

乌药叶总黄酮的抗氧化作用及对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用

顾莉蕴¹, 罗琼¹, 肖梅¹, 吴兴新¹, 何国庆², 孙洋¹, 陈婷¹, 徐强¹(1. 南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093; 2. 浙江天台山乌药生物工程有限公司, 浙江天台 317200)

摘要:目的 考察乌药叶总黄酮(LA-flavonoids)的抗氧化作用, 初步探讨其抗氧化机制。方法 在化学模拟体系中, 利用总抗氧化能力和抗超氧阴离子自由基试剂盒评价 LA-flavonoids 抗氧化活性。利用腹腔注射四氯化碳(CCl₄)造成小鼠急性肝损伤动物模型, 以血清转氨酶活性以及总抗氧化能力、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平为指标判断 LA-flavonoids 对化学性肝损伤的保护作用, 并通过逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)方法测定肝组织中相关抗氧化基因表达量的变化。结果 在化学模拟体系中, 随着 LA-flavonoids 浓度的增加, 其总抗氧化活性和抗超氧阴离子自由基活性均显著增加。在 CCl₄ 肝损伤模型中, 50~200 mg/kg 的 LA-flavonoids 均可显著降低肝损伤小鼠血清转氨酶的活性, 显著增强总抗氧化能力和 SOD 活力, 减少 MDA 释放; 进一步研究发现, LA-flavonoids 可显著提高受损肝组织中抗氧化相关基因 thioredoxin(抗细菌硫氧还原蛋白)、heme oxygenase-1(血红素加氧酶-1)以及 peroxiredoxin-1(过氧化物酶-1)的表达。结论 LA-flavonoids 能通过清除自由基, 抑制脂质过氧化产生, 从而保护 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤, 其机制可能与调节抗氧化相关基因的表达有关。

关键词: 乌药叶; 总黄酮; 抗氧化; 四氯化碳; 肝损伤

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1003-9783(2008)06-0447-04

Anti-oxidative and Hepatoprotective Activities of the Total Flavonoids from the Leaf of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. Against Mice Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride

GU Liyun¹, LUO Qiong¹, XIAO Mei¹, WU Xingxin¹, HE Guoqing², SUN Yang¹, CHEN Ting¹, XU Qiang¹(1. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093; 2. Zhejiang Tiantaishan Wuyao Biological Engineering Co. Ltd., Tiantai 317200 Zhejiang)

Abstract: **Objective** To explore the anti-oxidation effect and mechanism of the total flavones from the leaf of *Lindera aggregata* (LA-flavonoids). **Methods** The total antioxidation and anti-superoxide anion capacities were measured to evaluate the anti-oxidation activity of LA-flavonoids in the chemical model system in vitro. Acute liver injury mice model was induced with carbon tetrachloride (CCl₄), and the effect of LA-flavonoids on serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels as well as the contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and total anti-oxidation capacity were examined. RT-PCR was used for the determination of oxidation-related genes expression in liver tissues of mice with liver injury. **Results** In the chemical model system in vitro, with the increase of LA-flavonoids concentration, the total anti-oxidation and anti-superoxide anion capacities were increased. In mice with CCl₄-induced acute liver injury, LA-flavonoids at the concentrations of 50~200 mg/kg significantly decreased the ALT and AST activities and MDA content, and increased the activities of SOD and total antioxidation capacity in serum. The mRNA expression of thioredoxin, heme oxygenase-1 and peroxiredoxin-1 in liver tissues were also increased by LA-flavonoids. **Conclusion** LA-flavonoids has protective effect against CCl₄-induced acute liver injury by clearing away free radicals and inhibiting lipid peroxidation. Its antioxidant activity may be related to the regulation of some antioxidant-related genes.

Keywords: Leaf of *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm; Total flavonoids; Anti-oxidation; Carbon tetrachloride; Liver injury

收稿日期: 2008-05-13

作者简介: 顾莉蕴(1986-), 女, 硕士研究生, 从事药理学研究。Email: liyun_gu@163.com。通讯作者: 徐强, 教授。Email: molpharm@163.com。

基金项目: 江苏省六大人才高峰资助项目(A)。

樟科植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 为常用中药,《中国药典》记载其根、茎、叶均可入药,而历代方书多用其根,其叶的记述极少。近年来,对乌药叶的分析已有所进展,多种倍半萜内酯及黄酮类成分已被分离,有报道指出乌药叶茶能提高健康机体的抗氧化能力^[1],但相关作用机制未见报道。本研究在化学模拟体系及 CCl₄ 诱发脂质过氧化引起的小鼠急性肝损伤模型中,发现乌药叶总黄酮粗提物能通过清除自由基,抑制脂质过氧化而产生抗氧化作用。进一步研究发现,其抗氧化作用可能是通过提高抗氧化相关基因的表达实现的。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 乌药叶(浙江天台山乌药生物工程有限公司提供,采自浙江省天台县三州乡,经鉴定为 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的叶); CCl₄、橄榄油、异丙醇(上海凌峰化学试剂有限公司);氯仿(广东汕头市西陇化工厂);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);DEPC-H₂O(Beyotime);TRIzol[®] Reagent (Invitrogen),总抗氧化能力(TAOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和抗超氧阴离子自由基试剂盒(南京建成生物工程研究所);Rever Tra Ace-α-(TOYOBO), EasyTaq DNA Polymerase、10×EasyTaq DNA Polymerase buffer(+Mg²⁺),dNTP、10×Loading Buffer (TransGen Biotech);槲皮素(Acros);所有试剂均为分析纯,实验用水为millipore纯水机所产纯水。

1.2 动物 清洁级ICR小鼠,雌性,体重(20±2)g,扬州大学比较医学中心提供。合格证号:0013862。

1.3 仪器 酶标仪(Sunrise,TECAN公司);KQ-250DE型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);数显恒温水浴锅HH-2(国华电器有限公司);PCR仪(ABI);蛋白核酸检测仪(Eppendorf,Germany)。

1.4 乌药叶总黄酮的提取 乌药叶经蒸馏水煮沸提取后过大孔树脂,60%乙醇洗脱,浓缩,蒸干,得乌药叶总黄酮粗提物(LA-flavonoids),得率为3.35%,总黄酮含量为67%(以主成分为对照),批号:070321。

1.5 总抗氧化能力及抗超氧阴离子自由基活力的测定 以75%乙醇为阴性对照,槲皮素(querctin)作为阳性药^[2],将槲皮素及乌药叶总黄酮分别溶于75%乙醇中,制成一定浓度梯度的样品液,终浓度分别为:槲皮素,10⁻¹⁰,10⁻⁹,10⁻⁸g/mL;乌药叶总黄酮,10⁻¹⁰,5×10⁻¹⁰,10⁻⁹,5×10⁻⁹,10⁻⁸,5×10⁻⁸,

10⁻⁷g/mL。

按照TAOC测定试剂盒说明书,测定Fe³⁺还原反应体系中A520,并计算TAOC单位(在37℃时,每分钟每毫升样品液使反应体系的吸光度(OD)值每增加0.01时,为一个TAOC单位)。按照抗超氧阴离子自由基测试盒说明书,测定黄嘌呤氧化反应体系中A550,并计算抗超氧阴离子自由基活力单位(在反应体系中,每升样品液在37℃反应40min所抑制的超氧阴离子自由基相当于1mg的维生素C所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位)。

1.6 动物分组及小鼠CCl₄急性肝损伤模型建立^[3-4]

取小鼠60只,随机分成6组:I组为正常对照组(空白组),II组为肝损伤对照组,分别给予生理盐水20mL/kg,III组为阳性对照组,给予50mg/kg槲皮素,IV、V和VI组分别为乌药叶总黄酮低、中、高剂量治疗组,分别给予50,100,200mg/kg乌药叶总黄酮,药物均以蒸馏水溶解,超声助溶^[5]。每天灌胃1次,连续7d,每次给药前称重,末次给药2h后,II~VI组按5mL/kg腹腔注射体积分数为6%的CCl₄橄榄油溶液1次,禁食不禁水18h,摘眼球取血后断颈处死小鼠,离心得血清,准备检测各指标。取肝右叶组织,提取总RNA,RT-PCR检测抗氧化相关基因的表达。

1.7 指标检测

1.7.1 给药期间体重变化

1.7.2 血清生化指标 ALT、AST、SOD、MDA以及TAOC均按试剂盒说明书进行检测。

1.7.3 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR) 引物合成:根据GenBank登录的小鼠thioredoxin(抗细菌硫氧还原蛋白),heme oxygenase-1(血红素加氧酶-1),peroxiredoxin-1(过氧化物酶-1)基因以及β-actin基因的全长cDNA序列,通过Primer Premier 5.0软件设计,并经GenBank BLAST进行同源性检索后,由上海英骏生物技术有限公司上海合成部合成。

序列如下:thioredoxin,F:5'-GCACGGGAAGGTGCTCAT-3',R:5'-GCTGGTCCCTCGTCTTGATC-3',在409-557位点,预计扩增片段长度149bp;heme oxygenase-1,F:5'-TCACAGATGGCGTCACTT-3',R:5'-GAGGACCCACTGGAGGA-3',在819-947位点,预计扩增片段长度129bp;peroxiredoxin,F:5'-ATCCTCCTTGTTTCTTGG-3',R:5'-TTTACCCTCTTGACTTTACT-3',在201-362位点,预计扩增片段长度162bp;β-actin,F:5'-CGACAGGATGCA-GAAGGAGA-3',R:5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTG-

3', 在 1010-1164 位点, 预计扩增片段长度 155 bp。

从小鼠肝右叶剪取约 0.1 g 肝组织加入 1 mL Trizol 试剂, 提取组织总 RNA, 测定 A260/A280 比值在 1.8~2.0 之间, 说明 RNA 样品纯度理想。采用逆转录试剂盒合成 cDNA, 分别取 cDNA 模板 1 μL, PCR 扩增 thioredoxin, heme oxygenase-1, peroxiredoxin-1, β-actin 基因。Thioredoxin, heme oxygenase-1, β-actin 基因扩增设定反应程序如下: 94 °C, 5 min → [94 °C, 30 s → 56 °C, 30 s → 72 °C, 30 s] (循环 30 次) → 72 °C, 10 min; peroxiredoxin-1 基因扩增设定 PCR 反应程序如下: 94 °C, 5 min → [94 °C, 30 s → 52 °C, 30 s → 72 °C, 30 s] (循环 30 次) → 72 °C, 10 min。PCR 反应结束后取 20 μL 反应液于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, EB 染色, 紫外拍摄观察电泳条带。

1.8 统计学方法 数据以 “ $\bar{x} \pm s$ ” 表示。先用单因素方差进行分析, 再用 Dunnett's test 检验组间差异。

2 结果

2.1 乌药叶总黄酮的总抗氧化能力和抗超氧阴离子自由基活力 乌药叶总黄酮与槲皮素进行对照研究, 两者在浓度梯度范围内均随浓度的升高表现出增强的抗氧化能力和抗超氧阴离子自由基能力。从图 1 A 中可看出, 在低浓度下, 随着浓度的增加, 乌药叶总黄酮的 TAOC 呈微弱的增强趋势, 当乌药叶总黄酮浓度达 5×10^{-8} g/mL 时, TAOC 表现明显增强。图 1 B 表明, 乌药叶总黄酮抗超氧阴离子自由基能力的剂量依赖性较强, 随着浓度的增加呈现出明显的上升趋势。

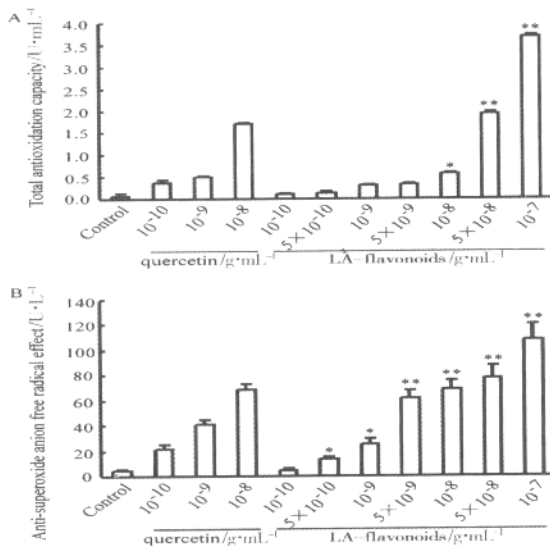


图 1 LA-flavonoids 总抗氧化和清除超氧阴离子自由基的能力 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: 与空白对照组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01。

2.2 对小鼠体重的影响 给药期间各组小鼠的进食量无明显差别, 小鼠毛色等均正常, 各组间平均体重均无显著性差异。

2.3 对 CCl₄ 致化学性肝损伤小鼠血清 ALT, AST 的影响 小鼠腹腔注射 CCl₄ 诱导后 18 h, 模型对照组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平显著高于正常对照组。与模型对照组相比, 乌药叶总黄酮各剂量组与槲皮素阳性对照组血清中 ALT 和 AST 显著降低, 并呈现一定的剂量依赖关系, 见表 1。

表 1 LA-flavonoids 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠血清中 ALT 和 AST 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	ALT/U · L ⁻¹	AST/U · L ⁻¹
Control		3.3 ± 1.2	9.7 ± 4.2
CCl ₄		148.3 ± 9.6	93.5 ± 17.5
CCl ₄ + Quercetin	50	126.3 ± 4.4**	75.2 ± 7.0*
CCl ₄ + LA-flavonoids	50	129.5 ± 10.6**	75.2 ± 10.0*
	100	128.0 ± 4.0**	73.6 ± 5.8**
	200	121.9 ± 6.4**	72.0 ± 7.3**

注: 与 CCl₄ 模型组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01。

2.4 对 CCl₄ 致化学性肝损伤小鼠血清总抗氧化能力、SOD、MDA 的影响 小鼠腹腔注射 CCl₄ 诱导后 18 h, 模型对照组小鼠血清的 TAOC 和 SOD 活性显著低于正常对照组, MDA 含量显著高于正常对照组。乌药叶总黄酮各剂量组与槲皮素阳性对照组可显著升高血清 TAOC 和 SOD 活性, 并使肝脏中 MDA 水平显著降低, 见表 2。

表 2 LA-flavonoids 对 CCl₄ 诱导的急性肝损伤小鼠血清中 TAOC、SOD、MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg · kg ⁻¹	TAOC/U · mL ⁻¹	SOD/U · mL ⁻¹	MDA/nmol · mL ⁻¹
Control		4.4 ± 0.3	101.9 ± 7.5	5.5 ± 0.9
CCl ₄		2.3 ± 0.4	67.8 ± 6.5	10.6 ± 1.1
CCl ₄ + Quercetin	50	3.3 ± 0.9*	95.7 ± 13.7**	7.7 ± 1.2**
CCl ₄ + LA-flavonoids	50	2.8 ± 0.8	81.5 ± 15.4	9.6 ± 1.4
	100	3.3 ± 0.9*	86.8 ± 11.7*	8.2 ± 1.5*
	200	3.3 ± 0.7*	92.6 ± 13.3**	7.4 ± 1.9**

注: 与 CCl₄ 模型组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01。

2.5 调节抗氧化相关基因的表达 由图 2 可见, 与正常对照组相比, CCl₄ 处理后, 小鼠肝组织中的 thioredoxin, heme oxygenase-1, peroxiredoxin-1 表达水平下降。乌药叶总黄酮可增强受损肝组织中 thioredoxin, heme oxygenase-1, peroxiredoxin-1 的表达, 并呈现出一定的剂量相关性。

3 讨论

CCl₄ 是常用的化学性肝损伤诱导剂^[6], 通过细胞

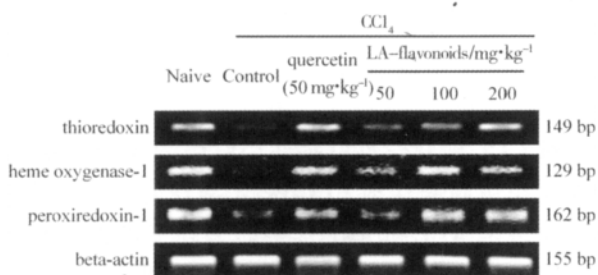


图2 RT-PCR 分析 CCl₄ 肝损伤小鼠肝组织中 thioredoxin, heme oxygenase - 1 和 peroxiredoxin - 1 的表达

色素 P450 起作用, 在肝细胞内形成活性的三氯甲基基团 (CCl₃⁺), 在有氧条件下进一步形成高度活性的三氯甲基过氧化自由基 (CCl₃O₂)^[7], 诱发脂质过氧化, 从而损害肝细胞的细胞膜, 使内源性转氨酶释放到细胞外, 导致血清中的转氨酶活性显著升高, 并导致细胞因子和氧自由基的释放; 同时, 激活 Kupffer 细胞及中性粒细胞, 影响肝细胞的 DNA 合成和分裂, 引起急性肝损伤^[8]。该模型是体内检测药物抗氧化作用的一种常用方法。

我们的研究表明, 乌药叶总黄酮可明显降低 CCl₄ 肝损伤小鼠血清转氨酶活性和脂质过氧化中间产物 MDA 的产生, 并显著增强 TAOC 和 SOD 活性, 说明乌药叶总黄酮能通过清除自由基, 抑制脂质过氧化而在体内起到抗氧化作用。同时, 乌药叶总黄酮在化学模拟体系内, 具有较强的还原能力, 能清除化学反应诱导的活性氧, 说明乌药叶总黄酮可以通过自身的还原性保护生物体内的其他还原性成分而发挥抗氧化作用。

为了进一步研究乌药叶总黄酮的抗氧化机制, 我们选择了三种抗氧化相关基因 thioredoxin, heme oxygenase - 1, peroxiredoxin - 1, 进行 mRNA 表达量的考察。在细胞内的氧化还原调节系统中, 这三种抗氧化相关基因都是应对氧化压力的抗氧化蛋白。Thioredoxin 是一种普遍存在的蛋白, 已被证实能在 peroxiredoxin 的配合下清除单线态氧, 羟自由基和过氧化

氢。细胞在压力情况下将血红素催化生成胆红素及一氧化碳的过程中, heme oxygenase - 1 是必需的。peroxiredoxin - 1 是巯基特异性的抗氧化剂, 它与血红素的结合后, 活性被抑制。研究表明, heme oxygenase - 1 和 peroxiredoxin - 1 共存能确保对方的抗氧化活性^[9]。在我们的实验中, 乌药叶总黄酮能显著提高 CCl₄ 降低的 thioredoxin, heme oxygenase - 1, peroxiredoxin - 1 的 mRNA 的表达, 这表明增强内源性的抗氧化酶活性可能是乌药叶总黄酮抗氧化作用的机制之一。综上, 乌药叶总黄酮能通过清除自由基, 抑制脂质过氧化产生抗氧化作用, 从而保护 CCl₄ 所致小鼠急性肝损伤, 其机制可能与调节抗氧化相关基因的表达有关。

参考文献:

- [1] 梁向明, 周芹, 大谷晴久. 乌药叶茶的抗氧化作用研究[J]. 卫生研究, 2006, 35(5): 636 - 638.
- [2] 苏俊锋, 郭长江. 食物黄酮槲皮素的抗氧化作用[J]. 解放军预防医学杂志, 2001, 19(3): 229 - 231.
- [3] 茹琴, 欧阳五庆, 张黎. 激动素对小鼠急性四氯化碳肝损伤的保护作用[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(4): 263 - 267.
- [4] 吴丽, 魏伟, 桂双英, 等. 芍药苷对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(21): 1807 - 1810.
- [5] 苏俊锋, 郭长江, 韦京豫, 等. 槲皮素体内外抗氧化作用的比较研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2002, 18(4): 382 - 386.
- [6] YANG Y, STEPHEN A. Kupffer cells are a major source of increased platelet activating factoring the CCl₄ - induced cirrhotic rat liver [J]. J Hepatol, 2003, 39(2): 200 - 207.
- [7] 宋正己. 实验性肝损伤模型的建立和研究进展[J]. 医学综述, 2004, 10(5): 278 - 280.
- [8] Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration [J]. Bio-materials, 2004, 25(9): 1601 - 1611.
- [9] Li Zhang, Huixin Yu, Yang Sun, et al. Protective effects of salidroside on hydrogen peroxide - induced apoptosis in SH - SY5Y human neuroblastoma cells [J]. European Journal of Pharmacology, 2007, 564: 18 - 25.

(编辑: 梁进权)

中国学术期刊综合引证年度报告(2008)

期刊名称: 中药新药与临床药理
 主办单位: 广州中医药大学
 计量指标统计表:

标准刊号: ISSN 1003 - 9783 CN 44 - 1308/R
 类目名称: 医药科学 \ 中医学 \ 中医药(YK3. 1)

总被引频次	影响因子	5 年影响因子	即年指标	他引总引比	被引期刊数	被引半衰期	2007 载文量	基金论文比
1196	0. 733	0. 838	0. 082	0. 98	398	5. 4	171	0. 47

中国学术期刊(光盘版)电子杂志社
 中国科学文献计量评价研究中心
 2008 年 10 月 20 日