

当药提取物对鼠试验性肝损伤的保护作用

周大成^{1,2}, 朴惠善¹, 张思玉², 张广平^{2*}

(1. 延边大学医学部药学院, 吉林 延吉 133002;

2. 中药复方新药开发国家工程研究中心, 北京 100075)

[摘要] 目的: 研究当药提取物对试验性肝损伤的作用。方法: 采用 0.1% CCl₄ 油溶液(0.01 mL·g⁻¹体重)连续给药 7 d, D-氨基半乳糖(D-Gal, 800 mg·kg⁻¹)连续给药 6 d, 分别 ip 造成小鼠急性肝损伤模型; 大鼠 ip α -萘异硫氰酸酯(ANIT, 100 mg·kg⁻¹), 连续给药 8 d, 造成大鼠急性黄疸模型。各组分别 ig 当药提取物低剂量(46.3 mg·kg⁻¹)、中剂量(92.6 mg·kg⁻¹)、高剂量(185.2 mg·kg⁻¹)。小鼠摘眼球取血, 分离血清, 测定血清丙氨酸转氨酶(ALT), 天冬氨酸转氨酶(AST)活性和总胆红素(TBIL), 直接胆红素(DBIL)含量; 大鼠测量胆汁流量, 股动脉取血, 分离血清, 测定 AST, ALT, 总胆红素 TBIL, DBIL 水平。各组分别取肝脏, 做病理切片, 观察肝组织病理改变。结果: 同模型组比较, 当药提取物 92.6, 185.2 mg·kg⁻¹能够显著抑制 CCl₄, D-Gal 导致小鼠急性肝损伤和 ANIT 导致大鼠黄疸模型 AST, ALT, TBIL, DBIL 的升高, 能够减轻模型动物肝脏变性、坏死数量和程度, 能够增加黄疸模型大鼠的胆汁流量。结论: 当药提取物具有一定的保肝作用。

[关键词] 当药; 四氯化碳; D-氨基半乳糖; α -萘异硫氰酸酯; 肝损伤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0125-04

Protective Effects of *Swertia pseudochinensis* Hara Extract on Experimental Liver Injury

ZHOU Da-cheng^{1,2}, PIAO Hui-shan¹, ZHANG Si-yu², ZHANG Guang-ping^{2*}

(1. Yanbian University Health Science Center Pharmacy College, Yanji 133002, China;

2. State Research Center for R&D of Traditional Chinese Medicine Multi-ingredient Drugs, Beijing 100075, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protection effects of *Swertia pseudochinensis* Hara extract on experimental liver injury. **Method:** Mouse model of acute liver injury was established by ip injection of 0.1% carbon tetrachloride (CCl₄) oil solution (0.01 mL·g⁻¹), and D-Galactosamine (D-Gal, 800 mg·kg⁻¹) respectively. Rat model of acute jaundice was developed by ip injection of α -naphthyl isothiocyanate oil solution (ANIT, 100 mg·kg⁻¹). Several doses of *S. pseudochinensis* Hara extract were ig administrated to the models. Activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL) Content in serum were determined. Bile flow in rats and pathological changes in liver were also investigated. **Result:** *S. pseudochinensis* Hara extract at the concentration of 92.6 mg·kg⁻¹ inhibited the acute liver injury induced by CCl₄ and D-Gal in mice. It decreased the increasing level of transaminases caused by ANIT in rat jaundice model, and reduced the liver degeneration and the number and extent of necrosis in the model animals. The extract also increased the bile flow rate in the rat jaundice model. **Conclusion:** *S. pseudochinensis* Hara extract has the efficacy of protecting liver from injury to a certain extent.

[收稿日期] 20100525(009)

[基金项目] “重大新药创制”国家科技重大专项课题(2009ZX09102-116)

[第一作者] 周大成, 在读硕士, 从事中药化学和知识产权相关工作, Tel: 010-87632604, E-mail: dacheng1941@126.com

[通讯作者] * 张广平, 药理硕士, Tel: 010-87632604, E-mail: iamzgp@163.com

[Key words] *Swertia pseudochinensis* Hara; carbon tetrachloride (CCl₄); *D*-galactosamine; α -naphthyl isothiocyanate; liver injury

当药为龙胆科植物瘤毛獐牙菜 *Swertia pseudochinensis* Hara 的干燥全草, 又名紫花当药。为河北、内蒙古一带的民间草药^[1]。《内蒙古中草药》始载有本品, 记载功能为: 清热, 健胃, 利湿; 主治消化不良, 胃炎, 黄疸, 火眼, 牙痛, 口疮。《中国药典》1977 年版、《中华药海》、《蒙药正典》、《中华本草》和《全国中草药汇编》也有记载。《中国药典》2010 年版再次收载本品。当药中化学成分较为复杂, 主要包括裂环烯醚萜类(獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药苷等)、三萜类(齐墩果酸、齐墩果烷、熊果酸等)、黄酮类(当药黄素、芒果苷等)^[2-4]。现代药理试验表明, 其中的獐牙菜苦苷等裂环烯醚萜类成分是其抗肝炎活性相关的化学成分^[5], 为此, 笔者在对当药的纯化过程中考察了当药提取物对鼠试验性肝损伤的影响。

1 材料

1.1 药品 双环醇片: 北京协和药厂生产, 批号 070504。当药片: 石家庄乐仁堂制药有限责任公司生产, 批号 060302。茵栀黄口服液: 北京双鹤高科天然药物有限责任公司生产, 批号 272026。当药提取物: 从当药全草中提取, 经大孔树脂纯化, 喷雾干燥即得^[6], 由中药复方新药开发国家工程研究中心药学部提供, 批号 200800ZS02, 临用时用蒸馏水配置成所需浓度, 冰箱保存备用。

1.2 试剂 四氯化碳(CCl₄): 分析纯, 北京化学试剂公司生产, 批号 010612。橄榄油, 产地: 意大利, 批号 20090410。*D*-氨基半乳糖(*D*-Gal)、 α -萘异硫氰酸酯(ANIT), 均为 Sigma 公司生产。丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒(连续监测法), 天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(连续监测法), 总胆红素(TBIL)试剂盒(重氮法), 直接胆红素(DBIL)试剂盒(重氮法), 均由中生北控生物科技股份有限公司生产。

1.3 动物 ICR 种小鼠, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22 g, SPF 级; Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重(150 ± 10) g, 均购自北京维通利华试验动物技术有限公司。动物许可证号 SCXK(京) 2006-0008。

1.4 仪器 Vital-300 半自动生化仪, 产地荷兰。

2 方法

2.1 当药提取物对四氯化碳导致小鼠急性肝损伤

的影响 小鼠适应性喂养 3 d 随机分为 7 组, 分别为正常对照组、模型组、双环醇片组(100 mg·kg⁻¹)、当药片组(4 g·kg⁻¹)、当药提取物低剂量组(46.3 mg·kg⁻¹)、当药提取物中剂量组(92.6 mg·kg⁻¹)、当药提取物高剂量组(185.2 mg·kg⁻¹), 每组 10 只。各组 ig 给药, 每日 1 次, 给药体积 0.02 mL·g⁻¹ 体重, 对照组和模型组给予等体积的蒸馏水。连续给药 7 d, 于第 4 天上午和第 6 天下午, 除正常对照组外, 其余各组分别 ip 0.1% CCl₄ 油溶液 0.01 mL·g⁻¹ 体重。末次给药 1 h 后(第 2 次注射 CCl₄ 油溶液 17 h 后) 各组小鼠摘眼球取血, 分离血清(3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min), 半自动生化仪测定 ALT 和 AST。动物处死后解剖, 立即摘取肝脏, 取左外叶, 固定于 10% 甲醛溶液中, 经取材修块, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片厚度 4 μm, HE 染色, 光镜学观察。组织病理检查结果按肝细胞变性、坏死和炎细胞浸润等主要病理变化的程度综合判断分级, 分级后作权重积分。

积分数 = 变性 × 1 + 坏死 × 3 + 炎细胞浸润 × 1

2.2 当药提取物对 *D*-氨基半乳糖导致小鼠急性肝损伤的影响 小鼠分组给药同 2.1。末次给药 1 h 后, 除空白对照组外, 其余各组按剂量 800 mg·kg⁻¹, ip *D*-Gal, 禁食不禁水, 19 h 后各组小鼠摘眼球取血, 分离血清, 测定 ALT 和 AST。各组小鼠取肝脏, 按 2.1 项下方法进行肝脏病理组织学检查和病变程度分级。

2.3 对 α -萘异硫氰酸酯(ANIT) 导致黄疸模型的影响 大鼠适应性喂养 5 d, 按体重将动物随机分为 7 组, 分别按表 3 的剂量给药。各组每日 ig 给药 1 次, 连续给药 8 d。正常组和模型组 ig 同体积的蒸馏水。其中第 5 天给药 1 h 后, 除正常组蒸馏水 ig 外, 其他各组大鼠按 100 mg·kg⁻¹ 一次性 ig α -萘异硫氰酸酯(ANIT) 油溶液。第 8 天试验前 16 h 全部动物禁食不禁水。各鼠以 10% 水合氯醛 3 mL·kg⁻¹ ip 麻醉, 仰位固定于固定板上, 沿腹正中线切开约 2 cm, 打开腹腔, 在十二指肠降部肠系膜中找到白色有韧性的胆管, 分离, 结扎乳头部, 用聚氯乙烯医用塑料管向肝脏方向刺入, 结扎固定塑料管, 给药, 并开始计时, 收集胆汁。试验过程中创面用生理盐水纱布

覆盖, 并保持经常湿润。分别收集给药后 0.5, 1, 2, 3 h 时各组鼠胆汁, 4 h 后股动脉取血, 分离血清, 测定 AST, ALT, 总胆红素 TBIL, DBIL 水平。

留取肝脏固定于 10% 甲醛溶液中, 经取材修块, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片厚度 4 μm , HE 染色。组织病理检查结果按肝细胞变性和坏死、胆管上皮变性、坏死、增生、纤维组织增生等、炎细胞浸润(肝小叶内和汇管区, 不包括肝包膜下炎细胞)、胆汁淤积等主要病理变化的程度综合判断分级, 分级后作权重积分。积分 = (肝细胞变性 $\times 1$ + 肝细胞坏死 $\times 3$) + (胆管变性 $\times 1$ + 胆管坏死 $\times 3$ + 胆管增生 $\times 1$ + 纤维增生 $\times 1$) + 炎细胞浸润 $\times 1$ + 胆汁淤积 $\times 1$, 求出各组积分($\bar{x} \pm s$)。各组分别与对照组和模型组比较, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2.4 统计学方法 试验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。模型组与正常组比较, 各给药组与模型组比较, 用 t 检验进行统计学分析。

3 结果

3.1 当药提取物对四氯化碳导致小鼠急性肝损伤的影响 当药提取物能够抑制小鼠 CCl_4 导致急性肝损伤 AST 和 ALT 升高, 减轻肝脏肝细胞变性、坏死和炎细胞浸润程度。结果见表 1。病理照片见图 1。

表 1 当药提取物对 CCl_4 致小鼠急性肝损伤血清转氨酶及肝脏病变的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	肝脏病变 权重评分
正常	-	109.09 \pm 16.64 ¹⁾	38.51 \pm 5.81 ¹⁾	0.40 \pm 0.52 ²⁾
模型	-	310.29 \pm 258.58	209.90 \pm 216.03	9.05 \pm 3.44
双环醇	100	168.05 \pm 40.96	35.20 \pm 5.02 ¹⁾	4.80 \pm 1.36 ²⁾
当药片	4 000	162.11 \pm 56.64	53.52 \pm 20.89 ¹⁾	4.35 \pm 1.70 ²⁾
当药提取物	46.3	166.21 \pm 33.40	83.02 \pm 46.82	8.40 \pm 3.05
	92.6	174.17 \pm 73.66	76.73 \pm 44.45 ¹⁾	5.20 \pm 2.98 ¹⁾
	185.2	130.39 \pm 11.13 ¹⁾	46.37 \pm 8.76 ¹⁾	3.70 \pm 2.82 ²⁾

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

3.2 当药提取物对 D-氨基半乳糖导致小鼠急性肝损伤的影响

当药提取物能够抑制 D-Gal 导致小鼠急性肝损伤 AST 和 ALT 升高, 能够减轻肝细胞变性、坏死和炎细胞浸润程度。结果表明当药提取物对 D-Gal 导致的小鼠急性肝损伤具有保护作用。见表 2。

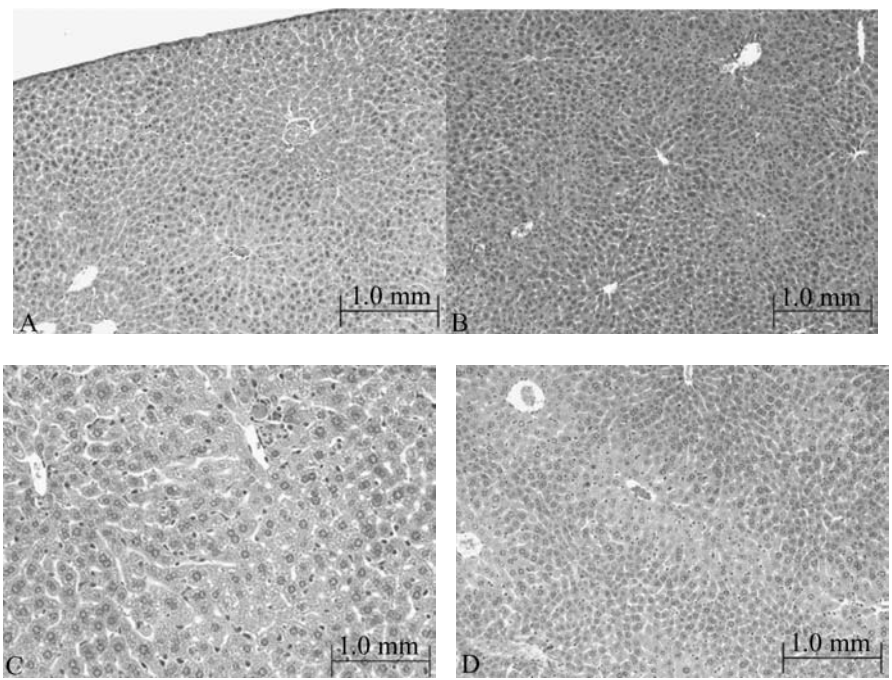


图 1 当药提取物对 CCl_4 致小鼠急性肝损伤肝脏病变的影响
A, B. 正常对照组; C. 模型组; D. 当药提取物 185.2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

表 2 当药提取物对 D-半乳糖造成小鼠急性肝损伤的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	权重评分
正常	-	126.76 \pm 12.64 ²⁾	30.50 \pm 3.80 ²⁾	1.25 \pm 0.79 ²⁾
模型	-	376.04 \pm 203.7	266.26 \pm 202.13	7.97 \pm 3.17
双环醇	100	186.64 \pm 60.71 ¹⁾	51.79 \pm 12.91 ²⁾	5.15 \pm 2.73 ¹⁾
当药片	4 000	204.79 \pm 61.46 ¹⁾	144.37 \pm 63.85 ¹⁾	4.75 \pm 2.75 ¹⁾
当药提取物	46.3	232.10 \pm 96.07	108.36 \pm 82.46	4.67 \pm 1.89 ¹⁾
	92.6	196.88 \pm 48.09 ¹⁾	84.15 \pm 34.04 ¹⁾	5.02 \pm 2.50 ¹⁾
	185.2	178.75 \pm 51.39 ¹⁾	54.88 \pm 38.91 ¹⁾	4.92 \pm 2.04 ¹⁾

3.3 对 -萘异硫氰酸酯(ANIT) 导致黄疸模型的影响 当药提取物能够抑制 ANIT 导致大鼠黄疸模型 TBIL, DBIL, AST, ALT 升高, 能够减轻大鼠肝脏和胆管炎性损伤坏死的程度, 能够增加模型动物胆汁流量。结果表明当药提取物对 ANIT 导致的大鼠黄疸模型具有退黄和利胆作用。见表 3 ~5。病理照片见图 2。

表 3 当药提取物对胆汁淤积大鼠胆汁流量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	胆汁流量/nL			
		0.5 h	1 h	2 h	3 h
正常	-	0.23 \pm 0.19 ¹⁾	0.62 \pm 0.27 ²⁾	1.53 \pm 0.45 ²⁾	2.27 \pm 0.80 ²⁾
模型	-	0.19 \pm 0.14	0.26 \pm 0.12	0.60 \pm 0.41	0.87 \pm 0.55
茵栀黄 ³⁾	10	0.16 \pm 0.13	0.41 \pm 0.36 ¹⁾	0.89 \pm 0.40 ¹⁾	1.33 \pm 0.42 ¹⁾
当药片	4 000	0.10 \pm 0.14	0.26 \pm 0.09	0.66 \pm 0.45	0.98 \pm 0.19
当药提取物	46.3	0.12 \pm 0.10	0.37 \pm 0.23	0.73 \pm 0.45	1.36 \pm 0.80
	92.6	0.20 \pm 0.19	0.50 \pm 0.35 ¹⁾	0.84 \pm 0.55 ¹⁾	1.43 \pm 0.85 ¹⁾
	185.2	0.21 \pm 0.28	0.51 \pm 0.53 ¹⁾	1.09 \pm 0.65 ¹⁾	1.93 \pm 0.78 ¹⁾

注: ³⁾ 剂量单位为 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (表 4 ~5 同)。

表 4 当药提取物对胆汁瘀积大鼠肝功能和胆红素的影响 (均±s, n=10)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	ALT /UL ⁻¹	AST /UL ⁻¹	TBL /μmol·L ⁻¹	DBL /μmol·L ⁻¹
正常	-	96.88 ± 24.56	295.13 ± 88.85	9.61 ± 2.65	6.44 ± 1.94
模型	-	954.61 ± 258.36 ²⁾	1016.68 ± 183.23 ¹⁾	133.11 ± 61.11 ²⁾	104.77 ± 51.98 ²⁾
茵陈黄 ³⁾	10	593.51 ± 168.64 ²⁾	760.21 ± 163.39 ²⁾	90.57 ± 31.26 ¹⁾	61.63 ± 24.74 ¹⁾
当药片	4000	679.53 ± 259.45 ¹⁾	856.83 ± 158.83	101.05 ± 57.75	73.59 ± 43.54
当药提取物	46.3	733.10 ± 148.64	801.84 ± 115.93 ¹⁾	114.95 ± 64.96	76.61 ± 53.39
	92.6	709.00 ± 287.57 ¹⁾	892.66 ± 223.15 ¹⁾	99.45 ± 44.26 ¹⁾	69.40 ± 45.77 ¹⁾
	185.2	685.23 ± 280.01 ²⁾	886.25 ± 210.74 ¹⁾	82.04 ± 54.16 ¹⁾	59.52 ± 40.59 ¹⁾

表 5 当药提取物对胆汁瘀积模型大鼠的保肝利胆作用主要病理改变积分的影响 (均±s, n=10)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	权重评分
正常	-	1.39 ± 2.12 ²⁾
模型	-	14.77 ± 2.47
茵陈黄 ³⁾	10	8.86 ± 2.55 ²⁾
当药片	4000	9.81 ± 2.27 ²⁾
当药提取物	46.3	11.42 ± 2.11 ²⁾
	92.6	12.10 ± 2.07 ²⁾
	185.2	12.42 ± 2.19 ²⁾

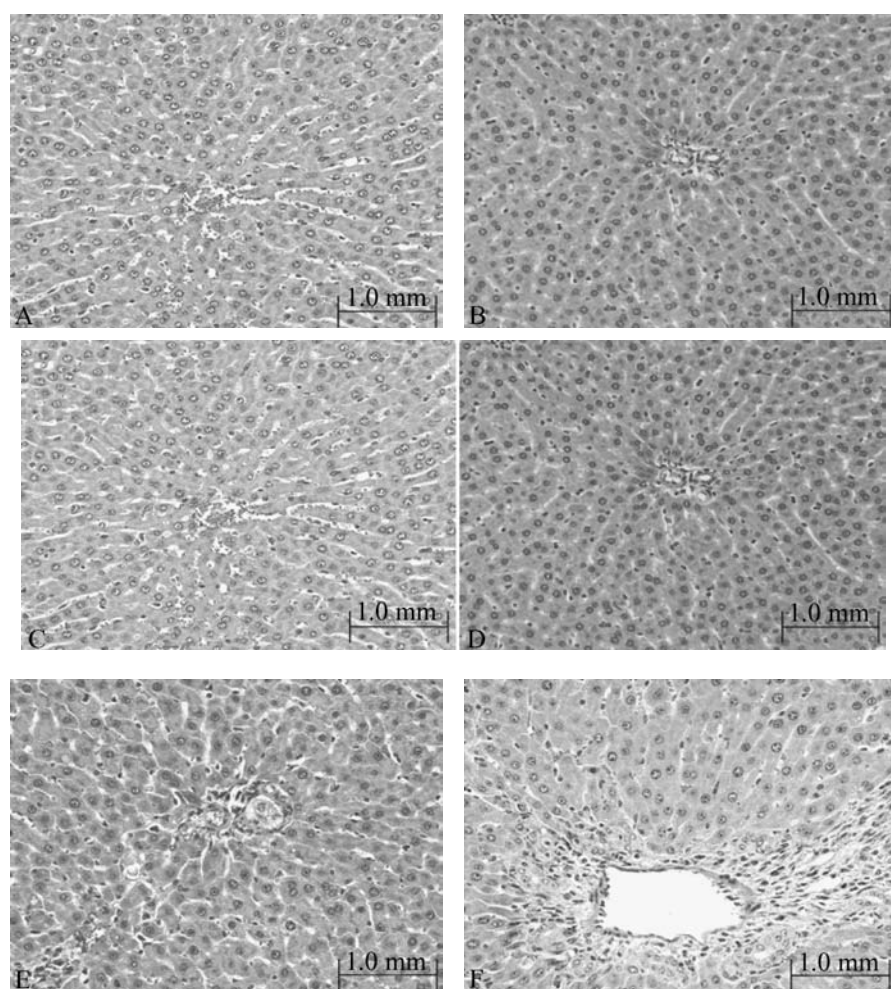


图 2 当药提取物对 ANIT 致大鼠黄疸肝脏病变的影响

A. 正常对照组肝细胞; B. 正常对照组肝汇管区; C. ANIT 模型组肝细胞; D. ANIT 模型组汇管区; E. 当药提取物 185.2 mg·kg⁻¹ 肝细胞; F. 当药提取物 185.2 mg·kg⁻¹ 肝汇管区

4 讨论

当药曾是河北、内蒙古一带治疗肝炎的常用中草药,民间俗称“肝炎草”^[7]。目前,当药主要作为制备中成药“当飞利肝宁胶囊”、“当药片”和“愈肝片”的药材来源,此 3 种中成药均用于治疗肝损伤。但是,在这些成药中,当药均以粗提物或粉碎后直接入药,有效成分不明确。笔者对当药进行了纯化,并观察了其保肝作用,研究结果表明:纯化后的当药提取物对于 CCl₄, D-Gal 导致的小鼠急性肝损伤模型和 ANIT 导致的大鼠黄疸模型具有抑制转氨酶升高和减轻肝脏损伤的作用,这表明纯化后的当药提取物含有有效成分,纯化过程有效去除了杂质。

以当药作为主要药材来源开发的治疗急慢性肝损伤的药物已广泛用于临床,本文研究发现,当药提取物对肝损伤动物模型具有保护作用,但是,其治疗作用除了保肝降酶作用外是否还具有抗病毒作用以及其抗肝损伤作用的机理,还有待进一步研究,这为我们又提出了新的研究课题。

[参考文献]

- [1] 徐都玲. 蒙药铁木尔迪格达的原植物及本草考证 [J]. 中药材, 2000, 23(2): 107.
- [2] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志 [M]. 第四册. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 342.
- [3] 姜燕. 獐牙菜属植物化学成分的研究概况 [J]. 国外医药·植物药分册, 1990, 5(3): 99.
- [4] 淮虎银, 郭继明, 胡芳弟. 国产獐牙菜属药用植物资源 [J]. 甘肃科学学报, 1995, 7(4): 29.
- [5] 胡若琪, 饶娴宜, 冯毓正, 等. 獐牙菜甙对试验大鼠肝病理形态学的影响 [J]. 云南中医学院学报, 1991, 14(1): 35.
- [6] 周大成, 孟贺, 李荣生, 等. 大孔吸附树脂纯化当药中獐牙菜苦苷的研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(7): 54.
- [7] 黄文哲, 许春辉, 周大成, 等. 用 RP-HPLC 测定了当药中环烯醚萜和三萜类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(23): 2494.

[责任编辑 聂淑琴]