

· 毒理 ·

吴茱萸水煎液致小鼠肝毒性机制研究

周璐, 姚广涛, 曹智丽, 徐婷婷, 金若敏*

(上海中医药大学药物安全评价研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的:探讨吴茱萸致小鼠肝脏损害的毒性机制。方法:昆明种小鼠随机分为吴茱萸高剂量组($30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、中剂量组($20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、低剂量组($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和正常组,连续灌胃给药或蒸馏水 21 d 后,摘眼球取血,离心,取血清检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)。取肝脏,计算脏器指数并观察肝组织形态学改变。测定肝组织中超氧化物歧化物(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量、谷胱甘肽脱氢酶(GSH)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、一氧化氮合酶(NOS)活性,计算 SOD/MDA;采用 ELISA 法测定肝组织中炎症介质肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素- 1β (IL- 1β)、白介素-6 (IL-6)水平。结果:与正常组比较,吴茱萸 3 个剂量组小鼠血清 ALT,AST 明显升高,肝脏肝组织形态学出现肝细胞灶性坏死。肝组织中 SOD/MDA, GSH-Px 和 NOS 活性明显下降($P < 0.05$), GSH 含量显著升高($P < 0.05$);炎症介质 TNF- α , IL- 1β , IL-6 含量显著升高($P < 0.01$)。结论:大剂量吴茱萸致小鼠肝毒性的机制可能与自由基及炎症因子的产生有关。

[关键词] 吴茱萸; 肝毒性机制; 自由基; 炎症因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0269-04

[doi] 10.11653/syfy2013220269

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130917.1610.003.html>

[网络出版时间] 2013-09-17 16:10

Mechanism of Liver Toxicity Induced by Euodiae Fructus Decoction in Mice

ZHOU Lu, YAO Guang-tao, CAO Zhi-Li, XU Ting-ting, JIN Ruo-min*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To explore mechanism of the liver injury caused by giving Euodiae Fructus decoction in mice. **Method:** KM mice were divided into four groups: normal control, high, middle and low dose groups which were administrated respectively with distilled water or equal volume of Euodiae Fructus decoction at the doses of crude drug 30, 20, 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ daily by gavage for consecutive 21 days. The blood of the animals was collected by pulling out the eyeball. The activities of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined by automatic biochemical analyzer. The livers were collected. The liver weight indexes were calculated and liver pathological changes were observed. The activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), nitric oxide synthase (NOS) and the contents of malonaldehyde (MDA) in liver samples were measured by Kit. The ratio of SOD/MDA was calculated. The contents of interleukin- 1β (IL- 1β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in liver samples were detected by ELISA. **Result:** Compared with control group, the activities of ALT and AST were significantly increased in high, middle and low dose groups. The liver histopathological change was characterized by emergence of focal necrosis of liver cells. The activity of GSH-Px, NOS and the ratio of SOD/MDA in the liver were significantly decreased ($P < 0.05$), the tissue content of GSH was increased ($P < 0.05$), the contents of IL- 1β , IL-6, TNF- α of the liver were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The mechanism of the liver

[收稿日期] 20130614(002)

[基金项目] 国家科技重大专项项目(2009ZX09502-002);国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2009CB522807);国家科技重大专项课题(2011ZX09301-009)

[第一作者] 周璐,在读硕士,从事中药药理毒理学研究, Tel:021-51323053, E-mail:zhoulu4310@163.com

[通讯作者] *金若敏,博士,研究员,博士生导师,从事中药新药及其安全性评价研究, Tel:021-51322401, E-mail:rmj801@126.com

injury caused by high dose of *Euodiae Fructus* decoction in mice may be related to oxidative stress and inflammatory response.

[Key words] *Euodiae Fructus*; mechanism of hepatotoxicity; free radicals; inflammatory factors

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. Var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实。其性味辛、苦、热;有小毒。归肝、脾、胃、肝经。功效散寒止痛,降逆止呕,助阳止泻。用于厥阴头痛,寒疝腹痛,寒湿脚气,经行腹痛,脘腹胀痛,呕吐吞酸,五更泄泻^[1]。国内临床上曾有报道患者服用过量吴茱萸后,有腹痛、头痛、晕厥、呕吐、视物不清、错觉、胸闷等不良反应出现^[2-3];近年来,关于吴茱萸肝毒性的问题,文献亦有报道^[4-5]。本文就小鼠连续灌服吴茱萸水煎液后产生肝毒性的机制进行以下初步研究。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,清洁级,雌雄各半,16~18 g,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号 SCXK(沪)2012-0002。动物饲养于清洁级饲养室,期间自由饮水、摄食,室温 20~25℃,湿度 40%~70%,光照周期 12 h/12 h,通风良好。

1.2 药物 吴茱萸药材由四川新荷花中药饮片有限公司提供,产地江西,批号 1008295。由上海中医药大学中药学院李西林教授鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 干燥近成熟果实。

煎煮方法:取 1 kg 吴茱萸,加 10 倍量蒸馏水浸泡 2 h 后,水煎 2 次,每次先以武火煮沸,再以文火煮 30 min,纱布过滤,合并滤液,文火浓缩至生药 2 g·mL⁻¹,置于 4℃ 冰箱中保存,临用前用蒸馏水配成所需浓度(以下简称吴茱萸)。

1.3 试剂 丙氨酸转氨酶(ALT)检测试剂盒(R1 批号 J922, R2, 批号 J917),天冬氨酸转氨酶(AST)检测试剂盒(R1 批号 L923, R2 批号 J917),均购自上海日和贸易有限公司。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒(批号 201209,均购自 R&D system)。蛋白定量测定盒(批号 20130121),总超氧化物歧化物(T-SOD)测试盒(批号 20130122),丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20130121),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号 20130119),谷胱甘肽脱氢酶(GSH)试剂盒(批号 20130121),一氧化氮合酶(NOS)测定试剂盒(批号 20130121),均由南京建成

生物工程研究所提供。

1.4 仪器 日立 7080 全自动生化分析仪(日本 HITACHI 公司生产),318C 酶标仪(上海三科仪器有限公司),2-16K 冷冻离心机(德国西格玛公司),TDL-5-A 离心机(上海安亭科学仪器厂),AR2130 电子天平(奥豪斯国际贸易上海有限公司生产),BX51 正置显微镜。

2 方法

2.1 动物分组 取健康小鼠 40 只,随机分为正常组、吴茱萸低剂量组、中剂量组、高剂量组。每组 10 只,雌雄各半。给药组每天分别灌胃给予吴茱萸水煎液(以下简称吴茱萸,剂量以生药量计)10 g·kg⁻¹(相当于人临床等效剂量的 11.1 倍)、20 g·kg⁻¹(22.2 倍)或 30 g·kg⁻¹(33.3 倍),正常组灌服等容量蒸馏水 20 mL·kg⁻¹,连续给药 21 d 后,禁食并处理全部动物。摘眼球取血,5 000 r·min⁻¹,离心 15 min,取血清,全自动生化分析仪检测 ALT,AST。摘取肝脏,用冷生理盐水洗去污血,称重,计算脏器指数,部分肝脏放于福尔马林中固定,HE 染色,与光学显微镜下观察组织形态学的改变。其余肝脏加冷生理盐水制成 10% 肝匀浆,离心,取上清液置于 -80℃ 以下冻存备用。

参照文献[6]对肝组织形态进行病理分级、积分:肝组织结构正常,无明显变性、坏死及炎症细胞浸润(-),0 分;肝小叶结构尚正常,可见明显的混浊肿胀、气球样变或脂肪变性,散在点状坏死(+),1 分;肝小叶结构不清,可见明显的灶状坏死,伴有炎症细胞浸润(++),2 分;肝小叶结构不清、可见明显的片状坏死,伴有炎症细胞浸润(+++),3 分;坏死细胞弥漫性存在于肝小叶中央,层次较多,伴有炎症细胞浸润(++++),4 分。

2.2 吴茱萸对小鼠肝组织过氧化脂质的影响 按试剂盒说明书操作,测定肝组织中 SOD 活性,MDA 含量,计算 SOD/MDA;按 GSH-Px, NOS 及 GSH 试剂盒方法测定肝组织 GSH 含量及 GSH-Px, NOS 活性。

2.3 吴茱萸对小鼠肝组织炎症介质的影响 按试剂盒说明书操作,采用 ELISA 法,测定肝组织中 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 的含量。

2.4 统计学分析 实验数据分析应用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用

t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性时以 LSD 方法、方差不齐时以 Dunnett's 方法分析。等级资料进行秩转换的非参数检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 吴茱萸对小鼠血清 ALT,AST 的影响 与正常

表 1 吴茱萸对小鼠肝功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

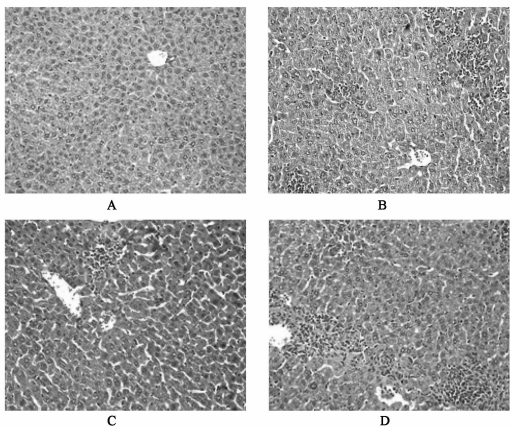
组别	生药剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	肝脏器指数/%
正常	-	33.17 ± 12.37	117.08 ± 20.21	4.31 ± 0.21
吴茱萸	10	38.36 ± 16.05	126.00 ± 26.5	4.66 ± 0.29 ²⁾
	20	81.67 ± 90.5	141.75 ± 75.52	5.18 ± 0.41 ²⁾
	30	143.58 ± 169.55 ¹⁾	206.00 ± 154.5	5.65 ± 0.36 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3~5 同)。

3.3 对小鼠肝组织形态学的影响 在光镜下观察,正常组肝小叶结构清晰完好,肝细胞未见明显变性、坏死,肝窦未见明显淤血扩张;低剂量组出现肝细胞点状坏死和肝细胞轻微肿大,中剂量组出现肝细胞点状坏死和多发灶性坏死,高剂量出现肝细胞小灶性坏死和多发灶性坏死。见表 2,图 1。

表 2 吴茱萸对小鼠肝脏损伤病理 Radit 分析

组别	生药剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	病变程度/只					<i>n</i>	<i>P</i>
		-	+	++	+++	++++		
正常	-	10	0	0	0	0	10	
吴茱萸	10	3	5	2	0	0	10	<0.05
	20	4	4	2	0	0	10	<0.05
	30	3	5	1	1	0	10	<0.05



A. 正常组;B. 吴茱萸 10 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组;

C. 吴茱萸 20 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组;D. 吴茱萸 30 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组

图 1 吴茱萸对小鼠肝组织形态学的影响(HE, ×100)

3.4 对小鼠肝组织过氧化脂质的影响 与正常组比较,吴茱萸 3 个剂量组,小鼠肝组织 SOD 活性均无明显变化,但 MDA 含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),高剂量组 SOD/MDA 显著下降($P < 0.05$),3 个剂量组 GSH-Px 和 NOS 活性均明显下降

组比较,吴茱萸高剂量组小鼠血清 ALT 明显升高($P < 0.05$),中剂量组和低剂量组有升高的趋势。3 个剂量组 AST 均有升高的趋势。见表 1。

3.2 对小鼠肝脏器指数的影响 与正常组比较,给药 21 d 吴茱萸高、中、低剂量组肝脏器指数明显升高($P < 0.01$),有一定的量效关系。见表 1。

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),高剂量组 GSH 含量显著升高($P < 0.05$),且有一定的量效关系。见表 3~4。

3.5 对小鼠肝组织炎症介质的影响 与正常组比较,吴茱萸 3 个剂量组小鼠肝组织 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 水平均显著升高($P < 0.01$),且有一定的量效关系。见表 5。

4 讨论

周绮等^[5]曾报道:小鼠在连续灌胃大剂量的吴茱萸生药 50 g·kg⁻¹·d⁻¹后,ALT 和 AST 均在 20 d 的时候血清中的含量达到高峰,病理出现肝细胞灶性坏死和炎症细胞的浸润。本结果亦显示,经连续灌胃给予生药 30 g·kg⁻¹·d⁻¹的吴茱萸水煎液 21 d,小鼠血清 ALT,AST 明显升高,肝脏器指数明显升高,病理可见肝细胞的灶性坏死。因此,本实验对吴茱萸致肝损伤的作用进行初步研究。

SOD,MDA,GSH-Px 和 GSH 等均是机体防御自由基脂质过氧化损伤保护系统的重要成员,是主要的酶类清除剂^[7]。其中 GSH-Px 在细胞内能清除有害的过氧化物代谢产物,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。GSH^[8]是一种低分子清除剂,是 GSH-Px 和 GST 两种酶的底物,为这两种酶分解氢过氧化物所必需,缺乏或耗竭 GSH 会促使许多化学物质或环境因素产生毒性作用或加重其毒性反应,因而,GSH 含量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素。实验结果显示,给予吴茱萸后,GSH 和 MDA 含量显著升高,SOD/MDA 明显减小,GSH-Px 和 NOS 活性显著降低($P < 0.05$ 或 0.01)。并呈现一定的量效关系。提示氧化应激反应是吴茱萸致肝损伤的原因之一。

与炎症反应密切相关炎症介质有 IL-1 β ,IL-6 和 TNF- α 等。IL-1 β 是致炎性细胞因子,可以诱导肝脏

表 3 吴茱萸对小鼠肝组织 SOD 活力及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	生药剂量/ $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA/ $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/MDA
正常	-	50.51 ± 3.79	10.84 ± 4.11	4.66 ± 0.67
吴茱萸	10	50.38 ± 11.16	12.87 ± 7.16 ¹⁾	3.99 ± 2.52
	20	45.28 ± 6.84	14.48 ± 3.58 ¹⁾	3.45 ± 1.45
	30	49.47 ± 4.13	15.45 ± 5.5 ¹⁾	3.54 ± 0.63 ¹⁾

表 4 吴茱萸对小鼠肝组织 GSH-Px, NOS, GSH 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	生药剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	GSH/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	NOS/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
正常	-	376.49 ± 43.23	3.01 ± 0.38	0.61 ± 0.15
吴茱萸	10	293.72 ± 55.18 ¹⁾	3.59 ± 1.38	0.39 ± 0.15 ¹⁾
	20	268.43 ± 94.18 ¹⁾	4.34 ± 1.87	0.33 ± 0.06 ¹⁾
	30	210.72 ± 81.46 ¹⁾	7.7 ± 3.35 ¹⁾	0.38 ± 0.09 ¹⁾

表 5 吴茱萸对小鼠肝组织炎症介质的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	生药剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	15.33 ± 0.74	24.99 ± 1.96	104.89 ± 8.86
吴茱萸	10	18.71 ± 1.03 ²⁾	27.14 ± 1.71 ²⁾	125.04 ± 8.7 ²⁾
	20	20.95 ± 0.86 ²⁾	29.89 ± 1.18 ²⁾	131.13 ± 9.96 ²⁾
	30	27.64 ± 1.43 ²⁾	41.57 ± 3.59 ²⁾	155.84 ± 8.9 ²⁾

固有细胞及炎症细胞增殖, 释放炎性介质, 与炎症后期纤维化的形成过程有关, 病理性成纤维细胞在应答 IL-1 β ^[9] 时产生的 IL-6 和 IL-8 较正常时产生的多。IL-6^[9-10] 是淋巴细胞等炎症细胞的诱导细胞因子, 由肝星状细胞合成和分泌。肝细胞损伤时可能刺激自身固有细胞和炎症细胞合成和释放 IL-6, 使细胞间形成大量 IL-6。TNF- α ^[11-13] 是细胞网络中重要的炎症介质之一, 能促进成纤维细胞增殖和 Con-I, Con-III 的表达, 已经被证实在肝纤维化中发挥着重要的作用。实验结果显示, 给予吴茱萸后, 小鼠肝脏中的炎症介质 IL-1 β , IL-6, TNF- α 显著升高。大量炎症介质产生和释放, 是吴茱萸致肝损伤的原因之一。

综上, 大剂量的吴茱萸所致小鼠肝损伤机制可能与氧化应激和炎症反应有关, 进一步的机制有待深入研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:100.
 [2] 蔡雪映, 孟楠, 杨冰. 服用吴茱萸过量致中毒 1 例分析[J]. 北京中医, 2006(3):171.
 [3] 吴春林. 附子配伍吴茱萸致中毒 1 例[J]. 山西中医, 1996, 12(2):27.
 [4] 黄伟, 赵燕, 孙蓉. 吴茱萸不同组分对小鼠急性毒性试验比较研究[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(3):129.

[5] 周绮, 张茜, 金若敏. 茱萸致小鼠肝毒性时效、量效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9):232.
 [6] 何桂霞, 李玲, 肖锦仁, 等. 藤茶总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(4):7.
 [7] 阚周密, 蔡原. 甘草酸二铵对镉中毒小鼠肝损伤的防护作用[J]. 天津医药, 2007, 35(5):361.
 [8] 徐敏. 论人体的自由基和抗氧化剂-谷胱甘肽[J]. 医药产业资讯, 2006, 3(2):127.
 [9] Rui Mei L, Kara A U, Sinniah R. Dysregulation of cytokine expression in tubulo interstitial nephritis associated with murine malaria[J]. Kidney Int, 1998, 53(4):845.
 [10] Strike L J, Peten E P, Elliot S J, et al. Mesangial cell turnover; effect of heparin and peptide growth factors [J]. Lab Invest, 1991, 64(4):446.
 [11] Watanabe T, Jono H, Han J, et al. Synergistic activation of NF-kappa B by nontypeable haemophilus influenzae and tumornecrosis factor alpha[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(10):3563.
 [12] Wang J Y, Liu P. Abnormal immune and gene mutation in patients with severe hepatitis-B[J]. World J Gastroentero, 2003, 9(9):2009.
 [13] 刘怡最, 潘其生. 细胞生长因子对大鼠急性肝损伤保护作用的实验研究[J]. 南京铁道医学院学报, 1997, 16(4):23.

[责任编辑 聂淑琴]