

# 南沙参多糖分散片急性毒性试验及对小鼠试验性肝损伤的保护作用

冯泽岸<sup>1,2</sup>, 马海忠<sup>1,2</sup>, 李玲<sup>1,2</sup>, 廖明琪<sup>1,2</sup>, 邵婷玘<sup>1,2</sup>, 梁莉<sup>1\*</sup>, 王婷<sup>1</sup>, 乔华<sup>1</sup>

(1. 兰州大学第一医院 国家药物临床研究机构, 兰州 730000; 2. 兰州大学药学院, 兰州 730000)

**[摘要]** 目的: 观察南沙参多糖分散片(RPDTS)小鼠急性毒性反应及其对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)致小鼠肝损伤的保护作用。方法: 通过测定小鼠最大给药量考察 RPDTS 的急性毒性; RPDTS 低、中、高剂量(0.75, 1.5, 3 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃给药 7 d 后, 采用 CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤模型, 比色法测定小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、肝组织匀浆总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量, 观察肝组织病理学改变。结果: 小鼠 ig RPDTS 最大给药量为含生药 208 g·kg<sup>-1</sup>, 相当于南沙参临床用量的 120 倍; RPDTS 各剂量组可显著降低急性肝损伤小鼠血清中 ALT, AST 活性和肝组织中 MDA 含量( $P < 0.05$ ), 提高肝组织中 T-SOD 和 GSH-Px 活性( $P < 0.05$ ); 病理形态学观察显示 RPDTS 能明显减轻肝脏的病理损伤。结论: RPDTS 无急性毒性, 对 CCl<sub>4</sub> 所致小鼠急性肝损伤具有一定的保护作用。

**[关键词]** 南沙参多糖; 分散片; 急性毒性; 急性肝损伤; 四氯化碳; 最大给药量

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0247-04

## Acute Toxicity and Protective Effects of Radix Adenophorae Potanini Korsh Polysaccharides Dispersible Tablets on Acute Liver Injury in Mice

FENG Ze-an<sup>1,2</sup>, MA Hai-zhong<sup>1,2</sup>, LI Ling<sup>1,2\*</sup>, LIAO Ming-qi<sup>1,2</sup>, SHAO Ting-ji<sup>1,2</sup>,  
LIANG Li<sup>1\*</sup>, WANG Ting<sup>1</sup>, QIAO Hua<sup>1</sup>

(1. Department of National Drug Clinical Trials, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. College of Pharmaceutical Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the acute toxicity and the protective effects of Radix Adenophorae Potanini Korsh Polysaccharides dispersible tablets (RPDTS) on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in mice. **Method:** The maximum dosage test was used as intragastric administration in mice to observe acute toxicity of RPDTS. After intragastric administration RPDTS (0.75, 1.5, 3 g·kg<sup>-1</sup>) in mice for 7 days, the acute liver injury model was induced by CCl<sub>4</sub>. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) in serum and total superoxide dismutase (T-SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase enzyme (GSH-Px) in liver were determined by kits respectively. Histopathological examination was also carried out. **Result:** Acute toxicity test showed that the total dose of intragastric administration of RPDTS was 208 g·kg<sup>-1</sup> (according to *Adenophorae tetraphylla*) equivalent to 120 times the clinical dose for adults. Acute liver injury test showed that RPDTS could obviously decrease the levels of ALT, AST in serum and MDA in liver ( $P < 0.05$ ), obviously increase the levels of T-SOD, GSH-Px in liver, the histopathological examination indicated that liver injuries were relieved. **Conclusion:** RPDTS has no acute toxicity, RPDTS has

**[收稿日期]** 20120316(007)

**[基金项目]** 甘肃省中医药管理局科研项目(甘卫中发[2007]123号)

**[第一作者]** 冯泽岸, 硕士研究生, 从事临床药理学及药剂学工作, Tel: 15193106237, E-mail: fengzean999apple@163.com

**[通讯作者]** \* 梁莉, 硕士生导师, 主任药师, 从事临床药理学及药剂学工作, Tel: 0931-8625200 转 6748, E-mail: liangli418@163.com

protective effects on acute liver injuries induced by  $\text{CCl}_4$  in mice.

[**Key words**] Radix Adenophorae Potanini Korsh Polysaccharides; dispersible tablets; acute toxicity; acute liver injury;  $\text{CCl}_4$ ; the maximum dosage test

南沙参是桔梗科植物轮叶沙参或沙参的干燥根,具有养阴清肺,化痰,益气等功效。南沙参多糖是中药南沙参中的多糖组分,具有较好的抗衰老作用<sup>[1]</sup>、辐射防护作用<sup>[2]</sup>,对遗传损伤也具有一定的拮抗作用<sup>[3]</sup>,另外还可改善东莨菪碱所致大鼠学习记忆障碍<sup>[4]</sup>等。目前国内外并没有相关的南沙参多糖制剂上市。本课题组已研制出南沙参多糖分散片,并对其进行了质量标准建立、稳定性考察。为进一步评价南沙参多糖分散片的安全性及其对急性肝损伤的保护作用,本研究对南沙参多糖分散片的急性毒性及对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤的保护作用进行了初步观察,为南沙参多糖分散片开发提供依据。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 南沙参多糖分散片,兰州大学第一医院制备,批号 20110706,每片含南沙参多糖 0.144 g,相当于生药南沙参 0.83 g/片,临床常用量每日 3 次,每次 4~6 片。临用前用乳钵研细,用纯化水配成混悬液,每 1 mL 相当于生药 1.734 g;联苯双酯滴丸 (DDB),北京协和药厂,批号 20110213,研磨乳化后用纯化水配制成 1% 乳浊液;四氯化碳 ( $\text{CCl}_4$ ),南京化学试剂厂,用花生油配制成 0.1%  $\text{CCl}_4$  花生油溶液;丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、肝组织匀浆总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、丙二醛 (MDA) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 检测试剂盒 (批号分别为 20110521, 20110329, 20110218, 20110603, 20110514);南京建成生物工程研究所,其他试剂均为分析纯。

**1.2 动物** 昆明种小鼠,SPF 级,雌雄各半,体重 18~22 g,由兰州大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(甘)2009-0004。实验前动物于室内适应环境 1 周,室温 20~25℃,相对湿度 50%~70%。记录小鼠的行为活动、饮食、体重及精神状况。

## 2 方法

**2.1 急性毒性试验** 采用最大给药量法进行试验<sup>[5]</sup>。昆明种小鼠 40 只,雌雄各半,每组 20 只,随机分为 2 组:给药组、空白对照组。灌胃前禁食不禁水 16 h 后,按小鼠灌胃所能承受的最大体积灌胃 RPPTS (40 mL·kg<sup>-1</sup>, 1.734 g 生药/mL),每隔 6 h 给药 1 次,每日 3 次,空白对照组同法灌胃纯化水。给药间隔期间不禁食。观察给药后小鼠的外表行动、

反射活动、饮水量、大小便及存活情况等。包括皮肤、黏膜、毛色、眼睛、呼吸、循环、自主及中枢神经系统行为表现,连续观察 14 d。准确记录小鼠的中毒表现和其出现和消失时间、毒性反应的特点和死亡时间,所有小鼠包括死亡或处死的小鼠均进行尸检,尸检异常的器官作病理组织学检查。给药前、给药后 7, 14 d,记录小鼠的体重。

**2.2 对  $\text{CCl}_4$  致小鼠急性肝损伤的影响** 昆明种小鼠 60 只,随机分为对照组、模型组、DDB 组 (200 mg·kg<sup>-1</sup>, 相当于临床用量的 3.7 倍)、RPPTS 高、中、低剂量组 (3, 1.5, 0.75 g·kg<sup>-1</sup>, 相当于南沙参临床用量的 2, 1, 0.5 倍)。正常对照组和模型对照组小鼠 ig 纯化水 (20 mL·kg<sup>-1</sup>),其他各组 ig 同体积的相应药物, qd, 连续 7 d。末次给药 1 h 后,除正常对照组 ip 给予等体积的花生油以外,其余各组分别 ip 0.1%  $\text{CCl}_4$  花生油溶液 10 mL·kg<sup>-1</sup>,禁食不禁水。16 h 后各组小鼠眼球采血,离心,分离血清,测定 AST, ALT 活性;颈椎脱臼法处死小鼠,取左叶肝脏 4℃ 低温制备 10% 肝组织匀浆,测定 T-SOD 及 GSH-Px 活性、MDA 含量。

**2.3 肝组织病理形态学观察** 取小鼠肝右叶, 10% 甲醛固定,经脱水、浸蜡、包埋、制成 4 μm 厚石蜡切片、HE 染色,光镜下观察肝细胞的损伤程度。

**2.4 统计方法** 采用统计软件 SPSS 13.0 进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为有统计意义。

## 3 结果

**3.1 RPPTS 的急性毒性** 给药后除了少数小鼠短时间内活动减少外,各组小鼠均无明显中毒症状, 14 d 后各组小鼠均存活;试验结束后处死所有小鼠,肉眼观察:给药组与对照组内脏 (心、肝、脾、肺、肾、胃、肠) 均无任何异常。实验中各组小鼠体重正常增长,给药组与对照组比较无显著性差异,说明给药后对小鼠正常生长发育无影响。

根据小鼠 ig 南沙参多糖分散片混悬液最大质量浓度 1.0 g·mL<sup>-1</sup>, 40 mL·kg<sup>-1</sup>, 3 次/d, 计算得出小鼠灌胃南沙参多糖分散片的总剂量为 120 g·kg<sup>-1</sup> 体重,相当于生药南沙参的剂量为 208 g·kg<sup>-1</sup> 体重,按正常人体重 (60 kg) 计算相当于生药南沙参临床常用量的 120 倍。

**3.2 对小鼠 CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤的保护作用** CCl<sub>4</sub> 损伤肝组织后,模型组的血清 ALT,AST 水平较对照组明显升高( $P < 0.01$ )。RPDTS 能降低损伤小鼠血清中 ALT,AST 水平,各剂量组与模型组比较,有显著性差异( $P < 0.01$ ),且呈现一定的量效关系;与 DDB 组比较:RPDTS 各剂量组对 AST 的降低作用较 DDB 明显( $P < 0.01$ )。见表 1。

**表 1 RPDTS 对 CCl<sub>4</sub> 肝损伤小鼠血清 AST, ALT 的影响**( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>
对照	-	46.12 ± 16.13	166.15 ± 29.23
模型	-	615.97 ± 85.74 <sup>1)</sup>	653.47 ± 76.65 <sup>1)</sup>
RPDTS	0.75	460.03 ± 58.06 <sup>2,3)</sup>	518.68 ± 33.85 <sup>2,3)</sup>
	1.5	357.69 ± 49.20 <sup>2,3)</sup>	427.49 ± 50.94 <sup>2,3)</sup>
	3.0	307.36 ± 53.35 <sup>2)</sup>	373.93 ± 39.05 <sup>2,3)</sup>
DDB	0.2	270.10 ± 63.99 <sup>2)</sup>	634.26 ± 59.66

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ ;与 DDB 组比较<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表 2 同)。

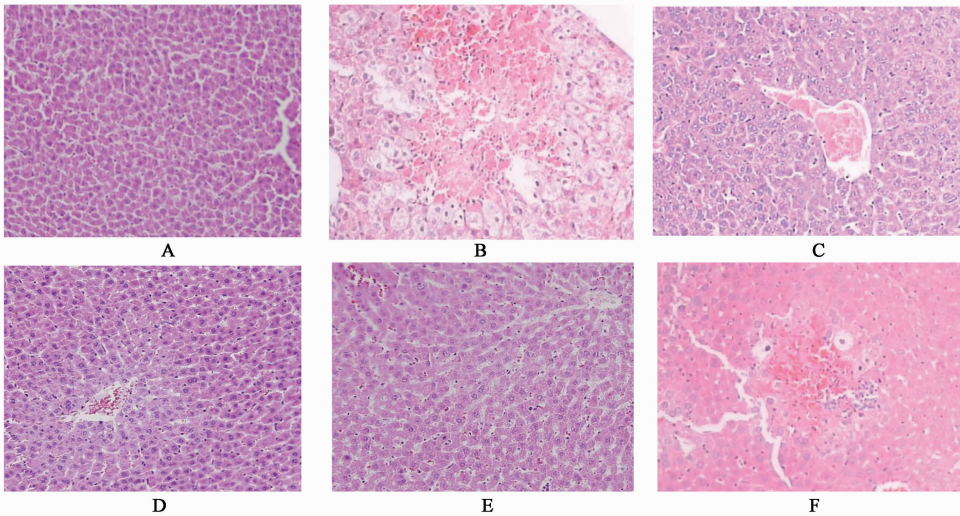
CCl<sub>4</sub> 致小鼠急性肝损伤后,MDA 水平显著升高,T-SOD 及 GSH-Px 活性显著下降,模型组与对照组相比较,差异显著( $P < 0.01$ )。与模型组比较,DDB 组、RPDTS 各剂量组均能显著降低损伤小鼠肝组织中 MDA 水平、提高 GSH-Px 及 T-SOD 的活性,且呈现一定的量效关系;与 DDB 组比较:RPDTS 中、高剂量组对 MDA 的降低作用及对 T-SOD 和

GSH-Px 的活性的提高也都较 DDB 明显( $P < 0.01$ )。见表 2。

**表 2 RPDTS 对 CCl<sub>4</sub> 肝损伤小鼠肝脏中 T-SOD、MDA, GSH-Px 的影响**( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	T-SOD /U·mg <sup>-1</sup>	MDA /nmol·mg <sup>-1</sup>	GSH-Px /U·mg <sup>-1</sup>
对照	-	268.00 ± 29.35	10.11 ± 2.39	1097.37 ± 143.50
模型	-	46.51 ± 22.12 <sup>1)</sup>	76.05 ± 14.30 <sup>1)</sup>	341.07 ± 52.95 <sup>1)</sup>
RPDTS	0.75	73.10 ± 24.13 <sup>2)</sup>	44.52 ± 9.43 <sup>3)</sup>	576.43 ± 124.13 <sup>3)</sup>
	1.5	130.92 ± 29.29 <sup>3,4)</sup>	33.90 ± 6.40 <sup>3,4)</sup>	756.34 ± 92.17 <sup>3,4)</sup>
	3.0	178.32 ± 24.46 <sup>3,4)</sup>	25.25 ± 6.10 <sup>3,4)</sup>	797.71 ± 101.17 <sup>3,4)</sup>
DDB	0.2	79.88 ± 29.56 <sup>2)</sup>	53.76 ± 13.23 <sup>3)</sup>	531.79 ± 108.96 <sup>3)</sup>

**3.3 肝组织病理切片观察结果** 对照组肝组织结构基本正常,肝细胞胞浆丰富,细胞核核质分布均匀,核仁清晰。模型组小鼠肝细胞疏松化或气球样变性,小叶内见多个点状坏死、片状坏死以及桥接坏死,于坏死灶内见大量中性粒细胞及淋巴细胞浸润;DDB 组可减轻组织病变范围与程度,使炎性细胞浸润减少,也可减少肝细胞变性坏死;RPDTS 0.75 g·kg<sup>-1</sup>组与模型组相比较肝细胞形态有所改善,坏死程度有所减轻,偶见片状坏死;RPDTS 1.5 g·kg<sup>-1</sup>组肝组织损伤较模型组明显减轻,多为点状坏死,偶见灶状坏死,肝细胞形态接近对照组;RPDTS 3.0 g·kg<sup>-1</sup>组肝组织损伤较模型组明显减轻,偶见点状坏死,肝细胞形态接近对照组。见图 1。



A. 对照组;B. 模型组;C. DDB 0.2 g·kg<sup>-1</sup>组;D. RPDTS 3.0 g·kg<sup>-1</sup>组;  
E. RPDTS 1.5 g·kg<sup>-1</sup>组;F. RPDTS 0.75 g·kg<sup>-1</sup>组  
**图 1 RPDTS 对 CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤小鼠肝组织病理的影响**(HE 染色, × 100)

**4 讨论**

**4.1 实验中通过预试验得知 RPDTS 急性毒性很**

低,测不出 LD<sub>50</sub>,故对其进行了一日 3 次给药的最大给药量试验,最大给药剂量下各组小鼠均未出现明

显急性中毒症状,14 d 后都存活,按 RPPTS 的给药总剂量( $120 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )推测,  $\text{LD}_{50}$  大于  $120 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,按化合物经口急性毒性分级标准,RPPTS 属于实际无毒类( $\text{LD}_{50} > 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。实验结果表明:RPPTS 无急性毒性,该药在此剂量范围内使用是安全的,该药是否存在长期毒性需进一步研究。

**4.2**  $\text{CCl}_4$  诱导的肝损伤模型是评价肝损伤药物疗效的标准模型<sup>[6]</sup>。 $\text{CCl}_4$  进入机体后,经肝脏细胞色素 P450 激活,生成三氯甲基自由基( $\cdot\text{CCl}_3$ )和三氯甲基过氧自由基( $\cdot\text{OOCCL}_3$ ),这 2 种自由基引起肝细胞的各种变化导致肝损伤,导致肝细胞内 SOD 和 GSH 过度消耗,MDA 大量产生,同时肝细胞破损后释放 ALT,AST 渗入血液而活性升高<sup>[7-10]</sup>。实验显示模型组的上述指标与对照组有显著的差异( $P < 0.01$ )。在 RPPTS 预防用药 7 d 后注射  $\text{CCl}_4$ ,RPPTS 可显著降低肝损伤诱发的血清 ALT,AST 水平的升高。GSH 可以保护含巯基的重要蛋白质或酶免受氧化剂尤其是过氧化物的损害,可以清除超氧阴离子  $\text{O}_2^-$  过氧化氢  $\text{H}_2\text{O}_2$  等自由基,也可作为谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转化酶的底物,减少或抑制氧自由基的产生<sup>[11]</sup>。模型组肝组织中 GSH-Px 水平显著降低,而 RPPTS 组较模型组可显著升高 GSH-Px 水平,表明 RPPTS 可增强机体的 GSH 系统对抗自由基的损害,起到对肝损伤细胞的保护作用。而 RPPTS 组较模型组可显著升高肝组织中 T-SOD 活性,降低 MDA 含量,表明 RPPTS 可提高机体的抗氧化能力,抑制自由基和脂质过氧化物的产生,减少抗氧化能力 T-SOD 的降低和过氧化产物 MDA 的产生,从而保护肝细胞膜,降低肝细胞损伤程度。肝组织病理形态学观察也提示 RPPTS 对  $\text{CCl}_4$  致小鼠肝组织损伤具有一定的保护作用。

**4.3** RPPTS 对  $\text{CCl}_4$  肝损伤小鼠具有较好的保护作用,其机制可能与 RPPTS 对抗  $\text{CCl}_4$  引起的膜脂质过氧化,减少自由基对细胞膜的损伤,促进肝细胞的再生和修复有关。

## [参考文献]

- [1] 孙亚捷,李新芳.南沙参多糖对小鼠的抗衰老及清除氧自由基作用的研[J].中国药师,2005,8(9):713.
- [2] 唐富天,梁莉,李新芳.南沙参多糖对大鼠的辐射防护作用[J].中药药理与临床,2002,18(2):15.
- [3] 刘青,李新芳.南沙参多糖对受照射小鼠遗传损伤的拮抗作用[J].中药药理与临床,2001,17(6):21.
- [4] 张春梅,李新芳.南沙参多糖改善东莨菪碱所致大鼠学习记忆障碍的研究[J].中药药理与临床,2001,17(6):19.
- [5] 徐淑云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:227.
- [6] 许金鹏,张慧慧,李朝品.原卟啉钠对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):188.
- [7] 王君明,崔瑛,王峥涛.超氧化物歧化酶参与肝损伤的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):265.
- [8] YANG Xiao-jun, LIU Jing, YE Lin-bai, et al. *in vitro* and *in vivo* protective effects of proteoglycan isolated from mycelia of Ganoderma lucidum on carbon tetrachloride-induced liver injury[J]. World Journal of Gastroenterology, 2006, 12(9): 1379.
- [9] Ibrahim H O, Adile F D, Bilal U, et al. Dose instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ )[J]. Hepatology Research, 2006, 35(3): 163.
- [10] GUO Ting-ting, XU Hong-li, ZHANG Lu-xi, et al. *In vivo* protective effect of porphyra yezoensis polysaccharide against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2007, 49(2): 101.
- [11] 王君明,崔瑛,申玲玲.中药致药源性肝损伤的氧化应激机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):247.

[责任编辑 何伟]