

蜂胶对氧自由基和四氧嘧啶致小鼠肝脏损伤的保护作用

曹 炜¹, 尉亚辉², 杨建雄^{1*}

(1. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069)

摘要: 目的 研究蜂胶对氧自由基和四氧嘧啶致小鼠肝脏损伤的保护作用。方法 应用体外和体内法研究了蜂胶对氧自由基和四氧嘧啶致小鼠肝脏损伤的保护作用。结果 体外试验表明, 蜂胶能显著地抑制氧自由基在体外引发的小鼠肝微粒体脂质过氧化反应, 呈现量效关系。体内试验表明, ig 20 mg/kg 蜂胶 24 d, 可以明显抑制四氧嘧啶致小鼠肝脏的损伤作用, 肝匀浆丙二醛 (MDA) 含量显著下降 ($P < 0.01$), SOD、GSH-Px 活力显著低于模型对照组 ($P < 0.01$)。结论 蜂胶醇提液对氧自由基在体外引发的肝微粒体脂质过氧化和四氧嘧啶在体内致小鼠肝脏损伤均有保护作用。

关键词: 蜂胶; 氧自由基; 四氧嘧啶; 肝脏损伤; 保护作用

中图分类号: R 286.55 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)11-0000-00

Protective effect of propolis extract on activity oxygen free radical and alloxan-induced hepatic injury in rat

CAO Wei¹, WEI Ya-hui², YANG Jian-xiong¹

(1. College of Life Science, Shanxi Normal University, Xi'an Shanxi 710062, China; 2. College of Life Science, North West University, Xi'an Shanxi 710069, China)

Key words: propolis; activity oxygen free radicals; alloxan; hepatic injury; protective action

蜂胶是蜜蜂从植物树芽或树杆采集的树胶, 并混入蜜蜂上腭分泌物和蜂蜡而成的树脂状固体物质, 具有抗肿瘤、抗病原微生物、抗病毒以及护肝等作用^[1]。蜂胶的化学成分十分复杂, 目前已从其中分离鉴定出几十种具有活性的有机化合物, 其中酚羟基化合物和黄酮化合物占的比例较大^[2]。体外药理实验表明, 蜂胶醇提物和其中的酚类化合物具有很强的抗氧化作用, 可以淬灭超氧阴离子自由基和羟基自由基^[3]。我们的研究也表明, 蜂胶不仅对氧自由基有抑制作用, 而且对 Fe^{2+} 诱导的低密度脂蛋白氧化修饰也有很强的抑制作用^[4]。本研究进一步以小鼠肝脏为对象, 采用体外和体内两种方法观察了蜂胶醇提物对氧自由基和四氧嘧啶致小鼠肝脏损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料及处理: 蜂胶购于陕西省蜂业公司, 用 95% 乙醇提取并精制, 配置成 10% 的乙醇溶液; 人参购于西安市希望中药堂, 用水浸泡 30 min 之后煮沸, 保持微沸 30 min, 搅拌, 趁热过滤, 药渣再经两次如上处理, 合并滤液, 减压浓缩至膏状, 用前配制

成 0.5 g/mL 的水煎液; 芦丁购于中国药品生物制品鉴定所; 1, 1, 3, 3, -四乙氧基丙烷 (TEP)、谷胱甘肽、5, 5'-二硫硝基苯甲酸 (DTNB) 购于华美生物工程公司, 四氧嘧啶购于 Sigma 公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 动物: ICR 种小鼠, 雌雄各半, 体重 (20 ± 2) g, 由陕西省中医研究院提供。

1.3 方法

1.3.1 小鼠肝微粒体的制备: 参考 Igor B 等人的方法^[5], 将 ICR 小鼠禁食 24 h, 乙醚麻醉, 摘取肝脏, 用 0.9% 生理盐水清洗, 加 3 倍体积的 0.2 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 匀浆, 12 000 g 离心 20 min, 取上清液于 105 000 g 离心 30 min, 取出沉淀物, 用磷酸缓冲液配制成 10 mg 蛋白质/mL 的肝微粒体溶液, 置于 $-20^{\circ}C$ 条件下保存。

1.3.2 蜂胶对超氧阴离子致小鼠肝微粒体发生脂质过氧化的抑制作用: 参考 Beauchamp C^[6] 的方法加以改进, 取肝微粒体溶液 0.1 mL, 加入不同浓度的蜂胶溶液, 混匀, 再加入 1 mmol/L 黄嘌呤, 10 μ mol/L 黄嘌呤氧化酶, 0.1 mmol/L EDTA, 用 2.0

* 收稿日期: 2001-03-12

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目 (2000SM16)

作者简介: 曹 炜 (1969-), 男, 陕西省佳县, 西北大学生命科学学院讲师, 理学博士, 参加 1 项国家自然科学基金项目, 主持 2 项陕西省自然科学基金项目, 在国内外期刊上已发表论文 15 篇, 目前主要从事功能食品的研究与开发工作。

mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.4) 定容至 3.0 mL。25 温育 30 min, 取出后测定其中的 MDA 含量。

1.3.3 蜂胶对 Fenton 反应致小鼠肝微粒体发生脂质过氧化的抑制作用: 取小鼠肝微粒体溶液 0.1 mL, 加入不同浓度的蜂胶溶液, 混匀, 再加入 10 μ mol/L FeSO₄ 和 3 mmol/L H₂O₂, 用磷酸缓冲液 (pH7.4) 定容至 3 mL, 置于 37 温育 15 min, 取出后测定其中的 MDA 含量。

1.3.4 蜂胶对四氧嘧啶致小鼠肝损伤的保护作用^[7]: 取 50 只小鼠, 雌雄各半, 随机分成 5 组, 分别为正常对照组, 模型对照组, 阳性对照组, 蜂胶大剂量组(40 mg/kg 体重) 和蜂胶小剂量组(20 mg/kg 体重), 每组 10 只。正常对照组每天 ig 0.4 mL 水; 模型对照组每天 ig 0.4 mL 水, 24 d 后 ip 四氧嘧啶; 阳性对照组每天 ig 0.4 mL 浓度为 0.2 g/mL 人参水煎液。将各组小鼠按所需的药物和剂量 ig 24 d 后, 禁食 16 h, 再以 120 mg/kg 体重的剂量给模型对照组和各给药组 ip 四氧嘧啶, 1 h 后恢复正常饮食和给药, 3 d 后造模成功, 脱臼处死动物, 摘取肝脏, 用 0.9% 生理盐水冲洗血迹, 迅速冷冻后制成肝匀浆, 测定各项指标。

1.3.5 各项指标的测定: 肝微粒体与肝匀浆脂质过氧化产物 MDA 的测定参考文献^[8]方法; 超氧化物歧化酶(SOD) 采用邻苯三酚自氧化法^[9]; 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 采用文献^[10]方法。

2 结果与讨论

2.1 蜂胶对超氧阴离子自由基致小鼠肝微粒体氧化损伤的抑制作用: 结果见表 1。蜂胶能明显降低肝微粒体 MDA 的含量 ($P < 0.01$), 并呈现量效关系, 表明蜂胶醇提液能抑制超氧阴离子引发的小鼠肝微粒体脂质过氧化反应。

2.2 蜂胶对 Fenton 反应致小鼠肝微粒体氧化损

表 3 蜂胶对四氧嘧啶致小鼠肝脏损伤的保护作用

组别	剂量(μ g/mL)	SOD(μ mol/g 肝脏)	GSH-Px(nmol/mg·min)	MDA(μ mol/g 肝脏)
正常对照	—	5.54 $\pm$ 0.144	80.46 $\pm$ 3.22	812.25 $\pm$ 19.68
模型对照	—	11.53 $\pm$ 0.352*	261.65 $\pm$ 12.56*	2 230.21 $\pm$ 178.52*
人参	0.2 g/mL	5.25 $\pm$ 0.140	104.32 $\pm$ 8.14	1 064.47 $\pm$ 145.85
蜂胶	40	5.63 $\pm$ 0.126	109.97 $\pm$ 14.19	1 033.63 $\pm$ 195.82
	20	6.62 $\pm$ 0.246	204.34 $\pm$ 11.85	1 163.14 $\pm$ 178.68

与正常对照组相比: * $P < 0.01$; 与模型对照组相比: $P < 0.01$

根据 Harman 的自由基理论^[11], 过多的自由基会对机体的许多细胞组分造成损伤, 尤其是肝脏最易遭受自由基的攻击, 导致其发生脂质过氧化。在正常情况下, 机体内有一定数量的自由基, 机体内的 SOD, GSH-Px 以及 CAT 等酶可以有效的清除多余的自

表 1 蜂胶对小鼠肝微粒体 MDA 含量的影响 ($n = 5$)

组别	剂量(μ g/mL)	MDA(nmol/mg)	抑制率(%)
正常组	—	2.745 $\pm$ 0.03	
氧化组	—	7.628 $\pm$ 0.07*	
蜂胶	10	5.824 $\pm$ 0.06	36.94
	20	4.257 $\pm$ 0.12	69.04
	30	3.965 $\pm$ 0.04	75.02
	40	3.476 $\pm$ 0.09	85.03
芦丁	10	6.254 $\pm$ 0.17	28.14
	20	5.243 $\pm$ 0.08	48.84
	30	4.642 $\pm$ 0.13	61.15
	40	3.710 $\pm$ 0.06	80.24

注: 氧化组表示超氧阴离子处理的肝微粒体

与正常组相比: * $P < 0.01$; 与氧化组相比: $P < 0.01$

伤的保护作用: 结果见表 2。Fenton 反应产生的羟基自由基可引起小鼠肝微粒体发生强烈的脂质过氧化, MDA 含量显著高于正常组($P < 0.01$), 预先加入不同浓度的蜂胶可以明显降低肝微粒体 MDA 的含量 ($P < 0.01$), 呈现量效关系。表明蜂胶对羟基自由基致小鼠肝微粒体氧化损伤有显著的保护作用。

表 2 蜂胶对 Fenton 反应致小鼠肝微粒体氧化损伤的保护作用 ($n = 5$)

组别	剂量(μ g/mL)	MDA(nmol/mg)	抑制率(%)
正常组	—	2.673 $\pm$ 0.04	
氧化组	—	10.327 $\pm$ 0.13*	
蜂胶	30	6.407 $\pm$ 0.08	51.22
	40	5.762 $\pm$ 0.15	59.64
	50	4.074 $\pm$ 0.08	81.69
	60	3.637 $\pm$ 0.10	87.41
芦丁	30	8.572 $\pm$ 0.10	22.93
	40	7.257 $\pm$ 0.13	40.01
	50	6.278 $\pm$ 0.07	52.90
	60	5.128 $\pm$ 0.13	67.93

注: 氧化组表示 Fenton 反应致小鼠肝微粒体氧化损伤

与正常组相比: * $P < 0.01$; 与氧化组相比: $P < 0.01$

2.3 蜂胶对上氧嘧啶致小鼠肝损伤的保护作用: 结果见表 3。

四氧嘧啶进入人体内可以产生大量的自由基。

由基, 使自由基基本保持平衡, 但是, 当四氧嘧啶进入机体后产生大量的自由基, 打破了这种平衡, 便刺激机体内 SOD, GSH-Px 等酶活力代偿性升高。蜂胶能显著抑制由四氧嘧啶刺激机体内 SOD 和 GSH-Px 等酶活力代偿性的升高 ($P < 0.01$)。说明

蜂胶可以有效地抑制四氧嘧啶致小鼠肝脏自由基浓度的升高。

机体过量的自由基可以引发生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,产生 MDA 和过氧化脂质,它们的含量变化可以定量反映生物膜如线粒体膜、细胞膜等的受损程度。从实验结果可知,蜂胶给药组和阳性对照组 MDA 的含量远低于模型对照组 ($P < 0.01$),但略高于正常对照组的水平。进一步表明,蜂胶在体内不仅有清除自由基的作用,对自由基引发的膜脂过氧化反应也有抑制作用。

综上所述,氧自由基可以引发小鼠肝微粒体发生脂质过氧化反应,其产物 MDA 的含量明显高于对照组 ($P < 0.01$),蜂胶可以抑制肝微粒体 MDA 含量的升高,表明蜂胶在体外可能通过清除氧自由基来保护肝微粒体。体内试验表明,蜂胶可以有效的抑制四氧嘧啶引发小鼠肝脏自由基的升高,降低肝脏 MDA 的含量,蜂胶对四氧嘧啶致小鼠肝脏损伤有显著的保护作用。我们的研究表明,蜂胶是一种天然、安全的抗氧化剂,对化学物质致肝脏损伤具

有一定的保护作用。

参考文献:

- [1] 王宗伟. 蜂胶的药理作用[J]. 国外医学-植物药分册, 1997, 12(4): 151-156.
- [2] 彭增起, 牛文娟, 常彦红. 蜂胶中的黄酮及类黄酮的保健作用[J]. 中国养蜂, 1996, 4: 14-15.
- [3] Pascual C, Gonzalez R, Torricel R G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals [J]. J Ethnopharmacol, 1994, 41(1-2): 9-13.
- [4] 曹 伟, 尉亚辉. 蜂胶抗氧化作用的研究[C]. 张家界: 第五届全国自由基生物学与自由基医学研讨会论文集汇编, 2000.
- [5] Igor B. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation [J]. Chemical Pharm, 1989, 38(11): 1763-1767.
- [6] Beanchamp C. Superoxide Dismutase: Improved assays and assay applicable gels [J]. Analytical Biochem, 1977, 44: 276-282.
- [7] 钱伯初. 蜂花粉对小鼠体外脂质过氧化的影响[J]. 营养学报, 1989, 11(4): 355.
- [8] 翁玉春, 王荣平. 细胞和细胞膜内过氧脂质的微量测定[J]. 细胞生物学杂志, 1985, 7(3): 54.
- [9] 袁勤生. 临苯三酚自氧化法测定 SOD 活性[J]. 医药工业, 1983, 1: 10-13.
- [10] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [11] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

褐藻多糖硫酸酯的抗凝和纤溶活性

彭 波¹, 许实波¹, 许东晖¹, 赵金华²

(1. 中山大学, 广东 广州 510275; 2. 深圳海王生物工程股份有限公司, 广东 深圳 518054)

摘 要: 目的 研究褐藻多糖硫酸酯(FPS)抗凝血和纤溶激活作用。方法 测定 FPS 对内源性和外源性凝血途径以及纤溶系统的影响。结果 FPS 对内源性和外源性凝血途径均有较强的抑制作用,并且能够增强纤溶系统的活性。小鼠 ip FPS 40, 20, 10 mg/kg 后 30 min 与对照组相比,血凝时间分别延长 1 267%, 302%, 83%。FPS 2.5, 5, 10 mg/mL 使大鼠离体凝血酶原时间比生理盐水对照组分别延长 207%, 1 627%, 4 561%。大鼠 10 mg/kg 舌下 iv 30 min 后取血,用试剂盒测得其能使血浆 t-PA 活性提高达 107%。结论 FPS 具有较强的抗凝血作用,其作用机制可能与肝素类似。

关键词: 褐藻多糖硫酸酯; 抗凝血; 促纤溶

中图分类号: R 286.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)11-1015-00

Anticoagulation and fibrinolysis activity of fucoidan

PENG Bo¹, XU Shi-bo¹, XU Dong-hui¹, ZHAO Jin-hua²

(1. Zhongshan University, Guangzhou Guangdong 510275, China; 2. Shenzhen Neptunus Biotechnique Stock CO., Ltd., Guangzhou Guangdong 518054, China)

Key words: fucoidan (FPS); anticoagulation; fibrinolysis

近代研究表明,存在于多种褐藻中的水溶性硫酸酯多糖具有抗凝血、调血脂和抗肿瘤等活性,

Springer 等人从墨角藻中分离的褐藻多糖硫酸酯在体内和体外实验中都表现出强抗凝活性。这些硫酸酯

收稿日期: 2000-02-27

作者简介: 彭 波(1973-),女,河北省唐山市人,助教,硕士学位。1992 年考入中山大学生物系,1996 年保送攻读本校生理学专业硕士研究生,研究方向为天然产物生理活性研究,1999 年毕业留任生物系动物生理研究室教师,从事基础教学与科研工作。通讯地址:广州市中山大学生命科学学院动物生理教研室,邮编: 510275