

柴达木盆地唐古特白刺籽油保护肝损伤作用研究

索有瑞^{1*}, 高航^{2,3}, 王洪伦^{1,3}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001;

2. 中国科学院广州地球化学研究所, 广州 510640; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:对柴达木盆地唐古特白刺种籽油保护化学性肝损伤作用进行了研究。将小鼠按体重随机分为白刺籽油高、中、低剂量组,另设空白对照组和联苯双酯、藏茵陈阳性对照组。小鼠连续灌胃给药 15 d 后,用 CCl₄ 进行肝损伤,测定小鼠血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST); 肝脏过氧化脂质 (LPO) 降解产物丙二醛 (MDA) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的含量。结果显示,白刺籽油对血清 ALT、AST 具有显著的抑制作用,显著拮抗肝脏 MDA 的升高,显著提高肝脏 GSH-Px 含量。表明白刺籽油具有明显的保护化学性肝损伤的保健作用。

关键词:唐古特白刺; 种籽油; 化学性肝损伤; 保护作用

中图分类号: R285; Q946.91

The Protective Effect of *Nitraria tangutorum* Bobr. Seed Oil from Qaidam Basin on the Liver Injury of Mice

SUO You-rui^{1*}, GAO Hang^{2,3}, WANG Hong-lun^{1,3}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China;

3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The protective effect of seed oil of *Nitraria tangutorum* Bobr. from Qinghai Qaidam Basin. On the liver injury by chemical reagent was studied in this paper. The mice were randomly divided into three experimental groups according to their weight, the normal control group, two comparison groups of *Swertia mussotii* and diphenyl bibenzoate. After rats were feed seed oil for 15 days, their liver were injured by CCl₄. The content of ALT, AST in serum and the content of MDA, GSH-Px in liver were measured. The result showed that the seed oil could obviously control the content of ALT, AST in serum, prevent the rise of MDA in liver and enhance the content of GSH-Px in liver. The result indicated that the seed oil of *Nitraria tangutorum* Bobr. has significant protective effect on the mice.

Key words: *Nitraria tangutorum* Bobr.; *Nitraria* seed oil; liver injury induced by chemical reagent; protective effect

唐古特白刺 (*Nitraria tangutorum* Bobr.) 是柴达木盆地盐碱地、沙地和荒漠化草地的优势建群植物,其果实富含多种营养成分和医疗保健活性成分,具有较高的经济和药用价值。成熟果实中,白刺种籽占果实总质量的 30% ~ 35%,资源量很大。白刺种籽含油率 11% ~ 13%,多为不饱和脂肪酸,高达 95% 以上,其中亚油酸接近 70%^[1],是自然界较为

少见的富含不饱和脂肪酸的功能性油脂。多不饱和脂肪酸具有多种营养保健作用,如调节机体免疫功能^[2,3];降低血浆甘油三酯浓度^[4]等,是近年来天然产物研究与开发的热点。不饱和脂肪酸对化学性肝损伤具有保护作用^[5],为了充分利用柴达木白刺果实资源,形成白刺产业链,通过开发达到保护白刺,改善柴达木生态环境的目的,我们对白刺籽油的功效作用进行了系列研究,本文对白刺籽油保护化学性肝损伤功效作用进行了研究。

1 实验材料

收稿日期:2005-01-17

接受日期:2005-02-22

基金项目:中国科学院“西部之光”人才培养计划

*通讯作者 Tel:86-971-6143857;E-mail:yrsuo@nwipb.ac.cn

1.1 唐古特白刺种籽油样品

在柴达木盆地腹地德令哈、都兰、乌兰等地区采集唐古特白刺 (*Nitraria tangutorum* Bobr.) 的新鲜果实,打浆分离果汁和果核。将果核晾干后破碎。在 CO₂ 超临界萃取设备上按照预先选定的萃取条件提取白刺籽油,直接作为实验样品。

1.2 实验动物

昆明种系实验小白鼠,由青海省实验动物中心提供,实验动物合格证:青医动字第 01 号。

1.3 主要试剂和仪器

谷丙转氨酶、谷草转氨酶、丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶等测定试剂盒,由南京建成生物工程制品有限公司提供。

肝匀浆介质:pH 7.4,0.01 mol/L Tris-HCl,0.25 mol/L 蔗糖。

CARY300 Bio 紫外-可见光分光光度仪,美国 VARIAN 公司出品。

2 实验方法

2.1 化学性肝损伤动物模型建立^[6-8]

肝损伤剂:用食用花生油调配四氯化碳 (CCl₄),浓度为 0.1%。

损伤方法:CCl₄ 剂量为 10 mL/kg,即 0.2 mL/20 g,腹腔注射(ip) 1 次。

2.2 实验方法

将小鼠按给药剂量高、中、低分为 3 个给药组,另设空白组、损伤模型组与藏药藏茵陈和西药联苯双酯阳性对照组,每组 10 只,雌雄各半。连续灌胃给药 15 d,末次给药 2 h 后,用 0.1% CCl₄ 花生油 ip 进行损伤,禁食 16 h,断头取血。8000 rpm 离心 5 min 得血清,测血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶;取肝脏 0.500 g 按 1:9 比例加入预冷介质缓冲液在冰浴中匀浆,3000 rpm 离心 15 min,取上清液测定丙二醛含量和谷胱甘肽过氧化物酶活力。

2.3 生化指标测定方法

(1) 血清谷丙转氨酶 (ALT):赖氏法。谷丙转氨酶作用于由丙氨酸及 α -酮戊二酸组成的底物,生成丙酮酸及谷氨酸,丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼作用,生成丙酮酸苯腙,在碱性溶液中呈棕红色,505 nm 处比色。

(2) 血清谷草转氨酶 (AST):赖氏法。谷草转氨酶作用于由天门氨酸及 α -酮戊二酸组成的底物,生

成谷氨酸和草酰乙酸,草酰乙酸在反应过程中自行脱羧成丙酮酸,丙酮酸与 2,4-二硝基苯肼作用生成 2,4-二硝基苯腙,在碱性溶液中呈棕红色,505 nm 处比色。

(3) 肝匀浆丙二醛:比色法。过氧化脂质降解产物丙二醛 (MDA) 与硫代巴比妥酸 (TBA) 缩合,形成红色产物,532 nm 处比色。

(4) 肝匀浆谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px):酶促法。GSH-Px 可以促进过氧化氢 (H₂O₂) 与还原型谷胱甘肽 (GSH) 反应生成 H₂O 及氧化型谷胱甘肽 (GSSG),GSH-Px 的活力可用其酶促反应的速度来表示,测定此酶促反应中 GSH 的消耗,则可求出酶的活力。GSH 量的测定:GSH 和二硫代二硝基苯甲酸作用生成 5-硫代二硝基苯甲酸阴离子成较稳定的黄色,测 A_{412nm} 计算 GSH 量。

2.4 数据统计处理

用 SPSS9.0 统计软件处理分析所得实验数据。

3 实验结果

3.1 白刺籽油对小鼠血清谷丙转氨酶的影响

由表 1 知,CCl₄ 肝损伤模型组小鼠血清 ALT 明显高于对照组,肝损伤模型成立。白刺籽油 3 个剂量对因肝损伤引起的 ALT 升高具有显著的抑制作用,并且量效关系明显。

表 1 白刺籽油对肝损伤小鼠血清谷丙转氨酶的影响

Table 1 Effect of *Nitraria* seed oil on serum ALT in mice of liver injury

| 组别 | Group | 剂量 Dose | 动物数 No. of mouse | ALT (U/L) |
|--------|--------------------------|------------|---------------------|---------------|
| 空白对照组 | Normal control | 0 | 10 | 20.63 ±2.6 ** |
| 肝损伤模型组 | Liver injury model | 0 | 10 | 61.07 ±15.7 |
| 藏茵陈组 | <i>Swertia mussotii</i> | 3.62 g/kg | 10 | 30.55 ±3.8 * |
| 联苯双酯组 | Diphenyl bibenzoate | 200 mg/kg | 10 | 26.85 ±8.7 ** |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 30 mL/kg | 10 | 21.88 ±3.0 ** |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 15 mL/kg | 10 | 34.43 ±10.3 * |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 7.5 mL/kg | 10 | 32.32 ±3.0 * |

注:与损伤模型组相比 * P < 0.05, ** P < 0.01;与空白对照组比较 P < 0.01

Note: * P < 0.05, ** P < 0.01 vs liver injury model group; P < 0.01 vs Normal control group

3.2 白刺籽油对小鼠血清谷草转氨酶的影响

由表 2 知,小鼠肝损伤后,其血清中的 AST 显著升高,给予白刺籽油可明显拮抗 CCl₄ 引起的肝损伤,抑制了 AST 的升高。

表2 白刺籽油对肝损伤小鼠血清谷草转氨酶的影响

Table 2 Effect of *Nitraria* seed oil on serum AST in mice of liver injury

| 组别 | Group | 剂量 | 动物数 | AST |
|--------|--------------------------|-----------|--------------|---------------|
| | | Dose | No. of mouse | (U/L) |
| 空白对照组 | Normal control | 0 | 10 | 47.88 ±2.2 * |
| 肝损伤模型组 | Liver injury model | 0 | 10 | 78.80 ±10.6 |
| 藏茵陈组 | <i>Swertia mussotii</i> | 3.62 g/kg | 10 | 52.28 ±2.5 * |
| 联苯双酯组 | Diphenyl bibenzoate | 200 mg/kg | 10 | 52.02 ±1.4 ** |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 30 mL/kg | 10 | 53.38 ±3.6 * |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 15 mL/kg | 10 | 54.21 ±2.8 * |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 7.5 mL/kg | 10 | 66.27 ±7.6 |

注:与损伤模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与空白对照组比较 $P < 0.01$

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs liver injury model group; $P < 0.01$ vs Normal control group

3.3 白刺籽油对小鼠肝匀浆中丙二醛(MDA)的影响

由表2知,小鼠肝损伤后,其肝脏中过氧化脂质降解产物丙二醛(MDA)的含量显著提高,预先给予白刺籽油,可降低 CCl_4 肝损伤后引起的脂质过氧化作用,抑制了MDA的升高,并且有明显的剂量效应关系。

表3 白刺籽油对肝损伤小鼠肝匀浆中丙二醛(MDA)的影响
Table 3 Effect of *Nitraria* seed oil on MDA of hepatic homogenate in mice of liver injury

| 组别 | Group | 剂量 | 动物数 | 丙二醛 MDA |
|--------|--------------------------|-----------|--------------|----------------|
| | | Dose | No. of mouse | (nmol/mg) |
| 空白对照组 | Normal control | 0 | 10 | 10.18 ±0.7 ** |
| 肝损伤模型组 | Liver injury model | 0 | 10 | 25.30 ±3.3 |
| 藏茵陈组 | <i>Swertia mussotii</i> | 3.62 g/kg | 10 | 12.77 ±1.38 ** |
| 联苯双酯组 | Diphenyl bibenzoate | 200 mg/kg | 10 | 10.33 ±0.9 ** |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 30 mL/kg | 10 | 12.67 ±1.1 ** |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 15 mL/kg | 10 | 16.47 ±3.1 * |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 7.5 mL/kg | 10 | 19.71 ±2.1 |

注:与损伤模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与空白对照组比较 $P < 0.01$

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs liver injury model group; $P < 0.01$ vs Normal control group

3.4 白刺籽油对小鼠肝匀浆中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力的影响

各组小鼠肝匀浆中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力结果见表4。结果表明,肝损伤后GSH-Px活力显著下降,白刺籽油有提高GSH-Px活力的作用,中高剂量组与肝损伤模型组相比,具有显著性差异,同时量效关系明显。

表4 白刺籽油对肝损伤小鼠肝匀浆中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力的影响

Table 4 Effect of *Nitraria* seed oil on GSH-Px of hepatic homogenate in mice of liver injury

| 组别 | Group | 剂量 | 动物数 | GSH-Px |
|--------|--------------------------|-----------|--------------|---------------|
| | | Dose | No. of mouse | (U/min·mg) |
| 空白对照组 | Normal control | 0 | 10 | 34.14 ±1.8 ** |
| 肝损伤模型组 | Liver injury model | 0 | 10 | 25.80 ±1.1 |
| 藏茵陈组 | <i>Swertia mussotii</i> | 3.62 g/kg | 10 | 28.98 ±1.1 * |
| 联苯双酯组 | Diphenyl bibenzoate | 200 mg/kg | 10 | 30.15 ±0.6 ** |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 30 mL/kg | 10 | 29.56 ±0.4 ** |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 15 mL/kg | 10 | 29.04 ±0.5 * |
| 白刺籽油组 | <i>Nitraria</i> seed oil | 7.5 mL/kg | 10 | 28.07 ±0.8 |

注:与损伤模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与空白对照组比较 $P < 0.01$

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs liver injury model group; $P < 0.01$ vs Normal control group

4 讨论与评价

4.1 CCl_4 急性肝损伤模型实验是抗肝炎药物保肝作用的一个常用的动物模型,相关研究指出, CCl_4 所致肝损伤的机理有两种:一是自由基损伤,即脂质过氧化学说^[9], CCl_4 作为趋肝毒物经肝微粒体细胞色素 P_{450} 酶系激活生成自由基“·” CCl_3 ,攻击作用于肝细胞膜磷脂分子,引起脂质过氧化,导致肝细胞坏死,使肝脏产生机型损伤;二是直接膜溶解作用^[10], CCl_4 与肝微粒体脂质和蛋白质发生共价结合,破坏肝细胞膜结构和功能的完整。以上两种途径均使得肝细胞膜受到破坏,胞浆中可溶性酶ALT、AST和膜脂质过氧化产物MDA释放到血液中引起血中ALT、AST和MDA升高^[11],而谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶,它特异的催化还原型谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢的还原反应,可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用,当细胞膜被破坏时,它的活性就会因受损而降低。

4.2 本实验通过各组间生化指标的单方差分析表明,损伤模型组与空白组各生化指标间有显著性差异,即损伤模型成立;白刺籽油中剂量组与损伤模型组各生化指标间有显著性差异,籽油高剂量组与损伤模型组各生化指标间有极显著性差异,即籽油高、中两个剂量组对四氯化碳引起的小鼠急性化学肝损伤有预防作用。

4.3 中、高剂量的白刺籽油与阳性对照联苯双酯和藏茵陈具有相同的保肝作用。由于白刺籽油属天然

无毒保健食品,如开发成保肝制剂,可长期服用,与纯药品相比,具有更低的毒副作用和更好的安全性。

4.4 白刺籽油中含有大量的不饱和脂肪酸,尤其是亚油酸,有消除自由基和抗氧化作用^[12],实验结果表明,白刺籽油可以明显抑制血中 ALT、AST 及脂质过氧化(LPO)产物 MDA 的含量,还可降低 CCl₄ 对 GSH Px 的破坏程度,由此可见,白刺籽油对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠的肝脏组织的保护作用与其有效成分的抗氧化自由基损伤和抗脂质过氧化作用有关。

参考文献

- 1 Suo YR, Gao H, Wang HQ. Chinese *Nitraria tangutorum* Bor. :chemical constituents of seed oil extracted by SFE-CO₂. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2004,16:16-18
- 2 Endres S. n-3 Polyunsaturated fatty acids and human cytokine synthesis. *Lipids*,1996,31:S239-S242
- 3 Watanabe S, Sakai N, Yasui Y, et al. A high alpha-linolenate diet suppresses antigen-induced immunoglobulin E response and anaphylactic shock in mice. *Journal of Nutrition*,1994,124:1566-1573
- 4 Nestel PJ. Effects of n-3 fatty acids on lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*,1990,10:149-167
- 5 Cheng T (程体娟), Pu JK (卜积康), Wu LW (武莉薇), et al. A study on the protective effect of *Hippophae rhamnoides* subsp. seed oil on the liver injury and the mechanisms. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志),1994,19:367-369
- 6 Zhang XQ(张小强), Lu ZM(陆琮明), Zhai CK(翟成凯). A study on the protective effect of *sprulina platensis* on the CCl₄-induced liver tissue injury of mice. *J Nanjing Railway Medical College*(南京铁道医学院学报),1999,18(2):101-102
- 7 Mei Q(梅俏), Wei W(魏伟), Xu JM(许建明), et al. The mechanisms of total glucosides of *mudan cortex* against chemical liver injury in mice. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报),1999,15:176-178
- 8 Zhang XQ(张小强), Lu ZM(陆琮明), Zhai CK(翟成凯). Effect of *spirulina platensis* on lipid peroxidation during acute chemical liver injury in mice. *J Nanjing Railway Med Coll*(南京铁道医学院学报),2000,19(2):105-106
- 9 Recknagel RD, Plaa CL, Hewitt WR. Lipid Peroxidation: Biochem, Measurement and Significance in Liver Cell Injury in Toxicology of the Liver. New York: Raven Press,1982. 68
- 10 Roser BG, Gores G. Liver cell necrosis: Cellular mechanism and clinical implication. *Gastroenterology*,1995,108:252-255
- 11 Soni MG, Mehendale HM. Protection from chloroform amplified carbon tetrachloride toxicity by cyanidanol: Biochemical and histological studies. *Toxicol Appl Pharmacol*,1991,108:46-57
- 12 Monhan KI, Das UN. Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by polyunsaturated fatty acids. *Nutrition*,2001,17:126-151