

# 甘草类黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的影响

王根生\* 韩哲武

(内蒙古医学院药理教研室, 呼和浩特 010059)

**提要** 甘草类黄酮(GF)是从甘草根中提得。本文结果表明, 预先 ig GF 200, 400, 600 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> × 2d 能显著降低 CCl<sub>4</sub> 所致血清谷丙转氨酶、乳酸脱氢酶活性的升高以及肝内丙二醛含量的增加, 其作用呈剂量依赖性。GF 可减轻 CCl<sub>4</sub> 所致的肝脏坏死, 但对血清内酶的活性没有抑制作用, 也不减少正常小鼠血清中酶的活性。GF 的肝保护作用可能与其抗脂质过氧化作用有关。

**关键词** 甘草类黄酮; 四氯化碳; 肝功能; 脂质过氧化

甘草有清热解毒功用, 其主要成分为甘草酸及黄酮类化合物(Glycyrrhiza flavonoids, GF)。近年研究发现甘草及其有效成分有抗氧化作用。已知人体内自由基、脂质过氧化反应是某些药物或毒物产生肝损伤的病理生化基础<sup>(6)</sup>。鉴于 CCl<sub>4</sub> 所致的肝损伤是通过自由基而起作用, 故本文研究了 GF 对 CCl<sub>4</sub> 肝损伤的影响, 并对其作用机理作了初步探讨。

## 材 料 和 方 法

**试剂和药品** 甘草类黄酮由内蒙古自治区药品检定所李仁主任药师馈赠, 为棕黄色粉末, 脂溶, 薄层层析鉴定主要含甘草黄酮甙、甘草异黄酮甙及二者的甙元等黄酮类化合物。该品小鼠 po LD<sub>50</sub> > 800 mg · kg<sup>-1</sup>。用前以 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC)制成混悬液, 置 0~4℃ 备用。CCl<sub>4</sub> 系齐齐哈尔市化学试剂厂产品, 分析纯。用前以花生油制成 0.1% 溶液备用。谷丙转氨酶试剂盒(酶法)为北京化工厂临床试剂分厂产品。硫代巴比妥酸(TBA)为上海试剂二厂产品。1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷和 5, 5'-二硫代-双-(2-硝基苯甲酸)[DTNB]均为 Fluka 公司产品。α-Tocopherol(V<sub>E</sub>)为 Merck 药厂产品。丙酮酸为 Sigma 公司产品。实验用其它试剂均为国产分析纯。

**动物** 雄性昆明种小鼠, 购自内蒙古大学实验动物中心。体重 25.2 ± 2.6 g。实验时按体重均衡法随机分组。

**血清谷丙转氨酶(GPT)及乳酸脱氢酶(LDH)活性测定** 以眶动静脉取血法采集血样, 分离血清。取血清适量, 置入反应池(恒温 30℃)按文献(7)和(8)的方法分别测定 GPT 和 LDH 的活性。

**光学显微镜检查** 断头处死小鼠, 剖腹取肝, 常规固定, 制片, HE 染色。根据肝细胞坏死的程度及范围分为 5 级: (-) 肝细胞无坏死; (±) 点状坏死灶, 分布于中央静脉周围; (+) 散在灶状坏死区, 限于肝小叶内 1/4; (++) 弥漫性坏死灶, 限于肝小叶内 1/2; (+++) 弥漫性坏死灶, 超过肝小叶内 1/2。

本文于 1992 年 10 月 26 日收到。

\* 现在通讯地址: 北京先农坛街 1 号, 中国医学科学院药物研究所 100050

肝匀浆内丙二醛(MDA)及还原性谷胱甘肽(GSH)含量的测定 MDA和GSH含量的测定分别按TBA法<sup>(9)</sup>和DTNB显色法<sup>(10)</sup>进行。

## 结 果

### GF对CCl<sub>4</sub>中毒小鼠血清GPT及LDH活性的影响

实验分组如表1所示,GF处理4组分别于采血前48h及60h ig GF 200、400、600 mg·kg<sup>-1</sup>各一次;V<sub>E</sub>处理组 ig V<sub>E</sub> 400 mg·kg<sup>-1</sup>,给药时间同GF各组;其余二组 ig 等体积0.5% CMC。于末次给药后24h,GF组、CCl<sub>4</sub>处理各组 and V<sub>E</sub>阳性对照组均 ip CCl<sub>4</sub> 10 μl·kg<sup>-1</sup>。各组小鼠均于采血前禁食12h。ip CCl<sub>4</sub>后24h,同时采集各组小鼠血样,测定GPT及LDH活性;取肝测湿重。结果如表1所示,GF显著降低CCl<sub>4</sub>中毒小鼠血清GPT及LDH活性;GF的降酶作用呈剂量依赖性,但肝重无明显变化。GF的降酶作用是同等剂量V<sub>E</sub>的1/2。正常小鼠 ig GF后,血清GPT及LDH活性没有明显变化。

Tab 1 Effects of GF treatment on the carbon tetrachloride-induced increases of serum GPT and LDH activities in mice ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	Treatment			Serum enzyme activities	
		GF (mg·kg <sup>-1</sup> )	V <sub>E</sub>	CCl <sub>4</sub> (μl·kg <sup>-1</sup> )	GPT	LDH (U/L)
Normal	10	—	—	—	47±8	341±33
GF	10	400×2	—	—	43±8	330±42
CCl <sub>4</sub>	10	—	—	10	423±48	579±76
GF+CCl <sub>4</sub>	8	200×2	—	10	405±88	539±48
GF+CCl <sub>4</sub>	10	400×2	—	10	108±13**	483±75*
GF+CCl <sub>4</sub>	10	600×2	—	10	75±16**	314±45**
V <sub>E</sub> +CCl <sub>4</sub>	8	—	400×2	10	52±9**	332±72**

\*  $P < 0.05$  vs CCl<sub>4</sub> group; \*\*  $P < 0.001$  vs CCl<sub>4</sub> group.

**血清混合实验** 取表1中前3组小鼠的血清(每组5只),每组血清置于一支离心管内共3支即:I(Normal), II(GF-pretreated)和III(CCl<sub>4</sub>-treated)。取II两份分别与I, III以等比例混合,即刻或于37℃温育2h后测定各组GPT及LDH活性。结果表明:GF处理小鼠的血清加入等量的正常小鼠血清或CCl<sub>4</sub>处理小鼠的血清,无论即刻测定或温育后测定,混合血清的GPT及LDH活性都相当于混合前二者之和的一半(表2)。说明GF处理小鼠的血清内不存在抑制正常小鼠和CCl<sub>4</sub>处理小鼠血清GPT及LDH活性的物质。

### GF对CCl<sub>4</sub>中毒小鼠肝细胞形态学的影响

取表1所列前5组小鼠肝脏,做病理切片,观察肝细胞病变。镜下可见CCl<sub>4</sub>中毒小鼠肝细胞广泛坏死,坏死灶分布于肝小叶中央静脉周围及肝被膜下,坏死灶内肝细胞大部分崩解消失,呈凝固性坏死。坏死区内有以中性白细胞为主的炎性细胞浸润,此外尚可见肝细胞变性,细胞核呈不同程度的固缩。GF保护组肝细胞病变普遍较轻,坏死灶明显减少,多为散在分布,坏死区内受损肝细胞一般也较CCl<sub>4</sub>组为少。根据坏死程度分级,按等级序值法分析表明:GF(400 mg·kg<sup>-1</sup>)可显著保护CCl<sub>4</sub>中毒小鼠肝细胞坏死(表3)。GF本身对正常肝细胞结构无影响。

**Tab 2 Effects of the serum of GF-treated mice on the serum GPT and LDH activities of normal and CCl<sub>4</sub>-treated mice\***

Serum	GPT(U/L)		LDH(U/L)	
	Immediate	Post-incubation**	Immediate	Post-incubation
I(normal)	40	38	376	379
II(GF-pretreated)	39	40	412	397
III(CCl <sub>4</sub> -treated)	249	244	597	615
I+II(1:1)	41(39.5)#	38(39)	378(394)	388(388)
II+III(1:1)	145(144)	182(142)	496(504.5)	516(506)

\* All the data are values of duplicate determinations. \*\* Sera were incubated at 37°C for 2 h.

# Figures in parentheses are means of the GPT and LDH activities of the two sera before being mixed. for example, (40+39)/2=39.5.

**Tab 3 Effect of GF on carbon tetrachloride induced hepatic necrosis in mice**

Group	Treatment		Score of liver necrosis*					≥±/n
	GF	CCl <sub>4</sub>	—	±	+	++	+++	
	(mg·kg <sup>-1</sup> )	(μl·kg <sup>-1</sup> )	(number of mice)					
Normal	—	—	5	0	0	0	0	0/5
CCl <sub>4</sub>	—	10	0	0	1	2	2	5/5
GF+CCl <sub>4</sub>	200×2	10	0	1	1	3	0	4/5
GF+CCl <sub>4</sub>	400×2	10	0	5	1	0	0	1/6**

n = number of mice examined \* (—) no necrosis, (±) spotty necrosis, (+) focal necrosis, (++) diffuse necrosis limited to the inner half of the lobule, (+++) diffuse necrosis exceeded the inner half of the lobule. \*\* P < 0.05 vs CCl<sub>4</sub> group

**Tab 4 Effects of GF on carbon tetrachloride-induced increases of liver MDA and GSH in mice ( $\bar{x} \pm s$ )**

Group	n	Treatment			GSH (μmol·g <sup>-1</sup> w. wt.)	MDA (nmol·g <sup>-1</sup> w. wt.)
		GF	V <sub>E</sub>	CCl <sub>4</sub>		
		(mg·kg <sup>-1</sup> )	(μl·kg <sup>-1</sup> )	(μl·kg <sup>-1</sup> )		
Normal	10	—	—	—	8.90±1.05	178.6±29.6
GF	10	400×2	—	—	9.16±1.03	158.4±31.8
CCl <sub>4</sub>	12	—	—	10	8.16±0.88	1396.7±109.9
GF+CCl <sub>4</sub>	8	200×2	—	10	8.01±0.42	1442.2±105.0
GF+CCl <sub>4</sub>	8	400×2	—	10	8.10±0.64	1036.7±55.9**
GF+CCl <sub>4</sub>	9	600×2	—	10	8.03±0.82	648.5±57.5**
V <sub>E</sub> +CCl <sub>4</sub>	8	—	400×2	10	8.29±0.66	462.1±52.9**

\*\* P < 0.001 vs CCl<sub>4</sub> group

### GF对CCl<sub>4</sub>中毒小鼠肝脏内MDA及GSH含量的影响

如图1所示, CCl<sub>4</sub>中毒后, 小鼠肝内MDA含量明显增高, 12 h达高峰, 以后渐降, 96 h接近正常水平。CCl<sub>4</sub>中毒后小鼠肝内GSH含量没有明显变化。

实验小鼠分组、处理同前。断头处死小鼠,取肝制成肝匀浆测 MDA 及 GSH 含量。结果表明:预先 ig GF(400, 600 mg · kg<sup>-1</sup>)可显著抑制 CCl<sub>4</sub> 致小鼠肝组织 MDA 含量的增加(表 4),抑制率分别可达 25.8 和 53.6%( $P < 0.01$ )。抑制作用在 200~600 mg · kg<sup>-1</sup>剂量范围内呈剂量依赖性,相关极显著。GF 降低肝脏 MDA 的作用是同等剂量 V<sub>E</sub> 的 1/2。GF 对中毒小鼠肝内 GSH 含量无影响。正常小鼠 ig GF 后,肝内 MDA 及 GSH 含量也无明显变化。

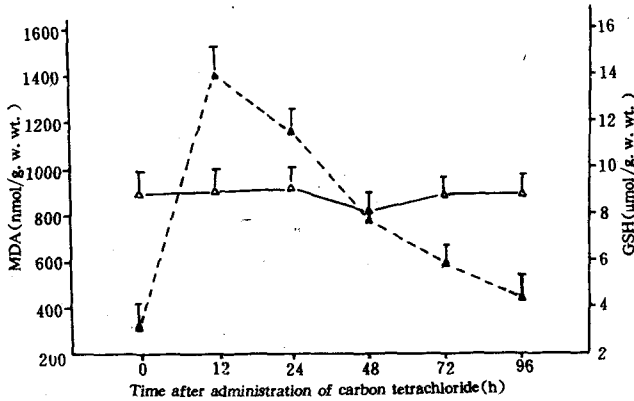


Fig 1 Time-course of MDA (▲-▲) and GSH (△-△) contents in the liver of mice after administration of CCl<sub>4</sub> (10 μl · kg<sup>-1</sup> ip). Results are  $\bar{x} \pm s$  (n=7~8).

## 讨 论

CCl<sub>4</sub> 经肝微粒体细胞色素 P<sub>450</sub> 激活后生成 ·CCl<sub>3</sub>, ·CCl<sub>3</sub> 可攻击肝细胞膜上磷脂分子,引起脂质过氧化,或与肝微粒体脂质和蛋白质发生共价结合,损伤了肝细胞膜结构与功能的完整性,从而使胞浆内可溶性酶如转氨酶,乳酸脱氢酶渗入血液中,其活性明显上升<sup>(7~11)</sup>。预先 ig GF 可缓解 CCl<sub>4</sub> 引起的小鼠血清 GPT 及 LDH 活性的增高。该作用可能通过以下 3 个途径得以实现:抑制血清中 GPT 及 LDH 活性;抑制肝细胞对酶蛋白的合成;阻止肝细胞对酶的释放。本文实验结果表明:GF 既不抑制血清中酶的活性,也不减少正常小鼠血清 GPT 和 LDH 活性。因此认为 GF 降低 CCl<sub>4</sub> 中毒小鼠血清 GPT 及 LDH 活性可能由于它保护了 CCl<sub>4</sub> 所致的肝细胞损伤,从而减少了 GPT 及 LDH 渗入血液。镜检结果也支持这一现象。再者 GF 可显著抑制 CCl<sub>4</sub> 中毒小鼠肝内 MDA 含量的增高,抑制作用的强弱与肝细胞组织学变化的轻重相吻合,但与血清 GPT 及 LDH 活性的高低呈相反变化。已知黄酮类化合物结构中的酚羟基是其抗氧化的功能基团,酚羟基数目增多,抗氧化活性相应增强。GF 的主要成分为甘草素和异甘草素,分别含有两个和 3 个酚羟基<sup>(12)</sup>,为抗氧化的功能基团。Dianzani 认为 ·CCl<sub>3</sub>, CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub> · 启动的脂质过氧化反应可能涉及 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ·OH; 而 GF 具有清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ·OH 的作用<sup>(4)</sup>,故推测 GF 通过清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 及 ·OH,抑制脂质过氧化反应,从而保护了肝细胞膜的完整性。

## 参 考 文 献

- 1 Hidehiko S, et al. The effect of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and hydrogen peroxide by macrophages. *Igaku no Aynumi* 1983;124: 109.

- 2 Kiso Y, et al. Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin, II. Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Med* 1984;51 : 298.
- 3 Niwa y, et al. Antioxidant action of natural health products and Chinese herbs. *Inflamma* 1986; 10 : 79.
- 4 句海松,等. 甘草类黄酮对脂质过氧化和活性氧自由基的作用. *药理学报* 1989;24 : 807.
- 5 句海松,等. 阿魏酸钠和 18- $\beta$ -甘草酸对氧自由基的清除作用. *中国药理学报* 1990;11 : 466.
- 6 Dianzani MU. The role of free radicals in liver damage. *Proc Nutr Soc* 1987;46 : 43.
- 7 Höpfer M, Rej R. Alanine aminotransferase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 3. 3rd ed. Weihim; Verlag Chemie, 1983 : 444~456.
- 8 Vassault A. Lactate dehydrogenase. *Ibid*; 118~126.
- 9 Ohkawa H, et al. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95 : 351.
- 10 Boyne AF, et al. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Ibid* 1972;46 : 639.
- 11 Perrisoud D, Festa B. Hepatic pharmacology; Mechanism of action and classification of antine-crotic hepatoprotective agents. *Trends Pharmacol Sci* 1982;29 : 371.
- 12 Takagik, et al. Peptic ulcer inhibiting properties of a new fraction from licorice root (FM<sub>100</sub>): Experimental peptic ulcer and general pharmacology. *Arzneimittelforsch* 1967;17 : 154.

## THE PROTECTIVE ACTION OF GLYCYRRHIZA FLAVONOIDS AGAINST CARBON TETRACHLORIDE HEPATOTOXICITY IN MICE

GS Wang and ZW Han

(Department of Pharmacology, Inner Mongolia Medical College, Huhhot 010059)

**ABSTRACT** The protective action of Glycyrrhiza flavonoids (GF), the major components in the radix of Glycyrrhiza, on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity was investigated. The carbon tetrachloride-induced increases of serum glutamic-pyruvic transaminase and lactate dehydrogenase were significantly inhibited by GF dose-dependently. Carbon tetrachloride-induced necrosis in mice were ameliorated by GF pretreatment. Concomitantly, the carbon tetrachloride-induced elevation of MDA in the liver was lowered by GF. GF neither reduced the activities of the two enzymes in normal mouse sera nor directly inhibited the activities of the two enzymes in the serum. These findings suggest that the anti-lipid peroxidation effect of GF was contributed to its protective action against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity.

**Key words** Flavonoids glycyrrhiza ; Carbon tetrachloride; Liver function; Lipid peroxidation