

淡竹叶总黄酮对拘束负荷所致小鼠肝损伤的保护作用

林冠宇, 姚楠, 何蓉蓉*, 栗原博*

(暨南大学 中药及天然药物研究所, 广州 510632)

[摘要] 目的: 通过小鼠拘束应激模型, 研究淡竹叶总黄酮对拘束应激负荷小鼠肝损伤的保护作用。方法: 利用 Hp20 大孔吸附树脂对淡竹叶提取物经不同浓度乙醇洗脱后得到淡竹叶总黄酮。观测淡竹叶总黄酮 125, 250, 500 mg · kg⁻¹ 连续 ig 5 d, 对拘束应激 18 h 后致急性肝损伤模型小鼠血浆中丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 活性、抗氧化能力指数 (ORAC)、肝组织中 ORAC、丙二醛 (MDA) 和一氧化氮 (NO) 含量的影响。结果: 与模型组相比, 淡竹叶总黄酮可以明显降低小鼠血浆 ALT 活性、肝组织的 MDA 含量和 NO 含量, 显著提高血浆和肝组织的抗氧化能力指数。结论: 淡竹叶总黄酮对拘束负荷引起小鼠急性肝损伤有一定的保护作用。

[关键词] 淡竹叶总黄酮; 抗氧化; 拘束负荷; 肝损伤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0177-03

Protective Effects of *Herbal Lophatheri* Flavonoids on Restraint Stress-induced Liver Damage in Mice

LIN Guan-yu, YAO Nan, HE Rong-rong, KURIHARA Hiroshi

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

[Abstract] Objective: To investigate the protective effect and the mechanism of *Herbal Lophatheri* flavonoids (HLF) on mice loaded with restraint stress. **Method:** The filtrate of extraction of *Herbal Lophatheri* was adsorbed by Hp20 macroporous exchange resin, eluted by ethanol. After oral administration of HLF 125, 250 and 500 mg · kg⁻¹ for five days. The mice were restrained for 18 h after 30 min of the last intragastric administration to induce liver injury. The protective effects were evaluated by assessing alanine aminotransferase (ALT) levels in plasma. The contents of NO and malondialdehyde (MDA) in liver were performed respectively. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay was used to measure the antioxidant capacity. **Results:** Compared with the stress model, HLF could decrease activities of ALT in the plasma and the levels of MDA and the contents of NO in liver. And it could significantly increase ORAC activity in the plasma and liver. **Conclusion:** *Herbal Lophatheri* flavonoids exert protective effect on liver injury in mice loaded with restraint stress.

[Key words] *Herbal Lophatheri* flavonoids; antioxidant capacity; restraint stress; liver injury

中药淡竹叶为禾本科 (Gramineae) 植物淡竹叶 (*Herba Lophatheri*) 的干燥茎叶。具有清热除烦, 利尿的功效, 多用于热病烦渴, 口舌生疮, 小便赤涩淋痛等症。本实验以淡竹叶总黄酮为对象, 通过拘束

应激负荷诱发小鼠氧化应激损伤状态, 测定血浆中丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和抗氧化能力指数 (ORAC), 肝脏中 ORAC、丙二醛 (MDA) 和一氧化氮 (NO) 等指标来评价淡竹叶总黄酮对机体应激损伤的保护作用以及可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级昆明种小鼠, 雄性, 体重 18 ~ 22 g [购自广东省医学实验动物中心, 许可证号 SCXK (粤) 2003-0002]。

[收稿日期] 2010-03-17

[通讯作者] * 何蓉蓉, E-mail: rongronghe66@163.com, Tel: (020) 85227791

* 栗原博, E-mail: Hiroshi_Kurihara@163.com, Tel: (020) 85221352

1.2 药品及试剂 淡竹叶由东莞杏林春凉茶公司提供; 维生素 E 的水溶性衍生物 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl-chroman-2- carboxylic acid (Trolox); 氧自由基诱发剂 2, 2 -azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)、荧光素钠 (disodium fluorescein) 均购自 Wako Pure Chemical Industries (Ltd Osaka, Japan)。ALT, MDA 和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; Hp20 大孔吸附树脂、高氯酸 (PCA)、偏磷酸、盐酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾均为天津市大茂化学试剂厂, 分析纯; N-1-奈乙二胺 (盐酸盐) 为天津市福晨化学试剂厂。

1.3 仪器与设备 电子天平 (德国 Sartorius 公司); 电热恒温水浴锅 HH-4 (上海博泰实验设备有限公司); pH S-25 型酸度计 (上海伟业仪器厂); 流水式高速中药粉碎机 (温岭市大德中药机械有限公司); EYELA 旋转蒸发器 (东京理化器械 (株) 独资工厂); 3-18K 型台式高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); IKA ULTRA-TURRAX T8 型组织匀浆机 (德国 GMBH 公司); MK3 型酶标仪 (芬兰雷博); GENios 多功能酶标仪 (奥地利 TECAN 公司) 及 Magellan 工作站; V-550 型紫外分光光度计 (日本分光株式会社)。

2 方法

2.1 淡竹叶总黄酮含量测定^[1] 取淡竹叶 600 g, 以 10 倍量 75% 乙醇浸泡 12 h, 回流 4 h, 减压回收溶剂得提取物为 21.5 g, 回收率为 3.6%。淡竹叶提取物溶于水, 用等量的石油醚萃取、去色素后, 经 Hp20 大孔树脂乙醇-水梯度洗脱 (水 30%, 50%, 70%, 95% 乙醇) 分离, 根据黄酮定性检测结果将 30%, 50%, 70% 乙醇洗脱物合并得淡竹叶黄酮。精密称取芦丁对照品 5 mg 置于 5 mL 量瓶中配得 1 mg · mL⁻¹ 的芦丁对照品储备溶液。于 510 nm 处测定芦丁系列浓度对照溶液的吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线, 并得到回归方程: $Y = 3.8854X - 0.009$, $R = 0.9959$ 。紫外分光光度法测定淡竹叶总黄酮含量, 利用回归方程求出淡竹叶总黄酮含量为 13%。

2.2 动物分组与模型建立 动物随机分为正常对照组、应激模型组、淡竹叶总黄酮低、中、高剂量组 (125, 250, 500 mg · kg⁻¹) 每组 8 只。拘束负荷前连续 4 d ig 淡竹叶总黄酮, 正常对照组和应激模型组给予同体积蒸馏水, 1 次 /d, 第 5 天应激模型组和淡竹叶总黄酮各剂量组 ig 30 min 后进行拘束应激实验^[2]。

2.3 血浆 ALT 活性的测定 拘束结束后, 乙醚麻醉, 取心脏血并置于肝素处理过的离心管中以 5 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 分离血浆测定, 测定 ALT。

2.4 血浆、肝组织和淡竹叶总黄酮 ORAC 活性的测定 ORAC 测定参照 Prior 等人方法^[3] 并加以改进, 分别测定淡竹叶总黄酮、小鼠血浆和肝组织匀浆上清液的 ORAC 水平。Disodium fluorescein, AAPH 和 Trolox 用配好的磷酸盐缓冲液溶解, 并使反应体系中 disodium fluorescein 和 AAPH 的终浓度分别为 63 nmol · L⁻¹ 和 12.8 mmol · L⁻¹。在 96 孔板中加入 20 μL pH 7.4 的 75 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液后, 添加样品 20 μL, 并依次加入 AAPH 140 μL 和缓冲液 20 μL, 最后添加 fluorescein 20 μL 后迅速将 96 孔板置于设置温度 37 的荧光酶标仪中, 每 2 min 测定 1 个点, 共测定 2 h。样品的 ORAC 值以 1 μmol · L⁻¹ 的 Trolox 在荧光衰减曲线上对应的曲线下积分面积作为标准对照计算。

2.5 肝组织 MDA 水平测定 按试剂盒说明测定。用考马斯亮蓝蛋白试剂盒测定其蛋白含量。

2.6 肝组织 NO 水平测定 采用 Griess 化学法^[4] 测定 取 10% 肝组织的生理盐水匀浆液 40 μL 加至 160 μL Griess 试剂中, 混匀, 静置 20 min 后, 在 550 nm 处测定其紫外吸光值, 根据 NO 标准 ($y = 0.033x + 0.0416$, $R = 0.9998$) 曲线计算肝组织中的 NO 的水平。

2.7 统计学方法 数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 13.0 统计软件分析, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 淡竹叶总黄酮对拘束负荷小鼠血浆 ALT 水平的影响 与正常对照组相比, 模型组小鼠血浆 ALT 水平显著提高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 淡竹叶总黄酮各组小鼠血浆 ALT 水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈一定量效关系 (见表 1)。

表 1 淡竹叶总黄酮对拘束应激负荷小鼠血浆 ORAC 和 ALT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n = 8$)

组别	剂量 / mg · kg ⁻¹	ALT / IU · L ⁻¹	ORAC / U · L ⁻¹
正常对照	—	18.92 ± 2.77 ²⁾	721.23 ± 40.22 ²⁾
模型	—	57.19 ± 4.87	454.46 ± 31.66
淡竹叶总黄酮	125	41.41 ± 3.91 ¹⁾	515.18 ± 29.83
	250	33.78 ± 2.96 ²⁾	571.93 ± 36.37 ¹⁾
	500	26.35 ± 3.11 ²⁾	623.29 ± 41.56 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 淡竹叶总黄酮体外对 ORAC 水平的影响 如图 1 所示, 淡竹叶总黄酮在体外能够明显延缓荧光物质被活性氧自由基淬灭的速度, 表明其抗氧化作用相对较强, 且具有一定量效关系。

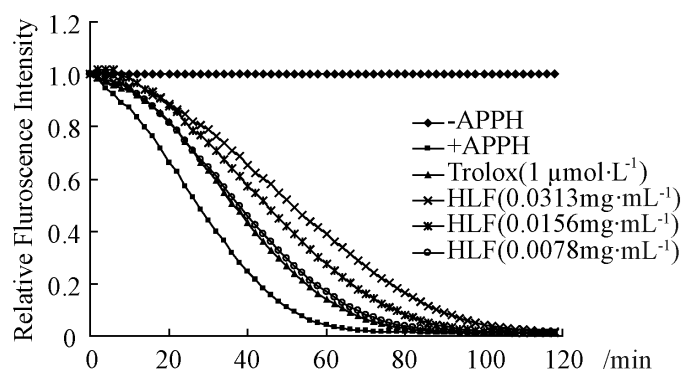


图 1 淡竹叶总黄酮(HLF)体外 ORAC 荧光衰减曲线

3.3 淡竹叶总黄酮对拘束负荷小鼠血浆 ORAC 水平的影响 与正常对照组相比, 模型组小鼠血浆 ORAC 显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 淡竹叶总黄酮各组小鼠血浆 ORAC 显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈一定量效关系(表 1)。

3.4 淡竹叶总黄酮对拘束负荷小鼠肝组织 ORAC 水平的影响 与正常对照组相比, 模型组小鼠肝组织 ORAC 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 淡竹叶总黄酮各组小鼠肝组织 ORAC 水平明显提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈一定量效关系(表 2)。

3.5 淡竹叶总黄酮对拘束负荷小鼠肝组织 MDA 水平的影响 与正常对照组相比, 模型组小鼠肝组织 MDA 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 淡竹叶总黄酮各组肝组织 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且呈一定量效关系(表 2)。

3.6 淡竹叶总黄酮对拘束负荷小鼠肝组织 NO 水平的影响 与正常对照组相比, 模型组小鼠肝组织中 NO 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 淡竹叶总黄酮各组均能明显降低拘束应激小鼠肝组织 NO 水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 2)。

表 2 淡竹叶总黄酮对拘束应激负荷小鼠肝组织 ORAC, MDA 和 NO 水平的影响 (均 ± s, n = 8)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	ORAC /U · L ⁻¹	MDA /nmol · ng ⁻¹	NO /μmol · L ⁻¹
正常对照	—	671.14 ± 52.32 ²⁾	25.22 ± 2.41 ²⁾	50.13 ± 4.06 ²⁾
模型	—	404.43 ± 41.26	50.78 ± 2.35	72.26 ± 3.94
淡竹叶总黄酮	125	475.38 ± 28.53	41.61 ± 1.75 ¹⁾	64.77 ± 3.22 ¹⁾
	250	531.65 ± 32.44 ¹⁾	36.43 ± 1.56 ¹⁾	60.35 ± 6.13 ¹⁾
	500	593.29 ± 37.82 ²⁾	31.38 ± 1.48 ²⁾	57.27 ± 3.83 ²⁾

注: 与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

当机体在应激负荷时, 体内活性氧自由基生成增加, 形成氧化应激状态。蓄积的氧自由基不仅攻

击生物膜中的不饱和脂肪酸而引发脂质过氧化反应, 而且可以破坏脂肪酸链和细胞膜完整性, 使胞浆内 ALT 渗出, 诱发应激性肝损伤^[5]。应激负荷条件下过量生成的 NO 可以与超氧阴离子直接或间接作用产生过氧化亚硝酸盐, 导致脂质过氧化, 生成脂质过氧化产物 MDA, 最终引发肝组织损伤^[6]。本实验结果显示, 拘束应激 18 h 后小鼠血浆中 ALT 水平、肝组织脂质过氧化产物 MDA 水平以及 NO 水平明显升高, 表明拘束应激负荷引起了急性肝损伤。另外, 实验表明拘束应激负荷明显降低血浆和肝组织中内 ORAC 水平, 这可能与机体氧化应激状态时内源性抗氧化能力消耗有关。

与模型组相比, 淡竹叶总黄酮能显著降低拘束应激引起的小鼠血浆 ALT 水平的升高, 能改善肝组织中 MDA 及 NO 水平, 并能提高拘束应激负荷小鼠血浆、肝组织的 ORAC, 说明淡竹叶总黄酮能有效地调节机体内自由基的产生和清除平衡, 缓解拘束应激负荷小鼠机体的氧化应激状态, 降低拘束应激诱发的过量自由基和脂质过氧化对肝脏的损伤。

[参考文献]

- [1] 王自军, 邓红等. 淡竹叶中总黄酮的提取与含量测定 [J]. 甘肃中医, 2004, 17(7): 35.
- [2] Yamaoka Y, Kawakita T, Nomoto K. Protective effect of a traditional Japanese medicine, Bu-zhong-yi-qi-tang (Japanese name: Hochu-ekki-to), on the restraint stress-induced susceptibility against *Listeria monocytogenes* [J]. Immunopharmacology, 2000, 48(1): 35.
- [3] Prior R L, Hoang H, Gu L, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples [J]. J. Agric. Food Chem, 2003, 51(11): 3273.
- [4] Saha K, Lajis N H, Israf D A, et al. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants [J]. Ethnopharmacology, 2004, 92: 263.
- [5] 宝丽, 姚新生, 何蓉蓉, 等. 广东凉茶颗粒对拘束负荷诱发小鼠应激性肝损伤的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(6): 664.
- [6] Llorens S, Jordan J, Nava E. The nitric oxide pathway in the cardiovascular system [J]. Physiology and Biochemistry, 2002, 58(3): 179.

[责任编辑 何伟]