

唐古特虎耳草抗肝损伤药效物质基础研究

王琪^{1,2} 潘国庆^{1,2} 党军^{3,4}

(1. 青海民族大学药学院, 西宁 810007; 2. 青藏高原植物化学重点实验室, 西宁 810007; 3. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 4. 青海省藏药研究重点实验室, 西宁 810001)

摘要:目的: 研究唐古特虎耳草抗肝损伤的药效成分。方法: 通过小鼠实验证实唐古特虎耳草甲醇提取物具有肝保护作用, 利用 HPLC-DPPH 色谱联用技术对唐古特虎耳草中自由基抑制剂进行色谱导向分离。结果: 从唐古特虎耳草甲醇提取物中分离并鉴定了七个二芳基壬烷类新化合物。结论: 唐古特虎耳草甲醇提取物中七个二芳基壬烷类化合物均有明显的抗氧化活性, 是抗肝损伤药物的潜在药效活性成分。

关键词: 唐古特虎耳草; 肝损伤; 氧化应激; HPLC-DPPH

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9393(2021)02-0034-04

引言

肝脏是人体内最重要的实质性器官, 承担着人体重要的生理功能。肝损伤主要是指肝细胞损伤, 分为化学性肝损伤和免疫性肝损伤两类^[1]。在日常生活中, 长期服用药物会导致药物毒素沉积在肝脏, 导致药物性肝损伤; 长期熬夜、酗酒、生活不规律, 同样会造成肝损伤, 且后者呈现越来越年轻化的趋势。肝损伤是各种肝脏类疾病共有的一种病理状态, 如不加以治疗, 还会导致肝硬化、肝纤维化及肝癌等^[2]。在各种肝损伤研究中, 由于氧化应激在肝细胞损伤中占据很重要地位, 因此, 对氧化应激导致肝细胞损伤的研究便成为治疗肝脏疾病的重要途径。目前临床上治疗肝损伤、肝癌的药物存在疗效低、毒副作用大等问题, 从而限制了其临床应用, 因此, 寻找可以预防和治疗

肝损伤的天然有效成分成为药物研究的热点之一。

唐古特虎耳草 (*Saxifraga tangutica* Engl.), 又名甘青虎耳草, 是虎耳草科 (*Saxifragaceae*) 虎耳草属 (*Saxifraga* Tourn. ex L.) 的一年生常绿草本植物^[3-4]。生长在海拔 2900m~5600m 的林下、灌丛、高山草甸和高山碎石隙, 分布于青海、甘肃、西藏及四川等地^[5]。唐古特虎耳草化学成分种类多样, 已报道的化学成分种类有黄酮类、酚类、甾体类、二芳基庚烷类等^[6-8]。唐古特虎耳草是藏族人民常用药材, 藏药名为“松滴”。据文献报道, 唐古特虎耳草提取物可对四氯化碳诱导的小鼠肝损伤有一定的保护作用^[9]。

1 研究背景

刀豆蛋白 A (ConA) 是一种植物蛋白成分提

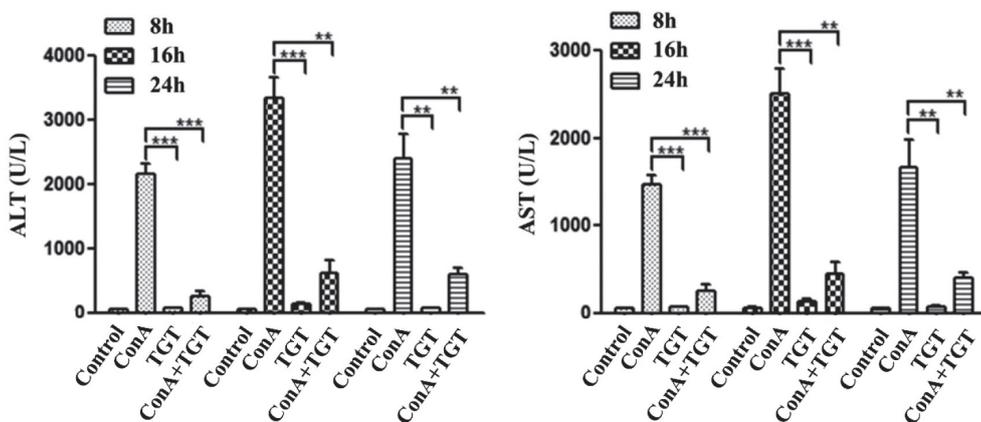
基金项目: 青海省重点实验室发展专项“青海省青藏高原植物化学重点实验室”(2017-ZJ-Y19); 青海省国际合作专项(2019-HZ-805); 青海民族大学研究生创新项目“唐古特虎耳草中自由基抑制剂的定向分离”。

作者简介: 王琪 (1996-), 女, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 天然药物化学。

取物, T淋巴细胞表面有其受体, 肝脏是 ConA 作用的靶器官之一, 通过给小鼠尾静脉注射 ConA 后能够经血液循环特异性地与肝窦内 T 细胞表面受体结合并引起 T 细胞活化, 从而导致肝脏炎症及损伤, 由此可建立小鼠肝损伤模型。

将小鼠腹腔注射 100mg/kg 唐古特虎耳草(TGT) 甲醇提取物, 2 周后, 单次尾静脉注射 ConA 造成免疫性肝损伤。一段时间后, 利用眼眶静脉丛取血收集血清, 检测各组小鼠血清中谷丙转氨酶 (ALT)

和谷草转氨酶 (AST) 的含量。实验结果如图 1 所示, 结果表明, ConA 诱导组在 8h、16h 和 24h 时, 血清中 ALT 和 AST 与正常对照组相比显著升高, 说明建模成功。与 ConA 诱导组相比, TGT 组和 ConA+TGT 实验组在 8h、16h 和 24h 时, 血清中 ALT 和 AST 检测结果均表现出显著或极显著的降低, 说明在剂量 100mg/kg 时, 唐古特虎耳草甲醇提取物具有显著的肝保护作用。

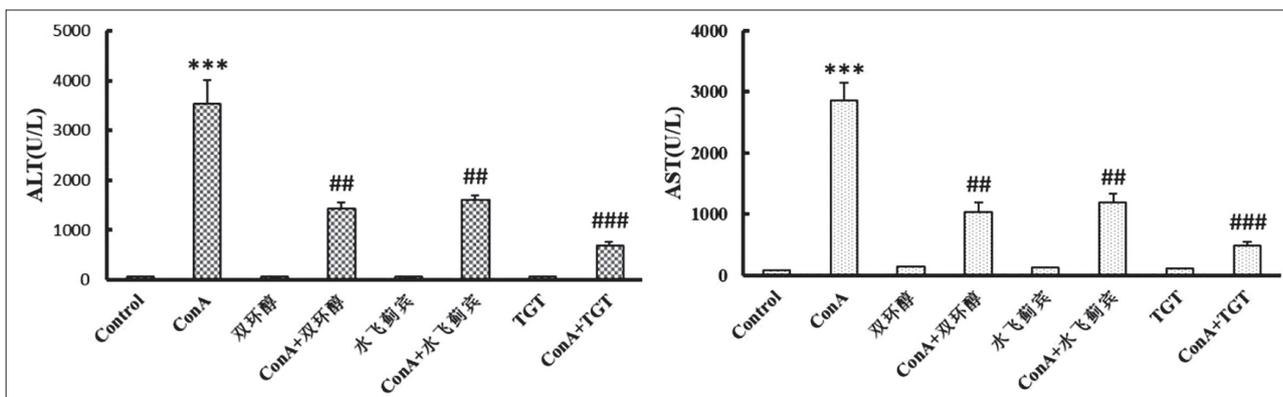


注: 与 ConA 组比较, ** 代表差异显著 ($P < 0.01$), *** 代表差异极显著 ($P < 0.001$)。

图 1 唐古特虎耳草甲醇提取物对 ConA 处理不同时间致小鼠肝损伤的保护作用 ($n=7$)

在上述实验小鼠肝损伤模型稳定的情况下, 进一步选择双环醇 (灌胃, 100 mg/kg) 和水飞蓟宾 (腹腔注射, 100 mg/kg) 作为阳性对照组, 于注射 ConA 16h 时, 检测各组小鼠血清中 ALT 和 AST

含量。结果如图 2 所示, 在 100mg/kg 剂量预保护下, ConA+ 双环醇、ConA+ 水飞蓟宾和 ConA+ 唐古特虎耳草甲醇提取物实验组在造模 16h 时, 血清中 ALT、AST 与 ConA 组相比均明显降低 ($p < 0.01$)。



注: 与 Control 组比较, *** 代表差异极显著 ($P < 0.001$); 与 ConA 组比较, ## 代表差异显著 ($P < 0.01$), ### 代表差异极显著 ($P < 0.001$)。

图 2 不同药物处理对 ConA 致小鼠肝损伤的保护作用 ($n=7$)

综合以上实验结果,可得出唐古特虎耳草甲醇提取物具有显著抗肝损伤活性的结论。

2 实验内容

2.1 药材

唐古特虎耳草,2016年8月采自青海省果洛藏族自治州,由中国科学院西北高原生物研究所梅丽娟教授鉴定为唐古特虎耳草(*Saxifraga tangutica* Engl.)原植物,药材标本存放于青藏高原生物博物馆,标本编号为0325734。

2.2 仪器与试剂

高效液相色谱仪(日本岛津公司),色谱级乙腈(云南新蓝晶化工公司),旋转蒸发仪(日本东京理化公司),DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)购于Sigma-Aldrich。

2.3 分析条件

HPLC 色谱条件:色谱柱为 ReproSil Pur-C18 AQ

(4.6×250mm,5μm),流动相为乙腈/水,梯度洗脱0~60min,5%~50%乙腈,进样体积5μL,柱温30℃,流速1.0mL/min,检测波长为254nm。

DPPH 色谱条件:流动相为 DPPH 乙醇溶液,溶液浓度为25μg/mL,DPPH 流速0.8mL/min,检测波长为517nm。

2.4 样品溶液配制

将唐古特虎耳草干燥全草采用纯甲醇溶液提取,将提取液浓缩后,取1.0mL样品溶液通过0.45μm的有机滤膜过滤。

2.5 在线 HPLC-DPPH 系统筛选

将唐古特虎耳草样品用 ReproSil-Pur C18 AQ 色谱柱进行色谱条件优化,使其色谱峰均匀分布在色谱图上,并采用 HPLC-DPPH 在线活性筛选,筛选色谱图如图3所示,254nm 波长下为正常的分离色谱图,517nm 下为 DPPH 色谱图。由图可知,唐古特虎耳草在 517nm 波长下有明显的倒峰,证明其具有明显的抗氧化活性。

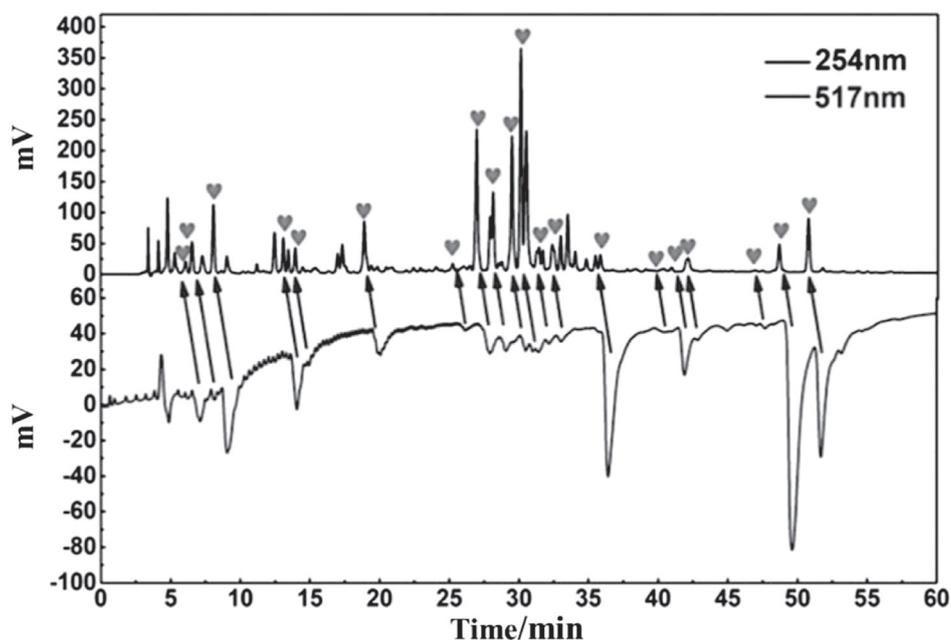


图3 唐古特虎耳草 HPLC-DPPH 活性筛选色谱图

根据其活性导向结果进行制备分离,最终从唐古特虎耳草甲醇提取物中分离并鉴定了七个二芳

基壬烷类新化合物,且均有明显的抗氧化活性,是抗肝损伤药物的潜在活性成分,其结构如图4所示。

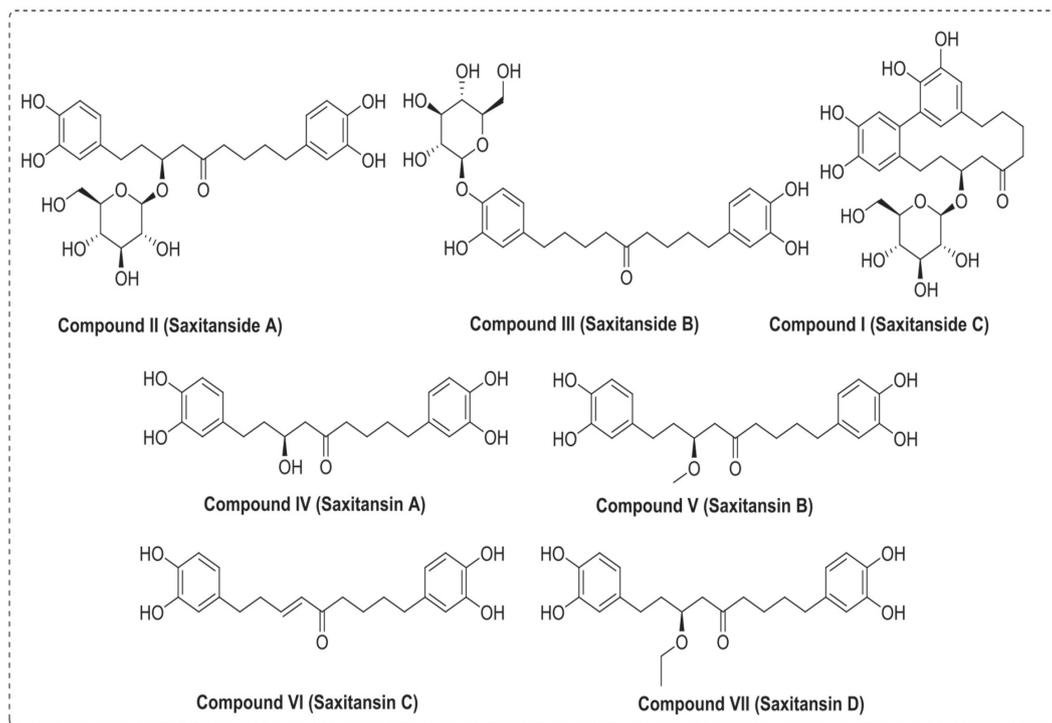


图4 唐古特虎耳草甲醇提取物中分离鉴定的二芳基壬烷类化合物

3 总结

本文通过小鼠实验证实唐古特虎耳草具有显著的抗肝损伤活性，由于氧化应激与肝损伤具有极大的相关性，是治疗肝损伤疾病的重要途径。故本文实验以 DPPH 自由基为靶标，采用 HPLC-DPPH 在线筛选色谱联用技术，筛选唐古特虎耳草中活性色谱峰，开展对唐古特虎耳草中自由基抑制剂的研究，可为抗肝损伤药物的研发提供先导化合物，推动其在相关医药领域的深入开发与应用。

参考文献:

- [1]赵文玺,金梅花,李天,等.草苈蓉水萃取物对四氯化碳致肝损伤小鼠肝脏氧化应激的干预作用[J].中国中药杂志,2013,38(6):875-878.
- [2]邓青芳,周欣,陈华国.多糖抗肝损伤作用及其机制研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(16):2958-2967.
- [3]中国科学院西北高原生物研究所.藏药志[M].西宁:青海人民

出版社,1991:104-107.

- [4]潘锦堂.中国虎耳草属的研究[J].植物分类学报,1991,29(1):1-24.
- [5]卓玛东智,秀措.藏药甘青虎耳草质量标准研究[J].中国民族医药杂志,2015,21(5):51-52.
- [6]李玉兰.藏药甘青虎耳草的化学成分及药理作用研究[D].兰州:兰州理工大学,2011.
- [7]DANG J,ZHANG L,WANG Q L,et al.Target separation of flavonoids from *Saxifraga Tangutica* using two-dimensional hydrophilic interaction chromatography /reversed-phase liquid chromatography[J].Journal of Separation Science,2018,41(24):1-11.
- [8]DANG J,TAO Y D,SHAO Y,et al. Antioxidative extracts and phenols isolated from Qinghai-Tibet Plateau medicinal plant *Saxifraga tangutica* Engl[J].Industrial Crop and Products, 2015,78:13-18.
- [9]王日康,杜小浪,慕泽泾,等.3种虎耳草属药材提取物对CCl4致小鼠急性肝损伤防治作用的比较[J].中成药,2018,40(7):1595-1599.