

黄根醇提物对小鼠实验性肝损伤保护作用的研究

邓家刚¹, 周程艳², 郑作文¹

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 华北煤炭医学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 以黄根醇提物为实验药物, 对其进行了最大耐受量试验(MTD)和小鼠实验性急性肝损伤的研究, 结果表明黄根醇提物最大耐受量为 2 080 g 生药/kg, 并能显著降低 CCL₄、D-GalN 所致的小鼠血清中 ALT、AST 升高($P < 0.01$); 亦能明显降低 BCG 和 LPS 致免疫性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 及肝组织中的 MDA 的水平($P < 0.01$), 增加肝组织中 SOD 的活性和 GSH 的水平($P < 0.01$)。该实验属首次报道。

关键词: 黄根; 急性毒性; 肝损伤

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)06-0941-03

Acute toxicity and protective effects of alcohol extract from *Prismatomeris tetrandra* on experimental liver injury in mice

DENG Jia-Gang¹, ZHOU Cheng-Yan², ZHENG Zuo-Wen¹

(1. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China; 2. North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

Abstract: Base on the acute toxicity of the alcohol extracted from *Prismatomeris tetrandra*, the protect effects on acute experimental liver injury in mice were studied. The MTD of the alcohol extract from *P. tetrandra* is 2 080 g drogen/kg. The alcohol extract from *P. tetrandra* can remarkable decrease ALT, AST in serum on acute liver injury induced by CCL₄ and D-GalN($P < 0.01$), and effect of the low dosage is the best. It can also obvious decrease ALT, AST activities in serum and MDA levels in liver tissue($P < 0.01$); improve SOD activities and GSH levels in liver tissue on immunological liver injury($P < 0.01$). These experiments of the article are the first report for *P. tetrandra*.

Key words: *Prismatomeris tetrandra*; acute toxicity; liver injury

黄根, 为茜草科植物三角瓣花(*Prismatomeris tetrandra*)的根, 性微苦, 味凉, 具有软坚散结、凉血止血、祛瘀生新、强壮筋骨和利湿退黄等功效, 广西民间多用以治疗慢性肝炎(广西壮族自治区卫生局, 1974; 合山矿务局疗养院, 1977)。本文对黄根醇提物急性毒性实验进行了研究, 并采用四氯化碳(CCL₄)、D-氨基半乳糖(D-GalN)、卡介苗(BCG)和大肠杆菌脂多糖(LPS)造成小鼠实验性肝损伤, 来探讨黄根醇提物对肝组织的保护作用。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 18~22 g。由广西医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK 桂 2003-0003。

1.2 药品

丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶

收稿日期: 2006-06-27 修回日期: 2007-08-21

基金项目: 广西科技攻关项目(0235023-1, 0630006-5A)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi(0235023-1, 0630006-5A)]

作者简介: 邓家刚(1953-), 广西合浦人, 教授, 博士生导师, 主要研究中药基础理论与药效研究, (E-mail): jgdeng@gxtcmu.edu.cn.

(AST)试剂盒(批号 20060120,20060720),超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(批号 20060410),丙二醛(MDA)测试盒(批号 20060515),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)测试盒和考马斯亮兰蛋白测定试剂盒(批号 20060620),以上试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。联苯双酯,为北京协和药厂产品,批号 0503026。四氯化碳(CCl_4 ,分析纯),重庆川江化学试剂厂产品,批号 20050426,实验时用花生油配成 0.08% CCl_4 溶液。D-氨基半乳糖(D-GalN),为 Sigma 公司产品,实验时用生理盐水配制成 5%(500 mg/kg)的溶液,并用 1 mol/L 的氢氧化钠溶液调其 pH 值为 7。卡介苗(BCG),为中国生物技术集团公司上海生物制品研究所产品,批号 2005030902。大肠杆菌脂多糖(LPS),为 Sigma 公司产品。

1.3 黄根

黄根,由广西中医学院医药会展中心从南宁当地购进,经广西中医学院药用植物教研室韦松基教授鉴定为茜草科三角瓣花的根。

1.4 仪器

Biofuge strutos 型高速低温离心机(Kendro Laboratory products)。JY92-2D 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所)。YKH-I 型液体快速混合器(江西医疗器械厂)。Agilent8453 紫外分光光度计。ZFQ-85A 型旋转蒸发仪(上海安亭电子仪器厂)。

2 方法(徐淑云等,2002)

2.1 黄根醇提物的制备

将黄根粉碎成粗粉,用乙醇加热回流提取 2 次,合并提取液,滤过,浓缩至无醇味,加水稀释致所需浓度,于 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 对小鼠急性毒性的实验研究

经反复预试,因其毒性较低,一次灌喂给药(ig)无法测出其 LD_{50} ,故改做小鼠最大耐受量试验(MTD)。取小鼠 40 只(♀♂各半),给药容量为 0.4 mL/10g/次。禁食不禁水,12 h 后灌胃给药,间隔 6 h 一次,共 2 次,使其日累积剂量达到 2 080 g 生药/kg。给药后让小鼠自由摄食及饮水,并观察小鼠的死亡、行为活动、皮毛、呼吸、大小便、食欲及摄食量、饮水、体重、鼻、眼、口腔有无异常分泌物等情况,每天上、下午各观察 1 次,连续 7 d。给药后第 8 天处死小鼠,观察内脏器官的变化情况。

2.3 对 CCl_4 致小鼠肝损伤的影响

小鼠 60 只,雌雄各半,随机分为 6 组,每组 10 只,即正常组、模型组、阳性组、高剂量组、中剂量组、低剂量组。各组每天 1 g,给药容量为 20 mL/kg/d,连续 10 d。正常组和模型组给予蒸馏水,阳性组给予联苯双酯 0.6 g/kg,高、中、低剂量组分别给予黄根醇提液 16、8、4 g 生药/kg。末次给药后禁食不禁水,8 h 后,除正常组外,其余各组均腹腔注射(ip) 0.08% CCl_4 花生油溶液 0.1 mL/10g,12 h 后眼球取血,分离血清,检测 ALT、AST 的活性。

2.4 对 D-GalN 致小鼠肝损伤的影响

分组及给药方法同 2.2。末次给药后禁食不禁水,8 h 后,除正常组外,其余各组均 ip 5% D-GalN 0.1 mL/10g,16 h 后眼球取血,分离血清,检测 ALT、AST 的活性。

2.5 对 BCG 和 LPS 致小鼠免疫性肝损伤的影响

分组及给药方法同 2.2。首次给药前,除正常组外,其余 5 组每只小鼠尾静脉注射(i.v)BCG(BCG,5 人份 11 安瓿配至 22 mL)0.2 mL/只,注射完 BCG 后 2 h 开始灌胃给药。第 10 天,末次给药后 1 h,再尾 i.v LPS 溶液 4 μg /只(0.2 mL/只)。并于注射 LPS 10 h 后取血,离心分离血清,检测血清 ALT、AST 的活性。取肝组织制备 10%肝匀浆,离心后取上清液,检测肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)的活性,丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)的水平。

2.6 数据处理

各组实验数据均以表示,采用统计软件 SPSS13.0 进行组间 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠急性毒性的实验结果

小鼠反应情况见表 1。小鼠经受试药物 2 次灌胃后,活动正常,未见明显毒性反应;7 d 内小鼠活动自如,行为、精神状态正常,毛色光亮,摄食饮水情况良好,无震颤、扭体及翘尾;鼻、眼、口腔无异常分泌物,未出现其他不良反应和死亡情况。7 d 后断颈处死,经解剖和尸检未发现内脏器官异常。结果提示:黄根醇提物 MTD 为 2 080 g 生药/kg,相当于成人(50 kg)临床用量(0.6 g 生药/kg)的 3 466 倍。

3.2 对 CCl_4 致小鼠肝损伤的影响

结果见表 2。黄根醇提物能显著对抗 CCl_4 导致的小鼠急性肝损伤血清中 ALT、AST 升高(与模

表 1 黄根醇提取物最大耐受量试验小鼠反应情况

Table 1 Maximum tolerated dose(MTD)of the alcohol extract from *Prismatomeris tetrandra* in mice (n=10)

组别 Group	性别 Sex	四肢活动 Limbs	体毛 Body hair	饮水 Drinking water	摄食 Food	粪便 Excrement	尿液 Urine	分泌物 Secreta	呼吸 Breath	死亡 Die
对照组 Control	雄 Male	—	—	—	—	—	—	—	—	0
	雌 Fmale	—	—	—	—	—	—	—	—	0
实验组 Experimental	雄 Male	—	—	—	—	—	—	—	—	0
	雌 Fmale	—	—	—	—	—	—	—	—	0

注：“—”代表正常 Note：“—”represent normal

型组比较 $P < 0.01$), 且各剂量组呈现较好的剂量相关性, 低剂量组效果最好。结果提示: 黄根醇提取物对 CCL_4 导致的小鼠急性肝损伤有显著的保护作用。

表 2 对 CCL_4 致小鼠肝损伤血清中 ALT、AST 活性的影响
Table 2 Effect of the alcohol extract from *P. tetrandra* on ALT,AST activities in serum of liver-injured mice induced by CCL_4 (n=10)

组别 Group	剂量 Dosage (g · kg ⁻¹)	丙氨酸转氨酶 ALT(U · L ⁻¹)	天冬氨酸转氨酶 AST(U · L ⁻¹)
正常组 Control	—	48.97 ± 5.34	47.48 ± 2.78
模型对照组 Model	—	135.50 ± 20.83**	106.73 ± 3.73**
阳性组 Solvent	0.6	64.64 ± 6.12▲▲	56.69 ± 3.25▲▲
高剂量组 High	16	83.61 ± 14.43▲▲	79.62 ± 3.45▲▲
中剂量组 Medium	8	81.91 ± 7.39▲▲	74.78 ± 2.60▲▲
低剂量组 Low	4	68.62 ± 11.04▲▲	67.04 ± 8.47▲▲

与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ▲▲ $P < 0.01$ 。下同。
** $P < 0.01$ vs normal control group; ▲▲ $P < 0.01$ vs model group. The same as follows.

表 4 对 BCG+LPS 致小鼠肝损伤血清中 ALT、AST 及肝组织中 SOD 活性的影响和肝组织中 MDA、GSH 水平的影响 (n=10)

Table 4 Effect of the alcohol extract from *P. tetrandra* on ALT,AST activities in serum and SOD activities and MDA,GSH levels in liver tissue of liver-injured mice induced by BCG and LPS

组别 Group	剂量 Dosage(g · kg ⁻¹)	丙氨酸转氨酶 ALT(U · L ⁻¹)	天冬氨酸转氨酶 AST(U · L ⁻¹)	超氧化物歧化酶 SOD(U · g ⁻¹)	丙二醛 MDA(nmol · g ⁻¹)	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH(μg · g ⁻¹)
正常组 Control	—	43.42 ± 2.50	47.48 ± 2.78	106.69 ± 6.37	12.13 ± 1.11	200.37 ± 16.22
模型对照组 Model	—	130.20 ± 5.75**	106.73 ± 3.73**	55.29 ± 5.90**	34.34 ± 2.15**	83.65 ± 13.70**
阳性组 Solvent	0.6	47.42 ± 2.60▲▲	56.69 ± 3.25▲▲	110.12 ± 7.53▲▲	14.92 ± 1.60▲▲	138.95 ± 16.00▲▲
高剂量组 High	16	53.03 ± 5.04▲▲	79.43 ± 6.87▲▲	93.81 ± 3.69▲▲	18.43 ± 1.70▲▲	152.55 ± 14.81▲▲
中剂量组 Medium	8	56.74 ± 10.91▲▲	79.62 ± 3.45▲▲	98.62 ± 4.49▲▲	14.28 ± 1.54▲▲	147.300 ± 12.84▲▲
低剂量组 Low	4	45.26 ± 2.80▲▲	74.78 ± 2.60▲▲	107.14 ± 3.31▲▲	11.62 ± 2.24▲▲	151.92 ± 12.62▲▲

3.4 对 BCG 和 LPS 致小鼠免疫性肝损伤的影响

结果见表 4, 表明黄根醇提取物能明显对抗 BCG 和 LPS 导致的小鼠免疫性肝损伤血清中 ALT、AST 和肝组织中 MDA 的升高(与模型组比较 $P < 0.01$), 而肝组织中的 SOD 的活力和 GSH 的水平亦能够明显增强(与模型组比较 $P < 0.01$)。结果提示: 黄根醇提取物对 BCG 和 LPS 致小鼠免疫性肝损伤具有明显的保护作用。

表 3 对 D-GalN 致小鼠肝损伤血清中 ALT、AST 活性的影响
Table 3 Effect of the alcohol extract from *P. tetrandra* on ALT,AST activities in serum of liver-injured mice induced by D-GalN (n=10)

组别 Group	剂量 Dosage (g · kg ⁻¹)	丙氨酸转氨酶 ALT(U · L ⁻¹)	天冬氨酸转氨酶 AST(U · L ⁻¹)
正常组 Control	—	26.14 ± 3.97	36.78 ± 2.60
模型对照组 Model	—	149.79 ± 9.85**	108.50 ± 7.67**
阳性组 Solvent	0.6	49.32 ± 17.29▲▲	53.40 ± 7.81▲▲
高剂量组 High	16	125.24 ± 19.24▲▲	65.27 ± 8.82▲▲
中剂量组 Medium	8	101.22 ± 26.36▲▲	62.74 ± 14.01▲▲
低剂量组 Low	4	80.03 ± 18.30▲▲	52.40 ± 8.06▲▲

3.3 对 D-GalN 致小鼠肝损伤的影响

结果见表 3。与模型组比较黄根醇提取物可显著降低血清中 ALT、AST 的活性(与模型组比较 $P < 0.01$), 低剂量组效果最佳。结果提示: 黄根醇提取物能显著抑制 D-GalN 对肝组织的影响。

4 讨论

(1)黄根醇提取物小鼠最大耐受量测定结果表明, 各项观察指标在给药组与对照组之间无显著差异, 且未见毒性反应, 故该药的小鼠 1 日最大耐受量为 2 080 g 生药/kg, 该药在此剂量范围内使用是安全、(下转第 960 页 Continue on page 960)

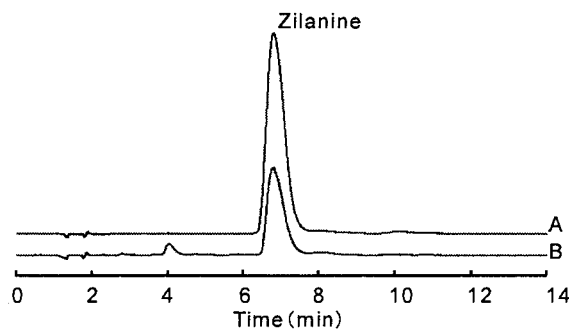


图 1 红丝线提取物中紫蓝素的 HPLC 分析
Fig. 1 HPLC analysis of zilanine in extract
of *Peristrophe baphica*

A. 紫蓝素; B. 红丝线提取物。
A. Zilanine; B. Extract of *P. baphica*.

表 2 红丝线提取物中紫蓝素的含量测定结果
Table 2 Content of zilanine in extract of
Peristrophe baphica (n=3)

批号 No.	紫蓝素含量 Content of zilanine (%)	RSD (%)
050601	86.8	0.42
050602	89.6	0.23
050701	97.9	0.78
050702	93.4	0.33
050801	93.6	0.56
050802	99.4	0.98
050901	88.5	0.67
050902	96.6	0.29

剂系统作为流动相对样品进行分析,结果最佳的流动相为(75 mmol/L 乙酸铵+0.5 mmol/L EGTA)一乙腈(92:8),样品峰与杂质峰分离度好,专属性强,保留时间合适,峰形尖锐,对称性好。

4.2 检测波长的选择

本试验用二极管阵列检测器对紫蓝素色谱峰在 200~600 nm 范围内进行光谱扫描,在波长 250 nm 及 590 nm 处有最大吸收,但波长 590 nm 处响应值比波长 250 nm 处的响应值大,在 590 nm 处杂质峰少,故选择 590 nm 作为检测波长。

参考文献:

- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 2002. 中国植物志(第 70 卷)[M]. 北京:科学出版社:241
- 谢运昌,蒋小华,文永新,等. 2005. 紫蓝素化合物、其制备方法及其用途[P]. 中国专利 CN03117188.5,北京:知识产权出版社
- Lü JH(吕俊华), Yu CR(玉从容), Yang WZ(杨文忠), et al. 2004. Influence of extract of *Peristrophe roxburghiana* on blood pressure and blood rheology in renal hypertensive rats (RHR)(红丝线草提取物对肾性高血压大鼠血压和血液流变学的影响)[J]. *Shanxi Med J*(陕西医学杂志), 33(345): 209-212
- Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. 1997. Practical HPLC Method Development[M]. 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc
- Wen YX(文永新), Xie YC(谢运昌), Jiang XH(蒋小华), et al. 2003. The comparison of four methods for processing *Peristrophe baphica*(四种山蓝加工方法的比较)[J]. *Guizhou*(广西植物), 23(5): 453-456

(上接第 943 页 Continue from page 943)

无毒的。(2)肝损伤实验研究表明,黄根醇提物对实验性小鼠肝损伤有显著的保护作用。在各肝损伤实验中有低剂量组较好的趋势,分析其原有二:①黄根含有一定量的蒽醌类化合物,而蒽醌类化合物有致泻的作用,在实验中高剂量组含有的蒽醌类化合物要高于低剂量组,因此致泻的作用也就要强于低剂量组,结果导致高剂量组药物吸收减少。而低剂量组因含有较少的蒽醌类化合物,致泻的作用就明显减轻,反而低剂量组吸收程度要比高剂量组好,因此出现了高剂量组药效低于低剂量组的情况。②同时在以前的一些实验中也曾经报道过黄根具有轻

微的毒性,这对药效也有一定的影响(甘荔等,1986)。

参考文献:

- 广西壮族自治区卫生局. 1974. 广西本草选编[M]. 南宁:广西人民出版社:1790-1791
- 合山矿务局疗养院. 1977. 黄根合剂治疗矽肺 57 例疗效观察[J]. *广西医学*, 8(4): 27
- 徐淑云,卞如廉,陈修,等. 2002. 药理实验方法学[M]. 第 3 版. 人民卫生出版社:1346-1347
- 甘荔,韦玉忠,刘敬东,等. 1986. 黄根抑制肝纤维化的病理形态学观察[J]. *中草药*, 17(11): 24