

· 论 著 ·

复方风柜斗草对小鼠急性肝损伤的保护作用

陈美惠¹, 石鹤坤², 侯中华¹, 陈开杰², 林小凤², 王曙东¹, 陈锦珊²

〔摘要〕 目的 观察复方风柜斗草对四氯化碳(CCl₄)引起的小鼠急性肝损伤的保护作用。方法 将小鼠随机分为空白组、模型组、复方风柜斗草低剂量组(2.2 g/kg)、中剂量组(4.4 g/kg)、高剂量组(8.8 g/kg)和联苯双酯阳性对照组(0.2 g/kg)。空白组与模型组给予1%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液,其他组给予相应的药物,1次/d,连续灌胃给药10 d后,除正常组外,腹腔注射CCl₄致小鼠急性肝损伤。检测肝组织中的超氧化物歧化酶(SOD)及血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)的活性,同时检测血清中总胆红素(T-BIL)、直接胆红素(D-BIL)及肝组织中丙二醛(MDA)的水平,并计算肝脏指数。结果 预先给予复方风柜斗草能显著降低急性肝损伤小鼠体内T-BIL、D-BIL、ALT、AST和MDA的水平,并升高肝组织中SOD活力。结论 复方风柜斗草对CCl₄致小鼠急性肝损伤具有保护作用,其机制可能与其所具有的抗脂质过氧化和清除体内过多氧自由基的作用有关。

〔关键词〕 复方风柜斗草;急性肝损伤;保护作用;小鼠

〔中图分类号〕 R917 〔文献标志码〕 A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.04.018

The protective effects of compound sarcopyramis nepalensis wall on acute hepatic injury in mice

CHEN Mei-hui¹, SHI He-kun², HOU Zhong-hua¹, CHEN Kai-jie², LIN Xiao-feng², WANG Shu-dong¹, CHEN Jin-shan². 1. Department of Pharmaceutical Preparation, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Department of Pharmacy, 175 Hospital of PLA/Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China

〔Abstract〕 Objective To observe the protective effects of compound sarcopyramis nepalensis wall against tetrachloride (CCl₄)-induced acute hepatic injury in mice. Methods The mice were randomly divided into normal group, model group, low dose compound sarcopyramis nepalensis wall group (2.2 g/kg), medium dose group (4.4 g/kg), high dose group (8.8 g/kg), and positive control (biphenyldicarboxylate) groups (0.2 g/kg). The mice were ig pretreated with compound sarcopyramis nepalensis wall and biphenyldicarboxylate once daily for consecutive 10 d, respectively. The mice in the normal and model groups were given 0.1% CMC-Na, the water-solution instead. Then, acute liver injury in mice was induced by ip injection of CCl₄. The activities of serum ALT and AST, hepatic SOD, and the level of serum T-BIL and D-BIL, hepatic MDA were also determined, the hepatic indices were calculated.

Results The activities of ALT and AST, the level of T-BIL, D-BIL and MDA were significantly decreased by compound sarcopyramis nepalensis wall pretreatment, while activity of SOD in hepatic tissues was markedly increased. Conclusion Compound sarcopyramis nepalensis wall has protective effects against CCl₄-induced acute hepatic injury in mice, and the mechanisms might be associated with its anti-oxidative and scavenging free radical activity.

〔Key words〕 compound sarcopyramis nepalensis wall; acute hepatic injury; protective effects; mice

复方风柜斗草由中药风柜斗草和向天盏组成^[1],风柜斗草(*Sarcopyramis nepalensis* Wall)又名肉穗草、风鼓斗草,来源于野牡丹科植物肉穗草属楮头红的全草,其性平、味甘,具有凉热解毒、凉血利水、去肝火、清肺热的功效,用于急性肝炎、肺热咳嗽、风湿痹痛、耳鸣耳聋及目雾羞明等治疗。廖梅等^[2]报道风柜斗草的正丁醇提取部分具有抑制四氯化碳(CCl₄)所致肝损伤所引起的转氨酶升高的作用。向天盏(*Scutellaria indica* L.)又名韩信草、

大力草、耳挖草(《生草药性备要》)、金茶匙(《本草求原》)、顺经草(贵州)、大叶半枝莲(广西)、虎咬癩(福建),为唇形科植物向天盏的全草,主要分布于江南各省区,其味辛、微苦、性凉,归肺、肝经,有清热解毒、利水消肿、止痛的功效^[3]。本实验采用以上两药合用,探讨其保护小鼠急性肝损伤的作用,为进一步研究该药提供实验依据。

1 材 料

1.1 药物 复方风柜斗草醇提取物,由南京军区南京总医院制剂科提供(批号:20140620),联苯双酯滴丸(浙江万邦药业股份有限公司,批号:A02130212)。

作者单位: 1. 210002 江苏南京,南京军区南京总医院药剂科; 2. 363000 福建漳州,解放军175医院(厦门大学附属东南医院)药学科

1.2 试剂 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 测定试剂盒、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 测定试剂盒、总胆红素 (T-BIL) 测定试剂盒、直接胆红素 (D-BIL) 测定试剂盒购于上海复星长征医学科学有限公司。超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒、丙二醛 (MDA) 测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。CCl₄ 购于天津市福晨化学试剂有限公司, 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 购于西陇化工股份有限公司, 冰乙酸为天津市福晨化学试剂有限公司生产, 无水乙醇为广东光华科技股份有限公司生产, 以上试剂均为分析纯。大豆油购于中粮东州粮食工业 (广州) 有限公司。

1.3 仪器 ADVIA2400 全自动生化分析仪 (德国西门子公司)、UV-2550 紫外分光光度计 (日本岛津公司)、Pico-17 高速离心机 (美国赛默飞世尔公司)、BS223S 电子天平 (德国赛多利斯集团公司)、Model 680 酶标仪 (美国伯乐生命医学有限公司)、MS3 digital 震摇器 (德国 IKA 工业公司)、420-A 型恒温水浴箱 (姜堰市新康医疗器械有限公司)。

1.4 实验动物 健康清洁级 ICR 种小鼠, 雌雄各半, 体重 (20 ± 2) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供 [许可证号: SCXK (沪) 2012-0002], 动物实验环境及设施符合《中华人民共和国实验动物规范》(GB14925-95)。动物实验在厦门大学附属东南医院实验室进行 [许可证号: SYXK (军) 2012-0054], 符合伦理准则, 获得实验动物伦理委员会批准, 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。试验前适应性饲养 3 d, 自由摄食饮水。

2 方 法

2.1 分组与给药 ICR 种小鼠 60 只, 随机分为空白组、CCl₄ 模型组、复方风柜斗草低剂量组、中剂量组、高剂量组、联苯双酯阳性对照组, 每组 10 只, 雌雄各半。复方风柜斗草给药的高剂量为 8.8 g/kg 生药, 中剂量 4.4 g/kg 生药、低剂量 2.2 g/kg 生药; 阳性对照组给药剂量为 0.2 g/kg, 灌胃给药体积

0.4 mL/10 g, 1 次/d, 连续给药 10 d; 空白对照组和模型组给予 1% 羧甲基纤维素钠 CMC-Na 水溶液。

2.2 造模与取材测定 末次给药后 0.5 h, 除空白对照组腹腔注射等量大豆油外, 其余各组小鼠腹腔注射 0.1% CCl₄ 大豆油溶液 (0.1 mL/10 g 体重), 制备 CCl₄ 急性肝损伤模型。24 h 后, 各组小鼠称体重, 摘眼球取血, 静置 1 h, 离心半径 15 cm, 3500 r/min 离心 10 min 后分离血清, 严格按试剂盒说明书检测 T-BIL、D-BIL、ALT 及 AST 活性。小鼠处死后, 立即取肝脏于预冷等渗盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 称定质量, 计算肝脏指数^[4], 并称取 0.8 ~ 1 g, 加入 9 倍量预冷等渗盐水制成 10% 肝组织匀浆, 匀浆液以 4000 r/min (离心半径 15 cm) 离心 10 min, 取上清液, 测定 SOD 活性和 MDA 的含量, 具体操作按照试剂盒说明书进行。

2.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, T-BIL、D-BIL、ALT、AST、MDA、SOD 等实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较使用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 复方风柜斗草对 CCl₄ 所致肝损伤小鼠血清 T-BIL、D-BIL、ALT 和 AST 的影响 与空白组比较, 模型组血清 T-BIL 显著增加 (*P* < 0.05), D-BIL、ALT、AST 亦显著增加 (*P* < 0.01), 说明急性肝损伤模型造模成功。与 CCl₄ 模型组比较, 复方风柜斗草中、高剂量组、联苯双酯组小鼠血清 T-BIL、D-BIL、ALT、AST 明显降低 (*P* < 0.05 或 0.01)。见表 1。

3.2 复方风柜斗草对 CCl₄ 所致肝损伤小鼠肝组织中 MDA 含量及 SOD 活性的影响 CCl₄ 模型组与空白组比较, 肝组织中 MDA 含量升高 (*P* < 0.01), SOD 活性降低 (*P* < 0.05)。与 CCl₄ 模型组比较, 复方风柜斗草中、高剂量组、联苯双酯组可降低肝损伤小鼠肝组织中 MDA 含量, 提高 SOD 活性 (*P* < 0.05 或 0.01)。见表 2。

表 1 复方风柜斗草对小鼠急性肝损伤肝血清 T-BIL、D-BIL、ALT 和 AST 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | 剂量 (g/kg) | T-BIL (μmol/L) | D-BIL (μmol/L) | ALT (U/L) | AST (U/L) |
|----------------------|----------|-----------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| 空白组 | 10 | — | 1.16 ± 0.28 | 0.55 ± 0.14 | 34.75 ± 3.56 | 94.73 ± 19.17 |
| CCl ₄ 模型组 | 10 | — | 1.67 ± 0.58 * | 0.81 ± 0.21 ** | 88.72 ± 39.25 ** | 166.49 ± 49.37 ** |
| 低剂量组 | 10 | 2.2 | 1.34 ± 0.36 * | 0.67 ± 0.15 ** | 60.83 ± 32.76 * | 137.14 ± 35.39 * |
| 中剂量组 | 10 | 4.4 | 1.21 ± 0.21 * | 0.57 ± 0.12 ** | 53.22 ± 20.61 * | 125.10 ± 30.75 * |
| 高剂量组 | 10 | 8.8 | 1.21 ± 0.32 * | 0.53 ± 0.18 ** | 46.98 ± 15.27 * | 121.14 ± 27.18 * |
| 联苯双酯组 | 10 | 0.2 | 0.91 ± 0.12 ** | 0.48 ± 0.13 ** | 44.38 ± 25.50 ** | 123.97 ± 30.40 * |

注: 与空白组比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

表 2 复方风柜斗草对小鼠急性肝损伤肝组织中
MDA 水平及 SOD 活性影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | 剂量 (g/kg) | MDA (nmol/mL) | SOD (U/mg) |
|----------------------|----------|--------------|------------------|------------------|
| 空白组 | 10 | — | 51.82 ± 16.15 | 159.79 ± 76.99 |
| CCl ₄ 模型组 | 10 | — | 85.38 ± 22.94 ** | 92.08 ± 54.02 * |
| 低剂量组 | 10 | 2.2 | 68.53 ± 13.62▲ | 148.17 ± 58.62▲ |
| 中剂量组 | 10 | 4.4 | 60.56 ± 12.04▲▲ | 150.06 ± 67.49▲ |
| 高剂量组 | 10 | 8.8 | 56.92 ± 10.13▲▲ | 177.98 ± 53.46▲▲ |
| 联苯双酯组 | 10 | 0.2 | 68.32 ± 17.49▲ | 175.71 ± 84.79▲ |

注:与空白组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01;与 CCl₄ 模型组比较,▲*P* < 0.05,▲▲*P* < 0.01

3.3 复方风柜斗草对小鼠体重及肝脏指数的影响
在 10 d 的给药期间内,高剂量组小鼠的体重增加最多,均值达到 28.93 g,其次为联苯双酯组,见表 3。复方风柜斗草对 CCl₄ 所致肝损伤小鼠肝脏指数的影响,各组之间比较差异无统计学意义(*P* > 0.05);但与空白组比较,各组小鼠的肝脏均有不同程度的肿胀,各给药组均不能降低 CCl₄ 所致急性肝肿胀。

表 3 复方风柜斗草对小鼠体重及肝脏指数的影响

| 组别 | <i>n</i> | 剂量 (g/kg) | 小鼠体重 (g, $\bar{x} \pm s$) | 肝脏指数 (%) |
|----------------------|----------|--------------|-------------------------------|-------------|
| 空白组 | 10 | — | 26.4 ± 3.29 | 3.99 |
| CCl ₄ 模型组 | 10 | — | 27.34 ± 3.06 | 4.25 |
| 低剂量组 | 10 | 2.2 | 27.24 ± 3.15 | 4.50 |
| 中剂量组 | 10 | 4.4 | 27.46 ± 2.35 | 4.36 |
| 高剂量组 | 10 | 8.8 | 28.93 ± 2.18 | 4.62 |
| 联苯双酯组 | 10 | 0.2 | 28.31 ± 2.83 | 4.22 |

4 讨 论

肝脏氧化损伤可引发多种疾病或加重机体的病变。CCl₄ 是一种经典的诱发急性肝损伤的肝毒性药物,选用 0.1% CCl₄ 大豆油作为造模材料,可以得到肝损伤程度合理,统计结果误差较小的 CCl₄ 小鼠急性肝损伤模型^[5-7]。本实验采用 0.1% CCl₄ 大豆油(0.1 mL/10 g 体重)灌胃,与空白对照组比较,模型组血清 T-BIL、D-BIL、ALT、AST 水平均显著增加,说明急性肝损伤造模成功。
CCl₄ 进入体内,经肝微粒体细胞色素 P450 作用下代谢为 CCl₃,并攻击肝细胞膜上的磷脂分子,引起膜的脂质过氧化反应以及直接的膜溶解作用,导致肝细胞变性坏死或肝细胞通透性增强,而引起血清中的 ALT、AST、T-BID、D-BID 含量上升^[8-9]。SOD 是体内清除自由基、抑制自由基反应的物质基

础之一,其活性降低则会导致体内氧自由基积累,引发质膜的过氧化作用,使膜结构破坏与功能受到损伤。MDA 是氧自由基攻击生物膜结构中的多聚不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应生成的,是脂质过氧化反应的最终产物^[10-11]。小鼠腹腔注射 CCl₄ 导致急性肝损伤时,过量的氧自由基产生于肝组织细胞可引起 SOD 水平下降及 MDA 含量升高,通过检测小鼠肝匀浆中的 SOD 活性及 MDA 含量可间接反映出药物对肝细胞的保护作用^[12-13]。
本实验显示,复方风柜斗草醇提取物的高、中剂量组与联苯双酯对照组可显著降低 CCl₄ 引起急性肝损害小鼠血清中的 ALT、AST、T-BIL、D-BIL 的含量,并提高肝匀浆组织中的 SOD 活性,降低组织中 MDA 含量,且复方风柜斗草高剂量组各项指标与联苯双酯对照组接近。在小鼠体重方面,高剂量组体重均数比空白组增加 2.53 g,其次为联苯双酯组增加 1.91 g,说明复方风柜斗草对提高小鼠体重质量具有一定的作用。与模型组比较,各给药组小鼠在肝脏指数方面并未见降低,说明各给药组小鼠不能降低由于 CCl₄ 引起的肝脏肿胀,其原因可能是 CCl₄ 引起损伤的早期,肝小叶结构被破坏,肝细胞不同程度肿胀未能及时修复而导致肝脏指数的增加。
综上所述,复方风柜斗草具有保肝和对抗 CCl₄ 引起急性肝损伤的作用,其机制可能与复方风柜斗草所具有抗脂质过氧化和清除体内过多的氧自由基的作用有关,本研究为临床应用复方风柜斗草治疗急性肝损伤提供了理论参考。
【参考文献】
[1] 陈美惠,刘文雅,李 黎. 复方风柜斗草提取工艺的研究[J]. 东南国防医药,2014,16(4):414-415,426.
[2] 廖 梅,张锦文,张勇慧. 楮头红保肝护肝活性部位筛选[J]. 医药导报,2010,29(5):571-572.
[3] 宋立人,洪 恂,丁绪亮,等. 现代中药学大辞典上册[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:867.
[4] 杨 云,胡筱希,周凌凌,等. 龙葵多糖对 CCl₄ 致急性肝损伤小鼠的保护作用研究[J]. 中成药,2014,36(12):2602-2605.
[5] Chang ML, Yeh CT, Chang PY, et al. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(27):4167-4172.
[6] 黎 畅,李瑾翡,蒋忠军,等. CCl₄ 致小鼠急性肝损伤模型的研究[J]. 热带医学杂志,2010,10(6):657-659.
[7] 丁体龙,马 勇,严家春,等. “抗纤汤”治疗四氯化碳致肝纤维化大鼠模型的实验研究[J]. 东南国防医药,2004,6(3):175-176.
[8] 王 欣,熊 哲. 黄芩素对急性肝损伤模型小鼠的保护作用及其机制[J]. 医药导报,2012,31(8):1000-1002.
(下转第 406 页)

会增高其表达,高表达的血清抵抗素使血管平滑肌细胞增殖,血管内皮功能受损,加速泡沫细胞的形成,直接参与动脉粥样硬化的发生发展,与白细胞介素-1、肿瘤坏死因子- α 等许多炎症反应因子密切相关,导致及加速动脉粥样硬化的形成进程,目前成为缺血性心脑血管疾病的独立危险因素^[6]。大量研究发现:心脑血管病患者血清中血清抵抗素水平明显升高,并且远远高于健康人群水平,能够损伤血管内皮功能,加速动脉粥样硬化,与心脑血管病关系密切,是急性心肌梗死的新型血清学生物标记物,为预测冠状动脉钙化程度的预测指标及预测缺血性心血管病的独立危险因素^[7]。曹建伟^[8]对脑梗死患者行颈动脉血管彩超及血清抵抗素检测,发现血清抵抗素水平及颈动脉内中膜厚度明显高于健康人,表明血清抵抗素与脑梗死关系密切。血清抵抗素与血清 C 反应蛋白水平亦呈正相关,有研究发现 C 反应蛋白的主要合成物质为白介素-6,血清抵抗素在促炎因子的刺激下大量合成并释放到血液中,同时血清抵抗素反过来又可以刺激白介素-6、肿瘤坏死因子- α 等炎症因子的释放,在体内形成一个逐渐增强的炎症正反馈途径,使炎症不断被放大^[9]。

SAA 是一个反映机体炎症水平的较敏感的血清特征性指标,在急性炎症时表达水平迅速升高,甚至比 C 反应蛋白更为敏感,可为临床提供较高的参考价值^[10]。研究发现,炎症机制贯穿动脉硬化全过程,SAA 参与并促进机体动脉粥样硬化形成,在机体发生急性炎症反应时,血清白介素-1、肿瘤坏死因子- α 等炎症因子大量合成并释放,刺激 SAA 迅速上升并特异性地与高密度脂蛋白结合,置换高密度脂蛋白上的载脂蛋白 A-I,通过抑制卵磷脂胆固醇酰基转移酶的活性,减缓胆固醇的逆转运及清除,增加脂质沉积,加速动脉硬化进程^[11];此外白介素-1、肿瘤坏死因子- α 等炎症因子还能促进单核细胞的黏附及血管内膜平滑肌的迁移,加速动脉粥样硬化的进程。Schillinger 等^[12]发现急性期脑梗死患者血清

SAA 水平明显高于成年健康人,甚至高出 1000 倍以上,对其进行颈部血管超声检测发现,SAA 表达水平越高,其斑块面积越大,两者呈正相关,经治疗后血清 SAA 水平显著下降。虽然 SAA 目前已经被公认为是心脑血管病的独立危险因素,但急性脑梗死发病机制较为复杂,还需要更深入的研究。

【参考文献】

- [1] 吴金飞,陈传琳,曾素琴,等. 脑梗死危险因素及生化特征分析[J]. 东南国防医药,2014,16(3):270-272.
- [2] 吴修信,李立新,廖品君,等. 急性脑梗死患者血清淀粉样蛋白 A 的临床和预后价值[J]. 首都医科大学学报,2012,33(2):255-258.
- [3] 中华医学会全国第四届脑血管病学术会议. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经杂志,1996,29(6):379-382.
- [4] 诸兴明,陈阳,杜宇平,等. 急性脑梗死患者血清胱抑素 C 和 C 反应蛋白水平变化的研究[J]. 东南国防医药,2014,16(3):275-277.
- [5] 耿红莲,仲人前. 血清淀粉样物质 A 研究进展[J]. 现代检验医学杂志,2010,25(4):10-12.
- [6] 夏章勇,杨华,崔可密,等. 脑卒中患者急性期血浆抵抗素和瘦素水平及其相关性研究[J]. 中华老年心血管病杂志,2006,8:329-332.
- [7] 崔海月,王庆国. 缺血性脑血管病发病机制的新进展[J]. 长春中医药大学学报,2009,25(2):291-292.
- [8] 曹建伟. 急性脑梗死患者血清抵抗素水平变化及意义[J]. 山东医药,2013,53(9):50-52.
- [9] Weikert C, Westphal S, Berger K, et al. Plasma resistin levels and risk of myocardial infarction and ischemic stroke[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008,93(7):2647-2653.
- [10] 曾素琴,熊宁,吕仁发. 颈动脉粥样硬化与脑梗死关系的探讨[J]. 东南国防医药,2011,13(3):500-502.
- [11] 孙增强. 血清淀粉样蛋白 A 和血清 C 反应蛋白与急性脑梗死关系的临床研究[D]. 青岛大学,2014.
- [12] Schillinger M, Exner M, Lekusch W, et al. Inflammation and Carotid Artery Risk for Atherosclerosis Study (ICARAS)[J]. Circulation, 2005,111(17):2203-2209.

(收稿日期:2015-05-06;修回日期:2015-06-08)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)

(上接第 395 页)

- [9] Boll M, Weber LW, Becker E, et al. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites[J]. Z Naturforsch, 2001,56(7-8):649-659.
- [10] 夏西超,华春秀,姜晓,等. 和厚朴酚对急性肝损伤模型小鼠抗氧化作用研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(2):361-362.
- [11] Wang L, Albrecht MA, Wurtman RJ. Dietary supplementation with uridine-5'-monophosphate (UMP), a membrane phosphatide precursor, increases acetylcholine level and release in striatum of aged

rat[J]. Brain Res, 2007,1133(1):42-48.

- [12] 杨珊珊,慎爱民,丁立新,等. 毛蕊花苷固体脂质纳米粒的制备及对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志,2014,34(1):4-8.
- [13] 戴城烽,李娟,金璐燕,姜黄素-3 脂质体对小鼠四氯化碳急性肝损伤的保护作用及其机制[J]. 中国临床药理学与治疗学,2008,13(4):401-405.

(收稿日期:2015-06-04;修回日期:2015-06-12)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)