

· 论 著 ·

沙棘籽油对小鼠实验性肝硬化的 保护作用及参数分析

施彦¹, 徐婧², 刘超², 叶存奇², 黄成²

(南京大学, 1. 医学院; 2. 生命科学学院, 江苏南京 210093)

摘要: 目的 研究沙棘籽油(seed oil of Hippophae rhamnoides L.)对实验性小鼠肝硬化的影响。 方法 采用四氯化碳(CCl₄)导致小鼠肝硬化, 分别饲以不同浓度的沙棘籽油, 饲养 45 d 后分别检测小鼠血清谷丙转氨酶(GPT)和超氧化物歧化酶(SOD)及肝组织的 SOD 活力和丙二醛(MDA)含量的变化, 观察沙棘籽油对小鼠肝的保护作用, 并以 GPT 生化指标值为应变变量, 以沙棘籽油剂量为自变量, 建立量效曲线。 **结果** 沙棘籽油能明显对抗血清中 GPT 的升高, 而且对调节 SOD 活力的下降及 MDA 的升高也有较明显效果。沙棘籽油剂量对 GPT 下降的函数相关性较好。 **结论** 沙棘籽油对小鼠实验性肝硬化具有一定的保护作用。

关键词: 沙棘籽油; 谷丙转氨酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 量效曲线

中图分类号: R575.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-8199(2006)01-0040-03*

The protection role and parameter analysis of seed oil of Hippophae rhamnoides L. on experimental hepatocirrhosis in mice

SHI Yan¹, XU Jing², LIU Chao², YE Cun-qi², HUANG Cheng²

(1. College of Medicine; 2. College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China)

Abstract: **Objective:** To study the effect of seed oil of Hippophae rhamnoides L. (SOHR) on experimental hepatocirrhosis in mice. **Methods:** CCl₄ was used in the experiment to form the model of experimental hepatocirrhosis in mice. In order to measure the possible changes of GPT and SOD in serum and SOD and MDA in tissues, we fed these mice with different concentration of SOHR for 45 days. The Dose-Effect Curve was set up based on the data of this experiment. **Results:** SOHR could control the increase of GPT in serum and the decrease of SOD evidently, as well as the increase of MDA in tissues. The relationship of that the Hippophae rhamnoides dose with the decrease of GPT is significant. **Conclusion:** SOHR protects the experimental hepatocirrhosis in mice.

Key words: Seed oil of Hippophae rhamnoides L.; Glutamic pyruvic transaminase; Superoxide dismutase; Malondialdehyde; Dose-effect curve

0 引 言

沙棘(Hippophae rhamnoides L.)系胡颓子科沙棘属落叶灌木或小乔木, 能耐高温、低温、干旱、瘠

薄、盐碱和风沙, 其适应不良环境的能力极强, 故目前开始在世界各地推广种植。在中国以中国沙棘(subsp. sinensis Rousi)为主要品种, 是传统的蒙、藏药, 有抗衰老、提高免疫力等多种功效, 对肝有较好

* 收稿日期: 2005-07-22; 修订日期: 2005-09-22

基金项目: 南京大学创建世界高水平大学学生创新工程基金资助项目(批准号: X-2004SKY-011)

作者简介: 施彦(1982-)男, 浙江余姚人, 医学硕士研究生, 从事临床医学方面研究。

通讯作者: 黄成(1962-)男, 江苏南京人, 副教授, 医学硕士, 从事实验动物学研究。

的保护作用^[1-3]。目前市场上已有沙棘保健品上市^[4,5],但关于沙棘籽油剂量标准不一。为深入研究其保肝作用及机制,本文采用口服四氯化碳(CCl₄)建立小鼠肝损伤的病理模型,用不同浓度的沙棘籽油灌胃,分析沙棘籽油对肝硬化小鼠保护作用的剂量效应。

1 材料和方法

1.1 实验材料 昆明小鼠 80 只,雄性,体重(25 ± 5)g,由南京安立默实验动物繁殖调剂中心提供(许可证号 SYXK2002-0059),沙棘籽油由内蒙古宇航人公司提供。谷丙转氨酶(GPT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法 80 只小鼠随机分成 8 组,每组 10 沙棘只:空白组,模型组,沙棘籽油剂量 1~6 实验组,其籽油:糊精分别为 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5 和 7:3。配制 1:19 CCl₄ 的橄榄油溶液,除空白组外每周给所有小鼠灌胃 1 次,剂量为 0.32 ml/20 g,持续 45 d,建立小鼠肝硬化模型^[6]。同时隔天给实验组小鼠灌以不同浓度沙棘籽油,模型组灌以糊精,空白组灌以蒸馏水,剂量均为 0.4 ml/20 g。

1.2.1 ALT 测定 灌胃 45 d,于末次给药 12 h 后,所有小鼠进行眼眶取血,按试剂盒说明书配置试剂,混匀,室温放置 5 min,505 nm 波长,蒸馏水调零,测各管吸光度,测定管吸光度减去对照管吸光度之差值,查标准曲线,求得相应血清 GPT 活力单位。

1.2.2 SOD 测定 灌胃 45 d,于末次给药 12 h 后,小鼠行眼眶取血,取肝,按试剂盒说明书配置试剂,混匀,蒸馏水调零,波长 550 nm 处比色。求得其中 5 组(空白组、模型组、实验组 3、组 5、组 6)相应 SOD 活力。

1.2.3 MDA 测定 灌胃 45 d,于末次给药 12 h 后,取肝组织制备肝匀浆,按试剂盒说明书配置试剂,测定其中 5 组(空白组、模型组、实验组 3、组 5、组 6)相应 MDA 值。

1.3 统计学方法 计数资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验统计检验, *P* ≤ 0.05 为差异有显著性统计学意义, *P* ≤ 0.01 为差异有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 沙棘籽油对肝硬化小鼠 GPT 的影响 模型组与空白组血清 GPT 差异极为显著,显示造模成功。实验组 GPT 值均有显著下降,其中实验组 5 的 GPT 值下降极为显著,见表 1。

表 1 沙棘籽油对 CCl₄ 所致雄性小鼠肝硬化 GPT 活力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of SOHR on GPT in hepatocirrhosis male mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 GPT(U/L)
空白组	10	38.96 ± 2.79 **
模型组	10	113.20 ± 21.30
实验组		
组 1	10	72.08 ± 31.16 *
组 2	10	75.12 ± 24.88 *
组 3	10	67.33 ± 28.94 *
组 4	10	66.80 ± 23.10 *
组 5	10	59.19 ± 8.24 **
组 6	10	56.56 ± 19.46 *

与模型组比较, * *P* < 0.05; ** *P* < 0.01

2.2 沙棘籽油对小鼠肝硬化 SOD 活力的影响 模型组与空白组 SOD 含量差异极为显著,显示造模成功。在选取的 3 个实验组中,除组 3 外,组 5、组 6 肝组织 SOD 值有显著和极显著升高。血清中 SOD 值 3 个实验组均有极为显著的升高,见表 2。

表 2 沙棘籽油对 CCl₄ 所致小鼠肝硬化 SOD 活力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of SOHR on SOD in hepatocirrhosis mice($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝 SOD(U/mg 肝组织)	血清 SOD(U/mL)
空白组	10	157.513 ± 28.692 **	52.068 ± 6.344 **
模型组	10	122.530 ± 5.703	21.977 ± 6.352
实验组			
组 3	10	139.805 ± 22.705	39.593 ± 1.694 **
组 5	10	140.389 ± 34.811 *	38.886 ± 3.324 **
组 6	10	169.267 ± 9.826 **	39.876 ± 8.597 **

与模型组比较, * *P* < 0.05; ** *P* < 0.01

2.3 沙棘籽油对小鼠肝硬化 MDA 活力的影响 模型组与空白组 MPA 含量差异极为显著,显示造模成功。在实验组 3、组 5、和组 6 的 3 个剂量组中,肝组织 MDA 值均有极为显著的降低,见表 3。

表 3 沙棘籽油对 CCl₄ 所致小鼠肝硬化 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of SOHR on MDA in hepatocirrhosis mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝 MDA(nmol/mg 肝组织)
空白组	10	37.200 ± 10.087 *
模型组	10	93.565 ± 25.112
实验组		
组 3	10	47.537 ± 15.405 *
组 5	10	24.106 ± 16.023 *
组 6	10	36.385 ± 23.440 *

与模型组比较, * *P* < 0.01

2.4 对沙棘 GPT 组作量效曲线及其参数分析

GPT 组生化指标与剂量梯度运用 Origin 7 进行 S 拟合 Fit Sigmoidal, 公式为:

$$y = A_2 + (A_1 - A_2) / \{1 + \exp[(x - x_0) / dx]\}$$

对应的参数值: A_1 为 73.681, A_2 为 55.881, x_0 为 40.547 (x_0) 为 64.781, R^2 为 0.925, A_1 为函数的最大值, A_2 为函数的最小值, x_0 为函数的拐点 (即函数由凸函数部分变为凹函数, 函数斜率绝对值由递增变为递减), R_2 为函数相关系数

血清 GPT 活力随浓度变化曲线图见图 1。

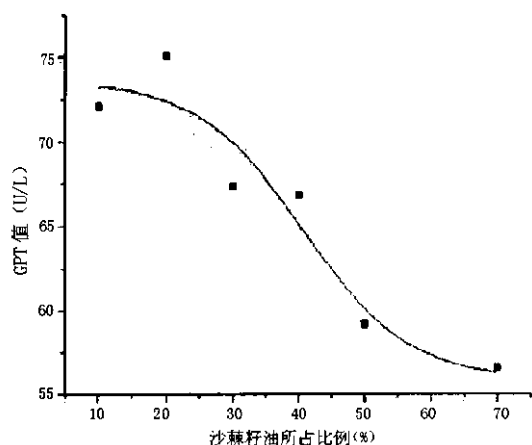


图 1 血清 GPT 活力随浓度变化曲线图

Figure 1 Curve of serum GPT to SOHR desity

3 讨 论

3.1 沙棘籽油对保肝作用的可能机制

对小鼠长期注射 CCl_4 致使肝细胞变性、纤维增生而致肝硬化, 肝小叶结构紊乱, 静脉回流受阻, 肝静脉和门静脉高压促进肝内动静脉吻合支形成, 致使肝细胞供血减少, GPT、MDA 含量增高, SOD 活性下降^[2]。目前对 CCl_4 引起肝损伤机制的研究多认为和脂质过氧化有关^[7]。其在肝中被微粒体酶代谢成 $CCl_3 \cdot$, $CCl_3 \cdot$ 能与 O_2 结合产生氧化性更强的 $CCl_3 \cdot O_2$ 自由基, 与肝细胞上的不饱和脂质共价结合, 发生脂质过氧化反应, 使肝细胞受损甚至死亡。当肝细胞损伤时, 细胞质内 GPT 大量释放, 使得 GPT 含量上升, 血清转氨酶是测定肝损伤的敏感指标^[8]。沙棘籽油各浓度组剂量对肝硬化模型小鼠血清 GPT 升高均有比较明显的抑制作用, 表明能对抗 CCl_4 的攻击。故 GPT 的变化能较显著的反映出肝细胞的损伤程度。

SOD 能特异性清除自由基对机体损伤的关键酶^[8]。可通过自身氧化还原反应将毒性极强的超氧化物自由基阴离子 O_2^- 歧化成无毒的 O_2 和 H_2O_2 , 再由过氧化氢酶等催化分解, 从而保护细胞免受内源性自由基阴离子的毒害作用。MDA 含量升高是机体抗氧化能力下降的表现之一, 它是一种细胞脂

质过氧化产物。国外曾有报道, 饮食量的维生素 E 能对抗肝脏中的一些毒素, 以促进其正常生长^[9]。而籽油中富含维生素 E, 可提示它可能也是沙棘籽油保肝的物质之一。因此 SOD 和 MDA 的指标能在一定程度反映肝细胞的损伤程度。

3.2 对 GPT 组的量效函数分析

对小鼠剂量梯度的 GPT 生化指标值用 $y = A_2 + (A_1 - A_2) / \{1 + \exp[(x - x_0) / dx]\}$ 函数拟合, 得到的拟合函数有较好的相关性, 说明本文选用函数模型有效。该函数的拐点为函数斜率绝对值由递增变为递减, 在拐点处斜率绝对值最大, 即在该点浓度服用沙棘籽油效率为最高, 即 x_0 值为 40.547, 作为它的最佳服用剂量。拟合函数可以得到函数的极大值和极小值, 但该组极小值大于正常组 x 对应值, 说明无论多大剂量, GPT 值都不能达到正常组的水平。

3.3 对其余各组生化指标的分析

由于实验组 1、组 2、组 4 血清、肝组织等实验材料较少, 不足以完成所有指标的测定, 故我们有目的地选取其他 3 个剂量组进行测定, 除实验组 3 肝组织 SOD 外, 其余各组均与模型组有显著的统计学差异。但血清各剂量组中, 选取的 3 组间差异不大, 提示 SOD 活力不随沙棘籽油的浓度升高而显著升高。可能提高沙棘籽油浓度对保护肝、增强 SOD 活力无明显效果。因 MDA 与 SOD 水平变化有其相互关系, 故对 MDA 我们同样选取这 3 个剂量组进行测定, 实验所得沙棘籽油各剂量组均可明显降低 MDA 含量, 提示沙棘籽油可能有抗脂质过氧化作用。因此, 还有必要进行更细的分组来求出其最佳剂量。

参考文献:

- [1] 程体娟, 卜积康, 武莉薇, 等. 沙棘籽油的保肝作用及其作用机理初探[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(6): 367-370.
- [2] 程体娟, 李文惠, 陈卫, 等. 沙棘籽油对大鼠实验性肝纤维化的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(6): 15-16.
- [3] 覃红, 程体娟, 佟婉红, 等. 沙棘籽油对肝损伤小鼠免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(1): 14-15.
- [4] 齐东梅, 刘虎成, 刘勤晋. 保健型沙棘果茶的研制[J]. 农牧产品开发, 2000(11): 21-22.
- [5] 齐东梅, 刘虎成, 刘勤晋. 保健型沙棘果茶的研制[J]. 沙棘, 2001, 14(1): 22-24.
- [6] 苗明三. 实验动物与动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 225-226.
- [7] 丁晶晶, 金安娜, 施丽丽, 等. 螺旋藻(Spirulina)对慢性肝损伤小鼠肝组织抗氧化能力的影响[J]. 湖泊科学, 2004, 16(4): 346-347.
- [8] 王鸿利. 实验诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 172, 180-181.
- [9] Parola M, Leonarduzzi G, Biasi F, et al. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis[J]. Hepatology, 1992, 16(4): 1014-1021.