

## 苦参碱微乳与苦参素胶囊对小鼠急性肝损伤保护作用的对比研究

魏红<sup>1</sup>, 吕建华<sup>1</sup>, 张芮<sup>1</sup>, 宋小莉<sup>2</sup> (1.山东医学高等专科学校, 济南 250002; 2.山东中医药大学, 济南 250014)

**摘要:** 目的 观察苦参碱微乳经皮吸收制剂和口服苦参素胶囊对小鼠四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)肝损伤模型的保护作用, 并比较两组之间的统计学差异。方法 将昆明种小鼠(60只)随机分为正常对照组、模型组、苦参素胶囊阳性对照组和苦参碱微乳制剂高、中、低剂量组。阳性对照组采用苦参素胶囊内容物水溶液(200 mg·kg<sup>-1</sup>)预防性灌胃给药; 苦参碱微乳制剂高、中、低剂量(200, 100, 50 mg·kg<sup>-1</sup>)组预防性经皮给药; 采用 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠急性肝损伤模型。测定各组血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)及肝组织匀浆超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的含量; 取肝组织做病理学检测。结果 与模型组相比, 苦参碱微乳高、中剂量组和苦参素胶囊水溶液组的 ALT 均显著降低( $P<0.05$ ), 肝组织匀浆中 SOD 含量明显升高( $P<0.05$ ), MDA 含量明显降低( $P<0.05$ ), 并减轻肝组织的病理变化。苦参碱微乳高剂量组和苦参素胶囊水溶液组的 AST 均显著降低( $P<0.05$ ); 苦参碱微乳制剂组 ALT, AST 水平及 SOD, MDA 含量以及病理变化与苦参素胶囊水溶液组间无显著性差异。结论 苦参碱微乳经皮给药对小鼠急性 CCl<sub>4</sub> 肝损伤具有保护作用, 与临床用药苦参素胶囊比较无显著性差异。

**关键词:** 苦参碱; 微乳; 苦参素(氧化苦参碱); CCl<sub>4</sub> 肝损伤

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)11-1057-04

### Protective Effect of Matrine Microemulsion and Kushenin Capsule on Acute Hepatic Injury in Mice

WEI Hong<sup>1</sup>, LÜ Jianhua<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>1</sup>, SONG Xiaoli<sup>2</sup> (1. Shandong Medical College, Ji'nan 250002, China; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the protective effects of matrine microemulsion and kushenin capsule on acute hepatic injury by CCl<sub>4</sub> in mice, and compare the difference between the two groups. **METHODS** Kunming mice were separated into six groups randomly, including normal control group, model group, matrine microemulsion groups (high, medium and low-dose) and kushenin capsule positive control group. The mouse model of liver injury induced by CCl<sub>4</sub>. In order to prevent the liver injury, mouse were administered by transdermal delivery with the matrine microemulsion in high, medium and low dose (200, 100, 50 mg·kg<sup>-1</sup>), and were administered by gavage with water solution of kushenin in 200 mg·kg<sup>-1</sup>. After 14 days, the alanine transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST) in serum were determined, and the malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver homogenate were measured. The hepatic histological changes were observed with optical microscope. **RESULTS** Compared with the model group, ALT were significantly lower in the groups of high and medium doses of the matrine microemulsion and the group of water solution of kushenin ( $P<0.05$ ), and the AST were significantly lower in the group of high doses of the matrine microemulsion and the group of water solution of kushenin ( $P<0.05$ ). In addition, pre-treatment of matrine microemulsion significantly prevented the elevation of MDA formation and the depletion of SOD contents in the liver of CCl<sub>4</sub>-injected mice ( $P<0.05$ ). And it could ameliorate the hepatic pathological changes. The ALT, AST, MDA, SOD levels and pathological changes had no significant difference between the two groups of matrine microemulsion and water solution of kushenin. **CONCLUSION** Matrine microemulsion transdermal delivery played an important role in prevention of acute CCl<sub>4</sub> liver injury in mouse. The protective effects on mouse model of liver injury by carbon tetrachloride had no significant difference between the two groups of matrine microemulsion and kushenin capsule.

**KEY WORDS:** matrine; microemulsion; kushenin(oxyamatrine); CCl<sub>4</sub> liver injury

苦参碱和氧化苦参碱是豆科槐属植物苦参 (*Sophora flavescens* Ait.)、广豆根 (*Sophora subprostrata* Chun et T.Chen.)和苦豆子 (*Sophora*

*alopecuroides* L.) 中的主要有效成分, 两者在临床中均被用来治疗肝脏方面的疾患。现代药理学研究证实两者均具有抗炎、抗病毒、抗肝纤维化、

基金项目: 山东省自然科学基金项目(Y2007C078)

作者简介: 魏红, 女, 硕士, 教授, 硕士 Tel: 13953108879

E-mail: bailing8861@sina.com

保肝降酶、抗癌及升高白细胞、抗心律失常等作用<sup>[1-4]</sup>。目前临床上使用的苦参碱制剂主要为注射剂,氧化苦参碱制剂主要为苦参素胶囊,在治疗慢性乙型肝炎方面均取得了一定的效果。但是,苦参碱注射剂在体内消除快,半衰期短,血药浓度不能持久稳定;苦参素胶囊口服半衰期短,血药浓度起伏大,生物利用度低<sup>[5]</sup>。为弥补上述制剂的不足,本课题组研制了苦参碱经皮吸收微乳制剂,经体内药动学试验证明,微乳中的苦参碱以零级动力学透过皮肤进入血液,从而使血药浓度持久稳定,比口服制剂的生物利用度高,便于合理用药。已有文献报道苦参碱和氧化苦参碱(苦参素)对 CCl<sub>4</sub> 所致肝损伤动物模型有肝细胞保护作用<sup>[6-7]</sup>,但苦参碱微乳经皮吸收制剂保护肝损伤作用的研究尚未见报道,本试验通过研究苦参碱微乳制剂与临床用药苦参素胶囊口服制剂对小鼠 CCl<sub>4</sub> 肝损伤模型的影响,探讨苦参碱微乳制剂透皮给药对小鼠 CCl<sub>4</sub> 肝损伤的保护作用,比较苦参碱微乳制剂与苦参素胶囊口服制剂的药效学差异。

## 1 材料

### 1.1 材料

**1.1.1 药品与试剂** O/W 型苦参碱微乳(本课题组研制,批号:20090918,苦参碱含量:7%);苦参素胶囊(江苏正大天晴药业股份有限公司,批号:090506,规格:0.1 g);CCl<sub>4</sub>(上海志锦化工有限公司提供,批号:20090109,使用时将其配成 0.1% 的花生油稀释液);花生油(市场购入);血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,批号依次为:110708015 和 110308029);超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒(由南京建成生物工程研究所提供,批号均为 20090715)。

**1.1.2 实验动物** 昆明种小鼠,♀♂各半,SPF 级[北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2006-0009]。动物饲养于普通级环境,室温 19~26 °C,湿度 40%~70%,日温差≤4 °C,换气次数 10~20 次·h<sup>-1</sup>,昼夜明暗交替时间 12 h。小鼠饲料由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

**1.1.3 主要仪器** JY2001 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);BS300 型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);AY220 型电子分析天平(日本岛津公司)。恒冷箱冷冻切片机

(德国 Leica 公司);MultiSkan MK3 型酶标仪(Thermo Electron 上海有限公司);MDF-382E 型超低温冰箱(日本 Sony 公司);Vibra-Cell 超声波细胞破碎仪(美国 Sonics 生物工程公司);Centrifuge 5804R 低温离心机(德国 Eppendorf 公司);Leica DM4000B 智能型生物光学显微镜(德国 Leica 公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物分组** 昆明种小鼠 60 只,♀♂各半,随机分为 6 组:正常对照组、模型组、苦参碱微乳保护组(分为高、中、低剂量组,给药量分别为 200, 100, 50 mg·kg<sup>-1</sup>)及苦参素胶囊阳性对照组。正常组、模型组及苦参素胶囊阳性对照组分别给予生理盐水(NS)、NS、苦参素(200 mg·kg<sup>-1</sup>)灌胃,给药体积为 0.2 mL·(10 g)<sup>-1</sup>,苦参碱微乳保护组分别给予 200, 100, 50 mg·kg<sup>-1</sup> 经皮给药(小鼠背部用 7.5% Na<sub>2</sub>S 脱毛,生理盐水洗净,24 h 后经皮给苦参碱微乳,医用胶布封固)。各组动物连续给药 14 d,然后,除正常对照组的小鼠外,其余各组小鼠建立 CCl<sub>4</sub> 肝损伤模型,按照文献[8]中方法建立:小鼠按 10 mL·kg<sup>-1</sup> 体重,腹腔注射 0.1% 的 CCl<sub>4</sub> 花生油稀释液,16 h 后处死。

**1.2.2 血清转氨酶检测** 摘眼球取血,常温 4 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,分离上清液。按 ALT 和 AST 试剂盒操作步骤,用全自动生化分析仪测定小鼠血清中 ALT, AST 含量。

**1.2.3 肝组织匀浆生化指标的检测** 称取(0.5±0.1)g 肝组织,置冰 NS 中洗净血液,用滤纸吸去水分,于 9 倍体积匀浆介质(pH 7.4, 0.01 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.001 mol·L<sup>-1</sup> EDTA-2Na, 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 蔗糖, 0.85% NaCl)中剪碎,以振幅 300 μm 超声破碎 10 s,间隔 5 s,如此反复 6 次,所得匀浆液于 4 °C 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min,取上清液。按照试剂盒操作步骤,使用酶标仪测定 SOD 及 MDA 吸光度值。所得 A 值经试剂盒提供的换算公式计算得相应的含量。

**1.2.4 组织病理学观察** 切取小鼠肝右叶部位大致相同的一小块肝组织,中性甲醛固定 24 h,石蜡包埋。4 μm 切片,常规脱蜡后进行苏木素-伊红染色(HE 染色),光学显微镜下观察肝细胞损伤程度。

### 1.3 数据处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 14.0 统计软件进行 *t* 检验, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清转氨酶检测

与正常对照组比较, 模型组小鼠血清中 ALT, AST 含量显著性升高( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 苦参碱微乳中、高剂量组及苦参素胶囊灌胃给药组小鼠血清中 ALT、AST 含量降低, 均具有显著性差异( $P<0.05$ ); 苦参碱微乳低剂量组具有降低血清中 ALT 含量的趋势( $P=0.056$ )。苦参素胶囊与苦参碱微乳间无显著性差异。结果见表 1。

表 1 苦参碱微乳及苦参素胶囊对 CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Effect of matrine microemulsion and kushenin capsule on ALT and AST in the serum from mouse( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ mg·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>
正常对照组	-	66.97±15.95	141.04±28.13
模型组	-	108.44±25.82 <sup>1)</sup>	215.22±57.04 <sup>1)</sup>
苦参素胶囊阳性对照组	200	80.50±14.92 <sup>2)</sup>	166.53±37.18 <sup>2)</sup>
苦参碱微乳高剂量组	200	82.69±20.01 <sup>2)</sup>	150.68±38.99 <sup>2)</sup>
苦参碱微乳中剂量组	100	82.25±20.15 <sup>2)</sup>	170.39±56.91 <sup>2)</sup>
苦参碱微乳低剂量组	50	89.30±14.60	193.11±29.76

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$

Note: Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$

### 2.2 肝脏组织中 SOD 活性及 MDA 含量

苦参碱微乳高、中剂量组 SOD 活性明显高于模型组( $P<0.05$ ), 与苦参素胶囊阳性对照组无统计学差异。苦参碱微乳高、中、低剂量组 MDA 含量明显低于模型组( $P<0.05$ ), 与苦参素胶囊阳性对照组无统计学差异, 见表 2。

表 2 苦参碱微乳及苦参素胶囊对肝组织中 SOD 活性及 MDA 含量的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Effect of matrine microemulsion and kushenin capsule on content of SOD and MDA in mouse hepatic tissue ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ mg·kg <sup>-1</sup>	SOD/ U·mg <sup>-1</sup> prot	MDA/ nmol·mg <sup>-1</sup> prot
正常对照组	-	157.97±15.15	8.04±2.73
模型组	-	68.44± 9.12 <sup>1)</sup>	13.61±4.37 <sup>1)</sup>
苦参素胶囊阳性对照组	200	148.50±12.77 <sup>2)</sup>	8.68±2.51 <sup>2)</sup>
苦参碱微乳高剂量组	200	150.22±12.02 <sup>2)</sup>	8.51±3.19 <sup>2)</sup>
苦参碱微乳中剂量组	100	152.25±13.16 <sup>2)</sup>	8.57±2.72 <sup>2)</sup>
苦参碱微乳低剂量组	50	110.30±10.16	9.52±2.77 <sup>2)</sup>

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P<0.05$

Note: Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$

### 2.3 组织病理学改变

光镜下可见, 正常对照组肝小叶结构完整, 肝细胞索排列整齐而清晰, 围绕中央静脉呈放射状排列, 细胞形态正常, 排列致密, 无炎细胞浸润, 细胞核较大、呈圆形, 见图 1A; 模型组肝细胞边界不清楚, 肝索排列紊乱, 肝小叶细胞核消失或者固缩而深染, 外形不规则, 中央静脉周围肝窦内大量炎细胞浸润, 肝细胞肿胀, 胞浆疏松如气球状, 细胞间隙变大, 多层肝细胞坏死, 见图 1B。苦参碱微乳高剂量组肝小叶结构完整, 肝索排列较规则而清晰, 围绕中央静脉呈放射状排列, 中央静脉周围有少量炎细胞轻微浸润, 细胞形态基本正常, 保护作用明显; 苦参碱微乳中剂量组中央静脉周围肝细胞坏死和炎细胞浸润较模型组明显减轻, 中央静脉区域结构破坏亦较轻, 肝细胞水肿减轻, 有一定保护作用; 苦参碱微乳低剂量组与模型组比, 肝细胞肿胀程度稍有减轻, 但变化不明显, 保护作用不明显, 见图 1C。苦参素胶囊阳性对照组与苦参碱微乳高剂量组病理学改变无明显差异, 保护作用大致相同, 见图 1D。

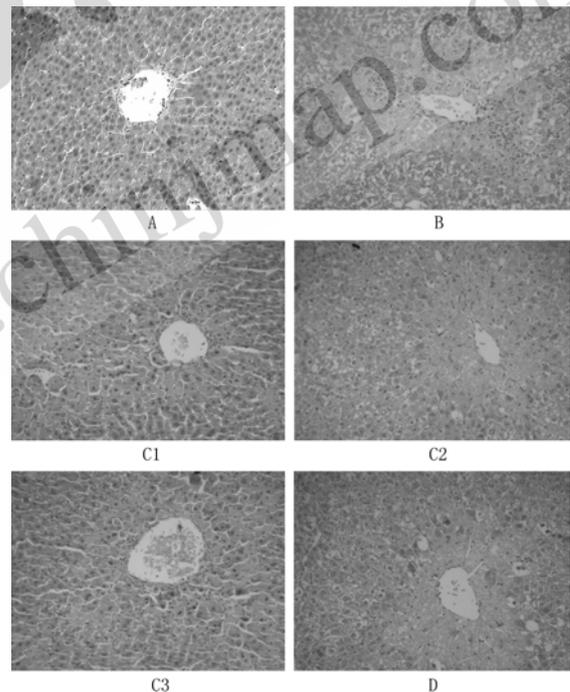


图 1 小鼠肝组织病理学改变(HE, ×200)

A-正常对照组; B-CCl<sub>4</sub> 模型组; C1-苦参碱微乳高剂量组; C2-苦参碱微乳中剂量组; C3-苦参碱微乳低剂量组; D-苦参素胶囊阳性对照组

Fig 1 Histopathological changes of mice livers(HEstaining, ×200)

A-Control; B-CCl<sub>4</sub> treated group; C1-high dose of matrine microemulsion group; C2-medium dose of matrine microemulsion group; C3-low dose of matrine microemulsion group; D-kushenin capsule positive control group

### 3 讨论

CCl<sub>4</sub> 小鼠急性肝损伤模型是研究药物保肝活性的经典模型。其机制主要是: CCl<sub>4</sub> 进入肝脏后经微粒体细胞色素 P450 激活, 生成活泼的三氯甲基自由基 (CCl<sub>3</sub>·) 和过氧化三氯甲基自由基 (CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·)。自由基攻击肝细胞膜磷脂分子, 引起脂质过氧化反应, 并与膜脂质和膜蛋白发生共价结合, 损伤细胞膜的结构和功能, 肝细胞膜的通透性增加, 胞浆内的可溶性酶渗出。肝细胞内 AST, ALT 主要分布于线粒体和细胞质中, 约为血中含量的 5 000 倍, 当肝细胞膜通透性增加时, 细胞内转氨酶因浓度梯度差而渗入血中<sup>[9]</sup>, 因此血清转氨酶升高的量可以反映肝细胞的损伤程度。本试验结果表明, CCl<sub>4</sub> 模型组肝组织破坏严重, 血清 ALT, AST 显著升高, 组织病理学观察证实肝索排列紊乱, 肝细胞肿胀、大片肝细胞坏死。而经过苦参碱微乳高、中剂量经皮给药保护后, 肝索排列得到改善, 肝细胞肿胀、坏死肝细胞明显减少, 血清 ALT, AST 水平亦显著降低, 表明苦参碱微乳经皮给药具有保护肝细胞膜和线粒体、对抗肝损伤的作用, 此作用具有一定剂量依赖性。苦参素胶囊阳性对照组对小鼠肝脏的保护作用与相同剂量的苦参碱微乳高剂量组无统计学差异。

SOD 是体内主要的抗氧化剂和自由基清除剂, 其在肝组织中的含量高低直接反应了肝细胞清除自由基的能力。MDA 作为脂质过氧化反应的分解终产物, 在肝组织中含量的高低不仅反应肝细胞膜脂质过氧化的强弱, 还反应肝脏损伤的程度。本试验结果表明, 苦参碱微乳经皮给药保护组能显著提高肝组织中 SOD 含量, 降低 MDA 含量。表明苦参碱微乳能有效对抗 CCl<sub>4</sub> 产生的脂质过氧化反应, 清除自由基, 发挥保护肝脏的作用。苦参素胶囊阳性对照组对抗 CCl<sub>4</sub> 产生的脂质过氧化反应, 清除自由基的能力与苦参碱微乳高剂量组无统计学差异。

综上所述, 苦参碱微乳经皮给药保护组对

CCl<sub>4</sub> 导致的急性肝脏损伤有明显的保护作用, 该作用有一定剂量依赖性, 其高、中剂量保护作用明显, 低剂量组保护作用不明显。苦参素胶囊对照组对小鼠 CCl<sub>4</sub> 导致的急性肝脏损伤的保护作用, 与相同剂量(实际含苦参碱量)的苦参碱微乳高剂量组相比无统计学差异。

另外, 对于需要长期用药的慢性患者, 苦参碱微乳经皮给药具有使用方便的优点, 更重要的是可以根据治疗的需要, 及时移去给药系统, 大大降低不良反应。从药效学、药动学及临床应用的角度看, 苦参碱微乳经皮给药是一种保肝治疗的优选制剂, 具有良好的新药开发前景。

### REFERENCES

- [1] AI J, GAO H H, HE S Z, et al. Effects of matrine, artemisinin, and tetrandrine on cytosolic [Ca<sup>2+</sup>]i in guinea pig ventricular myocytes[J]. Acta Pharmacol Sin(中国药理学报: 英文版), 2001, 22(6): 512-515.
- [2] ZHANG J P, ZHANG M, ZHOU J P, et al. Antifibrotic effects of matrine on *in vitro* and *in vivo* models of liver fibrosis in rats [J]. Acta Pharmacol Sin(中国药理学报: 英文版), 2001, 22(2): 183-186.
- [3] WU L, ZHOU Z T, ZHOU Y M, et al. *In vitro* activity of matrine against *Candida albicans* biofilms [J]. Shanghai J Stomatol(上海口腔医学), 2009, 18(4): 415-418.
- [4] YUAN X M, SUN H J, MIAO R H, et al. Effect of matrine on NF-κ B and collagen prote in III of rats with pulmonary fibrosis [J]. J Xinxiang Med Coll(新乡医学院学报), 2009, 26(4): 327-330.
- [5] MA T, WEI Y M, HU Q S, et al. Bioequivalent of marine dispersible tablets and capsules[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2006, 25(12): 927-931.
- [6] ZHANG M H, LI L Z, CHEN H, et al. Effect of matrine and oxymatrine of aminotransferase in mice of CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage [J]. Acta Acad Med CPAPF(武警医学院学报), 2002, 11(2): 74-75.
- [7] YU S X, WU J, YANG W D. Protective effects of matrine on immunological liver injury model in BALB/c mice [J]. J Ningxia Med Univ(宁夏医科大学学报), 2009, 31(1): 11-15.
- [8] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Pharmacology Empirical Method(药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Publishing House, 2002: 1346.
- [9] LIANG G H, LI S B. Hepatology(肝脏病学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Publishing House, 2003: 224.

收稿日期: 2010-03-29