

## 茵栀黄注射液对体外四氯化碳致肝细胞损伤的保护作用

任永申<sup>1,2</sup>, 张萍<sup>1\*</sup>, 鄢丹<sup>1</sup>, 段慧娟<sup>1</sup>, 李正明<sup>1</sup>, 肖小河<sup>1\*</sup>

(1. 解放军三二二医院 中西医结合肝病诊疗与研究中心, 北京 100039;

2. 成都中医药大学 药学院, 成都 610075)

[摘要] 目的: 研究茵栀黄注射液对四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )所致大鼠肝细胞损伤的保护作用。方法: 采用 $\text{CCl}_4$ 熏蒸法造成体外肝细胞损伤模型, 观察不同厂家生产的茵栀黄注射液与复方茵陈注射液及其有效成分黄芩苷及香豆素的保护作用。结果: 各厂家生产的茵栀黄注射液均能显著降低丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)及丙二醛(MDA)的含量, 提高谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)的活性, 降酶作用以复方茵陈注射液样品的作用最强。结论: 茵栀黄注射液及其主要有效成分黄芩苷及香豆素对 $\text{CCl}_4$ 所致大鼠肝细胞损伤具有保护作用, 各厂家正常样品药效作用具有较好的一致性。

[关键词] 茵栀黄注射液; 复方茵陈注射液; 四氯化碳; 肝细胞损伤; 保护作用

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0115-04

### Study on Protective Effect of Yinzhihuang Injection on Hepatic Cell Damage Caused by Carbon Tetrachloride *in vitro*

REN Yong-shen<sup>1,2</sup>, ZHANG Ping<sup>1\*</sup>, YAN Dan<sup>1</sup>, DUAN Hui-juan<sup>1</sup>, LI Zheng-ming<sup>1</sup>, XIAO Xiao-he<sup>1\*</sup>

(1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China;

2. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of Yinzhihuang Injection on hepatic cell damage caused by Carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) *in vitro*. **Method:**  $\text{CCl}_4$  fumigation method was adopted to duplicate hepatic cell damage *in vitro*, and the protective effect of Yinzhihuang Injection and Fufang Yinchen Injection and their main active ingredients, baicalin and coumarin, from different companies were investigated. **Result:** The ALT, AST and MDA of damaged cells could be decreased and GSH-Px could be elevated by Yinzhihuang Injections from different factories, and the strongest protective effect was originated by Fufang Yinchen Injection. **Conclusion:** Both Yinzhihuang Injection and their main active ingredients, baicalin and coumarin, could prevent the hepatic cell damage caused by  $\text{CCl}_4$  *in vitro*, and the protective effect of normal samples from different companies had good consistency agreed with each other.

[Key words] Yinzhihuang Injection; Fufang Yinchen Injection; carbon tetrachloride( $\text{CCl}_4$ ); hepatic cell damage; protective effect

[收稿日期] 20100628(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701109)

[第一作者] 任永申, 博士, 主要从事临床中药学研究工作, E-mail: godreny@163.com.

[通讯作者] \* 肖小河, Tel: 010-66933322, Fax: 010-63879915, E-mail: pharmacy302@126.com

\* 张萍, Tel: 010-66933322, Fax: 010-63879915, E-mail: zhp1231@126.com

茵栀黄注射液(Yinzhihuang Injection)是根据传统中医药理论和现代制药技术由茵陈蒿汤研制而成的中药注射剂, 其前身是解放军第302医院研制开发的复方茵陈注射液(6912注射液), 由茵陈 *Artemisia capillaries* Thumb, 栀子 *Gardenia jasminoides* Euis, 黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 及金银花 *Lonicera japonica* Thumb 4味中药经提取制成, 主要功效为清热、解毒、利胆、退黄, 具有清热、解毒、抗

菌、消炎、解痉、利胆、退黄、降酶、利尿、抗病原微生物、增强机体免疫功能、保肝和抗肝纤维化等药理作用<sup>[1-4]</sup>, 常用于治疗肝胆湿热、小便黄赤、急慢性肝炎等病症<sup>[5-6]</sup>, 其临床应用广泛且疗效显著<sup>[7-8]</sup>。

茵栀黄注射液临床常用于新生儿黄疸及急性黄疸型肝炎等, 为临床常用的中药注射剂品种, 生产厂家较多, 产品质量不一, 质控水平较低(仅以黄芩苷含量测定作为控制指标), 为临床应用带来一定的混乱和风险, 特别是近年来频现的中药注射剂不良反应, 更引起人们对茵栀黄注射液安全性和有效性的关注。为体现茵栀黄注射液生市场主要供应厂家产品质量的一致性和差异性, 本文以体外评价其抗肝损伤作用的一致性为切入点, 以黄芩苷和香豆素为对照, 考察了 5 批不同厂家生产的茵栀黄注射液及复方茵陈注射液对四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )所致大鼠肝细胞损伤的影响, 结果报道如下。

## 1 材料

**1.1 药物** 石家庄神威药业茵栀黄注射液(批号 07040341, SW); 山西太行药业茵栀黄注射液(批号 070502, TH); 北京双鹤药业茵栀黄注射液(批号 070414, SH); 解放军第 302 医院医院制剂复方茵陈注射液(批号 070620, FF); 石家庄神威药业茵栀黄注射液高温加速样品(批号 SW07040341, 于 60 °C 高温环境保存 7 d, GW); 黄芩苷对照品(baicalin)和香豆素对照品(coumarin)由中国药品生物制品检定所提供。

**1.2 试剂** DMEM 培养基(批号 12800082), 优级胎牛血清(批号 16000044), 胰蛋白酶(批号 25200056), 美国 Gibco 公司; Ⅰ型胶原酶(批号 9001121), 美国 Sigma 公司; 四氯化碳( $\text{CCl}_4$ ), 北京化工厂生产。谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST), 丙二醛(MDA), 谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒, 南京建成生物工程研究所提供(批号均为 20090618)。

**1.3 动物** SD 大鼠, SPF 级, 军事医学科学院实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK(军)2008-0001。

## 2 方法

### 2.1 大鼠原代肝细胞的制备与培养

采用在体灌注方法制备与培养大鼠原代肝细胞<sup>[9]</sup>。将大鼠以 10% 乌拉坦麻醉, 门静脉插管, 先以无钙灌流液冲洗肝脏, 再以Ⅰ型胶原酶灌流液消化肝组织间质, 将肝细胞分散入平皿内, 以 D-Hanks

液吹打清洗过滤肝细胞, 以 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清, 10 000 U 青霉素, 100 U 链霉素)制成  $1 \times 10^9$  cell/L 肝细胞悬液。分离的肝细胞经 0.6% 台盼蓝拒染法测得细胞活力大于 90%, 高碘酸雪夫反应显示糖原法鉴定 99% 为肝实质细胞。将上述肝细胞混悬液加入 24 孔板中, 每孔 1 mL, 将装有细胞混悬液的细胞培养板放入 37 °C 含 5%  $\text{CO}_2$  的恒温孵箱中培养 24 h, 更换培养基。

### 2.2 各茵栀黄注射液样品对 $\text{CCl}_4$ 所致大鼠肝细胞损伤的影响

取一块 24 孔板, 各孔中加入  $1 \times 10^9$  /mL 的单细胞混悬液, 每孔 1.1 mL, 将细胞培养板放入 37 °C 含 5%  $\text{CO}_2$  的恒温孵箱中培养 24 h, 更换培养基后继续培养 24 h, 吸取上清液检测 ALT, AST 含量, MDA 和 GSH-Px 的活性, 作为空白对照。

另取两块 24 孔板, 各孔中加入  $1 \times 10^9$  /mL 的单细胞混悬液 1 mL, 以 6 孔为 1 组, 设置以下组别: 分别加入上述 4 种茵栀黄注射液样品(SW, SH, TH, FF, GW) 各 100  $\mu\text{L}$ , 使各注射液样品的终浓度分别为  $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 作为供试品组; 分别加入 100  $\mu\text{L}$  以培养基溶解的黄芩苷对照品(baicalin)和香豆素对照品(coumarin), 使终质量浓度分别为  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  与  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 作为对照品组; 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  培养基, 作为模型对照组。将上述细胞培养板放入 37 °C 含 5%  $\text{CO}_2$  的恒温孵箱中培养 24 h 后, 置密闭塑料盒中, 内置  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (体积) 的  $\text{CCl}_4$ , 37 °C 温孵 90 min, 造成肝细胞损伤模型。更换培养基后继续培养 24 h, 吸取上清液, 检测 ALT, AST 含量, MDA 和 GSH-Px 的活性, 评价肝细胞的损伤程度。

## 3 结果

采用分光光度法, 测定各板各孔细胞培养液上清液 ALT, AST 含量, MDA 和 GSH-Px 的活性, 结果见表 1。结果表明: 与空白对照组比较, 模型组 ALT, AST 及 MDA 显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而 GSH-Px 活性则显著下降, 表明  $\text{CCl}_4$  熏蒸法所复制的肝细胞损伤模型成功; 与模型对照组比较, 神威(SW)、太行(TH)及双鹤(SH)药业生产的茵栀黄注射液样品能显著降低 ALT, AST, MDA 的含量, 提高 GSH-Px 的活性 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 降酶作用以复方茵陈注射液样品(FF)作用最强, 显著优于其他注射液样品; 与同批正常样品相比较, 神威高温加速试验样品(GW)的保肝降酶活性显著降低 ( $P < 0.05$ );

与茵栀黄注射剂样品中等含量<sup>[5]</sup>的黄芩苷 (baicalin) 及香豆素 (coumarin) 对照品溶液也能显著降低转氨酶及 MDA 的含量 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 并显著提高 GSH-Px 的活性 ( $P < 0.05$ )。

表 1 各茵栀黄注射液样品对  $CCl_4$  致大鼠原代肝细胞损伤的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·L <sup>-1</sup>	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>	MDA /μmol·L <sup>-1</sup>	GSH-Px /μmol·L <sup>-1</sup>
空白对照	-	7.57 ± 1.14	97.25 ± 11.027	5.47 ± 1.16	131.33 ± 26.43
模型	-	20.44 ± 1.75	218.52 ± 18.655	10.60 ± 1.88	81.59 ± 22.06
SW	100	10.15 ± 1.84 <sup>2)</sup>	146.48 ± 21.97 <sup>1)</sup>	8.68 ± 1.38	188.57 ± 38.92 <sup>2)</sup>
TH	100	9.40 ± 1.12 <sup>2)</sup>	86.11 ± 44.00 <sup>2)</sup>	7.88 ± 1.15 <sup>1)</sup>	207.94 ± 10.49 <sup>2)</sup>
SH	100	10.27 ± 1.05 <sup>2)</sup>	120.45 ± 6.33 <sup>2)</sup>	8.23 ± 1.53 <sup>1)</sup>	224.76 ± 3.43 <sup>2)</sup>
HF	100	6.49 ± 1.88 <sup>2)</sup>	117.30 ± 1.27 <sup>2)</sup>	6.50 ± 1.32 <sup>2)</sup>	122.22 ± 53.42 <sup>1)</sup>
GW	100	12.40 ± 2.02 <sup>1)</sup>	191.34 ± 17.79 <sup>1)</sup>	9.49 ± 1.89	181.45 ± 25.72 <sup>2)</sup>
黄芩苷	2	18.56 ± 1.77	146.02 ± 2.02 <sup>1)</sup>	4.02 ± 1.59 <sup>2)</sup>	133.02 ± 23.41 <sup>1)</sup>
香豆素	1	5.32 ± 1.15 <sup>2)</sup>	116.76 ± 3.52 <sup>2)</sup>	4.53 ± 1.39 <sup>2)</sup>	112.70 ± 13.88 <sup>1)</sup>

注: 与模型对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

肝细胞是肝脏中数目最丰富和最主要的细胞, 也是各种活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 攻击的主要目标, 氧自由基的损伤作用是肝炎发生的重要机制之一。机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基, 能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 引发脂质过氧化反应, 生成的脂质过氧化物如: MDA、氢过氧基以及新的氧自由基等, 脂质过氧化作用不仅把活性氧转化成活性化学剂即非自由基性的脂类分解产物, 而且通过链式或链式支链式反应放大活性氧作用。一般认为<sup>[10]</sup>, 四氯化碳造成肝损伤是  $CCl_4$  进入肝细胞后, 由于脂质过氧化使肝细胞膜脂质溶解, 致使肝细胞变性、坏死。肝细胞膜在受损伤的同时可产生大量新的活性氧基团, 促发脂质过氧化的链式反应, 因此而产生的脂质过氧化物可以损伤肝脏中的各种细胞, 故肝细胞膜的脂质过氧化是肝细胞损伤时的主要作用机制之一。因而测试 MDA 的含量可反映体内脂质过氧化的程度, 间接反映出细胞损伤的程度。

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解的酶, 它特异地催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 对氢过氧化物的还原反应, 一般认为它在细胞内能清除有害的过氧化物代

谢产物, 阻断脂质过氧化连锁反应, 从而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用; 因而, GSH-Px 活力可以衡量机体抗氧化水平。本文则通过对上述指标的考察, 反映不同厂家茵栀黄注射液及其主要药效组分的主要药效学差异, 并用于产品的品质的客观评价与质量控制。

研究结果表明, 茵栀黄注射液及复方茵陈注射液均具有体外抗  $CCl_4$  致大鼠肝细胞损伤的作用, 并以复方茵陈注射液作用最强; 不同厂家茵栀黄注射液的体外抗肝损伤作用基本一致, 提示各主要厂家产品药效作用具有较好的一致性; 高温加速样品 (为研究目的特制变质样品) 体外抗肝损伤作用显著降低, 提示高温对产品质量影响较为明显, 同时产品质量的改变可显著影响产品药效作用的发挥, 并可能导致产品临床使用风险的提升, 提示茵栀黄注射液易受保存环境影响, 故需要建立合理的临床使用规范与保存环境。

茵栀黄注射液中, 茵陈的主要有效成分为香豆素 (coumarin), 黄芩的主要有效成分为黄芩苷 (baicalin), 本研究结果表明, 黄芩苷组、香豆素组和茵栀黄注射液组均能降低血清 ALT, AST, 可以有效降低肝组织匀浆的 MDA 含量; 同时, 与等剂量的茵栀黄注射液样品相比, 黄芩苷与香豆素降低转氨酶及 MDA 含量、升高 GSH-Px 活力的能力较茵栀黄正常样品低, 提示中药复方注射剂 (茵栀黄注射液) 保肝降酶、抗肝细胞损伤药效作用较单体成分更强, 并表现出良好的协同增效作用。

可以推测, 降低转氨酶、抗脂质过氧化, 防止过氧化损伤, 减少过氧化脂质的生成等可能是茵栀黄注射液及其主要成分黄芩苷、香豆素等抗  $CCl_4$  致肝细胞损伤作用机制的重要方面。综上所述, 茵栀黄注射液对  $CCl_4$  所致大鼠肝细胞损伤的保护作用, 可能与该注射液的有效成分黄芩苷及香豆素有关, 具体的作用机制, 有待进一步研究阐明。

#### [参考文献]

- [1] 陈辉扬, 陈军, 温平康. 茵栀黄注射液的药理作用与临床应用评价[J]. 药品评价, 2005, 2(2): 122.
- [2] 邹堂斌, 刘娟. 茵栀黄注射液对鸭疫里默氏菌的抑制及抗氧化作用试验[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(8): 58.

(下转第 121 页)

Kangjs<sup>[5-6]</sup> 等的研究结果一致, 也与 Wilder J 等<sup>[7]</sup> 研究显示的雌激素诱发子宫内膜癌可能与其下调 ER 基因转录有关相一致。而二仙汤、淫羊藿、仙茅可明显上调 ER 和 ER 在子宫组织中的表达。由此, 我们推测二仙汤对大鼠生殖器官的影响不同于己烯雌酚, 在子宫形态上则表现为子宫内膜厚度和上皮细胞的高度无明显改变, 提示二仙汤对子宫内膜组织无雌激素样促增殖作用。

综上所述, 二仙汤可以通过雌激素受体直接作用于雌激素的靶器官—子宫, 发挥植物雌激素样作用, 为临床用于治疗与雌激素水平相关的疾病提供一定的理论指导。但详细理解其与雌激素受体之间是如何相互影响还有待进一步阐明。

#### [参考文献]

- [1] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 178.
- [2] Jefferson W N, Elizabeth P B, Clark G, et al. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse utero-trophic responses [J]. *Chromatography B*, 2002, 777: 179.

- [3] 廖柏松, 胡燕, 鞠躬, 等. 二仙汤对 18 月龄雌性大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴功能的调节 [J]. *山东中医学院学报*, 1996, 20(6): 396.
- [4] Shelby M D, Newbold R R, Tully D B, et al. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays [J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104(12): 1296.
- [5] Kang J S, Lee B J, Ahn B, Kim D J, et al. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the uterus and vagina of immature rats treated with 17-ethinyl estradiol [J]. *J Vet Med Sci*, 2003, 65(12): 1293.
- [6] Kang J S, Jung N J, Kim S, et al. Down regulation of estrogen receptor alpha and beta expression in carcinogen-induced mammary gland tumors of rats [J]. *Eksp Onkol*, 2004, 26(1): 31.
- [7] Wilder J L, Shajahan S, Khattar N H, et al. Tamoxifen-associated malignant endometrial tumors: pathologic features and expression of hormone receptors estrogen and progesterone; a case controlled study [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(2): 553.

[责任编辑 聂淑琴]

#### (上接第 117 页)

- [3] 郭青龙, 郭殿武, 陈真. 茵栀黄注射液保肝作用的实验研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2001, 32(6): 440.
- [4] 李瑞芬, 范玉明, 王希海. 茵栀黄注射液对大鼠实验性肝损伤的治疗作用 [J]. *中药药理与临床*, 2001, 17(2): 23.
- [5] 任永申, 张萍, 杜晓曦, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的茵栀黄注射液质量一致性和稳定性研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(6): 837.
- [6] 陈辉扬, 陈军, 温平康. 茵栀黄注射液的药理作用与临床应用评价 [J]. *药品评价*, 2005, 2(2): 122.

- [7] 王有良. 茵栀黄注射液佐治新生儿病理性黄疸 42 例临床观察 [J]. *儿科药学杂志*, 2009, 15(5): 28.
- [8] 张奕梅, 黎燕玲, 黄翎. 茵栀黄注射液联合微生态调节剂佐治新生儿高胆红素血症 128 例疗效观察 [J]. *中国医药导报*, 2009, 6(3): 63, 67.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 581.
- [10] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 458.

[责任编辑 聂淑琴]