

# 栀子生品及炮制品对 CCl<sub>4</sub> 致大鼠急性肝损伤保护作用的比较

魏春华, 邵坚, 罗光明\*

(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**比较栀子生品及炮制品对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)致急性肝损伤大鼠的保护作用差异。**方法:**大鼠按体重随机等分为 9 组,分别为正常组,阳性组(联苯双酯 35 mg·kg<sup>-1</sup>),模型组,生栀子高、低剂量组(2.0,1.0 g·kg<sup>-1</sup>),炒栀子高、低剂量组(2.0,1.0 g·kg<sup>-1</sup>),焦栀子高、低剂量组(2.0,1.0 g·kg<sup>-1</sup>),造模 12 h 后眼球取血,测定血清中天门冬氨酸转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),乳酸脱氢酶(LDH),总蛋白(TP)的活性,测定肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)的活性和丙二醛(MDA)的含量。观察肝脏病理组织学变化。**结果:**与正常组比较,模型组显著升高 AST,ALT,LDH 水平和 MDA 含量,降低了 TP 的水平及 SOD 活性。肝细胞排列紊乱,细胞肿胀坏死明显。与模型组比较,栀子生品及炮制品组可显著降低大鼠血清中 ALT,AST,LDH 活性,其中生栀子组与炒栀子组效果较佳;各给药组均可增高 SOD 活性,降低 MDA 水平。各栀子给药组与模型组比较血清 TP 水平无显著性差异。各给药组肝细胞坏死、变性及炎性细胞浸润程度均有所改善,且生品组与炒品组改善较为显著。**结论:**栀子生品、炒品、焦品对 CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤大鼠均有较好的保护作用,而生品、炒品具有较优的保肝降酶、抗氧化作用,且炒品能够改善生品苦寒之性的缺点,缓和药性,临床应用可能更宜使用炒栀子。

**[关键词]** 生栀子;炒栀子;焦栀子;肝损伤;四氯化碳;总蛋白

**[中图分类号]** R283.1;R943.1;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)17-0007-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016170007

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160705.1439.014.html>

**[网络出版时间]** 2016-07-05 14:39

## Comparison Between Protective Effect of Raw and Processed Products of Gardeniae Fructus on Acute Hepatic Injury Induced by CCl<sub>4</sub> in Rats

WEI Chun-hua, SHAO Jian, LUO Guang-ming\*

(School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare protective effect of raw and processed products of Gardeniae Fructus on acute hepatic injury induced by CCl<sub>4</sub> in rats. **Method:** SD rats were evenly randomized into 9 groups by weight, such as normal group, bifendate group (35 mg·kg<sup>-1</sup>), model group, low and high dose of raw products of Gardeniae Fructus (2.0, 1.0 g·kg<sup>-1</sup>) groups, low and high dose of fried products of Gardeniae Fructus (2.0, 1.0 g·kg<sup>-1</sup>) groups, low and high dose of stir-baked products of Gardeniae Fructus (2.0, 1.0 g·kg<sup>-1</sup>) groups. Twelve hours after modeling, serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) and total protein (TP) were examined. Super oxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in liver tissue were determined. Histopathological changes of liver were observed. **Result:** Compared with the normal group, the model group significantly increased levels of AST, ALT, LDH, MDA and decreased level of TP and SOD activity. Liver cells arranged disordered, swelling and necrosis of liver cells were obvious. Compared with the model group, levels of AST, ALT and LDH in serum of raw and

**[收稿日期]** 20150924(011)

**[基金项目]** 国家中医药管理局行业专项(201507002);江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC14C09)

**[第一作者]** 魏春华,在读硕士,从事中药资源的开发与应用研究,Tel:15870646336,E-mail:1354772155@qq.com

**[通讯作者]** \*罗光明,博士,教授,从事中药资源的开发与应用研究,Tel:0791-87118982,E-mail:jzlgm88@163.com

processed products groups decreased significantly, the raw and fried products groups were better. Raw and processed products groups increased activity of SOD and decreased the level of MDA significantly. There were no significant difference between the model group and administration groups in serum TP level of rats. Each administration groups reduced the number of degeneration, necrosis of liver cells and improve inflammatory cells infiltration. **Conclusion:** The raw, fried and stir-baked products of Gardeniae Fructus have an effective protection on acute hepatic injury induced by  $\text{CCl}_4$ , the the raw and fried products are better in reducing enzyme level and antioxidant capacity. The fried products can decrease the bitter and cold of raw products. So the fried products of Gardeniae Fructus may be more appropriate in clinical application.

**[Key words]** raw products of Gardeniae Fructus; fried products of Gardeniae Fructus; stir-baked products of Gardeniae Fructus; hepatic injury; carbon tetrachloride; total protein

梔子在我国药用历史悠久,主要分布于浙江、江西、湖北、湖南等省<sup>[1-2]</sup>,具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒的功效,临床常用于治疗热病心烦、高热烦躁、湿热黄疸等,外用治疗扭挫伤痛等<sup>[3]</sup>。目前常用于治疗急、慢性肝炎。研究报道梔子中梔子苷、西红花苷 I 等环烯醚萜苷类成分具有保肝作用<sup>[4-5]</sup>。但由于梔子生品性味苦寒,易损伤脾胃,在某种程度上限制了其临床使用<sup>[6]</sup>。

梔子炮制方法历代多有记载,现代主要有生用、炒黄、炒焦、炒炭、姜制等方法。目前,对梔子炮制研究仍多集中在化学成分方面<sup>[7-8]</sup>,对生品和炮制品之间药理作用差异的报道较少<sup>[4-5]</sup>。据报道,含梔子的中药复方如茵陈蒿汤<sup>[9]</sup>、梔子柏皮汤<sup>[10]</sup>等都具有显著的保肝作用。2015 年版《中国药典》<sup>[3]</sup>记载:含有梔子的多味中成药如三子散、黄连上清片等以生梔子入药;小儿豉翘清热颗粒、黄疸肝炎丸等以炒梔子入药;茵芪肝复颗粒、荷叶丸等以焦梔子入药。含梔子的中药复方如凉膈散、八正散等以梔子仁入药;桑杏汤以梔子皮入药;其余方中梔子皆为梔子全果。因此,探究梔子生品、炒品、焦品保肝作用的差异,有利于保肝药物的筛选及应用。本实验通过比较梔子生品与炮制品对  $\text{CCl}_4$  致大鼠急性肝损伤的保护作用,为梔子饮片的临床合理应用提供参考。

## 1 材料

Allegra 64R 型高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司),AU 400 型全自动生化分析仪(日本奥林巴斯光学株式会社),CCFG-160 型电炒锅(广东湛江家用电器工业公司),UV-1800 型紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司),Forma-86C 型超低温冰箱(美国 Thermo 集团),YB-6D 型生物组织石蜡包埋机(孝感市亚光医用电子技术有限公司)。

梔子生品由汇仁集团提供,批号 20140601,经江西中医药大学药学院葛菲教授鉴定为梔子 *Gardenia jasminoides* 的干燥成熟果实;天门冬氨酸转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),乳酸脱氢酶(LDH),总蛋白(TP)试剂盒均购自南昌百特公司;超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;注射性茶油(江西金海棠药用油有限公司,批号 140610),联苯双脂滴丸(浙江万邦药业股份有限公司,批号 A02130315),四氯化碳( $\text{CCl}_4$ ,国药集团化学试剂有限公司,批号 140715),水为蒸馏水,试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 20) g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(湘)2011-0003。

## 2 方法与结果

**2.1 样品的制备** 梔子筛去碎屑,为生梔子。将生梔子置于 175 °C 电炒锅中,约炒制 5 min,至梔子表面黄褐色,冷却后筛去碎屑,得炒梔子。将生梔子置于 200 °C 电炒锅中,约炒制 12 min,至表面焦褐色或焦黑色,果皮内表面和种子表面为黄棕色或棕褐色,冷却后筛去碎屑,得焦梔子。

**2.2 药液的制备**<sup>[3]</sup> 取梔子生品及不同炮制品于 60 °C 干燥,捻碎,各称取 150 g,加 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,滤液合并回收乙醇至无醇味,加水稀释药液至 0.1 g · mL<sup>-1</sup>,作为高剂量浓度药液;取部分高剂量浓度药液继续用水稀释至 0.05 g · mL<sup>-1</sup>,作为低剂量浓度药液,冷藏备用,梔子给药量按生药量计算。

**2.3 动物的分组及造模**<sup>[3]</sup> 取 90 只大鼠按体重随机分 9 组,每组 10 只,分别为正常组、阳性组、模型组、生梔子高剂量组、生梔子低剂量组、炒梔子高剂量组、炒梔子低剂量组、焦梔子高剂量组、焦梔子低剂量组。正常组、模型组每天灌胃等量水,阳性组按

剂量  $0.035 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃联苯双酯药液, 栀子生品与炮制品高、低剂量组分别按剂量  $2.0, 1.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃相应药液, 给药体积均为  $0.02 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ , 给药时间持续 7 d。第 7 天各动物组在给药 1 h 后按  $2.5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  腹腔注射 50%  $\text{CCl}_4$  茶油, 正常组注射等体积茶油。自由饮水, 禁食 12 h 后眼球取血并在冰台上分取肝脏。

### 2.4 指标检测

**2.4.1 生化指标** 大鼠取血后全血于  $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上层血清置于  $4\ ^\circ\text{C}$  冰箱中冷藏备用, 采用全自动生化仪检测血清中 AST, ALT, LDH, TP 含量, 其中检测 AST, ALT 和 LDH 时需适量稀释血清, 按照试剂盒说明书操作。脱颈处死大鼠, 并摘取肝脏。取肝组织块  $0.2 \text{ g}$ , 以预冷的生理盐水为匀浆介质, 制备成 10% 组织匀浆, 于  $4\ ^\circ\text{C}$ ,  $2\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清, 待用。SOD 和 MDA 等指标的测定均按照试剂盒说明书操作。

**2.4.2 病理组织学检测** 将摘取的肝组织固定于 10% 中性甲醛溶液中, 常规石蜡包埋, 切片(厚度  $4.5 \mu\text{m}$ ), 脱蜡, 无毒环保苏木素伊红(HE)染色, 脱水, 光学树脂胶封片, 光镜下观察肝脏病理组织学变化。

**2.5 统计学分析** 利用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用最小显著性差异法检验, 等级资料采用秩和检验。

**2.6 大鼠一般状态** 给药过程中, 各组大鼠状态正常。造模后, 除正常组状态无明显变化外, 其他组大鼠出现眯眼, 活动减少, 成群蜷卧, 弓背神萎, 被毛黄染、松散、无光泽。与模型组相比, 阳性组及其他各实验组对以上症状有不同程度改善。

**2.7 大鼠血清中 AST, ALT 和 LDH 水平检测** 见表 1。与正常组比较, 模型组 AST, ALT 和 LDH 水平显著升高, 提示模型成功; 阳性组大鼠血清 ALT, AST 和 LDH 活性与模型组比较, 差异具有统计学意义。各给药组大鼠血清 AST, ALT 和 LDH 水平均低于模型组, 且有显著性差异, 说明栀子生品、炮制品均能降低肝损伤大鼠血清中 AST, ALT, LDH 的水平。焦栀子高剂量组 AST 和 ALT 水平略高于生栀子和炒栀子高剂量组, 提示焦品降酶能力有所下降。对应剂量生栀子组的 AST 水平略高于炒栀子组。与生栀子组及焦栀子组相比, 炒栀子组显著降低了 LDH 水平, 表明生品与炒品的降酶能力较优。

表 1 各组对大鼠血清中 AST, ALT, LDH, TP 水平和肝脏中 SOD, MDA 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Comparison of AST, ALT, LDH, TP in serum and SOD, MDA in liver among various groups( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

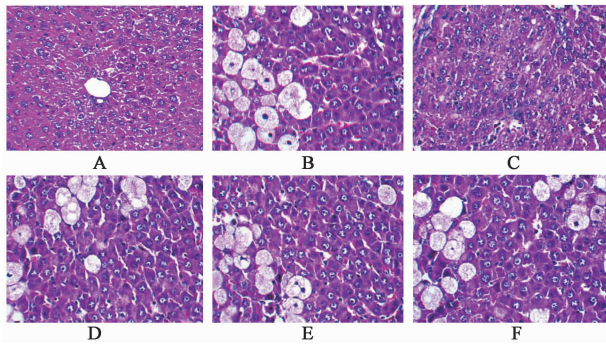
组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	AST / $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALT / $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	LDH / $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	TP / $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	MDA / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
正常	-	$131.050 \pm 13.75$	$35.19 \pm 2.75$	$1\ 191.89 \pm 28.21$	$64.93 \pm 3.19$	$163.88 \pm 44.64$	$3.69 \pm 0.34$
模型	-	$931.53 \pm 50.76^{2)}$	$490.86 \pm 62.18^{2)}$	$2\ 039.03 \pm 229.46^{2)}$	$56.91 \pm 2.99^{1)}$	$67.05 \pm 13.42^{1)}$	$9.11 \pm 0.36^{2)}$
阳性	0.035	$271.50 \pm 45.75^{4)}$	$136.29 \pm 29.19^{4)}$	$1\ 531.51 \pm 146.12^{3)}$	$56.53 \pm 3.89$	$74.22 \pm 14.14^{3)}$	$5.35 \pm 0.88^{3)}$
生栀子	2	$312.64 \pm 21.47^{4)}$	$238.39 \pm 27.96^{4)}$	$1\ 502.64 \pm 153.94^{3)}$	$57.49 \pm 4.31$	$80.30 \pm 17.90^{3)}$	$5.23 \pm 0.66^{3)}$
	1	$322.64 \pm 21.47^{4)}$	$284.69 \pm 26.13^{3)}$	$1\ 518.45 \pm 172.24^{3)}$	$56.77 \pm 4.90$	$77.40 \pm 18.53^{3)}$	$5.30 \pm 0.32^{3)}$
炒栀子	2	$304.37 \pm 52.34^{4)}$	$249.13 \pm 35.85^{4)}$	$1\ 408.57 \pm 146.16^{3)}$	$55.59 \pm 4.08$	$85.93 \pm 19.84^{3)}$	$5.04 \pm 0.91^{3)}$
	1	$320.91 \pm 41.35^{4)}$	$295.91 \pm 53.19^{3)}$	$1\ 414.34 \pm 168.03^{3)}$	$60.47 \pm 4.00$	$71.13 \pm 12.16^{3)}$	$5.30 \pm 0.65^{3)}$
焦栀子	2	$351.48 \pm 20.81^{4)}$	$288.66 \pm 53.79^{3)}$	$1\ 545.97 \pm 163.42^{3)}$	$58.16 \pm 4.46$	$79.81 \pm 19.55^{3)}$	$5.27 \pm 0.69^{3)}$
	1	$340.91 \pm 31.66^{4)}$	$307.50 \pm 49.85^{3)}$	$1\ 568.91 \pm 175.97^{3)}$	$57.72 \pm 4.88$	$72.53 \pm 24.16^{3)}$	$5.07 \pm 0.95^{3)}$

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ , <sup>4)</sup> $P < 0.01$ 。

**2.8 大鼠血清中 TP 含量及肝脏中 SOD 和 MDA 活性考察** 见表 1。与正常组比较, 模型组大鼠肝组织 SOD 活性显著降低, 而 MDA 含量明显提高, 提示肝损伤模型大鼠肝脏的抗氧化水平显著降低, 氧化损伤明显。阳性组中 SOD 和 MDA 的活性与模型组相比, 差异具有统计学意义。各栀子给药组血清 TP 水平与模型组比较无显著性差异, 表明栀子生品、炮制品均未明显改善  $\text{CCl}_4$  肝损伤所造成的大鼠血清中 TP 的下降; 各栀子给药组的 SOD 酶活性和 MDA 含量与模型组相比均具有统计学差异。表明栀子生品、炮制品均能提高  $\text{CCl}_4$  所致急性肝损伤的抗氧化

能力, 显著降低肝脏的氧化损伤。炒栀子高剂量组 SOD 酶活性与生栀子高剂量组、焦栀子高剂量组相比有显著性差异, 表明炒栀子的抗氧化能力最优。

**2.9 急性肝损伤小鼠肝组织病理学分析** 见图 1。正常组肝组织结构完整, 呈暗红色, 肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状整齐排列, 细胞边界清晰, 肝血窦排列规则, 未见病变、坏死肝细胞。模型组肝细胞排列紊乱, 肝细胞肿胀、脂肪变性、坏死, 血管周围炎性细胞浸润。与模型组相比, 各给药组的肝细胞坏死, 变性及炎性细胞浸润程度均有所改善。且生品组与炒品组改善较为显著。



A. 正常组; B. 模型组; C. 阳性组; D. 生栀子高剂量组; E. 炒栀子高剂量组; F. 焦栀子高剂量组

图 1 栀子生品及炮制品对  $\text{CCl}_4$  致急性肝损伤模型大鼠肝脏病理改变的影响 (HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effects of raw and processed products of *Gardeniae Fructus* on hepatic pathological changes of acute hepatic injury model rats induced by  $\text{CCl}_4$  (HE,  $\times 200$ )

### 3 讨论

诱发肝病因素种类较多,如药物、化学物质等。 $\text{CCl}_4$  诱导的肝细胞损伤模型被广泛用于研究药物的保肝作用<sup>[11]</sup>。其进入机体后能在酶系统的作用下脱卤素后形成  $\cdot\text{CCl}_3$  自由基,后者能从不饱和脂肪酸分子中夺取氢离子,引起脂质过氧化,致细胞膜通透性增强,胞浆内转氨酶渗出,从而导致血清中 AST 和 ALT 等水平急剧上升<sup>[12]</sup>。因此 ALT,AST 和 LDH 成为了临床上检测肝细胞受损的重要指标,以反映肝细胞的损伤程度。栀子生品及炒品、焦品均能有效降低  $\text{CCl}_4$  致急性肝损伤大鼠血清中 ALT,AST,LDH 的活性,细胞坏死状况及组织炎症均有所改善。且生品组与炒品组效果更佳。表明栀子生品与炒品降酶作用较好,对肝损伤有一定的保护作用。

生物体内,自由基作用于脂质的过程会形成脂质过氧化物如 MDA,其水平的高低可以反映体内脂质过氧化的程度,间接地反映细胞损伤的程度。SOD 是生物体内重要的内源性抗氧化酶,可清除体内的氧自由基,使自由基不能与膜脂质和膜蛋白进行反应而破坏肝细胞。其含量的变化可作为衡量肝损伤程度的指标之一。各给药组均可显著提高 SOD 的活性,降低 MDA 的含量。提示栀子生品及炮制品能够提高机体清除自由基的能力,抑制脂质过氧化物的发生,且炒品的抗氧化能力较优。

中药炮制与其毒性及疗效关系密切,减毒增效是中药炮制的主要目的之一<sup>[13]</sup>。栀子作为传统的保肝药物,其苦寒之性不易于患者服用。炒黄或炒焦后可缓和其寒性,以免苦寒伤胃<sup>[14]</sup>。本文结合临床需求及文献记载,对栀子生品、炒品及焦品进行药

理活性的筛选,以期指导栀子的临床使用,以最大程度地发挥其药效,同时降低其苦寒之性。本实验建立了  $\text{CCl}_4$  大鼠急性肝损伤模型,比较了栀子生品、炒品及焦品保肝作用的差异。结果发现栀子生品、炒品及焦品对  $\text{CCl}_4$  所致大鼠急性肝损伤均有不同程度的保护作用。而栀子生品及炒品降酶能力及抗氧化能力较优,结合炮制理论,炒品能够缓和药性,改善生品苦寒之性的缺点,便于临床用药的选用。

#### [参考文献]

- [1] 董婉茹,刘洪毓,丁雅光,等. 栀子在治疗肝脏疾病中的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23):250-254.
- [2] 娄素卉. 中药材栀子的化学物质基础研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2012.
- [3] 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, 2015: 248-249, 489, 553, 1145, 1327, 1474, 1480.
- [4] 肖小华,徐丽瑛,周艳艳,等. 栀子苷和西红花苷 I 对 ANIT 致小鼠肝损伤的保肝作用研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1600-1601.
- [5] 尚新涛,张琳,祖元刚,等. 京尼平苷对  $\text{CCl}_4$  诱导的大鼠慢性肝损伤保护作用研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(4): 29-31.
- [6] 张学兰,程合丽,李慧芬. 栀子炮制的历史沿革研究[J]. 中成药, 2005, 27(11): 1281-1283.
- [7] 邵坚,罗光明,朱继孝,等. 栀子炮制前后 7 种成分的比较研究[J]. 中草药, 2015, 46(11): 1629-1633.
- [8] 孙娜,徐钢,赵远,等. HPLC 测定栀子不同炮制品中栀子苷、绿原酸和西红花苷-I 含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 50-53.
- [9] 王喜军,王萍,孙晖,等. 茵陈蒿汤对 ANIT 诱导的急性肝损伤的保护作用[J]. 中医药学报, 2007, 35(4): 17-21.
- [10] 肖旭,朱继孝,罗光明,等. 栀子柏皮汤及其拆方保肝利胆作用实验研究[J]. 中药材, 2013, 36(7): 1132-1135.
- [11] 闫冰,李黎,陈星,等. 二至丸的保肝活性部位群对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 216-219.
- [12] 李远辉,黄挺章,郭圣奇,等. 亚麻子提取物对 D-半乳糖胺致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(16): 139-142.
- [13] 高飞,傅超美,胡慧玲,等. 关于中药炮制机制研究现状与发展趋势的思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 352-355.
- [14] 唐永红,陈锡琨. 微波炮制焦栀子的正交试验研究[J]. 广西中医学院学报, 2006, 9(3): 79-80.

[责任编辑 刘德文]