

归脾汤对雷公藤醇提物致急性肝损伤的保护作用

周文静¹, 柴智², 王永辉², 闫润红², 周然^{2*}

(1. 山西省中医药研究院, 太原 030012; 2. 山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] 目的: 建立雷公藤醇提物致大鼠急性肝损伤模型, 进而探讨中医经典方剂归脾汤对其的保护作用。方法: 50 只大鼠随机分为空白对照组、模型组、归脾汤低、中、高剂量组 ($4.5, 9, 18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。分别以相应剂量连续 ig 5 d 后, 再以雷公藤醇提物 ($3.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ig 3 d 造模。检测大鼠肝病理组织, 血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平。结果: 与空白对照组相比, 模型组血清 SOD, GSH-Px 活性明显降低 ($P < 0.05$), MDA 水平明显升高 ($P < 0.05$); 肝脏病理呈脂肪性病变, 肝细胞浑浊。与模型组相比, 归脾汤各组均可有效降低血清 ALT, AST, MDA 水平 ($P < 0.05$), 提高 GSH-Px 水平 ($P < 0.05$), 中、高剂量还可提高 SOD 水平 ($P < 0.05$); 归脾汤各组肝脏病理损伤与模型组相比较均有所减轻。结论: 归脾汤对雷公藤所致肝损伤有保护作用, 而且急性肝损伤的发生机制与脂质过氧化有关。

[关键词] 归脾汤; 雷公藤醇提物; 肝损伤; 脂质过氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0169-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120224.1733.004 **[网络出版时间]** 2012-02-24 17:33

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120224.1733.004.html>

Protective Effect of Guipi Tang on Acute Liver Injury Induced by Ethanol Extract from *Tripterygium wilfordii* in Rats

ZHOU Wen-jing¹, CHAI Zhi², WANG Yong-hui², YAN Run-hong², ZHOU Ran^{2*}

(1. Shanxi Institute of Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China;

2. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect and mechanism of Guipi Tang on acute liver injury reduce by ethanol extract from *Tripterygium wilfordii* in rats. **Method:** Totally 50 rats were randomly divided into control group, *T. wilfordii* model group, large-dose, medium-dose and small-dose groups of Guipi Tang ($4.5, 9, 18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups. Each group was respectively perfused with the corresponding dose of drug for 5 days. Then *T. wilfordii* by Ethanol was perfused for 3 days to produce the mode 1. The pathological tissue of liver was detected. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD), malondiadehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured. **Result:** Compared with the control group. The serum levels of SOD and GSH-Px in model group decreased and MDA increased obviously ($P < 0.05$). Pathological investigation showed that liver cell steatosis was took place with cell turbid. Compared with model group, Guipi Tang of all doses could effectively decrease ALT, AST and MDA level, increase GSH-Px level ($P < 0.05$). Large-dose and medium-dose also increased SOD level ($P < 0.05$). The liver injury was alleviated. **Conclusion:** Guipi Tang has effect of protecting the liver and the mechanism of liver injury has a relationship with lipid peroxidation.

[Key words] Guipi Tang; extract from *Tripterygium wilfordii* by ethanol; liver injury; lipid peroxidation

[收稿日期] 20111019(015)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30873433)

[第一作者] 周文静, 在读硕士, 从事方剂效用及其物质基础研究, Tel: 0351-2272276, E-mail: zhouwengjing0918@163.com

[通讯作者] * 周然, 博士, 教授, 博士生导师, 从事方剂效用及其物质基础研究, Tel: 0351-2272390, E-mail: zhour58@sohu.com

雷公藤系卫矛科一年生藤本植物,性凉,味辛、苦,有大毒,归肝、肾经,具有祛风除湿,活血通络,消肿止痛,杀虫解毒等功效。现代研究雷公藤具有抗炎和免疫抑制的作用,广泛用于自身免疫性疾病,疗效肯定,但同时存在明显的毒副作用。临床及实验证实其对消化系统尤其是肝功能有较大影响,从而限制了其临床的适用范围。本实验建立雷公藤醇提物所致的大鼠急性肝损伤模型,观察归脾汤的防治作用,进一步阐明雷公藤所致急性肝损伤的发病机制及归脾汤的保护作用机制。

1 材料

1.1 药材及雷公藤醇提物的制备 雷公藤药材采自江西九江,经山西省药品检验所鉴定为卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook 的干燥根。雷公藤自然干燥粉碎成细粉。取雷公藤细粉 1 600 g,用 10 倍体积的 95% 乙醇浸泡过夜,超声处理 45 min,冷却至室温,补足质量,以 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取上清液,上清液用旋转蒸发器减压回收乙醇至无醇味,置真空干燥中干燥,称重,得药物粉末 150.49 g,计算药物提取率为 9.41%,即每克雷公藤醇提物相当于原药材 10.63 g。灌胃用蒸馏水配成所需药物浓度。归脾汤(黄芪 12 g,龙眼肉 12 g,人参 6 g,白术 6 g,茯神 9 g,木香 6 g,酸枣仁 12 g,当归 9 g,远志 6 g,甘草 3 g),购自北京同仁堂药店。原药材加 10 倍量水,煎 2 次合并滤液,浓缩配成含生药为 0.225,0.45,0.90 g·mL⁻¹ 的汤剂,冰箱保存备用。

1.2 动物 SD 大鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号 SCXK(京)2009-0004,体重 180~220 g,雌雄各半。动物购回后饲养于(22±2)℃,55% 湿度环境中,自由饮水摄食,适应性饲养 1 周后开始实验。

1.3 仪器与试剂 BS224S 1/万电子天平(德国赛多利斯),KQ-300VDE 超声波清洗器(昆山市仪器有限公司),DL-5-B 离心机(上海安亭),USA1489-2010 全自动生化分析仪(西门子医疗诊断有限公司)。血清丙氨酸转氨酶(ALT,批号 C009)、天冬氨酸转氨酶(AST,批号 C010)、超氧化物歧化酶(SOD,批号 A001)、丙二醛(MDA,批号 A003)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,批号 A005),均由南京建成生物工程研究所提供。

2 方法

2.1 分组及造模^[1] 50 只大鼠随机分为 5 组,依次为空白对照组、模型组、归脾汤低、中、高剂量组,

每组 10 只。分别按 4.5,9.0,18.0 g·kg⁻¹,ig 给予归脾汤。模型组及空白对照组分别给予等体积的生理盐水。每日 1 次,连续 5 d。然后,除空白组外其余各组再以雷公藤醇提物按 3.2 mg·kg⁻¹ 剂量,每天 1 次,连续 ig 3 d 造模。大鼠在实验期间自由进食和饮水,定期根据体重适时调整用量。

2.2 样品制备与检测 于末次给药后禁食 12 h,动脉取血,分离血清。按试剂盒说明书操作步骤进行测定 ALT,AST,SOD,MDA,GSH-Px。肝脏病理组织学的测定,取同一部位肝组织,放入 10% 甲醛溶液中固定,制备切片,HE 染色,光镜观察。本实验将肝组织病变程度分为 4 级:(-)肝细胞正常;(+)肝细胞仅有轻度浊肿变性或点状坏死;(++)肝细胞广泛的浊肿,脂肪变性明显;(+++肝细胞脂肪变性严重,并出现瘀血现象。

2.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件对实验资料进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的比较采用单因素方差分析,病理组织学检查结果采用 Ridit 分析方法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对雷公藤醇提物致急性肝损伤大鼠血清 ALT,AST 的影响 实验表明雷公藤醇提物模型组大鼠血清 ALT,AST 明显升高,与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。归脾汤各剂量组均可有效降低血清 ALT,AST,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 归脾汤对雷公藤醇提物致急性肝损伤大鼠血清 ALT,AST 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$) U·L⁻¹

分组	剂量/g·kg ⁻¹	ALT	AST
空白	-	38.45 ± 3.36 ¹⁾	105.92 ± 16.44 ¹⁾
模型	-	52.61 ± 3.20	197.85 ± 33.63
归脾汤	4.5	42.62 ± 5.46 ¹⁾	153.31 ± 27.01 ¹⁾
	9.0	39.46 ± 6.85 ¹⁾	114.32 ± 22.36 ¹⁾
	18.0	40.32 ± 4.52 ¹⁾	134.68 ± 20.42 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

3.2 对雷公藤醇提物致急性肝损伤大鼠血清 SOD,GSH-Px,MDA 的影响 雷公藤模型组的大鼠血清 SOD,GSH-Px 活性明显降低,MDA 水平则明显升高,与空白组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。归脾汤各组均可提高血清 GSH-Px 活性,降低血清 MDA 水平,中高剂量还可提高 SOD 活性,与模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 病理组织学改变 正常组肝脏形态正常,光

表2 归脾汤对雷公藤醇提物致急性肝损伤大鼠血清 SOD, GSH-Px, MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	MDA		SOD		GSH-Px	
		/nmol·mL ⁻¹	/U·mL ⁻¹	/μmol·L ⁻¹	/μmol·L ⁻¹		
空白	-	5.23 ± 0.76 ⁽¹⁾	169.52 ± 14.62 ⁽¹⁾	20.61 ± 8.13 ⁽¹⁾			
模型	-	9.49 ± 0.51	120.34 ± 13.94	14.88 ± 3.64			
归脾汤	4.5	6.23 ± 0.12 ⁽¹⁾	122.82 ± 13.41	18.73 ± 4.36 ⁽¹⁾			
	9.0	5.77 ± 0.43 ⁽¹⁾	165.26 ± 16.75 ⁽¹⁾	19.27 ± 5.62 ⁽¹⁾			
	18.0	5.62 ± 0.66 ⁽¹⁾	160.57 ± 18.58 ⁽¹⁾	18.38 ± 2.74 ⁽¹⁾			

镜下染色显示肝细胞结构清晰,肝窦正常,肝索排列规则,未见异常改变。雷公藤醇提物组可见肝窦扩张,肝细胞脂肪变性严重,瘀血,肝索排列紊乱。与

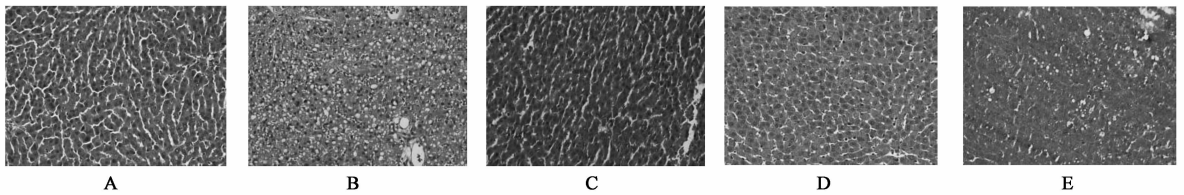


图1 各组大鼠肝脏病理组织切片(HE, ×200)

4 讨论

药物性肝损伤的中医机制,为外来之药邪侵入人体,首先犯脾胃,致脾虚不运,助湿生热,进而影响肝的疏泄功能,导致发黄,肝脏肿大等症状。而肝损伤最后导致之根本在于气血亏虚,顾治肝先治脾,选方归脾汤,补脾气,养气血,方可疏肝解毒,治其根本。运用中医经典方剂归脾汤对抗雷公藤所致急性肝损伤,为雷公藤在各种难治疾病的治疗中发挥更大作用,使中医优势在雷公藤减毒增效研究方面得到充分发挥。

雷公藤导致的肝损伤,认为其损伤机制与其引起脂质过氧化反应有关,肝组织内氧自由基水平的升高是导致肝损伤的核心环节^[2]。药物对肝细胞的直接毒性作用主要为药物在肝内经代谢转化为亲电子基,自由基及氧基,这些产物与大分子物质共价结合或造成脂质过氧化而导致肝细胞坏死^[3]。亲电子基与肝细胞大分子蛋白质巯基形成共价结合,使细胞结构和功能破坏,自由基和氧基引起膜脂质的过氧化损伤,蛋白质损伤和功能障碍,核酸氧化损伤,最终引起细胞死亡或癌变^[4]。

SOD 是存在于细胞内的天然抗氧化剂,具有清除自由基,防止脂质过氧化作用,其活性降低则自由基清除不足^[5]而引起损伤,同时,有肝损伤的 SOD 活性均明显下降^[6]。另外 MDA 是脂质氧化的主要降解产物,一系列氧活性物,并诱导膜系统发生脂质过氧化反应,膜磷脂大量降解,从而破坏生物膜结构的完整性,引起膜通透性增高,最终导致肝细胞死

亡。研究还发现肝损伤程度越重,血清中的 MDA 含量则越高^[3]。脂质过氧化反应还可使 GSH-Px 活性下降,同时 GSH-Px 对肝细胞膜过氧化的影响主要是防止氧化物形成,是重要的抗氧化和解毒物质,肝损伤越严重,则 GSH-Px 活性越下降^[7]。

表3 归脾汤对雷公藤醇提物致急性肝损伤大鼠肝脏病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹	肝脏病变分级				病理积分
		-	+	++	+++	
空白	-	9	1	0	0	0.1 ± 0.34 ⁽¹⁾
模型	-	0	1	5	4	2.3 ± 0.62
归脾汤	4.5	1	4	4	1	1.5 ± 0.64 ⁽¹⁾
	9.0	2	7	1	0	0.9 ± 0.59 ⁽¹⁾
	18.0	3	6	1	0	0.8 ± 0.71 ⁽¹⁾

亡。本实验中模型组与正常组比较, SOD, GSH-Px 活性明显降低, MDA 水平则明显升高,而归脾汤治疗各组 SOD, GSH-Px 升高, MDA 降低,通过实验研究得出,归脾汤对雷公藤所致急性肝损伤有保护作用,而且急性肝损伤的发生机制与脂质过氧化有关。

【参考文献】

- [1] 禄保平,苗明三,杨晓娜.应用雷公藤多苷灌胃建立小鼠急性肝损伤模型的研究[J].中药药理与临床,2007,23(2):75.
- [2] 陈象青,王钦茂.白芍总苷与当归提取物合用对实验性肝炎的保护作用[J].安徽中医学院学报,2007,21(3):44.
- [3] 刘丹卓,赵新广.肝损伤病因病理机制及中医药治疗研究近况[J].国医论坛,2006,21(6):53.
- [4] Fan' ell G C. Drugs and steatohepatitis[J]. Sem Liver Dis,2002,22(2):185.
- [5] Ladilov Y, Efe O, Schafer C. Reoxygenation-induced rigor-type contracture[J]. Mol Cell Cardiol, 2003, 25(12):1481.
- [6] 浦林,李娟.超氧化物歧化酶比活性在肝肾疾病中的应用[J].天津医药,1993,21(10):612.
- [7] 彭汉光,戴春林,魏屏,等.加味四逆散保护肝损伤的实验研究[J].中国中医药信息杂志,2000,7(11):25.

[责任编辑 聂淑琴]