

肝宁颗粒对 α 萘异硫氰酸酯所致大鼠黄疸模型的退黄降酶作用

万绍晖^{1,2}, 丁原全³, 蒲晓辉¹, 郭立¹, 康廷国² (1. 河南大学药学院, 河南 开封 475004; 2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032; 3. 沈阳军区卫生技术干部训练中心, 辽宁 大连 116017)

摘要:目的 观察肝宁颗粒对 α 萘异硫氰酸酯 (ANIT) 所致大鼠急性黄疸模型的退黄降酶作用。方法 将 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、肝宁颗粒高、中、低剂量组和茵栀黄注射液组。各治疗组连续灌胃给药 7 d 后, ANIT 诱发黄疸模型, 48 h 后摘眼球取血, 分离血清, 以血清肝功能指标、SOD 的活力及 MDA 含量以及肝脏组织病理学的改变为观察指标。结果 与模型组比较, 肝宁颗粒高、中剂量组、茵栀黄组的 ALT, AST, TBIL, ALP, GGT, MDA 均显著下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), SOD 显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与茵栀黄注射液比较, 肝宁颗粒各剂量组的 TBIL 均显著增高 ($P < 0.01$), 肝宁颗粒高剂量组的 ALT, GGT, SOD, MDA 均无差异 ($P > 0.05$)。肝脏病理组织学检查表明, 肝宁颗粒能明显减轻肝细胞变性、坏死和肝小胆管增生。肝宁颗粒高、中、低剂量组之间存在量效关系。结论 肝宁颗粒剂具有降低实验性胆汁淤积大鼠血清胆红素、转氨酶和改善肝脏组织损伤的作用, 疗效略低于茵栀黄注射液。

关键词: 肝宁颗粒剂; 胆汁淤积; 肝功能; 肝脏病理组织学; 大鼠

中图分类号: R282.710.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2007)03-0192-04

Action of Ganning Granula on Reduced Jaundice and Enzyme in Jaundice Model of Rat Induced by ANIT

WAN Shao-hui^{1,2}, DING Yuan-quan³, PU Xiao-hui¹, GUO Li¹, KANG Ting-guo² (1. Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shengyang 110032, China; 3. PLA Medical Servicemen Training Center of Shenyang Military Region, Dalian 116017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the action of ganning granula on reduced jaundice and enzyme in jaundice model of rat induced by ANIT. **METHODS** Wistar rats were randomized into six groups: group A in which no treatment was given, group B in which ANIT was given on the seventh day, group C in which high dosage of "Ganning granula" was given, group D in which moderate dosage of "Ganning granula" was given, group E in which low dosage of "Ganning granula" was given, and group G in which "Yinzhihuang injection" was given as positive control. Except group A and B, the other groups were given corresponding medicines for 7 days and then additionally administered ANIT to induced jaundice. After 48 h, the rats' blood was gained from eyes. The serum was separated. The liver functional sign and the content of SOD and MDA in serum, and the change in pathology of liver tissue were observed. **RESULTS** Compared to group B, ALT, AST, TBIL, ALP, GGT, MDA of group C and D and G group dropped obviously ($P < 0.01$

作者简介: 万绍晖 (1959 -), 女, 江西南昌人, 博士, 副教授, 研究方向: 中药质量评价。Tel: 0378-3880680, E-mail: wsh@henu.edu.cn

or $P < 0.05$); and SOD went up obviously ($P < 0.01$ or $P > 0.05$). By the examination the liver pathology, we found that "Ganning granula" could notably alleviate hepatocell change and necrosis and hepatom inicholange hyperplasia. ALT, SOD, MDA and GGT of group C was not indifference with group G ($P > 0.05$). **CONCLUSION** "Ganning granula" has the action of reducing serum bilirubin and transaminase and improving liver tissue injury in rats of experimental Cholestasis. But it's thapeutic effect is not as good as "Yinzhihuang injection".

KEY WORDS: Ganning granula; Cholestasis; liver function; pathology of hepar; rat

肝宁颗粒是在某传染病院临床经验方的基础上研制而成,由大黄、川芎等药材制成,用于急性黄疸型肝炎的肝胆湿热症。采用 α 萘异硫氰酸酯 (ANIT) 一次攻毒,造成大鼠实验性黄疸模型,观察了肝宁颗粒对 ANIT 所致大鼠肝损伤和黄疸的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试药物 肝宁颗粒 (每克中含芦荟大黄素 9.84 mg,大黄酸 1.36 mg,大黄素 13.70 mg,大黄酚 16.20 mg,大黄素甲醚 2.26 mg,阿魏酸 2.91 mg) 自制,每克相当于生药 2.00 g。成人剂量为生药 $30\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,折算成颗粒剂为 $15\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,按体表面积换算成大鼠每日等效剂量为 $1.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,结合预试结果,确定 $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。临用前将肝宁颗粒用 0.2% CMC-Na 稀释成所需浓度。茵栀黄注射液 (阳性对照药),江苏安格药业有限公司生产,批号:050207,成人剂量 $10\text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$,按体表面积换算大鼠每日剂量为 $1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,肌肉注射。

1.1.2 试剂 α 萘异硫氰酸酯 (α -naphthyl isothiocyanate, ANIT),购自美国 Sigma 公司;肝功能有关指标测试采用潍坊三潍生物工程集团有限公司的试剂;超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.1.3 动物 Wistar 大鼠 70 只,体重 (200 ± 20) g,雄性,购自河南省实验动物中心。实验动物质量合格证号:0001217。

1.1.4 仪器 美国贝克曼 Cx7 全自动生化分析仪;日本岛表 1 各实验组肝功能指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of the liver's function sign in groups($\bar{x}\pm s$)

Groups	ALT($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	AST($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	TBIL($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	ALP($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)	GGT($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)
nomal	$45\pm7^{(2)(4)(6)}$	$161\pm18^{(2)(4)(6)}$	$4\pm1^{(2)(4)(6)}$	$318\pm69^{(2)(4)(6)}$	$3\pm1^{(2)(4)(6)}$
Anit	375 ± 64	757 ± 114	148 ± 13	1018 ± 176	17 ± 2
Yinzhihuang	$106\pm18^{(2)(4)}$	$324\pm87^{(2)(4)}$	$53\pm5^{(2)(4)}$	$554\pm147^{(2)(4)}$	$9\pm2^{(2)}$
high dosage	$149\pm47^{(2)(3)}$	$425\pm127^{(2)(4)(5)}$	$68\pm10^{(2)(4)(6)}$	$709\pm156^{(2)(5)}$	$10\pm2^{(2)}$
m iddle dosage	$200\pm45^{(2)(6)}$	$571\pm131^{(2)(6)}$	$91\pm17^{(2)(6)}$	$812\pm162^{(1)(6)}$	$11\pm2^{(2)}$
low dosage	$326\pm77^{(1)(4)(6)}$	$695\pm128^{(3)(6)}$	$103\pm11^{(2)(6)}$	$895\pm184^{(6)}$	$16\pm3^{(4)(6)}$

注:与 B 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 D 组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与 G 组比较, ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$

Note: Comparison to group B, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; comparison to group D, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; comparison to group G, ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$

2.1.1 ALT, AST 的变化 与模型组比较,肝宁颗粒剂高剂量组、中剂量组和茵栀黄组的 ALT, AST 均有极显著下降 ($P < 0.01$);肝宁颗粒剂低剂量组 ALT 下降显著 ($P < 0.05$),而 AST 下降不显著 ($P > 0.05$)。与茵栀黄组 (阳性对照药) 比较,肝宁颗粒剂高剂量组的 ALT 无差别 ($P > 0.05$),AST 显著增高 ($P < 0.05$);肝宁颗粒剂中剂量组、低剂量组的 ALT,

津公司 UV - 265 紫外可见分光光度计。

1.2 方法

取雄性 Wistar 大鼠 60 只,随机分为 6 组 (每组 10 只): 正常组、模型组、茵栀黄组以及肝宁颗粒 4、2 和 $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重重组。正常组和模型组给等量的溶剂 ($20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体重),茵栀黄组每日 1 次肌肉注射,其余各组每日 1 次灌胃给药,于实验第 8 天给药后 1 h,正常组等量橄榄油灌胃,其余各组 ANIT (临用前用橄榄油配制成 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,按 $5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃)灌胃。同时继续给药,第 10 天给药后 1 h (中毒 48 h,禁食 12 h,自由饮水),摘眼球取血,分离血清,全自动生化分析仪检测血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、碱性磷酸酶 (ALP) 和谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 活性、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量。并处死大鼠,在同一部位切取肝脏,10% 甲醛固定,常规石蜡切片,HE 染色,光镜下作病理组织学观察。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行 SNK 方差分析。实验过程中 60 只大鼠,肝宁颗粒剂高剂量组死亡 1 只,其余各组每组 10 只。

2 结果

2.1 各实验组肝功能指标测定结果见表 1,血清中 SOD 活性和 MDA 含量的变化见表 2。模型组与正常组比较,大鼠血清 ALT, AST, TBIL, ALP, GGT 活性和 MDA 含量均显著升高 ($P < 0.01$); SOD 活性显著下降 ($P < 0.01$)。

AST 均极显著增高 ($P < 0.01$)。与肝宁颗粒剂中剂量组比较,肝宁颗粒剂高剂量组的 ALT 显著降低 ($P < 0.05$),AST 极显著降低 ($P < 0.01$);肝宁颗粒剂低剂量组的 ALT 极显著增高 ($P < 0.01$),AST 显著增高 ($P < 0.05$)。2.1.2 TBIL 的变化 与模型组比较,肝宁颗粒剂各剂量组和茵栀黄组均极显著下降 ($P < 0.01$);与茵栀黄组比较,肝宁

表 2 各实验组 SOD活力、MDA含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of the serum SOD and MDA in groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	SOD(U• mL ⁻¹)	MDA(nmol• mL ⁻¹)
normal	250 ±15 ²⁾⁴⁾⁶⁾	6 ±2 ²⁾⁴⁾⁵⁾
Anit	126 ±18	30 ±2
Yinzhihuang	212 ±11 ²⁾⁴⁾	9 ±1 ²⁾⁴⁾
high dosage	204 ±16 ²⁾⁴⁾	11 ±4 ²⁾⁴⁾
m iddle dosage	157 ±32 ¹⁾⁶⁾	18 ±4 ²⁾⁶⁾
low dosage	133 ±15	27 ±4

注:与 B组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 D组比较,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与 G组比较,⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$

Note: Comparison to group B,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$; comparison to group D,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$; Comparison to group G,⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$

颗粒剂各剂量组均极显著增高 ($P < 0.01$)。与肝宁颗粒剂中剂量组、高剂量组极显著降低 ($P < 0.01$),肝宁颗粒剂低剂量组无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.1.3 ALP的变化 与模型组比较,肝宁颗粒剂高剂量组、茵栀黄组均极显著降低 ($P < 0.01$),中剂量组显著降低 ($P < 0.05$),低剂量组无显著差别 ($P > 0.05$)。与茵栀黄组比较,肝宁颗粒高剂量组显著升高 ($P < 0.05$),中和低剂量组均极显著升高 ($P < 0.01$)。肝宁颗粒的高、中、低组均无差别 ($P > 0.05$)。

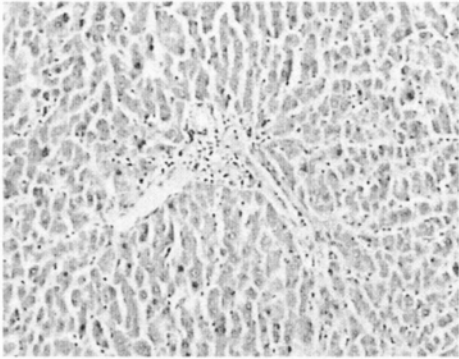
2.1.4 GGT的变化 与模型组比较,肝宁颗粒剂高、中剂量组和茵栀黄组均有极显著降低 ($P < 0.01$),低剂量组无显著差别 ($P > 0.05$)。与茵栀黄组比较,肝宁颗粒剂高、中剂量组均无差别 ($P > 0.05$),低剂量组极显著升高 ($P < 0.01$)。与中剂量组比较,高剂量组无差别 ($P > 0.05$),低剂量组极显著升高 ($P < 0.01$)。

2.1.5 SOD及 MDA含量的变化 与模型组比较,肝宁颗粒剂高剂量组及茵栀黄组的 SOD均极显著升高 ($P < 0.01$),中剂量组的 SOD均显著升高 ($P < 0.05$),低剂量组的 SOD无显著差别 ($P > 0.05$)。肝宁颗粒剂的高、中剂量组和茵栀黄组的 MDA均极显著降低 ($P < 0.01$),低剂量组的 MDA显著降低 ($P < 0.05$)。与茵栀黄组比较,肝宁颗粒剂高剂量组的 SOD无差别 ($P > 0.05$),而中、低剂量组的 SOD均极显著降低 (P

< 0.01);肝宁颗粒剂高剂量组的 MDA无差别 ($P > 0.05$),而中、低剂量组的 MDA均极显著升高 ($P < 0.01$)。与中剂量组比较,肝宁颗粒剂高剂量组极显著降低 ($P < 0.01$),而低剂量组极显著升高 ($P < 0.01$)。

2.2 肝脏组织病理学变化

正常组,肝脏外观轮廓、颜色正常;肝组织病理观察,肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐有序,肝细胞核大而圆,核膜清晰,胞浆丰富、淡染,见图 1。ANIT组(模型组),肝脏外观明显肿胀,颜色呈灰白色;肝组织病理切片观察,小叶间胆管增生,胆管上皮细胞肿胀、坏死;肝小叶轮廓不清,汇管区大量炎细胞浸润,肝细胞浊肿、空泡、嗜酸性变,坏死明显。见图 2。茵栀黄组,肝小叶结构较完整,仅见个别肝细胞呈空泡变性。肝宁颗粒剂高剂量组,肝小叶结构基本完整,中央静脉及肝窦轻度充血,肝细胞灶性区域轻度脂肪变性,点、灶状坏死散在分布。汇管区少许淋巴细胞浸润,小叶间胆管大致正常,见图 3。肝宁颗粒剂低剂量组,肝小叶轮廓不清,中央静脉及肝窦显著充血,肝细胞轻度脂肪变性,可见点、灶状坏死;汇管区小

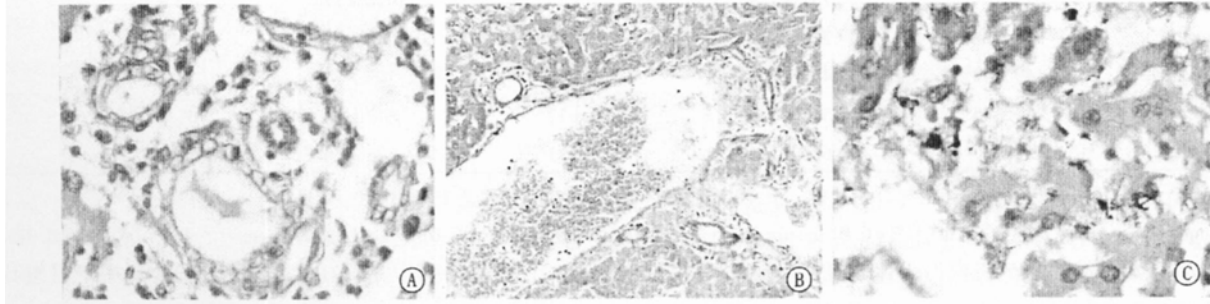


正常大鼠肝组织

Fig 1 The rat's normal liver tissue

注:肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐有序,肝细胞核大而圆,核膜清晰,胞浆丰富、淡染 ($\times 100$)

Note: The formation of the hepatic lobule is clear, and hepatic cellular ropes arrange orderly. Hepatic cell nucleus is large and round, and nuclear membrane is evident. The plasma is affluent, and is dyed slightly ($\times 100$)



ANIT组(模型组)

Fig 2 ANIT group (model group)

A.小胆管明显增生 ($\times 400$); B.小叶轮廓不清,炎细胞、充血、胆管增生 ($\times 100$); C.肝细胞内散在瘀胆现象 ($\times 400$)

A. Bile duct hyperplased obviously ($\times 400$); B. The outline of hepatic lobule is not clear. There was inflammatory cellular infiltration and congestion and hyperplased bile duct ($\times 100$); C. There is phenomenon of jaundice in the hepatic cell ($\times 400$)

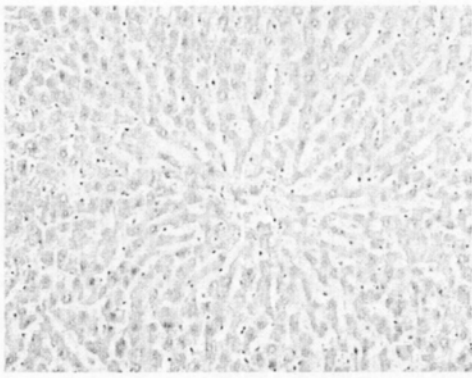


图 3 肝宁颗粒剂高剂量组

Fig 3 High dosage group of Ganning granula

注:多数肝小叶结构基本完整,中央静脉及肝窦轻度充血,肝细胞轻度脂肪变性,点、灶状坏死散在分布。汇管区少许淋巴细胞浸润,小叶间胆管大致正常(×100)

Note: The cellular construction of the majority of hepatic lobules is mainly intact. The central vein and hepatic sinuses congestion slightly. Hepatic cells emerged fatty degeneration. Point-shape and kitch-shape necrosis distribute scatteringly. In the zones of converging ducts, there were a few of lymphocytic infiltration, and bile ducts in the middle of the lobules were normal roughly(×100)

胆管上皮肿胀,较多量淋巴细胞浸润。中剂量组,多数肝小叶结构尚完整,中央静脉及肝窦扩张充血程度较模型组明显变轻,肝细胞轻度脂肪变性,汇管区小胆管增生较少,可见少量淋巴细胞浸润,偶见肝细胞点、灶状坏死。

3 讨论

3.1 ANIT诱发的大鼠肝损伤的生物化学和病理形态学改变类似于人类肝内胆淤积病变,其引起动物瘀胆型肝炎的机制是多方面的,一方面造成肝细胞的急性损伤,削弱其对胆红素的摄取、结合、排泄功能,另一方面造成毛细胆管增生,小叶间胆管周围炎症,胆管上皮坏死、脱落而引起管腔闭塞致使胆汁排泄障碍^[1]。ANIT于大鼠中毒 48h 血清 BILT 达高峰,72 h 开始下降^[2]。实验中模型组与正常组比较,ALT,AST,TBIT,GGT,ALP 均极显著升高,肝组织病理切片可见毛细胆管大量增生,胆管上皮坏死,大量炎细胞浸润。表明造模成功。

3.2 ALT 与 AST 主要分布在肝细胞内,如果肝细胞坏死,ALT 和 AST 就会升高,升高的程度与肝细胞受损程度相一致,是最常用的肝功能指标。ALP 和 GGT 是诊断胆道系统疾病是常用的指标;ALP 几乎存在与机体的各个组织,正常情况下血清中的 ALP 经血液到肝脏,从胆道系统排泄,瘀胆型肝炎时此酶明显升高;GGT 在体内分布很广,但是,血清中 GGT 主要来自肝脏,因此具有较强的特异性,肝胆系统疾病时,此酶升高。正常情况下,胆红素组成胆汁,排入胆道,再

经大便排出;当肝细胞发生病变,肝细胞肿胀、肝小胆管管腔闭塞,排泄胆汁受阻,则血中胆红素升高,就发生了肝细胞性黄疸。肝宁颗粒剂各剂量组及茵栀黄组的 TBIL 均极显著性低于模型组,表明肝宁颗粒剂及醇提制剂均有明显的退黄作用。肝宁颗粒剂高、中剂量组和茵栀黄组的 ALT,AST,γ-GT,ALP 均显著性低于模型组,表明肝宁颗粒剂有明显的降酶作用。

3.3 SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起重要作用,能清除超氧阴离子自由基(O_2^-)保护细胞免受损伤;其活力的高低与炎症、衰老、消化系统疾病、自身免疫病等有着密切的联系。机体通过酶系统与非酶系统产生氧自由基,后者攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸(PUFA)引发脂质过氧化作用而引起细胞损伤,并因此形成 MDA 等一系列脂质过氧化物;还能通过脂质过氧化物的分解产物引起细胞损伤;因而测试 MDA 的含量常常可以反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度。MDA 的测定常常与 SOD 的测定相互配合,SOD 活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力,而 MDA 的高低有间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度,通过 SOD 与 MDA 的结果分析,对疾病的病因血探讨、诊断、治疗的观察有着重要意义。肝宁颗粒剂高、中剂量组和茵栀黄组的 SOD 均显著高于模型组,并且 MDA 显著低于模型组,进一步证实肝宁颗粒剂的保肝作用。

3.4 实验过程中肝宁颗粒剂高剂量组死亡 1 只,当即解剖,为发现脏器部分等有异常现象,分析与降酶退黄作用没有相关性。

3.5 各项测定指标及肝脏组织学变化均表明,肝宁颗粒剂高、中、低剂量组之间存在量效关系。

3.6 各项测定指标及肝脏组织学变化均表明,茵栀黄注射液的药效略高于肝宁颗粒剂。

3.7 “肝宁颗粒剂对四氯化碳致大鼠实验性肝损伤的保护作用(已发表)”同样证实了肝宁颗粒剂的降酶保肝作用。

致谢:本实验动物模型的建立得到中国人民解放军第 302 医院黄正明教授的指导,特此致谢!

参考文献

- [1] XU S Y. Methodology of Pharmacological Experiment(药理实验方法学)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishing House, 1991: 458.
- [2] HUANG Z, M, YANG X B, CAO W B, et al. Methodology's study on the model of chemical and immunical hepatic injury[J], Pharm J Chin PLA(解放军药学报), 2005, 21(1): 42-46.

收稿日期: 2006-12-25