

赤芍总苷的制备及其对小鼠肝损伤的保护作用

高雪岩¹, 孙建宁¹, 王文全^{1, 2*}, 郑巧云¹, 杨晓芸¹

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102)

[摘要] 目的: 制备赤芍总苷, 同时观察赤芍总苷对小鼠四氯化碳致急性肝损伤和 DL-乙硫氨酸致急性脂肪肝的保护作用。方法: 应用大孔树脂法, 富集赤芍总苷部位。以四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型和 DL-乙硫氨酸致急性脂肪肝模型, 考察赤芍总苷部位对小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 ALT 及天冬氨酸氨基转移酶 AST 活性的影响, 同时考察其对 DL-乙硫氨酸致急性脂肪肝模型肝组织总胆固醇及甘油三酯含量的影响。结果: 采用 AB-8 型大孔树脂, 10% 乙醇除杂, 50% 乙醇洗脱可得到含量 50% 以上的赤芍总苷部位。对四氯化碳致急性肝损伤模型, 赤芍总苷可显著降低 CCl₄ 导致的小鼠血清 ALT 和 AST 活性的升高; 对 DL-乙硫氨酸致急性脂肪肝模型, 各组小鼠血清 ALT 和 AST 活性无显著性差异, 而模型组小鼠肝组织总胆固醇和甘油三酯含量显著升高, 治疗后明显降低。结论: 赤芍总苷对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤和 DL-乙硫氨酸致小鼠急性脂肪肝具有一定的保护作用, 其作用机制有待进一步实验研究。

[关键词] 赤芍总苷; 大孔吸附树脂; 肝损伤; DL-乙硫氨酸

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0183-04

Preparation of Total Glycosides of *Paeonia lactiflora* and Research on its Hepatoprotective Effects in Mice

GAO Xue-yan¹, SUN Jian-ning¹, WANG Wen-quan^{1, 2*}, ZHENG Qiao-yun¹, YANG Xiao-yun¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Good Agricultural Practice Engineering Research Center of Education Ministry, Beijing 100102, China)

[Abstract] Objective: To prepare the total glycosides of *Paeonia lactiflora*, and investigate its protection towards carbon tetrachloride induced acute liver injury and DL-ethionine induced acute fatty liver in mice. **Method:** Macroporous adsorption chromatography was used to enrich its total glycosides. Carbon tetrachloride induced acute liver injury and DL-ethionine induced acute fatty liver in mice were utilized to investigate the effect of total glycosides of *P. lactiflora* on serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities. Meanwhile, its effect on total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) contents in liver was studied in DL-ethionine induced acute fatty liver model. **Result:** The polysaccharide and some other components was eluted off from the column of AB-8 resins with 10% ethanol, afterwards the remaining total glycosides was eluted off from the column by washing continuously with 50% ethanol, and its content was above 50%. On carbon tetrachloride induced acute liver injury model, the total glycosides could significantly reduce the increase of serum ALT and AST activities induced by CCl₄; on DL-ethionine induced acute fatty liver model, there was no significant difference of serum ALT and AST activities between the model group and the control group, however, the content of total cholesterol and triglyceride in the liver of model groups significantly increased and decreased after treatment with total glycosides. **Conclusion:** The total glycosides of *P. lactiflora* has a protective effect on CCl₄ induced acute liver injury and DL-ethionine induced acute fatty liver in mice.

[Key words] total glycosides of *Paeonia lactiflora*; macroporous resin; liver injury; DL-ethionine

[收稿日期] 20100822(006)

[作者简介] 高雪岩, 在读博士, 研究方向: 中药资源开发与利用, E-mail: minicat118@163.com

[通讯作者] * 王文全, 教授, Tel: 010-84738334, E-mail: wwq57@126.com

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pal1. 或川芍药 *P. veitchii* Lynch 的干燥根^[1], 属传统活血化瘀类中药, 性味苦, 微寒, 归肝经, 具有清热凉血, 散瘀止痛之功, 含多种单萜类化合物、鞣质、挥发油、树脂及多糖类成分, 其中苷类化合物为其主要有效成分, 包括芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷等。赤芍主要用于热入营血, 斑疹吐衄, 经闭癥瘕, 跌打损伤, 痛肿疮毒, 目赤翳障等症, 近年来发现其对多种肝病的治疗具有良好的疗效, 临床中不乏重用赤芍治疗肝纤维化的报道^[2], 动物试验也证实, 赤芍具有良好保护肝细胞, 抑制胶原纤维的合成、沉积及促进其降解的作用, 可明显改善肝纤维化血清学指标及肝组织的病理变化, 使纤维化肝小叶结构基本恢复正常^[3-5], 而起到抗肝纤维化作用的正是赤芍总苷类成分。本实验采取大孔树脂吸附法富集赤芍总苷部位, 以四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型和 DL-乙硫氨酸致小鼠急性脂肪肝模型, 考察了赤芍总苷对肝脏的保护作用。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 18 ~22 g, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 许可证号 SCXK-(军) 2007-004, 自由取食, 任意饮水。

1.2 药物与试剂 赤芍饮片购自内蒙古赤峰荣兴堂药业公司, 为道地野生优质赤芍, 经北京中医药大学王文全教授鉴定为毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* 的干燥根。赤芍总苷的制备工艺为赤芍饮片用 70% 乙醇回流提取, 提取液浓缩回收乙醇, 配制成一定浓度的溶液后, 通过 AB-8 大孔吸附树脂柱, 用 10% 乙醇除杂, 再用 50% 乙醇洗脱, 洗脱液干燥即得赤芍总苷提取物, 采用紫外分光光度法测定其中赤芍总苷的含量为 57.72%, 采用高效液相色谱法测定其中芍药苷的含量为 41.43%。联苯双酯滴丸, 北京协和药厂, 批号 08040105。四氯化碳 (CCl₄), 北京化工厂, 批号 20091010, 用时以橄榄油配成 0.1% 溶液; DL-乙硫氨酸 (DL-Ethionine), AlfaAesar, 纯度 98%, 批号 10121111, 购自国药集团化学试剂有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG) 测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所产品, 批号分别为 10100316, 10100316, 2010010034, 2010010033。

1.3 仪器 HitachiU-2000 紫外分光光度计, 日立公

司生产; Agilent1100 型高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司生产; SartoriusBP211D 电子分析天平, 德国赛多利斯集团生产。

2 方法和结果

2.1 CCl₄ 所致的小鼠急性肝损伤模型 小鼠随机分为 5 组, 分别为正常对照组、模型对照组、联苯双酯组 (150 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、赤芍总苷低剂量组 (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、赤芍总苷高剂量组 (300 mg·kg⁻¹·d⁻¹) (剂量设置参考药典规定成人临床日用量, 并根据有效部位的含量换算而来), 每组 14 只。自造模前 5 d 起, 各治疗组按 0.01 mL·g⁻¹ 体积每天灌胃给药 1 次, 共 5 次, 正常对照组和模型对照组灌胃给予等体积生理盐水; 末次给药 2 h 后小鼠腹腔注射 0.1% CCl₄ 10 mL·kg⁻¹, 正常对照组腹腔注射等体积橄榄油, 16 h 后采取摘除眼球法取血, 室温静置片刻后, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 4 储存备用, 用试剂盒测定血清中 ALT 和 AST 的活性。

2.2 DL-乙硫氨酸所致的小鼠急性脂肪肝模型 小鼠随机分为 5 组, 分别为正常对照组、模型对照组、联苯双酯组 (7.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、赤芍总苷低剂量组 (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、高剂量组 (300 mg·kg⁻¹·d⁻¹) (剂量设置参考药典规定成人临床日用量, 并根据有效部位的含量换算而来), 每组 16 只, 动物在造模期间禁食, 自由饮水。自造模前 5 d 起, 除正常对照组外, 其余各组按 0.01 mL·g⁻¹ 体积每天灌胃给药 1 次, 共 5 次, 正常对照组灌胃给予等体积生理盐水; 末次给药 1 h 后, 模型组与治疗组按 10 mL·kg⁻¹ 灌胃给 25 g·L⁻¹ DL-乙硫氨酸溶液, 正常组灌胃相当剂量的蒸馏水, 24 h 后采取摘除眼球法取血, 室温静置片刻后, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 4 储存备用, 用试剂盒测定血清中 ALT 和 AST 的活性。另取肝脏组织用生理盐水洗去浮血, 拭干, 称取 0.5 g, 加 5 mL 冷生理盐水制成 10% 的肝匀浆, 用试剂盒测定肝组织中 TC 和 TG 的含量。

2.3 结果

2.3.1 对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠血清 ALT, AST 活性的影响 正常对照组小鼠肝脏呈红褐色, 质地软而富有弹性; 模型组的肝脏体积明显增大, 质脆, 表面呈微黄色; 治疗组肝脏大小及颜色介于模型组与空白对照组之间。肝指数统计结果表明 (表 1), 模型组比正常组显著增大 ($P < 0.01$), 各治疗组与模型组之间存在显著性差异 ($P < 0.01$), 与正常对

照组之间无统计性差异。小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 ALT 与血清天冬氨酸氨基转移酶 AST 活性统计结果表明,模型组比正常对照组 ALT 与 AST 活性均显著升高 ($P < 0.01$),而各治疗组 ALT 与 AST 活性均比模型组显著降低 ($P < 0.01$),与正常对照组无显著性差异。模型组与正常组在肝脏颜色、形态、肝

指数及血清 ALT 和 AST 活性方面的差异表明,用 CCl_4 复制小鼠急性肝损伤的模型成功,赤芍总苷治疗组在肝脏颜色、质地、肝指数、ALT 和 AST 活性等方面,均较模型组有一定程度的改善,说明赤芍总苷具有一定的抗 CCl_4 导致的急性肝损伤的作用,可抑制 CCl_4 导致的小鼠血清 ALT 和 AST 活性的升高。

表 1 赤芍总苷对 CCl_4 致小鼠急性肝损伤肝指数及 ALT 和 AST 活性的影响 (柳±s, n=14)

组别	剂量 / $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	肝指数 / %	ALT / $IU \cdot L^{-1}$	AST / $IU \cdot L^{-1}$
正常	-	4.45 ± 0.22 ²⁾	43.93 ± 11.49 ²⁾	111.68 ± 23.52 ²⁾
模型	-	5.03 ± 0.26	129.78 ± 40.76	172.45 ± 32.51
联苯双酯	150	4.75 ± 0.36	56.00 ± 32.87 ²⁾	127.72 ± 32.74 ²⁾
赤芍总苷低剂量	100	4.82 ± 0.48	44.88 ± 26.29 ²⁾	105.90 ± 14.43 ²⁾
赤芍总苷高剂量	300	4.59 ± 0.48	65.88 ± 31.84 ²⁾	111.17 ± 26.75 ²⁾

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

2.3.2 对 DL-乙硫氨酸致急性脂肪肝小鼠 ALT, AST 活性及 TC, TG 含量的影响 正常对照组小鼠肝脏组织呈鲜红色,有光泽,质地柔软而有弹性;DL-乙硫氨酸脂肪肝模型组小鼠肝脏颜色变白,肿胀,质地较硬,弹性差。肝指数统计结果表明(表 2),模型组及各治疗组比正常组小鼠肝指数略大,但各组动物肝指数无显著性差异。小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 ALT 与血清天冬氨酸氨基转移酶 AST 活性统计结果表明(表 2),模型组及各治疗组比正常组小鼠 ALT 和 AST 活性略升高,但升高幅度不大,而各治疗组 ALT 含量比模型组又略有降低,但各组之间 ALT 和 AST 活性并无显著性差异。小鼠血清总胆固醇 TC 与甘油三酯 TG 含量的测定结果表明(表

3),模型组及各治疗组比正常组小鼠血清 TC 与 TG 含量显著降低 ($P < 0.05$),而各治疗组 TC 含量比模型组又有不同程度的升高 ($P < 0.05$)。小鼠肝组织匀浆液中 TC 与 TG 含量的测定结果表明(表 3),模型组及各治疗组比正常组小鼠 TC 含量显著降低 ($P < 0.05$),而各治疗组 TC 含量比模型组又有不同程度的升高 ($P < 0.05$)。上述结果表明,DL-乙硫氨酸急性脂肪肝模型对小鼠肝指数及血清丙氨酸氨基转移酶 ALT 和天冬氨酸氨基转移酶 AST 的活性无显著性差异,而血清和肝组织中总胆固醇 TC 和甘油三酯 TG 的含量均发生显著性差异,赤芍总苷的干预有利于缓解 DL-乙硫氨酸导致的血清 TC 和 TG 含量的降低及肝组织 TC 和 TG 含量的升高。

表 2 赤芍总苷对 DL-乙硫氨酸致小鼠急性脂肪肝肝指数及 ALT 和 AST 活性的影响 (柳±s, n=16)

组别	剂量 / $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	肝指数 / %	ALT / $IU \cdot L^{-1}$	AST / $IU \cdot L^{-1}$
正常	-	4.00 ± 0.48 ²⁾	32.17 ± 11.76 ²⁾	124.95 ± 14.20
模型	-	5.26 ± 0.25	51.62 ± 17.51	134.15 ± 14.95
联苯双酯	7.5	5.28 ± 0.49	42.57 ± 15.67	115.42 ± 20.71
赤芍总苷低剂量	100.0	5.29 ± 0.48	39.56 ± 11.57	108.28 ± 27.30 ¹⁾
赤芍总苷高剂量	300.0	5.24 ± 0.67	44.06 ± 18.02	123.42 ± 24.82

表 3 赤芍总苷对 DL-乙硫氨酸致小鼠急性脂肪肝 TC, TG 含量的影响 (柳±s, n=16)

组别	剂量 / $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	血清 TC / $mmol \cdot L^{-1}$	血清 TG / $mmol \cdot L^{-1}$	肝组织 TC / $mmol \cdot L^{-1}$	肝组织 TG / $mmol \cdot L^{-1}$
正常	-	2.98 ± 0.48 ²⁾	1.12 ± 0.26 ²⁾	0.57 ± 0.13 ²⁾	0.96 ± 0.36 ²⁾
模型	-	0.90 ± 0.33	0.87 ± 0.11	0.79 ± 0.11	1.66 ± 0.46
联苯双酯	7.5	1.37 ± 0.37 ²⁾	1.16 ± 0.29 ²⁾	0.60 ± 0.15 ²⁾	1.39 ± 0.25 ²⁾
赤芍总苷低剂量	100.0	1.46 ± 0.38 ²⁾	1.06 ± 0.29 ¹⁾	0.60 ± 0.08 ²⁾	1.33 ± 0.21 ²⁾
赤芍总苷高剂量	300.0	1.31 ± 0.38 ¹⁾	1.00 ± 0.22	0.58 ± 0.12 ²⁾	1.24 ± 0.28 ²⁾

3 讨论

CCl₄ 肝损伤模型为目前国际常用急性肝损伤模型之一^[4], 其引起损失的作用机制为 CCl₄ 进入机体后, 经肝微粒体细胞色素 P₄₅₀ 代谢产生自由基三氯甲基自由基(CCl₃·)及二氯甲基自由基(CCl₂·)及过氧化三氯甲基自由基(OOCCl₃·), 这些自由基可与肝细胞内大分子发生共价结合, 也可以攻击膜下不饱和脂质, 使生物膜发生脂质过氧化, 进而使生物膜通透性增加, 从而使胞浆中的 ALT 或线粒体中的 AST 释放进入血液^[5-6], 因此血清中 ALT 和 AST 的活力变化可特异性的反映肝损伤程度^[7]。本实验考察了赤芍总苷对 CCl₄ 引起的肝损伤的保护作用, 结果表明, 高剂量(300.0 mg·kg⁻¹)和低剂量(100.0 mg·kg⁻¹)的赤芍总苷均可降低 CCl₄ 引起的血清 ALT 和 AST 的升高, 说明赤芍总苷对 CCl₄ 致急性肝损伤有一定程度的保肝作用, 而根据 CCl₄ 引起肝损伤的作用机制推测赤芍总苷抗肝损伤的作用机制可能与抗自由基损伤、抗脂质过氧化或反相调节自由基激活的细胞信号通路等环节有关, 具体机制有待进一步实验研究。

乙硫氨酸的结构与体内作为甲基转化供体的甲硫氨酸的结构类似, 可竞争性地提供乙基, 使肝脏蛋白合成障碍, 减少肝脏中转运甘油三酯 TG 的载脂蛋白的合成, 导致肝脏中甘油三酯 TG 的蓄积, 从而引发脂肪肝^[8]。本实验选择 DL-乙硫氨酸复制小鼠急性脂肪肝模型, 考察了赤芍总苷对 DL-乙硫氨酸引起的脂肪肝的保护作用, 结果表明, 赤芍总苷干预后, 肝组织中总胆固醇 TC 和甘油三酯 TG 的含量均

较模型组显著下降, 说明赤芍总苷对脂肪转运障碍通路有较好的调控作用, 其作用机制可能为促进载脂蛋白的合成, 或抑制外源性脂质吸收, 或促进肝脂的代谢, 具体机制有待进一步实验研究。

[参考文献]

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010.
- [2] 王良骏. 重用赤芍治疗肝病之近况[J]. 中西医结合肝病杂志, 2002, 12(4): 255.
- [3] 蒋毅萍, 刘永刚, 陈厚昌. 赤芍水提物对四氯化碳致肝损伤大鼠的保护作用[J]. 医药导报, 2004, 23(8): 527.
- [4] Pierce R A, Glaug M R, Greco R S, et al. Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats[J]. J Biol Chem, 1987, 262(4): 1652.
- [5] Weber L W, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model[J]. Crit Rev Toxicol, 2003, 33(2): 105.
- [6] Kodai S, Takemura S, Minamiyama Y, et al. S-allyl cysteine prevents CCl₄-induced acute liver injury in rats [J]. Free Radic Res, 2007, 41(4): 489.
- [7] 仲来福, 张瑾岗, 张富勤, 等. 四氯化碳致肝损伤的机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1989, 3(4): 298.
- [8] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 465.

[责任编辑 邹晓翠]