

杜金梁, 贾睿, 曹丽萍, 等. 桃仁提取物抗四氯化碳诱导建鲤肝组织损伤的试验[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 245–248.

# 桃仁提取物抗四氯化碳诱导建鲤肝组织损伤的试验

杜金梁<sup>1</sup>, 贾睿<sup>1</sup>, 曹丽萍<sup>1</sup>, 张殿新<sup>2</sup>, 殷国俊<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081;

2. 沧州职业技术学院畜牧兽医系, 河北沧州 061000)

**摘要:**研究桃仁提取物对四氯化碳诱导急性肝损伤各项生化指标的影响, 观察其是否有保肝功效。将桃仁提取物分为 3 个不同浓度添加到饲料中饲喂建鲤, 采用四氯化碳制备急性肝损伤模型, 造模 72 h 后处死建鲤并采集血液, 检测建鲤血清中总蛋白(TP)含量、白蛋白(ALB)含量、总抗氧化能力(T-AOC)、丙氨酸转氨酶(GPT)活性、天冬氨酸转氨酶(GOT)活性; 采集肝组织匀浆液上清液, 检测匀浆上清液中超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、丙二醛(MDA)含量、谷胱甘肽(GSH)的含量。结果表明: 1% 桃仁提取物保肝效果较好, 与 CCl<sub>4</sub> 组相比, 可以极显著降低血清中的 GOT 活性( $P < 0.01$ ); 可显著降低血清中 GPT 活性( $P < 0.05$ ); 显著增加血清中 TP、ALB、T-AOC、GSH 的含量( $P < 0.05$ ); 显著增强肝组织匀浆上清液中 SOD、GSH-Px 的活性( $P < 0.05$ ), 显著降低肝组织匀浆上清液中 MDA 的含量( $P < 0.05$ )。桃仁提取物对于 CCl<sub>4</sub> 致肝组织损伤有一定的保护作用, 具有较好的抗氧化功能。

**关键词:** 建鲤; 桃仁提取物; 四氯化碳; 肝损伤

**中图分类号:** S943.116.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0245-04

肝胆综合征是近 2 年在鱼类养殖生产中频繁发生的一种疾病, 其发生受多种因素的影响, 目前关于其发病机制主要归结为 3 类: 一是鱼群养殖密度大, 造成水质恶化, 使鱼群代谢发生障碍, 从而引发该病; 二是在养殖生产中滥用抗生素药物, 造成鱼类的肝损伤; 三是鱼类饲料营养成分缺乏或者变质产生有害物质造成的肝脏病变<sup>[1-2]</sup>。该病还未发现有效的治疗药物, 一些西药如氯霉素、磺胺类、喹乙醇等只是在一定程度上缓解肝损伤, 治标不治本, 而且容易在鱼体内产生耐药性, 造成药物残留, 威胁人类健康。现代药理学研究发现, 中草药桃仁提取物具有增强机体免疫力、保肝护肝、抗菌消炎等功效<sup>[3]</sup>。近些年来, 关于桃仁提取物的研究主要围绕哺乳动物<sup>[4]</sup>, 如徐列明等研究发现桃仁提取物抗四氯化碳所致大鼠肝纤维化作用明显, 显著减少了纤维肝内的纤维间隔, 使肝组织结构修复<sup>[5]</sup>。方美善等对桃仁提取物用于痴呆模型小鼠脑组织研究发现, 桃仁提取物具有明显清除氧自由基和抗氧化功能<sup>[6]</sup>。刘成等研究发现, 桃仁提取物合虫草菌丝对肝炎后肝硬化具有较好的效果<sup>[7]</sup>, 而桃仁提取物在鱼类方面研究国内未见有相关报道。本研究主要以建鲤为研究对象, 以药物 CCl<sub>4</sub> 来模拟建鲤的肝损伤, 从体内探讨中药桃仁提取物是否具有抗四氯化碳引起肝损伤的功效, 以期为临床上研究保

肝中草药药物提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验鱼 试验用建鲤取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心渔场, 体质健康无病, 所取建鲤规格基本一致, 取回后将建鲤饲养于循环水系统中。

1.1.2 试剂和仪器 桃仁提取物, 购自陕西西安应化生物技术有限公司; CCl<sub>4</sub> (分析纯), 购于国药集团化学试剂有限公司; 丙氨酸转氨酶(GPT)、天冬氨酸转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)酶、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒, 购于江苏省南京建成生物工程研究所科技有限公司; 723 分光光度计, 购自上海欣茂仪器有限公司; 酶标仪 MK3, 购于美国 Thermo 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 试验设计 选取 120 条体质健康、规格基本一致的建鲤作为试验对象, 随机将其设为 5 个处理组、1 个对照组, 每组 20 条。I (CCl<sub>4</sub>) 组: 只饲喂基础饲料, 不添加任何药物添加剂, 连续饲喂 60 d 后, 按 0.005 mL/g 体重体内注射 30% CCl<sub>4</sub> (溶于植物油中); II、III、IV (0.1%、0.5%、1% 桃仁提取物) 组: 分别在基础饲料中添加 0.1%、0.5%、1% 桃仁提取物, 连续饲喂 60 d 后, 注射 0.005 mL/g CCl<sub>4</sub> (1 g 体重注射 0.005 mL CCl<sub>4</sub>, 下同); V (1% 桃仁提取物药物对照) 组: 在基础饲料中添加 1% 桃仁提取物, 连续饲喂 60 d 后, 不进行体内 CCl<sub>4</sub> 注射, 按 0.005 mL/g 进行植物油注射; VI (空白对照) 组, 只饲喂基础饲料, 连续饲喂 60 d 后不进行体内 CCl<sub>4</sub> 注射, 按 0.005 mL/g 进行植物油注射。

1.2.2 血清肝功能指标检测 注射 72 h 后, 于建鲤尾静脉采集血液并分离血清, 按照试剂盒说明书测定 TP、ALB 的含

收稿日期: 2013-04-22

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31202002, 31200918); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(编号: 2013JBFM11、2013JBFM12); 江苏省自然科学基金(编号: BK2012535)。

作者简介: 杜金梁(1982—), 男, 河北沧州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事临床药理与药物代谢研究。Tel: (0510) 85558876; E-mail: dujl@ffrc.cn。

通信作者: 殷国俊, 博士, 研究员, 主要从事鱼类免疫和药理研究。E-mail: yingj@ffrc.cn。

量及 T-AOC、GPT、GOT 的活性。

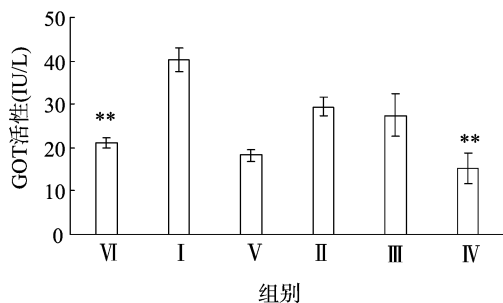
1.2.3 肝组织氧化和抗氧化指标的检测 采集建鲤肝脏,制备肝组织匀浆液,取上清液,按照试剂盒说明书测定 GSH-Px、SOD 的活性及 GSH、MDA 的含量。

1.2.4 统计学处理 数据分析采用 SPSS 16.0 软件包进行处理,采用单因素方差分析 (One-way-ANOVA) 处理,对样本之间进行  $t$  检验,其中  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 桃仁提取物对建鲤血清中 GOT 活性的影响

由图 1 可以看出,与 VI 组相比,经  $\text{CCl}_4$  注射处理后的建鲤血清中 GOT 活性极显著增强 ( $P < 0.01$ )。不同浓度的桃仁提取物处理后,随着浓度的加大, GOT 活性明显减弱,以 1% 桃仁提取物效果最好,与 I 组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ )。V 组无显著变化。



\*、\*\* 表示与  $\text{CCl}_4$  组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )、极显著 ( $P < 0.01$ )。下同。

图1 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤血清中 GOT 活性的影响

### 2.2 桃仁提取物对建鲤血清中 GPT 活性的影响

由图 2 可以看出,与 VI 组相比,经  $\text{CCl}_4$  注射处理后的建鲤血清中 GPT 活性极显著增强 ( $P < 0.01$ )。不同浓度的桃仁提取物处理后,随着浓度的加大, GPT 活性明显减弱;与 I 组相比,0.5%、1% 桃仁提取物均能显著减弱 GPT 活性 ( $P < 0.05$ ),且以 1% 桃仁提取物的效果较好。V 组无显著变化。

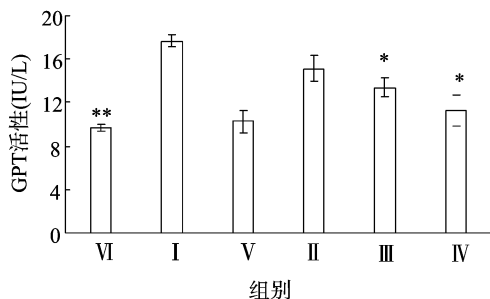


图2 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤血清中 GPT 活性的影响

### 2.3 桃仁提取物对建鲤血清中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性的影响

由图 3 可以看出,与 VI 组相比,经  $\text{CCl}_4$  注射处理后的建鲤血清中 LDH 活性极显著增强 ( $P < 0.01$ )。不同浓度的桃仁提取物处理后,随着浓度的加大, LDH 活性显著减弱;与 I

组相比,0.5% 桃仁提取物能显著减弱 LDH 的活性 ( $P < 0.05$ ),1% 桃仁提取物能极显著减弱 LDH 的活性 ( $P < 0.01$ ),且以 1% 桃仁提取物效果较好;V 组无显著变化。

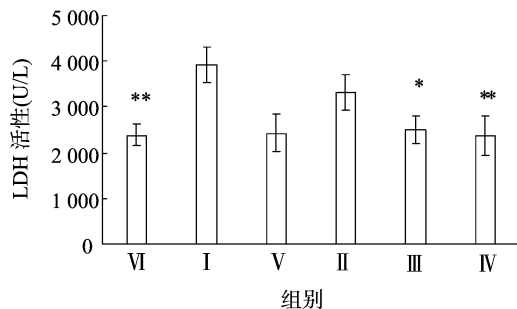


图3 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤血清中 LDH 活性的影响

### 2.4 桃仁提取物对建鲤血清中 TP 含量的影响

由图 4 可以看出,与 VI 组相比,经  $\text{CCl}_4$  注射处理后的建鲤血清中 TP 含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。用不同浓度的桃仁提取物处理后,随着浓度的加大, TP 含量明显增加,以 1% 桃仁提取物效果最好,与 I 组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。V 组无明显变化。

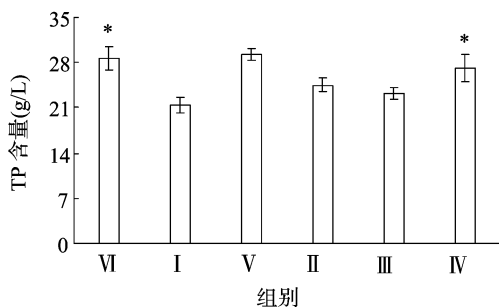


图4 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤血清中 TP 含量的影响

### 2.5 桃仁提取物对建鲤血清中 ALB 含量的影响

由图 5 可以看出,与 VI 组相比,经  $\text{CCl}_4$  注射处理后的建鲤血清中 ALB 含量显著下降 ( $P < 0.05$ )。用不同浓度桃仁提取物处理后,随着浓度的加大, ALB 含量明显增加,且以 1% 桃仁提取物效果较好,与 I 组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。V 组无明显变化。

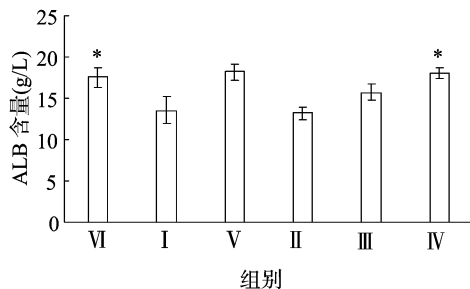


图5 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤血清中 ALB 含量的影响

### 2.6 桃仁提取物对建鲤血清中 T-AOC 的影响

由图 6 可以看出,与 VI 组相比,经  $\text{CCl}_4$  注射处理后的建鲤血清中 T-AOC 显著减弱 ( $P < 0.05$ )。用不同浓度的桃仁提取物处理后,随着浓度的加大, T-AOC 不断增强,且以 1%

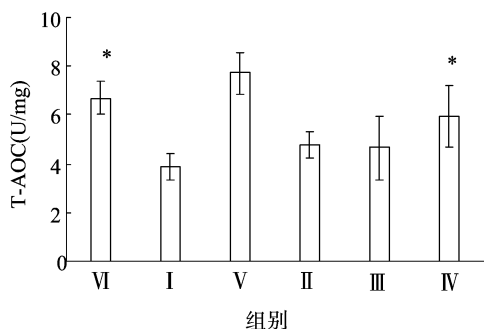


图6 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤血清中 T-AOC 的影响

桃仁提取物效果较好,与 I 组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。V 组无明显变化。

## 2.7 桃仁提取物对建鲤肝组织匀浆上清液中 SOD 活性的影响

由图 7 可见,与 VI 组相比,经  $\text{CCl}_4$  注射处理后的肝组织匀浆液中 SOD 活性显著减弱 ( $P < 0.05$ )。用不同浓度的桃仁提取物处理后,随着桃仁提取物浓度的增加,SOD 活性明显增强,0.1%、1% 桃仁提取物处理的 SOD 活性与 I 组差异显著 ( $P < 0.05$ ),且以 1% 桃仁提取物效果较好。V 组无明显变化。

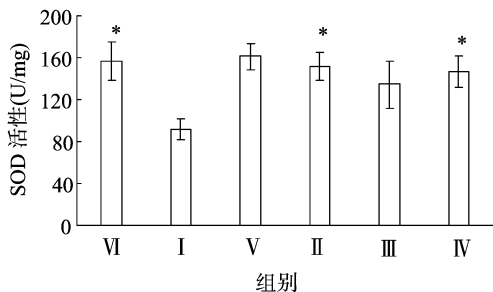


图7 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤组织匀浆上清中 SOD 活性的影响

## 2.8 桃仁提取物对建鲤肝组织匀浆上清液中 GSH-Px 活性的影响

由图 8 可见,与 VI 组相比,经  $\text{CCl}_4$  注射处理后的肝组织匀浆液中 GSH-Px 活性显著减弱 ( $P < 0.05$ ),不同浓度的桃仁提取物处理后,随着桃仁提取物浓度的加大,GSH-Px 活性明显增强,且以 1% 桃仁提取物效果最好,与 I 组相比,能显著增强 GSH-Px 活性 ( $P < 0.05$ )。V 组无明显变化。

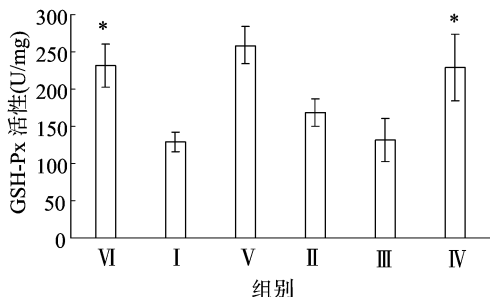


图8 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤组织匀浆上清中 GSH-Px 活性的影响

## 2.9 桃仁提取物对建鲤肝组织匀浆上清液中 GSH 含量的影响

由图 9 可以看出,与 VI 组相比,经  $\text{CCl}_4$  注射处理后的肝

组织匀浆中 GSH 含量显著下降 ( $P < 0.05$ )。用不同浓度的桃仁提取物处理后,随着浓度的加大,GSH 含量明显增加,且以 1% 桃仁提取物效果较好,与 I 组差异显著 ( $P < 0.05$ )。V 组无明显变化。

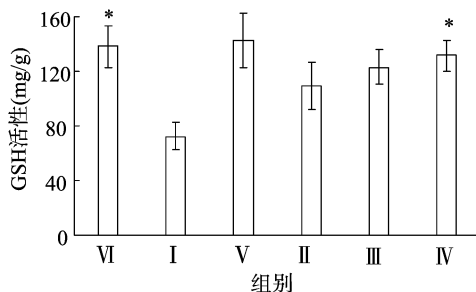


图9 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤组织匀浆上清中 GSH 含量的影响

## 2.10 桃仁提取物对肝组织匀浆上清液中 MDA 含量的影响

由图 10 可以看出,与 VI 组相比,经过  $\text{CCl}_4$  注射处理后的肝组织匀浆液中 MDA 含量显著增加 ( $P < 0.05$ )。用不同浓度的桃仁提取物处理后,随着浓度的加大,MDA 含量明显降低,且以 1% 桃仁提取物效果较好,与 I 组差异显著 ( $P < 0.05$ )。V 组无明显变化。

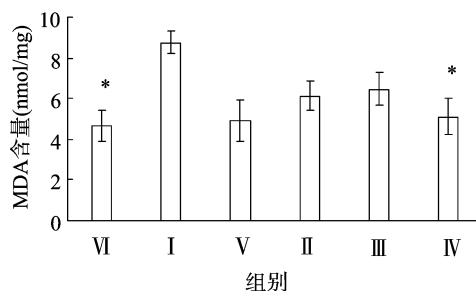


图10 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  肝损伤组织匀浆上清中 MDA 含量的影响

## 3 结论与讨论

### 3.1 $\text{CCl}_4$ 诱导的肝损伤模型的建立

目前,应用化学药物  $\text{CCl}_4$  来制备的肝组织损伤模型<sup>[8-9]</sup>,已经被广泛应用于哺乳动物药物筛选方面,而在水产研究方面相关报道较少。关于  $\text{CCl}_4$  的损伤机制主要是其损害了肝细胞膜系统的稳定性,引起脂质过氧化,导致细胞内的环境发生紊乱,继而出现肝细胞死亡<sup>[10-12]</sup>。马永贵等研究发现,在用  $\text{CCl}_4$  诱导的小鼠急性肝损伤的血清中 GOT、GPT 活性及肝组织的 MDA 含量有所升高,而肝组织的 SOD 活性降低<sup>[13]</sup>。杨生海等研究  $\text{CCl}_4$  诱导小鼠肝损伤后发现 GPT 和 GOT 的活性明显增强<sup>[14]</sup>。在本试验中,与 VI 组相比,经过  $\text{CCl}_4$  进行注射处理后的建鲤血清中 GPT、GOT、LDH 活性均极显著增强 ( $P < 0.01$ );血清中 TP、ALB 的含量及 T-AOC 以及肝组织匀浆中 GSH 的含量显著降低,肝组织匀浆中 GPX、SOD 的活性也显著减弱 ( $P < 0.05$ );肝组织匀浆中 MDA 含量显著增加 ( $P < 0.05$ )。本研究报道的结果与马永贵等报道的结果<sup>[13]</sup>相符,这说明本试验应用  $\text{CCl}_4$  进行造模是成功的,可用于后续试验。

### 3.2 桃仁提取物对 $\text{CCl}_4$ 引起建鲤肝组织氧化和抗氧化指标的影响

GPT、GOT 主要存在于肝细胞线粒体和胞浆中,当肝组织受到  $\text{CCl}_4$  侵害后,GPT 和 GOT 就会从细胞中释放出来,进入血液,因而造成血清中 GPT、GOT 的活性增强。许贞爱等研究桃仁提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用时发现,桃仁提取物能减弱急性肝损伤小鼠血清中 GPT、GOT 活性<sup>[15]</sup>。本试验在饲料中分别添加 3 种不同浓度的桃仁提取物后发现,与 I 组相比,1% 桃仁提取物能极显著减弱血清中 GOT 的活性 ( $P < 0.01$ ),能显著降低血清中 GPT 的活性 ( $P < 0.05$ )。本试验结果与许贞爱等报道的桃仁提取物保肝结果<sup>[15]</sup>相符,这说明桃仁提取物具有一定的抗四氯化碳造成肝组织损伤的作用。

LDH 广泛分布于机体所有组织细胞的胞质内,它主要有 5 种存在形式,即 LDH-1、LDH-2、LDH-3、LDH-4、LDH-5。当肝细胞受到损伤后,肝细胞会向血液中释放大量的 LDH-4、LDH-5,造成 LDH 含量升高<sup>[16]</sup>。因此,本试验中由于  $\text{CCl}_4$  的损伤作用使得肝组织细胞受损,血清中 LDH 含量明显升高;再加入 3 个不同浓度的桃仁提取物后,血清中 LDH 含量发生了显著变化,与 I 组相比,0.5% 桃仁提取物能显著降低 LDH 含量 ( $P < 0.05$ ),1% 桃仁提取物能极显著降低血清中 LDH 含量 ( $P < 0.01$ )。这说明桃仁提取物能起到一定的修复受损肝细胞的作用,并且有随着药物浓度的增加修复能力增强的趋势。

TP 与 ALB 的含量也是用来评价肝组织功能是否正常的重要指标,其高低反映肝组织的受损伤程度。当肝组织受到损伤时,其分泌量就会减少。损伤程度越高,其在肝组织中的含量则越低。而 T-AOC 主要是反映抗氧化水平的一个综合指标,它可以消除自由基,防护机体组织过氧化<sup>[17]</sup>。如果 T-AOC 出现了显著降低的现象,这表明肝组织的抗氧化系统功能可能受到影响。在饲料中分别添加 0.1%、0.5%、1% 桃仁提取物后发现,血清中 TP、ALB 的含量和 T-AOC 显著升高 ( $P < 0.05$ ),但以 1% 桃仁提取物效果最好,且与 I 组相比差异显著,这说明 1% 桃仁提取物具有较好的保肝作用,可以抵抗  $\text{CCl}_4$  所诱导的肝组织损伤。

SOD、GSH-Px、MDA、GSH 是生物机体内很重要的抗氧化酶,SOD、GSH、GSH-Px 主要功能是反映机体清除活性氧自由基的程度,维持生物机体正常的生理活动,而 MDA 含量的变化则反映了机体受氧化损伤的程度<sup>[18-20]</sup>。通常情况下,MDA 和 SOD 或者 GSH-Px 联合使用,一起反映氧自由基对组织的损伤程度。笔者在饲料中分别添加 0.1%、0.5%、1% 桃仁提取物后发现,与 I 组相比,1% 桃仁提取物能显著增强肝组织匀浆中 SOD、GSH-Px、GSH 的活性,降低 MDA 的含量 ( $P < 0.05$ )。由此可见,1% 桃仁提取物对于清除氧自由基及抗肝脏损伤方面有较好的保护作用。

综上所述,1% 桃仁提取物对  $\text{CCl}_4$  所诱导的肝组织损伤有明显的保护作用,效果明显好于 0.1%、0.5% 桃仁提取物处理组,可以有效清除机体内自由基,抑制脂质过氧化,提高机体的抗氧化能力,但其具体机制还有待于进一步研究。本研究结果为后面鱼类保肝药物的开发和利用奠定了很好的基础。

### 参考文献:

- [1] 孟祥林,丁庆秋. 鱼类肝胆综合症的发病原因及防治方法[J]. 水利渔业,2004,24(3):65-65.
- [2] 路典敬. 浅析鱼类肝胆病[J]. 内陆水产,2006,31(9):20-21.
- [3] 修春,李铭源,宓穗卿,等. 桃仁的主要化学成分及药理研究进展[J]. 中国药房,2007,18(24):1903-1904.
- [4] 洪长福,姜金萍,周华仕,等. 桃仁提取物对大鼠实验性矽肺纤维化的影响[J]. 劳动医学,2000,17(4):218-219.
- [5] 徐列明,刘平,刘成,等. 桃仁提取物抗实验性肝纤维化的作用观察[J]. 中国中药杂志,1994(8):491-494,512.
- [6] 方美善,张红英. 桃仁提取物对痴呆模型小鼠脑组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):236-238.
- [7] 刘成,刘平,徐列明,等. 桃仁提取物合虫草菌丝治疗肝炎后肝硬化的观察[J]. 中医杂志,1991(7):20-23.
- [8] 周琼,刘芳萍,刘颖妹,等. 四氯化碳致小鼠急性肝损伤动物模型建立方法的研究[J]. 东北农业大学学报,2012,43(6):77-81.
- [9] 长尾由纪子,叶木荣,赖小平. 实验性肝损伤模型建立的初步探讨[J]. 广西中医药,2006,29(3):47-49.
- [10] 黄正明,杨新波,曹文斌,等. 化学性及免疫性肝损伤模型的方法学研究[J]. 解放军药科学学报,2005,21(1):42-46.
- [11] Zhu R Z, Xiang D, Xie C, et al. Protective effect of recombinant human IL-1Ra on  $\text{CCl}_4$ -induced acute liver injury in mice[J]. World Journal of Gastroenterology:WJG,2010,16(22):2771-2779.
- [12] Yin G, Cao L, Xu P, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Glycyrrhiza glabra* extract against Carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ )-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry,2011,37(1):209-216.
- [13] 马永贵,罗桂花,陈志,等. 小鼠四氯化碳急性肝损伤模型稳定性初探[J]. 青海师范大学学报:自然科学版,2006(1):88-91.
- [14] 杨生海,陈建茂,马磊,等. 大枣渣多糖对  $\text{CCl}_4$  肝损伤小鼠的保护作用[J]. 宁夏医科大学学报,2011,33(9):874-875.
- [15] 许贞爱,张红英,朴惠顺,等. 桃仁提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(2):120-123.
- [16] 夏伟,胡芹芹,熊丽,等. 氯氰菊酯胁迫下鲫鱼肾脏 LDH 同工酶和血清 GOT、SOD 活性的变化[J]. 生态毒理学报,2009,4(1):87-92.
- [17] Jia R, Cao L, Xu P, et al. In vitro and in vivo hepatoprotective and antioxidant effects of *Astragalus polysaccharides* against Carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry,2012,38(3):871-881.
- [18] 曹丽萍,丁炜东,殷国俊. 玫瑰茄水提物对 *t*-BHP 诱导原代培养异育银鲫肝细胞损伤生化指标的影响[J]. 浙江农业学报,2011,23(2):273-277.
- [19] Weifen L, Xiaoping Z, Wenhui S, et al. Effects of bacillus preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry,2012,38(6):1585-1592.
- [20] Morales A E, Pérez-Jiménez A, Hidalgo M C, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver[J]. Comparative Biochemistry and Physiology,2004,139(1/2/3):153-161.