

甘草毛状根体内外抗氧化能力的测定

杜旻 刘峻 丁家宜 陈齐

(中国药科大学中药生物技术研究室, 南京 210038)

摘要: 甘草毛状根是用 Ri 质粒转化甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 细胞后获得的人工培养根器官, 应用化学发光法测定体外 SOD 样活力, 证明甘草毛状根具有较好的抗氧化能力。小鼠体内实验结果表明, 预先口服甘草毛状根水煎剂可使由 CCl₄ 所致的小鼠血清乳酸脱氢酶、谷草转氨酶的升高以及肝内丙二醛含量的增加显著降低, 也能使 CCl₄ 所致的小鼠肝内超氧化物歧化酶的降低显著提高, 其作用呈剂量依赖性。甘草毛状根可减轻 CCl₄ 所致的肝脏坏死, 是值得深入研究与开发利用的人工新资源。

关键词: 甘草; 毛状根; 抗氧化

中图分类号: S567.7⁺1; R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2000)04-0001-04

Antioxidational ability determination of hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *in vitro* and *in vivo*

DU Min, LIU Jun, DING Jia-yi, CHEN Qi (Laboratory of Plant Tissue Culture, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(4): 1~4

Abstract: Hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (HRGU) were transferred by infecting its cell with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 which harboured the agropine-type Ri plasmid. Using chemiluminometry the SOD activity of HRGU was detected. The result proved that it had good effect on antioxidation. The experiment in mice showed that the HRGU could apparently ameliorate the symptom induced by carbon tetrachloride, such as the rising of LDH, GOT, MDA and the reducing of SOD activity. The effects are dose-dependent. It can alleviate the carbon tetrachloride-induced hepatic necrosis. So HRGU is worthy for further to research as an useful artificial new resources.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; hairy roots; antioxidation

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 是我国重要的传统药材之一, 具有清热解毒、补脾和胃及调和诸药等功用。研究证实, 甘草毛状根能合成甘草查尔酮 A、甘草甙、异甘草甙、甘草素、异甘草素等多种黄酮类化合物。已知人体内自由基、脂质过氧化反应是某些药物或毒物产生肝损伤的病理生化基础^[1]。近年来的研究发现甘草及其有效成分具有抗氧化作用^[2], 但通过 Ri 质粒转化后形成的甘草毛状根培养物的体内外抗氧化能力的研究国内外尚未见报道。鉴于 CCl₄ 所致的肝损伤是通过氧自由基而起作用, 故本文研究甘草毛状根在小鼠体内的抗氧化能力; 并利用化学发光法^[3] 测定甘草毛状根体外的抗氧化能力, 以评价甘草毛状根的药用价值。

1 材料与方 法

1.1 动物

昆明种雄性小鼠, 体重 18~22 g, 购自中国药科

大学实验动物中心。

1.2 试剂和药品

甘草毛状根为中国药科大学中药生物技术研究室培养产物。商品甘草购自南京市药材公司, 经中国药科大学张恩汉教授鉴定为甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 的干燥根。净选, 粉碎成粉末, 过 20 目筛。常规水煎 2 次, 100℃ 水浴浓缩至生药量 ρ (生药) = 0.7 g/mL, 使用时以生理盐水稀释至所需浓度。乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒、谷草转氨酶 (GOT) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。 α -Tocopherol (V_E) 为厦门鱼肝油厂产品。实验用其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2000-04-25

作者简介: 杜旻, 女, 1974 年 7 月生, 江苏南京人, 硕士, 主要从事中药生物技术研究。现通讯地址: 上海中医药大学中药研究所, 200032

1.3 方法

1.3.1 体外抗氧化能力测定 称取不同生长天数、相同生长部位、等长的毛状根 0.5 g, 加 0.5 mL pH 7.8 磷酸缓冲液, 破碎细胞, 2 000 r/min 冷冻离心 5 min, 上清液定容至 1 mL, 稀释至上机浓度, 利用智能化学发光仪测定 SOD 样活力^[3]。

1.3.2 体内抗氧化能力测定 小鼠按体重随机分组, 经口服给药, 甘草毛状根处理的 3 组及商品甘草处理的 3 组均分别以 3、6 和 12 g/kg 水煎剂灌胃, Vit E 处理组灌胃 0.4 g/kg, 其余 2 组 (正常对照组与模型组) 分别灌胃等体积生理盐水, 连续 7 d。末次给药 1 h 后, 除正常对照组外, 其余各组均腹腔注射 0.15% CCl₄ 的橄榄油溶液 (0.01 mL/g 体重), 24 h 后眼眶取血, 分离血清 (3 000 r/min, 10 min), 测定血清中的 LDH 和 GOT。处死小鼠, 取 0.5 g 肝组织块, 制成 10% 肝组织匀浆, 分离肝匀浆 (3 000 r/min, 15 min), 测定肝匀浆中的 SOD 和 MDA。剖腹取肝, 常规固定, 制片, HE 染色。根据肝细胞坏死程度及范围分为 5 级: “-”肝细胞无坏死; “±”点状坏死灶; “+”散在灶状坏死, 限于肝小叶内 1/6; “++”散在灶状坏死, 限于肝小叶内 1/4; “+++”弥漫性坏死灶, 限于肝小叶内 1/2。血清及肝匀浆指标采用 T 检验, 病理切片指标采用秩和检验。

2 结果与分析

2.1 甘草毛状根体外 SOD 样活力

甘草毛状根体外 SOD 样活力测定结果见图 1, SOD 样活力在 20 d 时达到最高点, 20~30 d 间持续保持较高活力, 而甘草毛状根的生长在 20~30 d 之间也达到最好, 说明无论从生长或是 SOD 样活力而言, 20~30 d 均是收获甘草毛状根的最佳时期。这同时也显示甘草毛状根在体外具有较好的抗氧化能力, 培养 20 d 毛状根 SOD 样活力可高达 10 200 U/g (鲜重), 具有很好清除 O₂⁻ 的活性。

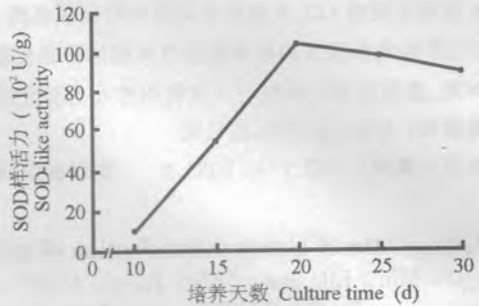


图 1 甘草毛状根 SOD 样活性的变化
Fig. 1 SOD activity change of *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots

2.2 甘草毛状根对 CCl₄ 中毒小鼠血清 LDH 及 GOT 活性的影响

如表 1 所示, 甘草毛状根与商品甘草均能降低由 CCl₄ 肝损伤引起的小鼠血清 LDH、GOT 的升高。毛状根高剂量组 (12 g/kg) 对 LDH、GOT 两指标均有效, 中剂量组 (6 g/kg) 对 GOT 有效。而商品甘草仅高剂量组有效。

表 1 甘草毛状根与商品甘草对 CCl₄ 致肝损伤的小鼠血清中 LDH 和 GOT 活性的影响

Table 1 Effects of *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots and crude drug on the carbon tetrachloride induced serum LDH and GOT activities in mice with hepatic necrosis ($\bar{X} \pm S$)

处理组 Group	剂量 Dose (g/kg)	小鼠数 No. of mice	乳酸脱氢酶活性 ¹⁾ LDH activity (U/L) ¹⁾	谷草转氨酶活性 ¹⁾ GOT activity (U/L) ¹⁾
正常对照 Control	-	10	3 478.80 ± 401.68	169.21 ± 53.28
模型对照 Model	-	10	7 614.93 ± 1 654.37***	902.42 ± 253.17***
甘草毛状根 Hairy roots of <i>G. uralensis</i>	3 × 7	10	6 740.31 ± 1 748.03	813.31 ± 203.05
甘草毛状根 Hairy roots of <i>G. uralensis</i>	6 × 7	10	6 165.51 ± 1 793.25	675.36 ± 214.66*
甘草毛状根 Hairy roots of <i>G. uralensis</i>	12 × 7	10	5 788.04 ± 1 888.29*	604.68 ± 269.08*
甘草干药材 Crude drug of <i>G. uralensis</i>	3 × 7	10	7 086.54 ± 2 016.90	864.49 ± 382.84
甘草干药材 Crude drug of <i>G. uralensis</i>	6 × 7	10	6 913.56 ± 2 188.56	701.06 ± 268.97
甘草干药材 Crude drug of <i>G. uralensis</i>	12 × 7	10	5 930.74 ± 1 440.08*	420.15 ± 277.98***
维生素 E V _E	0.4 × 7	10	5 332.86 ± 1 549.03**	450.71 ± 241.90***

¹⁾ 与对照相比 *** $P < 0.001$ vs control; 与模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model.

2.3 甘草毛状根对 CCl₄中毒小鼠肝匀浆中 SOD 和 MDA 的影响

从表2的结果可知,中、高剂量(6 g/kg, 12 g/kg)的甘草毛状根组和相应的商品甘草组对 CCl₄致肝损伤的小鼠肝匀浆中的 SOD 和 MDA 均有影响,能显著提高 SOD 样活力,降低 MDA 活性。

2.4 甘草毛状根对 CCl₄中毒小鼠肝细胞的影响

镜检可见 CCl₄中毒小鼠肝细胞坏死较广泛,主要呈现散在灶状及弥散性坏死,坏死灶分布于肝小叶中央静脉周围、汇管区及肝被膜下,坏死灶内肝细

胞大部分崩解消失呈凝固性坏死,也可见细胞核呈不同程度的固缩、溶解;尚可见嗜酸性病变的肝细胞坏死区,汇管区内有以中性白细胞为主的炎细胞浸润,其数量与坏死程度无并行关系。甘草毛状根组和商品甘草组的肝细胞病变普遍较轻,坏死灶减少,多为散在及点灶状分布于中央静脉周围及被膜下,坏死范围也减小,受损肝细胞一般也较 CCl₄组少;且中、高剂量的毛状根组与相应剂量的商品甘草组具有相同的效价。

表2 甘草毛状根与商品甘草对 CCl₄致肝损伤的小鼠肝匀浆中 SOD 和 MDA 的影响

Table 2 Effects of *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots and crude drug on carbon tetrachloride induced SOD and MDA activities in poisoning liver of mice ($\bar{X} \pm S$)

处理组 Group	剂量 Dose (g/kg)	小鼠数 No. of mice	超氧化物歧化酶 ¹⁾ SOD nU/g ¹⁾	丙二醛 ¹⁾ MDA nmol/g ¹⁾
正常对照 Control	-	10	866.62 ± 28.82	218.09 ± 12.00
模型对照 Model	-	10	410.56 ± 37.56 ^{###}	1 416.40 ± 61.68 ^{###}
甘草毛状根 Hairy roots of <i>G. uralensis</i>	3 × 7	10	425.44 ± 101.82	1 319.02 ± 88.46
甘草毛状根 Hairy roots of <i>G. uralensis</i>	6 × 7	10	636.22 ± 60.76 ^{**}	1 216.81 ± 40.91 ^{***}
甘草毛状根 Hairy roots of <i>G. uralensis</i>	12 × 7	10	667.11 ± 36.71 ^{***}	1 181.30 ± 61.78 ^{***}
甘草干药材 Crude drug of <i>G. uralensis</i>	3 × 7	10	466.86 ± 53.71 [*]	1 438.29 ± 40.32
甘草干药材 Crude drug of <i>G. uralensis</i>	6 × 7	10	666.10 ± 50.68 ^{***}	1 211.23 ± 69.77 ^{***}
甘草干药材 Crude drug of <i>G. uralensis</i>	12 × 7	10	672.65 ± 40.15 ^{***}	1 198.46 ± 38.13 ^{***}
维生素 E V _E	0.4 × 7	10	687.19 ± 72.13 ^{***}	1 101.14 ± 19.24 ^{***}

¹⁾与对照相比 ^{###} $P < 0.001$ vs control; 与模型组相比 ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ vs model.

表3 甘草毛状根与商品甘草对 CCl₄中毒小鼠肝细胞的影响

Table 3 Effects of *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots and crude drug on carbon tetrachloride induced hepatic necrosis in poisoning liver of mice

处理组 Group	小鼠数 No. of mice	剂量 Dose (g/kg)	肝坏死程度和范围 ¹⁾ Degree and range of score of liver necrosis ¹⁾					P
			-	±	+	++	+++	
正常对照 Control	10	-	9	0	1	0	0	
模型对照 Model	10	-	0	1	5	2	2	
甘草毛状根 Hairy roots of <i>G. uralensis</i>	10	3 × 7	0	5	2	1	2	>0.05, vs model
甘草毛状根 Hairy roots of <i>G. uralensis</i>	10	6 × 7	0	6	2	2	0	<0.05
甘草毛状根 Hairy roots of <i>G. uralensis</i>	10	12 × 7	0	7	1	2	0	<0.05
甘草干药材 Crude drug of <i>G. uralensis</i>	10	3 × 7	0	6	1	3	0	<0.05
甘草干药材 Crude drug of <i>G. uralensis</i>	10	6 × 7	1	6	1	2	0	<0.05
甘草干药材 Crude drug of <i>G. uralensis</i>	10	12 × 7	2	4	2	2	0	<0.05

¹⁾ - : 无肝细胞坏死 no liver necrosis; ± : 点状坏死灶 dotted necrosis focus; + : 散在灶状坏死,限于肝小叶内 1/6 scattered necrosis focus limited in 1/6 liver-leaf; ++ : 散在灶状坏死,限于肝小叶内 1/4 scattered necrosis focus limited in 1/4 liver-leaf; +++ : 弥散性坏死灶,限于肝小叶内 1/2 dissipated necrosis focus limited in 1/2 liver-leaf.

3 讨论

生物体在需氧代谢过程中的氧化还原反应伴有 O₂⁻, H₂O₂ 及 OH[·] 等生成。O₂⁻ 和 OH[·] 可以引发生物膜

不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,损伤膜结构及其功能^[4]。自由基还可以损伤糖、蛋白质及核酸等生物大分子,导致功能和代谢紊乱^[5]。活性氧自由基的上述毒性反应被认为与炎症、自身免疫病、肿瘤、心肌及脑缺血、衰老和肺气肿等疾病的成因直接

相关^[6,7]。CCl₄经肝微粒体细胞色素 P₄₅₀ 激活后生成 ·CCl₃, ·CCl₃ 可攻击肝细胞膜上磷脂分子,引起脂质过氧化,或与肝微粒体脂质和蛋白质发生共价结合,损伤了肝细胞膜结构与功能的完整性,从而使胞浆内可溶性酶如乳酸脱氢酶、转氨酶渗入血液中,其活性明显上升^[8]。体内存在酶及非酶类清除自由基的完整体系,当自由基代谢失衡时,则需要补充外源性抗氧化剂辅助治疗。本实验结果表明:甘草毛状根具有良好的抗氧化能力,已知黄酮类化合物结构中的酚羟基是其抗氧化的功能基团,酚羟基数目越多,抗氧化活性相应增强。甘草毛状根含大量的黄酮类成分,其中甘草素和异甘草素分别含有 2 个和 3 个酚羟基^[9],为抗氧化的功能基团,因此推测甘草毛状根通过清除 O₂⁻ 和 OH·,抑制脂质过氧化反应,从而保护肝细胞膜的完整性。本研究表明通过生物技术将 Ri 质粒转化到甘草细胞后形成的甘草毛状根与天然药材甘草有着相同的清除自由基、抗氧化和保护肝等药理活性,是值得研究和开发利用的人工新资源。

参考文献

[1] 傅乃武,刘朝阳,张如意. 甘草黄酮体抗促癌、抗致突和抗氧化

作用的研究[J]. 天然产物研究与开发,1995,7(4):29~34.

- [2] Dianzani M U. The role of free radicals in liver damage [J]. Proc Nutr Soc, 1987, 46(1): 43~52.
- [3] 李益新,方允中. 超氧化物歧化酶活力测定新方法——化学发光法[J]. 生物化学与生物物理进展,1983,2:59~62.
- [4] Halliwell B, Gutteridge J M C. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases [J]. Mol Aspects Med, 1985, 8: 89~193.
- [5] Horton A A, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity [J]. CRC Crit Rev Toxicol, 1987, 18(1): 27~79.
- [6] Marx J L. Oxygen free radicals linked to many diseases [J]. Science, 1987, 235: 529~531.
- [7] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. Anal Biochem, 1979, 95(2): 351~358.
- [8] Perrissoud D, Festa B. Hepatic pharmacology: Mechanism of action and classification of antinecrotic hepatoprotective agents [J]. Trends Pharmacol Sci, 1982, 29: 371~374.
- [9] Takagi K, Ishii Y. Peptic ulcer inhibiting properties of a new fraction from licorice root (FM₁₀₀) I; Experimental peptic ulcer and general pharmacology [J]. Arzneimittelforsch, 1967, 17: 1544~1547.

(责任编辑:惠红)

欢迎订阅 2001 年《植物学通报》

《植物学通报》是中国植物学会创办的植物学综合性科技刊物。国内统一刊号 CN11-1945/Q, 国际标准连续出版物号 ISSN 1003-2266。

主要刊登内容:1. 植物学各分支学科及其有关的农、林、牧、药、环保和轻工等方面有一定理论水平和应用价值的专论与综述;2. 新技术、新方法;3. 研究论文和简报;4. 高等院校植物学教学研讨;5. 信息动态;6. 科学家园地。全国性植物学专题学术讨论会论文或摘要以专辑发表。

《植物学通报》的主要读者对象是从事植物学以及有关的农、林、牧、医药、轻工、环保等方面的科技、教学人员,深受广大读者的欢迎。据中国科学院上海文献情报中心对生命科学 450 种中文期刊近几年流通频次的统计,在流通率

最高的 59 种生命科学中文期刊中,《植物学通报》排名第 14 位,居植物学类刊物之首。本刊为“中国自然科学核心期刊”,据中国科学引文数据库统计数据,被引频次排名前 500 名期刊中,本刊在近 3 年内名次提高了 186 名次,现位于第 211 名。

本刊为双月刊,每双数月月末出版,单价每册 14 元,全年 84 元。欢迎全国各地图书情报单位及广大读者在当地邮局订阅。若错过邮局订阅,请直接与编辑部联系订阅。除现刊外,尚有自创刊以来的全部过期刊物,半价优惠,共计 180 元(含邮费)。欲订阅者,与我编辑部联系。本刊编辑部地址:北京市香山南辛村 20 号,《植物学通报》编辑部,邮政编码:100093,电话:(010)62591431-6135。