

三七总皂苷对药物性肝损伤小鼠的保护作用

马加庆¹, 云宇¹, 后文俊¹, 杨泳¹, 钱忠义¹, 沈志强^{2*}

(1. 昆明医科大学基础医学院机能实验室, 昆明 650500;

2. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500)

[摘要] 目的: 观察三七总皂苷(PNS)对异烟肼(INH)和利福平(RFP)合用所致小鼠药物性肝损伤的保护作用及其机制。方法: 小鼠随机分为正常组、模型组、PNS低、中、高剂量组(100, 200, 400 mg·kg⁻¹)、和联苯双酯组(200 mg·kg⁻¹)。采用INH和RFP合用复制小鼠药物性肝损伤模型, 分光光度法测定血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肝匀浆超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量; HE染色法观察肝组织病理学变化, 分析三七总皂苷的保肝作用及其可能机制。结果: PNS中、高剂量组肝脏指数[(70.84 ± 5.93), (66.38 ± 4.33) mg·g⁻¹]低于模型组[(83.18 ± 6.12) mg·g⁻¹](*P* < 0.05 或 *P* < 0.01); PNS低、中、高剂量组ALT[(89.71 ± 12.13), (79.58 ± 12.54), (65.86 ± 13.82) U·L⁻¹], AST[(101.54 ± 14.61), (83.70 ± 9.85), (69.47 ± 15.41) U·L⁻¹]水平低于模型组ALT[(102.63 ± 13.83) U·L⁻¹], AST[(117.05 ± 16.81) U·L⁻¹](*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), PNS中、高剂量组[MDA(7.80 ± 1.21), (7.07 ± 1.17) nmol·mg⁻¹]含量低于模型组[(9.62 ± 1.68) nmol·mg⁻¹](*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), PNS中、高剂量组[SOD(119.69 ± 14.32), (129.72 ± 20.22) U·mg⁻¹], GSH-Px[(108.02 ± 17.07), (112.72 ± 17.54) U·mg⁻¹]活性高于模型组[SOD(101.75 ± 16.18) U·mg⁻¹], GSH-Px[(85.23 ± 14.44) U·mg⁻¹](*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。肝组织HE染色显示PNS能显著减轻肝损伤程度。结论: 三七总皂苷对药物性肝损伤小鼠具有一定的保护作用, 其机制可能与其抗氧化作用有关。

[关键词] 三七总皂苷; 药物性肝损伤; 抗氧化; 异烟肼; 利福平

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0246-04

[doi] 10.11653/syfy2013230246

[收稿日期] 20130521(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160401)

[第一作者] 马加庆, 硕士, 实验师, 从事药理学教学和相关研究工作, Tel: 0871-65922845, E-mail: majiaqing@126.com

[通讯作者] * 沈志强, 博士, 教授, 博士生导师, 从事天然药物与心血管药理学研究, Tel: 0871-65922781, E-mail: shzfq21cn@yahoo.com.cn

胃肠道的活动; 诃子醇提物对ACh引起的小肠平滑肌兴奋收缩产生抑制作用, 同时也可阻断BaCl₂引起的小肠平滑肌强制性收缩, 说明诃子提取物抑制小肠平滑肌收缩的机制可能与M-受体和钙离子有关, 具体机制还需进一步深入探讨。

综上, 诃子醇提物对正常动物胃肠活动具有抑制效应且可降低血清MTL含量, 可以为诃子的临床应用提供一定的药理学依据, 但诃子对肛肠疾病的治疗作用及其原理还需要进一步在动物病理模型上去验证。

[参考文献]

- [1] 赵丽娟, 杜遵义. 诃子在藏蒙药中应用研究的概述[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(4): 31.
- [2] 潘燕, 张述禹, 侯金凤, 等. 诃子对大鼠心肌酶的影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 382.
- [3] Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, et al.

Antibacterial activity of blackmyrobalan (*Terminalia chebula* Retz.) against *Helicobacter pylori* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2001, 18(1): 88.

- [4] Jagetia G C, Baliga M S, Malagi K J, et al. The evaluation of the radioprotective effect of triphalain the mice exposed to γ -radiation [J]. Phytomedicine, 2002, 9(2): 99.
- [5] 瞿燕, 傅超美, 胡慧玲, 等. 煨制川木香对家兔离体肠肌解痉作用的研究 [J]. 中国药房, 2010, 27(21): 2504.
- [6] 周灵. 蒙药诃子在肛肠疾病的临床运用 [J]. 中国民族医药杂志, 2000, 6(3): 46.
- [7] 邬国栋, 张东, 高洪波, 等. 诃子提取液对家兔离体肠平滑肌的影响 [J]. 中国民族医药杂志, 2010, 16(11): 46.
- [8] 张绪生. 乌梅诃子合剂治疗溃疡性结肠炎 68 例临床疗效观察 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(10): 796.

[责任编辑] 李玉洁

Protective Effect of Saponins of *Panax notoginseng* on Drug-induced Liver Injury in Mice

MA Jia-qing¹, YUN Yu¹, HOU Wen-jun¹, YANG Yong¹, QIAN Zhong-yi¹, SHEN Zhi-qiang^{2*}

(1. Laboratory of Function, School of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

2. Pharmaceutical School & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products,

Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

[Abstract] Objective: To investigate the protective effect and mechanism of saponins of *Panax notoginseng* (PNS) on drug-induced liver injury in mice. **Method:** Mice were randomly divided into six groups, control group, model group, low, middle, high-dose (100, 200, 400 mg·kg⁻¹) of PNS and bifendate group (200 mg·kg⁻¹). The model of drug-induced liver injury was induced by intragastric administration of isoniazid (INH) and rifampin (RFP) in mice. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST) in serum and the content of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver homogenate were assayed by spectrophotometry. The pathological changes of hepatic tissues were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. **Result:** The liver index (70.84 ± 5.93), (66.38 ± 4.33) mg·g⁻¹ of in PNS middle, high-dose groups was lower than that (83.18 ± 6.12) mg·g⁻¹ in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of ALT (89.71 ± 12.13), (79.58 ± 12.54), (65.86 ± 13.82) U·L⁻¹ and AST (101.54 ± 14.61), (83.70 ± 9.85), (69.47 ± 15.41) U·L⁻¹ in PNS low, middle, high-dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The content of MDA (7.80 ± 1.21), (7.07 ± 1.17) nmol·mg⁻¹ in PNS middle, high-dose groups was also lower than that (9.62 ± 1.68) nmol·mg⁻¹ in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the activity of SOD (119.69 ± 14.32), (129.72 ± 20.22) U·mg⁻¹ and GSH-Px (108.02 ± 17.07), (112.72 ± 17.54) U·mg⁻¹ in PNS middle, high-dose groups was higher than that in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Hepatic tissues stained with HE showed that PNS could remarkably relieve liver injury. **Conclusion:** PNS has protective effect on drug-induced liver injury in mice, which may be related to antioxidant effect.

[Key words] saponins of *Panax notoginseng*; drug-induced liver injury; antioxidant; isoniazid; rifampin

随着化学药物及中草药的广泛应用,药物已成为导致肝损伤的临床常见因素,抗菌药物特别是抗结核药物已成为急性肝衰竭的主要致病因素,但其发生机制尚不明确,临床也缺乏特效的治疗方法,因此开展有关药物性肝损害的研究具有重要意义。三七总皂苷(PNS)是三七主要有效成分,研究表明其具有调节免疫、抗炎、抗纤维化、延缓衰老、改善肝脏微循环、抑制肝肿瘤细胞等作用,临床用于治疗肝炎、丙氨酸转氨酶增高症等^[1-3]。本实验以异烟肼(INH)和利福平(RFP)合用致小鼠药物性肝损伤,观察PNS的肝保护作用及其可能机制,为治疗提供药效学依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 三七总皂苷(含量>98%),南

京泽郎医药科技有限公司,批号20090321;联苯双酯滴丸,浙江医药股份有限公司新昌制药厂,批号090401。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所,批号20101012。

1.2 动物 ICR小鼠,雄性,体重18~25g,SPF级,由昆明医科大学实验动物中心提供,动物许可证号SCXK(滇)2005-0008号。

1.3 仪器 721型分光光度计(上海分析仪器厂),80-2型离心沉淀机(江苏新康医疗器械有限公司),JA2003N电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 小鼠药物性肝损伤模型的复制 将小鼠随机

分为 6 组,每组 10 只,即正常组、模型组、PNS 低、中、高剂量组(100,200,400 mg·kg⁻¹)和联苯双酯组(200 mg·kg⁻¹)组。INH 和 RFP 分别用 0.9% NaCl 注射液溶解,三七总皂苷用蒸馏水溶解。除正常组以 0.9% NaCl 注射液 20 mL·kg⁻¹, ig 外,其他各组均以 100 mg·kg⁻¹ INH 和 100 mg·kg⁻¹ RFP, ig,在给予 INH 和 RFP 2 h 后,正常组和模型组均以蒸馏水 20 mL·kg⁻¹, ig, PNS 低、中、高剂量组分别以三七总皂苷 100,200,400 mg·kg⁻¹ ig,联苯双酯组以 200 mg·kg⁻¹的联苯双酯, ig,1 次/d,连续 10 d。全部动物末次给药后禁食 16 h,第 11 天称重,摘眼球取血,颈椎脱臼处死,剖腹取肝,洗净、揩干、称重。

2.2 肝指数测定 采血前称小鼠体重,处死后取肝称重,计算肝指数。

肝指数 = 脏器重(mg)/体重(g)

2.3 血清 ALT,AST 活性测定 常规制备血清标本,按照试剂盒说明书测定 ALT,AST 活性。

2.4 肝组织匀浆 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量测定 取肝左叶相同部位 0.1 g,剪碎,置玻璃匀浆器,加预冷 9 倍体积 0.9% NaCl 溶液匀浆,2 500 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,4 ℃ 保存备用,按试剂盒说明测定 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量。

2.5 肝组织病理学检查 取肝右叶相同部位,放入 10% 甲醛溶液中固定,常规制片,HE 染色,光镜下观察肝组织病理学变化。

2.6 统计方法 采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机设计的单因素方差分析,多个样本均数间的两两比较采用 *q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对模型小鼠肝指数的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝指数明显高于正常组 ($P < 0.01$);PNS 中、高剂量组和联苯双酯组均明显降低肝指数 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 1。

表 1 三七总皂苷对药物性肝损伤小鼠肝脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肝脏指数/mg·g ⁻¹
正常	-	53.42 ± 5.26 ²⁾
模型	-	83.18 ± 6.12
PNS	100	75.63 ± 8.51
	200	70.84 ± 5.93 ¹⁾
	400	66.38 ± 4.33 ¹⁾
联苯双酯	200	61.52 ± 7.43 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对模型小鼠血清 ALT,AST 活性的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 ALT,AST 活性明显升高 ($P < 0.01$);PNS 中、高剂量组和联苯双酯组均显著降低 ALT,AST 活性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 2。

表 2 三七总皂苷对模型小鼠血清 ALT,AST 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT	AST
正常	-	45.89 ± 10.38 ²⁾	52.26 ± 10.86 ²⁾
模型	-	102.63 ± 13.83	117.05 ± 16.81
PNS	100	89.71 ± 12.13 ¹⁾	101.54 ± 14.61 ¹⁾
	200	79.58 ± 12.54 ²⁾	83.70 ± 9.85 ²⁾
	400	65.86 ± 13.82 ²⁾	69.47 ± 15.41 ²⁾
联苯双酯	200	61.45 ± 15.54 ²⁾	61.92 ± 12.58 ²⁾

3.3 对模型小鼠肝组织 SOD,MDA,GSH-Px 的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织 SOD,GSH-Px 活性显著下降,MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,PNS 中、高剂量组和联苯双酯组均明显升高 SOD,GSH-Px 活性,降低小鼠 MDA 含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 3。

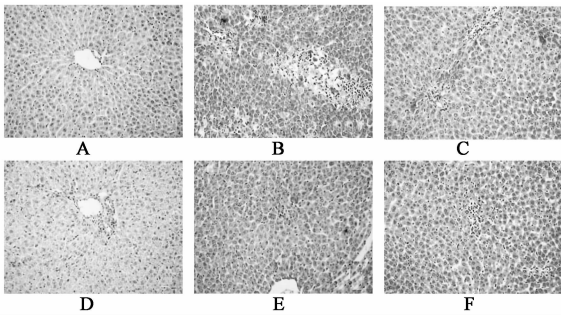
表 3 三七总皂苷对模型小鼠肝组织 SOD,MDA,GSH-Px 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	GSH-Px /U·mg ⁻¹
正常	-	141.56 ± 17.31	5.59 ± 1.60 ²⁾	138.69 ± 13.65 ²⁾
模型	-	101.75 ± 16.18 ¹⁾	9.62 ± 1.68	85.23 ± 14.44
PNS	100	110.99 ± 13.83	8.42 ± 1.50	98.12 ± 15.79
	200	119.69 ± 14.32 ¹⁾	7.80 ± 1.21 ¹⁾	108.02 ± 17.07 ¹⁾
	400	129.72 ± 20.22 ²⁾	7.07 ± 1.17 ²⁾	112.72 ± 17.54 ²⁾
联苯双酯	200	129.32 ± 14.49 ²⁾	6.55 ± 1.15 ²⁾	115.93 ± 18.40 ²⁾

3.4 对模型小鼠肝组织病变的影响 正常组肝细胞结构清晰,肝细胞索清晰,围绕中央静脉呈放射状排列,汇管区无炎性细胞浸润;模型组肝小叶结构破坏,肝细胞变性坏死,有炎性细胞浸润,PNS 中、高剂量组和联苯双酯组可明显改善肝脏损伤,炎性细胞浸润和坏死程度明显减轻,见图 1。

4 讨论

现代药理研究表明,三七及其提取物对心血管系统、血液系统、免疫系统、神经系统等均有不同程度的作用^[2-4],但少见对药物性肝损伤保护作用的报道。近 10 年来,药物性肝病的发病呈逐年增加的趋势^[5],临床尚缺乏行之有效的治疗方法,故开展有关药物性肝损伤的研究具有重大意义。本课题组选用 PNS 对药物性肝损伤进行研究和探索,此为临



A. 正常组;B. 模型组;C. PNS 100 mg·kg⁻¹组;
D. PNS 200 mg·kg⁻¹组;E. PNS 400 mg·kg⁻¹组;
F. 联苯双酯 200 mg·kg⁻¹组

图1 三七总皂苷对药物性肝损伤小鼠肝组织病变的影响(HE, ×200)

床应用 PNS 治疗药物性肝损伤提供了药效学依据。

INH 和 RFP 联合诱导的肝损伤动物模型是国内研究药物性肝炎、肝损伤的较理想的动物模型,二者合用可直接引起肝细胞坏死或脂肪变性,其机制与其代谢过程中形成毒性衍生物有关^[6]。肝细胞受损时,细胞发生变性和坏死,膜通透性增加或发生崩解,肝细胞中所含的 ALT,AST 由于失去了细胞膜的包裹而被释放入血,使血液中 ALT,AST 活性增高,血清转氨酶的升高在一定程度上反映了肝细胞损害和坏死的程度^[7]。本实验结果显示,模型组小鼠肝指数和血清 ALT,AST 活性明显高于正常组,肝组织病理学显示模型组小鼠肝小叶结构破坏,肝细胞变性坏死,有炎性细胞浸润,表明药物性肝损伤模型复制成功,而 PNS 中、高剂量可显著降低肝损伤小鼠的肝指数和血清 ALT,AST 活性,并明显改善肝组织病理性损伤,炎性细胞浸润和坏死程度明显减轻,提示 PNS 对药物性肝损伤小鼠具有明显保护作用。

研究证明,脂质过氧化在肝损伤的发生发展过程中起重要作用,而抗氧化是治疗各种肝脏疾病的有效途径^[8]。有研究报道,PNS 对肝细胞的保护作用与提高肝组织及血清 SOD 活性、减少肝糖原消耗、改善肝脏微循环、减少内质网等细胞器损伤有关^[9]。MDA 是脂质过氧化的最终产物,其含量反映体内脂质过氧化的程度。SOD, GSH-Px 是清除氧自由基的 2 种主要的酶,SOD 活性的高低反映了机体清除氧自由基的能力;GSH-Px 特异性催化谷胱甘肽(GSH)对氢氧化物的还原反应,清除细胞内有害的过氧化代谢产物,阻断脂质过氧化连锁反应,从而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用^[10-14]。本研究结果显示,模型组小鼠肝组织 MDA 含量明显升

高,SOD, GSH-Px 活性显著下降。PNS 治疗后,能逆转 INH 和 RFP 所致小鼠肝组织的 MDA 含量升高和 SOD, GSH-Px 活性下降,提示 PNS 的肝保护作用可能与调控氧自由基及代谢产物,提高机体抗脂质过氧化能力有关。

[参考文献]

[1] 甘雨,徐惠波,孙晓波. 三七总皂苷的药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2007,18(5):1251.
[2] 赵日秋,舒斌,林娜,等. 注射用三七素对 SD 大鼠神经系统的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(1):252.
[3] 杨子明,杨秀芬. 三七总皂苷对小鼠肝脏谷胱甘肽-S-转移酶的抑制作用及其动力学分析[J]. 中国中药杂志,2011,36(17):2413.
[4] 唐婧姝,裴清华. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):210.
[5] DENK H. Drug-induced liver injury[J]. Verh Dtsch Ges Pathol,2002,86(3):120.
[6] 张玉军. 三七总皂苷的药理研究进展[J]. 广西医学,2009,31(4):589.
[7] Yu J, Wang Y, Qian H, et al. Polyprenols from *Taxus chinensis* var. *mairei* prevent the development of CCl₄-induced liver fibrosis in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2012,142(1):151.
[8] 马丽娜,华碧春. 药物性肝损伤动物模型研究进展[J]. 亚太传统医药,2011,7(2):129.
[9] 孙兰,刘世成,胡小鹰. 三七保肝作用及其机理研究进展[J]. 中医药信息,2006,23(1):17.
[10] 黄明姬,崔敬爱. 复方远桂知合剂对急性肝损伤大鼠血清 SOD 活性 MDA 含量的影响[J]. 延边大学学报,2007,30(2):103.
[11] 谭安雄,朱耀斌,王玉银. 西红花酸对大鼠脑缺血-再灌注氧自由基及一氧化氮的影响[J]. 医药导报,2011,30(7):846.
[12] Wang J, Zhang Y, Zhang Y, et al. Protective effect of *Lysimachia christinae* against acute alcohol-induced liver injury in mice[J]. Biosci Trends, 2012,6(2):89.
[13] Huang Q, Zhang S, Zheng L, et al. Hepatoprotective effects of total saponins isolated from *Taraphochlamys affinis* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats[J]. Food Chem Toxicol,2012,50(3/4):713.
[14] Li L, Li W, Kim Y H, et al. *Chlorella vulgaris* extract ameliorates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice[J]. Exp Toxicol Pathol,2013,65(1/2):73.

[责任编辑 李玉洁]