

· 毒理 ·

基于黄疸模型大鼠的栀子苷急性肝肾毒性研究

程生辉¹, 张妍妍¹, 李会芳^{1*}, 魏锦萍²

(1. 山西中医学院, 太原 030919; 2. 中国辐射防护研究院 药物安全评价中心, 太原 030006)

[摘要] 目的:观察栀子苷对 α -萘异硫氰酸酯(ANIT)所致黄疸模型大鼠的肝肾毒性作用,为栀子的临床安全用药提供参考。方法:Wistar大鼠190只,雌雄各半,随机分为空白组,模型不同时间组,栀子苷不同时间组,其中模型组和栀子苷组又分为0.5,1,2,4,8,12,24,48,72 h组,每组10只,模型组及栀子苷组采用ANIT($60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)ig一次造模,造模后24 h,栀子苷组灌以栀子苷($1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),模型组灌以同体积生理盐水。给药后模型组及栀子苷组分别在0.5,1,2,4,8,12,24,48,72 h对大鼠眼眶取血,离心获得血清,全自动生化仪测定丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(TBIL),血尿素氮(BUN),肌酐(CREA),取肝、肾组织进行病理检查。结果:与空白组比较,给予ANIT后,模型组及栀子苷组在8~72 h后ALP,ALT,AST,TBIL肝功能指标不同程度升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组同时点比较,栀子苷组在给予栀子苷48,72 h后血清中各项ALP,ALT,AST,TBIL肝功能指标显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),在给药24,48,72 h后BUN,CREA显著升高($P<0.01$);光镜下观察,栀子苷组及模型组不同时间点均出现不同程度的肝脏病理损伤,其中栀子苷组48,72 h肝脏病理损伤较模型组严重,模型组各时间点肾脏病理检查未见异常,而给药后24~72 h出现不同程度的肾脏病理损伤,其中以48 h最为严重。结论:栀子苷对ANIT黄疸模型大鼠具有明显的急性肝、肾毒性。

[关键词] 栀子苷; 黄疸动物模型; 肝毒性; 肾毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)04-0174-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040174

Acute Hepatotoxicity and Nephrotoxicity Study of Geniposide on Jaundice Rats CHENG Sheng-hui¹, ZHANG Yan-yan¹, LI Hui-fang^{1*}, WEI Jin-ping² (1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China; 2. China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the acute hepatotoxicity and nephrotoxicity of geniposide on α -naphthylisothiocyanate (ANIT)-induced jaundice rats, and to provide scientific basis for the clinical application of gardenia. **Method:** One hundred and ninety rats were divided into three following groups: the normal group, the model group and the geniposide group. The alanine aminotransferase (ALT), aspartic transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TBIL), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CREA) activity in serum were detected at different time. The morphological changes of liver and kidney tissue were observed under light microscope. **Result:** Compared with the normal group, the levels of AST, ALP, ALT, TBIL, BUN and CREA increased in the model and geniposide groups. The results in the geniposide group were even worse for AST, ALP and ALT at 48, 72 h, for BUN and CREA at 24, 48, 72 h than the model group. Under light microscope, serious pathological damage in liver and kidney tissue of rats were observed in the model and geniposide groups, which were more serious at 48, 72 h. **Conclusion:** Geniposide could cause acute liver and kidney injury on jaundice rats.

[Key words] geniposide; jaundice animal models; hepatotoxicity; nephrotoxicity

栀子卫生部公布的首批药食两用的药材之一,广泛应用于治疗湿热黄疸。栀子苷为其主要的

[收稿日期] 20140904(011)

[基金项目] 山西中医学院基础与临床计划项目(JC201112)

[第一作者] 程生辉,硕士,讲师,从事中医内科临床及基础研究,Tel:0351-3179716,E-mail:csh1979@126.com

[通讯作者] *李会芳,博士,副教授,从事中药药理及毒理学研究,Tel:0351-3179903,E-mail:sunshine_613@163.com

有效成分,现代药理研究表明栀子苷具有保肝利胆作用^[1-2],然而近年来其单独应用于正常动物体内却表现出明显的肝毒性^[3-6],引起了对栀子临床应用安全性的担忧。栀子苷是栀子产生保肝利胆作用和肝毒性双向作用的主要物质基础。因此本文选择栀子苷作为栀子肝肾毒性的研究载体。栀子苷的肝保护作用是采用病理损伤模型得出的结论,而肝毒性研究则采用正常动物,那么导致正常动物产生肝毒性的剂量对黄疸动物产生的是肝保护还是肝毒性(加重肝损伤),现有栀子安全性研究都采用正常动物,国内外此研究尚属空白。本文在《黄帝内经》“有故无殒亦无殒”思想指导下,在前期对正常大鼠的栀子苷急性肝肾毒性研究结果基础上,采用黄疸动物模型开展栀子苷急性毒性“时-毒”关系系统研究,为指导栀子临床合理用药提供直接客观依据。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 190 只,雌雄各半,体重(200 ± 20) g,购自北京维通利华实验技术动物有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2012-0004。大鼠常规适应饲养 1 周,自由摄食饮水。

1.2 药物及试剂 栀子苷(90%,南京泽朗植提生物科技有限公司,批号 20120311), α -萘异硫氰酸酯(ANIT, 98%,阿法埃莎化学有限公司,批号 10149460),橄榄油(欧丽微兰特级初榨橄榄油,批号 QS121602012375)。

1.3 仪器 JA4003 型电子精密天平(上海良平仪器有限公司),KONEL AB PRIME30 型全自动生化仪(美国 Thermo 公司),GL-21C 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 分组及给药 将大鼠随机分成空白组(生理盐水)、模型不同时间组(ANIT)、栀子苷不同时间组(ANIT + 栀子苷)。其中模型组和栀子苷组又分为 0.5,1,2,4,8,12,24,48,72 h 组,每组 10 只,雌雄各半。除空白组大鼠 *ig* 生理盐水外,其余动物 ANIT 60 mg·kg⁻¹(给药前以橄榄油新鲜配置为质量浓度为 6 g·L⁻¹,给药体积为 10 mL·kg⁻¹) *ig* 1 次。24 h 后栀子苷组 *ig* 栀子苷 1.2 g·kg⁻¹(给药质量浓度为 0.12 g·mL⁻¹ 0.5% CMC-Na 溶液,给药体积为 10 mL·kg⁻¹),模型组大鼠及空白组 *ig* 同体积生理盐水,并于相应的时间点(空白组于 *ig* 生理盐水后 24 h),用乙醚麻醉大鼠,眼眶静脉丛取血,室温放置 30 min 后,常温离心 15 min(3 000 r·min⁻¹),取血清,以全自动生化仪测定丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸

氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(TBIL),血尿素氮(BUN),肌酐(CREA)。同时摘取大鼠肝脏、肾脏,置于 10% 中性福尔马林溶液中编号保存,进行病理组织形态学检查。

2.2 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析,组间比较 LSD 多重比较方法,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析, $P < 0.05$ 为组间差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般观察 各组大鼠除正常组外,其他各组大鼠活动倦怠。栀子苷组大鼠给药 4 h 以后各组均出现排蓝色粪便现象,且尾部肛门处均染成蓝色,可能是栀子苷在动物体内的代谢产物栀子蓝引起的^[2]。此外,给药 48 h 组有 2 只大鼠死亡。

3.2 对黄疸大鼠肝功能的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中 ALP 在 0.5,1,8,12,24,48 h 时间点,ALT 在 8,12,24,48 h 时间点,AST 在 8,24 h 时间点,TBIL 在 4,8,12,24 h 时间点,各项肝功能指标显著升高($P < 0.05$),说明黄疸模型成功,而在给予 ANIT 72 h 后各指标与正常组比较无显著性差异,说明黄疸模型具有自我恢复趋势,已逐步恢复正常。与模型组同时时间点比较,栀子苷组 ALP 在 8 h,ALT,AST 在 24 h 时,呈现一过性降低的现象($P < 0.01$)。但之后 ALP 值在 72 h 时间点,ALT,AST 在 48,72 h 时间点,TBIL 在 24,48,72 h 时间点,大鼠血清中各肝功能指标显著升高($P < 0.01$),说明栀子苷在给药 48,72 h 后具有显著肝毒性,加重了 ANIT 已经造成的肝损伤,且在 48 h 达到最高峰。见表 1。

3.3 对黄疸大鼠肝脏组织形态学的影响 光镜下观察:正常组肝脏肝小叶结构完好,肝细胞未见明显变性、坏死;模型组及栀子苷组 0.5,1,2,4,8 h 病理表现基本相似,栀子苷组 0.5,1 h 可见汇管区少量炎细胞浸润及少量肝细胞核缩;模型组及栀子苷组 2,4,8 h 可见散发肝细胞坏死灶及汇管区炎细胞浸润;模型组 12 h 组可见偶见肝细胞坏死灶,汇管区少量炎细胞浸润,栀子苷组 12 h 组可见小灶状肝细胞坏死、汇管区少量炎细胞浸润;模型组 24 h 组可见汇管区少量炎细胞浸润、卵圆细胞轻度增生、髓外造血,栀子苷组 24 h 组可见大量肝细胞水样变、肝细胞脂肪变性、局灶性肝细胞坏死、炎细胞浸润;模型组 48 h 可见汇管区炎细胞浸润,纤维组织增生,栀子苷组 48 h 可见多灶性肝细胞坏死、汇管区炎细胞浸润,纤维组织增生;模型组 72 h 可见汇管区少量炎细胞及脂肪变性,栀子苷组 72 h 可见汇管区少

表 1 栀子苷对黄疸大鼠肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of geniposide on hepatic function of jaundice rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹
空白	10	-	259.29 ± 75.58	49.26 ± 7.94	164.06 ± 19.54	1.90 ± 0.51
模型 0.5 h	10	-	426.33 ± 123.93 ¹⁾	226.35 ± 64.98	431.74 ± 160.74	31.58 ± 12.14
模型 1 h	10	-	442.82 ± 134.50 ¹⁾	145.57 ± 69.70	358.04 ± 162.82	33.31 ± 17.26
模型 2 h	10	-	360.30 ± 141.06	224.59 ± 71.25	445.67 ± 154.98	26.78 ± 17.50
模型 4 h	10	-	370.37 ± 94.45	234.56 ± 46.11	468.25 ± 53.61	38.68 ± 27.84 ¹⁾
模型 8 h	10	-	684.90 ± 185.78 ²⁾	290.37 ± 123.79 ¹⁾	612.75 ± 247.20 ¹⁾	73.31 ± 25.46 ²⁾
模型 12 h	10	-	583.32 ± 326.31 ²⁾	456.27 ± 220.81 ²⁾	660.88 ± 290.56 ¹⁾	48.62 ± 21.15 ²⁾
模型 24 h	10	-	544.06 ± 223.83 ²⁾	872.94 ± 559.11 ²⁾	1 267.74 ± 792.28 ²⁾	60.69 ± 47.00 ¹⁾
模型 48 h	10	-	506.55 ± 133.06 ²⁾	320.80 ± 96.28 ²⁾	529.61 ± 176.01	32.22 ± 44.06
模型 72 h	10	-	363.01 ± 109.53	93.37 ± 16.30	953.52 ± 624.24	10.30 ± 4.53
栀子苷 0.5 h	10	1.2	448.18 ± 107.80 ¹⁾	199.80 ± 66.05	413.47 ± 157.48	24.70 ± 10.84
栀子苷 1 h	10	1.2	432.35 ± 53.34 ¹⁾	184.23 ± 108.34	437.99 ± 252.17	37.45 ± 29.73
栀子苷 2 h	10	1.2	397.30 ± 99.43 ¹⁾	226.23 ± 44.80	492.43 ± 137.14	38.25 ± 14.34 ¹⁾
栀子苷 4 h	10	1.2	399.21 ± 77.81	233.82 ± 83.86	549.27 ± 178.30 ¹⁾	43.77 ± 18.76 ¹⁾
栀子苷 8 h	10	1.2	476.74 ± 138.77 ^{2,4)}	291.66 ± 191.05 ¹⁾	635.80 ± 444.09 ¹⁾	70.22 ± 28.17 ²⁾
栀子苷 12 h	10	1.2	542.71 ± 245.81 ²⁾	305.49 ± 69.77 ²⁾	513.46 ± 161.21	52.74 ± 11.00 ¹⁾
栀子苷 24 h	10	1.2	690.68 ± 224.72 ²⁾	430.07 ± 264.61 ^{2,4)}	517.21 ± 542.30 ⁴⁾	153.62 ± 64.35 ⁴⁾
栀子苷 48 h	8	1.2	584.91 ± 147.31 ²⁾	762.05 ± 435.71 ^{2,4)}	1 574.36 ± 1151.5 ^{2,4)}	177.20 ± 79.73 ^{2,4)}
栀子苷 72 h	10	1.2	636.02 ± 246.71 ^{2,4)}	487.04 ± 390.78 ^{2,4)}	566.03 ± 483.46 ^{2,4)}	81.67 ± 75.97 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与模型组同时间点组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01 (表 2 同)。

量炎细胞、偶见肝细胞坏死灶。见图 1。

3.4 对黄疸大鼠肾功能的影响 与空白组相比,模型组大鼠血清中 BUN, CREA 等肾功能指标在 0 ~ 72 h 时间点均无显著性变化,说明 ANIT 对大鼠肾脏无明显毒性。与模型组比较,大鼠血清中 BUN, CREA 在给予栀子苷 24, 48, 72 h 后明显升高,且在 72 h 仍呈上升趋势,说明栀子苷在给药 24, 48, 72 h 之后,对大鼠产生明显急性肾毒性。见表 2。

3.5 对黄疸大鼠肾脏组织形态学的影响 光镜下观察:正常组及模型组各时间点、栀子苷组 0.5 ~ 4 h 组肾脏未见明显病理改变。栀子苷组 8 h 肾脏偶见 1 例髓质局部肾小管上皮细胞肿胀;给药后 12 h 可见髓质较多肾小管上皮细胞变性;给药后 24 h 可见皮质大量肾小管上皮细胞变性/脂肪变性,偶见管型,髓质多处肾小管坏死;给药后 48 h 可见皮质、髓质大片肾小管坏死,管型多见;72 h 可见髓质局部肾小管上皮细胞变性/脂肪变性。见图 2。

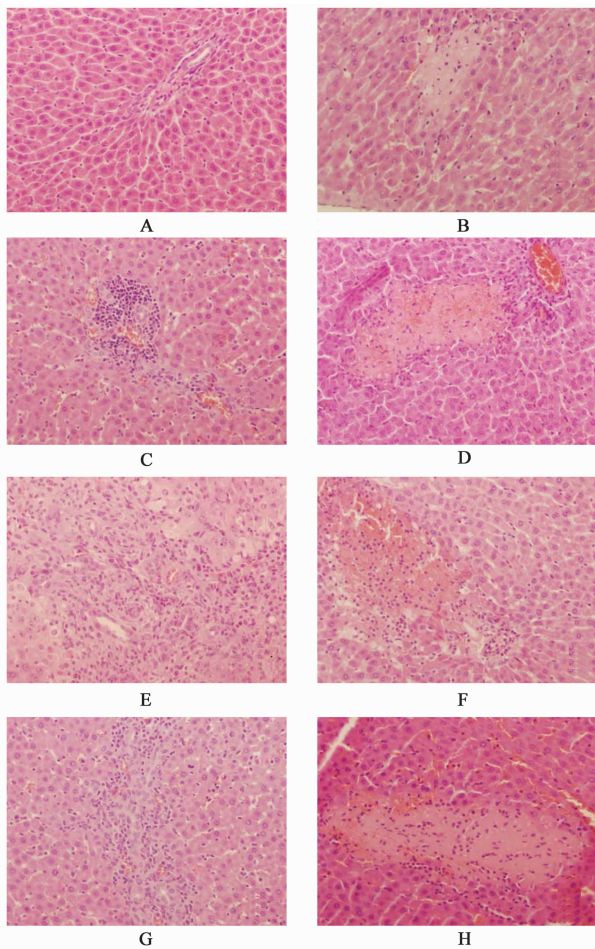
4 讨论

根据《黄帝内经》“有故无殒”的理论,“有病则病受之,反之无病则体受之。”是指在没有病邪存在的情况下,中药的偏性作用于正常机体,就有可能表现为毒性,反之,在有病邪存在的情况下,中药的偏

表 2 栀子苷对黄疸大鼠肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of geniposide on kidney function of jaundice rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	CREA /μmol·L ⁻¹
空白	10	-	7.94 ± 1.27	64.73 ± 8.87
模型 0.5 h	10	-	6.16 ± 0.86	67.19 ± 5.71
模型 1 h	10	-	6.43 ± 0.62	56.42 ± 5.34
模型 2 h	10	-	7.08 ± 1.36	55.54 ± 10.01
模型 4 h	10	-	6.78 ± 1.20	62.56 ± 7.15
模型 8 h	10	-	7.31 ± 1.28	70.02 ± 10.32
模型 12 h	10	-	5.84 ± 0.95	40.51 ± 20.76
模型 24 h	10	-	5.84 ± 0.95	63.38 ± 14.93
模型 48 h	10	-	7.61 ± 1.15	65.59 ± 5.47
模型 72 h	10	-	7.37 ± 0.85	62.86 ± 6.57
栀子苷 0.5 h	10	1.2	6.11 ± 0.89	61.87 ± 5.24
栀子苷 1 h	10	1.2	7.10 ± 1.58	70.02 ± 10.17
栀子苷 2 h	10	1.2	6.26 ± 1.54	59.06 ± 9.47
栀子苷 4 h	10	1.2	6.68 ± 1.06	68.23 ± 14.18
栀子苷 8 h	10	1.2	7.65 ± 1.29	78.05 ± 10.83
栀子苷 12 h	10	1.2	10.39 ± 5.84	34.81 ± 10.55
栀子苷 24 h	10	1.2	17.82 ± 9.21 ^{2,4)}	147.25 ± 62.01 ^{2,4)}
栀子苷 48 h	8	1.2	26.99 ± 6.35 ^{2,4)}	208.67 ± 73.41 ^{2,4)}
栀子苷 72 h	10	1.2	43.13 ± 14.27 ^{2,4)}	374.71 ± 144.97 ^{2,4)}

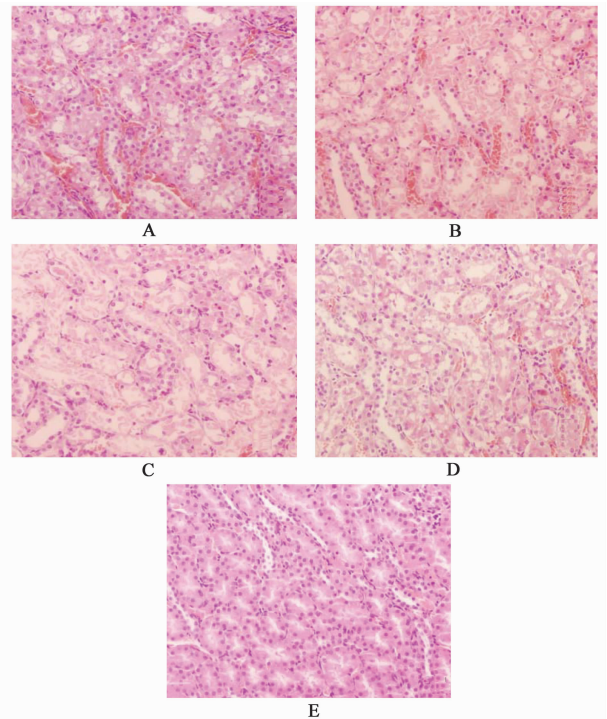


A. 正常组; B. 模型 12 h 组(散发肝细胞坏死); C. 模型 24 h 组(髓外造血); D. 栀子苷 24 h 组(局灶性肝细胞坏死); E. 模型 48 h 组(汇管区炎细胞浸润, 纤维组织增生); F. 栀子苷 48 h 组(多灶性肝细胞坏死); G. 模型 72 h 组(汇管区少量炎细胞浸润); H. 栀子苷 72 h 组(偶见肝细胞坏死)

图 1 栀子苷对黄疸大鼠肝脏组织形态学的影响(HE, ×200)

Fig.1 Effects of geniposide on liver tissue morphology of jaundice rats(HE, ×200)

性作用于病邪,就有可能消除病邪,使机体痊愈^[7]。因此,“有故无殒”思想提示在开展正常动物毒性研究的基础上,更应结合病证动物模型评价中药的安全性,反映临床应用的真实情况。从现代医学角度讲,肝脏既是栀子的药效靶器官又是毒性靶器官。肝脏的不同状态(肝药酶活性改变、肝内血流量改变、胆汁排泄受阻等)一定会带来栀子体内效应成分量-时变化,如体内药量和滞留时间等的改变,从而引起体内效应(包括药理活性和毒性)的差异。栀子的保肝作用药效学实验都是在肝损伤动物模型上完成的,那么栀子具有保肝作用是基于栀子在肝损伤状态下的体内代谢行为综合的结果;而在正常动物上进行的毒理学研究栀子具有肝毒性的结论,



A. 栀子苷 12 h 组(髓质较多肾小管上皮细胞变性); B. 栀子苷 24 h 组(髓质肾小管坏死); C. 栀子苷 48 h 组(髓质大量肾小管坏死); D. 栀子苷 72 h 组(髓质部分肾小管上皮细胞变性); E. 正常组

图 2 栀子苷对黄疸大鼠肾脏组织形态学的影响(HE, ×200)

Fig.2 Effects of geniposide on kidney tissue morphology of jaundice rats(HE, ×200)

却是基于栀子在肝脏正常状态下体内代谢行为综合的结果。因此需明确栀子在正常动物体内产生肝毒性的剂量作用于病证状态下的动物表现为肝保护还是肝毒性(加重肝损伤),此研究直接关系到临床病人在疾病状态下使用栀子的安全性问题。

本课题组前期对栀子苷单次给药对正常大鼠的“量-毒”及“时-毒”关系进行了研究。研究表明单次灌胃超过 $0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 栀子苷即可产生非常明显的肝肾毒性,在给药 24, 48 h 后 AST, ALP, ALT, TBIL, BUN, CREA 出现峰值, 72 h 后明显下降, 240 h 可见基本恢复正常。表明栀子苷对正常大鼠造成的急性肝肾毒性有一定的时-毒关系, 并且造成的损伤基本上是可逆性的。

黄疸模型大鼠自身存在肝功能损害动态演变, ANIT 进入大鼠体内 24 ~ 48 h 为其高峰期, 72 h 后开始趋于恢复正常。如何区别是黄疸模型本身的肝毒性, 还是栀子苷造成的肝毒性, 是保证本次试验结果可信的关键点。因此本文在给药每个时间点都设置了模型组同时时间点的对照, 并从血清肝肾功能检查和病理检查两个层面进行对照和相互参考。从本次实验研究结果来看剂量为 $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于栀

子生药量 200 g) 的栀子苷在灌胃后 24 ~ 72 h 血清中肝肾功能指标与模型组相比, 显著升高; 同时光镜下观察, 栀子苷组 48 h 及 72 h 肝脏病理损伤表现较模型组同时点严重; 模型组各时间点肾脏病理检查未见异常, 而给药后 24 ~ 72 h 出现不同程度的肾脏病理损伤, 其中以 48 h 最为严重。说明栀子苷在有黄疸模型的基础上加重了肝损伤, 并产生了急性肾毒性。但这种急性肝肾损伤是可逆的, 给药后 72 h 较 48 h ALT, AST 及 TBIL 明显下降, 肝脏纤维组织增生、卵圆细胞增生都说明肝脏进行自我修复, 给药后 72 h 肾脏中病理损伤也明显轻于 48 h 而趋于恢复 (BUN, CREA 值的下降存在一定的滞后性)。结合前期研究结果, 栀子苷对黄疸大鼠和正常大鼠的肝肾毒性时-毒轨迹是一致的, 给药后 24 h 出现毒性, 48 h 为毒性高峰, 72 h 表现出一定的自我修复趋势。提示在临床超大剂量用药无论是对正常机体还是病理损伤机体都是不安全的。

目前本课题正在进行栀子苷对正常动物和黄疸动物的“量-毒”关系对比研究。就药物的安全性评价而言, 单纯急性毒性研究尚不能为临床应用提供充分依据, 还应进行重复给药的“量-时-毒”关系研究, 本课题组将继续采用正常动物结合病证动物模型进行栀子的慢期毒性研究, 模拟临床给药的剂量

和疗程, 为临床用药提供客观真实的实验依据。

[参考文献]

- [1] 杨全军, 范明松, 孙兆林, 等. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展 [J]. 中国现代中药, 2010, 12 (9): 7-12.
- [2] 张燕, 朱华旭, 郭立玮. 栀子中环烯醚萜类化合物的体内过程及其对相关酶的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 269-273.
- [3] 杨洪军, 付梅红, 吴子伦. 栀子对大鼠肝毒性的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(13): 1091-1093.
- [4] 周淑娟, 李强, 刘卫红, 等. 栀子苷对大鼠肝指数、肝功能及肝脏微粒体中 CYP3A2 的影响 [J]. 中医研究, 2010, 23(3): 20-25.
- [5] Ding Y, Zhang T, Tao J S, et al. Potential hepatotoxicity of geniposide, the major iridoid glycoside in dried ripe fruits of *Gardenia jasminoides* (Zhi-zi) [J]. Nat Prod Res, 2013, 27(10): 929-933.
- [6] 林庆勋, 徐列明. 栀子水提液对小鼠的肝毒性及健脾保肝方的预防作用 [J]. 上海中医药大学学报, 2009, 23(6): 59-63.
- [7] 李会芳, 邢小燕, 金城, 等. 浅论《黄帝内经》“有故无殒, 亦无殒”的中医内涵及其在中药安全性评价中的意义 [J]. 中医杂志, 2008, 49(3): 281-282.

[责任编辑 周冰冰]