

复方银杏叶制剂对肝损伤防护作用研究

刘亚锋, 潘苏华*

(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] 目的: 考察银杏提取物(GBE)与刺梨配伍制备复方银杏叶制剂(CGB)对肝损伤保护作用及其可能机制。方法: 84 只清洁级雄性小鼠随机分为空白对照组, 模型组, GBE 组, CGB 高、中、低剂量组, 联苯双酯组。分别 ig 给予 GBE 组(0.4 g·kg⁻¹), CGB 高、中、低剂量组(2.4, 0.8, 0.4 g·kg⁻¹), 联苯双酯组(0.15 g·kg⁻¹) 小鼠相应剂量的药物 4 周后, 除空白对照组外余组均一次性 ig 给予白酒 6 g·kg⁻¹, 6 h 后测定小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)及肝匀浆甘油三酯(TG)、丙二醛(MDA)含量; 体内用 H₂O₂ 诱导人肝 LO2 细胞造成氧化损伤, 观察细胞 ALT, AST 水平及总抗氧化能力。结果: 与模型组比较, CGB 高、中剂量组对小鼠 AST, ALT, TG 均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且 CGB 高、低剂量组 MDA 较模型组降低显著($P < 0.05$)。在体外除 CGB 低剂量组与模型组比较, 肝细胞中 AST 无显著性差异外, 余给药组均可显著降低 ALT, AST, 并提高总抗氧化(TAOC)水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 且 CGB 高、中剂量组与单方 GBE 比较, 降低 ALT 升高 TAOC 水平更为显著($P < 0.01$)。结论: 复方银杏叶制剂可防护乙醇及 H₂O₂ 所致的肝损伤, 其作用可能与其协同抗氧化活性有关。

[关键词] 银杏叶提取物; 刺梨; 急性酒精性肝损伤; 过氧化氢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0181-04

Protective Effect of Compound Ginkgo Biloba Capsule on Hepatocyte Injury

LIU Ya-feng, PAN Su-hua*

(Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of the compound Ginkgo biloba (CGB), the combination of Ginkgo biloba extracts (GBE) and *Rose roxburghii*, on hepatic injury and to explore the possible mechanism. **Method:** Eighty-four male rats of clean grade were randomly divided into 7 groups: control group, acute liver injury model group, GBE group(0.4 g·kg⁻¹), and low, middle and high doses of CGB groups(0.4, 0.8, 2.4 g·kg⁻¹), bifendatatum group. These rats were firstly given with corresponding drugs for 4 weeks, and then were induced by alcohol at a dose of 6 g·kg⁻¹ except for the control group, and after 6 hour the rats were sacrificed, and ALT, AST in serum and MDA, TG in tissue were assayed. The *in vitro* damage of LO2 cells by hydrogen peroxide (H₂O₂) was chosen to establish the model of hepatocellular oxidative stress and the levels of ALT, AST and TAOC were determined. **Result:** Compared with model group, the levels of AST, ALT and TG in groups of CGB high and medium doses were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the levels of MDA in groups of CGB high and low doses were decreased significantly ($P < 0.05$). Except the levels of AST in the low doses of CGB, the exaltation of ALT and AST of LO2 cells stimulated *in vitro* by H₂O₂ were inhibited ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and the capacity of TAOC was enhanced in the groups of CGB and GBE ($P < 0.01$). The effects of high dose and medium dose groups of CGB were better than that of GBE for decreasing the levels of AST, ALT and

[收稿日期] 20110123(002)

[基金项目] 江苏省中医局基金项目(H-024)

[第一作者] 刘亚锋, 在读硕士, 主要从事中药心脑血管药理, Tel: 15952044770

[通讯作者] * 潘苏华, 教授, Tel: 13851664089, E-mail: shpan2222@ yahoo. com. cn

increasing the capacity of TAOC. **Conclusion:** CGB can protect the hepatocyte injury induced by alcohol and H_2O_2 . It might be related to its collaborative antioxidation.

[**Key words**] Ginkgo biloba extract; Rose roxburghii; acute alcoholic hepatocyte injury; hydrogen peroxide

近年来有关银杏叶制剂中残留银杏酸(ginkgolic, GA)所致不良反应^[1]愈来愈被关注。有文献报道仅含 $1 \mu\text{g g}^{-1}$ GA 的金纳多注射液可致转氨酶升高、肝功能损害^[2]; 长期喂饲银杏叶提取物(*Ginkgo biloba extract*, GBE)能损害年老自发性高血压小鼠的循环系统和肝功能^[3]。为降低银杏叶制剂的肝毒性, 保障用药安全, 我们将刺梨 *Rosa roxburghii* Tratt 与银杏叶提取物配伍成复方银杏叶制剂(compound ginkgo biloba, CGB)。本研究采用小鼠急性酒精性肝损伤和体外 H_2O_2 诱导人肝 LO2 细胞氧化损伤模型, 观察 CGB 对肝损伤的防护作用及其与单方 GBE 相比在抗氧化保肝方面的作用, 为进一步研究 CGB 的保肝作用机制提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级昆明种健康雄性小鼠, 体重 $19 \sim 22 \text{ g}$, 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。合格证号 SCXK(沪)2007-0031, 常规条件饲养。

1.2 细胞株 人肝 LO2 细胞, 南京中医药大学中药药理实验室细胞库提供。

1.3 药品 GBE(邳州富伟生化制品有限公司提供, 批号 091116, 其中黄酮苷 $\geq 24.0\%$ 、银杏内酯 $\geq 6.0\%$); 刺梨汁粉(由江阴天江制药代为加工, 批号 060829); CGB(本室制备, 批号 091126, 主要成分由银杏叶提取物与刺梨汁粉按 1:1 加蒸馏水配制成不同浓度药物, 其中黄酮苷 $\geq 4.8\%$ 、银杏内酯 $\geq 1.2\%$, VC $\geq 5\%$); 联苯双酯滴丸(北京协和药厂, 批号 08040103, 用时用蒸馏水溶解稀释至所需浓度); 乙醇含 56% 红星二锅头白酒(北京红星股份公司)。

1.4 试剂 丙氨酸转氨酶(ALT, 批号 20101012)、天冬氨酸转氨酶(AST, 批号 20101015)、甘油三酯(TG, 批号 20101019)、考马斯亮蓝 G250(批号 WF20100412)、丙二醛(MDA, 批号 20101018)、总抗氧化能力(TAOC, 批号 100909)均购自南京建成生物工程公司; 胰蛋白酶(GIBCO 公司, 批号 2011/08)、DMEM 培养基(GIBCO 公司, 批号 727635)、小牛血清(杭州四季青公司, 批号 090512); 其他试剂均为国产分析纯。

1.5 仪器 酶标仪(美国 Bio-TEK 公司); CO_2 培养箱(美国 Forma Scientific 公司); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 自动生化分析仪(日立 7180 型)。

2 方法

2.1 复方银杏叶制剂对小鼠急性酒精性肝损伤防护作用 随机区组法将小鼠分成 7 组: 空白对照组, 模型组, CGB 高、中、低剂量 ($2.4, 0.8, 0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[4], 联苯双酯 ($0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, GBE ($0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于 CGB 中剂量)。每天清晨空腹 ig 给予不同剂量药物, 3 次/d; 模型组及空白对照组 ig 给予同体积生理盐水, 连续 ig 4 周。末次给药后禁食 16 h, 除空白对照组外, 余组均 ig 白酒 $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。6 h 后眼眶取血, 分离血清测定 ALT, AST; 取肝组织制备肝匀浆测定 TG, MDA。

2.2 复方银杏叶制剂对体外肝细胞氧化损伤防护作用 肝 LO2 细胞, 用含 10% 小牛血清的 1640 培养液培养, 取对数生长期细胞以 2.5×10^4 个/孔接种于 96 孔板。试验设 6 组: 空白对照组, 模型组、联苯双酯组(终质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、CGB 高、中、低剂量组(终质量浓度分别为 $500, 50, 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。细胞贴壁生长 12 h 后吸出培养液换成无血清培养液。培养 24 h 后, 除空白对照组外, 模型组和试药组分别加入 H_2O_2 及 H_2O_2 和不同药物的混合液共孵育 4 h, H_2O_2 终浓度均为 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。收集培养液上清和细胞用于检测 ALT, AST, TAOC 的含量。

2.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析处理, 组间比较用单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 复方银杏叶制剂对小鼠血清 AST, ALT 水平的影响 由表 1 可见, 造模后小鼠血清 AST, ALT 水平明显高于空白对照组 ($P < 0.01$)。与模型组比较, CGB 高、中剂量组 ALT, AST 均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且 CGB 低剂量组 ALT 明显低于模型组 ($P < 0.05$)。与 CGB 组比较, CGB 高剂量组 AST 明显降低 ($P < 0.05$)。

表1 CGB对急性酒精性肝损伤小鼠血清ALT,AST的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
空白对照	12	-	43.67 ± 12.18 ²⁾	93.83 ± 16.30 ²⁾
模型	10	-	105.00 ± 30.33	144.50 ± 31.66
联苯双酯	12	0.15	75.50 ± 21.83 ²⁾	111.75 ± 21.06 ²⁾
GBE	10	0.4	99.70 ± 16.69	137.90 ± 33.96
CGB	12	2.4	78.58 ± 18.86 ²⁾	113.67 ± 21.81 ^{2,3)}
	11	0.8	81.91 ± 20.95 ¹⁾	118.64 ± 22.89 ¹⁾
	11	0.4	86.64 ± 20.60 ¹⁾	128.73 ± 23.73

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与GBE比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表2~3同)。

3.2 复方银杏叶制剂对小鼠肝组织TG,MDA的影响 由表2可见,造模后小鼠肝组织TG,MDA明显高于空白对照组($P < 0.05$)。与模型组比较,CGB高、中剂量小鼠TG均显著降低($P < 0.05$),且降低

程度较单方组更明显($P < 0.05$);CGB高、低剂量组小鼠MDA均较模型组显著降低($P < 0.05$),且均低于单方组($P < 0.05$)。

3.3 复方银杏叶制剂体外对肝细胞氧化损伤的保

表2 CGB对急性酒精性肝损伤小鼠肝脏TG,MDA的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量/g·kg ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	MDAN/mol·mg ⁻¹
空白对照	12	-	0.9 ± 0.25 ¹⁾	69.70 ± 18.22 ¹⁾
模型	10	-	1.32 ± 0.47	93.27 ± 23.86
联苯双酯	12	0.15	0.89 ± 0.44 ¹⁾	72.27 ± 20.50 ¹⁾
GBE	10	0.4	1.31 ± 0.45	93.09 ± 26.85
CGB	12	2.4	0.92 ± 0.36 ^{1,3)}	73.43 ± 19.61 ^{1,3)}
	11	0.8	0.92 ± 0.21 ^{1,3)}	78.36 ± 19.64
	11	0.4	1.29 ± 0.42	74.16 ± 21.13 ^{1,3)}

护作用 从表3可见,与空白对照组比较,模型组ALT和AST明显升高($P < 0.01$),TAOC显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,除CGB低剂量组AST无显著性差异外,余单复方各组均可显著降低ALT、

AST($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提高TAOC水平($P < 0.01$)。其中CGB高、中剂量组与GBE比较ALT明显降低($P < 0.01$),TAOC水平显著升高($P < 0.01$)。

表3 CGB对氧化损伤LO2细胞ALT,AST,TAOC的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TAOC/U·mL ⁻¹
空白对照	-	772.73 ± 74.33 ²⁾	554.92 ± 48.77 ²⁾	522.36 ± 48.53 ²⁾
H ₂ O ₂ 模型	400 ³⁾	1539.42 ± 57.37	770.19 ± 61.26	321.94 ± 41.61
联苯双酯	5	996.67 ± 66.46 ²⁾	629.88 ± 59.83 ²⁾	563.02 ± 24.34 ²⁾
GBE	50	1200.46 ± 58.06 ²⁾	612.97 ± 64.67 ²⁾	555.52 ± 34.09 ²⁾
CGB	500	980.23 ± 32.31 ^{2,4)}	570.21 ± 44.17 ²⁾	726.35 ± 49.04 ^{2,4)}
	50	1100.88 ± 72.25 ^{2,4)}	598.13 ± 43.52 ²⁾	729.16 ± 69.40 ^{2,4)}
	5	1176.98 ± 86.11 ¹⁾	666.76 ± 49.81	565.24 ± 57.85 ²⁾

注:³⁾模型组H₂O₂剂量单位为μmol·L⁻¹。

4 讨论

银杏制剂临床应用广泛,为减轻银杏制剂的肝毒性,选择刺梨与银杏配伍,笔者前期研究证明两者配伍具有毒性减轻的作用,机制可能与银杏酸降低

有关^[5]。本研究用白酒单次ig小鼠引起小鼠急性肝脏损伤,表现为血清ALT,AST升高、肝脏甘油三酯蓄积以及脂质过氧化产物MDA含量升高,反映了酒精性肝病早期的生化改变。而CGB组可明显降

知母与盐知母对甲亢阴虚大鼠红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶影响的比较研究

佟连琨, 高慧, 姜永粮, 张凡, 贾天柱*
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:比较知母及盐知母对甲亢阴虚大鼠红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力的影响,从能量代谢方面探讨知母盐炙后增强滋阴降火作用的炮制原理。方法:SD 大鼠,雌雄各半,随机分为空白组,模型组,六味地黄丸组(2.2 g·kg⁻¹),生知母、盐知母高剂量组(2 g·kg⁻¹),生知母、盐知母低剂量组(1 g·kg⁻¹);各组大鼠每天上午 ig 甲状腺素液 2 mL(1.25 g·L⁻¹),空白组 ig 生理盐水;下午各给药组 ig 相应的药液(10 mL·kg⁻¹),空白组、模型组 ig 等体积生理盐水,3 周后测定红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性。结果:与模型组相比,生知母及盐知母各剂量组均能显著降低 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性(P<0.05),其中低剂量组盐知母作用优于生知母(P>0.05);高剂量组结果相反,即盐炙后作用降低(P>0.05),且高剂量组作用弱于低剂量组(P<0.05)。结论:知母及盐知母均具有滋肾阴清虚热的作用。

[关键词] 知母;盐知母;Na⁺-K⁺-ATP 酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0184-03

[收稿日期] 20101207(006)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI09B06-09)

[第一作者] 佟连琨,硕士研究生,从事中药炮制原理研究,Tel:0411-87586011,E-mail:tonystar310@163.com

[通讯作者] *贾天柱,教授,博士生导师,从事中药炮制原理研究,Tel:0411-87586499,E-mail:jiatz@lnutcm.edu.cn

低 ALT, AST 水平,抑制甘油三酯蓄积,降低 MDA,从而保护急性酒精性肝损伤。此外为进一步探讨 CGB 保肝机制,选用体外 H₂O₂ 诱导肝细胞氧化损伤模型,结果显示银杏叶提取物与刺梨配伍后可显著减轻 H₂O₂ 对肝细胞氧化损伤,抗氧化效果优于单味 GBE。该作用可能是银杏与刺梨均具有强大的抗氧化功能^[6-7],两者配伍可能系银杏提取物使 VitC 破坏减少、制剂稳定性增强^[8],从而使抗氧化协同而具有肝脏保护作用。由此认为,将刺梨与银杏配伍,对减轻肝脏等消化道不良反应,提高银杏叶制剂的用药安全是有益的。

[参考文献]

- [1] Yao Ping, Song Fangfang, Li Ke, et al. Ginkgo biloba extract prevents ethanol induced dyslipidemia[J]. Am J Chin Med, 2007,15(4):643.
- [2] 李又林,李成健,高伯春.金纳多不良反应[J].实用医

技杂志,2004,11(7):1386.

- [3] Tada Y, AU-Kagota S, Kubota Y. et al. Long-term feeding of Ginkgo biloba extract impairs peripheral circulation and hepatic function in aged spontaneously hypertensive rats [J]. Biol Pharm Bull,2008,31(1):68.
- [4] 潘苏华,牛文明,吴丽,等.银杏叶提取物与刺梨配伍抗实验性肝损伤作用[J].药学实践杂志,2009,27(6):437.
- [5] 潘苏华,吴丽.复方银杏叶制剂配伍减毒初步研究[J].南京中医药大学学报,2007,23(6):389.
- [6] 刘晓平.银杏叶提取物双重抗氧化作用的研究[J].中成药,2009,31(7):1004.
- [7] 戴支凯,余丽梅.刺梨的药理作用[J].中国药房,2007,18(21):1668.
- [8] 沈源,潘苏华.温度对复方银杏叶胶囊中维生素 C 含量的影响[J].南京中医药大学学报,2004,20(4):233.

[责任编辑 聂淑琴]