

栀子苷对正常大鼠急性肝、肾毒性的时-毒关系分析

程生辉¹, 唐超¹, 李会芳^{1*}, 魏锦萍²

(1. 山西中医学院, 太原 030619; 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:**考察栀子苷对正常大鼠急性肝、肾毒性的时-毒关系,为栀子临床安全应用提供科学依据。**方法:**Wistar大鼠110只,随机分为正常组,给药后不同时间组(0.5,1,2,4,8,12,24,48,72 h组),除正常组灌服生理盐水外,其余组按剂量 $1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌服栀子苷。按组在灌胃后相应时间眼眶静脉取血,离心取血清,检测血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),丙氨酸氨基转移酶(ALT),总胆红素(TBIL),尿素氮(BUN),肌酐(Cr)活性,观察肝肾毒性损伤情况。**结果:**与正常组比较,在给药12 h后AST,ALP,ALT,TBIL,BUN,Cr明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),在给药24,48 h后AST,ALP,ALT,TBIL,BUN,Cr出现峰值,72 h后明显下降,240 h可见基本恢复正常。病理组织学检查出现不同程度的汇管区炎细胞浸润、肝细胞坏死、汇管区胆管轻度增生、纤维组织增生等病理变化。**结论:**栀子苷($1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)对正常大鼠存在急性肝、肾毒性且存在一定的时-毒关系。

[关键词] 栀子苷; 肝毒性; 肾毒性; 时-毒关系

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0162-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010162

Time-toxicity Relationship of Geniposide on Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in Normal Rats

CHENG Sheng-hui¹, TANG Chao¹, LI Hui-fang^{1*}, WEI Jin-ping²

(1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China;

2. Drug Safety Evaluation Center in China Institute For Radiation Protection, Taiyuan 030006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the time-toxicity relationship of geniposide on hepatotoxicity and nephrotoxicity in normal rats, and provide scientific basis for the clinical application of gardenia. **Method:** The 110 Wistar rats were randomly divided into normal group, different time groups (0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h group). The rats in normal group received normal saline by gavage, and the rats in other groups received $1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ geniposide by gavage. Orbital venous blood was taken at corresponding time points after gavage, and the serum was taken by centrifugation. aspartate amino transferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), alkaline phosphatase (ALT), total bilirubin (TBIL), urea nitrogen (BUN), and creatinine (Cr) activities in serum were detected to indicate the toxicity of kidney and liver injury. **Result:** 12 h after administration of geniposide, AST, ALP, ALT, TBIL, BUN, and Cr levels were significantly higher than those in normal group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). 24 h and 48 h after administration of geniposide, AST, ALP, ALT, TBIL, BUN, and Cr levels came to peak values. 72 h after administration of geniposide, AST, ALP, ALT, TBIL, BUN, and Cr levels began to significantly decrease. 240 h after administration, the values basically returned to normal levels. In histopathologic examination, different degree's infiltration of inflammatory cells in portal area, necrosis of liver cells, mild

[收稿日期] 20150113(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573688);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

hyperplasia of bile duct in portal area, proliferation of fibrous tissue and other pathological changes were observe.
Conclusion: Geniposide at dose of $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ can cause acute liver and kidney injury on rats and show certain time-toxicity relationship.

[**Key words**] geniposide; hepatotoxicity; nephrotoxicity; time toxicity relationship

梔子为茜草科植物梔子 *Garden iajaminoides* 的干燥成熟果实,具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒之功,用于热病心烦,湿热黄疸,淋证涩痛,血热吐衄,目赤肿痛,火毒疮疡等^[1],为我国卫生部公布的首批药食两用的药材之一。梔子的化学成分复杂,国内外研究均表明环烯醚萜类成分为主要成分,其中梔子苷含量最高,可达 3% ~ 5%。自 1988 年以来陆续报道称梔子苷具有一定肝毒性^[2-9],但缺乏系统的量-毒及时-毒关系研究,其损伤是否可逆也未见报道。本实验旨在考察梔子苷对正常大鼠急性肝肾毒性的时-毒关系,为梔子临床安全应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 100 只,雌雄各半,体重 $(220 \pm 20) \text{ g}$,购自北京军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号 SCXK(军)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 梔子苷(90%)(南京泽朗科技医药有限公司,批号 20120311),天门冬氨基转移酶(AST)试剂盒(上海复星长征医学科学有限公司,批号 P1209011),丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(上海复星长征医学科学有限公司,批号 P1209021),总胆红素(TBIL)试剂盒(上海复星长征医学科学有限公司,批号 D1301043),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(上海复星长征医学科学有限公司,批号 D1403021),尿素(BUN)试剂盒(上海复星长征医学科学有限公司,批号 P11208021),肌酐(Cr)试剂盒(上海复星长征医学科学有限公司,批号 D1307073)。其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 JA4003 型电子精密天平(上海良平仪器有限公司),LD5-10 型低速离心机(北京医用离心机厂),Konelab PRIME 30 型全自动生化分析仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 分组和给药 将大鼠随机分为正常组(生理盐水)及给药后不同时间组,其中给药后不同时间组又分为 0.5,1,2,4,8,12,24,48,72 h 组,每组 10 只。根据前期课题组量-毒关系研究结果,为充分暴露梔子苷的肝肾毒性,梔子苷按 $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量

给药。

2.2 观察和检测 给药后按分组及不同时间点大鼠眼眶静脉取血,把收集到的血液样本室温放置 30 min 后, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取血清 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。使用全自动生化分析仪测定 ALP,ALT,AST,BUN,Cr,TBIL。剥离肝脏,置于 10% 甲醛溶液中保存,制作病理切片,光学显微镜下观察其形态学变化。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计,统计方法为单因素方差分析,组间比较采用 LSD 多重比较方法,计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况考察 各组大鼠在实验期间给药 12,24,48 h 有比较萎靡现象,给药后 4 h 时发现各组大鼠部分尾巴上有蓝色斑点,两天后消失,可能是梔子苷的代谢产物梔子蓝造成的结果。死亡情况:给药后 48 h 组,72 h 组各死亡 2 只大鼠,240 h 组死亡 3 只大鼠。

3.2 对正常大鼠肝功能的影响 与正常组比较,给药后 12,24,42,78 h,大鼠 AST,ALP,ALT,TBIL 均明显升高,均具有不同程度的显著性差异。其中 ALT,AST 在 12 h 开始升高,在 24 h 时达峰值,48 h 后开始降低,并于 240 h 基本恢复正常;另外 ALP,TBIL 在 12 h 后开始升高,在 48 h 达峰值,72 h 后开始降低,也于 240 h 基本恢复正常 ($P < 0.05, P < 0.01$)。以上实验结果表明梔子苷对肝脏有明显的急性肝毒性,且呈现一定的时-毒关系,并且造成肝损伤是可逆的。见表 1。

3.3 对大鼠肝脏组织形态学的影响 正常组,0.5,1,2,4 h 组肝脏肝小叶结构完好,肝细胞未见明显变性、坏死;8 h 组和 12 h 组分别有 4 例观察到汇管区炎细胞浸润,4 例出现肝细胞脂肪变性,且 12 h 组的脂肪变性较 8 h 组严重;24 h 组所有大鼠肝细胞脂肪变性,并出现局灶性肝细胞坏死或大片肝细胞坏死;48 h 组所有大鼠都出现大片肝细胞坏死或汇管区周围肝细胞坏死;2 例出现卵圆细胞轻度增生;72 h 组 4 例观察到局灶性肝细胞脂肪变性,3 例局灶性肝细胞坏死,汇管区胆管轻度增生,少量炎细

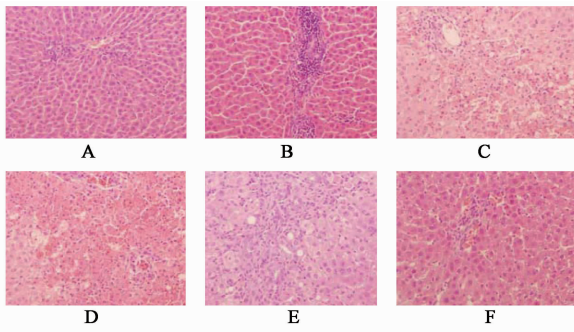
表 1 栀子苷给药后不同时间对正常大鼠肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of geniposide on hepatic function of normal rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹
正常	-	135.21 ± 20.86	196.37 ± 90.65	42.25 ± 9.50	3.39 ± 1.60
0.5 h	1.2	154.55 ± 26.03	223.70 ± 143.82	38.79 ± 8.92	4.41 ± 2.31
1 h	1.2	191.02 ± 18.18	198.35 ± 109.02	39.49 ± 4.44	3.58 ± 1.94
2 h	1.2	154.99 ± 18.06	231.64 ± 124.97	35.81 ± 5.13	8.25 ± 4.60
4 h	1.2	180.32 ± 33.35	289.86 ± 163.83	46.35 ± 10.48	10.41 ± 2.30
8 h	1.2	181.89 ± 25.68	301.58 ± 188.82	45.79 ± 13.97	13.66 ± 5.87
12 h	1.2	908.96 ± 364.14 ¹⁾	377.05 ± 194.89 ¹⁾	301.95 ± 204.38	26.08 ± 9.82
24 h	1.2	1 977.80 ± 1 209.37 ²⁾	381.75 ± 152.40 ¹⁾	1 197.51 ± 952.24 ²⁾	46.98 ± 25.36 ²⁾
48 h	1.2	1 155.11 ± 706.80 ²⁾	497.87 ± 233.93 ²⁾	1 142.46 ± 640.70 ²⁾	132.08 ± 69.57 ²⁾
72 h	1.2	793.71 ± 410.80 ¹⁾	427.05 ± 185.29 ¹⁾	401.80 ± 235.49	64.36 ± 64.89 ²⁾
240 h	1.2	137.50 ± 35.93	312.27 ± 133.62	55.46 ± 14.66	2.62 ± 0.57

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01(表 2 同)。

胞浸润,纤维组织增生,卵圆细胞轻度增生;2 例大量肝细胞脂肪变、肿胀,汇管区胆管轻度增生,炎细胞浸润,纤维组织增生;240 h 组 3 例局灶性肝细胞脂肪变,2 例汇管区之间肝细胞坏死,卵圆细胞轻度增生,2 例卵圆细胞轻度增生。见图 1。



A. 正常组;B. 12 h 组;C. 24 h 组;D. 48 h 组;E. 72 h 组;F. 240 h 组

图 1 栀子苷给药后不同时间对大鼠肝脏组织形态学的影响(HE, × 200)

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

3.4 对正常大鼠肾功能的影响 与正常组比较,大鼠 BUN 在 24 h 升高,并在 48 h 显著升高 ($P < 0.05$),表现出显著性差异,72 h 后下降,在 240 h 基本恢复到正常水平;Cr 在 12 h 时明显升高 ($P < 0.01$),表现出非常显著性差异,24 h 后逐渐恢复,在 240 h 基本恢复到正常组水平。以上实验结果表明栀子苷对正常大鼠一次性大剂量(1.2 g·kg⁻¹)给药后对肾脏存在一定的毒性,并表现一定的时-毒关系,造成的急性肾损伤是可逆的。见表 2。

表 2 栀子苷给药后不同时间对正常大鼠肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of geniposide on kidney function of normal rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	Cr/μmol·L ⁻¹
正常	-	7.15 ± 1.49	72.43 ± 13.40
0.5 h	1.2	6.51 ± 0.77	71.46 ± 8.97
1 h	1.2	7.10 ± 0.33	75.47 ± 8.12
2 h	1.2	6.24 ± 0.92	85.04 ± 8.40
4 h	1.2	8.26 ± 1.01	87.95 ± 13.94
8 h	1.2	7.39 ± 1.24	76.90 ± 7.86
12 h	1.2	8.64 ± 1.25	125.58 ± 18.60 ²⁾
24 h	1.2	13.00 ± 8.92	105.44 ± 57.31
48 h	1.2	15.41 ± 13.88 ¹⁾	97.12 ± 85.15
72 h	1.2	12.72 ± 12.79	96.74 ± 61.03
240 h	1.2	8.28 ± 0.54	71.96 ± 3.13

4 讨论

栀子肝毒性已经引起业内专家的重视,近年来对栀子苷、栀子水提物的肝毒性研究逐渐深入。如王波等^[6]研究发现,以 0.28 g·kg⁻¹栀子苷(折算至生药量为 52 g,约为临床常用量 9 g 的 6 倍)给大鼠连续灌胃 3 d 产生肝毒性,其表现为肝质量增加、肝指数增大;并能明显升高血清中 ALT,AST 的活性,增加 TBIL 含量;光镜下可见明显的肝细胞肿胀、坏死,大量炎症细胞浸润等形态改变。林庆勋等^[7]研究表明 5.96 g·kg⁻¹栀子水提液(折算至生药量为 36 g 约为临床常用量 9 g 的 4 倍)连续灌胃 2 周肝

小叶结构紊乱及肝窦狭窄。Ding等^[9]研究表明栀子苷剂量超过 $574\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 可产生与 CCl_4 ($2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)相似的肝脏病理损害。王坤等^[10-11]对栀子肝毒性产生机制进行了研究,并对栀子及茵陈蒿汤、黄连解毒汤肝毒性进行了对比研究,栀子组(生药 $12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)大鼠肝组织中丙二醛(MDA)显著升高;超氧化物歧化酶(SOD), SOD/MDA及谷胱甘肽氧化酶(GSH-Px)极显著降低;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量极显著升高;累积吸光度与凋亡指数显著升高;茵陈蒿汤组、黄连解毒汤组与栀子组相比,ALT, ALP,总胆汁酸(TBA)均显著降低;SOD, SOD/MDA极显著升高, GSH-Px无明显差异;大鼠肝组织中TNF- α 的含量无明显差异,该研究结果表明栀子肝毒性的机制与氧化应激、炎症反应诱导肝细胞的坏死及凋亡有关;茵陈蒿汤、黄连解毒汤的其他中药可通过提高清除自由基酶的活性、抑制炎症反应拮抗栀子引起的肝细胞损伤而降低栀子的肝毒性。

从现有研究结果来看,对栀子肝毒性的客观存在已经取得共识,现有研究在栀子产生肝毒性剂量、毒性表现、作用机制及配伍减毒等方面进行了探讨,但对栀子肝毒性的时-毒关系、毒性损害是否可逆、栀子肾毒性的量-时-毒关系及作用机制等研究有待继续深入研究。本课题组前期以小鼠单次灌胃栀子苷 $0.3\sim 1.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 考察了栀子苷的量-毒关系,研究表明单次灌胃 $0.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 栀子苷产生非常明显的肝毒性,因此本文大于此剂量的 $1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 研究栀子苷的肝肾毒性的时-毒关系。本实验结果表明对正常大鼠一次性大剂量($1.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)给予栀子苷,大鼠肝肾均表现出了明显的损伤,各指标在12 h后开始明显上升,在24 h或48 h到达峰值,随后开始下降,在240 h时基本恢复至正常水平,表明栀子苷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。本实验结果为监测和预

警栀子临床应用中可能出现的肝肾毒性提供了重要的科学依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:231.
- [2] Yamano T, Tsujimoto Y, Noda T, et al. Hepatotoxicity of garde-nia yellow color in rats [J]. Toxicol Lett, 1988, 44(1/2):177-183.
- [3] Yamano T, Tsujimoto Y, Noda T, et al. Hepatotoxicity of genipo-side in rats [J]. Food Chem Toxicol, 1990, 28(7):515-523.
- [4] 齐娜, 蒋致诚, 苏忆兰, 等. 栀子水提物对大鼠毒性作用的探讨[J]. 食品工业科技, 2004, 25(5):122-123.
- [5] 杨洪军, 付红梅, 吴子伦, 等. 栀子对大鼠肝毒性的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3):1091-1093.
- [6] 王波, 杨洪军, 高双荣, 等. 栀子对大鼠肝肾毒性的病理学观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(5):45-48.
- [7] 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):59-62.
- [8] 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):20-23.
- [9] Ding Y, Zhang T, Ta 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.
- [10] 王坤, 金若敏, 陈长勋. 栀子肝毒性与黄连解毒汤的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14):2365-2369.
- [11] 王坤, 金若敏, 陈长勋. 茵陈蒿汤与栀子肝毒性的比较研究[J]. 中国药理学与临床, 2013, 29(1):8-12.

[责任编辑 周冰冰]