

芦根多糖对镉中毒小鼠肝肾组织损伤的保护作用

王 珍, 尤其嘉, 杨靖亚*, 晁若瑜

(上海海洋大学海洋科学研究院, 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要:目的:探讨芦根多糖对镉中毒小鼠肝肾损伤的影响。方法:通过建立镉中毒小鼠模型,分别以芦根多糖高剂量组[480mg/(kg·d)],多糖中剂量组[240mg/(kg·d)],多糖低剂量组[120mg/(kg·d)],共连续灌胃20d。正常组和模型组小鼠正常饲喂,正常饮水。观察表征变化、称重;制作石蜡切片进行病理形态学观察;检测肝肾组织的MDA含量、GSH含量、GSH-Px活性。结果:不同浓度的芦根多糖对镉引起的小鼠肝和肾损伤均具有保护作用。芦根多糖高剂量组其对小鼠的组织损伤保护作用最有效。结论:芦根多糖对镉中毒小鼠肝肾损伤有保护作用。

关键词:芦根多糖,肝肾损伤,保护作用

Protective effect of cadmium poisoning mice liver and kidney damage of the phragmites polysaccharide

WANG Zhen, YOU Qi-jia, YANG Jing-ya*, CHAO Ruo-yu

(Ocean Science Institution Research Institute, Shanghai Ocean University,
Shanghai Engineering Center for Processing and Storage of aquatic product, Shanghai 201306, China)

Abstract: Objective: To study the influence of the phragmites polysaccharide of cadmium poisoning in mice liver and kidney damage. Methods: Through the establishment of the mouse model of cadmium poisoning, respectively, to the high dose group of phragmites polysaccharide [480mg/(kg·d)], polysaccharide medium dose group [240mg/(kg·d)], polysaccharides low dose group [120mg/(kg·d)], a total of intragastric administration for 20d. Normal group and model group of normal mice fed normal drinking water. Observing characterization of changes in weighing, paraffin slice with pathological morphological observation, detecting liver and kidney tissue content of MDA, GSH, GSH-Px activity. Results: The phragmites polysaccharides of different concentrations had a protective effect on mouse liver and kidney injury caused by cadmium poisoning. The high dose group of phragmites polysaccharide had the most effective tissue damage in mice protective effect. Conclusion: Phragmites polysaccharide had a protective effect on cadmium poisoning in mice liver and kidney damage.

Key words: phragmites polysaccharide; kidney and liver damage; protective effect

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)02-0349-04

镉被美国毒物管理委员会(ATSDR)列为第6位危及人体健康的有毒物质^[1]。曾明等^[2]研究表明,镉对动物的肾脏、肝脏都有不同程度的损害。陈敏等^[3]研究表明,镉有明显的肝脏毒性。在实验研究之后,由于不再接触镉,肝脏作为解毒器官,肝脏功能会不同程度的恢复。Tahiri等^[4]研究表明,果胶多糖对铅的吸收有阻碍作用。刘培勋等^[5]发现银耳碱提多糖有一定清除自由基的能力。多糖的解毒作用可能与自由基的清除有关。张国升等^[6]探讨了芦根多糖对四氯化碳小鼠肝损伤的保护作用。李立华等^[7]研究发现芦根多糖大、小剂量对模型大鼠血清AST含量均有降低作

用,且多糖小剂量对白蛋白与球蛋白(A/G)比值也可起到升高作用。目前,芦根多糖对镉中毒的研究甚少,本实验将探讨芦根多糖对镉中毒引起的小鼠肝和肾组织的损伤的保护作用,以期为芦根多糖的开发利用和镉中毒的治疗提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

芦根 北京永安堂药店;丙二醛(MDA)试剂盒、谷胱甘肽(GSH)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒 南京建成生物工程研究所,20110711;高锰酸钾、硫酸铝钾、苏木素、伊红、甘油、甲醛 国药集团化学试剂有限公司,分析纯;SPF级健康昆明小白鼠50只 上海第二军医大学实验动物中心,18~22g。

LEICA RM2245切片机、LAICA HI1220烘片机、BM1000显微镜、TGL-20C冷冻离心机、UV1102紫外

收稿日期:2012-06-26 * 通讯联系人

作者简介:王珍(1988-),女,在读硕士,研究方向:海洋生物资源综合利用与海洋药物的开发、肿瘤药理学。

基金项目:上海市科委工程中心建设项目(11DZ2280300)。

风光光度计 上海圣科仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 芦根多糖的制备 按照本实验室的提取方法^[6],先将芦根粗提取,采用Sevag法去蛋白,选取1.6cm×40cm凝胶层析柱进行分离纯化,冷冻干燥得到的芦根多糖(包括三种多糖:R-Poly I、R-Poly II和R-Poly III)备用。

1.2.2 动物模型建立与灌胃解毒 SPF级健康昆明小白鼠50只,饲养一周。将小白鼠分为5组:正常组、模型组、多糖高剂量组、多糖中剂量组和多糖低剂量组。每组10只,雌雄各半。模型组、多糖高剂量组、多糖中剂量组和多糖低剂量组腹腔注射氯化镉溶液2.5mg/(kg·d);每周连续4d,连续5周^[9]。

造模结束后,多糖高剂量组每天灌胃芦根多糖480mg/(kg·d),多糖中剂量组灌胃240mg/(kg·d),多糖低剂量组灌胃120mg/(kg·d)^[7],共连续灌胃20d。正常组和模型组小鼠正常饲喂,正常饮水。

1.2.3 老鼠组织的表征观察 实验结束后,各组老鼠禁食12h,解剖,观察肝脏和肾脏的病变。

1.2.4 肝脏和肾脏组织的重量变化 老鼠禁食12h,解剖取肝脏和肾脏组织,用预冷的生理盐水清洗干净,滤纸吸去多余水分,称量各组织块重量及体重,计算肝脏系数和肾脏系数(见表1)。

1.2.5 肝肾组织石蜡切片 取解剖后的部分肝组织和肾组织,用冰生理盐水清洗干净血迹,滤纸吸干水分,将组织块切成大小为0.5×0.5cm²的小方块,制得切片,将玻片置于显微镜下观察拍照,进行病理形态学检查。

1.2.6 肝肾组织的丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量的测定 将小鼠肝、肾组织分别用生理盐水漂洗脱血后制成10%的肝组织和肾组织匀浆,将制备好的匀浆用冷冻离心机离心10min(2000r/min),匀浆离心好后弃下面沉淀,留上清做后续的测定^[10]。

1.2.6.1 肝肾组织的丙二醛(MDA)含量的测定 按试剂盒说明书进行测定,求得MDA的含量(见表2、表3)。

1.2.6.2 肝肾组织中的谷胱甘肽(GSH)含量的测定 取待测肝、肾组织匀浆0.5mL,按试剂盒说明书进行测定,求得GSH的含量(见表2、表3)。

1.2.6.3 肝肾组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量的测定 将10%的肝组织和肾组织匀浆稀释至最佳浓度,按试剂盒说明书进行GSH-Px活性测定(见表2、表3)。

2 结果与分析

2.1 肝脏组织和肾脏组织的表征观察

多糖灌胃结束后,小鼠禁食12h解剖观察其肝脏

和肾脏组织。正常组中小白鼠的肝脏和肾脏组织颜色均呈红褐色,组织质地均匀且边缘锐利,被膜光滑有光泽。模型组每只小鼠的肝脏和肾脏均呈土黄色,边缘钝圆,脏器无光泽且肿大。多糖低中剂量组小白鼠的肝脏和肾脏均呈土黄色,边缘钝圆,脏器无光泽且肿大。多糖高剂量组小白鼠的肝脏肾脏略见肿大,边缘稍有钝圆,组织颜色依旧呈红褐色。

2.2 肝脏系数和肾脏系数

各组小白鼠解剖后的肝脏和肾脏,用电子天平称量湿重量,以小鼠肝脏重量、肾脏重量与其体重之比,分别记算肝脏系数和肾脏系数(见表1)。从表1中可以看出,模型组小鼠的肝脏系数和肾脏系数较正常组大。多糖三剂量组中,多糖高中剂量组可不同程度的缓解肝脏、肾脏损伤。

2.3 肝脏组织和肾脏组织的石蜡切片

各组小白鼠肝脏组织病理切片经40倍显微镜观察结果见图1~图5。从图1~图5中可见,正常组小白鼠的肝细胞紧密的排列在一起,细胞核的轮廓比较清楚,肝血窦成放射状并且走向比较清晰。模型组小白鼠的肝细胞则多肿胀坏死,细胞核染色较淡或没有

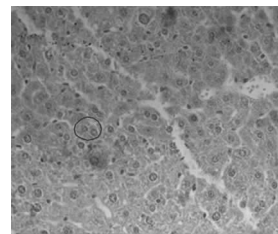


图1 正常组小白鼠的肝脏

Fig.1 The liver of control group mice

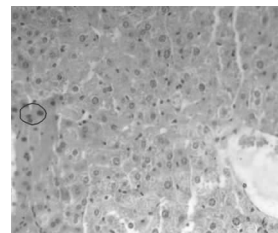


图2 模型组小白鼠的肝脏

Fig.2 The liver of model group mice

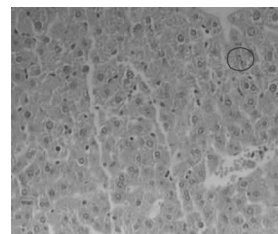


图3 芦根多糖高剂量组小白鼠的肝脏

Fig.3 The liver of high dose polysaccharide group

表1 肝脏系数和肾脏系数

Table 1 Liver coefficient and kidney coefficient

组别	正常组	模型组	多糖高剂量组	多糖中剂量组	多糖低剂量组
肝脏系数	0.0484±0.00497	0.0546±0.00426*	0.0489±0.00576*	0.0488±0.00510**	0.0494±0.00496**
肾脏系数	0.0133±0.00258	0.0153±0.00398*	0.0143±0.0190**	0.0150±0.00257**	0.0154±0.00209**

注:*表示 $p<0.05$; **表示 $p<0.01$;表1~表3同。

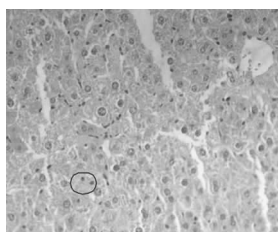


图4 多糖中剂量组小白鼠的肝脏

Fig.4 The liver of medium dose polysaccharide group

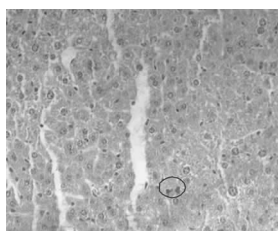


图5 多糖低剂量组小白鼠的肝脏

Fig.5 The liver of low dose polysaccharide group mice

颜色,肝血窦的走向混乱。多糖低剂量组和中剂量组小白鼠的肝细胞有部分肿胀坏死,细胞轮廓难以观察清楚,细胞核染色也较淡。多糖高剂量组小白鼠的肝细胞则稍优于低、中剂量组的,肝细胞肿胀坏死的情况极少,可观察到细胞轮廓,且肝血窦的走向清晰呈放射状。

各组小白鼠肾脏组织的病例切片见图6~图10。由图6~图10可见,正常组小白鼠的肾细胞排列紧密,

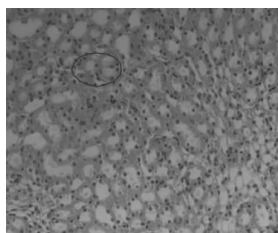


图6 正常组小白鼠的肾脏

Fig.6 The kidney of control group mice

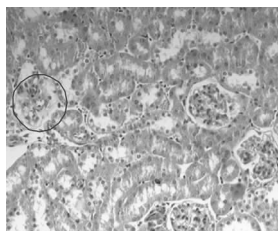


图7 模型组小白鼠的肾脏

Fig.7 The kidney of model group mice

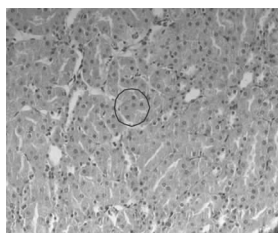


图8 芦根多糖高剂量组小鼠肾脏

Fig.8 The kidney of high dose polysaccharide group

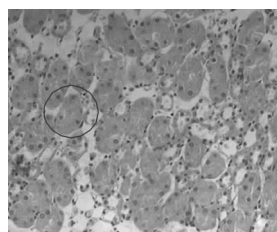


图9 芦根多糖中剂量组小鼠肾脏

Fig.9 The kidney of medium dose polysaccharide group

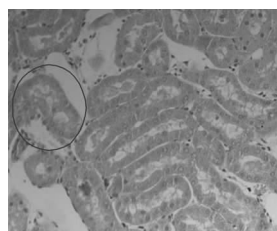


图10 芦根多糖低剂量组小鼠肾脏

Fig.10 The kidney of low dose polysaccharide group mice

细胞核可明显观察到,且核大小均一。模型组小白鼠的肾小管上皮细胞多肿胀坏死,细胞间的间隙变大。多糖低、中剂量组小鼠的肾小管上皮细胞大部分也都肿胀坏死,细胞间隙也逐渐变大。而多糖高剂量组小鼠的肾小管上皮细胞虽有少数肿胀情况发生,但却排列依然紧密,细胞之间的间隙没有多糖低、中剂量组的大。

2.4 肝脏和肾脏组织的MDA、GSH、GSH-Px含量

各药物组对镉中毒小鼠的肝损伤和肾损伤的保护作用见表2、表3。由表2、表3可知,模型组小鼠肝组织和肾组织中MDA的含量明显高于正常组,GSH和GSH-Px的含量与正常组相比则极低。说明镉中毒小鼠模型建立成功。模型组小鼠肝组织、肾组织中的MDA、GSH和GSH-Px的含量是五个组中最高的;正常组肝组织、肾组织中的MDA、GSH和GSH-Px的含量则是五个组中最小的。芦根多糖高、中、低三剂量组小鼠肝和肾组织中的MDA含量高于正常组,低于模型组;GSH和GSH-Px的含量处于正常组和模型组

表2 肝脏组织中MDA、GSH、GSH-Px的含量

Table 2 The content of MDA, GSH and GSH-Px in the liver

组别	MDA	GSH	GSH-Px
正常组	31.201±8.547	16.308±1.191	22.615±0.361
模型组	64.413±11.503*	9.455±3.500*	16.725±1.667**
高剂量组	32.496±11.255	15.395±3.241*	20.952±0.919*
中剂量组	35.135±7.060*	13.620±5.612*	19.316±0.644**
低剂量组	37.440±8.405	12.186±1.916**	18.115±0.423***

注:***表示 $p < 0.001$ 。

表3 肾脏组织中MDA、GSH、GSH-Px的含量

Table 3 The content of MDA, GSH and GSH-Px in the kidney

组别	MDA	GSH	GSH-Px
正常组	23.590±7.990	22.615±0.361	23.680±2.459
模型组	51.739±4.916*	16.725±1.667**	15.098±0.805*
高剂量组	31.516±7.878	20.952±0.919	22.519±0.664
中剂量组	43.929±7.410**	19.316±0.644*	19.487±1.858*
低剂量组	50.847±1.529**	18.115±0.423*	18.480±0.481*

之间,这说明不同浓度的芦根多糖对镉引起的小鼠肝、肾损伤均具有不同程度的保护作用,且呈浓度依赖性。其中,芦根多糖高剂量组小鼠的各项指标极接近正常组,其对小鼠的组织损伤保护作用最有效。

3 结论与讨论

本文通过动物建模探究芦根多糖对镉中毒的肝肾的解毒作用。芦根多糖对镉中毒小鼠的肝肾损伤的保护作用可能与芦根多糖的抗氧化性有关。镉通过与酶类巯基结合或替代作用,置换出细胞内酶类金属,降低机体抗氧化酶的活性,使机体清除自由基的能力下降,引起氧化损伤^[1]。肝脏和肾脏是机体重要的代谢解毒器官,在机体代谢过程中,门静脉收集自腹腔流来的血液,血中的有害物质及微生物抗原性物质,将在肝内被解毒和清除。谷胱甘肽(GSH)是一种天然含巯基三肽,是机体内极为重要的抗氧化剂和自由基清除剂,可以和自由基、重金属等结合,将毒物转化为无害物而排出体外,使肝细胞膜稳定性增加,保护肝细胞膜,促进肝脏酶的活性,促进肝脏的解毒与合成功能^[2]。GSH-Px是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶,它的生理功能是以GSH为基质来促进过氧化物的分解,从而起到抗氧化的作用。因此GSH-Px活性高低意味着机体清除氧自由基的能力的强弱。MDA是生物膜脂质过氧化的降解产物,其水平的高低体现了自由基的产生情况以及机体抗氧化系统的功能状态。

芦根多糖(R-Poly I、R-Poly II和R-Poly III)组成为阿拉伯糖、葡萄糖、木糖,具有很强的抗氧化活性,具有清除生物体内自由基的作用。实验结果显示,芦根多糖能够增加GSH的含量,提高机体内GSH-Px的活力,使机体的自由基防御处于较高水平,增强机体细胞的防御机制和解毒作用,机体的防御机制增强,抗氧化作用增强,那么细胞呼吸代谢过程中产生的过氧化物和羟自由基将被及时清除,而脂质过氧化产物MDA的含量自然降低。病理学形态

切片显示,不同剂量的芦根多糖对肝肾细胞有一定的保护作用。本实验中芦根多糖对镉中毒小鼠的肝肾器官的保护作用可能与其抗氧化作用有关,这将为芦根多糖的开发利用和镉中毒的治疗提供一定的参考依据。

参考文献

- [1] 党卫红. 镉的毒性及镉损害的营养干预[J]. 郑州轻工业学院报, 2008(4):10-12.
- [2] 曾明, 王翔朴, 安飞云, 等. 镉中毒性肝肾损伤的实验研究[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(10):869-870.
- [3] 陈敏, 谢吉民, 程晓农, 等. 镉对小鼠肝脏的毒作用机理探讨[J]. 江苏大学学报:医学版, 2002, 4:321-323.
- [4] M Tahiri, JC Tressol, T Doco, et al. Chronic oral administration of rhamnogalacturonan-II dimer, a pectic polysaccharide, failed to accelerate body lead detoxification after chronic lead exposure in rats[J]. British Journal of Nutrition, 2002, 87(1):47-54.
- [5] 刘培勋, 高小荣, 徐文清, 等. 银耳碱提多糖抗氧化活性的研究[J]. 中药药理与临床, 2005(4):35-37.
- [6] 张国升, 樊明月, 彭代银, 等. 芦根多糖对四氯化碳小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(3):354-355.
- [7] 李立华, 张国升, 戴敏, 等. 芦根多糖对四氯化碳致肝纤维化大鼠的保肝作用[J]. 安徽中医学院学报, 2005, 24(2):24-26.
- [8] 沈蔚, 任晓婷, 张建, 等. 芦根多糖的提取及其抗氧化活性的研究[J]. 时珍国医国药, 2010(5):1078-1080.
- [9] 霍俊凤, 董爱国, 马吉飞. 姬松茸多糖对镉中毒小鼠血液系统损伤的治疗作用[J]. 中国兽药杂志, 2009(5):27-29.
- [10] 赵红霞. 糖萜素对虾生产性能和肉质影响及机理研究[D]. 杭州:浙江大学, 2003.
- [11] 刁书永, 张立志, 袁慧, 等. 镉中毒机理研究进展[J]. 动物医学进展, 2005(5):49-51.
- [12] 曹秀虹, 庞惠, 赵民生, 等. 谷胱甘肽的临床应用进展[J]. 中国综合临床, 2002, 18(9):783.

(上接第348页)

东科技出版社, 1994, 8.

[2] 杨月欣, 王光亚, 潘兴昌, 等. 中国食物成分表[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2002-12.

[3] Munakata T, Arai S, Kuwano K, et al. Induction of interferon production by natural killer cells by organic germanium compound, Ge-132[J]. Interferon Res, 1987, 7(1):69-76.

[4] 陈石良, 许正宏, 陶文沂, 等. 灰树花富锗培养研究[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(3):248-251.

[5] 李秋蕊. 富锗羊肚菌菌丝体深层发酵的研究[D]. 长春:吉林大学, 2005, 6.

[6] 尹计秋, 燕小梅, 牛奔. 微波消解-火焰原子吸收光谱法测定海藻中的微量元素[J]. 光谱实验室, 2011, 28(1):118-120.

[7] 高平章, 张英武, 肖玲玲, 等. 微波消解-火焰原子吸收光谱法测定黄芩中的微量元素含量[J]. 安徽农业科学, 2010,

38(35):2021-2022.

[8] 李云, 袁明华. 微波消解-火焰原子吸收光谱法测定下火药材中的微量元素[J]. 光谱实验室, 27(1):257-259.

[9] 刘瑛, 杨秀华, 卢中热. 石墨炉原子吸收光谱法测定饮料中的锗及基体干扰的研究[J]. 分析测试学报, 1995, 14(5):49-52.

[10] 李好. 富硒猴头栽培及其药理活性初探[D]. 合肥:安徽农业大学, 2010, 6.

[11] 杨美芬, 王玉明, 黄永坤, 等. 用细菌16S rRNA荧光定量PCR法检测肠道菌群的变化[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(4):266-269.

[12] 白鹏, 吕玉敏, 顾芳. 细菌16S rDNA荧光定量PCR法分析溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2008, 17(7):566-571.