



王春花,张云龙.锦灯笼多糖对 CCl_4 诱导的急性肝损伤小鼠的保肝活性[J].黑龙江农业科学,2019(9):111-114,120.

锦灯笼多糖对 CCl_4 诱导的急性肝损伤小鼠的保肝活性

王春花,张云龙

(牡丹江师范学院 生命科学与技术学院,黑龙江 牡丹江 157000)

摘要:为促进锦灯笼的深加工与药物利用,试验把小鼠随机均分为6组,即正常组,模型组(体积分数0.1%的 CCl_4 溶液, $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),锦灯笼多糖低、中、高剂量组($100, 200, 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,以体质量计)、联苯双酯组($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。连续给药7 d后,观察各组小鼠的肝脏组织病理学特征,并对肝功能以及肝脏抗氧化指标进行检测。结果表明:与模型组小鼠比较,锦灯笼多糖组小鼠肝代谢酶 ALT、AST、ALP 的含量降低,SOD 活性增高,对 MDA 的含量有所抑制,对比联苯双酯组治疗效果,高剂量的锦灯笼多糖保护作用显著。说明锦灯笼多糖对 CCl_4 诱导的急性肝损伤小鼠有保护作用。

关键词:锦灯笼多糖;肝损伤;小鼠;保肝

中药锦灯笼为多年生茄科植物酸浆(*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast) Makino), 又称酸浆、红姑娘、挂金灯等,宿萼味苦,果实味甘、微酸,性寒,原产于中国^[1],美洲、韩国和日本等国也有分布^[2],在我国除西藏外,各地均有分布。锦灯笼常用于治疗咳嗽、痰浊、咽炎、咽痛、排尿困难、天疱疮和湿疹^[3]。锦灯笼多糖是锦灯笼的主要活性成分之一,研究显示锦灯笼多糖具有调节免疫,改善肠道菌群,降血糖血脂等作用^[4-7]。研究表明,中药及食物中的多糖类化合物在肝脏疾病的治疗中具有明显的疗效^[8-10],多糖类药物研究已成为当今防治肝病的热点之一。本研究旨在研究锦灯笼多糖对四氯化碳(CCl_4)诱导的急性肝损伤小鼠的保护作用,为锦灯笼的深加工与利用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 42 只健康清洁级昆明小鼠(6 周龄、雄性),由牡丹江师范学院实验动物中心提供。试验动物饲养在温度为 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$,12 h 光照/12 h 黑暗的小鼠饲养室内。

1.1.2 主要试剂 锦灯笼(购于牡丹江市农贸市场,经鉴定符合中华人民共和国药典锦灯笼标

准);HE 与油红 O 组织染色试剂盒(购于江苏绿叶生物科技有限公司),MDA 与 SOD 试剂盒(购于碧云天生物技术有限公司),联苯双酯滴丸(购自北京协和制药厂), CCl_4 等有机试剂(购自天津市永大化学试剂有限公司)。

1.1.3 主要仪器 冷冻切片机(HM500 型,沈阳恒松科技),生化分析仪(U-8021A 型,桂林优利特有限公司),酶标仪(SAF-680T 型,上海巴玖有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 锦灯笼多糖的制备 称量锦灯笼干燥果实 3 kg,料液比 1:15 加水浸泡 2 h,于 80°C 条件下超声提取 1 h,提取 2 次后合并提取液过滤,70%乙醇沉淀, 60°C 真空干燥,干燥物水溶液反复冻融,离心除蛋白,冷冻干燥。

1.2.2 小鼠分组与给药方案 42 只雄性小鼠按随机原则分为 6 组,各分组均为 7 只,设为正常组、模型组、锦灯笼多糖(PAPS)高剂量组($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、锦灯笼多糖中剂量组($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、锦灯笼多糖低剂量组($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和联苯双酯组($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。以上药物处理组均采用灌胃给药,正常组和模型组给予等剂量生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。末次给药 16 h 后,除正常组,其他各组小鼠腹腔注射 0.1% CCl_4 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,所有程序遵循中国小动物保护协会的要求。

1.2.3 样本采集与处理 小鼠腹腔注射 CCl_4 24 h 后,称量各组小鼠体质量,记录。摘眼小鼠球取血,室温放置 30 min 后, 4°C 条件下 $1500 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ 离

收稿日期:2019-03-13

基金项目:黑龙江省教育厅科研备案项目(1352MSYQN)。

第一作者简介:王春花(1984-),女,博士,讲师,从事非酒精性脂肪性肝病发病机制及防治药物研究。E-mail:swxwch@126.com。

心 10 min,取上清液为检测用血清。小鼠采血后颈椎脱臼处死,解剖小鼠暴漏肝脏观察拍照,称肝脏湿重后,肝组织切块,一部分肝组织块放于 4%多聚甲醛固定,OCT 包埋,其余组织与 OCT 包埋块均冻于-80℃保存。

1.2.4 测定项目及方法 观察并记录各组小鼠被毛的光泽程度和精神状态。根据测定的各组小鼠体质量与肝脏湿重,计算肝脏指数,小鼠肝脏指数计算公式如下:

小鼠肝脏指数(%)=[肝脏湿重(g)/体质量(g)]×100

肝脏组织病理学的变化:取肝组织 OCT 包埋块制备肝组织冰冻切片(厚度:8 μm),经 HE 染色试剂盒染色后,于光镜下观察各组小鼠肝脏组织形态变化。

小鼠血清生化指标及肝脏抗氧化指标的检测:采用丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST)和碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒经生化分析仪检测血清中 ALT,AST 和 ALP 含量。按超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)检测试剂盒方法制备肝组织匀浆液,取上清液检测肝脏组织内 SOD 和 MDA 含量。

1.2.5 数据分析 实验中数据采用统计软件 SPSS 13.0 分析与处理,实验结果以平均值±标准误差表示,组间经 *t* 检验分析组间差异显著性,*P*≤0.05 代表组间差异显著,*P*≤0.01 代表组间差异极显著。

2 结果与分析

2.1 锦灯笼多糖对 CCl₄ 诱导的肝损伤的小鼠体重与肝指数的影响

由表 1 可知,对比正常组小鼠,模型组小鼠体

质量降低,肝湿重和肝脏指数均增高。与模型组小鼠对比,联苯双酯组小鼠体质量升高,肝湿重和肝脏指数均降低,锦灯笼多糖低和高剂量组小鼠体重升高,锦灯笼多糖低、中和高剂量组小鼠肝湿重和肝脏指数均有所降低,高剂量锦灯笼多糖对 CCl₄ 诱导的小鼠体质量、肝湿重及肝脏指数变化的影响作用高于中、低剂量,但各组数据间差异均不明显。

表 1 锦灯笼多糖对急性肝损伤的小鼠体重与肝脏指数的影响

Table 1 Effects of PAPS on body weight and liver index of acute liver injury mice			
组别 Group	体重 Body weight/g	肝湿重 Freshliver weight/g	肝脏指数 Liver index/%
正常组	38.77±1.65	1.79±0.34	4.92±0.48
模型组	35.83±1.42	2.07±0.40	5.78±1.18
联苯双酯组	36.90±1.92	1.85±0.23	5.00±0.07
锦灯笼多糖高剂量组	36.00±1.36	1.86±0.13	5.16±0.41
锦灯笼多糖中剂量组	35.73±1.23	2.01±0.17	5.62±0.50
锦灯笼多糖低剂量组	35.90±1.70	2.04±0.24	5.67±0.40

2.2 锦灯笼多糖对 CCl₄ 诱导的肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 和 ALP 活性的影响

由表 2 可知,对比正常组,模型组小鼠血清 ALT、AST 和 ALP 均显著增高。与模型组比较,联苯双酯组小鼠血清 ALT、AST 和 ALP 显著或极显著降低,锦灯笼多糖低、中、高剂量组小鼠血清 ALT、AST 和 ALP 均有不同程度的降低。锦灯笼多糖高剂量组 ALT 和 AST 极显著低于模型组和 ALP 显著低于模型组,锦灯笼多糖中剂量组 ALT 和 AST 极显著低于模型组,锦灯笼多糖低剂量 AST 也极显著低于模型组。

表 2 锦灯笼多糖对小鼠血清中 ALT、AST 和 ALP 的影响

Table 2 Effects of PAPS on ALT,AST and ALP in mice serum (U·L⁻¹)

组别 Group	ALT	AST	ALP
正常组	43.43±4.65	69.75±5.41	94.00±8.09
模型组	364.41±28.10**	491.21±34.12**	166.50±19.81**
联苯双酯组	121.32±8.81##	113.76±10.33##	110.43±13.23#
锦灯笼高剂量组	95.44±8.93##	83.70±6.75##	126.01±6.63#
锦灯笼中剂量组	132.6±14.32##	118.91±12.72##	147.91±10.61
锦灯笼低剂量组	355.55±27.71	120.52±9.88##	149.90±16.47

与正常组比较,**P*≤0.05,***P*≤0.01;与模型组比较,#*P*≤0.05,##*P*≤0.01。下同。
Compared with the normal group,**P*≤0.05,***P*≤0.01; compared with the model group,#*P*≤0.05,##*P*≤0.01. The same below.

2.3 锦灯笼多糖对 CCl₄ 诱导的肝损伤小鼠的肝组织中 SOD 和 MDA 含量的影响

由表 3 可知,与正常组比较,模型组小鼠 MDA 含量极显著增高,与模型组小鼠对比,联苯双酯组小鼠 MDA 含量极显著降低,锦灯笼多糖低、中、高剂量组小鼠 MDA 含量均有不同程度的降低,锦灯笼多糖高剂量组小鼠 MDA 含量降低极显著。与正常组比较,模型组小鼠 SOD 的含量显著降低。与模型组比较,联苯双酯组小鼠 SOD 含量极显著升高,锦灯笼多糖低、中、高剂量组小鼠 SOD 含量均有不同程度的升高,锦灯笼多糖高剂量组小鼠 SOD 含量升高显著。

2.4 锦灯笼多糖对 CCl₄ 诱导的肝损伤小鼠肝脏组织病理的影响

2.4.1 小鼠肝脏外观形态 如图 1 所示,正常组小鼠肝脏表面光滑,颜色为暗红色,发亮,质感柔软;模型组小鼠肝脏色泽偏白,体积增大,质感较硬,有大面积的出血与坏死点;联苯双酯组肝脏表

面光滑,颜色为暗红色,有少量出血点。锦灯笼多糖低剂量组肝脏表面光滑,色泽偏白,可见少量出血点,质感硬。锦灯笼多糖中剂量组与高剂量组肝脏表面光滑,颜色为暗红色,无明显出血点,质感柔软。

表 3 锦灯笼多糖对小鼠肝组织 MDA 和 SOD 的影响

Table 3 Effects of PAPS on MDA and SOD in mice liver		
组别 Group	MDA/ (nmol·mg ⁻¹)	SOD/ (U·mg ⁻¹)
正常组	0.57±0.12	68.49±14.08
模型组	1.03±0.06 **	43.06±4.55 *
联苯双酯组	0.46±0.03 ##	74.99±10.34 ##
锦灯笼高剂量组	0.52±0.04 ##	75.39±19.02 #
锦灯笼中剂量组	0.84±0.29	66.98±23.68
锦灯笼低剂量组	0.99±0.26	47.90±1.03

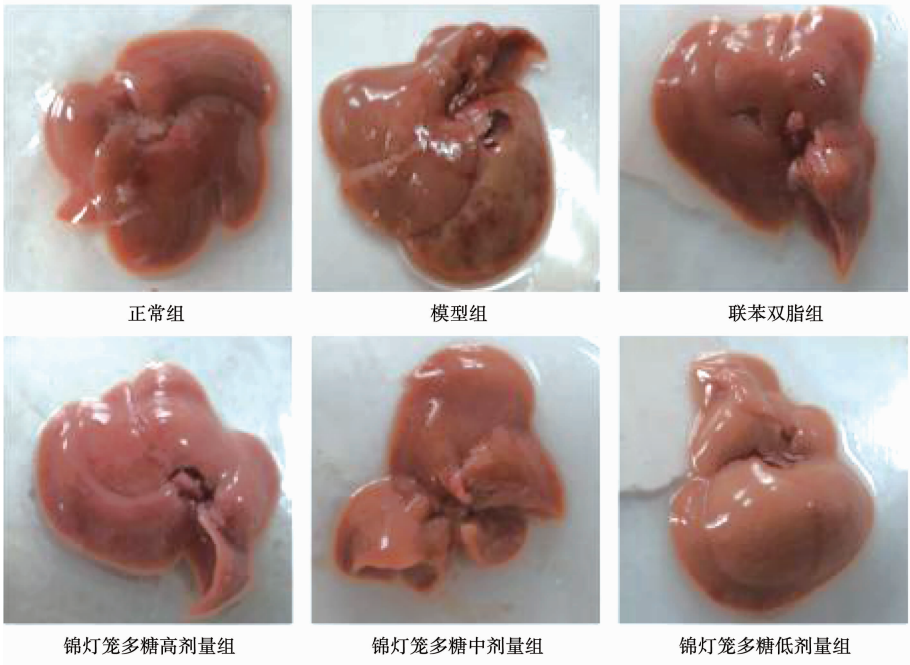


图 1 小鼠的肝脏形态
Fig. 1 Mice liver morphology

2.4.2 小鼠肝组织细胞形态 如图 2 所示,正常组小鼠肝小叶和肝细胞索结构完整,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状分布,形态清晰完整,无坏死细胞。模型组小鼠肝小叶结构和肝细胞索紊乱,中央静脉呈现不规则及附近细胞结构被破坏,

细胞出现片状坏死,炎性细胞浸润。联苯双酯组和锦灯笼多糖组均能明显减轻 CCl₄ 导致的小鼠肝细胞坏死以及改善肝组织形态结构的不完整,锦灯笼多糖高剂量组肝小叶和肝细胞索结构基本完整。

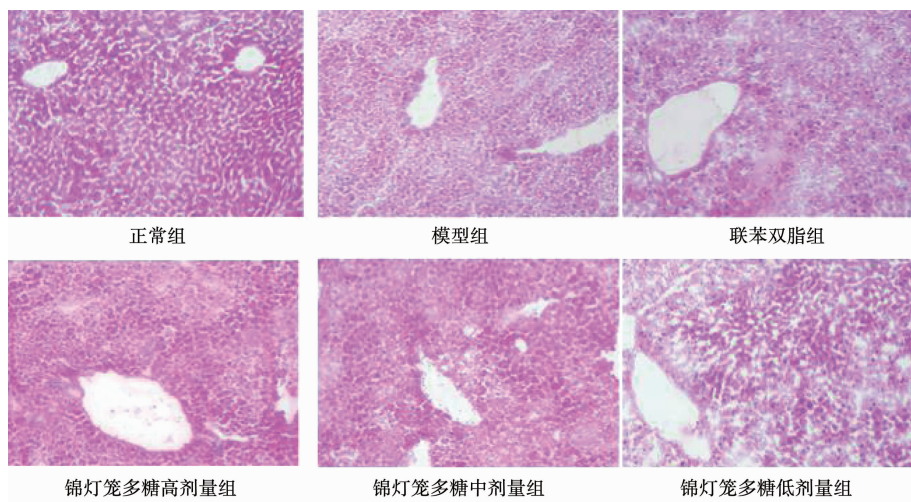


图 2 小鼠的肝组织显微结构

Fig. 2 Mice liver tissues microscopic structure(HE,100×)

3 结论与讨论

CCl_4 诱导的肝损伤模型是研究急性肝损伤的典型模型^[11]。腹腔注射 CCl_4 可诱导小鼠形成肝损伤模型, 不仅对肝细胞造成实质性损伤, 还可引起肝功能障碍。直接观察整体肝脏外观和经过染色的肝组织细胞的肝脏病理观察是直接反映肝损伤的重要试验, 在临床和其他的相关试验中肝脏病理在判断肝损伤程度上也是极其重要的判断依据。本研究通过肝脏病理观察发现不同剂量的锦灯笼多糖干预 7 d 后, 注射 CCl_4 后小鼠肝脏损伤的程度均明显下降。链式过氧化物反应和自由基的出现是 CCl_4 诱导肝损伤的主要因素。肝损伤会引起血清中肝代谢酶的指标升高, 通过检测 AST、ALT 和 ALP 的含量变化就可以检测到病变活动性和实质性损伤。赵欣等^[12] 报道苦丁茶多酚提取物对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤具有保护作用, 小鼠在 CCl_4 注射 16 h 后, 模型组小鼠 ALT、AST、ALP 和 MDA 含量显著增高, SOD 的含量显著降低, 苦丁茶多酚提取物组小鼠 ALT、AST、ALP 和 MDA 的含量降低, SOD 含量升高。本试验同样选择检测 ALT、AST、ALP、SOD 和 MDA 含量, 进一步确定锦灯笼多糖对小鼠肝损伤的保护作用。结果显示, 对比模型组, 锦灯笼多糖组小鼠中 ALT、AST、ALP 和 MDA 含量降低, SOD 含量升高, 锦灯笼多糖高剂量组接近联苯双酯组, 研究结果与 Zhao 等^[6] 报道的锦灯笼多糖对糖尿病小鼠肝损伤的保肝结果基本一致。试验可初步确定锦灯笼多糖对小鼠肝损伤具有保护作用。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 67 卷第一册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 117-126.
- [2] Zhang C H, Wang Z T, Yang Y P, et al. A novel cytotoxic neophysalin from *Physalis alkekengi* var. *francheti* [J]. Chinese Chemical Letters, 2009, 20(11): 1327-1330.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [4] Guo Y, Li S J, Li J X, et al. Anti-hyperglycemic activity of polysaccharides from calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti* Makino on alloxan-induced mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99: 249-257.
- [5] Li X L, Yang G, Zhang G L, et al. Improvement of intestinal microflora balance by polysaccharide from *Physalis alkekengi* var. *francheti* [J]. Molecular Medicine Reports, 2014, 9: 677-682.
- [6] Zhao X, Chen Z Y, Yin Y L, et al. Effects of polysaccharide from *Physalis alkekengi* var. *francheti* on liver injury and intestinal microflora in type-2 diabetic mice[J]. Pharmaceutical Biology, 2017, 55(1): 2020-2025.
- [7] 侯新影. 锦灯笼果实多糖通过小鼠树突状细胞表面 TLR4 增强免疫作用机制的研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2017.
- [8] 王磊, 许小敏, 卢志伟, 等. 当归多糖防护 X 线辐射对大鼠肝脏损伤的研究[J]. 中草药, 2017, 48(20): 4284-4288.
- [9] 陈玉胜, 陈全战. 灵芝多糖对 CCl_4 诱导的急性肝损伤小鼠的抗炎和保肝活性[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 210-215.
- [10] 刘晴. 枸杞多糖对 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化的保护作用及机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [11] Jamshidzadeh A, Fereidooni F, Salehi Z, et al. Hepatoprotective activity of *Gundelia tourenfortii* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 101(1-3): 223-237.
- [12] 赵欣, 李贵节, 胡园园, 等. 苦丁茶多酚提取物对四氯化碳诱导小鼠肝损伤的改善作用及机制研究[J]. 食品工业科技, 2017, 39(4): 289-295.

(下转第 120 页)

Isolation and Identification of *Pseudomonas* sp. H8 with Flocculant-producing Capacity and Analysis of the Flocculant Components

HAN Xiao-yun^{1,2}, ZHENG Gui-hua^{1,2}, ZHENG Bao-jiang³, WANG Yun-lai^{1,2}, LIU Yang^{1,2}, KANG Chuan-hong^{1,2}, LI Xiu-liang^{1,2}, SUN Qing-shen^{1,2}

(1. Engineering Research Center of Agricultural Microbiology Technology, Ministry of Education, Heilongjiang University, Harbin 150500, China; 2. Key Laboratory of Microbiology in Universities of Heilongjiang Province, School of Life Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 3. School of Life Sciences, Northeast Forestry University Harbin 150040, China)

Abstract: The use of bioflocculants for the treatment of sewage and sludge has such advantages as environmentally friendly and no secondary pollution. Therefore, the exploitation of flocculants-producing strains, especially those that produce flocculants at low temperature, has important significance theoretically and application prospects. In this study, the strain named H8 with efficient flocculation activities was isolated and purified from the low-temperature sewage treatment biofilm, the flocculation effect towards kaolin suspension was also evaluated. The strain grew well at 4 °C, and its LB fermentation broth showed 85.79% flocculation efficiency towards kaolin. The H8 strain was characterized with colony and cell morphology, physiological and biochemical tests, Biolog strain identification system analysis and bacterial 16S rDNA sequence analysis, which showed close relation to *Pseudomonas mandelii* and identified as *Pseudomonas*. The flocculants in the H8 strain-derived fermentation broth was extracted by ethanol precipitation with flocculants yield of 0.807 g·L⁻¹ after the protein removal by sewage method. The flocculation rate was also increased to 98%. Qualitative and quantitative analysis confirmed that the chemical constituents of H8 flocculants were mainly composed of polysaccharides which accounted for 51% (w/w), protein (2.64%, w/w), glucuronic acid (1.3%, w/w) and a small amount of amino sugar.

Keywords: low temperature flocculants-producing bacteria screening; strain identification; strain H8-derived flocculants; component analysis

(上接第 114 页)

Hepatoprotective Activity of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* Polysaccharides on Carbon Tetrachloride-induced Acute Liver Injury of Mice

WANG Chun-hua, ZHANG Yun-long

(School of Life Science and Technology, Mudajiang Normal University, Mudanjiang 157000, China)

Abstract: In order to promote the further processing and drug utilization of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii*, mice were randomly divided into six groups: normal control group, acute liver injury model group (0.1% (V/V) CCl₄, 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹, low, medium and high-dose PAPS groups (100, 200 and 400 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and bifendate group (150 mg·kg⁻¹·d⁻¹). After administration for 7 continuous days, the histopathological characteristics of liver were observed, and liver function and liver antioxidant index were detected, the results showed that compared with acute liver injury model group, PAPS significantly decreased the levels of ALT, AST and ALP, restrain SOD activity, and enhanced MAD content. Conclusion: PAPS have effects of hepatoprotective on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice.

Keywords: *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* polysaccharides; liver injury; mice; hepatoprotective