



导读 由于近年来,集约化、工厂化水产养殖方式的迅速发展,养殖产量的提高及抗生素等抗菌药物的使用,使养殖用水体日益恶化,水产品药物残留居高不下,这不仅威胁到水产养殖本身,水产养殖动物病害越来越严重,同时还威胁到人们的身心健康。本文研究叶下珠提取物外的抗氧化和保肝作用。采用叶下珠水提取物、75%乙醇提取物、95%乙醇提取物体外对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子($\text{O}_2\cdot^-$)的清除和抑制 H_2O_2 诱导小鼠红细胞氧化溶血性等方法来研究叶下珠的抗氧化活性。和体外培养法获取罗非鱼的原代肝细胞,用 CCl_4 对肝细胞建立体外损伤模型,研究叶下珠水提取物、75%乙醇提取物、95%乙醇提取物对丙氨酸转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)活力的影响。叶下珠水提取物对羟自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子($\text{O}_2\cdot^-$)的清除和抑制 H_2O_2 诱导小鼠红细胞氧化溶血性最强。加药组丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶活性显著低于损伤组,差异极显著($p<0.01$)。叶下珠提取物具有明显的体外抗氧化和保肝作用。为叶下珠在水产养殖上应用提供依据。

叶下珠提取物体外抗氧化和保肝作用

郑秀青

(厦门大学医学院 361005)

由于近年来,集约化、工厂化水产养殖方式的迅速发展,养殖产量的提高及抗生素等抗菌药物的使用,使养殖用水体日益恶化,水产品药物残留居高不下,这不仅威胁到水产养殖本身,水产养殖动物病害越来越严重,同时还威胁到人们的身心健康。叶下珠,为大戟科植物(*Phyllanthus urinaria* L.),药用全草,别名苦味叶下

珠、珍珠草、叶后珠、老鹤珠、细叶珍珠等。具有清热利尿、平肝明目、消积、解毒、止泻的功效。对体外抗四氯化碳损伤肝细胞具有明显的保护作用。本文就观察叶下珠提取物体外抗氧化和对四氯化碳损伤罗非鱼肝细胞保护作用,为叶下珠在水产养殖上应用提供依据。

于福州回春药店,经鉴定为 *Phyllanthus urinaria* L.。

罗非鱼购自洪山桥下,重量在 50g~100g 之间,清洁级昆明小鼠,体重约 18g~22g,购自福建医科大学试验动物中心。

实验试剂与仪器:四氯化碳分析纯为国药集团化学试剂有限公司,邻二氮菲、硫代巴比妥酸、三氯乙酸分析纯为沈阳市试剂三厂,RPMI1640 为 GIBCO 公司产品,新生小牛血清为三利生物制品公司产品,胰酶为 Amresco 公司产

材料和方法

材料

实验药材与动物:叶下珠购买

作者简介:郑秀青(1979-),女,硕士研究生,助理实验师,主要从事动物实验。

品,丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶均购于南京建成生物工程公司;GALAXYRCO2培养箱(英国Rsbioitech),旋转蒸发器RE-52AA(上海亚荣生化仪器厂)。

方法

提取物的制备

各取100g于50℃恒重的叶下珠粉碎,分别用95%乙醇、75%乙醇和水回流提取3次,过滤,合并滤液,减压浓缩成浸膏至干。将提取物用蒸馏水稀释成1mg/mL和10mg/mL浓度备用。

叶下珠提取物对·OH自由基消除率的测定

在试管中分别加入2mL pH7.4磷酸盐缓冲液,1mL 0.75mol/L邻二氮菲无水乙醇溶液,充分混匀后,加入1mL 0.75mmol/L硫酸亚铁溶液,加入后立即混匀。然后向试管中加入1mL浓度为1mg/mL的叶下珠提取物供试样溶液,未损伤管和损伤管加1mL蒸馏水,混匀,再加入1mL 0.01% H₂O₂,未损

伤管不加H₂O₂。于37℃水浴保温60min,然后在510nm测定吸光值,重复三次,计算其平均值。

$$\cdot\text{OH清除率}(\%) = \frac{A_2 - A_1}{A_1 - A_0} \times 100\%$$

其中,A₀表示未损伤管的吸光度;A₁表示损伤管的吸光度;A₂表示加叶下珠提取物的吸光度。

叶下珠提取物对H₂O₂诱导红细胞氧化溶血作用的影响

小鼠摘眼球取血,制成抗凝血,3000r/min离心得到红细胞,冷生理盐水洗涤三次,制成0.5%的红细胞悬液。各组取红细胞悬液0.5mL,每组3个平行,加浓度为1mg/mL的叶下珠提取物供试样溶液0.1mL,对照管以生理盐水代替,混匀,最后加入0.3% H₂O₂ 0.1mL启动反应,37℃温育1h后,用4mL生理盐水稀释,3000r/min离心5min,取上清液测定415nm的吸光值OD₄₁₅,计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = (A_0 - A_i) / A_0 \times 100$$

其中,A₀表示对照组的吸光值;

A_i表示各试验组的吸光值。

叶下珠提取物清除超氧阴离子自由基作用的测定(邻苯三酚自氧化法)

0.05 mmol/L Tris-HCl (PH=8.2)于25℃水浴保温10min,在10mL具有塞子试管中依次加入3.0 mL 0.05 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (PH=8.2),0.5 mL 30 mmol/L 邻苯三酚和1.0 mL 叶下珠提取物供试样溶液,混匀后置于恒温水浴中,25℃反应5min,立即加入1mL 8mol/L HCl 终止反应;空白组加入1.0mL的蒸馏水。于325nm处,每隔30s测一次吸光值(A)。反应时间为4min,滞后30s。计算每分钟吸光值的增值,空白对照管的结果为邻苯三酚的自氧化速率。对照的自氧化速率需控制在0.06-0.08 O.D./min。空白

(上接93页)本试验所采用的中药材具有广泛的功能。穿心莲(Herba Andrographitis),具抗菌消炎作用,常用于畜禽鱼细菌性感染疾病防治(袁宗辉,2001),此外还具有显著增强肉鸡的体液免疫和细胞免疫功能(胡宇莉等,2006a;2006b)。广东土牛膝(Eupatorium Chinense Linn),具抗菌、中和毒素、抗炎和镇痛作用(刘晓燕等,2004)。从1955年广东新会老中医黄华庭公布他用广东土牛膝治疗白喉有效后,广东珠三角地区掀起一股研究应用广东土牛膝治疗咽喉疾病的热潮,大大促进了此本地资源的利用(田素英等,2006)。大青叶属于具有清热解毒免疫调节作用的饲用中草药(袁宗辉,2001),具广谱抗菌活性(张

连同等,2002;郑剑玲等,2003),还具有抗病毒作用(刘盛等,2000)。锁阳(Herba Cynomorii)是一种补阴药,通过阳生阴长,用于阳虚病证中(汪运富等,1999),属于补肾壮阳催情类饲用中草药,具有雌激素样作用,促进体液免疫(袁宗辉,2001),还能增加肠蠕具润肠通便作用(王珏,1996)。淫羊藿(Herba Epimedii)具有雄性激素样作用,用作免疫增强剂以提高畜禽生产性能和增强畜禽抗病力(袁宗辉,2001)。葫芦巴(Semen Trigonellae)含催乳成分但无任何性激素作用,具致泻效果(袁宗辉,2001)。由于本文所用的单味中药原料都具广泛的功能,可能它们之间的配比例有较大变化时会产生不同的应用效果,而本文组方

中各原料配比例变化较小,所以这3种复方不一定就是最好的可促进肉鸡生长的中药复方。

在筛选复方时,应针对不同动物的不同生理阶段特点和应用目的来科学合理组方,如对育肥猪,应选择健胃消食、活血散瘀、安神镇静的药物为主;对奶牛、奶羊等泌乳动物,则应以活血化瘀,促进新陈代谢及与泌乳有关激素分泌,增强乳腺发育和促进泌乳药物为主;对蛋鸡宜选用平补消食类的药为主,这种药对其生产性能有促进作用(孙耀华等,2000)。

我国中草药资源丰富,应大力挖掘中医中药宝库,以研究开发出对不同动物的不同生理阶段各有适宜的抗生素替代品。

参考文献(略)■



对照组以相同体积的蒸馏水代替样品，每次重复3次，求得平均值；

计算清除率 = (A 空白 - A 样品) / A 空白 × 100%

罗非鱼肝细胞的培养

在无菌条件下取出罗非鱼肝脏，迅速取出肝脏置于高压过后的培养皿中，用含有青霉素和链霉素的 Hanks 液漂洗，去除血污。于青霉素小瓶中，用锋利的解剖剪将肝组织剪成约 1cm³ 左右的小块。用质量分数为 0.25% 胰蛋白酶 29℃ 消化 30min。加入小牛血清 1mL 终止消化，消化得到的细胞悬液经 200 目尼龙网过滤，加无血清的 1640 培养液，低速离心，并反复洗 2 次，最后用 20% 新生牛血清的 1640 培养液制成细胞悬液，0.4% 台盼蓝计数显示肝细胞成活率在 90% 以上。按 1 × 10⁵ 个细胞/mL 的密度接种于 96 孔培养板，置于 29℃ 培养箱中培养。4h 后换液，以后每隔 2d 换液一次，定期在倒置显微镜下观察。

叶下珠提取物对四氯化碳损伤罗非鱼肝细胞的影响

试验设 3 个组，分为正常组、损伤组、各提取物加药组。将上述肝细胞悬液加入 96 孔无菌培养板

中。每孔 150μL，每个孔 8 个重复，放入培养箱中培养。第 3d 损伤组细胞用含有 10mmol/L 四氯化碳培养液培养 4h。各提取物加药组预先加叶下珠提取物干预 1h 后，再换成含有 10mmol/L 四氯化碳培养液，继续培养 4h，收集上清液用来测丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶活性。

指标的检测方法采用南京建成研究所所提供的试剂盒测定样品中的丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)，按说明书操作。

试验结果采用 DPS6.85 软件进行统计学处理，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验方法。

结果与分析

叶下珠提取物是一种很强的抗氧化剂，有很强的清除羟基自由基的能力。以水提取物为最强，其抑制率为 90.9%，说明清除自由基的主要活性成分溶在水中，其次 95% 乙醇提取物为 48.4% 和 75% 乙醇提取物为 35.6%。叶下珠提取物抑制 H₂O₂ 诱导红细胞氧化溶血作用，其中水提取物的抑制率最高，为 20.5%，95% 乙醇提取

物为 17.8% 和 75% 乙醇提取物为 16.7%。水提取物清除超氧阴离子的能力最强，清除率为 62.5%。说明其具有良好的清除超氧阴离子自由基的能力。95% 乙醇提取物清除率为 21.3%，75% 乙醇提取物 40.2%。结果见表 1。

叶下珠提取物对四氯化碳损伤肝细胞丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶活性的影响。由表 2 数据可以看出损伤组的丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶活性较正常组明显升高，而经过叶下珠提取物预先处理过的加药组，其丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶活性显著低于损伤组，有极显著差异 (p < 0.01)。

讨论

叶下珠同种方法提取物在不同体系中的抗氧化效果不完全相同，不同方法的提取物在同一体系中的抗氧化效果也存在差异。

转氨酶活性是肝细胞损伤的敏感指标，肝细胞损伤时，其细胞膜通透性发生改变，转氨酶从肝细胞内泄漏到培养基中，其活性的高低与肝实质细胞受损的程度一致。我们的结果显示：叶下珠对体外罗非鱼肝细胞具有保护作用。

参考文献 (略)

表1 叶下珠提取物的抗氧化作用

待测物	抗氧化体系		
	Fenton体系 清除率 (%)	H ₂ O ₂ 诱导红细胞氧化溶血体系 抑制率 (%)	邻苯三酚自氧化体系 清除率 (%)
水提取物	90.9 ± 1.01	20.5 ± 0.25	62.5 ± 0.40
95%乙醇提取物	48.4 ± 0.36	17.8 ± 0.31	21.3 ± 0.35
75%乙醇提取物	35.6 ± 0.53	16.7 ± 0.31	40.2 ± 0.35

表2 肝细胞上清分泌 AST 和 ALT 的含量

组别	谷丙转氨酶	
	(卡门单位)	(卡门单位)
正常组	50.38 ± 3.40	61.75 ± 3.20
损伤组	152.88 ± 13.85	129.75 ± 9.19
水提取物	117.25 ± 11.85**	106.88 ± 11.22**
95%乙醇提取物	123.13 ± 14.38**	103.25 ± 9.44**
75%乙醇提取物	121.25 ± 13.56**	110.38 ± 8.68**

注：与损伤组比较，p < 0.01。