

黄药子对小鼠肝脏毒性的表达及其机理研究

李玉洁¹, 刘树民², 罗明媚², 刘红凤¹

(1 山西医科大学第一临床医学院, 山西 太原 030001; 2 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的: 探讨黄药子肝毒作用的指标和肝脏毒性产生的机理。方法: 黄药子 2g/kg·d、10g/kg·d、50g/kg·d 给予小鼠, 连续给药 21d, 观察其生化指标变化, 药物代谢酶及抗氧化酶活性及病理变化。结果: 黄药子可引起小鼠 GPT、GOT、ALP、TBIL 值增高, GST、GSH-PX、SOD 活力降低, 且呈一定剂量、时间相关性。病理变化可见肝细胞疏松、肿胀、胞核溶解、融合、坏死、汇管区炎细胞浸润, 小胆管水肿、增生等。其毒性产生与抑制 GST、GSH-PX、SOD 等酶的活性有关。结论: 黄药子的肝毒作用客观化指标为 GPT、GOT、ATP、TBIL 及组织学变化。其毒性产生的机理与抑制肝微粒体中抗氧化酶和药物代谢酶活性有关。

关键词: 黄药子; 肝脏毒性; 指标; GST; GSH-PX; SOD

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)01-0040-03

The Express and Principle Study of Liver Toxicity of *Dioscorea bulbifera* L

LI Yujie¹, LIU Shumin², LUO Ming-mei², LIU Hongfeng¹

(1 The First Clinical Hospital of Shan Xi University of Medical, Taiyuan 030001, China;

2 Hei Long Jiang University of TCM, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective: To discuss the indexes and principle of *Dioscorea bulbifera* L liver toxicity. Method: *Dioscorea bulbifera* L, 2g/kg d, 10g/kg d, 50g/kg d were given to mice which lasted 21 days, and observe the change of biochemical indexes, the activity of medicine metabolizability enzyme and anti-oxidation enzyme and pathology results. Result: *Dioscorea bulbifera* L can increase the GPT, GOT, ATP and TBIL levels and decrease the GST, GSH and SOD activity in mice, both of which is relevant to time and dosage. The pathology changes included looseness, tumidness, karyon dissolution, amalgamation, putrescence, confluent hepatic duct district inflammatory cells corrasion and small bile duct edema and hyperplasia. Conclusion: The indexes of *Dioscorea bulbifera* L toxicity are GPT, GOT, ATP, TBIL and tissue changes. The principle of toxicity is relevant to its inhibition of the activity of medicine metabolizability enzyme and anti-oxidation enzyme in liver mitochondria.

Key words: *Dioscorea bulbifera* L; Liver Toxicity; Index; GST; GSH-PX; SOD

黄药子为薯蓣科薯蓣属植物黄独 (*Dioscorea bulbifera* L.) 的块茎, 始载于孙思邈的《千金月令》。

药性苦寒, 具有散结消瘿, 清热解毒, 凉血止血的作用, 多用于瘰疬瘤肿, 亦有用其止血之功。《本草拾遗》中“土芋蔓生, 叶如豆, 其根圆如卵, 鸩食后弥吐, 人不可食”^[1]的著述是黄药子毒性的最早记载。现认为其有小毒, 临床使用不当可引起肝功能异常。

收稿日期: 2004-01-20

基金项目: 国家中医药管理局专项基金资助项目 (NO: 02-03zp29)

通讯作者: 李玉洁, Tel: (0351) 4192499, E-mail: yjsgy@hotmail.com

为深入探索黄药子的肝脏毒性, 本实验从其毒性的表达及机理方面进行了实验研究。

1 材料

1.1 药品与试剂 黄药子购于黑龙江省药材公司, 产地河北, 经黑龙江省药检所王清华研究员鉴定为薯蓣科黄独 (*Dioscorea bulbifera* L.) 的块茎。谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 试剂盒, 批号 20030613; 谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 试剂盒, 批号 20030617; 超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒, 批号是 20030617; 考马斯亮兰, 批号 20030617, 均由南京建成生物工程研究所提供。谷丙转氨酶试剂盒 (GPT), 批号 010161; 谷草转氨酶试剂盒 (GOT), 批号 020081; 碱性磷酸酶试剂盒 (ALP), 批号 030031; 总胆红素试剂盒 (TBIL), 批号 300061; 总胆固醇试剂盒 (CHO), 批号 180111, 均为中生北控生物科技股份有限公司产品。其它试剂均为分析纯。

1.2 动物 昆明小鼠, 体重 (20 ± 2) g, 雄性由黑龙江中医药大学实验动物中心提供, 动物质量合格证书号: 医动字第 09-2-2 号。

1.3 实验仪器 Lisa 300 全自动生化分析仪、BECKMAN 超速低温离心机 SHIMADZU UV-2201 紫外分光光度计、恒温水浴等。

2 实验方法

2.1 药物制备: 黄药子饮片头煎加 10 倍量水, 二煎 8 倍量水浸泡后煎煮 2 次, 合并煎液, 浓缩, 喷雾干燥制粒, 每克颗粒相当于 12.5g 原药材。用时用蒸馏水溶解稀释至所需浓度。

2.2 动物分组及给药 取 δ 小白鼠 60 只, 随机分为 4 组, 黄药子低、中、高剂量组每日 ig 给予黄药子 2, 10, 50g/kg (相当于人日服剂量 1 倍、5 倍、25 倍), 连续给药 21d。对照组 ig 等体积生理盐水。

表 2 黄药子对小鼠血清 GPT、GOT、ALP、TBIL、CHO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药量 (g·kg ⁻¹)	GPT (U·L ⁻¹)	GOT (U·L ⁻¹)	ALP (U·L ⁻¹)	TBIL (μ mol·L ⁻¹)	CHO (mmol·L ⁻¹)
对照组	—	60.36 ± 26.92	196.56 ± 36.62	53.52 ± 25.37	0.89 ± 0.79	4.27 ± 0.66
黄药子低剂量组	2	65.67 ± 21.27	209.00 ± 71.89	56.82 ± 25.06	1.28 ± 1.09	4.00 ± 0.86
黄药子中剂量组	10	70.80 ± 29.92	218.12 ± 36.62	83.44 ± 16.47 ²⁾	1.77 ± 1.29 ²⁾	3.78 ± 1.09
黄药子高剂量组	50	98.10 ± 43.78 ¹⁾	337.20 ± 123.11 ²⁾	83.72 ± 23.17 ¹⁾	4.31 ± 3.29 ²⁾	3.27 ± 1.74

3.3 对小鼠肝微粒体中 GST、GSH-PX、SOD 的影响: 与对照组相比, 小鼠肝微粒体中 GST、GSH-PX、SOD 活力均有不同程度降低, 表明黄药子对小鼠肝脏的毒性作用与抑制肝脏中药物代谢酶及抗氧化酶活性有关。结果见表 3。

2.3 观察指标 各组分别连续给药 21d 后, 于末次给药 30min 后, 称重, 摘眼球取血, 离心取血清检测 GPT、GOT、ALP、TBIL、CHO。断椎处死小鼠, 迅速摘取肝脏, 用预冷的生理盐水反复冲洗直至没有血污, 扭力天平称肝重, 计算肝脏指数 (肝重/体重 × 100), 并取肝脏适量, 按 1:4 (W/V) 比例加入 pH.7.5 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 1.15% KCl), 冰浴条件下制备匀浆, 匀浆迅速放 4℃ 冰箱保存。肝匀浆于 4℃ 10000g, 离心 20min, 取上清液 (肝 S₀ 部分) 备用。用双缩脲法测定蛋白含量后, 分光光度法进行各指标测定。其余肝脏常规固定, HE 染色, 光镜观察病理变化。

3 结果

3.1 对体重、肝脏指数的影响: 与对照组相比, 黄药子对小鼠正常的体重增长有明显抑制作用, 且呈剂量依赖趋势。各组肝脏指数分别比对照组增加 16.74, 19.72, 65.37%。表明黄药子对小鼠生长发育有抑制作用, 并引起肝脏肿大。结果见表 1。

表 1 黄药子对小鼠体重及肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药量 (g·kg ⁻¹)	体重增长 (g)	肝脏指数
对照组	—	7.78 ± 1.88	4.36 ± 0.54
黄药子低剂量组	2	3.92 ± 4.47 ¹⁾	5.09 ± 0.94
黄药子中剂量组	10	3.82 ± 2.46 ²⁾	5.22 ± 0.62 ¹⁾
黄药子高剂量组	50	0.27 ± 2.36 ³⁾	7.21 ± 1.71 ³⁾

注: 与对照组比较: ¹⁾ P < 0.05; ²⁾ P < 0.01; ³⁾ P < 0.001。下同。

3.2 对 GPT、GOT、ALP、TBIL、CHO 的影响: 与对照组相比, 各剂量组 GPT、GOT、ALP、TBIL 均有不同程度的升高。其中 TBIL 分别增高 43.82%, 98.88%, 383.1%, 表明黄药子对肝脏的毒性反应除引起转氨酶增高外, 还引起不同程度的胆管阻塞, 胆汁淤积。对 CHO 则影响并不显著。结果见表 2。

3.4 组织学改变: 病理切片黄药子各剂量组均可见肝细胞普遍疏松肿胀, 小叶结构紊乱, 窦间隙增宽, 胞浆淡染, 肝窦轻度扩张 (见图 2), 并可见肝细胞肿胀, 有的融合溶解, 核固缩, 染色质边集, 小胆管扩张 (见图 3), 大剂量组可见大量固缩的细胞核, 并有肝

细胞缺失。(见图 4)。

表 3 黄药子对小鼠肝微粒体 GST、GSH-PX、SOD 的影响

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药量 ($g \cdot kg^{-1}$)	GST ($nmol \cdot mg^{-1} \cdot pro$)	GSH-PX ($nmol \cdot mg^{-1} \cdot pro$)	SOD ($U \cdot mg^{-1} \cdot pro$)
对照组	—	733.70 ± 131.32	81.50 ± 15.85	81.66 ± 41.05
黄药子低剂量组	2	721.37 ± 169.45	74.25 ± 27.34	77.24 ± 26.51
黄药子中剂量组	10	534.88 ± 99.16 ²⁾	35.56 ± 12.83 ³⁾	31.80 ± 9.13 ³⁾
黄药子高剂量组	50	483.11 ± 141.50 ³⁾	33.26 ± 15.54 ³⁾	31.12 ± 17.40 ³⁾

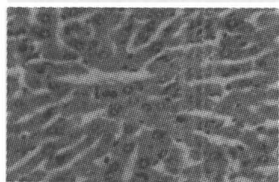


图 1 正常组 HE × 400

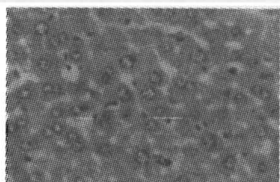


图 2 低剂量组 HE × 400

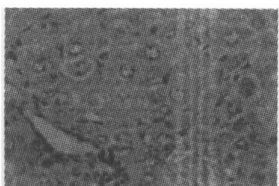


图 3 中剂量组 HE × 400

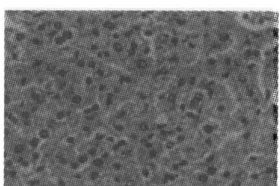


图 4 高剂量组 HE × 400

5 讨论

中药毒性的认识经历了一个漫长的过程,对中药毒性进行系统研究已成为不容忽视的重要课题。中药毒性的客观地评价,不仅有利于中药理论体系的充实和完善,对中药的临床安全应用亦有重要的参考价值。本实验采用黄药子临床常用剂量及其倍量,观察正常及毒性剂量下小鼠各项指标的变化,以期为临床提供参考。

据苏莉^[2]对黄药子中毒的病历分析结果,黄药子的毒性主要表现为 GPT、GOT、黄疸指数升高,尿三胆阳性等。本实验结果表明,黄药子可引起转氨酶的增高的同时,ALP、TBIL 值亦明显增高。低剂量组(即临床常用剂量)服用 21d,(相当于人累积服用 300g 左右)各生化指标即有轻微改变,但无统计学意义。少数小鼠变化较明显,可能与个体差异有关。中剂量组(相当于人累积服用 1500g 左右)首先出现 ALP、TBIL 显著增高,GPT、GOT 亦有增高趋势,但无显著性意义。高剂量组(相当于人累积服用 7500g 左右)可引起 GPT、GOT、ALP、TBIL 均显著增高。结合组织检查结果,许多病理切片中可见小胆管的扩张、水肿、增生的情况,可推测黄药子可引起肝脏胆汁生成、排泄的障碍。黄药子除对肝细胞的直接损害外,胆汁淤积、胆盐的刺激可能是造成肝损伤的原

因之一。

宋崇顺^[3]研究认为黄药子引起的肝脏病理变化为灶性坏死、中央静脉高度扩张充血、肝窦扩张瘀血、肝细胞普遍疏松,空泡样变等。而本实验结果显示,低剂量黄药子引起肝细胞疏松、肿胀为主,随剂量增加,可表现出广泛水变性、小叶中央静脉周围细胞胞质淡染、嗜酸性变、直至融合变性、溶解,并可见散在的单细胞坏死、细胞核固缩、特别严重者可见区带性坏死。此外,我们还观察到汇管区可见细胞空泡变,小胆管扩张、水肿、层状增生甚至纤维化等一系列病理改变,其差异可能与给药剂量、时间及药物产地等因素有关。

目前认为,细胞膜的氧化损伤和药物代谢过程中生物转化功能异常,是造成肝损伤的重要原因^[4]。本实验结果表明,黄药子可抑制肝微粒体中 GST、GSH-PX 及 SOD 的活性,表明其毒性作用的产生与抑制肝抗氧化酶和药物代谢酶活性密切相关。

本实验结果提示在正常剂量下,黄药子即能引起一定的肝脏损伤,但由于肝脏的代偿能力较强,在一定范围内表现不明显。故现行的预防黄药子毒性的手段(严格控制给药剂量和时间、定期查肝功)似乎仍显不足,特别是对于某些敏感体质或肝功轻度异常者。在黄药子的使用过程中,通过有效的药物配伍来制约其毒性,预防其毒性的发生实为治本之法。进一步探索抑毒、减毒药对,在有效控制毒性的情况下,充分发挥其良好的治疗作用,将是我们研究探索的方向。

参考文献:

- [1] 唐慎微.证类本草[M].北京:华夏出版社,1993.411.
- [2] 苏莉.亚急性黄药子中毒的实验病理学研究[J].法医学杂志,2003,19(2):81-83.
- [3] 宋崇顺.黄药子对肝肾毒性的初步实验[J].中药通报,1983,8(4):34-36.
- [4] 陈成伟,马洪年,傅青春.药物与中毒性肝病[M].上海:上海科学技术出版社,2002.7.