

秦岭柴胡不同提取物保肝作用量效关系研究

卫昊^{1*}, 刘清¹, 卫伟光²

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省西安植物园, 西安 710061)

〔摘要〕 目的:探讨两种产地秦岭柴胡不同提取物对 *D*-氨基半乳糖致急性肝损伤小鼠的保护作用,并初步筛选最佳提取工艺和活性部位。方法:将小鼠分为 9 组:空白对照组,半乳糖胺模型组,联苯双酯滴丸(150 mg·kg⁻¹),秦岭柴胡 1 号样品水提组,65% 醇提组,95% 醇提组,秦岭柴胡 2 号样品水提组,65% 醇提组,95% 醇提组。剂量为 5.0 g·kg⁻¹,灌胃给药,给药体积 20 mL·kg⁻¹,模型组和空白组分别灌胃给予同体积生理盐水,每天 1 次,连续给药 7 d 后,采取小鼠腹腔注射 *D*-氨基半乳糖盐酸盐溶液造模,16 h 后眼静脉采血,测定血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性;同时测定肝匀浆中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果:2 种产地秦岭柴胡的水提组、65% 醇提组、95% 醇提组均能不同程度降低 CCl₄ 模型小鼠血清 ALT、AST 活性,降低肝脏 MDA 的含量,增强 SOD 活性,其中以东太白产秦岭柴胡 65% 醇提物作用最强(*P* < 0.01, *P* < 0.05)。结论:秦岭柴胡对 *D*-氨基半乳糖盐酸盐所致小鼠急性肝损伤具有较明显的保护作用,其保肝作用与柴胡皂苷 a、d 含量存在一定的量效关系。

〔关键词〕 秦岭柴胡; *D*-氨基半乳糖盐酸盐; 保肝作用
〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0237-04
〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0910.008.html>
〔网络出版时间〕 2012-10-12 9:10

Experimental Study on Dose-effect Relationship of Hepatoprotective Effect of the Different Extraction from *Bupleurum longicaule* var. *giraldii*

WEI Hao^{1*}, LIU Qing¹, WEI Wei-guang²

(1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;
2. Xi'an Botanical Garden of Shaanxi Province, Xi'an 710061, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To discuss protective effect of different extractions of two origin *Bupleurum longicaule* var. *giraldii* on acute liver injury in mice caused by intraperitoneal injection (ip) *D*-galactosamine, and to screen the optimum process and the active site of extraction. **Method:** The mice were divided into 9 groups: control group, model group, galactosamine group, bifendate group (150 mg·kg⁻¹), water extraction group, 65% ethanol extract group, 95% ethanol extract group of *B. longicaule* var. *giraldii* sample No. 1 and No. 2, delivery 20 mL·kg⁻¹ by intragastric administration (ig). Model group and control group were given normal saline by ig once a day with the same dose. After continuous administration of 7 days, model of mice were made by intraperitoneal injection of *D*-galactosamine hydrochloride solution, and after 16 hours, ocular venous blood were collected to determine the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities and the malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity in liver homogenate. **Result:** Two origin of *B. longicaule* var. *giraldii* on aqueous extraction group, 65% ethanol group and 95% ethanol group showed that they all could decrease the serum ALT and AST activity in model, reduce the content of liver MDA and increase the SOD activity, and the 65% ethanol extract of *B. longicaule* var. *giraldii*

〔收稿日期〕 20120713(006)
〔基金项目〕 陕西省教育厅科学研究计划项目(2010JK499);咸阳市科技发展计划项目(2010-K14-02(5))
〔通讯作者〕 * 卫昊,讲师,从事中药药理学研究,Tel:13992011980, E-mail: weihao217@163.com

gathered from East Taibai Mountain had the strongest effect ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** *B. longicaule* var. *giraldii* has obvious protective effect on *D*-galactosamine hydrochloride induced acute liver injury in mice. There is a dose-effect relationship between its hepatoprotective effect and saikosaponin a, d content.

[**Key words**] *Bupleurum longicaule* var. *giraldii*; *D*-galactosamine hydrochloride; hepatoprotective effect

秦岭柴胡又名金柴胡,为伞形科柴胡属多年生草本植物,属于陕西省重点保护的药用植物种类之一,主产秦岭太白山、光头山及佛坪等地^[1],味苦,性微寒,是陕西秦巴山区民间习用的重要中草药。具有发表祛风、清肝利胆、清心火、通经之功效,主治感冒、虚劳骨蒸、月经不调、肝气不舒、黄疸等症,其在疗效上与柴胡不完全一致,有其独到之处。因秦岭柴胡为区域民间用药,地方使用较为广泛,疗效较为显著,但尚缺乏系统性研究,尤其对其化学成分、药理作用实验研究的文献报道较少^[2-4]。本实验在对其指标成分含量检测研究的基础上,主要对其保肝降酶药理作用进行研究,并初步筛选其制剂提取工艺与最佳药材来源。

1 材料

1.1 药物 秦岭柴胡:1号药材样品于2011年7月采自东太白山(陕西眉县)海拔3400~3500m处;2号药材样品于2011年7月采自西太白山(陕西太白县)海拔3400m左右处。样品经陕西中医学院生药教研室王西芳教授鉴定均为伞形科柴胡属秦岭柴胡(*Bupleurum longicaule* Wall. var. *giraldii* Wolff.),全草入药。称取秦岭柴胡1号、2号样品各250g,分别以水、65%乙醇、95%乙醇为溶剂回流提取2次,第1次加14倍量,第2次加10倍量,每次2h,过滤,合并滤液,回收乙醇并浓缩定容至1000mL即得,质量浓度为生药0.25g·mL⁻¹。联苯双酯滴丸(浙江万邦药业股份有限公司生产,批号110910)。

1.2 试剂 *D*-氨基半乳糖盐酸盐(KAYON公司生产,批号T0016),MDA测试盒(批号20120508),SOD试剂盒(批号30120505),考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(批号20120515),均为南京建成生物工程研究所产品。

1.3 动物 昆明种小鼠,体重(20±2)g,雌雄各半,由西安交通大学医学院实验动物中心提供,许可证号SCXK(陕)2007-001。

1.4 仪器 Waters 2695 Separations Module 高效液相色谱仪(美国Waters公司),UV1102型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),BT224S电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],

YLS-7A 微量进样器(宁波市镇海三爱仪器厂),HH.W21.420型电热恒温水箱(天津市森斯特仪器有限公司)。

2 方法

2.1 秦岭柴胡不同提取物含量测定^[5] 分别取药材提取物浓缩液各2.0mL置于分液漏斗中,以乙醚萃取3次,每次30mL,弃去乙醚层,再向分液漏斗中加入30mL水饱和正丁醇,摇匀,静置30min,分层后分取上层萃取液,重复萃取3次。合并上层萃取液并置于分液漏斗中,加入60mL正丁醇饱和的水溶液洗涤,静置分层后分取上层溶液,重复操作1次,并合并上层液。将得到的上层液在蒸发皿中水浴挥干正丁醇,再以甲醇溶解并定容至2mL即得。采用HPLC法[色谱条件Diamon-sil C₁₈(250mm×4.6mm,5μm),流动相乙腈-水(25:75),流速1mL·min⁻¹,检测波长210nm]分别测定提取物中柴胡皂苷a和柴胡皂苷d的含量。

2.2 秦岭柴胡保肝作用^[6-10]

2.2.1 分组和给药 取小鼠117只,按体重随即分成9组,每组13只,雌性7只,雄性6只。分别为空白对照组、半乳糖胺模型组、联苯双酯滴丸阳性组(150mg·kg⁻¹)、秦岭柴胡1号样品水提组,1号样品65%醇提组,1号样品95%醇提组,秦岭柴胡2号样品水提组,2号样品65%醇提组,2号样品95%醇提组。ig给药,剂量为5.0g·kg⁻¹,给药体积20mL·kg⁻¹,模型组和空白组分别ig给予同体积生理盐水,每天1次,连续给药7d。末次给药1h后,ip10%*D*-氨基半乳糖盐酸盐10mL·kg⁻¹,空白组ip等容量的蒸馏水溶液,禁食不禁水。

2.2.2 检测指标 造模16h后,摘取眼球取血,冷冻离心(3000r·min⁻¹)10min后,取血清检测ALT,AST活性。采血后,快速处死小鼠,取肝右叶组织约0.15g,在冰生理盐水中漂洗,滤纸拭干,置于匀浆器中,加生理盐水在冰水浴中制成10%肝组织匀浆。冷冻离心,取上清液冷藏,待测。按照试剂盒说明配制考马斯亮蓝蛋白测定试剂、MDA测试试剂、SOD测试试剂:用紫外分光光度计分别在595,550,532nm波长下检测组织蛋白,SOD,MDA。

2.3 统计学方法 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用

SPSS 11.0 软件处理分析,组间差异采用 Student's *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 两种产地秦岭柴胡不同提取物含量测定 两种产地秦岭柴胡提取物中以 65% 乙醇提取液柴胡皂苷 a 含量最高,其中秦岭柴胡 1 号样品柴胡皂苷 a 含量明显高于 2 号样品。比较而言各组提取物中柴胡皂苷 d 含量均较低。见表 1。

3.2 对急性肝损伤小鼠血清 ALT,AST 活性的影响 与模型组比较,各给药组均可不同程度降低肝损伤小鼠血清中 ALT,AST 活性。其中以秦岭柴胡 1 号样品(即东太白秦岭柴胡)作用稍强;不同提取物中,2 种产地秦岭柴胡均以 65% 醇提组降低血清

ALT,AST 活性作用最为明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),提示东太白秦岭柴胡 65% 醇提组保肝作用效果最好。见表 2。

3.3 对急性肝损伤小鼠肝匀浆中 MDA 含量和 SOD 活性的影响 与模型组比较,秦岭柴胡各给药组均可不同程度降低模型小鼠肝匀浆中 MDA 水平,增强 SOD 活性。秦岭柴胡 1 号样品即东太白秦岭柴胡水提组和 65% 醇提组均降低小鼠肝组织 MDA 水平,增强 SOD 活性作用明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),整体效果优于 2 号样品即西太白秦岭柴胡,其中以东太白秦岭柴胡 65% 醇提组抗氧自由基作用最佳。见表 3。

表 1 两种产地秦岭柴胡不同提取物中柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 含量 %

样品	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d	柴胡皂苷 (a + d)	柴胡皂苷 (a + d) 平均值
秦岭柴胡 1 号样品水提取物	0.147 6	0.006 1	0.153 7	0.148 0
	0.136 8	0.005 5	0.142 3	
秦岭柴胡 2 号样品水提取物	0.105 7	0.002 4	0.108 1	0.105 6
	0.099 8	0.003 3	0.103 1	
秦岭柴胡 1 号样品 65% 乙醇提取物	0.287 8	0.008 0	0.295 8	0.291 9
	0.279 1	0.008 8	0.287 9	
秦岭柴胡 2 号样品 65% 乙醇提取物	0.220 0	0.001 8	0.221 8	0.222 8
	0.222 0	0.001 7	0.223 7	
秦岭柴胡 1 号样品 95% 乙醇提取物	0.155 4	0.001 9	0.157 3	0.1592
	0.159 3	0.001 8	0.161 1	
秦岭柴胡 2 号样品 95% 乙醇提取物	0.190 3	0.006 0	0.196 3	0.196 3
	0.188 7	0.007 7	0.196 4	

表 2 秦岭柴胡对急性肝损伤小鼠肝脏指数,血清 ALT,AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肝脏指数 /g·100 g ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹
空白	—	3.48 ± 0.44	36.01 ± 11.42 ²⁾	130.62 ± 42.28 ²⁾
模型	—	4.43 ± 0.76	57.07 ± 20.10	229.65 ± 76.79
联苯双酯滴丸	0.15	4.22 ± 0.49	33.76 ± 14.26 ²⁾	175.29 ± 66.57
1 号样品水提液	5	4.03 ± 0.81	43.27 ± 25.62	181.23 ± 73.27
1 号样品 65% 醇提液	5	4.32 ± 0.42	39.99 ± 13.74 ¹⁾	155.43 ± 65.36 ¹⁾
1 号样品 95% 醇提液	5	4.37 ± 0.54	49.79 ± 14.44	182.53 ± 74.51
2 号样品水提液	5	4.10 ± 0.43	53.91 ± 25.06	207.59 ± 67.19
2 号样品 65% 醇提液	5	3.79 ± 0.34	41.76 ± 10.44 ¹⁾	166.37 ± 53.49
2 号样品 95% 醇提液	5	3.81 ± 0.37	42.78 ± 11.15	177.48 ± 37.93

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 秦岭柴胡对急性肝损伤小鼠肝匀浆中 MDA 含量和 SOD 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 13$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	组织蛋白/g·L ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹	SOD/kU·g ⁻¹
空白	—	1.593 ± 0.638	12.86 ± 4.97 ¹⁾	61.07 ± 27.04 ¹⁾
模型	—	1.530 ± 0.785	21.52 ± 8.22	38.34 ± 12.92
联苯双酯滴丸	0.15	1.577 ± 0.459	18.73 ± 3.51	41.87 ± 14.84
1 号样品水提液	5	1.640 ± 0.310	13.46 ± 7.67 ¹⁾	48.25 ± 7.10
1 号样品 65% 醇提液	5	1.440 ± 0.465	13.00 ± 4.10 ¹⁾	55.60 ± 22.06 ¹⁾
1 号样品 95% 醇提液	5	1.253 ± 0.378	16.93 ± 7.25	43.12 ± 15.62
2 号样品水提液	5	1.553 ± 0.604	19.11 ± 5.35	49.12 ± 8.31
2 号样品 65% 醇提液	5	1.587 ± 0.298	17.69 ± 5.15	55.60 ± 30.05 ¹⁾
2 号样品 95% 醇提液	5	1.578 ± 0.372	14.13 ± 7.00	55.88 ± 2.83 ²⁾

注:与模型组相比¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01。

4 讨论

肝损伤改善作用与有效部位(或成分)相关性分析 2 种产地秦岭柴胡 65% 乙醇提取液保肝降酶作用最好,可使四氯化碳/*D*-氨基半乳糖致小鼠急性肝损伤血清 ALT,AST 值明显降低,肝组织匀浆中 SOD 活性明显增强,MDA 含量下降。而从柴胡皂苷含量测定结果可知,1 号样品太白秦岭柴胡 65% 醇提组柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 总和最高,由此可见秦岭柴胡的保肝作用可能与柴胡皂苷含量存在一定的量效关系。

产地对药物作用的影响分析 本次实验所用秦岭柴胡产地分别为陕西眉县太白山(习称东太白)和陕西太白县太白山(习称西太白),两地都属于秦岭山系,药材采集点海拔高度相近,但由于生长地貌、土壤等因素影响,导致所含有效成分和药理作用有所差异,总体而言东太白秦岭柴胡保肝作用明显优于西太白秦岭柴胡,因此可以优选东太白秦岭柴胡为该品种最佳药材来源。

[参考文献]

[1] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志(第 1 卷,第三册)[M]. 北京:科学出版社,1981: 390.
[2] 谢东浩,蔡宝昌,安益强,等. 柴胡皂苷类化学成分及

药理作用研究进展[J]. 南京中医药大学学报,2007, 23(1): 63.
[3] 黄幼异,黄伟,孙蓉,等. 柴胡皂苷对肝脏的药理毒理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(17):298.
[4] 梁云,崔若兰. 柴胡皂苷及其同系物抗炎和免疫功能的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志,1998, 18(7):446.
[5] 刘清,卫昊,王西芳,等. 秦岭柴胡根部柴胡皂苷 a 的含量测定[J]. 现代中药,2011,31(4):70.
[6] 韩燕全,洪燕. 重楼对小鼠急性肝损伤保护作用的研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(1):99.
[7] 王向军. 五味草水提物与醇提物预处理对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 郑州大学学报:医学版, 2012,47(1):49.
[8] 娄猛猛,李国玉,王航宇,等. 四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型的研究[J]. 农垦医学,2010,32(3):196.
[9] 王大平,王敏,王文芳,等. 保利甘胶囊对酒精所致急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(1):65.
[10] 吴诚,吕著海,沈存思,等. 养元饮对酒精性肝损伤大鼠解酒和保肝作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):150.

[责任编辑 聂淑琴]