

肝康片对四氯化碳致动物肝损伤的作用

陈文丽*, 曾贵荣, 陈志, 邓青, 潘善庆

(湖南省药物安全评价研究中心, 长沙 410331)

[摘要] **目的:**观察肝康片对化学药物诱发肝损伤的保护作用。**方法:**将60只昆明小鼠随机分成6组:正常对照组、模型组、肝康片高、中、低剂量组(32.8, 16.4, 8.2 g·kg⁻¹)和护肝片组(5.62 g·kg⁻¹)。除正常组和模型组外,其余小鼠每日给药ig 1次,共7 d,从第5天开始,各给药组及模型组予ip 0.2% CCl₄(20 mL·kg⁻¹)1次,造成急性肝损伤。造模后48 h,采血测定血清中天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)含量。另取60只SD大鼠,随机分成6组:正常对照组、模型组、肝康片高、中、低剂量组(22.68, 11.34, 5.67 g·kg⁻¹)和护肝片组(3.8 g·kg⁻¹),除正常组ip等体积生理盐水外,其他大鼠ip 10% CCl₄(5 mL·kg⁻¹),每周2次,连续7周,造成慢性肝损伤。观察大鼠血清的生化指标和病理组织变化。**结果:**给药7 d,肝康片高中剂量组可降低小鼠CCl₄急性肝损伤血清中的ALT(47.31 ± 9.37), (60.14 ± 11.25) U·L⁻¹和AST(231.67 ± 19.26), (272.11 ± 15.25) U·L⁻¹含量,与模型组比较均有显著的差异。给药8周,各剂量组肝康片还可明显降低CCl₄大鼠慢性肝损伤血清中ALT和AST的含量,提高血清中的白蛋白(ALB)(40.7 ± 1.5), (39.6 ± 1.8) g·L⁻¹的含量,降低血清中总胆红素(TBIL)(9.22 ± 1.90), (9.34 ± 2.78) μ·mol·L⁻¹的含量,与模型组比较均有显著差异。**结论:**肝康片对CCl₄所致小鼠急性肝损伤和大鼠慢性肝损伤均有明显的治疗作用。

[关键词] 肝康片; 四氯化碳; 肝损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0200-04

Effect of Gankang Tablet on Liver Injury induced by Carbon Tetrachloride in Animals

CHEN Wen-li*, ZENG Gui-rong, CHEN Zhi, DENG Qing, PAN Shang-qing

(Hunan Research Center for Safety Evaluation of Drugs, Changsha 410331, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protection of Gankang tablets on liver injury induced by chemical drugs in animals. **Method:** Sixty mice were randomly divided into six groups: the normal group, the model group, high-dose Gankang group (19.8 g·kg⁻¹), middle-dose Gankang group (13.2 g·kg⁻¹) and low-dose Gankang group (6.6 g·kg⁻¹), Hugang tablet group (150 mg·kg⁻¹). Except for normal group and model group, the other mice were orally administered corresponding drugs once per day for seven days. Then, the treated groups and model group were ip given 0.2% CCl₄ (20 mL·kg⁻¹) once to produce acute liver injury on fifth day. The Serum

[收稿日期] 20110622(013)

[通讯作者] * 陈文丽, 硕士, 讲师, 从事药物毒理研究, Tel: 0731-83285167

[3] 连红琴, 秦铮然, 张月虹, 等. 桃红四物汤的临床应用及实验研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(9):1868.

[4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000:495.

[5] 王钰莹, 魏英, 夏文. 银丹心脑通软胶囊对垂体后叶素致心肌缺血大鼠心电图的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(7):804.

[6] 吕树静. 冠心病分子机制研究进展[J]. 中国医药导报[J]. 专家论坛, 2009, 6(7):5.

[7] 刘永国, 任澎. 心肌缺血/再灌注损伤的机制研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(21):3267.

[8] 李佳, 李红磊, 唐慧慧. 天麻多糖对垂体后叶素致急性心肌缺血大鼠的保护作用[J]. 中国医院用药评价与分析, 2010, 10(9):818.

[责任编辑] 聂淑琴

was collected after 48 h to detect level of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT). Sixty SD rats were randomly divided into six groups: the normal group, the model group, high-dose Gankang group ($22.68 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), middle-dose Gankang group ($11.34 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and low-dose Gankang group ($5.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Hugang group ($3.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The treated groups were ip 10% CCl_4 ($5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) once every two week for eight weeks to establish chronic liver injury, whereas the normal were ip given equal volume saline. To observe the hepatic pathological and biochemical indexes changes in rats. **Result:** Gankang tablets can reduce the level of ALT (47.31 ± 9.37), (60.14 ± 11.25) $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ and AST (231.67 ± 19.26), (272.11 ± 15.25) $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ of serum in mice which compared with the model group, the high-dose group and the middle-dose group showed a significant difference. Gankang tablets can also significantly reduce levels ALT and AST of serum in rats, increasing Albumin (ALB) (40.7 ± 1.5), (39.6 ± 1.8) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels in serum and decreasing total bilirubin (TBIL) (9.22 ± 1.90), (9.34 ± 2.78) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ levels after eight weeks. There was a significant difference compared with model group. **Conclusion:** Gankang tablets have significant therapeutic effects on CCl_4 induced acute liver injury and chronic liver injury.

[**Key words**] Gankang tablets; carbon tetrachloride; liver injury

肝康片是湖南德康制药股份有限公司生产的用于治疗急、慢性肝炎的纯中药制剂,处方由柴胡、田基黄、茵陈、蒲公英、甘草、金钱草等中药组成,具有清肝利湿之功效。用于肝胆湿热所致的黄疸,症见周身小便俱黄,体疲乏力、纳呆、恶心厌油、苔黄腻,脉弦滑数;及急慢性肝炎、胆囊炎。本文主要观察肝康片对 CCl_4 所致动物肝损伤的保护作用,探讨治疗急慢性肝炎的作用机制,并为临床应用提供药效学依据。

1 材料

1.1 动物 雄性昆明种小鼠,SPF级,60只,体重(21 ± 1)g;雄性SD大鼠,SPF级,体重(150 ± 10)g,60只,均由湖南斯莱克景达有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(湘)2009-0004,实验动物使用许可证号SYXK(湘)2010-0008。

1.2 药品 肝康片(含生药3.667g/片),批号090901,由湖南德康制药股份有限公司生产;护肝片(含生药1.255g/片),批号20100702,哈药集团三精千鹤制药有限公司生产。

1.3 试剂 四氯化碳(CCl_4),分析纯,批号091021;丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),白蛋白(ALB),总蛋白(TP),总胆红素(TBIL)检测试剂盒。批号0908074,日本和光纯药工业株式会社。

1.4 仪器 LABOSPEC7003全自动生化分析仪(日本日立),MACHI-LIR高速冷冻离心机(美国Thermo)。

2 方法

2.1 对小鼠急性肝损伤的影响 取雄性小鼠60

只,均分成6组,每组10只,分为正常对照组,模型对照组,护肝片组(按生药量计 $5.62 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,相当于人临床剂量2倍),肝康片高、中、低剂量组(按生药量计,下同)分别为 $32.8, 16.4, 8.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,分别相当于人临床剂量的4,2,1倍。各组ig给药,每日1次,连续7d。给药第5天下午除正常对照组外,其余小鼠按 $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,ip 0.2%的 CCl_4 1次,造成肝细胞急性损伤^[1]。于造模后48h,即末次给药后1h,眼眶后静脉丛采血,测定血清中ALT和AST含量。

2.2 对大鼠慢性肝损伤的影响 取雄性大鼠80只,其中10只用于正常对照组,其余动物按 $5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ip 10%的 CCl_4 ,每周2次^[2],2周后眼眶后静脉丛采血测定血清中ALT和AST。选取50只ALT含量低于 $100 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 的动物,并根据ALT含量均匀分成5组($n = 10$),分别为模型对照组,护肝片组($3.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),肝康片高、中、低剂量组($22.68, 11.34, 5.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,分别相当于人临床剂量的4,2,1倍)。分组后上述5组仍继续ip 10%的 CCl_4 造模,正常对照组则ip等体积生理盐水,每周2次,连续8周。同时,各给药组每天ig给药,每日1次,连续8周。模型对照组和正常对照组每天予等体积蒸馏水ig。给药后第6周和第8周末次给药后1h,取血分别检测血清中ALT,AST,ALP,ALB,TP,TBIL的含量;给药8周后,即末次给药后24h,麻醉处死各组动物,解剖取肝右叶同部位约 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 组织块做病理学检查^[3]。各组肝组织经HE染色、VG染色后进行观察,纤维组织增生程度分级标准参考有关文献^[4]：“-”表示正常组织结构；“+”

表示胶原纤维含量增加,很少形成条索分隔肝小叶,可见汇管区扩大;“++”表示胶原纤维呈细条索状分隔肝小叶,散在分布,表现为不完全假小叶;“+++”表示胶原纤维呈较宽的条索状分隔肝小叶,胶原纤维明显增加,表现为完全分隔成假小叶。

2.3 统计方法 实验数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,等级资料进行秩和检验,采用 SPSS 17.0 统计软件分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 肝康片对小鼠急性肝损伤的影响 肝康片 3 个剂量组和护肝片组能明显降低血清中 ALT 和 AST 的含量,上述各组与模型对照组比较均有显著性差异,表明对 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤有明显的预防作用。见表 1。

3.2 肝康片对大鼠慢性肝损伤的影响

3.2.1 对生化指标的影响 在给药 6 周后,护肝片组及肝康片高、中剂量组可明显降低大鼠血清中 ALT,AST 含量;护肝片组、肝康片高剂量组能降低血清中 TBIL 的含量。给药 8 周后,护肝片组及肝康片高、中、低剂量组均能降低血清中 ALT,AST,TBIL

表 1 肝康片对 CCl_4 致小鼠急性肝损伤的预防作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	ALT	AST
正常对照	-	42.62 ± 5.11	211.25 ± 14.33
模型对照	-	103.70 ± 21.22	380.72 ± 29.47
护肝片	3.89	50.62 ± 15.62 ²⁾	240.15 ± 25.32 ²⁾
肝康片	22.68	47.31 ± 9.37 ²⁾	231.67 ± 19.26 ¹⁾
	11.34	60.14 ± 11.25 ¹⁾	272.11 ± 15.25 ¹⁾
	5.67	79.63 ± 17.56	320.70 ± 23.56

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

的含量;护肝片组,肝康片高、中剂量组可明显提高血清中 ALB 的含量,与模型组比较均有显著性差异。见表 2~3。

3.2.2 对肝脏组织损伤病理的影响 与模型组比较,给药 8 周后,护肝片组和肝康片各剂量组肝组织经 HE 染色,在显微镜下观察,肝组织纤维增生,汇管区的炎性细胞浸润,结节的形成均有明显的减轻;经 VG 染色,在显微镜下观察,护肝片和肝康片各剂量组组织间质增生亦明显减轻。各组肝脏病变程度统计学分析结果,与模型组比较,均有显著性差异。见表 4~5。

表 2 肝康片给药 6 周对 CCl_4 致大鼠慢性肝损伤生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$	ALP/ $U \cdot L^{-1}$	TP/ $g \cdot L^{-1}$	ALB/ $g \cdot L^{-1}$	TBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
正常对照	-	27.62 ± 3.97	203.54 ± 14.62	30.2 ± 2.5	80.1 ± 5.1	38.2 ± 1.7	4.92 ± 1.73
模型对照	-	90.21 ± 15.32	357.20 ± 25.36	38.7 ± 1.6	78.3 ± 4.9	35.6 ± 1.1	13.87 ± 4.21
护肝片	3.89	60.75 ± 12.68 ²⁾	276.17 ± 24.54 ²⁾	37.5 ± 0.9	77.2 ± 5.4	37.2 ± 1.5	8.29 ± 5.72 ¹⁾
肝康片	22.68	52.32 ± 14.53 ²⁾	236.92 ± 27.21 ²⁾	36.3 ± 1.1	78.3 ± 4.4	37.8 ± 1.4	7.93 ± 5.02 ¹⁾
	11.34	59.72 ± 15.56 ²⁾	266.18 ± 25.72 ²⁾	37.0 ± 1.5	76.2 ± 6.1	36.2 ± 1.2	9.56 ± 7.24
	5.67	70.21 ± 12.76	326.24 ± 21.17	38.1 ± 1.2	75.5 ± 5.1	36.7 ± 1.6	9.23 ± 6.19

表 3 肝康片给药 8 周对 CCl_4 致大鼠慢性肝损伤生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$	ALP/ $U \cdot L^{-1}$	TP/ $g \cdot L^{-1}$	ALB/ $g \cdot L^{-1}$	TBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
正常对照	-	24.26 ± 8.42	201.37 ± 27.11	18.25 ± 4.71	77.2 ± 6.8	40.1 ± 2.7	5.26 ± 1.57
模型对照	-	190.45 ± 26.71	396.82 ± 24.56	38.73 ± 3.52	70.4 ± 5.1	35.7 ± 1.9	13.87 ± 3.20
护肝片	3.89	102.37 ± 32.56 ²⁾	291.77 ± 19.24 ²⁾	37.26 ± 2.71	71.2 ± 3.3	41.1 ± 2.2 ¹⁾	10.19 ± 2.73 ¹⁾
肝康片	22.68	96.45 ± 21.72 ²⁾	280.13 ± 12.65 ²⁾	36.84 ± 4.21	69.4 ± 1.9	40.7 ± 1.5 ¹⁾	9.22 ± 1.90 ²⁾
	11.34	101.27 ± 47.54 ²⁾	287.39 ± 21.43 ²⁾	37.02 ± 3.11	70.6 ± 2.5	39.6 ± 1.8 ¹⁾	9.34 ± 2.78 ¹⁾
	5.67	99.62 ± 32.11 ²⁾	281.72 ± 11.75 ²⁾	36.28 ± 2.79	71.7 ± 3.2	37.0 ± 2.9	9.92 ± 1.97 ¹⁾

4 讨论

CCl_4 是经典肝脏毒性物质,一般认为在肝细胞内经微粒体酶活化生成自由基,启动脂质过氧化,造成肝损伤^[5]。 CCl_4 诱导的肝纤维化动物模型,其病理改变与人类肝纤维化的形态特征相似^[10]。大鼠 ip CCl_4 造模后引起血清中 ALT,AST,TBIL 含量升

高,ALB 降低,肝组织纤维增生,汇管区的炎性细胞浸润等改变,肝脏组织损伤明显,说明造模成功。经口 ig 给予不同剂量的肝康片能明显减低血清 ALT,AST,TBIL 的含量,提高血清 ALB 含量,证明肝康片对 CCl_4 所致急、慢性肝损伤具有明显的防治作用,为临床应用提供了药效学依据。

表4 肝康片对 CCl₄ 致大鼠慢性肝组织损伤的影响(HE染色, n=10)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肝组织病变程度			
		-	+	++	+++
正常对照组	-	10	0	0	0 ²⁾
模型对照组	-	0	0	2	8
护肝片	3.89	0	4	5	1 ¹⁾
肝康片	22.68	1	4	4	1 ¹⁾
	11.34	0	4	4	2 ¹⁾
	5.67	1	4	3	2 ¹⁾

表5 肝康片对 CCl₄ 致大鼠慢性肝组织损伤的影响(VG染色, n=10)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝组织病变程度			
		-	+	++	+++
正常对照	-	10	0	0	0 ²⁾
模型对照	-	0	0	2	8
护肝片	3.89	0	8	2	0 ¹⁾
肝康片	22.68	1	8	1	0 ¹⁾
	11.34	0	9	1	0 ¹⁾
	5.67	1	8	1	0 ¹⁾

中药具有“多成分,多靶点”的作用特点,得到学术界普遍认可^[12]。肝康片是治疗急、慢性肝炎的纯中药制剂,所含药物的成分主要有柴胡皂苷、甘草酸、茵陈、黄酮苷、田基黄苷、蒲公英等。现代药理研究表明,茵陈可清热利水保肝利胆^[11],其有效成分对四氯化碳损伤的原代培养大鼠肝细胞有保护作用,动物实验证明能保护肝细胞膜,防止肝细胞坏死,促进肝细胞再生及改善肝脏微循环^[6]。田基黄能提高大鼠全体的特异性和非特异性细胞免疫功能,具有免疫调节作用,同时还具有抗脂质过氧化,保护肝细胞超微粒结构及细胞色素 P450 系统的作用^[7]。柴胡皂苷具有保护肝细胞溶酶体膜和线粒体的作用,促进毛细血管内胆汁的排除,使肝内蓄积的肝糖元及核酸大部分恢复正常,使血清转氨酶活力下降,并可直接抑制贮脂细胞(FSC)内 DNA 合成、抑制 FSC 激活使得 FSC 合成细胞外基质(ECM)

能力下降而发挥抗肝纤维化作用^[13]。蒲公英能明显降低肝组织的过氧化终产物 MDA,NO 水平诱发细胞凋亡的重要因素^[8]。甘草酸通过抗炎、抗脂质过氧化,调节免疫和稳定溶酶体等作用,可有效防治实验性和临床各种肝损伤^[9]。综上,肝康片可能是通过上述各种机制实现其治疗急慢性肝炎的作用。

[参考文献]

- [1] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:724,837,846.
- [2] 中华人民共和国卫生部药政管理局.中药新药研究指南[S],1982.:82.
- [3] 赵文霞.化痰方对大鼠脂肪肝模型病理形态的影响[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(6):61.
- [4] 马玉珍,韩景田,陈玮,等.四氯化碳皮下注射制备肝纤维化模型的新设计[J].四川动物,2007,26(3):697.
- [5] 吴庆光,刘明平,赵珍东.虎金丸对肝纤维化大鼠型IV胶原表述的影响[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(4):43.
- [6] 唐国风.茵陈蒿对实验性肝纤维组织化大鼠细胞的保护作用[J].中药材,2005,28(3):218.
- [7] 宋敏,吴海坤,陈善真.田基黄的药理作用及其作用机理[J].兽药研究与应用,2009(8):41.
- [8] 任丽平,杜钢军,崔新萍.蒲公英对酒精性肝损伤的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):180.
- [9] 许秋霞,邹敏.甘草酸药理作用概述[J].实用中医学杂志,2005,21(7):412.
- [10] 姜辉,尚莉丽,徐松龄,等.肝乐颗粒对肝纤维化大鼠的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):167.
- [11] 青献春,刘炳辰,裴香萍,等.软肝散结胶囊抗大鼠肝纤维化实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):149.
- [12] 陈晓萌,陈畅,李德凤.中药有效成分辨识的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):249.
- [13] 黄幼异,黄伟,孙蓉.柴胡皂苷对肝脏的药理毒理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):298.

[责任编辑 聂淑琴]