

# 虎金丸对 CCl<sub>4</sub> 所致实验性肝损伤的保护作用\*

黄兆胜 黎俏梅 王宗伟 刘明平 荣向路(广州中医药大学中药学院 广州 510407)

**摘要** 虎金丸 ig 小鼠,能显著降低 CCl<sub>4</sub> 所致血中 ALT、AST、GST 和肝中 MDA 水平的升高;虎金丸 ig 大鼠制得药物血清后,以 10%浓度加入原代培养大鼠肝细胞培养液中,能显著降低 10mmol/L CCl<sub>4</sub> 所致培养液中 ALT 和 MDA 的升高,并使细胞存活率由 55.90%提高至 82.45%。

**关键词** 虎金丸 CCl<sub>4</sub> 致毒 小鼠肝脏 大鼠肝细胞

## Protective Effect of Hujin Pills on CCl<sub>4</sub>-induced Experimental Liver Injury

Huang Zhaosheng, Li Qiaomei, Wang Zongwei, Liu Mingping, Rong Xianglu

(College of Chinese Material Medical, Guangzhou University of TCM, Guangzhou, 510407)

**Abstract:** After the mice were dosed with Hujin Pill for 6 days, the raised level of ALT, AST, GST in serum and MDA in liver caused by CCl<sub>4</sub> was ameliorated evidently. In addition, for primay cultured rat hepatocytes, rat serum containing Hujin Pills could remarkably decrease the raised level of ALT and MDA in the culture caused by 10 mmol/L CCl<sub>4</sub>, and the cell viability was improved from 55.90% to 82.45%.

**Key words:** hujin pills, CCl<sub>4</sub>-intoxicate, mouse liver, rat hepatocytes

虎金丸由虎杖、郁金、田七、泽泻、山楂、灵芝 6 味中药组成,是作者根据多年临床经验总结而得的复方,在临床主要用于脂肪肝的治疗。经对 63 例脂肪肝患者进行治疗,结果证明疗效显著,有效率达 94%,治愈率达 58%<sup>[1]</sup>。药效学实验表明虎金丸对脂肪肝大鼠有显著治疗作用<sup>[2]</sup>,对大鼠脂肪肝的组织形态及超微结构均有明显改善<sup>[3]</sup>。由于临床脂肪肝患者多同时伴见肝功能低下,因此我们对虎金丸的护肝作用也进行了研究,既往研究表明,方中作为质量控制指标的主要有效成分虎杖甙和大黄素对 CCl<sub>4</sub> 损伤原代培养大鼠肝细胞均有显著保护作用<sup>[4]</sup>。本文报道虎金丸对 CCl<sub>4</sub> 所致小鼠肝损伤的保护作用和虎金丸药物血清对 CCl<sub>4</sub> 所致大鼠肝细胞损伤的保护作用。

## 1 材料

**1.1 动物** NIH 小鼠 60 只,雌性,体重(20

±2)g。SD 大鼠,雄性,体重(150±10)g。均由广州中医药大学实验动物中心提供。

**1.2 试剂** II 型胶原酶(collagenase II)、羟乙基哌嗪乙硫磺酸(Hepes)、3-4,5-二甲基噻唑-2-yl-2,5-二苯基四唑溴盐(MTT)、胰岛素、地塞米松、青霉素、链霉素及 RPMI-1640 培养基均为 Sigma 产品。胎牛血清(FCS)为中国医学科学院血液病研究所产品,批号 97012。谷丙转氨酶(ALT)试剂盒,批号 970101,谷草转氨酶(AST)试剂盒,批号 970103,均为卫生部上海生物制品研究所产品。谷胱甘肽-S 转移酶(GST)试剂盒,批号 9612023,丙二醛(MDA)试剂盒,批号 9612018,均为南京建成生物工程研究所产品。

**1.3 药物** 联苯双酯滴丸,北京协和药厂产品,批号 960429。秋水仙碱为 Sigma 公司产品。虎金丸试液系按处方比例将各药材加水煎煮 3 次,过滤,浓缩为含生药 1g/ml,临用时以生理盐水调至所需浓度。

\* 国家中医药管理局资助课题 No97A06

## 2 方法和结果

### 2.1 虎金丸对 CCl<sub>4</sub> 诱发肝损伤小鼠的影响

**2.1.1 实验方法** 将小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 治疗组每天 ig 虎金丸溶液, 剂量分别为 10, 20g/kg, 阳性对照组 ig 联苯双酯, 剂量为 12mg/kg, 连续 6d。正常对照组和模型组每天 ig 等体积(20ml/kg)生理盐水。除对照组外, 其余各组于第 5d 给药后 1h, ip 1% CCl<sub>4</sub> 豆油溶液 10ml/kg, 并于中毒后 24h, 即末次给药后 1h, 眼眶取血, 测血清中 ALT, AST 和 GST 含量。小鼠处死, 立即取肝组织制取匀浆, 测 MDA 含量。

**2.1.2 实验结果** 表 1 表明, 与正常对照组相比, CCl<sub>4</sub> 模型组小鼠 ALT, AST 水平明显升高, 虎金丸 10, 20g/kg 均能显著降低 CCl<sub>4</sub> 所致两酶的升高, 高剂量组作用尤为显著。由表 2 可见, 模型组动物肝中 MDA 含量和血中 GST 水平与正常对照组相比明显升高, 均有极显著差异, 给以虎金丸治疗后则显著下降, 与模型组相比有显著差异。治疗组对上

表 1 虎金丸对小鼠血清 ALT 和 AST 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 g/kg	ALT(U)	AST(U)
正常对照		52.91 ± 3.44	115.33 ± 21.46
CCl <sub>4</sub> 模型		424.98 ± 13.35 <sup>#</sup>	280.51 ± 47.85 <sup>#</sup>
联苯双酯		253.35 ± 29.36 <sup>***</sup>	154.76 ± 45.91 <sup>***</sup>
虎金丸	10	358.86 ± 52.00 <sup>*ΔΔ</sup>	204.67 ± 40.32 <sup>**Δ</sup>
虎金丸	20	313.65 ± 26.05 <sup>**Δ</sup>	197.85 ± 37.18 <sup>**Δ</sup>

与 CCl<sub>4</sub> 组相比 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与正常组比<sup>#</sup>  $P < 0.001$ ; 与联苯双酯相比<sup>Δ</sup>  $P < 0.05$ , <sup>ΔΔ</sup>  $P < 0.01$ ,  $n = 10$ (下同)

表 2 虎金丸对小鼠肝 MDA 和血清 GST 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 g/kg	MDA(nmol/g)	GST(U/mL)
正常对照		195.87 ± 36.38	54.60 ± 17.48
CCl <sub>4</sub> 模型		304.92 ± 52.16 <sup>#</sup>	218.45 ± 33.17 <sup>#</sup>
联苯双酯		211.85 ± 50.09 <sup>***</sup>	116.42 ± 39.97 <sup>***</sup>
虎金丸	10	257.59 ± 41.95 <sup>*Δ</sup>	157.36 ± 32.54 <sup>**Δ</sup>
虎金丸	20	223.68 ± 48.23 <sup>**</sup>	138.79 ± 43.18 <sup>**</sup>

述指标的改善作用不如联苯双酯组明显。

### 2.2 虎金丸药物血清对 CCl<sub>4</sub> 损伤原代培养大鼠肝细胞的保护作用

**2.2.1 药物血清的制备** 虎金丸试液以 0.75g/100g 体重给大鼠灌胃, 24h 后加强 1 次, 1h 后无菌条件下取下腔静脉血, 离心, 分离血清备用。同法制备生理盐水对照血清。

**2.2.2 大鼠肝细胞的分离** 参照我室已建立的方法进行。

**2.2.3 肝细胞培养** 在 RPMI-1640 培养液中加入 10% FCS, 青霉素、链霉素 100U/ml, 胰岛素  $10^{-9}$ mol/L, 地塞米松  $10^{-9}$ mol/L, 用该培养液调整细胞浓度为  $4 \times 10^5$ /ml, 接种于 96 孔培养板(0.2ml/孔), 在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养, 4h 后更换培养液, 以后每隔 24h 更换 1 次。

**2.2.4 CCl<sub>4</sub> 致肝细胞急性损伤<sup>[5]</sup>和药物的添加** 细胞培养 24h 后, 换无 FCS 的 1640, 分别加 10% 药物血清、对照血清、对照血清 + 秋水仙碱。同时加入 CCl<sub>4</sub> 使终浓度至 10mmol/L, 于损伤 12h 后, 分别取培养液上清检测 ALT 和 MDA 活性。

**2.2.5 细胞活性和增殖活力的测定** 按文献<sup>[6]</sup>方法并加以改进, 于 CCl<sub>4</sub> 损伤 24h 后向培养板加入 5mg/ml MTT 溶液 20μl/孔, 共同孵育 4h 后加入二甲基亚砜(DMSO) 0.1ml/孔以终止反应及溶解黑色结晶, 自动酶标仪读数, 测定波长 595nm, 参考波长 630nm。细胞存活率 = (测定 OD 值/正常 OD 值) × 正常细胞存活率。

**2.2.6 结果** 由表 3 可见, 与正常肝细胞相比, CCl<sub>4</sub> 损伤肝细胞 ALT 值和 MDA 值均显著升高, 表明 CCl<sub>4</sub> 造成的肝细胞损伤模型成功; 加入虎金丸药物血清或秋水仙碱的损伤肝细胞与加入对照血清的损伤肝细胞相比, ALT 值和 MDA 值均显著下降, 且虎金丸效果优于秋水仙碱。由表 4 可见, 加入 CCl<sub>4</sub> 能使肝细胞存活率由 90.54% 降至 55.90%, 差异显著; 虎金丸药物血清能使存

活率提高至 82.45%，提示有保护作用；秋水仙碱也能使存活率提高至 65.90%，但无显著差异。

表 3 虎金丸药物血清对  $\text{CCl}_4$  损伤大鼠肝细胞培养上清液 ALT 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MDA/nmol · L <sup>-1</sup>	ALT 活性/U
正常肝细胞+对照血清	5.1 ± 0.6**	10.3 ± 2.1***
损伤肝细胞(无 FCS)	18.8 ± 2.6	50.0 ± 3.1
损伤肝细胞+对照血清	13.0 ± 3.3#	32.5 ± 2.3###
损伤肝细胞+药物血清	6.9 ± 2.7**	15.1 ± 3.5**
损伤肝细胞+对照血清+秋水仙碱	8.7 ± 2.8*	23.0 ± 4.9*

注：与不含血清的损伤肝细胞组比较 #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.01$ ；与加对照血清的损伤肝细胞比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  (下同)

表 4 虎金丸药物血清对肝细胞存活和增殖活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	OD 值	细胞存活率(%)
正常肝细胞+对照血清	1.55 ± 0.05**	90.54 ± 3.16**
损伤肝细胞(无 FCS)	0.82 ± 0.05	49.65 ± 3.05
损伤肝细胞+对照血清	0.96 ± 0.03###	55.90 ± 1.78###
损伤肝细胞+药物血清	1.40 ± 0.04**	82.45 ± 2.35**
损伤肝细胞+对照血清+秋水仙碱	1.13 ± 0.06*	65.90 ± 3.31*

### 3 讨论

ALT 目前仍被认为是反映肝脏受损或变性坏死的敏感指标,其绝大部分存在于细胞浆中。AST 则主要位于线粒体,少部分位于细胞浆。当肝脏轻度受损,细胞膜通透性开始增加时,胞浆内 ALT 和 AST 释放入血,而线粒体内 AST 则不释放,只有在肝细胞受损严重时才释放入血<sup>[7]</sup>。在本实验中, $\text{CCl}_4$  造成小鼠肝损伤后血中 ALT、AST 均显著升高,提示肝脏受损较为严重;给予虎金丸的治疗组和联苯双酯对照组动物血中 ALT、AST 水平均有显著降低,表明有护肝作用。虎金丸 2 个治疗组对上述指标的作用均不如

联苯双酯对照组明显,一方面可能由于剂量不够,另一方面可能由于该方主要用于治疗脂肪肝,护肝作用不如联苯双酯。在原代培养大鼠肝细胞损伤实验中, $\text{CCl}_4$  致毒 12h 后培养液中 ALT 活性明显上升,AST 则升高不明显(数据未显示),提示肝细胞受损较轻;加入虎金丸药物血清后 ALT 活性显著下降,表明对肝细胞损伤有保护作用。治疗组细胞存活率及对生化指标的改善作用均优于秋水仙碱组,提示其对肝细胞损伤的保护作用优于后者。两方面实验结果相结合,证实虎金丸对轻度和较重度肝损害均有保护作用。

肝微粒体细胞色素  $\text{P}_{450}$  在机体解毒过程中起关键作用,虎金丸是否对  $\text{P}_{450}$  产生影响从而发挥护肝作用,我们将进一步深入研究。

### 参考文献

- 1 黄兆胜,肖旭辉,钟仕卿,等.虎金丸治疗脂肪肝 63 例临床观察.实用中西医结合杂志,1997,10(21):2128
- 2 黄兆胜,王宗伟,刘明平,等.虎金丸抗脂肪肝的药效学研究.中成药,1998,20(5):27~28
- 3 黄兆胜,王宗伟,黄真炎,等.虎金丸抗脂肪肝的组织形态学研究和超微结构研究.中西医结合肝病杂志,1998,8(3):150
- 4 黄兆胜,王宗伟,刘明平,等.虎杖贰对  $\text{CCl}_4$  损伤原代培养大鼠肝细胞的保护作用.中国药理学通报,1998,14(6):543
- 5 Koji H, Rena K, Purusotam B, et al. Preventive effect of lithospermate B from *Salvia miltiorhiza* on experimental hepatitis induced by  $\text{CCl}_4$  or D-Gal/LPS. Plant Med, 1997, 16(3):22
- 6 郑永唐, 贲昆龙. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立. 免疫学杂志, 1992, 8(4):266
- 7 杨明, 孙红, 于德伟, 等. 复肝肽对动物实验性肝损伤的保护作用. 中国药理学通报, 1996, 12(3):268

(收稿:1998-03-31)