

养肝利胆颗粒对小鼠四氯化碳肝损伤的保护作用

尤圣富¹, 郑培永¹, 季光¹, 魏华凤¹, 赵婕¹, 朱培庭²

(1. 上海中医药大学龙华医院科研实验中心, 上海 200032; 2. 上海中医药大学中医外科研究所, 上海 200032)

[摘要] 目的: 观察养肝利胆颗粒对小鼠四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)肝损伤的影响, 并探讨其作用机制。方法: 采用腹腔注射 CCl₄ 制作小鼠慢性肝损伤模型。造模 3 周后分别予以养肝利胆颗粒小、中、大剂量, 胆宁片及联苯双酯治疗 4 周, 检测各组血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST), 肝组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。结果: 养肝利胆颗粒可显著降低小鼠 CCl₄ 肝损伤模型血清 ALT、AST 的水平和肝组织 MDA 的含量, 明显升高肝组织 SOD 的水平。结论: 养肝利胆颗粒对 CCl₄ 所致小鼠肝损伤有明显的改善作用, 其作用机制可能与减轻肝内脂质过氧化反应有关。

[关键词] 养肝利胆颗粒; 四氯化碳; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

[中图分类号] R286.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2005)06-0470-03

Protective effects of Yanggan Lidan Granules on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice

YOU Sheng-Fu¹, ZHENG Pei-Yong¹, JI Guang¹, WEI Hua-Feng¹, ZHAO Jie¹, ZHU Pei-Ting²

(1. Center of Scientific Research, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. Institute of Chinese Traditional Surgery, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the protective effects of Yanggan Lidan Granules (YGLDG) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver damage in mice and to find out its mechanism. Methods: A model of chronic liver damage was established in mice by intraperitoneal injection of CCl₄. After three weeks, those model mice were treated with low-, medium-, high-dose YGLDG, Danning Tablets and bifendate respectively for four weeks. Then the levels of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), as well as the contents of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in liver tissues were detected. Results: YGLDG could significantly reduce the levels of serum ALT and AST in model mice, and the content of MDA was obviously decreased while the content of SOD was increased in liver tissue. Conclusion: The therapeutic effect of YGLDG on mice with CCl₄-induced liver damage is to relieve the seriousness of liver damage, and its mechanism may relate to reducing peroxidation activity in liver tissue.

KEY WORDS Yanggan Lidan Granules; carbon tetrachloride; superoxide dismutase; malondialdehyde

J Chin Integr Med, 2005, 3(6): 470-472

目前,具有保肝、抗肝损伤作用的中药有效成分或复方,如甘草甜素、联苯双酯、当飞利肝宁和黄芪注射液等虽在临床上被广泛应用,但经国际认可的该类药物均非源自我国^[1]。养肝利胆颗粒

(Yanggan Lidan Granules, YGLDG)具有养肝柔肝、利胆止痛的功效,临床上治疗慢性胆道感染(慢性胆囊炎、慢性胆管炎)证属肝阴不足者有一定的疗效。我们观察了养肝利胆颗粒对小鼠四氯化碳

[基金项目] 上海市科学技术发展基金项目中药现代化专项资助项目(No. 014319304); 上海市重点学科中医外科资助项目(No. 01ZX004)

[作者简介] 尤圣富(1977-), 男, 助理研究员。

Correspondence to: Prof. ZHU Pei-Ting. E-mail: crecie@163.com

(carbon tetrachloride, CCl₄)慢性肝损伤的保护作用,以期为临床用药提供依据并对其作用机制作进一步的探讨。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 (1)养肝利胆颗粒(干膏粉),主要成分:白芍、枸杞子、甘草等,四川美大康药业股份有限公司提供,批号 020301,每克干膏粉相当于4 g 生药;(2)胆宁片(Danning Tablets, DNT),主要成分:人工牛黄、水飞蓟素、盐酸小檗碱、延胡索、大黄、蒲公英、金钱草、薄荷油等,250 mg/片,上海中药制药一厂生产,批号 000715;(3)联苯双酯片,25 mg/片,上海市医药股份有限公司天平制药厂生产,批号 248004;(4)CCl₄,分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司生产,批号 W20021218;(5)橄榄油,化学纯,中国医药集团上海化学试剂公司生产,批号 F20020819;(6)超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒,南京建成生物工程研究所提供,批号均为 20030809;(7)考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所提供,批号 20030814。

1.2 动物 昆明种雄性小鼠,体质量 18~22 g,上海中医药大学实验动物中心提供,合格证号:医动字 02-24-3 号。

1.3 实验方法

1.3.1 药物配制 (1)用蒸馏水溶解养肝利胆干膏粉,配制成小剂量(含 0.18 g 生药/ml)、中剂量(含 0.36 g 生药/ml)及大剂量(含 0.72 g 生药/ml)混悬液。(2)用蒸馏水溶解胆宁片,配制成浓度为 0.11 g/ml 的混悬液。(3)用蒸馏水溶解联苯双酯片,配制成浓度为 2.5mg/ml 的混悬液。(4)用橄榄油溶解 CCl₄,配制成 7% (体积比)CCl₄ 溶液。

1.3.2 动物分组和造模 77 只小鼠随机分为正常组,模型组, YGLDG 小、中、大剂量组,胆宁片组和联苯双酯组,每组 11 只。采用 CCl₄ 注射致小鼠肝损伤模型。正常组小鼠予以腹腔注射生理盐水,其

余各组均予以腹腔注射 7% CCl₄ 溶液,10 ml/kg, 1 周 2 次,连续 7 周。造模期间不限饮食量,自由饮水。造模第 3 周末,小鼠禁食不禁水 16 h,摘眼球取血后随机处死每组各 2 只小鼠,测定血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT),取肝组织作 HE 染色,行病理学检查,结果显示造模成功(造模小鼠血清 ALT 较正常组升高近 10 倍,病理结果显示造模小鼠肝小叶外围有多层次肝细胞坏死伴炎细胞浸润)。

1.3.3 药物处理 造模第 4 周起, YGLDG 小、中、大剂量组分别予以 0.18、0.36、0.72 g/ml 的养肝利胆混悬液灌胃,胆宁片组予以 0.11 g/ml 的胆宁片混悬液灌胃,联苯双酯组予以 2.5mg/ml 的联苯双酯混悬液灌胃,每组均按 10 ml/kg 给药,1 次/d,连续 4 周。正常组和模型组则以等量生理盐水灌胃,1 次/d,连续 4 周。

1.3.4 标本采集和指标测定 末次给药或生理盐水后,小鼠禁食不禁水 16 h,摘眼球取血,3 000 r/min 离心 15 min,取血清检测 ALT 和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST);取肝组织用冷生理盐水制成 10% 肝匀浆,检测肝组织总蛋白(考马斯亮蓝法)、SOD(黄嘌呤氧化酶法)和 MDA(硫代巴比妥酸比色法)的含量。

1.4 统计学方法 所有实验数据均用 SPSS 统计软件进行分析,计量资料均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 对小鼠血清 ALT 和 AST 的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 ALT 和 AST 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, YGLDG 大、中、小剂量组血清 ALT 和 AST 水平均明显降低,大剂量组的效应尤其明显 ($P < 0.01$);联苯双酯组血清 ALT 和 AST 水平亦明显下降 ($P < 0.01$)。提示养肝利胆颗粒对小鼠 CCl₄ 肝损伤模型血清 ALT 和 AST 水平升高有明显的拮抗作用。见表 1。

表 1 各组小鼠血清 ALT、AST 及肝组织 SOD、MDA

Tab 1 Serum ALT, AST and SOD, MDA in liver tissues of mice in different groups

Group	<i>n</i>	ALT	AST	SOD	MDA
Normal	9	26.11 ± 6.31	54.00 ± 5.15	163.82 ± 26.37	0.31 ± 0.20
Untreated	9	421.22 ± 90.92 ^{**}	510.00 ± 92.65 ^{**}	129.61 ± 24.66 [*]	0.84 ± 0.24 ^{**}
Low-dose YGLDG-treated	9	240.22 ± 52.97	357.00 ± 104.99	148.03 ± 24.91	0.50 ± 0.23
Medium-dose YGLDG-treated	9	249.22 ± 51.27	424.89 ± 94.18	152.32 ± 29.44	0.58 ± 0.18
High-dose YGLDG-treated	9	246.11 ± 90.09	325.56 ± 87.12	158.67 ± 18.70	0.60 ± 0.17
DNT-treated	9	370.22 ± 80.57	507.56 ± 77.08	221.06 ± 98.01	0.90 ± 0.51
Bifendate-treated	9	31.00 ± 10.26	79.33 ± 20.44	158.21 ± 41.13	0.47 ± 0.10

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs normal group; $P < 0.05$, $P < 0.01$, vs untreated group

2.2 对小鼠肝组织 SOD 和 MDA 的影响 与正常组比较,模型组小鼠肝组织 SOD 明显下降 ($P < 0.05$),MDA 明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,YGLDG 大、中剂量组肝组织 SOD 水平均有明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),联苯双酯组 SOD 水平亦有明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,YGLDG 大、中、小剂量组肝组织 MDA 水平均有明显降低 ($P < 0.05$),联苯双酯组 MDA 水平亦有明显下降 ($P < 0.01$)。提示养肝利胆颗粒具有显著的抗脂质过氧化作用。见表 1。

3 讨论

在正常情况下,生物体内活性氧自由基的产生和清除维持在一定水平,过多或过少均会给机体造成损害^[2]。自由基与脂质过氧化物极易对肝脏造成损害。CCl₄ 在体内对肝脏的亲合力很强,在肝细胞内质网中经细胞色素 P450 依赖性混合功能氧化酶的代谢,生成三氯甲烷自由基、二氯甲烷自由基和过氧化三氯甲烷自由基,可与细胞膜大分子共价结合,使酶的功能丧失,细胞膜发生脂质过氧化,破坏肝细胞膜的结构和功能完整,使蛋白质合成障碍;并通过抑制细胞膜上 Ca²⁺ 泵的活性,使 Ca²⁺ 离子大量内流,导致肝细胞损伤,从而使胞浆内转氨酶渗入血液中^[3,4]。本实验证实,CCl₄ 可使小鼠血清 ALT 和 AST 活性明显上升,肝组织 SOD 水平明显下降伴 MDA 含量明显升高。

养肝利胆颗粒具有养肝柔肝、利胆止痛之功,主治慢性胆道感染(慢性胆囊炎、慢性胆管炎)证属肝阴不足者。方中白芍养血柔肝、缓中止痛,为君药。《药品化义》云:“白芍药味苦能补阴,略酸能收敛,因酸走肝,暂用之生肝,肝性欲散恶敛,又取酸以抑肝,故谓白芍能补复能泻……以此泻肝之邪,而缓中焦脾气,《难经》所谓损其肝者,缓其中。”现代药理学研究显示,白芍中的白芍总苷有诱生干扰素的作用,对小鼠的免疫应答具有调节作用^[5];白芍醇提取物对大鼠甲醛性急性炎症及棉球肉芽肿等几种炎症模型均有显著的抑制作用。方中枸杞子性味甘、平,有滋补肝肾、益精明目之功,主要有效成分为甜菜碱。有研究报道:CCl₄ 引起小鼠急性肝损伤 24 h 后,经口服或腹腔内给予甜菜碱,可使血清 ALT 下降,溴脱氧鸟苷掺入肝细胞核 DNA 的量增加^[6]。甜菜碱对

CCl₄ 所致小鼠肝细胞内脂肪沉积有轻微的抑制作用,并可促进肝细胞再生。本实验中,养肝利胆颗粒具有降低 CCl₄ 所致肝损伤小鼠血清 ALT、AST 水平,降低肝组织 MDA 含量以及升高 SOD 活性的作用。提示养肝利胆颗粒对小鼠 CCl₄ 肝损伤的改善作用,可能与抗脂质过氧化有关。

本实验中设立了中药与西药阳性对照组,确保实验设计的科学性、合理性。联苯双酯的降酶作用是公认的,但在临床上应用有其局限性,该药本身不能针对病因治疗,即治标不治本,停药后肝功能极易反跳,因而有研究中药保肝作用的必要。中药胆宁片具有疏肝利胆、清热通下的功用,主治肝郁气滞型的慢性胆囊炎,胆囊结石、慢性胆管炎、胆总管结石、肝胆管结石、术后胆管结石,属湿热未清者。胆宁片设为阳性对照药,一方面该药是朱培庭教授多年临床经验心得,其保肝作用是确切的,另一方面也从不同中医治法的保肝作用做个比较。从实验结果看胆宁片降酶作用不明显,因本实验在给药同时还继续造模,可能是胆宁片剂量起效浓度未完全达到造成的;养肝利胆颗粒三个剂量组的剂量依赖性效应不明显,可能在低剂量时该药已起效,因在给药同时还继续造模,可能造成起效之后有一个平台期,这在以后的研究中可以在此基础上做量效关系的观察。

[参考文献]

- 1 刘平.理论联系实际,基础结合临床,促进中西医结合肝病学科发展[J].中西医结合学报,2003,1(2):81-83.
- 2 陈瑗,周玫.自由基医学[M].北京:人民军医出版社,1991.283-286.
- 3 刘春宇,顾振纶,韩蓉,等.沙苑子提取物对小鼠四氯化碳肝损伤的保护作用[J].中草药,2002,33(12):1104-1106.
- 4 刘建文主编.药理实验方法学——新技术与新方法[M].北京:化学工业出版社,2003.168.
- 5 王本祥主编.现代中药药理学[M].天津:天津科学技术出版社,1997.589,1290,1295,1572.
- 6 黄琼,黄俊明,陈瑞仪,等.大豆、枸杞子、山楂复合提取物对小鼠化学性肝损伤的保护作用[J].营养学报,2003,25(2):208-211.

[收稿日期] 2005-04-19 [本文编辑] 黄文华 周庆辉