

# 壳聚糖降解衍生物的抗氧化活性及对药物性肝损伤纤维化的预防作用<sup>Δ</sup>

张迪\*,邢宇,王杨,孔敏,李新莉\*(大连医科大学生物技术系,辽宁大连 116044)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3498-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.12

**摘要** 目的:研究壳聚糖(CTS)降解衍生物的体外抗氧化活性及对药物性肝损伤纤维化的预防作用。方法:采用酸水解法制备不同水解时间(3、6、8、10 h)的CTS降解衍生物CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10,测定CTS及其降解衍生物的黏均分子量和脱乙酰度,通过检测其对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)和超氧负离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)自由基的体外清除能力评价其抗氧化活性。以CTS-10进行体内肝损伤纤维化的预防实验,将小鼠随机分为正常对照组(水)、模型组(水)和CTS-10高、中、低剂量组(100、50、25 mg/mL),每组8只,每天ig给药0.2 mL,连续24 d后停药;继而连续ig盐酸左氧氟沙星7 d建立药物性肝损伤模型(正常对照组除外)。采用Western blot法检测小鼠肝组织中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、转化生长因子β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>)和饰胶蛋白聚糖(Decorin)蛋白的表达。结果:CTS、CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10的黏均分子量分别为21.70×10<sup>4</sup>、6.70×10<sup>4</sup>、6.30×10<sup>4</sup>、5.01×10<sup>4</sup>、4.87×10<sup>4</sup>,脱乙酰度分别为83.44%、74.62%、67.28%、64.83%、54.23%;对DPPH和O<sub>2</sub><sup>-</sup>自由基均有一定的清除能力,其中CTS-10清除能力最强,分别为25.47%和56.31%。与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织中TNF-α、TGF-β<sub>1</sub>和Decorin蛋白表达均增强(P<0.05);与模型组比较,CTS-10中、高剂量组小鼠肝组织中TNF-α、TGF-β<sub>1</sub>和Decorin蛋白表达均减弱(P<0.01)。结论:CTS降解衍生物中CTS-10的黏均分子量和脱乙酰度较低,具有较强的体外抗氧化活性,对小鼠药物性肝损伤纤维化有一定的预防作用。

**关键词** 壳聚糖;降解衍生物;抗氧化活性;药物性肝损伤;肝纤维化;小鼠

## Antioxidant Activity and Preventive Effects of Chitosan Degradation Derivatives on Drug-induced Liver Injury Fibrosis

ZHANG Di, XING Yu, WANG Yang, KONG Min, LI Xinli (Dept. of Biotechnology, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the *in vitro* antioxidant activity of chitosan (CTS) degradation derivatives and its preventive effects on drug-induced liver injury fibrosis. METHODS: Acid hydrolysis method was used to prepare the CTS degradation derivatives CTS-3, CTS-6, CTS-8, CTS-10 for different hydrolysis time (3, 6, 8, 10 h). The viscosity-average relative molecular mass and deacetylation degree of CTS and its degradation derivatives were determined, and its antioxidant activity was evaluated by detecting its *in vitro* scavenging ability on 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) radicals. Using CTS-10 for *in vivo* liver injury fibrosis prevention test, mice were randomly divided into normal control group (water), model group (water), CTS-10 high-dose, medium-dose, low-dose groups (100, 50, 25 mg/mL), 8 in each group. Mice were intragastrically administrated 0.2 mL, then withdrawal after continuous 24 d. Then levofloxacin hydrochloride was intragastrically given for 7 d to establish drug-induced liver injury model (except for normal control group). Western blot method was used to detect the expressions of tumor necrosis factor α (TNF-α), transforming growth factor β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>) and Decorin protein in liver tissue of mice. RESULTS: The viscosity-average relative molecular mass of CTS, CTS-3, CTS-6, CTS-8, CTS-10 were 21.70×10<sup>4</sup>, 6.70×10<sup>4</sup>, 6.30×10<sup>4</sup>, 5.01×10<sup>4</sup>, 4.87×10<sup>4</sup>; and deacetylation degree were 83.44%, 74.62%, 67.28%, 64.83%, 54.23%, respectively. All of them had certain scavenging ability on DPPH and O<sub>2</sub><sup>-</sup>, in which, CTS-10 was the strongest (25.47% and 56.31%). Compared with normal control group, expressions of TNF-α, TGF-β<sub>1</sub> and Decorin protein in liver tissue in model group were enhanced (P<0.05). Compared with model group, expressions of TNF-α, TGF-β<sub>1</sub> and Decorin protein in liver tissue in CTS-10 medium-dose and high-dose groups were weakened (P<0.01). CONCLUSIONS: The viscosity-average relative molecular mass and deacetylation degree of CTS-10 in CTS degradation derivatives are lower with stronger antioxidant activity, and show certain preventive effects on drug-induced liver injury fibrosis in mice.

**KEYWORDS** Chitosan; Degradation derivatives; Antioxidant activity; Drug-induced liver injury; Liver fibrosis; Mice

药物性肝损伤(Drug-induced liver injury, DILI)是由

Δ 基金项目:辽宁省教育厅科学研究一般项目(No.L2016004)

\* 本科生。研究方向:生物制药。电话:0411-86110296。E-mail: 2711395747@qq.com

# 通信作者:讲师。研究方向:药物与肠道微生态。电话:0411-86110296。E-mail:lixinlibio@163.com

药物本身或其代谢产物所导致的肝脏损伤,是一种在中国乃至世界范围内常见的疾病,药物停用后自行缓解。DILI临床类型分为肝细胞型、胆汁淤积型、混合型3种,主要以肝细胞型肝损伤为主<sup>[1]</sup>。肝承担着药物清除、生物转化等功能,几乎所有药物都会对肝造成负担,引起肝损伤。中草药、中成药所致DILI比例占40%,然后依

次是抗生素、抗肿瘤药和抗结核药以及抗心血管病药物<sup>[2]</sup>。由于抗生素滥用情况严重,由其所致的DILI具有发生率高、病死率高、可预测性低等特点。其中,喹诺酮类抗生素如左氧氟沙星、环丙沙星等,都可能致暂时性DILI<sup>[3]</sup>,当其与一些药物联用时还可使毒性增加。

壳聚糖(Chitosan, CTS)化学名称为聚合 $\beta$ -(1, 4)-*N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺,水解可生成水溶性壳聚糖(Water soluble chitosan, WCS)和低分子壳寡糖(Chitooligosaccharide, COS)。已有研究表明,CTS及其衍生物有抗肿瘤和增强机体免疫功能作用<sup>[4-5]</sup>,对1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基和羟自由基有一定的清除能力<sup>[6]</sup>,可以抑制真菌、酵母菌、细菌等的生长<sup>[7]</sup>,还具有降脂<sup>[8]</sup>、调节肠道菌群失调<sup>[9]</sup>等活性。本文研究了不同黏均分子量和脱乙酰度(DD)的CTS降解衍生物的体外抗氧化活性和对DILI纤维化的预防作用,初步探讨了CTS降解衍生物的保肝护肝作用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

奥氏黏度计(昆山广测仪器设备有限公司);UVS-1涡旋振荡器(北京优晟联合科技有限公司);HC-3018R高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学有限公司);MV-II垂直板电泳装置、ST-I半干式转移电泳仪(大连竞迈生物科技有限公司);真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);全自动凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 药品与试剂

CTS原料药(济南海得贝海洋生物工程有限公司,批号:050112,DD: $\geq 80\%$ );盐酸左氧氟沙星胶囊(海口奇力制药股份有限公司,批号:H20055533,规格:每粒0.2 g);兔源 $\beta$ 肌动蛋白( $\beta$ -actin)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、饰胶蛋白聚糖(Decorin)抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);Pierce化学增强发光(ECL)试剂盒(美国Thermo公司);甲基橙、RIPA裂解液(北京索莱宝科技有限公司);DPPH(美国Sigma公司,批号:D9132-1G,纯度:99%);维生素C(天津市凯信化学工业有限公司,批号:XK13-2010344,分析纯);其他试剂均为市售分析纯。

### 1.3 动物

SPF级KM小鼠,♀♂各半,体质量18~22 g,由大连医科大学实验动物中心提供,动物合格证号为:SCXK(辽)2008-0002。本实验经大连医科大学伦理委员会批准通过。

## 2 方法

### 2.1 CTS降解衍生物的制备

称取2 g CTS 4份,分别装于250 mL锥形瓶中,加入200 mL的1%醋酸溶液,充分溶解后,加入10 mL浓HCl,并用牛皮纸封口后放入80℃的恒温水浴锅中水

解,4份溶液分别水解3、6、8、10 h。然后滴加1 mol/L的NaOH溶液中和,使CTS沉淀,4 000 r/min(离心半径6 cm,下同)离心10 min,用蒸馏水清洗沉淀物2次,调pH至7左右;继续4 000 r/min离心10 min,取沉淀物,冷冻干燥,得到CTS降解衍生物CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10。

### 2.2 黏均分子量的测定

将CTS、CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10各0.2 g分别溶于0.1 mol/L醋酸钠-0.2 mol/L醋酸缓冲溶液中,于50 mL量瓶中定容制成样品溶液。将奥氏黏度计固定在25℃的恒温水浴中,吸取10 mL样品溶液于奥氏黏度计中,平衡10 min,用秒表测定溶液的流出时间 $t$ ,连续测3次,每次结果相差不得超过0.1 s。同时,测定空白溶剂(0.1 mol/L醋酸钠-0.2 mol/L醋酸缓冲溶液)的流出时间 $t_0$ 。按一点法<sup>[10]</sup>计算各样品的黏均分子量。

### 2.3 DD的测定

分别称取约0.25 g的CTS、CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10,加入20 mL 0.1 mol/L HCl溶液,室温搅拌1 h至全部溶解,加入10 mL蒸馏水稀释,再加入3滴1%甲基橙指示剂,用0.1 mol/L NaOH溶液滴定至溶液由黄色变为红色,重复3次,按文献[11]计算各样品的DD。

### 2.4 体外抗氧化活性研究

2.4.1 DPPH自由基清除率的测定 称取DPPH 1 mg溶于20 mL二甲基亚砜(DMSO)中,避光保存备用。CTS、CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10分别用DMSO配制成质量浓度为13.3、20.0、26.6、53.3、67.7  $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,分别与DPPH溶液在室温下避光反应30 min,于519 nm波长处测定吸光度。以1 mg/mL维生素C为阳性对照,重复测定3次,计算CTS、CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10对DPPH自由基的清除率。

2.4.2 超氧负离子( $\text{O}_2^-$ )自由基清除率的测定 将0.1 mol/L HCl-Tris缓冲液(pH 8.2)和邻苯三酚溶液(用10 mmol/L HCl配制成50 mmol/L)在25℃水浴中保温备用。取4.5 mL HCl-Tris缓冲液加入4.4 mL蒸馏水、0.1 mL邻苯三酚溶液,摇匀后于325 nm波长处测定吸光度,记为 $A_0$ 。CTS、CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10分别用HCl-Tris缓冲液配制成质量浓度为14.43、16.89、18.87、18.95、22.57  $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,分别加入0.1 mL邻苯三酚溶液,摇匀,按上述方法测定吸光度,记为 $A_1$ 。以10 mmol/L HCl为空白对照、1 mg/mL维生素C为阳性对照,重复测定3次,计算CTS、CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10对 $\text{O}_2^-$ 自由基的清除率。

### 2.5 对DILI纤维化的预防作用考察

2.5.1 分组与给药 通过上述试验,筛选黏均分子量和DD较低且具有一定抗氧化活性的CTS-10进行体内DILI的预防作用研究。将CTS-10和盐酸左氧氟沙星分别溶于无菌水中制成水溶性CTS-10高、中、低浓度溶液(100、50、25 mg/mL)<sup>[12]</sup>和盐酸左氧氟沙星溶液(60

mg/mL)<sup>[13]</sup>。取小鼠随机分为正常对照组、模型组和CTS-10高、中、低剂量组,每组8只。正常对照组和模型组小鼠每天ig水0.2 mL,各给药组小鼠ig相应药物0.2 mL,24 d后停药;除正常对照组外其余各组小鼠继而ig盐酸左氧氟沙星溶液7 d,每天0.2 mL以建立DILI模型。第8天处死小鼠,迅速剥开肝脏,于-80℃保存备用。

**2.5.2 肝组织蛋白质提取** 取各组小鼠肝组织50~100 mg,剪碎,用预冷的生理盐水洗涤2次,加入0.5 mL预冷的蛋白裂解液[RIPA-甲苯基磺酰氟(100:1, V/V)],匀浆至95%的细胞破碎,在冰浴中放置30 min,4℃下12 000 r/min离心15 min,将上清液转移到新的离心管,分装,-80℃保存。电泳前,使用考马斯亮蓝法检测其中蛋白质浓度<sup>[14]</sup>。

**2.5.3 Western blot 法检测肝组织中TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、Decorin蛋白表达** 取“2.5.2”项下肝组织蛋白,进行常规十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。蛋白上样量为80  $\mu$ g,分离胶浓度10%,浓缩胶浓度5%,待预染蛋白分子量标准品(Marker)充分被分开,停止电泳。用半干式电转仪进行转膜,脱脂奶粉封闭NC膜1 h,分别与兔源 $\beta$ -actin(1:500稀释)、TNF- $\alpha$ (1:500稀释)、TGF- $\beta_1$ (1:500稀释)、Decorin(1:500稀释)抗体结合,4℃过夜,TBST缓冲液洗膜,加入HRP标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体(1:5 000稀释)孵育2 h,ECL发光,凝胶成像。以 $\beta$ -actin为内参,采用Quantity One 4.6.2软件进行蛋白灰度值分析,以目标蛋白与内参的灰度比值表示目标蛋白表达水平。

**2.5.4 统计学方法** 采用SPSS 10.0软件进行统计分析,正态计量指标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 黏均分子量和DD

CTS、CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10的黏均分子量分别为 $21.70 \times 10^4$ 、 $6.70 \times 10^4$ 、 $6.30 \times 10^4$ 、 $5.01 \times 10^4$ 、 $4.87 \times 10^4$ ,DD分别为83.44%、74.62%、67.28%、64.83%、54.23%。结果表明,随着水解时间的延长,CTS降解衍生物的黏均分子量减小,DD也相应减小。由于DD高的CTS分子内氨基和羟基含量较多,易形成较强的氢键,不溶于水;且由于氢键的存在,CTS分子具有一定规整性,易形成结晶区,也使其难溶于水<sup>[15]</sup>。因此,当DD为50%时CTS具有水溶性,DD>60%时CTS则不溶于水。综上,CTS-10的DD为54.23%,黏均分子量为 $4.87 \times 10^4$ ,具有较好的水溶性;其他CTS降解衍生物的水溶性均相对较差。

#### 3.2 抗氧化活性

维生素C对DPPH自由基和O<sub>2</sub><sup>-</sup>自由基的清除能力很强,清除率分别为93.89%和100%。在试验范围内,CTS、CTS-3、CTS-6、CTS-8、CTS-10对DPPH自由基和O<sub>2</sub><sup>-</sup>自由基均有一定的清除能力,但相对于维生素C,其

清除能力低很多,其中67.7  $\mu$ g/mL的CTS-10对DPPH自由基的清除率为25.47%,22.57  $\mu$ g/mL的CTS-10对O<sub>2</sub><sup>-</sup>自由基的清除率为56.31%,表明CTS-10具有一定的抗氧化活性。6种样品对DPPH和O<sub>2</sub><sup>-</sup>自由基的清除率-质量浓度曲线见图1。

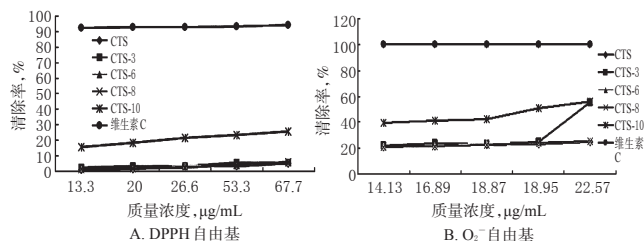


图1 6种样品对DPPH和O<sub>2</sub><sup>-</sup>自由基的清除率-质量浓度曲线

Fig 1 Scavenging rate-mass concentration curves of six samples on DPPH and O<sub>2</sub><sup>-</sup> radicals

#### 3.3 肝组织中TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、Decorin蛋白表达

与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、Decorin蛋白表达均明显增强( $P < 0.05$ );与模型组比较,CTS-10中、高剂量组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、Decorin蛋白表达均明显减弱( $P < 0.01$ )。各组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、Decorin蛋白表达的电泳图见图2,测定结果见图3。

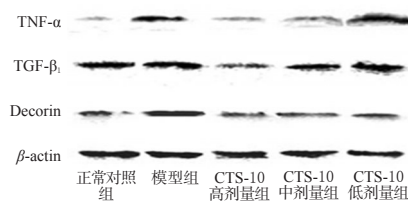
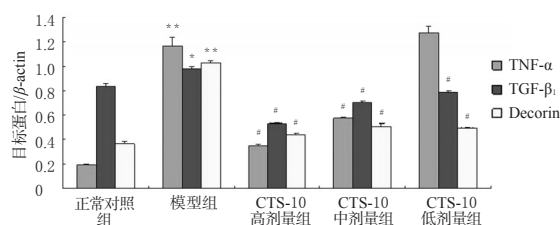


图2 各组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、Decorin蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoresis chart of expressions of TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$ , Decorin protein in liver tissue of mice in each group



注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.01$

Note: vs. normal control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ; vs. model group,\* $P < 0.01$

图3 各组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 、Decorin蛋白表达的测定结果

Fig 3 Determination results of expressions of TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$ , Decorin protein in liver tissue of mice in each group

## 4 讨论

药物具有二重性,一方面其能够防病治病,另一方面其也可危害机体,引起生理、生化功能的紊乱和组织结构发生病理改变。抗生素是临床治疗感染性疾病的主要药物,但长期大量使用抗生素会导致胃肠道反应、过敏反应、多器官损伤等<sup>[6]</sup>。盐酸左氧氟沙星主要用于治疗革兰氏阴性菌引起的炎症感染,临床应用较广。自2001年Karim A等<sup>[17]</sup>报道首例由左氧氟沙星致肺损伤的病例之后,陆续有类似病例出现。

在肝损伤的发生发展过程中,肝细胞线粒体和肝细胞膜被损伤,产生大量炎症介质并激活TNF- $\alpha$ 和TGF- $\beta_1$ ,促进肝星状细胞分泌众多细胞外基质(Extracellular matrix, ECM),导致了肝纤维化的发生和发展。Decorin作为ECM的一个主要组分,在正常肝脏中是微量的,其含量随纤维化进展而稳定增加,具有突出的抑制胶原纤维合成以及调控TGF- $\beta_1$ 活性的功能,在TGF- $\beta_1$ 功能调节中起重要作用。

CTS为甲壳素完全或部分脱乙酰化产物,是一种有生物相容性、生物降解性、生物活性且无毒的高聚物,具有广泛的开发前景<sup>[18]</sup>。但是较大黏均分子量的CTS导致其溶解度较低,限制了其在医学和食品工业中的应用。因此,低黏均分子量CTS的制备引起了人们的关注。

本研究结果表明,随着水解时间的加长,CTS水解产物的黏均分子量减小,DD也相应减小。其中CTS-10的黏均分子量和DD较低,具有较强的抗氧化活性,对小鼠DILI纤维化有一定的预防作用。

综上推测,CTS降解衍生物对DILI纤维化的预防作用机制可能与增强机体抗氧化能力,抑制TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta_1$ 和Decorin蛋白的表达有关。由于肠道与肝之间有着重要联系<sup>[19]</sup>,肠血液回流到门静脉,肠道菌群的组成会影响肝功能;反之,肝通过胆汁分泌也可影响肠道菌群功能,因此后续将开展肠道菌群与肝损伤的相关研究。

## 参考文献

- [1] Figueira-Coelho J, Pereira O, Picado B, et al. Acute hepatitis associated with the use of levofloxacin[J]. *Clin Ther*, 2010, 32(10):1733-1737.
- [2] 徐丽红,张蕾,陈卫刚,等.急性药物性肝损伤临床特点及预后分析[J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(22):3668-3671.
- [3] 林圣生,雷招宝. 25例左氧氟沙星致肝损伤患者的相关因素分析[J]. *抗感染药学*, 2014, 11(4):350-352.
- [4] 周艳芬,韩绍芳,倪志华,等.壳寡糖对HeLa细胞和A549细胞自噬性死亡的影响[J]. *科学技术与工程*, 2015, 15(7):24-29.
- [5] 张沛,韩宝芹,陈列欢,等.用酶解法制备壳寡糖及其对机体免疫功能的调节作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(2):191-196.
- [6] 姚倩,孙涛,徐轶霞,等.壳聚糖/壳寡糖衍生物的制备及

其抗氧化性能研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(2):188-191.

- [7] Hosseinnejad M, Jafari SM. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022.
- [8] Zhang HL, Tao Y, Guo J, et al. Hypolipidemic effects of chitosan nanoparticles in hyperlipidemia rats induced by high fat diet[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(4):457-461.
- [9] Muanprasat C, Wongkrasant P, Satitsri S, et al. Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: mechanism of action and potential applications in intestinal disorders[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 96(3):225-236.
- [10] Halal CY, Moura JM, Pinto LAA. Evaluation of molecular weight of chitosan in thin-layer and spouted bed drying[J]. *J Food Process Eng*, 2011, 34(1):160-174.
- [11] Thevarajah JJ, van Leeuwen MP, Cottet H, et al. Determination of the distributions of degrees of acetylation of chitosan[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.056.
- [12] Xu Y, Shi B, Yan S, et al. Effects of chitosan on body weight gain, growth hormone and intestinal morphology in weaned pigs[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2013, 26(10):1484-1489.
- [13] Li X, Yang G, Zhang C, et al. Improvement of intestinal microflora balance by polysaccharide from *Physalis alkekengi* var. *francheti*[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(2):677-682.
- [14] 周琪,曹雪姣,刘丽坤,等.冬瓜粗提物对小鼠紫外线晒伤皮肤的修复作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(9):1475-1478.
- [15] Hosseinnejada M, Jafari SM. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022.
- [16] 李新莉,吴大畅,张翠丽,等.盐酸林可霉素和头孢拉定对BALB/c小鼠肠道菌群影响的比较[J]. *中国药房*, 2012, 23(33):3089-3091.
- [17] Karim A, Ahmed S, Rossoff LJ, et al. Possible levofloxacin induced acute hepatocellular injury in a patient with chronic obstructive lung disease[J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 33(12):2088-2090.
- [18] Xia Z, Wu S, Chen J. Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis using hydrogen peroxide[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.04.034.
- [19] Dhiman RK. Gut microbiota and hepatic encephalopathy[J]. *Metab Brain Dis*, 2013, 28(2):321-326.

(收稿日期:2016-11-09 修回日期:2017-01-19)

(编辑:邹丽娟)