

性欲冷淡是肾阳虚证主症之二,该症定位于肾,是由肾阳虚衰,精失而藏所致^[3]。本实验考察了生殖器官指数。结果,海马 4 个提取物均能提高小鼠囊腺指数,水提取物和石油醚提取物能提高辜丸指数。这些作用可能与海马甘温入肾,能温补肾阳、填精益肾,从而改善性欲冷淡症状有关。

畏寒肢冷是肾阳虚证的主症之三,该症是阳虚证的一般表现,表现为四肢发冷^[3]。海马水提取物和石油醚提取物能提高小鼠肛温,这可能与海马性温,能温阳散寒,改善畏寒肢冷症状有关。

精神萎靡是肾阳虚证次证之一,喜静不喜动为阳虚的一般表现^[3]。海马水、石油醚、正丁醇提取物均能增加小鼠自主活动次数,这可能与海马性温,能温补阳气,从而改善精神萎靡状态功能有关。

肾阳虚水泛为兼证,常以血清 Cr、UR 水平升高反映该证^[4]。结果,海马 4 个提取物均能降低 UR 水平,这可能与海马性温、归肾经,能温阳行气利水,从而改善阳虚水泛有关。

由于肾精亏虚及肝气虚弱导致化血无力、肝不

藏血,最终致使血液亏虚^[3]。血液学指标结果显示,海马的 4 个提取物能不同程度升高 RBC、Hb、PLT;水和石油醚提取物还可升高 WBC、LY、MO。这些作用可能与海马甘温入肝肾,能补肾填精,温阳补血,从而改善化血无力、肝不藏血有关。

海马不同提取物的上述药理作用,说明海马甘温、归肝肾经,则能改善肾阳虚证之腰膝酸软、性欲减退、畏寒肢冷、精神萎靡、阳虚水泛,以及肾精亏虚、肝气虚弱所致血液亏虚。这些药效学研究结果可认为是海马甘、温、归肝肾经的主要药效群。海马水提取物和石油醚提取物的作用较为接近且较强,这为其甘、温、归肝肾经共同药效群的药效物质群提供了启示。

参考文献:

- [1] 田代华. 实用中药辞典 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2005.
- [2] 苗明三, 朱飞鹏. 常用医药研究动物模型 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2007.
- [3] 印会河, 童 瑶. 中医基础理论 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2007.
- [4] 赵洪钧. 三种小鼠“肾虚”模型的生化指标比较研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1997, 3(5): 60-61.

蛹虫草菌丝体醇提物对氢化可的松致小鼠肝损伤的保护作用

施明珠^{1,2}, 李有贵², 钟 石², 樊美珍¹, 计东风^{2*}

(1. 安徽省微生物防治重点实验室, 安徽 合肥 230036; 2. 浙江省农业科学院, 浙江 杭州 310021)

摘要:目的 研究蛹虫草菌丝体醇提物对外源性糖皮质激素氢化可的松致老龄小鼠肝损伤的治疗作用,并对其进行机制进行探讨。方法 ICR 雄性老龄小鼠随机分为对照组,模型组和蛹虫草菌丝体醇提物低、中、高剂量 (0.167、0.334、0.668 g/kg) 组。除对照组外各组均 im 氢化可的松 (25 mg/kg) 造模,实验结束时测定小鼠肝组织丙二醛 (MDA) 水平及 ATP 酶 (Na^+ , K^+ -ATP、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性;同时通过光镜观察小鼠肝组织结构病理变化。结果 蛹虫草菌丝体醇提物可显著提高模型小鼠肝组织 ATP 酶、SOD 和 GSH-Px 活性;降低脂质过氧化物 MDA 水平;减轻氢化可的松引起的肝组织病理损伤。结论 蛹虫草菌丝体醇提物对氢化可的松致小鼠肝脏损伤具有明显的保护作用。

关键词:蛹虫草; 氢化可的松; 肝损伤

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)02-0262-04

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link, 又称北冬虫夏草,是一种传统的名贵中药材,具有抑制肿瘤、增强免疫力、抗氧化、抗疲劳、抗炎等多种药理作用^[1,2]。大量临床和实验结果表明,虫草及虫草菌丝体对化学性、免疫性、病毒性等肝损伤具有一定程度的保护作用^[3]。现代药理学研究发现,外

源性糖皮质激素氢化可的松造成的动物模型,其病理改变集中发生在肝、肾、心、脾、肺等器官。因此,本实验以老龄模型小鼠为对象,对小鼠肝脏中一些相关生化指标进行测量,结合小鼠肝脏病理变化,探讨人工蛹虫草菌丝体醇提物对外源性糖皮质激素氢化可的松致老龄小鼠肝损伤的治疗作用及其可能机制,为进

* 收稿日期:2008-05-05

基金项目:浙江省重大国际科技合作项目资助 (2004C14009)

作者简介:施明珠 (1982—),男,江苏淮安人,硕士研究生,主要从事虫生真菌研究。

*通讯作者 计东风 Tel: (0571) 86404288 E-mail: shimingzhu2005@126.com

一步推动蛹虫草资源的开发利用提供依据。

1 材料

1.1 药物:将活化的蛹拟青霉液体菌种 Pm12 (浙江省农业科学院提供)接种至 1 000 mL 培养瓶中,接种量 5 %,摇床黑暗中培养 8 d (温度 25 ℃,转速 120 r/min),抽滤并收集菌丝体,蒸馏水冲洗 3 次后烘干至恒质量,粉碎,经 3 倍体积 50 % 乙醇 100 浸提 5 h,12 000 ×g 离心 10 min,取上清液冻干,得到蛹虫草菌丝体醇提物 (含虫草素 54.2 %,含虫草多糖 33.6 %)。氢化可的松注射液 (购自山西晋新双鹤药业有限责任公司,批号 200504223)。

1.2 实验动物及环境:清洁级雄性 ICR 小鼠,10 月龄,体质量 (36 ±3) g,由浙江省医学科学院实验动物中心提供,动物饲养合格证号:浙医动字 2003001。环境清洁级,温度 (25 ±2) ℃、相对湿度 50 %~70 %、自然光照、自由取食与饮水。

1.3 主要试剂及仪器:超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和 ATP 酶 (Na^+ , K^+ -ATP、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP) 测试盒购于南京建成生物工程研究所。U-3010 型紫外分光光度计 (日本, HITACHI 公司); Leica-DM2500 微生物显微镜 (德国, Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组和处理:小鼠正常饲养 1 周后,取 75 只随机分为 5 组 ($n=15$):即对照组,模型组和蛹虫草菌丝体醇提物低、中、高剂量 (0.167、0.334、0.668 g/kg) 组^[4]。各给药组按 10 mL/kg ig 给药,对照组和模型组 ig 等量生理盐水,每天 1 次。每次给药 1 h 后除对照组外各组均 im 氢化可的松 25 mg/kg 造模^[5],对照组以等量生理盐水代替,连续 7 d。第 8 天停止造模,各给药组继续给药至第 30 天。

2.2 ATP 酶、GSH-Px、SOD 和 MDA 的检测:小

表 1 蛹虫草菌丝体醇提物对氢化可的松致肝损伤小鼠肝脏 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶、SOD、GSH-Px 及 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of ethanol extract of *C. militaris mycelia* on activities of Na^+ , K^+ -ATPase, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase, SOD, and GSH-Px as well as MDA level in liver tissue of hydrocortisone-induced liver injury mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	Na^+ , K^+ -ATP 酶/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	GSH-Px/ (U · mg ⁻¹)	SOD/ (U · mg ⁻¹)	MDA/ (mmol · mg ⁻¹)
对照	-	2.54 ±0.25	2.16 ±0.18	661.49 ±32.31	224.57 ±8.87	2.51 ±0.44
模型	-	1.34 ±0.08 **	1.12 ±0.06 **	563.17 ±30.01 **	185.65 ±14.75 **	3.52 ±0.66 **
蛹虫草菌丝体	0.167	1.69 ±0.14 **	1.54 ±0.09 **	590.58 ±40.17 **	221.71 ±6.03	2.63 ±0.29
提取物	0.334	2.21 ±0.48 *	1.93 ±0.14 *	623.93 ±16.91 **	223.69 ±7.27	2.55 ±0.38
	0.668	2.46 ±0.21	2.13 ±0.12	652.43 ±25.46	220.75 ±6.77	2.73 ±0.46

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; $P<0.01$ vs model group

鼠处死后取部分肝脏,用冷生理盐水冲洗,制备成 10 % 肝组织匀浆,ATP 酶、GSH-Px、SOD 和 MDA 定量测定均按照试剂盒说明书检测。

2.3 肝脏病理变化观察:取小鼠肝左叶,10 % 中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察。

2.4 统计分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析,组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 小鼠肝脏 Na^+ , K^+ -ATP 与 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性变化:由表 1 可知,氢化可的松可导致小鼠肝脏 Na^+ , K^+ -ATP 与 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性显著降低。蛹虫草菌丝体醇提物可明显提高肝脏中这两种 ATP 酶的活性。与模型组相比,各给药组 Na^+ , K^+ -ATP 与 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性均有明显的提高。高剂量组 (0.668 g/kg) 的 Na^+ , K^+ -ATP 和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性与对照组相比无明显差异,而低、中剂量组显著低于对照组 ($P<0.01$ 、 0.05)。

3.2 小鼠肝脏 GSH-Px、SOD 活性及 MDA 水平的变化:模型组小鼠肝脏 GSH-Px 和 SOD 活性明显下降,MDA 水平显著升高。经蛹虫草菌丝体醇提物治疗后,与模型组相比,各给药组 GSH-Px 和 SOD 活性均明显提高,而 MDA 水平明显下降 ($P<0.01$)。与对照组相比,高剂量组 (0.668 g/kg) GSH-Px 活性无显著差异性,其余各组 GSH-Px 活性仍显著低于对照组 ($P<0.01$)。各给药组 SOD 活性及 MDA 水平与对照组相比无差异显著性,见表 1。

3.3 小鼠肝组织病理变化:病理检查结果显示,对照组小鼠肝组织结构完整,无变性、坏死,肝小叶结

构清晰,肝索排列整齐,细胞核清晰,肝窦正常。模型组小鼠肝小叶结构紊乱,肝索排列紊乱,细胞间无明显分界,肝窦瘀血,肝细胞广泛性空泡变性,部分肝细胞呈典型的气球样变。给药低剂量 (0.167 g/kg) 组肝小叶结构有一定程度恢复,细胞排列紊乱,

局部肝细胞肿大,空泡和疏松,肝窦瘀血程度减轻。中剂量 (0.334 g/kg) 组肝小叶结构清晰,肝索、肝窦无明显异常,细胞浆着色均匀,无明显变性,细胞核结构较清晰。高剂量 (0.668 g/kg) 组肝小叶结构有所恢复,肝细胞损伤明显轻于模型组。见图 1。

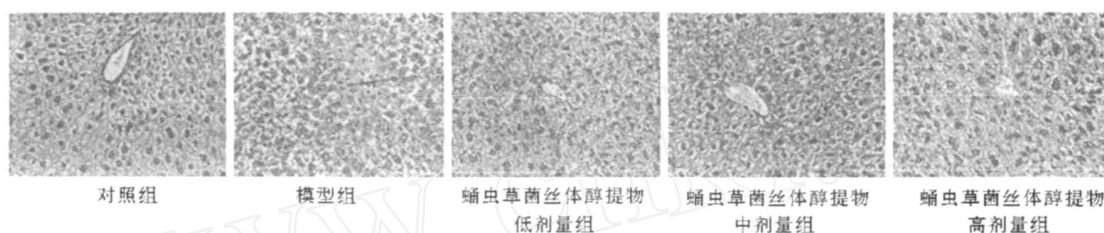


图 1 蛹虫草菌丝体醇提物对氢化可的松致肝损伤小鼠肝组织病理改变的影响

Fig. 1 Effect of ethanol extract of *C. militaris* mycelia on pathological changes in liver tissue of hydrocortisone-induced liver injury mice

4 讨论

皮质激素氢化可的松造模是应用最广泛的造模方法,大量的实验研究表明皮质激素动物模型几乎全身所有系统均产生变化,造成模型机体代谢水平下降,免疫功能下降,广泛的器官病理损害,脂质过氧化物增加和自由基清除系统功能低下等。本实验从肝组织理学和肝组织化学两方面说明小鼠肝损伤造模成功。肝脏是机体进行物质和能量代谢的一个重要的器官,肝细胞膜的损伤是肝细胞乃至整个肝脏器官病变的一个重要的原因,因为细胞膜是维系细胞正常物质能量代谢的一个重要的结构。 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶与细胞代谢及细胞膜正常功能有着密切的关联,它们不仅维持细胞内外的渗透压平衡及跨膜电化学梯度,也调节细胞的体积和驱动某些细胞中的糖和氨基酸的运送,并维持细胞膜的正常功能^[6]。本实验研究发现,与对照组相比,模型小鼠肝组织 Na^+ , K^+ -ATP 酶与 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性明显降低,经虫草菌丝体醇提物治疗后有所恢复,暗示虫草菌丝体醇提物对氢化可的松引起的肝损伤小鼠细胞代谢及细胞膜生理功能有恢复调节作用。

脂质过氧化是机体分子氧在氧化代谢过程中形成的活性氧中间产物,对生物膜磷脂中多不饱和脂肪酸攻击引起的细胞损伤过程^[6]。SOD、GSH-Px 和 MDA 是反映机体脂质过氧化水平的 3 个重要的指标,SOD 和 GSH-Px 是机体内两个重要的抗氧化酶,而脂质过氧化终产物 MDA 能与蛋白质的巯基反应,被修饰的蛋白质和酶将失去生物活性,导致代谢异常^[6]。本实验发现,模型小鼠肝组织 SOD、GSH-Px 活性显著下降,MDA 水平显著升高,脂质

过氧化作用加剧,而虫草菌丝体醇提物可明显提高 SOD 及 GSH-Px 的活性,降低 MDA 水平,从而减轻了因脂质过氧化加剧而造成的肝细胞损伤。此外,研究发现 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性抑制是由于超氧化物、氢氧基及其他自由基的大量形成,并通过泛肽结合系统造成的^[7,8],因此脂质过氧化水平的降低也可能是模型小鼠 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性恢复的一个重要原因。脂质过氧化的直接结果是膜不饱和脂肪酸减少,膜脂的流动性降低,而氢化可的松引起小鼠脂质过氧化加剧,从而使膜蛋白处于永久性缔合状态,进一步限制了膜蛋白在膜平面上的运动性,这可能是细胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶活性降低的另一个原因^[6]。同时,肝脏组织病理观察结果表明,蛹虫草菌丝醇提物可明显减轻氢化可的松引起的肝细胞浊肿、脂肪变性及炎症反应等病理变化,从形态学角度对其药理作用提供了依据。

参考文献:

- [1] 林群英,宋 斌,李泰辉. 蛹虫草研究进展 [J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 154-157.
- [2] Ahn YJ, Park S J, Lee S G, et al. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 2744-2748.
- [3] 成 亮,徐平湘,唐 玉. 中国拟青霉对小鼠免疫性肝损伤的保护作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(3): 318-320.
- [4] 张念志,干静云,张一萌. 参七虫草胶囊对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺功能的影响 [J]. 中国中医急诊, 2006, 15(9): 1007-1008.
- [5] 皋 聪,王传社,巫冠中. 苁蓉总苷对氢化可的松致肾虚小鼠学习记忆功能的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(5): 330-332.

- [6] 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 第3版. 北京:高等教育出版社,2002.
- [7] Comellas A P, Dada L A, Lecuona E, et al. Hypoxia-mediated degradation of Na⁺, K⁺-ATPase via mitochondrial reactive oxygen species and the ubiquitin-conjugating system [J].

Circ Res, 2006, 98(10): 1314.

- [8] Fuller W, Parmar V, Eaton P, et al. Cardiac ischemia causes inhibition of the Na⁺, K⁺-ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress [J]. Cardiovasc Res, 2003, 57(4): 1044.

木贼大孔树脂提取物对单个核细胞-内皮细胞黏附的影响

李丽玮,黄伟,李云峰,甄艳军,张莉,侯建明*

(河北医科大学基础课教学部,河北石家庄 050091)

摘要:目的 探讨木贼大孔树脂提取物对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的单个核细胞-内皮细胞黏附的作用及其可能的机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC),大孔吸附树脂分离法获取木贼提取物,用不同质量浓度的木贼大孔树脂提取物作用于ox-LDL诱导的ECV304细胞12 h,观察人单个核细胞与内皮细胞的黏附及ECV304细胞的IL-8和VCAM-1蛋白表达,并通过RT-PCR观察IL-8和VCAM-1的基因表达。结果 高、中、低剂量(100、50、25 μg/mL)的木贼大孔树脂提取物均显著抑制ox-LDL诱导的单个核-内皮细胞的黏附,下调ox-LDL诱导的ECV304细胞IL-8和VCAM-1蛋白和基因的表达,以中剂量(50 μg/mL)效果最明显。结论 木贼中总黄酮和总酚酸是木贼抗动脉粥样硬化(AS)的有效部位之一,两者抑制IL-8和VCAM-1的基因及蛋白表达可能是其抑制单个核-内皮细胞黏附及抗AS的机制之一。

关键词:木贼;内皮细胞;血管细胞黏附分子;氧化低密度脂蛋白;白细胞介素-8;动脉粥样硬化

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)02-0265-04

单核细胞及淋巴细胞向动脉内膜黏附、迁移是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)早期炎症反应的特征事件,抑制单个核细胞与内皮细胞间黏附是抗AS的重要机制。研究表明木贼 *Equisetum hiemale* L. 具有包括抗AS等多方面的药理活性,但对其抗AS有效部位的研究少有报道。本实验采用乙醇回流提取,大孔吸附树脂分离法初步提取木贼中的有效部位总黄酮和总酚酸,作用于氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC),观察有效部位对单个核细胞-HUVEC黏附及白细胞介素-8(IL-8)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)表达的影响,为研究木贼抗AS的有效部位及作用机制提供依据。

1 材料

木贼药材(购于石家庄市乐仁堂大药房,经河北医科大学中医学院中药系鉴定),槲皮素和阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号0080-9705、0773-9910),D101型大孔树脂(天津大均科技开发有限公司),人脐静脉内皮细胞株ECV304(武汉大学中国动植物细胞保藏中心),新生小牛血

清(杭州四季青公司),DMEM培养液和胰酶(Gibco公司),淋巴细胞分离液(北京鼎国生物技术公司),白细胞介素-8(IL-8)放射免疫分析药盒(北京普尔伟业生物科技有限公司),VCAM-1鼠抗人单克隆抗体、羊抗鼠FITV-IgG二抗工作液(美国Santa Cruz公司),TRIzol试剂和PCR试剂盒(北京天根公司),其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 木贼大孔树脂提取物的制备:称取适量木贼于圆底烧瓶中,加12倍量70%乙醇浸泡2 h,回流提取3次,滤过,合并滤液。大孔树脂40 g经适当处理后湿法装柱,将滤液上树脂柱,先以水冲至洗脱液近无色后(Molish反应阴性)分别用蒸馏水、30%乙醇、70%乙醇洗脱,收集70%乙醇洗脱液,分别以槲皮素、阿魏酸作为对照品测定总黄酮和总酚酸,结果木贼大孔树脂提取物中含黄酮36.62%、酚酸26.66%。将70%乙醇洗脱液减压浓缩后,用无血清培养基DMEM配制,加入二甲基亚砜(DMSO,终体积分数为5%)使其充分溶解,此为用于本实验的木贼大孔树脂提取物(以下简称木贼提取物)。

* 收稿日期:2008-04-07

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划项目(06276102D—28)

作者简介:李丽玮(1980—),女,河北省邢台市人,硕士,研究方向为中药防治动脉粥样硬化的基础研究。

Tel: (0311) 86265219 E-mail: losingangle567@163.com

*通讯作者 侯建明 E-mail: houjianming@mail.china.com