

# 广元杜仲与市售不同商品等级杜仲 提高免疫和保肝作用的比较研究

熊秋韵, 彭成\*, 高继海, 谢晓芳\*

成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137

**摘要:** 制备广元精制杜仲、市售杜仲的水提液, 以比较其提高免疫、保肝作用的强弱。通过建立氢化可的松、环磷酰胺致免疫低下小鼠模型, 观察不同杜仲水提物对碳粒廓清指数 K、吞噬指数  $\alpha$ 、外周血细胞数和免疫器官脏器系数的影响; 采用四氯化碳致急性肝损伤小鼠模型, 观察不同杜仲水提物对肝脏系数、血清 ALT、AST 活力和肝组织 SOD 活力、MDA 含量的影响。广元杜仲水提物能明显提升免疫低下小鼠的吞噬指数  $\alpha$  ( $P < 0.01$ ); 杜仲水提物均使外周血中 PLT 含量趋近于正常值, 其中二等杜仲对 RBC 的升高作用明显 ( $P < 0.05$ ); 均可降低急性肝损伤模型小鼠血清 ALT、AST 活力, 广元杜仲对 ALT 的下调作用最佳 ( $P < 0.01$ ), 而二等杜仲降低 AST 的作用最显著 ( $P < 0.01$ ), 均能明显升高肝组织内的 SOD 活力 ( $P < 0.01$ ), 二等、三等杜仲可显著减少 MDA 含量 ( $P < 0.01$ )。综上所述, 广元杜仲精制饮片和两种商品等级杜仲均有提高免疫功能和保肝的作用, 其中广元杜仲提高免疫功能效果最好, 二等杜仲的保肝效果最佳。

**关键词:** 杜仲; 商品等级; 提高免疫功能; 保肝

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019) Suppl-0009-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.S.002

## Comparative study among commercial *Eucommia ulmoides* Oliv. of different grades and *Eucommia ulmoides* Oliv. from Guangyuan on effects of immunity enhancement and liver protection

XIONG Qiu-yun, PENG Cheng\*, GAO Ji-hai, XIE Xiao-fang\*

Pharmacy College of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Characteristic Chinese Medicine Resources in Southwest China, Chengdu 611137, China

**Abstract:** To prepare water extract of *Eucommia ulmoides* Oliv. from Guangyuan and commercial *Eucommia ulmoides* Oliv. (EUO) of different grades, in order to compare the effects on enhancing immune function and protecting liver function among them. Through the immunosuppressive mice models which were made by injecting hydrocortisone subcutaneously, the immunity-enhancement capability of three kinds of EUO was tested by detecting the carbon clearance index K, the phagocytic index  $\alpha$ , and the index of immune organs. Through the immunosuppressive mice models which were made by injecting cyclophosphamide subcutaneously, the immunity-enhancement capability of three kinds of EUO was tested by detecting the number of peripheral blood cells and the index of immune organs. The acute liver injury model was induced by injecting  $\text{CCl}_4$  into mice abdominal cavity, then judge the effect of three kinds of EUO on liver protection by detecting the liver index, the levels of ALT and AST in serum, the SOD and MDA levels in liver tissues. As the result, the water extract of Guangyuan EUO could increase the phagocytic index  $\alpha$  of immunosuppressive mice greatly ( $P < 0.01$ ), all water extract of EUO could make PLT counts of immunosuppressive mice tend to be normal, while the second-class EUO obviously increased the RBC counts ( $P < 0.05$ ). Comparing with acute liver injury mice, all drug-treated group had a significant effect on decreasing the levels of ALT and AST in serum, and Guangyuan EUO reduced the ALT level evidently ( $P < 0.01$ ), while the AST level was distinctly lowered

收稿日期: 2019-05-13 接受日期: 2019-10-11

基金项目: 四川省中央引导地方科技发展专项 (2017JZYD0001); 四川省科技厅项目 (2017TD0001); 四川省科技厅科技支撑计划项目 (2014FZ0121)

\* 通信作者 Tel: 86-28-61800018; E-mail: pengchengchengdu@126.com, xxfl4544@163.com

by second-class EUO ( $P < 0.01$ ), third-class EUO and Guangyuan EUO ( $P < 0.05$ ). All drug treated groups obviously improved the level of SOD in liver tissues ( $P < 0.01$ ), and decreased MDA level in liver tissues evidently. Second-class and third-class EUO can lower the level of MDA in liver tissues distinctly ( $P < 0.01$ ). In conclusion, EUO from Guangyuan and commercial EUO of different grades all have effects on immunity-enhancement and liver protection. EUO from Guangyuan has the most obvious effect on immunity enhancement, while the second-class EUO's effect on liver protection was the best.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* Oliv. ; commercial grade; immunity enhancement; liver protection

杜仲(EUO)是杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮,主要功效为补肝肾、强筋骨,具有保肝、增强免疫等作用,近年来更是将其作为热门的保健品开发资源<sup>[1,2]</sup>。依据《七十六种药材商品规格标准》,商品杜仲按其宽度和厚度分为特等、一等、二等和三等。目前,围绕杜仲药材质量评价的研究,内容均集中在其所含的化学成分、成分含量测定及指纹图谱的建立上,而并未涉及药效学研究<sup>[3-7]</sup>。因药物的质量优秀与否最终取决于其临床效果,而仅从化学成分去判断药材好坏并不全面,所以应当结合其生物学活性综合评价。

四川广元作为杜仲的道地产区之一,为保障并提升杜仲的药材质量,而不断探索、优化其规范化种植与精深加工技术,但其实际药效如何暂不明了<sup>[8]</sup>。作为杜仲药材质量控制的评价指标,除了对化学成分进行含量测定之外,亦应从生物活性来综合反映其品质。基于此,本课题将获得的广元杜仲精制饮片与从市场购买的不同商品等级的杜仲饮片进行生物学比较,主要围绕增强免疫功能、保肝这两个药理作用,采用氢化可的松、环磷酰胺致小鼠免疫低下模型和四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型开展药效对比研究,以初步了解广元杜仲的药理作用,为其道地性提供更多科学证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验药物

生杜仲,包括二等杜仲、三等杜仲和广元杜仲。其中,二等杜仲、三等杜仲均购于北京同仁堂健康药业(福州)有限公司(批号20160901);广元杜仲由广元亿明生物科技有限公司杜仲种植基地提供。经成都中医药大学药教研室专家鉴定,3批药材饮片均为正品,为杜仲科植物杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)的树皮。根据《七十六种药材商品规格标准》,广元杜仲的商品评级为二等。经含量测定,确认3批杜仲所含松脂醇二葡萄糖苷均高于0.10%,符合药典标准。各药分别称取300 g,加8倍量水浸泡30 min后煮1 h,再加4倍量水,煎煮2次,第一次40 min,第二次20 min,合并3次滤液,浓缩,用前稀

释至实验所需浓度。左旋咪唑片(桂林南药股份有限公司,批号ZX161005);联苯双酯滴丸(万邦得制药集团股份有限公司,批号A02150311)。

### 1.2 动物

昆明种小鼠,SPF级,体重18~22 g,雌雄各半,由四川省中医药科学院实验动物研究中心提供,生产许可证号:SCXK(川)2013-15。

### 1.3 试剂

氢化可的松(天津金耀药业有限公司,批号1409071);环磷酰胺(江苏盛迪医药有限公司,批号16120125);四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )(成都市科龙化工试剂厂,批号2014061301)。溶血剂(天津海迈医用科技有限公司,批号11702081);谷丙转氨酶(ALT)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号20170401);谷草转氨酶(AST)测试盒(南京建成生物工程研究所生产,批号20170406);考马斯亮蓝(南京建成生物工程研究所,批号20170407);超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20170402);丙二醛(MDA)测试盒(南京建成生物工程研究所,批号20170331)。

### 1.4 仪器

VARIOSKAN FLASH 2.4.3 全波长多功能读数仪(美国 Thermo 公司);AL104 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);MEK-6218K 型血细胞分析仪(日本光电仪器公司)。

### 1.5 实验方法<sup>[9]</sup>

#### 1.5.1 氢化可的松致小鼠免疫低下试验

取正常、合格昆明种小鼠60只,雌雄各半,按体重随机分为空白对照组、模型对照组、左旋咪唑组、二等杜仲组、三等杜仲组、广元杜仲组,每组10只。待适应环境后,各组分别按体重灌胃给予10 mL/kg·d<sup>-1</sup>的蒸馏水、30 mg/kg的左旋咪唑、3.3 g/kg的各杜仲水提物,每日1次,连续10天。于灌胃第1、3、5、7、9天,除空白对照组外,各组小鼠在灌胃前皮下注射氢化可的松40 mg/kg,制备小鼠免疫低下模型。隔日称重1次。于末次给药1 h后,尾静脉注射经生理盐水稀释3.5倍的墨汁0.01 mL/g,分别

于 2 min 及 10 min 后眼眶取血 20  $\mu\text{L}$ , 并将其加入 2 mL 的 0.1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液中。用全波长多功能读数仪在 600 nm 波长处分别测定其 2 min 时所取血液的吸光度值  $\text{OD}_1$  和 10 min 时所取血液的吸光度值  $\text{OD}_2$ , 以 0.1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液作为空白对照校零。然后处死小鼠, 剖取胸腺、脾脏和肝脏, 称重, 计算脏器系数。计算碳粒廓清指数  $K$  和吞噬指数  $\alpha$ 。具体计算方法如下:

$$\text{碳粒廓清指数 } K = (\lg \text{OD}_1 - \lg \text{OD}_2) / (t_2 - t_1)$$

$$\text{吞噬指数 } \alpha = K^{1/3} \times \text{体重} / (\text{肝重} + \text{脾重})$$

$$\text{脏器系数} = \text{脏器重量}(\text{g}) / \text{小鼠体重}(\text{g}) \times 100\%$$

### 1.5.2 环磷酰胺致小鼠免疫低下试验

取正常、合格昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 分组及给药同 2.1。于灌胃第 1、3、5、7、9 天, 除空白对照组外, 各组小鼠在灌胃之前皮下注射环磷酰胺 35 mg/kg。隔日称重 1 次。于给药第 5 天, 各组小鼠眼眶取血, 采用血细胞分析仪测定外周血中 WBC、RBC、HGB、PLT 数量; 末次给药后 24 h, 称重, 各组小鼠眼眶取血, 再次测定外周血中 WBC、RBC、HGB、PLT 数量; 然后处死小鼠, 剖取胸腺、脾脏和肝脏, 称重, 计算脏器系数。脏器系数计算方式同 1.5.1。

### 1.5.3 四氯化碳致小鼠急性肝损伤试验

取正常、合格昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 按体重随机分为空白对照组、模型对照组、联苯双酯组、

二等杜仲组、三等杜仲组、广元杜仲组, 每组 10 只。待适应环境后, 各组分别按体重灌胃给予 10 mL/kg·d<sup>-1</sup> 的蒸馏水、200 mg/kg 的联苯双酯滴丸、3.3 g/kg 的各杜仲水提物, 每日 1 次, 连续 7 天。于第 7 天给药 1 h 后, 除正常组注射大豆油外, 其余组均腹腔注射含有 0.35%  $\text{CCl}_4$  的大豆油溶液, 给药体积为 10 mL/kg。禁食不禁水 24 h 后, 各组小鼠眼眶取血, 测定血清 ALT、AST 活力; 同时立即解剖, 剖取肝脏称重, 计算脏器系数, 并取肝组织 300 mg 左右, 匀浆, 用于测定肝组织 SOD、MDA 水平。脏器系数计算方式同 1.5.1。

### 1.6 数据处理

所有实验数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行分析, 组间比较采用单因素分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 氢化可的松致小鼠免疫低下试验结果

#### 2.1.1 对小鼠单核巨噬细胞吞噬活性的影响

如表 1 所示, 与空白对照组比较, 模型组和左旋咪唑组、市售两种杜仲组的吞噬指数  $\alpha$  均降低, 而广元杜仲组的  $\alpha$  值高于空白对照组; 与模型对照组相比, 广元杜仲的  $\alpha$  值明显升高 ( $P < 0.01$ )。模型对照组的碳粒廓清指数  $K$  较空白对照组降低, 各杜仲组的  $K$  值均高于空白对照组和模型对照组, 但都无显著性差异。

表 1 不同杜仲对氢化可的松致免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of different EUO on macrophage phagocytic activity of immunosuppressive mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	碳粒廓清指数 $K$ The carbon clearance index $K$	吞噬指数 $\alpha$ The phagocytic index $\alpha$
空白对照 Control	-	0.018 1 $\pm$ 0.004 3	4.604 4 $\pm$ 0.651 2
模型对照 Model	-	0.014 6 $\pm$ 0.006 6	4.117 3 $\pm$ 0.960 5
左旋咪唑 Levamisole	0.03	0.015 0 $\pm$ 0.008 7	4.404 6 $\pm$ 0.960 5
二等杜仲 Second-class EUO	3.3	0.019 2 $\pm$ 0.006 6	4.594 6 $\pm$ 0.844 7
三等杜仲 Third-class EUO	3.3	0.018 8 $\pm$ 0.004 8	4.409 1 $\pm$ 0.661 2
广元杜仲 Guangyuan EUO	3.3	0.020 6 $\pm$ 0.009 6	5.393 9 $\pm$ 1.160 1**

注: 与模型对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model, \*\*  $P < 0.01$ .

### 2.1.2 对小鼠免疫器官脏器系数的影响

由表 2 可得, 与空白对照组比较, 各组的胸腺系数均明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型对照组比较, 仅左旋咪唑组的胸腺系数有升高趋势; 各组肝脏系数与空白对照、模型对照组比较均无明显差异, 其中以广

元杜仲组数值最低; 各组脾脏系数均低于空白对照组, 除三等杜仲和广元杜仲组明显偏低 ( $P < 0.05$ ) 外, 其余药物组数值相近, 左旋咪唑组的脾脏系数最大; 与模型对照组比较, 各药物组脾脏系数均无明显差异。

表2 不同杜仲对氢化可的松致免疫低下小鼠脏器系数影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 2 Effect of different EUO on organ index of immunosuppressive mice( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	胸腺系数 Thymus index (%)	肝脏系数 Liver index (%)	脾脏系数 Spleen index (%)
空白对照 Control	-	0.375 ± 0.077	5.306 ± 0.611	0.432 ± 0.114
模型对照 Model	-	0.139 ± 0.049 <sup>▲▲</sup>	5.509 ± 0.591	0.346 ± 0.074
左旋咪唑 Levamisole	0.03	0.143 ± 0.038 <sup>▲▲</sup>	5.079 ± 0.271	0.371 ± 0.238
二等杜仲 Second-class EUO	3.3	0.091 ± 0.033 <sup>▲▲</sup>	5.525 ± 0.626	0.337 ± 0.076
三等杜仲 Third-class EUO	3.3	0.104 ± 0.029 <sup>▲▲</sup>	5.741 ± 0.780	0.326 ± 0.044 <sup>▲</sup>
广元杜仲 Guangyuan EUO	3.3	0.108 ± 0.036 <sup>▲▲</sup>	4.965 ± 0.462	0.306 ± 0.084 <sup>▲</sup>

注:与空白对照组比较,▲ $P < 0.05$ ,▲▲ $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control,▲ $P < 0.05$ ,▲▲ $P < 0.01$ 。

## 2.2 环磷酰胺致小鼠免疫低下试验结果

### 2.2.1 对小鼠外周血细胞水平的影响

各组对免疫低下小鼠血细胞水平的影响如图1~4所示。与空白对照组比较,模型对照组的WBC数量明显降低( $P < 0.01$ )。与模型对照组比较,在给药第5天,除二等杜仲组外,各药物组的WBC数量均具有一定的升高趋势,其中三等杜仲、广元杜仲组较高;第11天,各药物组的WBC数量均具有一定的升高趋势,其中左旋咪唑、三等杜仲组相对较高,但均不具备统计学意义。各药物组的RBC在第5天均具有升高趋势,以左旋咪唑组和二等杜仲组的RBC数量最多;第11天,杜仲各药物组的RBC数量均在一定程度增加,其中二等杜仲组的RBC变化最明显( $P < 0.05$ )。在第5天时,各药物组的HGB水平平均稍高于模型对照组;第11天,各杜仲组的HGB

数量略高于模型对照组,但仍无统计学意义,其中二等杜仲组的HGB含量最高。于给药第5天,各药物组的PLT数量均低于模型对照组,其中左旋咪唑组的PLT水平最接近于空白对照组,其次是三等杜仲组;第11天,各组PLT数量均升高,药物组均低于模型对照组,各杜仲组中,三等杜仲的PLT水平相对而言最接近于空白对照组。

### 2.2.2 对小鼠免疫器官脏器系数的影响

由表3可见,同模型对照组比较,各药物组的胸腺系数均有升高趋势;各药物组的肝脏系数均低于模型对照组,且二等杜仲组具有显著性差异( $P < 0.05$ ),三等杜仲和广元杜仲组具有极显著性差异( $P < 0.01$ );除左旋咪唑组的脾脏系数与模型对照组相比具有极显著性差异( $P < 0.01$ ),各杜仲组虽具有升高趋势,但均无统计学意义。

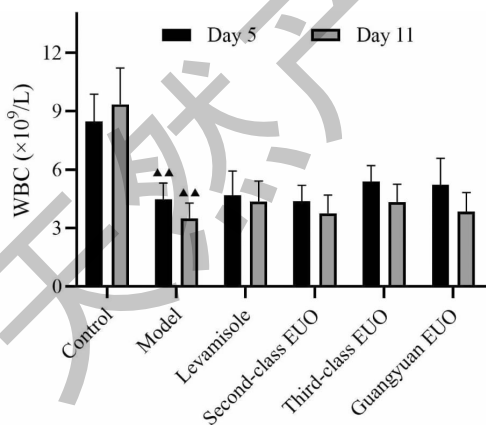


图1 不同杜仲对环磷酰胺致免疫低下小鼠外周白细胞数量的影响( $n=10$ )

Fig. 1 Effect of different EUO on WBC of immunosuppressive mice ( $n=10$ )

注:与空白对照组比较,▲▲ $P < 0.01$ 。Note:Compared with control,▲▲ $P < 0.01$ 。

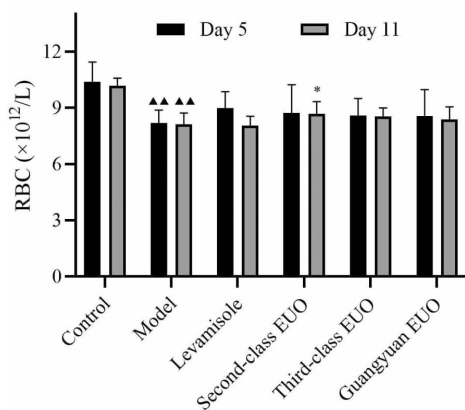


图2 不同杜仲对环磷酰胺致免疫低下小鼠外周红细胞数量的影响( $n=10$ )

Fig. 2 Effect of different EUO on RBC of immunosuppressive mice ( $n=10$ )

注:与空白对照组比较,▲▲ $P < 0.01$ ;与模型对照组比较,\* $P < 0.05$ 。Note:Compare with control,▲▲ $P < 0.01$ ; Compare with model,\* $P < 0.05$ 。

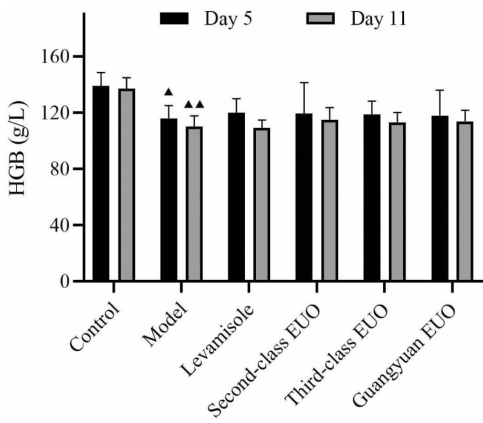


图3 不同杜仲对环磷酰胺致免疫低下小鼠外周血红蛋白数量的影响 (n = 10)  
Fig. 3 Effect of different EUO on HGB of immunosuppressive mice (n = 10)

注:与空白对照组比较, ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01. Note: Compared with control, ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01

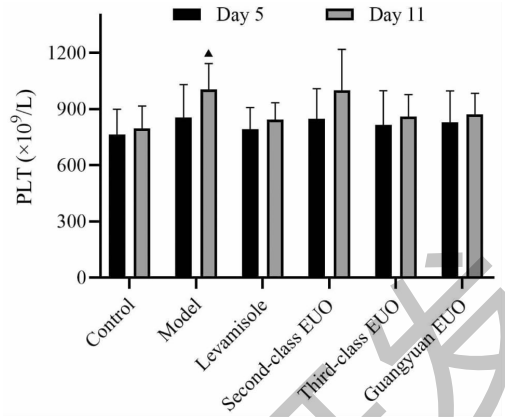


图4 不同杜仲对环磷酰胺致免疫低下小鼠外周血小板数量的影响 (n = 10)  
Fig. 4 Effect of different EUO on PLT of immunosuppressive mice (n = 10)

注:与空白对照组比较, ▲P < 0.05. Note: Compared with control, ▲P < 0.05.

表3 不同杜仲对环磷酰胺致免疫低下小鼠脏器系数的影响 (x̄ ± s, n = 10)

Table 3 Effect of different EUO on organ index of immunosuppressive mice (x̄ ± s, n = 10)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	胸腺系数 Thymus index (%)	肝脏系数 Liver index (%)	脾脏系数 Spleen index (%)
空白对照 Control	-	0.35 ± 0.10	5.40 ± 0.37	0.34 ± 0.04
模型对照 Model	-	0.09 ± 0.03▲▲	5.45 ± 0.46	0.22 ± 0.04▲
左旋咪唑 Levamisole	0.03	0.11 ± 0.04	5.39 ± 0.41	0.34 ± 0.10**
二等杜仲 Second-class EUO	3.3	0.10 ± 0.04	5.03 ± 0.37*	0.23 ± 0.08
三等杜仲 Third-class EUO	3.3	0.10 ± 0.03	4.93 ± 0.34**	0.24 ± 0.08
广元杜仲 Guangyuan EUO	3.3	0.11 ± 0.04	4.98 ± 0.31**	0.27 ± 0.07

注:与空白对照组比较, ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01; 与模型对照组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.  
Note: Compared with control, ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01; Compared with model, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

### 2.3 四氯化碳致小鼠急性肝损伤试验结果

#### 2.3.1 对小鼠肝脏系数的影响

由表4可得,与空白对照组相比较,造模后,模

型对照组及各药物组的肝脏系数均明显增大(P < 0.01)。其中,联苯双酯组的肝脏系数最大,三等杜仲组的肝脏系数最接近空白对照组。

表4 不同杜仲对 CCl<sub>4</sub> 所致肝损伤小鼠肝脏系数的影响 (x̄ ± s, n = 10)

Table 4 Effect of different EUO on liver index of mice with CCl<sub>4</sub>-induced liver injury (x̄ ± s, n = 10)

组别 Group	剂量 Dose (g/kg)	肝脏系数 Liver index (%)
空白对照 Control	-	4.04 ± 0.41
模型对照 Model	-	5.25 ± 0.14▲▲
左旋咪唑 Levamisole	0.2	5.37 ± 0.25▲▲
二等杜仲 Second-class EUO	3.3	5.09 ± 0.14▲▲
三等杜仲 Third-class EUO	3.3	5.07 ± 0.20▲▲
广元杜仲 Guangyuan EUO	3.3	5.17 ± 0.15▲▲

注:与空白对照组比较, ▲▲P < 0.01.  
Note: Compared with control, ▲▲P < 0.01.

### 2.3.2 对血清 ALT、AST 活力的影响

由图 5 可知,与空白对照组比较,模型对照组的 ALT、AST 均明显上升( $P < 0.01$ )。与模型对照组比较,联苯双酯组和广元杜仲组的 ALT 明显下降,联苯双酯组具显著性差异( $P < 0.05$ ),而广元杜仲组

具有极显著性差异( $P < 0.01$ );各杜仲组的 AST 都有明显降低,其中,三等杜仲和广元杜仲组具有显著性差异( $P < 0.05$ ),二等杜仲组则具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。

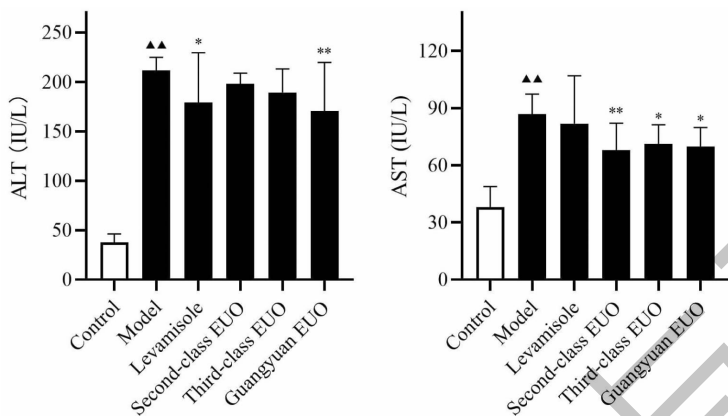


图 5 不同杜仲对  $\text{CCl}_4$  所致肝损伤小鼠 ALT 及 AST 的影响 ( $n = 10$ )

Fig. 5 Effect of different EUO on ALT and AST of mice with  $\text{CCl}_4$ -induced liver injury ( $n = 10$ )

注:与空白对照组比较,▲▲ $P < 0.01$ ;与模型对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。Note:Compared with control,▲▲ $P < 0.01$ ;Compared with model,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

### 2.3.3 对肝组织 SOD、MDA 水平的影响

如图 6 所示,与空白对照组比较,模型对照组的 SOD 水平明显下降( $P < 0.01$ ),MDA 含量稍有上升。与模型对照组比较,各药物组的 SOD 水平均明显升高( $P < 0.01$ );联苯双酯、二等杜仲、三等杜仲

组的 MDA 含量均显著降低,其中,联苯双酯组具显著性差异( $P < 0.05$ ),二等杜仲和三等杜仲组具有极显著性差异( $P < 0.01$ ),而广元杜仲组的 MDA 含量仅具有一定的下降趋势。

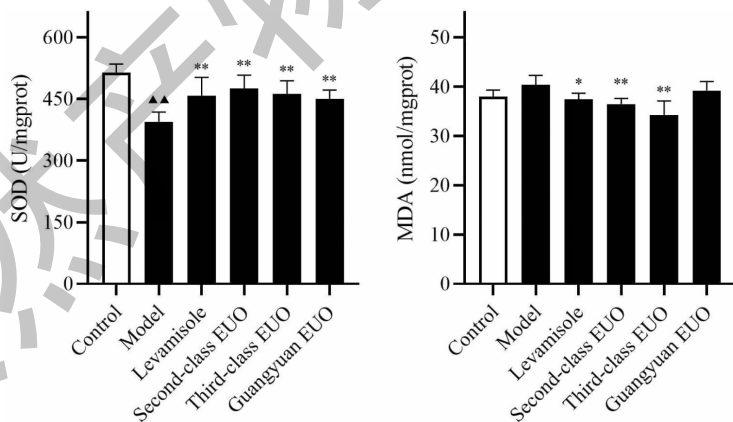


图 6 不同杜仲对  $\text{CCl}_4$  所致肝损伤小鼠 SOD 及 MDA 的影响 ( $n = 10$ )

Fig. 6 Effect of different EUO on SOD and MDA of mice with  $\text{CCl}_4$ -induced liver injury ( $n = 10$ )

注:与空白对照组比较,▲▲ $P < 0.01$ ;与模型对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。Note:Compared with control,▲▲ $P < 0.01$ ;Compare with model,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

杜仲性温味甘,为临床常用补阳药,《日华子本草》中记载其能“治肾劳,腰脊挛”,近年来,作为养

生保健品深受大众喜爱,开发前景一片大好。作为商品,杜仲有特等、一等、二等及三等之分,其分级的主要依据为杜仲的宽度、厚度<sup>[10]</sup>。然而,目前各地

药材市场上流通的杜仲药材质量不一,并没有进行规范处理,亦不存在商品学上的等级分类。孔强<sup>[11]</sup>等研究比较过 13 批不同产地的市售杜仲药材,发现市场上流通的杜仲药材的生长年限大多都较短且皮薄,其醇溶性浸出物虽都符合药典标准,但各样品的含量差异较大;此外,各药材样品中松脂醇二葡萄糖苷的含量也有不同程度的差异,其中,陕西杜仲和河南南阳杜仲的含量高,四川广元、青平等 4 个产区的杜仲次之。可见,市场流通杜仲的等级、质量比较混乱。四川广元建有全国最大的杜仲基地,占地面积达到 28000 公顷,杜仲皮的年产量可达到 2000 吨<sup>[12]</sup>。为使杜仲的饮片质量得到保证与提高,杜仲种植基地致力于规范化种植与精深加工技术的研究,本实验选用的广元杜仲即为当地生产的精制饮片,商品评级为二等。

目前认为,杜仲提高免疫、保肝作用的有效成分为多糖类和黄酮类。有报道给小鼠腹腔注射环磷酰胺并灌服杜仲多糖,能有效地拮抗由环磷酰胺引起的毒性反应,令胸腺、脾脏及肝脏指数有所提高,同时可使 MDA 的含量降低而 GSH、SOD、ALT 的水平升高,WBC、RBC、PLT 含量上升,骨髓 DNA 含量也有所上升<sup>[13]</sup>;杜仲多糖对 CCl<sub>4</sub> 所致肝纤维化大鼠的肝保护作用效果显著,可提升肝脏与脾脏系数,上调血清中 TP、ALB 的含量及白蛋白与球蛋白的比值,升高肝脏组织内 SOD 和 GSH-Px 的水平,并能减少血清中 HA、IV-C、LN、PCIII、GLOB 的含量,抑制血清 AST、ALT 的活力,下调肝脏组织内 MDA 水平及 Hyp 的含量<sup>[14]</sup>;杜仲总黄酮可使 CCl<sub>4</sub> 所致急性肝损伤模型小鼠的血清 ALT、AST 活力明显下降,MDA 含量显著减少,肝脏组织中的 SOD、GSH 的活性上升<sup>[15]</sup>;杜仲黄酮、槲皮素可使 Con A 刺激所致小鼠脾淋巴细胞增殖,同时促进 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的分泌<sup>[16]</sup>。综上,杜仲具有确切的增强免疫功能和保肝的作用,可作为评价杜仲质量中的生物学指标。

氢化可的松和环磷酰胺都是常用的免疫低下模型造模药物。前者为糖皮质激素,对体液免疫、细胞介导的免疫反应、肝脏巨噬细胞及 NK 细胞的活性都有抑制作用;后者为化疗药,通过破坏 DNA 的合成抑制细胞增殖,从而抑制体液免疫和细胞免疫<sup>[17,18]</sup>。此外,环磷酰胺还可诱导破坏或抑制骨髓细胞,导致外周血全血细胞减少,但是随作用时间延长,相应的造血骨髓有核细胞对药物的敏感性增加,又使 WBC、RBC、PLT 增生<sup>[19,20]</sup>。因此,本实验中选

用可反映机体巨噬细胞吞噬功能的碳粒廓清试验、环磷酰胺致小鼠免疫低下试验,对药物提高免疫作用进行评价。

CCl<sub>4</sub> 是一种被广泛应用于建立急性肝损伤模型的化学物质,其通过细胞色素 P<sub>450</sub> 依赖性混合功能氧化酶的代谢,在肝脏细胞内质网中生成 CCl<sub>3</sub>· 和 OOCCL<sub>3</sub>·,引发脂质过氧化反应和膜溶解作用,导致细胞损伤、坏死,转氨酶释放入血,AST、ALT 水平升高,故血清 ALT、AST 上升被认定为判断肝脏受损严重程度的重要指标<sup>[21]</sup>。因自由基的释放而发生的脂质过氧化反应可被 SOD 及体内其他抗氧化类酶抑制,机体清除氧自由基的能力可通过 SOD 活力的高低得到间接反映,而作为脂质过氧化反应的最终代谢产物,MDA 含量的高低可间接反应机体细胞受自由基攻击的严重程度<sup>[22,23]</sup>。所以,本实验采用血清 ALT、AST 水平和肝组织中 SOD、MDA 水平为药物保肝作用的评价指标。

在增强免疫研究中,从两个实验结果看,二等杜仲、三等杜仲和广元杜仲对氢化可的松导致的免疫低下小鼠巨噬细胞吞噬功能均具有保护作用,各组碳粒廓清指数 K、吞噬指数  $\alpha$  均接近甚至超过空白对照组,以广元杜仲的效果为最佳,其吞噬指数  $\alpha$  明显上升( $P < 0.01$ );而各药对免疫器官的脏器系数均无明显作用。对于环磷酰胺所致小鼠免疫低下模型,各杜仲组对外周血中的 WBC、RBC、HGB 水平都具有提升趋势,其中二等杜仲组的 RBC 水平最高( $P < 0.05$ );三等杜仲组的 PLT 水平最接近正常组,广元杜仲次之。各杜仲给药组的胸腺、脾脏系数均有升高趋势,以广元杜仲组的脾脏、胸腺系数最高;而各组的肝脏系数均有一定程度的降低( $P < 0.05$  或 0.01),二等杜仲组最接近于正常组,三等杜仲、广元杜仲组则低于正常组,这可能与各组小鼠自身状态差异有关。在保肝作用方面,经 CCl<sub>4</sub> 造模后,杜仲各药物组均能降低血清中 ALT、AST 的水平和肝组织中 MDA 的含量,并提高肝组织中的 SOD 水平。其中,广元杜仲对 ALT 的下调作用最明显( $P < 0.01$ ),三等杜仲次之;二等杜仲降低 AST 的作用最显著( $P < 0.01$ ),其次是广元杜仲、三等杜仲( $P < 0.05$ );三等杜仲、二等杜仲降低 MDA 含量的作用均较好,三等杜仲略优于二等杜仲( $P < 0.01$ );三种杜仲对 SOD 水平的上调作用都很明显( $P < 0.01$ ),以二等杜仲为最优,三等杜仲其次,广元杜仲略逊于前二者。

本研究结果表明,广元杜仲的提高免疫作用较好,既提升血细胞水平,又对免疫器官和巨噬细胞的吞噬作用有一定程度的保护作用,整体治疗效果优于市售二等杜仲和三等杜仲;二等杜仲对肝脏的保护作用最佳,广元杜仲在降低血清 ALT、AST 活力方面的作用较好,而三等杜仲则在增强肝脏的抗氧化能力方面有良好的作用。综上所述,广元杜仲具有增强免疫功能和保肝作用,且效果较好;但本研究也暴露了另一个问题,即虽同为正品药材,三个样品的杜仲,药理作用强度存在差异,且与等级划分不完全相符,体现了中药质量参差不齐和控制不好的现状。本结果提示对中药需进行全过程链溯源追踪,是保证药材和饮片质量的重要保障,同时生物性状评价、生物学评价和化学评价有机结合才能真正反映中药质量。

#### 参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:165.
- Feng H, Zhou HH, Ouyang DS. Chemical constituents and pharmacology of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Chin J Clin Pharm Thera (中国临床药理学与治疗学), 2015, 20: 713-720.
- Wu GH, Chen Y, Zheng LH, et al. Chemical constituents of *Eucommia ulmoides* in Guizhou Province. [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2015, 38: 980-984.
- Liu X, Zhou X, Zhou M, et al. Establishment and analysis of HPLC fingerprint *Eucommia ulmoides* Oliv. from Guizhou [J]. Her Med (医药导报), 2015, 34: 84-88.
- Zhou Y, Liu DP, Wang W, et al. Study on fingerprint of *Eucommia ulmoides* from Enshi by HPLC [J]. China Pharm (中国药师), 2014, 17: 2071-2074.
- Wang J, Zhou RB, Shan ZQ, et al. Dynamic change in pinoresinol diglucoside from *Eucommia ulmoides* in Hunan Province [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2014, 36: 2363-2366.
- Fan YB, Yuan MY, Zhang YS. Establishment of fingerprint of *Eucommia ulmoides* from Sichuan by HPLC [J]. Her Med (医药导报), 2016, 35: 1121-1124.
- Wang W, Wen H, Wang QH, et al. Correlation of *Eucommia ulmoides* bark yield and active ingredient content with growth and development characters [J]. Shandong Agri Sci (山东农业科学), 2017, 49: 55-58.
- Peng C. Chinese Medicine Animal-experimental methodology (中医药动物实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 1075-1076.
- Peng C. Chinese Genuine Medicinal Material (中华地道药材) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2013: 1142-1147.
- Kong Q, Lyu WH. Quality analysis of 13 batches of *Eucommia ulmoides* from different producing areas [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2010, 32: 803-805.
- Xu Y. The research on the material basis of genuineness *Eucommia ulmoides* medicinal [D]. Chengdu: Chengdu University of Technology (成都理工大学), 2015.
- Xin XM, Guo GL, Wang H, et al. Effect of *Eucommia Ulmoides* polysaccharide on toxicity of cyclophosphamide in mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2009, 20: 1664-1665.
- Zhou CY, Ai LY, Wang M, et al. Protection of *Eucommia ulmoides* polysaccharide on liver fibrosis [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2011, 42: 324-329.
- Jiang ZZ, Yuan DX, Hu Q, et al. Study on the protective effect of total flavonoids of *Eucommia ulmoides* on acute liver injury in mice [J]. Guangzhou Chem Ind Technol (广州化工), 2016, 4: 69-70.
- Wang ZH, Lei MS, Peng S, et al. Effects of flavonoid and flavone from *Eucommia ulmoides* Oliv. on proliferation of splenocytes and production of IL-2 and IFN- $\gamma$  in mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 514-518.
- Lyu YJ, Huang JM, Cai W, et al. Comparison of experimental murine immunodeficiency models induced by cyclophosphamide and hydrocortisone [J]. J Hyg Res (卫生研究), 2012, 41: 951-955.
- Lyu YJ, Huang JM, Cai W, et al. Establishment and verification of hydrocortisone-induced immunocompromised model in mice [J]. J Toxicol (毒理学杂志), 2013, 27: 194-196.
- Zhang Q, Peng HJ, Yu XB, et al. Establishment of a mouse model of cyclophosphamide-induced thrombocytopenia and determination of platelet function in this model [J]. J South Med Univ (南方医科大学学报), 2003, 23: 1277-1279.
- Fu R, Shao ZH, Liu H, et al. Proliferation of bone marrow hematopoietic stem cells and function of T helper lymphocytes of patients with immuno-related pancytopenia [J]. Chin J Hematol (中华血液学杂志), 2004, 25: 24-27.
- Chen XL, Qi YP. Changes of serum and liver tissue in mice with acute liver injury induced by carbon tetrachloride [J]. Chin J Vet Med (中国兽医杂志), 2011, 47: 39-40.