

逍遥散对雷公藤致大鼠急性肝损伤的保护作用

柴智^{1,3}, 周文静², 王永辉³, 樊慧杰³, 高丽³, 闫润红³, 周然^{3*}

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 山西省中医药研究院, 太原 030012;
3. 山西中医学院, 太原 030024)

[摘要] 目的: 观察中医经典方剂逍遥散对雷公藤水煎剂致大鼠急性肝损伤的保护作用, 并初步探讨相关机制。方法: 60只大鼠随机分为空白对照组、模型组、甘利欣(0.056 g·kg⁻¹)对照组、逍遥散低、中、高剂量组(3.38, 6.75, 13.50 g·kg⁻¹)。分别以相应剂量药物连续ig 5 d, 再以雷公藤水煎剂按生药量计3.2 mg·kg⁻¹ ig 4 d造模。测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性及丙二醛(MDA)含量, 并做肝脏病理学检查。结果: 与空白组比较, 模型组血清ALT、AST及MDA水平明显升高($P < 0.05$), SOD、GSH-Px水平明显降低($P < 0.05$); 肝脏病理呈脂肪性病变, 肝细胞浑浊。与模型组比较, 逍遥散各组均可有效降低血清ALT、AST及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($P < 0.05$); 逍遥散各组肝脏病理损伤与模型组比较均有所减轻。结论: 雷公藤所致急性肝损伤与其引起脂质过氧化反应有关; 逍遥散对雷公藤所致急性肝损伤具有保护作用, 其作用机制与抑制脂质过氧化反应有关。

[关键词] 逍遥散; 雷公藤; 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)07-0170-03

Study on Protective Effect and Mechanism of Xiaoyao San on the Acute Liver Injury Induced by *Tripterygium wilfordii*

CHAI Zhi^{1,3}, ZHOU Wen-jing², WANG Yong-hui³, FAN Hui-jie³, GAO Li³, YAN Run-hong³, ZHOU Ran^{3*}

(1. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Shanxi Institute of Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China;

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

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect and mechanism of Xiaoyao San on rats' acute liver injury induced by the decoction of *Tripterygium wilfordii*. **Method:** Sixty rats were randomly divided into control group, *T. wilfordii* model group, ganlixin group, low-dose, medium-dose and high-dose groups of Xiaoyao San. Each group was respectively fed with the corresponding dose of drug for 5 days. Then fed with decoction of *T. Wilfordii* for 4 days to make the model. alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase GSH-Px in serum were measured and liver pathology is detected. **Result:** Compared with the control group, the serum ALT, AST and MDA of model group were significantly increased, SOD and GSH-Px decreased obviously ($P < 0.05$). Pathological investigation showed liver fatty change and turbid degeneration. Compared with model group, all doses of Xiaoyao San could effectively decrease ALT, AST and MDA, increase GSH-Px ($P < 0.05$), medium-dose and high-dose also increase SOD ($P < 0.05$), the liver injury was alleviated. **Conclusion:** *T. wilfordii*-induced acute liver injury is associated with lipid peroxidation. Xiaoyao San has effect of protecting the liver injury induced by *T. wilfordii* and the mechanism has a relationship with inhibition of lipid peroxidation.

[Key words] Xiaoyao San; *Tripterygium wilfordii*; liver injury; lipid peroxidation

[收稿日期] 20111111(009)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30873433); 山西省高校科技开发项目(20101106)

[第一作者] 柴智, 在读博士, 讲师, 从事方剂效用及其物质基础研究, Tel:0351-2272241, E-mail: chaizhi008@126.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

雷公藤是卫矛科雷公藤属一年生藤本植物,又名黄藤木、黄腊藤、断肠草等^[1],有大毒,归肝、肾经,具有祛风除湿、舒筋活络、消肿止痛、杀虫解毒等多种药理活性,常用于治疗自身免疫等难治性疾病(如类风湿性关节炎、慢性肾炎、系统性红斑狼疮等)^[2],效果显著,但同时表现出明显的毒副作用,成为近半个世纪以来报道发生中毒事件最多的中草药之一,其所致肝毒性在相关文献报道中居单味肝损伤中药的首位^[3],近年来已引起临床高度重视。本实验在提前给予大鼠逍遥散进行预防的基础上,用雷公藤水煎剂制备大鼠急性肝损伤模型,观察逍遥散的预防保护作用,并阐明雷公藤所致急性肝损伤的发生机制及逍遥散的保护作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,体重100~120g,雌雄各半,购自北京华卓康生物科技股份有限公司,许可证号SCXK(京)2009-0004。动物购回后饲养于(22±2)℃,55%湿度环境中,自由摄水摄食,适应性饲养1周后开始实验。

1.2 药品 雷公藤水煎剂的制备:雷公藤药材采自江西九江,经山西省药品检验所主管药师史宪海鉴定,为卫矛科植物雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f., TWHF)的干燥根。经粉碎后,称取一定量雷公藤细粉,常规煎煮2次,合并滤液,浓缩并减压蒸干为粉末备用(1g药粉含生药量6.5g),灌胃时用蒸馏水配制为实验所需药物浓度的混悬液。逍遥散选用《太平惠民和剂局方》中的配方(北柴胡30g,当归30g,白芍30g,白术30g,茯苓15g,制甘草15g,生姜10g,薄荷10g),购自北京同仁堂饮片有限责任公司(批号20050915),经山西省药品检验所鉴定为纯正药材。常规煎煮2次,合并滤液,浓缩并减压蒸干为粉末备用(1g药粉含生药量4.5g),灌胃时用蒸馏水配制为实验所需药物浓度的混悬液。甘利欣胶囊购自江苏正大天晴药业股份有限公司(批号040801),灌胃时用蒸馏水配制为实验所需药物浓度的混悬液。

1.3 仪器与试剂 BS224S 1/万电子天平(德国赛多利斯集团),DL-5-B离心机(上海安亭科学仪器厂),USA1489-2010全自动生化分析仪(西门子医疗诊断有限公司)。ALT试剂盒(批号C009)、AST试剂盒(批号C010)、SOD试剂盒(批号A001)、MDA试剂盒(批号A003)、GSH-Px试剂盒(批号A005),均购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 分组及给药^[4] 60只大鼠随机分为6组,每组10只,分别为空白组,模型组,甘利欣对照组,逍遥散低、中、高剂量组。逍遥散低、中、高剂量组分别按含生药剂量3.38,6.75,13.50g·kg⁻¹ig给药(按成人用药量换算成大鼠等效剂量作为大鼠低剂量组);甘利欣对照组按0.056g·kg⁻¹ig给药(按成人用药量换算成大鼠等效剂量);空白组和模型组分别给予等体积的生理盐水。每天1次,连续4d。第5d除空白组外其余各组再以雷公藤水煎剂按生药剂量3.75g·kg⁻¹ig给药,每天1次,连续4d。大鼠在实验期间自由进食和饮水,定期称重并根据体重适时调整给药量。

2.2 样品制备及指标检测 于末次给药后禁食12h,处死大鼠,腹腔静脉取血,离心制备血清,按试剂盒说明书操作步骤测定血清ALT,AST,SOD,GSH-Px的活性及MDA的含量;取同一部位肝组织1块,放入10%甲醛溶液中固定,制备切片,HE染色,光镜观察肝脏病理学变化。

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, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对雷公藤水煎剂致急性肝损伤大鼠血清ALT,AST活性的影响 与空白组比较,雷公藤水煎剂模型组大鼠血清ALT,AST活性明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较逍遥散各剂量组及甘利欣组均可有效降低血清ALT,AST,差异均有统计学意义($P < 0.05$);逍遥散各剂量组与甘利欣组比较大鼠血清ALT、AST活性差异无统计学意义。见表1。

3.2 对雷公藤水煎剂致急性肝损伤大鼠血清SOD,GSH-Px及MDA的影响 与空白组比较,雷公藤模型组的大鼠血清SOD,GSH-Px活力明显降低,MDA含量则明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,逍遥散各剂量组均可提高血清GSH-Px活力,降低血清MDA含量,中、高剂量组还可提高SOD活力,差异均有统计学意义($P < 0.05$);逍遥散各剂量组与甘利欣组比较大鼠血清SOD,GSH-Px活力和MDA含量差异无统计学意义。见表2。

3.3 病理组织学改变 空白组肝脏形态正常,色泽鲜红,未见明显病变,光镜下HE染色显示肝索排列规则,细胞结构清晰。模型组肝脏色泽晦暗,光镜下

表 1 逍遥散对雷公藤水煎剂致大鼠急性肝损伤血清 ALT, AST 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$
空白	-	33.57 \pm 5.46 ¹⁾	101.22 \pm 17.38 ¹⁾
模型	-	71.55 \pm 7.13	199.44 \pm 30.16
甘利欣	0.056	39.24 \pm 10.48 ¹⁾	120.52 \pm 19.61 ¹⁾
逍遥散	3.38	45.68 \pm 8.76 ¹⁾	142.59 \pm 26.24 ¹⁾
	6.75	42.31 \pm 9.39 ¹⁾	129.13 \pm 24.87 ¹⁾
	13.50	36.02 \pm 8.93 ¹⁾	118.47 \pm 21.02 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 逍遥散对雷公藤水煎剂致急性肝损伤大鼠血清 SOD, GSH-Px 及 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	SOD	GSH-Px	MDA
		/ $U \cdot mL^{-1}$	/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	/ $nmol \cdot mL^{-1}$
空白	-	164.63 \pm 10.34 ¹⁾	899.78 \pm 147.61 ¹⁾	4.74 \pm 0.91 ¹⁾
模型	-	101.26 \pm 14.78	514.25 \pm 123.96	8.91 \pm 0.65
甘利欣	0.056	150.39 \pm 16.04 ¹⁾	802.41 \pm 131.65 ¹⁾	5.17 \pm 0.82 ¹⁾
逍遥散	3.38	114.31 \pm 15.36	693.73 \pm 124.54 ¹⁾	6.18 \pm 0.93 ¹⁾
	6.75	145.75 \pm 16.70 ¹⁾	807.62 \pm 116.83 ¹⁾	5.69 \pm 0.54 ¹⁾
	13.50	150.82 \pm 17.48 ¹⁾	836.55 \pm 129.19 ¹⁾	5.32 \pm 0.76 ¹⁾

HE 染色可见肝索排列紊乱,肝细胞浑浊,水肿及脂肪变性明显,伴片状坏死,与空白组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);逍遥散各剂量组及甘利欣组肝脏色泽较红,光镜下 HE 染色可见肝索轻度紊乱,肝细胞浑浊,水肿及脂肪变性明显减轻,未见明显的肝细胞坏死现象,与模型组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。病理积分分析方法参考文献[5],统计结果见表 3。

表 3 逍遥散对雷公藤水煎剂致大鼠急性肝损伤病理 Radit 分析结果 ($n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	病变程度				P (与模型组比较)
		-	+	++	+++	
空白	-	10	0	0	0	< 0.05
模型	-	0	0	4	6	
甘利欣	0.056	2	5	3	0	< 0.05
逍遥散	3.38	1	4	4	1	< 0.05
	6.75	2	6	2	0	< 0.05
	13.50	3	5	2	0	< 0.05

4 讨论

研究报道,药物导致肝损伤的发生机制可能与其引起脂质过氧化反应有关^[6],一般而言,脂质过氧化的主要降解产物 MDA 可严重损伤肝细胞膜结构,导致肝细胞的肿胀、坏死^[7]。SOD 是体内自由基的重要清除剂,可防止生物膜过氧化引起的毒性作用^[8],据报道,各型肝病患者 SOD 活性均明显下降,且与肝脏病理损伤严重程度呈正相关^[9]。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,肝毒性越严重,则 GSH-Px 含量越低^[10]。

本实验结果显示,与空白组比较,模型组血清 ALT, AST 及 MDA 水平明显升高, SOD, GSH-Px 水平明显降低;肝脏色泽晦暗,光镜下可见肝索排列紊乱,肝细胞浑浊,水肿及脂肪变性明显,伴片状坏死。与模型组比较,逍遥散各剂量组均可有效降低血清 ALT, AST 及 MDA 水平,提高 GSH-Px 水平,中、高剂量还可提高 SOD 水平;逍遥散各组肝脏病理损伤与模型组比较均有所减轻。结果表明,雷公藤所致急性肝损伤与其引起脂质过氧化反应有关;逍遥散对雷公藤所致急性肝损伤具有保护作用,其作用机制与抑制脂质过氧化反应有关。以此为逍遥散防治雷公藤所致肝损伤以及中医方剂防治中药引起肝脏及其他器官的毒副作用提供理论和实验依据。

[参考文献]

- [1] 郭艳红,谭昱. 雷公藤的毒性及其研究概况[J]. 中药材, 2007, 30(1): 112.
- [2] 倪龙,戴静,穆芳英,等. 正相 HPLC 法测定雷公藤药材及其制剂中雷公藤酯甲的含量[J]. 中国药品标准, 2007, 8(3): 32.
- [3] 傅肖岩,劳邵贤. 重视中药所致肝损害[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(2): 130.
- [4] 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.
- [5] 盛云华,李峰杰,金若敏,等. 山豆根对小鼠急性肝毒性及其病理形态学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 144.
- [6] 柴智,周文静,周然,等. 雷公藤肝毒性及其作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 270.
- [7] 肖碧跃,赵国荣,贺又舜,等. 理脾护肝调脂丸对脂肪肝大鼠肝脏 MDA, SOD 影响的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 230.
- [8] 王君明,崔瑛,季莉莉,等. 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.
- [9] 周艳丽,张磊,刘维. 白芍总苷对雷公藤多苷片所致小鼠急性肝损伤保护作用的实验研究[J]. 天津中医药, 2007, 24(1): 61.
- [10] 许金鹏,张慧慧,李朝品,等. 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): 168.

[责任编辑 聂淑琴]