

粗壮女贞水提物在荷瘤裸鼠体内安全性的研究^{*}刘 珊¹, 李俐漫³, 左浩江², 周 涛², 裴晓芳^{2△}

(1. 电子科技大学附属医院/四川省医学科学院/四川省人民医院检验科, 成都 610072; 2. 四川大学华西公共卫生学院/华西第四医院, 成都 610041; 3. 武汉大学第二临床学院, 武汉 430000)

摘 要:目的 研究粗壮女贞水提物在荷瘤裸鼠体内的安全性。方法 建立裸鼠荷瘤模型, 腹腔注射粗壮女贞或磷酸盐缓冲液(PBS)后, 观察裸鼠体质量、精神行为、肢体活动变化; 处死裸鼠后, 采用脏器百分比和 HE 染色评价裸鼠脏器大小及其组织病理学改变; 并进行血清超氧化物歧化酶(SOD)活性检测。结果 各组裸鼠未发现精神行为和肢体活动异常; 体质量及脏器百分比与对照组比较, 差异无统计学意义($P < 0.05$); HE 染色显示各组裸鼠脏器组织结构均正常。与对照组比较, 粗壮女贞组裸鼠血清 SOD 活性明显增高($P < 0.05$)。结论 粗壮女贞水提物在荷瘤裸鼠体内具有较好的安全性, 能提高其抗氧化能力。

关键词:粗壮女贞; 水提物; 荷瘤裸鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.14.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)14-2028-03

Safety evaluation of Ligustrum robustum in tumor-bearing nude mouse^{*}LIU Shan¹, LI Liman³, ZUO Haojiang², ZHOU Tao², PEI Xiaofang^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of University of Electronic Science and Technology/Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. School of Public Health, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 3. Second Clinical College of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430000, China)

Abstract: Objective To evaluate the safety of the aqueous extract of Ligustrum robustum, (L. robustum) in tumor-bearing nude mouse. **Methods** Tumor-bearing nude mouse model was established, which was randomly divided into the L. Robustum group and the control group with 10 mice for each group. Mice were injected with L. robustum or intraperitoneally (2 g/kg in 100 μ L of PBS) for 5 days. Body weight and mental behavior were observed. At the end of the experiment, the major organs of mice were weighted and the organs' histological architecture were examined by HE staining. Superoxide dismutase (SOD) activity of serum was detected. **Results** There were no changes of body weight and mental behavior. No obvious histopathological changes of organs were observed. The superoxide dismutase (SOD) activity of serum increased significantly in L. Robustum group compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** L. Robustum is safety in the tumor-bearing nude mouse model under this experimental condition.

Key words: L. Robustum; the aqueous extract; tumor-bearing nude mouse

苦丁茶是我国民间常见的一种天然茶类饮品, 享有“保健益寿茶”“绿色黄金”等称号^[1-2]。中国西南地区, 如四川、云南、贵州大部分地区盛产, 苦丁茶主要是木犀科的粗壮女贞。有研究发现粗壮女贞含有多钟对人体有益的成分, 如黄酮类、多酚类、三萜类、维生素等生物活性物质, 具有清热解毒、降脂降压、抗氧化、抗菌消炎等功效^[2-4]。目前对粗壮女贞的安全性研究甚少, 尤其对动物荷瘤模型的安全性评估, 国内外尚未报道^[5-8]。现探讨粗壮女贞在荷瘤动物模型的安全性, 报道如下。

1 材料与方 法

1.1 一般材料 粗壮女贞来源于四川省筠连县青山绿水茶叶专业合作社, 采摘时间为 2011 年春季。

1.2 仪器与试剂 低温冷却循环泵(汇成科工贸易有限公司), 二氧化碳培养箱(日本 SANYO 公司), 高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂), 全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司), DMEM 培养液(美国 Hyclone 公司), 0.05% 胰蛋白酶溶液(美国 Thermo Fisher 公司), 小牛血清(美国 Hyclone 公司), 超氧化物歧化酶(SOD) 测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 细胞及动物 宫颈癌细胞株(HeLa)购于美国 ATCC 细胞库。3~5 周龄无特定病原体(SPF)雌性 BALB/c 裸鼠, 于成都达硕实验动物有限公司从北京斯莱克生物有限公司代购, 饲养于 SPF 级环境。

1.4 实验方法

1.4.1 粗壮女贞水提物制备 称取 50 g 粗壮女贞样品, 过 80 目中药粉碎机打碎样品, 加入 500 mL 蒸馏水, 温度为 80 $^{\circ}$ C 恒温水浴中浸提 1 h, 反复 3 次, 将 3 次得到的浸提液合并, 采用旋转蒸发仪把浸取液过滤后得到的滤液蒸干, 使用无菌蒸馏水调至浓度为 1 g/mL, 经高压蒸汽灭菌后保存在 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱里。

1.4.2 细胞培养 细胞添加 100 U/mL 青霉素、10% 胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养箱中培养。

1.4.3 荷瘤裸鼠模型的建立 消化收集对数生长期 HeLa 细胞, PBS 缓冲液重悬计数。采用皮下接种的方式于裸鼠右侧前肢腋下接种 3×10^6 个细胞(100 μ L), 建立荷瘤模型。

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81273055)。

作者简介: 刘珊, 女, 主管技师, 主要从事临床检验研究。 △ 通信作者, E-mail: xxpeiscu@163.com。

1.4.4 动物分组 瘤体平均体积生长至 50 mm³ 时,将裸鼠随机分为粗壮女贞组和对照组,每组各 10 只。粗壮女贞组裸鼠每日按 2 g/kg(100 kg)剂量腹腔注射粗壮女贞水提物,连续注射 5 d,对照组给予相同体积的 PBS。

1.4.5 体质量、精神行为及肢体活动评价 每日对裸鼠体质量进行 1 次测量,并观察裸鼠的精神行为和肢体活动。

1.4.6 SOD 活性测定 腹腔注射后第 31 天,采用眼球取血,将 20 μL 待测血清或双蒸水与 20 μL 酶工作液、200 μL 底物混合,空白对照加 200 μL 酶稀释液,暗处放置 20 min,450 nm 测定吸光度。SOD 抑制率(%)=(对照孔实际吸光度-样品孔实际吸光度)/(样品孔实际吸光度)×100%,SOD 活性(U/mL)=SOD 抑制率(%)×2×(0.24/0.02)。

1.4.7 脏器百分比及组织病理学检查 眼球取血后,处死裸鼠,取肾脏、肺脏、脾脏、肝脏、心脏,用生理盐水冲洗,置于干纱布 30 s。然后对各脏器的质量进行数据记录并计算脏器百分比,脏器百分比(mg/g)=脏器质量(mg)/动物体质量(g)。最后将脏器置于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h,石蜡包埋切片,HE 染色观察脏器组织病理学改变。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组裸鼠体质量结果比较 粗壮女贞组和对照组裸鼠精神行为和肢体活动均未见异常。粗壮女贞处理裸鼠后,连续观察其体质量变化。粗壮女贞组和对照组裸鼠体质量比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。裸鼠处死前,粗壮女贞组[(22.73±0.99)g]和对照组[(21.61±1.21)g]裸鼠体质量比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见图 1。

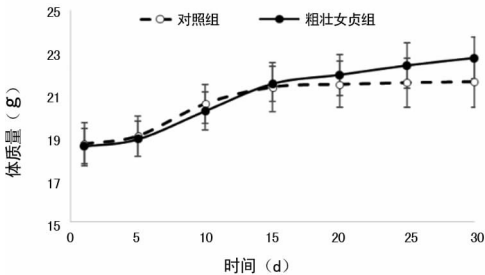


图 1 2 组裸鼠体质量检测结果比较

2.2 2 组裸鼠 SOD 活性检测结果比较 粗壮女贞组裸鼠体内抗氧化能力较对照组强,其血清 SOD 活性分别为 197.49、169.35 U/mL,差异有统计学意义(*P*<0.05)。

表 1 2 组裸鼠脏器百分比结果比较($\bar{x} \pm s$,%)

组别	肾脏	肺脏	脾脏	肝脏	心脏
对照组	23.31±3.21	9.58±1.27	11.68±0.92	77.04±6.30	6.23±0.85
粗壮女贞组	23.74±2.65	9.72±0.76	10.95±1.54	76.82±3.27	6.81±1.43

2.3 2 组裸鼠脏器百分比结果比较 与对照组比较,粗壮女贞组裸鼠肾脏、肺脏、脾脏、肝脏、心脏脏器质量及脏器百分比比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 1。

2.4 2 组裸鼠组织病理学检查结果比较 取肾脏、肺脏、脾脏、肝脏、心脏进行 HE 染色,粗壮女贞组和对照组裸鼠主要脏器均未发现明显的组织病理学改变。见图 2。

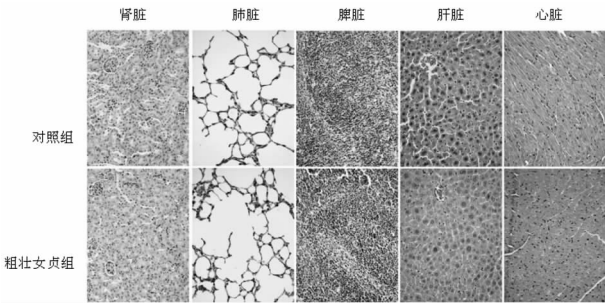


图 2 脏器组织病理学检测

3 讨 论

粗壮女贞作为一种天然茶类保健饮品,在我国被广泛饮用。近年来,对粗壮女贞药理学和开发应用研究已有较多报道,但安全性研究资料甚少,尤其对动物荷瘤模型的安全性评估,国内外尚未有报道^[9-11]。本研究建立了粗壮女贞的荷瘤动物模型并进行安全性研究,

本研究表明,荷瘤裸鼠腹腔注射粗壮女贞后,精神行为、肢体活动及体质量未见异常。粗壮女贞组裸鼠与对照组比较,肾脏、肺脏、脾脏、肝脏、心脏脏器质量及脏器百分比比较,

差异无统计学意义(*P*>0.05)。取肾脏、肺脏、脾脏、肝脏、心脏进行 HE 染色,粗壮女贞组裸鼠主要脏器未发现明显的组织病理学改变,提示粗壮女贞在荷瘤裸鼠体内具有较好的安全性。黄超培等^[12]以粗壮女贞对小鼠进行遗传毒性试验,发现粗壮女贞对小鼠的 LD50 大于 30 g/kg,未见遗传毒性作用。刘冠萍等^[13]研究中未发现粗壮女贞提取物对大鼠生殖及胚胎发育的影响。相关研究均可作为评价粗壮女贞的安全性提供实验依据。本研究结果显示,粗壮女贞组裸鼠体内抗氧化能力较对照组强,与刘冠萍等^[14]报道的结果一致。

本研究初步探讨了粗壮女贞在荷瘤动物模型内的安全性,对肿瘤患者饮用粗壮女贞提供了重要的参考依据,后续还可从免疫、生化指标等方面进一步分析粗壮女贞的体内安全性。

参考文献

[1] 杜晓昕,叶倩,陈凡,等.粗壮女贞水提物对金黄色葡萄球菌耐药株的抑菌效果及与抗生素的联合抑菌作用[J].现代预防医学,2014,41(5):894-897.

[2] 张倩茹,高瑞,吴芹,等.粗壮女贞对小鼠高血脂症及脂肪肝的治疗作用[J].时珍国医国药,2014,25(12):2880-2881.

[3] Zhu F,Cai YZ,Sun M,et al.Comparison of major phenolic constituents and in vitro antioxidant activity of diverse Kudingcha genotypes from Ilex kudingcha, Ilex cornuta, and Ligustrum robustum[J].J Agric Food Chem,2009,57(14):6082-6089.

(下转第 2032 页)

肠埃希菌对 TZP 的耐药性仅为 4.9%,提示全国范围 TZP 的耐药性也较 SAM 低,但是该研究未根据菌株是否产 ESBLs 分别进行分析。李耘等^[1]根据大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是否产 ESBLs 分别进行探讨,但仅分析了 TZP 的耐药性,ESBLs(+)大肠埃希菌耐药率为 3.6%,ESBLs(-)大肠埃希菌为 5.0%,ESBLs(+)肺炎克雷伯菌耐药率为 9.4%,ESBLs(-)肺炎克雷伯菌耐药率为 12.5%,均比本研究高,但与 SAM 耐药性比较,均处于较低耐药水平。基础药学研究认为舒巴坦属于不可逆的竞争性 ESBLs 抑制剂,对肠杆菌所产生的 ESBLs 均有抑制作用,其与酶发生不可逆反应,致使酶失活。但是,酶抑制作用在其过程中也遭到破坏(故称自杀性抑制剂)。而他唑巴坦是在舒巴坦的结构基础上增加了 1 个三氮唑环,属于舒巴坦的衍生物。化学结构的差异导致他唑巴坦对 A 类酶与 B 类酶均存在较强的抑制作用,且较舒巴坦强。而自杀性抑制剂舒巴坦在其作用过程中的自身破坏,导致对细菌的抑制作用减弱而细菌对其耐药性增加。TZP 含有稳定性强的他唑巴坦,因此对细菌是否产 ESBLs 酶的耐药性差异不大。

本研究散点图分析显示,4 种细菌的 SAM 与 TZP 之间的交叉耐药率均较低,其中 ESBLs(+)肺炎克雷伯菌交叉耐药率最高(2.9%),ESBLs(-)大肠埃希菌交叉耐药率最低,仅为 0.9%;交叉敏感率提示,ESBLs(-)菌交叉敏感率较高,其中 ESBLs(-)肺炎克雷伯菌交叉敏感率高达 81.2%,但对 ESBLs(+)肺炎克雷伯菌交叉敏感率仅为 9.2%,ESBLs(+)大肠埃希菌交叉敏感率也仅 10.8%。表明细菌是否产 ESBLs 对 SAM 与 TZP 之间的交叉敏感性存在较大关系,而交叉耐药性似乎与细菌是否产 ESBLs 酶关系不大。

综上所述,通过对 SAM 和 TZP 的药敏分析,TZP 对大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的敏感性远远高于 SAM,其敏感性均在 90%以上,其耐药率在 3%以下。因此对该类细菌引起的临床感染,可经验性使用 TZP 进行治疗,会取得较好效果。TZP 较碳氢酶烯类抗菌药物经济。SAM 虽为含酶抑制剂抗菌药物,但其针对产 ESBLs 的菌株的耐药性均高于 50%,因此在药敏结果之前不宜经验性使用以防止治疗失败。散点图分析发现 2 种抗菌药物交叉耐药率较低,因此只需选取敏感性高的抗

菌药物进行治疗即可,非特殊情况下不必进行 2 种抗菌药物的联合使用。

参考文献

- [1] 周建芳,杜斌.产超广谱 β -内酰胺酶肠杆菌科细菌的感染与控制[J].临床药物治疗杂志,2012,15(6):5-8.
- [2] 刘素娟.氨苄西林钠舒巴坦钠应用于老年下呼吸道细菌感染治疗的疗效分析[J].中国处方药,2016,14(9):56-56.
- [3] 宋俊.舒巴坦联合氨苄西林清除糖尿病并发细菌感染的病原菌分析[J].当代医学,2016,22(6):139-140.
- [4] 房莉.哌拉西林/他唑巴坦治疗老年呼吸道感染的临床疗效[J].临床合理用药杂志,2016,9(3):69-70.
- [5] 唐珩,刘峰,邓欢,等.哌拉西林/他唑巴坦治疗儿童呼吸道细菌感染的疗效观察[J].中国药师,2016,19(8):1515-1517.
- [6] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2013:736-753.
- [7] 罗万军,徐润琳,陈莎.某儿童医院 2011—2014 年多重耐药菌监测分析[J].儿科药科学杂志,2016,8(1):44-46.
- [8] 杨继勇,刘杰,韩黎.细菌耐药现象多侧面解读与理解[J].中华医院感染学杂志,2016,26(1):238-240.
- [9] 王惠姣,徐娇君,陈小平,等.ICU 患者感染多药耐药肺炎克雷伯菌的耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2016(6):1235-1237.
- [10] 吕媛,李耘,崔兰卿.2010 年度卫生部全国细菌耐药监测报告:肠杆菌科细菌耐药监测[J].中华医院感染学杂志,2011,21(24):5138-5143.
- [11] 李耘,吕媛,薛峰,等.卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarín)2011—2012 年革兰阴性菌耐药监测报告[J].中国临床药理学杂志,2014,30(3):260-277.

(收稿日期:2017-01-15 修回日期:2017-02-23)

(上接第 2029 页)

- [4] He D, Lau M, But P, et al. Antioxidative glycosides from the leaves of *Ligustrum robustum*[J]. J Nat Prod, 2003, 66(6):851-854.
- [5] Xie M, Zhou T, Liao Y, et al. Effects of *ligustrum robustum* on gut microbes and obesity in rats[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(46):13042-13054.
- [6] Yang M, Liu F, He D, et al. Anti-obesity effect of total phenylpropanoid glycosides from *Ligustrum robustum* Blume in fatty diet-fed mice via up-regulating leptin[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 169(16):459-465.
- [7] Yu ZL, Zeng WC. Antioxidant, antibrowning, and cyto-protective activities of *Ligustrum robustum* (Rxob.) Blume extract[J]. J Food Sci, 2013, 78(9):C1354-C1362.
- [8] Lau KM, He ZD, Dong H, et al. Anti-oxidative, anti-inflammatory and hepato-protective effects of *Ligustrum robustum*[J]. J Ethnopharmacol, 2002, 83(1/2):63-71.
- [9] 李兴桥,陈嘉熠,熊靖飞,等.川产粗壮女贞水提物体外抗

氧化能力的比对研究[J].现代预防医学,2016,43(21):3966-3968.

- [10] 黄梦姣,卢添林,王瑶,等.粗壮女贞不同萃取部位抑菌活性成分研究[J].现代预防医学,2016,43(5):864-866.
- [11] 曹芳,陈明,邓先扩,等.粗壮女贞提取物对 2 型糖尿病小鼠的降血糖效果及作用机制[J].中华中医药学刊,2016,34(12):2981-2984.
- [12] 黄超培,何励,王彦武,等.苦丁茶的急性毒性和遗传毒性研究[J].药学杂志,2014,24(2):183-184.
- [13] 刘冠萍,黄宇声,覃良,等.粗壮女贞提取物对大鼠生殖及胚胎发育的影响[J].中国保健营养(下旬刊),2012,22(7):2199-2200.
- [14] 刘冠萍,黄宇声,张栩颜,等.粗壮女贞水提取物对高脂血症小鼠血脂及脂质过氧化的影响[J].中国民族民间医药,2012,21(13):44-47.

(收稿日期:2017-02-15 修回日期:2017-04-25)