

花青素对化学诱导小鼠急性肝损伤的预防研究

张晓丽¹, 刘洪海², 梁红兵², 杜平², 张希波¹

(1. 石河子大学药学院, 新疆石河子 832000; 2. 新疆中基天然植物纯化高新技术研究院有限公司, 乌鲁木齐 830088)

[摘要] 目的 研究花青素对四氯化碳(CCl₄)所致的急性化学性肝损伤的预防作用。方法 昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 随机分为空白对照组、肝损伤模型组、阳性对照组(给予维生素 E)及花青素低、中、高剂量组, 用分光光度法测定并比较各组小鼠肝脏指数、脾脏指数及胸腺指数, 红细胞膜中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)的活力和丙二醛(MDA)的含量, 血浆中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)活力以及肝糖原水平。结果 花青素可抑制由于氧化损伤所致的小鼠红细胞膜中 SOD、CAT 活性的降低, 抑制血浆中 GSH-Px 活性的降低, 降低血浆 ALT、AST、红细胞膜中 MDA 及肝脏指数的异常升高; 提高肝糖原水平及脾脏指数及胸腺指数。结论 花青素对四氯化碳所致氧化损伤的小鼠有明显的保护作用。

[关键词] 花青素; 抗氧化; 损伤, 肝, 急性

[中图分类号] R282.77

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2009)07-0843-04

Protection of Anthocyanidin on Acute Chemical - Induced Liver Injury in Mice

ZHANG Xiao-li¹, LIU Hong-hai², LIANG Hong-bing², DU Ping², ZHANG Xi-bo¹ (1. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. Institute of Xinjiang Chalks Natural Plant, Urumqi 830088, China)

ABSTRACT Objective To study the protective effects of anthocyanidin against the acute liver injury induce by CCl₄ in mice. **Methods** 60 Kunming mice with equal numbers of male and female were randomly divided into control group, liver injury model group, VE group and groups with low, middle and high dose of anthocyanidin. Liver index, spleen index, thymus index, activities of erythrocyte membrane superoxide dismutase (SOD), plasma alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), and hepatic glycogen were assayed and compared between groups. **Results** Anthocyanidin significantly increased activities of SOD, CAT and GSH-Px; increased hepatic glycogen, spleen index, and thymus index; abated plasma ALT, AST, MDA content and liver index.

Conclusion Anthocyanidin shows protective effects on the acute liver injury induced by CCl₄ in mice.

KEY WORDS Anthocyanidin; Antioxidation; Injury, liver, acute

花青素(anthocyanidin)又称花色素,是一类广泛地存在于植物中的水溶性天然色素,属黄酮类化合物。花青素在自然状态下常与各种单糖形成糖苷,称为花色苷。花青素作为一种天然食用色素,安全、无毒、资源丰富,而且具有一定营养和药理作用,大量研究表明花青素具有抗氧化、抗突变、预防心脑血管疾病、保护肝脏、抑制肿瘤细胞发生等多种生理功能。此外,花青素在食品、化妆、医药等方面有着巨大的应用潜力^[1]。笔者在本研究通过四氯化碳(CCl₄)诱导建立小鼠急性肝损伤模型,对从烟 73 葡萄中提取得到的花青素进行小鼠体内抗氧化活性的研究,旨在揭示其

对此类损伤的预防保护作用。

1 实验材料

1.1 药物与试剂 花青素粉末(实验室自制,纯度 95%),维生素 E(纯度 97.5%,西南合成制药厂);肝素钠(上海生物化学制药厂);四氯化碳;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒、肝/肌糖元测定试剂盒、氯化高铁血红蛋白测试液、丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定试剂盒、天冬氨酸氨基转移酶(AST)测定试剂盒(以上均为南京建成生物工程研究所提供)。

1.2 仪器 低温超速离心机、岛津 UV-2550 型分光光度计;SK-1 型涡旋混合振荡器。

1.3 实验动物 昆明种小鼠,体质量(20±2)g,雌雄各半,新疆实验动物研究中心提供。

2 实验方法

2.1 动物分组和给药 60 只小鼠随机分成 6 组,每

[收稿日期] 2008-11-10

[作者简介] 张晓丽(1982-),女,山东临沂人,硕士,从事天然产物研究与开发。电话:(0)15999121816, E-mail: 270919515@qq.com。

[通讯作者] 刘洪海(1965-),男,副教授,硕士生导师,研究方向为天然产物研究与开发。电话:0991-3963028, E-mail:hhliu@china.com.cn。

组 10 只,分别为空白对照组、肝损伤模型组、阳性对照组(给予维生素 E $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、花青素高剂量组($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、中剂量组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、低剂量组($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),各组连续灌胃给药 21 d,空白对照组和肝损伤模型组给予 0.9% 氯化钠溶液,各组均自由进食。

2.2 氧化模型的建立及样本制备 参照文献[2,3]。于末次给药后 2 h,除空白对照组外分别进行腹腔注射 0.10% 的 CCl_4 花生油溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,空白对照组腹腔注射同剂量的花生油,禁食不禁水,18 h 后摘除眼球采血,肝素钠抗凝,同时立即破腹取肝脏、脾脏和胸腺,用 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 0.9% 氯化钠溶液冲尽残血,滤纸拭干,称质量,计算肝脏、脾脏和胸腺指数。肝脏指数 = 肝脏质量/小鼠体质量;脾脏指数 = 脾脏质量/小鼠体质量;胸腺指数 = 胸腺质量/小鼠体质量。

2.2.1 红细胞指标测定样本的处理 测定 CAT 的溶血液制备:将抗凝全血 $1\ 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心机半径 8 cm)离心 5 min,弃上清液,沉淀的红细胞加一定量纯化水混匀后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 10 min,制成 1% 的溶血液,立即测定;SOD 测试液制备:取肝素抗凝全血 $50 \text{ }\mu\text{L}$,冲入盛有 0.9% 氯化钠溶液 4 mL 的带刻度的玻璃离心管中, $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,弃上清液,沉淀的红细胞加 0.6 mL 冷纯化水,旋涡混匀 1 min;加无水乙醇 0.3 mL,旋涡混匀 30 s;加三氯甲烷 0.3 mL,旋涡混匀 1 min; $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,取上清液立即测定。MDA 测试液制备:取肝素抗凝全血 0.15 mL,加 0.9% 氯化钠溶液 3 mL, $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 8 min,弃上清液,沉淀的红细胞加纯化水 0.6 mL,旋涡混匀 1 min;加 0.3 mL 无水乙醇,旋涡混匀 30 s;加三氯甲烷 0.3 mL,旋涡混匀 1 min; $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。取上清液立即测定。

2.2.2 血浆的制备 抗凝全血 $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液待测。

2.3 检测方法 SOD、CAT、ALT、AST、GSH-Px 的活性,MDA 含量、肝糖原含量等的测定均按南京建成生

物工程研究所提供的试剂盒检测方法进行测定。

2.4 统计学方法 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 14.0 统计软件进行数据统计分析,组间 *t* 检验判断差异显著性。

3 结果

3.1 肝脏指数、脾脏指数、胸腺指数的检测 结果见表 1。表 1 的结果表明,肝损伤模型组小鼠腹腔注射 CCl_4 后使肝脏指数极显著地增高($P < 0.01$),而阳性对照组及花青素低、中、高剂量组则可极显著的降低肝脏指数($P < 0.01$)。

胸腺是动物体的重要免疫器官,也是 T 淋巴细胞成熟的场所,脾脏内的巨噬细胞和淋巴细胞也都参与机体免疫活动。因此,胸腺指数和脾脏指数的变化从一个侧面反映了细胞免疫功能的变化情况。由表 1 可以看出,阳性对照组及花青素低、中、高剂量组小鼠的胸腺指数和脾脏指数与肝损伤模型组相比都有升高的趋势,差异显著。这说明补充一定量的花青素可以促进小鼠免疫器官胸腺的生长,有利于机体免疫功能的提高。

3.2 花青素对小鼠红细胞氧化损伤的保护作用 SOD、CAT、GSH-Px 为体内清除超氧阴离子的抗氧化酶,酶活力的高低与自由基代谢密切相关。MDA 是脂质过氧化产物,其生成的多少体现了生物膜的受损程度,且和自由基的含量密切相关。花青素对红细胞膜中 SOD、CAT 活性,MDA 含量及血浆中 GSH-Px、ALT、AST 活性,肝糖原水平的影响见表 2,3。表 2 和表 3 的结果表明,与空白对照组比较,肝损伤模型组小鼠红细胞膜中 SOD、CAT 活性显著降低($P < 0.01$),血浆中 GSH-Px 活性显著降低,而 ALT、AST 活性、MDA 含量显著增加($P < 0.01$)。与肝损伤模型组比较,花青素各剂量组和阳性对照组红细胞膜中 SOD、CAT 活性明显升高,与花青素低剂量比较,花青素中、高剂量红细胞中 SOD、CAT 活性明显升高,并且花青素高剂量组的作用优于阳性对照组,差异有极显著性($P < 0.01$);与肝损伤模型组比较,花青素各剂量组和阳性对照组血

表 1 各组小鼠肝脏指数、脾脏指数、胸腺指数的检测

$n = 10, \bar{x} \pm s$

组别	肝脏指数	脾脏指数	胸腺指数
花青素			
低剂量组	$0.041\ 5 \pm 0.002\ 2^{*1}$	$0.002\ 54 \pm 0.002\ 8^{*1}$	$0.003\ 87 \pm 0.000\ 3^{*1}$
中剂量组	$0.041\ 5 \pm 0.003\ 1^{*1}$	$0.002\ 56 \pm 0.000\ 4^{*1}$	$0.004\ 25 \pm 0.000\ 3^{*1*2}$
高剂量组	$0.042\ 0 \pm 0.004\ 0^{*1}$	$0.002\ 57 \pm 0.000\ 3^{*1}$	$0.004\ 25 \pm 0.000\ 3^{*1*2}$
空白对照组	$0.043\ 8 \pm 0.002\ 5$	$0.002\ 53 \pm 0.000\ 3$	$0.004\ 78 \pm 0.000\ 7$
肝损伤模型组	$0.052\ 2 \pm 0.004\ 2^{*3}$	$0.002\ 09 \pm 0.000\ 1^{*3}$	$0.003\ 03 \pm 0.000\ 5^{*3}$
阳性对照组	$0.043\ 5 \pm 0.003\ 1^{*1}$	$0.002\ 60 \pm 0.000\ 2^{*1}$	$0.004\ 46 \pm 0.000\ 2^{*1}$

与肝损伤模型组比较, $^{*1}P < 0.01$;与花青素低剂量组比较, $^{*2}P < 0.01$;与空白对照组比较, $^{*3}P < 0.01$

浆中 GSH-Px 活性明显升高, 血浆 ALT、AST 活性、红细胞膜中 MDA 含量明显降低。随着花青素剂量的升高, 作用也逐渐增强, 显示了一定的剂量依赖性。

表 2 各组红细胞膜 SOD、CAT、MDA 活性比较

$n = 10, \bar{x} \pm s$

组别	SOD/ ($U \cdot pr^{-1}$)	CAT/ ($U \cdot mgpr^{-1}$)	MDA/ ($nmol \cdot mgpr^{-1}$)
花青素			
低剂量组	9 187.3 ± 163.65 ^{*1}	11.51 ± 0.63 ^{*1}	11.96 ± 1.09 ^{*1}
中剂量组	10 297.5 ± 496.19 ^{*1*2}	12.13 ± 1.08 ^{*1}	10.99 ± 0.93 ^{*1*2}
高剂量组	11 078.0 ± 511.67 ^{*1*3*4}	12.92 ± 0.84 ^{*1*3*5}	10.01 ± 0.75 ^{*1*4*7}
空白对照组	12 664.8 ± 656.50	13.84 ± 0.45	8.03 ± 0.35
肝损伤模型组	8 958.4 ± 256.01 ^{*6}	10.52 ± 1.01 ^{*6}	12.89 ± 1.43 ^{*6}
阳性对照组	10 394.1 ± 288.60 ^{*7}	12.03 ± 0.68 ^{*7}	10.88 ± 0.41 ^{*7}

与肝损伤模型组比较, ^{*1} $P < 0.05$, ^{*7} $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, ^{*3} $P < 0.01$, ^{*5} $P < 0.05$; 与花青素低剂量组比较, ^{*2} $P < 0.01$, ^{*4} $P < 0.05$; 与空白对照组比较, ^{*6} $P < 0.01$

表 3 各组血浆 GPT、GOT、GSH-Px 含量及肝糖原水平比较

$n = 10, \bar{x} \pm s$

组别	ALT/ ($U \cdot L^{-1}$)	AST/ ($U \cdot L^{-1}$)	GSH-Px/ ($U \cdot mgpr^{-1}$)	肝糖原/ ($mg \cdot g^{-1}$)
肝损伤模型组	112.55 ± 9.14 ^{*1}	95.29 ± 4.43 ^{*1}	61.48 ± 8.98 ^{*1}	2.94 ± 0.55 ^{*1}
阳性对照组	67.43 ± 9.01 ^{*2}	57.16 ± 3.28 ^{*2}	100.38 ± 7.99 ^{*2}	4.06 ± 0.45 ^{*2}
花青素				
低剂量组	85.76 ± 6.67 ^{*2}	87.04 ± 6.79 ^{*2}	70.82 ± 7.38 ^{*3}	3.38 ± 0.31 ^{*3}
中剂量组	61.73 ± 4.93 ^{*2*4}	73.02 ± 8.89 ^{*2*4}	73.22 ± 9.53 ^{*2}	3.42 ± 0.41 ^{*3}
高剂量组	56.32 ± 5.64 ^{*2*4*5}	62.63 ± 5.83 ^{*2*4*6}	86.58 ± 7.41 ^{*4*6}	4.61 ± 0.82 ^{*2}
空白对照组	15.95 ± 1.65	22.42 ± 1.83	123.65 ± 10.97	5.52 ± 1.07

与空白对照组比较, ^{*1} $P < 0.01$; 与肝损伤模型组比较, ^{*2} $P < 0.01$, ^{*3} $P < 0.05$; 与花青素低剂量组比较, ^{*4} $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, ^{*5} $P < 0.05$, ^{*6} $P < 0.01$

4 讨论

正常机体内, 有一套有效的抗氧化防御体系, 来防止 ROS 对机体的损伤, 如 SOD 具有减少超氧自由基的作用, GSH-Px 则能降低过氧化氢含量。氧化和抗氧化的平衡是决定细胞生存的条件, 应及时清除体内过剩的自由基, 维持自由基的动态平衡。不断清除多余活性氧自由基是保护机体组织的一种重要机制。CCl₄ 所致肝损伤模型是传统的肝毒模型, 它能准确反映肝细胞在接触化学性物质后肝脏功能、代谢及形态学变化, 常用于解释某些肝脂肪变性的发病机制。

众多研究表明, 当机体摄入 CCl₄ 时, 可以明显影响血浆 ALT、AST 活性。同时体内肝组织细胞中的自由基代谢平衡就会失调, 对自由基的防御能力也会下降, 过量自由基可使生物膜脂质双分子层中的不饱和脂肪酸过氧化, 而形成脂质过氧化产物, 从而使膜结构和功能发生障碍。过氧化脂质的代谢产物 MDA, 进一步与磷脂酰乙醇胺和蛋白质交联, 生成无活性脂褐质, 沉积于组织细胞, 破坏细胞膜结构, 最后导致细胞无法维持正常代谢而死亡^[2,4]。本实验的结果表明, 模型组 ALT、AST 活性较正常组明显升高, 肝糖原水平明显降

低, 说明造模成功。

SOD 是 O₂^{-·} 的特异酶, 它能催化两个超氧阴离子的歧化反应, 生成过氧化氢 (H₂O₂) 和分子氧。超氧阴离子的质子化形式 HOO[·] 比较活泼, 可以启动脂质过氧化, 并能和 GSH 反应, 还能使 GSH-Px 失活。因此 SOD 是组织细胞内主要的抗氧化酶, 具有多种生物功能, SOD 的活性高低反映了组织细胞清除超氧阴离子的能力。测定 MDA 的含量可反映出组织细胞脂质过氧化的程度, 间接反映出其损伤的程度^[5,6]。

GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化 H₂O₂ 分解的酶, 可以起到保护细胞膜结构和功能的完整的作用, 测定 GSH-Px 的活性可以作为衡量机体抗氧化水平的一项生化指标。研究表明, GSH-Px 可以清除有机过氧化物, 尤其是自由基造成脂质过氧化时产生的脂质过氧化物^[7]。

本实验表明, 花青素可抑制由于 CCl₄ 肝损伤所致的小鼠红细胞膜中 SOD、CAT 的降低, 抑制血浆 GSH-Px 活性的降低及血浆 ALT、AST 活性的异常升高; 降低红细胞膜中 MDA 含量及肝脏指数, 提高肝糖原水平及脾脏指数、胸腺指数, 有效缓解 CCl₄ 对肝脏组织的损

伤。

[DOI] 10.3870/yydb.20109.07.007

[参考文献]

[1] 任雁,张惟广. 花色苷的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2006, 6(1): 71-77.

[2] 唐云安,刘玉清,王国钦. 肝损伤动物模型研究进展[J]. 卫生毒理学杂志, 2002, 16(4): 236-238.

[3] 崔文新. 天然植物色素抗氧化作用的比较研究[D]. 山东师范大学, 2006.

[4] 裴凌鹏,惠伯棣,董福慧. 万寿菊提取物改善 D-半乳糖致

衰大鼠抗氧化功能的研究[J]. 国外医学老年学分册, 2007, 28(1): 38-40.

[5] 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]. 华西药理学杂志, 2008, 23(2): 8-12.

[6] 冯亮,徐辰,郑洁,等. 茶多酚对 D-半乳糖诱导糖基化大鼠脑损害的干预作用[J]. 中国老年学杂志, 2008, 27(13): 1251-1254.

[7] 陈媛,周枚. 自由基与衰老[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004: 15-18.

亚叶酸钙分散片人体药动学与生物等效性研究

卜跃华¹, 洪博², 赵旻², 赵春杰²

(1. 中国医科大学高等职业技术学院, 沈阳 110001; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的 评价两种亚叶酸钙制剂在健康人体内的药动学和生物等效性。方法 18 例男性健康志愿者随机交叉单剂量口服两种亚叶酸钙分散片, 采用高效液相色谱(HPLC)法测定血浆中药物浓度, 通过方差分析和双向单侧 t 检验比较两种分散片药时曲线下面积 AUC_{0-12} 。结果 受试制剂和参比制剂的 t_{max} 均为 (1.5 ± 0.0) h, C_{max} 分别为 $(2\ 295.51 \pm 368.93)$ 和 $(2\ 139.53 \pm 189.67)$ $ng \cdot mL^{-1}$, $t_{1/2}$ 分别为 (2.19 ± 0.16) h 和 (2.23 ± 0.17) h, 药时曲线下面积 AUC_{0-12} 分别为 $(6\ 202.09 \pm 229.90)$ $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$ 和 $(6\ 185.32 \pm 191.47)$ $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $(6\ 478.43 \pm 250.69)$ $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$ 和 $(6\ 478.63 \pm 248.10)$ $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$ 。结论 两种亚叶酸钙分散片生物等效, 相对生物利用度为 $(100.13 \pm 5.39)\%$ 。

[关键词] 亚叶酸钙; 分散片; 生物利用度; 色谱法, 高效液相

[中图分类号] R973.3; R969.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2009)07-0846-03

Pharmacokinetics and Bioequivalence of Calcium Folate Dispersed Tablets

BU Yue-hua¹, HONG Bo², ZHAO Min², ZHAO Chun-jie² (1. School of Altitude Vocational, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT Objective To evaluate the bioavailability and pharmacokinetics of two preparations of calcium folinate in healthy volunteers. **Methods** The randomized, crossed-over study was conducted in 18 healthy volunteers. After a single dose of administration (containing 90 mg calcium folinate dispersed tablets), the plasma levels of medicines were determined by HPLC. The AUC_{0-12} of both forms were compared by variance analysis and two-way one-sided t test. **Results** The main pharmacokinetics parameters of test and reference preparation were as followed: t_{max} were (1.5 ± 0.0) h and (1.5 ± 0.0) h, C_{max} were $(2\ 295.51 \pm 368.93)$ $ng \cdot mL^{-1}$ and $(2\ 139.53 \pm 189.67)$ $ng \cdot mL^{-1}$, $t_{1/2}$ were (2.19 ± 0.16) h and (2.23 ± 0.17) h, AUC_{0-12} were $(6\ 202.09 \pm 229.90)$ $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$ and $(6\ 185.32 \pm 191.47)$ $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$, and $AUC_{0-\infty}$ were $(6\ 478.43 \pm 250.69)$ $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$ and $(6\ 478.63 \pm 248.10)$ $ng \cdot mL^{-1} \cdot h$, respectively. **Conclusion** The results showed that the two formulations were bioequivalent. The relative bioavailability of calcium folinate dispersed tablets was $(100.13 \pm 5.39)\%$.

KEY WORDS Calcium folinate; Dispersed tablets; Bioavailability; HPLC

亚叶酸钙(calcium folinate)为抗贫血、解毒药。它可中和叶酸拮抗剂(如甲氨蝶呤)的即时毒性反应,主要用于治疗营养不良、婴儿期、肝病及吸收障碍综合征引起的巨幼红细胞性贫血。本品口服易于吸收,不良反应少,偶见皮疹、荨麻疹或哮喘等变态反应。笔者参

考有关亚叶酸钙测定的有关文献^[1,2],采用高效液相色谱(HPLC)法,以深圳中联制药有限公司生产的亚叶酸钙分散片为参比,对上海华联制药有限公司研制的亚叶酸钙分散片进行研究,18 例健康志愿者采用同体交叉试验方法,测定口服亚叶酸钙制剂后的经时过