC fingerprint of HO and the contents of ALT, AST and SOD were carried out with stepwise regression. **Result:** The linoleic acid, oleic acid and linolenic acid were important for liver protection. **Conclusion:** The protective effects of HO on immunologic liver injury model might be related to its unsaturated fatty acids.

[Key words] *Herpetospermum caudigerum* oil; immunologic liver injury; profile-effect

[收稿日期] 20131114(011)

[基金项目] 四川省科技支撑项目(2013SZ0114)

[第一作者] 陈璐, 硕士研究生, Tel: 15882232328, E-mail: chenlu9724@126.com

[通讯作者] *张梅, 教授, 博士生导师, Tel: 028-61800231, E-mail: zhangmei63@126.com

波棱瓜子具有清腑热,胆热的功效,治疗赤巴入脏腑,肝、胆热症(肝炎,胆囊炎),消化不良等症。化学成分研究表明波棱瓜子主要含有脂肪酸类、木脂素类及苯呋喃类成分^[1-2];现代药理研究表明波棱瓜子具有抗化学性肝损伤、抗氧化、抗疲劳及抑制乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和e抗原(HBeAg)、乙型肝炎病毒的脱氧核糖核酸(HBV-

DNA)、抗鸭乙肝病毒等作用^[3-7]。波棱瓜子传统入药方式多为丸、散剂,如九味獐牙菜丸、十三味榜嘎散等,这表明波棱瓜子入药时其中的脂肪油类成分会较好的保存下来。课题组前期研究也表明了,波棱瓜子脂肪油(HO)对卡介苗(BCG)+脂多糖(LPS)诱导小鼠免疫性肝损伤有明显的保护作用,本研究进一步探讨HO抗免疫性肝损伤的药理作用与其化学成分之间的关系,采用逐步多元回归方法对波棱瓜子脂肪油GC图谱及抗肝损伤药效进行分析研究,揭示其抗肝损伤的有效物质基础。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,SPF级,雄性,110只,体重18~22g,购于成都达硕实验动物有限公司,动物许可证号SCXK(川)2008-24。

1.2 药材与试剂 波棱瓜子药材,共9批,样品编号S1-S9;经成都中医药大学药学院裴瑾教授鉴定为葫芦科植物波棱瓜 *Herpetospermum caudigerum* Wall. 的干燥成熟种子。卡介苗(BCG,北京天坛生物制品研究所),脂多糖(LPS,美国Sigma),丙氨酸氨基转移酶(ALT)天冬氨酸氨基转移酶(AST),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。石油醚(60~90℃)、无水硫酸钠、正己烷,均为分析纯。

1.3 仪器 安捷伦HP6890/5973气相色谱质谱联用仪,UV1100紫外分光光度计,TGL-16G台式离心机。

2 方法

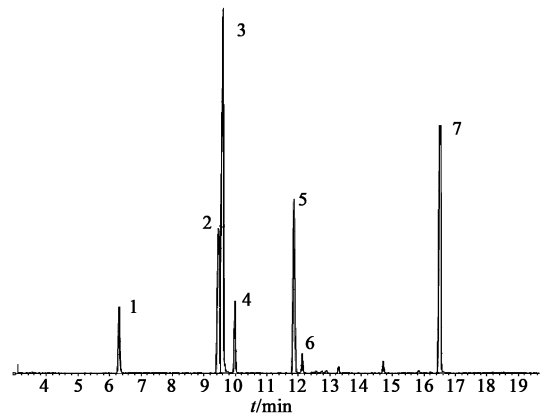
2.1 波棱瓜子脂肪油(HO)GC分析

2.1.1 HO供试样品的制备 取波棱瓜子,粉碎,加5倍量石油醚水浴加热回流6h,石油醚提取液离心取上层液体,回收石油醚得HO^[2]。取400μLHO,加2mL0.5mol·L⁻¹KOH甲醇溶液,置70℃水浴加热30min,加入2mL水后加稀HCl至溶液呈中性,加入5mL正己烷萃取,取正己烷溶液加入无水硫酸钠脱水后,过0.45μm微孔滤膜,得供试样品^[8]。

2.1.2 GC色谱条件 石英毛细管HP-5MS柱(0.25μm×0.25mm×25m);FID检测器;温度260℃,程序升温条件:190℃初温,保持6min,升温速率6℃·min⁻¹,终止温度260℃,保持2min;载气高纯氮气;柱流量(恒流)1.0mL·min⁻¹;进样模式脉冲不分流,Ei源70eV,离子源温度230℃,四级杆温度150℃,进样1μL。该色谱条件下,分离显示良好。

2.1.3 方法学考察 对上述方法进行稳定性、精密度、重现性考察,取同一供试品连续进样5次,测得各色谱峰相对保留时间的RSD0.51%~0.75%,相对峰面积的RSD0.75%~1.62%。表明该方法精密度良好。取同一样品5份,按照2.1.1项下方法制备供试品溶液,分别进样,测得各色谱峰相对保留时间的RSD0.78%~1.81%,相对峰面积的RSD0.93%~2.10%。表明该方法重现性良好。取同一供试品溶液,每隔1h进样,测得6h内,各色谱峰相对保留时间的RSD0.62%~1.21%,相对峰面积的RSD1.32%~2.54%,表明溶液基本稳定。6h后,随时间推移,部分峰峰面积降低,故应在6h之内测定。

2.1.4 GC分析 根据2.1.1方法制备9批HO供试样品,在2.1.2色谱条件下进行分析。即得9批HO的GC指纹图谱,共有图谱见图1,共标定7个色谱峰,分别为:棕榈酸、亚油酸、油酸、硬脂酸、亚麻酸、3-十二烯-1-炔、邻苯二甲酸。9批HO各成分峰面积,见表1。



1. 棕榈酸;2. 亚油酸;3. 油酸;4. 硬脂酸;
5. 3-十二烯-1-炔;6. 亚麻酸;7. 邻苯二甲酸

图1 波棱瓜子脂肪油GC色谱

2.2 波棱瓜子脂肪油抗免疫性肝损伤

2.2.1 波棱瓜子脂肪油的提取 2.1.4项下制得的9批波棱瓜子脂肪油,备用。

2.2.2 小鼠免疫性肝损伤造模及给药方案 将110只昆明种小鼠随机均分为空白组、模型组、及9批HO给药组。造模第1天,除正常组外,其余小鼠每只尾静脉注射2.5mgBCG,2.5mgBCG。造模第2天起,HO给药组每天分别按体重ig7mL·kg⁻¹HO;正常组与模型组ig20mL·kg⁻¹的生理盐水,连续给药12d,末次给药1h后,除正常组外,其余每只小鼠尾静脉注射7.5μgLPS。禁食10h后,摘眼

表 1 9 批波棱瓜子脂肪油各成分峰面积

峰号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
化合物	棕榈酸	亚油酸	油酸	硬脂酸	3-十二烯-1-炔	亚麻酸	邻苯二甲酸
保留时间/min	6.137	9.478	9.8	10.127	11.87	12.958	16.533
S1	633 962	1 744 525	2 132 203	458 896	1 085 861	49 284	0
S2	402 635	1 040 517	1 560 776	406 126	662 437	43 542	0
S3	504 787	1 506 964	1 769 045	418 917	781 357	116 172	0
S4	534 949	1 158 946	2 060 349	433 417	863 260	182 017	0
S5	478 143	1 208 372	1 812 553	431 922	1 020 423	67 649	0
S6	441 531	1 186 423	1 855 662	493 041	904 360	34 520	0
S7	505 719	1 670 652	1 738 807	579 316	928 984	47 289	0
S8	370 121	782 909	1 932 405	367 954	213 839	0	4 541 112
S9	433 886	926 559	2 006 469	570 522	1 020 637	57 348	0

球取血,分离血清,检测 ALT,AST,SOD 各项指标。ALT,AST,SOD 指标的测定均按试剂盒说明书进行。

2.3 统计处理 所得数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行方差齐性分析, $P < 0.05$ 有显著性差异。

3 结果

3.1 9 批 HO 对血清中 ALT,AST,SOD 的影响 模型组小鼠血清中 ALT,AST 活性较正常组明显升高 ($P < 0.01$),SOD 活性较正常组明显降低 ($P < 0.01$),说明造模成功。9 批 HO 给药组血清中 ALT,AST 活性较模型组明显降低 ($P < 0.01$),SOD 活性较模型组明显升高 ($P < 0.01$)。说明 9 批 HO 均具有抗免疫性肝损伤的作用。见表 2。

表 2 9 批 HO 对免疫性肝损伤小鼠血清中转氨酶及 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mL·kg ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹
正常	-	8.76 ± 1.82 ¹⁾	22.48 ± 4.34 ¹⁾	113.23 ± 23.43 ¹⁾
模型	-	87.71 ± 14.62	90.39 ± 12.81	69.23 ± 28.33
S1 HO	7	31.32 ± 9.30 ¹⁾	40.72 ± 8.37 ¹⁾	150.68 ± 26.23 ¹⁾
S2 HO	7	37.43 ± 8.23 ¹⁾	42.74 ± 9.35 ¹⁾	139.54 ± 40.34 ¹⁾
S3 HO	7	32.24 ± 10.21 ¹⁾	41.32 ± 7.14 ¹⁾	154.43 ± 34.52 ¹⁾
S4 HO	7	30.01 ± 8.25 ¹⁾	39.35 ± 8.73 ¹⁾	158.23 ± 37.48 ¹⁾
S5 HO	7	34.34 ± 7.42 ¹⁾	38.45 ± 9.44 ¹⁾	153.36 ± 30.22 ¹⁾
S6 HO	7	36.54 ± 9.38 ¹⁾	40.43 ± 11.42 ¹⁾	142.36 ± 29.57 ¹⁾
S7 HO	7	32.03 ± 10.11 ¹⁾	39.81 ± 10.29 ¹⁾	144.32 ± 27.35 ¹⁾
S8 HO	7	34.53 ± 11.53 ¹⁾	41.13 ± 9.34 ¹⁾	142.63 ± 30.74 ¹⁾
S9 HO	7	37.53 ± 11.46 ¹⁾	41.73 ± 9.45 ¹⁾	152.22 ± 25.91 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 HO 抗肝损伤活性与指纹图谱相关性 将 9 批 HO GC 指纹图谱数据(表 1)与 3 组抗免疫性肝

损伤的药理指标活性数据(表 2),进行逐步多元回归分析。其中,与 ALT 活性数据建立的回归方程中有两个变量(X_2, X_6)被保留, X_2, X_6 与 ALT 活性均为负相关,即与抗肝损伤药理活性呈正相关,回归方程为 $Y = 44.94 - 6.48 \times 10^{-6} X_2 - 3.20 \times 10^{-5} X_6$ (Y : ALT 活性, X : 色谱峰), X_2 为亚油酸, X_6 为亚麻酸;与 AST 活性数据建立的回归方程中无变量被保留;与 SOD 活性数据建立的回归方程中有两个变量(X_3, X_6)被保留, X_3, X_6 与 SOD 活性均为正相关,即与抗肝损伤药理活性呈正相关,回归方程为 $Y = 116.32 + 8.81 \times 10^{-5} X_6 + 1.41 \times 10^{-5} X_3$ (Y : SOD 活性, X : 色谱峰), X_6 为亚麻酸, X_3 为油酸。

HO 降低小鼠血清 ALT 活性作用与亚油酸、亚麻酸呈正相关,升高 SOD 活性作用与亚麻酸、油酸呈成正相关,由此可见,HO 抗免疫性肝损伤的作用可能与其含有的不饱和脂肪酸有关,不饱和脂肪酸的含量越高,其抗肝损伤药理活性越强。

4 讨论

4.1 相关性分析方法的选择 本实验中 9 批 HO 化学成分种类差异不大,且 GC 指纹图谱聚类分析的结果与药效活性数据无关联,故考虑选用多元线性回归,逐步回归分析是一种优化的多元线性回归分析,可以对自变量进行筛选,找出“最优”方程,其要求自变量小于样品数量,即色谱峰的数量应小于样品数。本实验 HO GC 指纹图谱色谱峰较少,小于样品数量,可以采用逐步回归分析。

4.2 药理指标的选择 血清中 ALT、AST 的活性是反映肝细胞损害程度的重要检测指标。SOD 活性的高低反映了机体清除氧自由基的能力,自由基过多时,可导致体内脂质过氧化反应的发生,脂质过氧化

八角莽草酸的抗动脉粥样硬化作用机制研究

黄晓婷¹, 杨冬业¹, 郑楚^{1*}, 范志敏¹, 刘漫君¹, 韦桂宁²

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541001; 2. 广西中医药研究院, 南宁 530022)

[摘要] 目的: 探讨八角莽草酸对动脉粥样硬化(AS)大鼠抗氧化系统、炎症因子的水平及ⅡA分泌型血小板型磷脂酶A₂(sPLA2-ⅡA)mRNA表达的影响,以了解莽草酸对动脉粥样硬化的作用机制。方法:健康SPF级雄性Wistar大鼠72只,随机分正常对照组、动脉粥样硬化模型组、阳性(辛伐他汀,5 mg·kg⁻¹)对照组、莽草酸低、中、高剂量组(15, 30, 60 mg·kg⁻¹),高脂饲料加腹腔注射维生素D₃法复制动脉粥样硬化模型,灌胃给以莽草酸,24周后,观察莽草酸对模型大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)、C反应蛋白(CRP)和血清肿瘤坏死因子α(TNF-α)的水平,主动脉弓sPLA2-ⅡA mRNA表达的影响。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清TNF-α, CRP, MDA水平显著增高, SOD的活性显著降低, sPLA2-ⅡA mRNA的表达显著增强。与模型组比较,莽草酸60 mg·kg⁻¹剂量组可显著降低AS大鼠血清TNF-α, CRP水平,分别由模型组的(49.88 ± 22.91) ng·L⁻¹, (10.82 ± 4.33) mg·L⁻¹下降到(28.18 ± 15.95) ng·L⁻¹, (8.17 ± 1.74) mg·L⁻¹ (P < 0.05)。莽草酸60 mg·kg⁻¹剂量组可显著降低AS大鼠血清MDA水平,由模型组的(21.55 ± 4.45) μmol·L⁻¹下降到(18.70 ± 1.95) μmol·L⁻¹ (P < 0.05),可提高SOD的活性,由模型组的(145.81 ± 50.61) U·mL⁻¹提高到(199.87 ± 50.29) U·mL⁻¹ (P < 0.05);莽草酸60, 30, 15 mg·kg⁻¹剂量组显著下调AS大鼠主动脉弓sPLA2-ⅡA mRNA的表达(P < 0.01)。结论:莽草酸可改善AS大鼠炎症状态,且有抗氧化及抑制sPLA2-ⅡA mRNA表达的作用。

[关键词] 八角莽草酸; 动脉粥样硬化; 抗氧化; 炎症因子; ⅡA分泌型血小板型磷脂酶A₂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0126-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110126

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140324.1600.016.html>

[网络出版时间] 2014-03-24 16:00

[收稿日期] 20131204(001)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2010GXNSFA013255)

[第一作者] 黄晓婷, 硕士, 从事心血管方面的研究, E-mail:Zhengchu999@163.com

[通讯作者] * 郑楚, 主任医师, 教授, 从事心血管方面的研究, Tel:13768439393, E-mail:Zhengchu999@163.com

物积累导致肝损伤,此外,课题组前期研究HO对免疫性肝损伤小鼠的影响表明HO有较强的升高SOD活性作用。

[参考文献]

- [1] 刘军,陈兴,张伊,等. 藏药波棱瓜子乙酸乙酯部位化学成分研究[J]. 中药与临床, 2010, 1(3):15.
- [2] 方清茂,张浩,曹毓. 藏药波棱瓜子提取物对肝损伤大鼠的抗氧化作用[J]. 华西药学杂志, 2008, 23(2):147.
- [3] 曹琳,吴勤,袁海龙,等. 肝能滴丸对免疫异常小鼠的保护作用[J]. 解放军药学报, 2005, 21(3):227.
- [4] Yuan Hai-Long, Yang Ming, LI Xian-Yi, et al. Hepatitis B virus inhibiting constituents from *Herpetospermum*

caudigerum[J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54(11):1592.

- [5] 韩玉梅,李正明,袁海龙,等. 肝能滴丸在鸭体内对鸭乙型肝炎病毒感染的治疗效果[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4):43
- [6] 谭睿,石雪蓉. 藏药色吉美多提取物对小鼠单核-巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 世界科学技术——中医药现代化:民族医药学, 2005, 7(S1):68
- [7] 靳世英,吕俊兰,袁海龙,等. 波棱瓜子提取物对小鼠抗疲劳耐缺氧作用[J]. 解放军药学报, 2011, 27(5):417.
- [8] 杨凤梅,张思源. 藏药波棱瓜子中亚油酸和亚麻酸的含量测定方法研究[J]. 青海医学院学报, 2010, 31(1):49.

[责任编辑 聂淑琴]