

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

闫冰, 李黎, 陈星, 王银娟, 陆崧, 王曙东*
(南京军区南京总医院制剂科, 南京 210002)

[摘要] 目的: 研究二至丸的保肝活性部位群(70%乙醇组分)(active fractions in liver protection from Erzhi Pill, AFEP)对四氯化碳(CCl_4)致小鼠急性肝损伤的保护作用。方法: 将 60 只昆明种小鼠随机分成 6 组: 正常对照组、四氯化碳损伤模型组、AFEP 的高、中、低剂量组(19.8, 13.2, 6.6 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和联苯双酯组(150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。AFEP 高、中、低剂量组每日 ig 1 次, 共 7 d, 末次 ig 后除正常组外, 其余所有小鼠予 ip 0.1% CCl_4 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1 次, 16 h 后处死全部小鼠, 收集肝组织及血清标本, 测定小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)活性; 测定肝匀浆中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性; 计算肝指数并同时对照肝组织进行病理学检查。结果: AFEP 高、中剂量组具有明显的剂量依赖性降低 CCl_4 致小鼠肝损伤血清 ALT, AST 值升高($P < 0.01$), 降低肝匀浆中 MDA 的含量($P < 0.01$), 增强 SOD 的活性($P < 0.01$)。通过病理学切片观察, AFEP 各剂量组能显著改善肝组织的病理变化($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: AFEP 对 CCl_4 造成的小鼠急性肝损伤具有显著的保护作用, 为其保肝活性的效应部位。

[关键词] 二至丸; 保肝; 活性部位群; 四氯化碳; 急性肝损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0216-04

Experimental Study of Active Fractions in Liver Protection From Erzhi Pill on Acute Hepatic Injury Induced by CCl_4 in Mice

YAN Bing, LI Li, CHEN Xing, WANG Yin-juan, LU Yin, WANG Shu-dong*
(Department of Pharmaceuticals, Nanjing General Hospital
of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the active fractions in liver protection from Erzhi Pill (AFEP) on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl_4) in mice. **Method:** Sixty Kunming mice were randomly divided into six groups: the normal group, the model group, bifendate group (150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), high AFEP group (19.8 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), middle AFEP group (13.2 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and low AFEP group (6.6 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The treatment groups were orally administered once per day for 7 d separately, whereas the normal and model groups were orally administered with saline. Except normal rats, all the other rats were injected intraperitoneally CCl_4 20 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ once. The rats were sacrificed 16 h after CCl_4 administration. Serum and liver samples were collected for analysis. The acute hepatic injury model was prepared by CCl_4 injected intraperitoneally. Then, the therapeutic effects of AFEP on the model were evaluated by the activity determination of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in liver, and the hepatic pathohistological changes following the treatment. **Result:** The activities of ALT and AST and the MDA content in liver was significantly increased and the activity of SOD was largely inhibited in the animals of modeling group. Following the treatment with AFEP, ALT and AST activities and MDA content were significantly reduced and SOD activity was obviously increased in the mice of treatment group. Furthermore, AFEP

[收稿日期] 20120915(001)

[基金项目] 南京军区南京总医院基金项目(2012061); 江苏省中医药管理局研究项目(LB09031)

[通讯作者] *王曙东, 主任药师, Tel: 025-80860167, E-mail: 21324375@qq.com

could ameliorate the hepatic pathological changes. **Conclusion:** AFEP have protective effects on acute hepatic injury induced by CCl_4 in mice, and are the effect of the liver protecting active sites.

[**Key words**] Erzhi Pill; liver protection; active fractions; carbon tetrachloride; acute hepatic injury

二至丸出自明代吴旻辑的《扶寿精方》^[1-2],由女贞子(酒蒸)和墨旱莲两味中药等量(1:1)组成,属滋阴补肾方剂。其有补益肝肾、滋阴止血的作用,临床上用于治疗肝肾阴虚、眩晕耳鸣、咽干鼻燥、腰膝酸软等症^[3]。本文采用 CCl_4 致小鼠急性肝损伤药理模型^[4],通过前期二至丸正丁醇部位对于小鼠急性肝损伤的保护作用的研究表明了该部位显著的保肝活性^[5-6],所以本实验进一步研究了正丁醇部位通过聚酰胺柱层析进一步分离,70%乙醇洗脱活性部位群(AFEP)对 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤的保护作用,为筛选出活性最好的保肝效应部位提供重要实验依据。

1 材料

1.1 药物和试剂 女贞子(批号 110525)和墨旱莲(批号 110712)购于亳州市永刚饮片厂有限公司,经南京中医药大学吴启南教授鉴定为女贞子 *Ligustrum lucidu* Ait. 和墨旱莲 *Eclipta prostrata* L.。AFEP 的制备:将 1 000 g 女贞子与 1 000 g 墨旱莲(1:1)混合后进行常规加工粉碎后过 20 目筛,用水回流提取 3 次,用旋转蒸发器浓缩后用正丁醇萃取,然后通过聚酰胺柱吸附,用 70% 乙醇洗脱,洗脱液减压浓缩至相当于含生药 $0.66 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品,置冰箱保存,备用。天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒、丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒及考马斯亮蓝蛋白试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;四氯化碳(CCl_4):分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司,批号 120215,使用时用花生油配制成 0.1% 的花生油溶液;联苯双酯滴丸:北京协和药厂生产,批号 11050206。

1.2 动物 昆明种小鼠,18~22 g,雄性,清洁级,由南京江宁县汤山青龙山动物繁殖场提供,实验动物许可证号 SCXK(苏)20011-0012。

1.3 仪器 CENTRI-FUGE (AX120)电子天平(日本产),酶联免疫仪(美国 Bio-Tek 公司),722S 分光光度仪(上海精密科学仪器公司),Anke (LXJ-11B)离心机(上海安寿科学仪器厂),KH2200B 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组和造模 取 60 只小鼠,随机分成 6

组,每组 10 只,分别为正常对照组,四氯化碳损伤模型组,AFEP 的高、中、低剂量组 ($19.8, 13.2, 6.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),联苯双酯组 ($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。正常对照组及四氯化碳模型组给予同量的生理盐水,给药组连续灌胃 7 d,于末次给药后 1 h,除正常组 ip 0.9% NaCl 20 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 外,其余各组均 ip 0.1% CCl_4 花生油溶液 20 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。染毒 16 h 后,所有小鼠采用眼眶放血法采血,分离血清,测定血清中 ALT 及 AST 的活性。取血后每只小鼠立即剖腹,取一小块肝组织,用 10% 的福尔马林溶液固定,进行石蜡包埋切片。同时另取相同部位的一小块肝组织用生理盐水制备成 10% 的肝匀浆,硫代巴比妥酸法测定每克肝组织中 MDA 含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力。

2.2 生化指标检测 赖氏法测定血清 ALT、AST 活性,硫代巴比妥酸法测定肝匀浆中 MDA 含量,考马斯亮蓝蛋白法测定肝匀浆中蛋白质含量,黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力,按以下公式计算肝脏指数。

$$\text{肝脏指数} = \frac{\text{肝质量}(\text{g})}{\text{体质量}(\text{g})} \times 100\%$$

2.3 病理学检查 用 10% 的福尔马林溶液固定肝组织,常规石蜡包埋切片(片厚 5 μm),HE 染色,光镜下观察肝组织病理学变化。将肝组织损伤程度分为 4 级:0 级(-),肝组织结构正常,无明显变性,坏死及炎症细胞浸润;I 级(+),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;II 级(++),肝小叶结构不清,可见明显的灶状坏死,伴有炎症细胞浸润;III 级(+++),肝小叶结构不清、可见明显的片状坏死,伴有炎症细胞浸润。

2.4 统计学分析 各项数据采取 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,所有资料的统计分析均用 SPSS 16.0 软件包完成。对肝脏组织病理学变化经 Ridit 分析统计处理, $P < 0.05$ 为显著性界限。

3 结果

3.1 对急性肝损伤小鼠血清生化指标肝匀浆 MDA 含量, SOD 活性及肝脏指数的影响 模型组血清中 ALT, AST 较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$),说明本次实验模型造模成功。AFEP 能剂量依赖性显著降低小鼠血清 ALT, AST 水平,其保肝活性与阳性对照药联苯双酯相当。其中,AFEP 的高、中剂量组与联苯双酯组血清 ALT, AST 与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 1。

CCl₄ 肝损伤模型组小鼠肝脏 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$), SOD 活性显著降低 ($P < 0.01$), 说明本次实验的小鼠急性肝损伤造模成功。而 AFEP 对这些变化都有较强的抑制作用。其中, AFEP 的高、中剂量组与联苯双酯组肝匀浆中 MDA 及 SOD 活性与模型组比较具有显著性差

异 ($P < 0.01$)。见表 1。

模型组小鼠的肝脏指数显著高于空白组 ($P < 0.01$), 说明模型组肝脏增大。二至丸 70% 乙醇部位的高、中剂量组能显著降低由 CCl₄ 升高的肝脏指数 ($P < 0.01$), 说明 AFEP 对小鼠肝脏轻度肿胀的缓解作用效果最佳。见表 1。

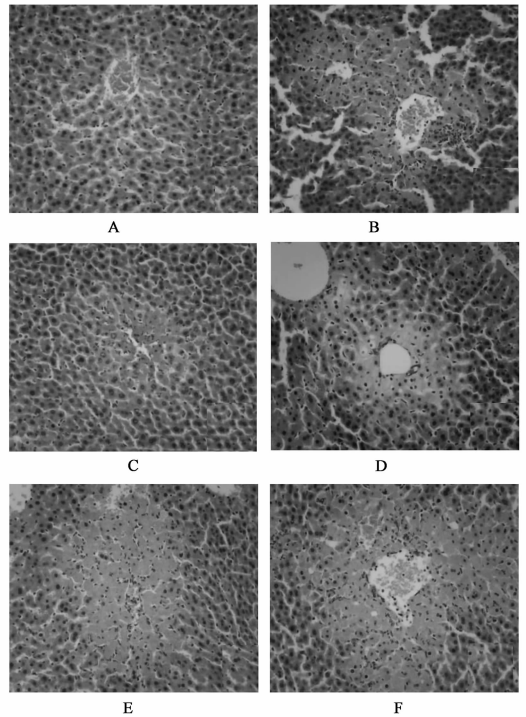
表 1 二至丸活性部位群对急性肝损伤小鼠血清 ALT, AST 水平肝匀浆 MDA, SOD 和肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	血清		肝匀浆		肝脏指数
		ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	/%
正常对照	-	45.73 ± 12.46 ²⁾	82.54 ± 16.54 ²⁾	11.75 ± 2.32 ²⁾	38.45 ± 4.63 ²⁾	4.72 ± 0.65 ²⁾
模型	-	221.56 ± 24.82	232.38 ± 21.68	31.62 ± 5.83	17.82 ± 2.74	5.75 ± 0.83
联苯双酯	0.15	152.84 ± 23.19 ²⁾	181.26 ± 19.17 ²⁾	17.45 ± 2.74 ²⁾	32.63 ± 3.52 ²⁾	4.84 ± 1.17 ²⁾
二至丸活性部位群	19.8	158.43 ± 21.68 ²⁾	180.35 ± 19.46 ²⁾	19.65 ± 4.42 ²⁾	31.82 ± 3.37 ²⁾	4.92 ± 0.95 ²⁾
	13.2	172.75 ± 25.84 ²⁾	197.27 ± 22.53 ²⁾	23.58 ± 4.36 ²⁾	26.74 ± 4.65 ²⁾	5.13 ± 1.18 ¹⁾
	6.6	191.26 ± 26.32 ²⁾	210.65 ± 24.78 ¹⁾	26.37 ± 5.85 ¹⁾	21.65 ± 3.74 ¹⁾	5.45 ± 1.36 ¹⁾

3.2 对急性肝损伤小鼠肝组织病理学的影响 病理切片结果表明, 正常对照组小鼠肝脏色泽暗红, 肝组织结构正常, 肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝细胞索、肝血窦排列规则, 肝小叶结构完整, 未见肝细胞变性、坏死等病理变化。CCl₄ 模型组小鼠肝组织体积增大, 颜色发白, 呈粉色, 肝结构镜下可见大多数肝细胞浑浊肿胀, 细胞质疏松化, 有的呈气球样变, 以环中央静脉分布的肝细胞灶性或片状坏死, 伴炎性细胞浸润等病理改变。AFEP 高、中剂量组比较其他部位的肝细胞坏死, 变性 & 炎性细胞浸润程度的减轻效果最好, 表明 AFEP 高、中剂量组在保护肝损伤作用方面最佳, 经 Ridit 法统计处理, 均有显著的统计学意义。结果见表 2, 图 1。

4 讨论

各种有害因素所致肝损伤的防治目前仍是一个全球性的严峻课题。因此, 通过建立实验性肝损伤动物模型, 筛选保肝药物, 具有十分重要的意义。CCl₄ 所致急性肝损伤模型是最常用的经典模型之一^[7], 其机制为 CCl₄ 在肝内经微粒体细胞色素 P450 分解活化, 生成活泼的三氯甲基自由基和氯自由基, 导致肝微粒体的脂质过氧化。由于脂质过氧化反应增强而抗氧化能力下降, 导致自由基增加, 通过过氧化细胞膜脂质, 使肝细胞结构和功能受到损害。文献报道酚羟基是抗脂质过氧化作用的主要功能基团^[8]。因此, 有效地清除自由基, 保护肝细胞膜的生物功能将成为抗肝细胞损伤的主要研究内容并日益受到人们的关注。



A. 正常组; B. 模型组; C. 联苯双酯 0.15 g·kg⁻¹ 组; D. AFEP 19.8 g·kg⁻¹ 组; E. AFEP 13.2 g·kg⁻¹ 组; F. AFEP 6.6 g·kg⁻¹ 组

图 1 二至丸活性部位群对 CCl₄ 造成的小鼠急性肝损伤肝组织病变的影响 (HE, ×100)

SOD 是体内清除自由基、抑制自由基反应的物质基础之一, 它能减少自由基的产生, 减少肝细胞的损伤, 其活性降低则会导致体内氧自由基德积累, 引发质膜的过氧化作用, 使膜结构与功能受到损伤, 最

表 2 二至丸活性部位群对急性肝损伤小鼠肝组织病理学损伤的影响 (n = 10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肝细胞变性				肝细胞坏死				炎性细胞浸润			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常对照	-	10	0	0	0 ²⁾	9	1	0	0 ²⁾	9	1	0	0 ²⁾
模型	-	0	0	2	8	0	0	2	8	0	0	3	7
联苯双酯	0.15	5	4	1	0 ²⁾	4	5	1	0 ²⁾	5	4	1	0 ²⁾
二至丸活性部位群	19.8	5	3	1	1 ²⁾	4	2	3	1 ²⁾	5	2	2	1 ²⁾
	13.2	5	2	1	2 ²⁾	3	3	2	2 ¹⁾	2	2	3	3 ²⁾
	6.6	0	3	4	3 ¹⁾	3	1	3	3 ¹⁾	1	3	2	4 ¹⁾

终导致细胞的死亡^[9]。MDA 是脂质过氧化反应的终产物之一,常用作脂质过氧化的指标^[10],可严重破坏细胞膜的结构,导致细胞肿胀、坏死,其含量反映了组织过氧化的损伤程度,故 SOD 活性及 MDA 含量常可反映体内脂质过氧化反应程度,间接反映机体组织、细胞损伤的程度^[11]。本实验研究结果表明,AFEP 高、中剂量组可以明显降低 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠肝组织 MDA 含量升高 (P < 0.01),提高肝组织 SOD 活性 (P < 0.01),提示 AFEP 对肝细胞的保护是通过抗自由基、抑制脂质过氧化发挥作用的。

综上所述,AFEP 对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤具有较强的保护作用,这为筛选二至丸最佳的保肝效应部位提供了重要实验依据。

[参考文献]

[1] 明·吴旻,著.伊泽信恬,撰.扶寿精方[M].北京:中医古籍出版社,1986:11.
 [2] 蔡秀江,黄美艳,丁安伟,等.二至丸考源及药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):272.
 [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,2010:412.
 [4] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:75.

[5] 闫冰,丁安伟,张丽,等.二至丸水提取物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,2010,16(14):131.
 [6] 蔡秀江,丁安伟,闫冰,等.二至丸保肝活性成分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,2011,17(20):113.
 [7] Chang M L, Yeh C T, Chang P Y, et al. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(27):4167.
 [8] Fukumoto L R, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(8):3597.
 [9] 车勇良.扇贝多肽(PCF)对 H₂O₂ 损伤胸腺细胞的保护作用[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(4):13.
 [10] 万方,郭景珍,李忻,等.柴胡皂苷 d 对肝纤维化大鼠 TPA、PAI、MDA 及 NO 影响的研究[J].中国药房,2007,18(24):1847.
 [11] 谢丽琼,李海芳,迪里努尔.小鼠中甘草毛状根、甘草切片总抗氧化能力和对 CCl₄ 致肝损伤保护的比较研究[J].食品科学,2009,30(23):432.

[责任编辑 聂淑琴]