

毛茛苣水提取物急性毒性及其保肝作用研究

杨巧丽, 刘燕, 史玉柱, 王雪, 司丽君, 黄华* (新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004)

摘要: 目的 探讨毛茛苣水提取物的急性毒性, 并通过 D-氨基半乳糖酸盐(D-GaIN)、卡介苗联合脂多糖(BCG+LPS)和异硫氰酸-1-萘酯(ANIT)致小鼠肝损伤实验研究探讨毛茛苣水提取物的保肝作用。方法 急性毒性试验: 将小鼠随机分为给药组和空白对照组, 并观察记录 14 d 内小鼠死亡情况、体质量和摄食量等, 14 d 后处死并做大体解剖, 观察其各主要脏器是否异常。保肝实验: 将小鼠分成空白对照组、模型组、阳性对照组(联苯双酯组/护肝片组)及毛茛苣水提取物 0.13 g·kg⁻¹ 和 0.26 g·kg⁻¹ 剂量组, 采用 D-GaIN 建立化学性肝损伤模型, BCG+LPS 建立免疫性肝损伤模型, ANIT 建立小鼠黄疸性肝炎模型, 经眼球采血, 测定血清中 ALT、AST、总胆红素(total bilirubin, TBIL)和直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)水平, 同时测定肝脏指数, 并取肝脏做常规 HE 切片观察。结果 小鼠单次最大给药量为 150 g(生药)·kg⁻¹ 未出现死亡及其他急性毒性反应。保肝实验: 在 D-GaIN 致小鼠化学性肝损伤模型中, 毛茛苣水提取物 0.26 g·kg⁻¹ 剂量组能显著抑制 D-GaIN 所致的血清 ALT、AST 和 TBIL 活性升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 在免疫性肝损伤模型中毛茛苣水提取物各剂量组均可显著抑制 BCG+LPS 所致的小鼠血清 ALT、AST 活性升高($P<0.01$), 但对血清中 TBIL 的含量未见明显改变。在黄疸性肝炎模型中, 毛茛苣水提取物 0.26 g·kg⁻¹ 剂量组可显著抑制 ANIT 所致的小鼠血清 ALT、AST、TBIL 和 DBIL 活性升高($P<0.01$)。此外毛茛苣水提取物 0.13 g·kg⁻¹ 剂量组对小鼠血清中 TBIL 和 DBIL 的含量也有显著的抑制作用($P<0.01$)。肝脏病理切片结果显示毛茛苣水提取物各剂量组对本实验中的 3 种肝损伤均有明显改善作用。结论 毛茛苣水提取物以最大剂量 150 g(生药)·kg⁻¹ 给药对小鼠未见明显急性毒性反应, 对实验性肝损伤具有较好的保护作用。

关键词: 毛茛苣水提取物; D-氨基半乳糖酸盐; 卡介苗联合脂多糖; 肝损伤; 急性毒性

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-7693(2017)07-0957-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.006

引用本文: 杨巧丽, 刘燕, 史玉柱, 等. 毛茛苣水提取物急性毒性及其保肝作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 957-963.

Acute Toxicity Research of *Cichorium Glandulosum* Aqueous Extracts and It's Protective Effect on Acute Liver Injury Mice

YANG Qiaoli, LIU Yan, SHI Yuzhu, WNAG Xue, SI Lijun, HUANG Hua* (Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To detect the acute toxicity of *Cichorium glandulosum* Boiss.et Huet aqueous extracts(MS), and to research the protective effect of MS on acute liver injury mice induced by D-GaIN, BCG+LPS and ANIT. **METHODS** The mice were randomly divided into the treatment group and the normal group in acute toxicity test. The mortality, changes of the body weigh and feed intake of animals were measured. After 14 d, all mice were killed and grossly anatomized, then the internal organs were observed. Liver-protective experiment: Mice were divided into normal group, model group, positive drug group, the low and high dose groups of MS(0.13, 0.26 g·kg⁻¹). Acute liver injury mice model were induced by D-GaIN, BCG+LPS and ANIT. Then blood from eyeball was used to examine level of serum ALT, AST, TBIL and DBIL. The liver index was determined. And the pathologic section of the liver was stained for HE expression. **RESULTS** Acute toxicity test in mice to the single dose of maximum dose of 150 g·kg⁻¹ without death and other acute toxicity reaction. In D-GaIN induced chemical liver injury model, MS significantly reduced D-GaIN induced ALT, AST and TBIL at 0.26 g·kg⁻¹ ($P<0.05$ or $P<0.01$). In the immune liver injury mode, MS significantly ($P<0.01$) reduced BCG+LPS induced ALT, AST at 0.13 and 0.26 g·kg⁻¹, but had no influence on TBIL. In the model of jaundice induced liver injury, MS significantly reduced ANIT induced ALT, AST, TBIL and DBIL at 0.26 g·kg⁻¹ ($P<0.01$). In addition, MS significantly reduced TBIL and DBIL at 0.13 g·kg⁻¹ ($P<0.01$). Pathologic examination showed liver injury had significantly improved in each treatment groups. **CONCLUSION** There are not exist the acute toxicity of MS in treatment mice with maximum dose 150 g·kg⁻¹. And, MS has a protective effect on acute liver injury.

KEY WORDS: *Cichorium glandulosum* Boiss.et Huet aqueous extracts; D-GaIN; BCG+LPS; liver injury; acute toxicity

基金项目: 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(KY2014061)

作者简介: 杨巧丽, 女, 硕士, 高级实验师 Tel: (0991)2322783 E-mail: qiaoliyang111108@163.com *通信作者: 黄华, 女, 硕士, 研究员 Tel: (0991)2812061 E-mail: huangh6505@163.com

菊苣为菊科植物毛菊苣(*Cichorium glandulosum* Boiss.et Huet)或菊苣(*Cichorium intybus* L.)的干燥地上部分或根,为中国药典 2015 年版^[1]收载品种维吾尔医习用药材,功能主治为清肝利胆,健胃消食,利尿消肿,用于湿热黄疸等。据维吾尔族多部医药典籍记载维吾尔医习用菊苣水提取物治疗肝炎、胆囊炎等疾病,其中单方制剂的代表药物有清热卡森颗粒,复方制剂的代表药物有炎消迪娜儿糖浆、护肝布祖热颗粒及复方木尼孜其颗粒等^[2]。但查阅菊苣的相关文献^[3-8]发现,该药材的现代药理学研究多集中于菊苣有机溶剂提取物保肝、抗菌、降血糖、调血脂和抗高尿酸血症等作用上,关于菊苣水提取物的毒性和保肝作用的系统研究却鲜有报道,因此本课题针对毛菊苣水提物进行了急性毒性的初步研究,并采用了 3 种实验性小鼠肝损伤模型,观察其保肝降酶作用,以期毛菊苣水提取物的临床应用提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 动物和药材试剂

昆明种 SPF 级小鼠,♀♂各半,体质量 18~22 g,由新疆实验动物研究中心提供,实验动物质量合格证号:No.65000200000380, No.65000200000392, No.65000200000425; 实验动物设施使用证明编号: No.00000502, No.00000504, No.00000763; 实验动物生产许可证号: SCXK(新)2011-0001。

毛菊苣地上部分样品采自新疆吉木萨尔县泉子镇十八户村,药材经新疆药物研究所维药室何江副研究员鉴定。联苯双酯滴丸(浙江万邦药业股份有限公司,批号: A02130409,规格: 1.5 mg); 护肝片(黑龙江葵花药业股份有限公司,批号: 201405101,规格: 每片 0.35 g); D-氨基半乳糖(D-GaIN,美国 Sigma 公司,批号: 101596512); 氢氧化钠(上海德诺化学试剂有限公司,批号: 20100422); ALT、AST 试剂盒均购自四川迈克生物科技股份有限公司(批号分别为 0715031, 0715021); TBIL、DBIL 试剂盒均购自德赛诊断系统(上海)有限公司(批号分别为 07255, 07261); 卡介苗(BCG, 中国生物制品药品检定所,批号: 2013-1); 脂多糖(LPS, 美国 Sigma 公司,批号: L-2880); 异硫氰酸-1-萘酯脂多糖(ANIT, 成都贝斯特试剂有限公司,批号: T1207441)。

1.2 仪器

YP 型电子天平(上海菁海仪器有限公司); BS200S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); 80-2 离心沉淀器(江苏省金坛市医疗仪器厂); 日立 7600-110 型全自动生化分析仪(日本株式会社日立高新技术)。

2 方法

2.1 毛菊苣水提取物的制备及给药剂量设定

取毛菊苣地上部分以 10 倍量水回流提取,每次 1.5 h,连续提取 3 次后合并提取液,浓缩、真空干燥得毛菊苣水提取物,其中提取物得率为 10.7%。参考中国药典 2015 年版一部记载的临床成人每天 9~18 g(生药)的服用量,即临床成人每日用量为 0.1~0.3 g·kg⁻¹。肝损伤实验分别取 9 g 和 18 g 水提取物作为本实验的低、高剂量,并根据毛菊苣水提取物的出膏率及人和动物体表面积换算表折算成小鼠每日口服剂量为 0.13, 0.26 g·kg⁻¹; 护肝片和联苯双酯按人和动物体表面积换算表折算成小鼠每日口服剂量分别为 0.5, 0.15 g·kg⁻¹。

2.2 小鼠急性毒性试验

2.2.1 预实验 选取 10 只昆明小鼠,♀♂各半,体质量 18~22 g,禁食 12 h,不禁水。毛菊苣水提取物制成最大给药浓度(37.5%)药液,以 0.04 mL·g⁻¹灌胃给药 1 次,观察 24 h,如未见死亡,且精神与活动状态亦无异常可进入正式实验。

2.2.2 最大给药量的测定 选取健康昆明小鼠 20 只,♀♂各半,体质量 18~22 g,随机分为空白对照组(给予等量的蒸馏水)、毛菊苣水提取物组,每组 10 只。毛菊苣水提取物以蒸馏水配成最大给药浓度(37.5%)的溶液,按 0.04 mL·g⁻¹灌胃给药,每天 1 次。观察记录给药后 14 d 内动物全身状况及局部反应,第 14 天各组动物称重后处死,作大体解剖检查,并对肉眼可见异常的器官进行组织病理学检查。

2.3 保肝作用实验

2.3.1 对 D-GaIN 致小鼠急性肝损伤的影响^[9] 取昆明小鼠 60 只,♀♂各半,体质量 19~23 g,随机分为空白对照组、模型组、联苯双酯组(0.15 g·kg⁻¹)、毛菊苣水提取物低、高剂量组(0.13, 0.26 g·kg⁻¹),每组 12 只。各给药组均按设定剂量灌胃给药,空白对照组和模型组给予等体积 0.5%羧甲基纤维素钠,每天 1 次,连续 3 d。于第 3 天给药后 1.5 h,除空白对照组外,其余各组小鼠均腹腔注射 8%

D-GaIN 生理盐水溶液 $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 空白对照组腹腔注射等体积生理盐水, 20 h 后摘眼球取血并分离血清, 采血前禁食 12 h, 不禁水, 测定血清中 ALT、AST、TBIL 水平, 同时解剖取肝脏并称重, 计算肝指数, 并取肝右叶相同部位组织固定于 10 % 甲醛溶液, 进行病理学检查。肝指数=肝脏质量/体质量 $\times 100$ 。

将切片按病理损伤程度分成 4 级: “-”, 未见明显病理改变; “+”, 偶见散在单个肝细胞坏死, 或伴汇管区纤维组织增生, 嗜酸性小体形成; “++”, 可见少量肝细胞坏死灶(3 个及以下), 或伴汇管区纤维组织增生, 嗜酸性小体形成; “+++”, 可见大量散在、灶状肝细胞坏死灶(3 个以上), 或伴汇管区纤维组织增生, 嗜酸性小体形成。

2.3.2 对 BCG+LPS 致小鼠免疫性肝损伤的影响^[10] 取昆明种小鼠 60 只, 体质量 18~22 g, ♀♂ 兼用, 按“2.3.1”项下方法分组。各给药组均按设定剂量灌胃给药, 空白对照组和模型组给予等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠, 各组每天 1 次, 连续给药 10 d。除空白对照组外, 其余各组小鼠在首次给药前均尾静脉注射 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BCG 生理盐水溶液 0.2 mL, 空白对照组尾静脉注射等体积生理盐水。于给药第 10 天, 除空白对照组外, 其余各组小鼠均尾静脉注射 LPS 生理盐水溶液 $5 \mu\text{g}$, 空白对照组尾静脉注射等体积生理盐水, 16 h 后, 摘眼球取血并分离血清, 采血前禁食 12 h, 不禁水, 测定血清 ALT、AST、TBIL 水平; 解剖取肝脏并称重, 计算肝指数。并取肝右叶相同部位组织固定于 10 % 甲醛溶液, 按“2.3.1”项下方法进行病理学检查。

2.3.3 对 ANIT 致小鼠肝损伤的影响 取昆明种小鼠 72 只, ♀♂ 各半, 体质量 22~25 g, 按“2.3.1”项下方法分组及给药, 护肝片和联苯双酯($0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)为阳性对照药。于第 2 天给药后 1.5 h, 除空白对照组外, 其余各组小鼠均灌胃给药 ANIT 大豆油溶液 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。空白对照组给予等体积大豆油。48 h 后, 各组小鼠摘眼球取血并分离血清, 采血前禁食 12 h, 不禁水, 测定血清 ALT、AST、TBIL、DBIL 水平, 同时解剖取肝脏并称重, 计算肝指数; 取肝右叶相同部位组织固定于 10 % 甲醛溶液, 按“2.3.1”项下方法进行病理学检查。

2.4 统计学处理

运用 SPSS 13.0 统计软件进行处理, 计量资料

比较采用 t 检验, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。肝损伤实验中肝脏病理切片统计结果采用 Wilcoxon 秩和检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠急性毒性试验结果

试验观察期内对照组和给药组动物均未出现死亡; 外观体征、行为活动及饮食等均未见异常; 实验结束时给药组动物体质量为 $(36.7 \pm 3.9) \text{ g}$, 对照组体质量为 $(38.4 \pm 5.5) \text{ g}$, 且给药组体质量与对照组比较无显著性差异, 大体解剖检查给药组与对照组组织脏器比较亦未发现有明显异常。本品以最大给药浓度(37.5%)、最大给药容积($0.04 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$)给小鼠 1 d 灌胃 1 次, 最大给药量为 $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (按生药计为 $150 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 为 70 kg 成人 18 g(生药)每日每千克体质量用量的 500 倍, 连续观察 14 d 内未出现死亡及其他急性毒性反应。提示本提取物在此剂量下无明显毒性, 用药安全。

3.2 保肝作用实验

3.2.1 毛茛苣水提取物对 D-GaIN 致小鼠急性肝损伤的影响 与空白对照组比较, 模型组小鼠血清 ALT、AST 水平均显著升高($P < 0.01$), 表明造模成功。与模型组比较, 毛茛苣水提取物 $0.13 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组可显著降低模型小鼠血清 ALT 水平($P < 0.05$), $0.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组可显著降低模型小鼠血清 ALT、AST 和 TBIL 的水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。此外, 模型组肝脏系数显著升高, 但各给药组对升高的肝脏系数未见明显改变, 结果见表 1。

病理检查结果显示, 空白对照组未见明显病理改变。模型组小鼠肝细胞均出现病变, 主要以肝细胞坏死为主, 可见单个/少量肝细胞坏死灶, 嗜酸性小体形成。偶见大量点状或灶状肝细胞坏死灶, 灶内大量炎细胞浸润。与模型组比较, 各给药组均表现出具有减轻 D-GaIN 致急性肝损伤小鼠肝脏组织学病变程度的作用。其中联苯双酯组病变程度明显减轻, 表现为均未见明显病理改变; 毛茛苣水提取物表现为低剂量组偶见肝细胞点状坏死, 高剂量组效果较明显, 表现为均未见明显病理改变, 结果见表 2 和图 1(HE 染色, $200\times$)。统计结果显示, 与模型组比较, 联苯双酯和毛茛苣水提取物各剂量组对 D-GaIN 所致小鼠的病理改变有明显的改善作用($P < 0.01$)。样本损失原因: 个别样本血清量不足, 或数据离散性大, 在 $\bar{x} \pm 4s$ 范围外舍弃。

表 1 毛菊苣水提取物对 D-GaIN 致肝损伤小鼠血清 ALT、AST、TBIL 及肝指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts on the levels of serum ALT, AST, TBIL and liver index in liver injury mice induced by D-GaIN($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TBIL/ μ mol·L ⁻¹	肝指数
空白对照组	12	25.4±4.4	109.0±17.2	1.4±0.3	5.47±0.4
模型组	11	1 151.3±328.1 ¹⁾	1 404.9±565.1 ¹⁾	2.9±1.9 ¹⁾	6.27±0.4 ¹⁾
联苯双酯组	11	114.4±76.0 ³⁾	567.8±348.5 ³⁾	1.1±0.5 ³⁾	6.23±0.6
毛菊苣水提取物低剂量组	7	733.7±361.9 ²⁾	952.3±365.3	2.5±2.4	6.12±0.6
毛菊苣水提取物高剂量组	9	382.1±181.4 ³⁾	457.6±192.2 ³⁾	1.5±0.7 ²⁾	6.00±0.6

注：与空白对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.05$ ，³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表 2 毛菊苣水提取物对 D-GaIN 致肝损伤小鼠肝脏病理变化的影响

Tab. 2 The effect of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts on liver pathologic in liver-injury mice induced by D-GaIN

组 别	剂量/ g·kg ⁻¹	n	肝组织病变程度			
			-	+	++	+++
空白对照组	-	12	12	-	-	-
模型组 ¹⁾	-	11	-	5	5	1
联苯双酯组 ²⁾	0.15	11	11	-	-	-
毛菊苣水提取物低剂量组 ²⁾	0.13	7	4	3	-	-
毛菊苣水提取物高剂量组 ²⁾	0.26	9	9	-	-	-

注：与空白对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

3.2.2 毛菊苣水提取物对 BCG+LPS 致小鼠免疫性肝损伤的影响 与空白对照组比较，模型组小鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平和肝脏系数均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，表明造模成功。与模型组比较，毛菊苣水提取物各剂量组均可显著降低模型小鼠血清 AST 和 ALT 水平($P<0.01$)。但

各给药组对升高的 TBIL 和肝脏系数未见明显改变，结果见表 3。

病理检查结果显示，空白对照组未见明显病理改变，模型组小鼠肝细胞均出现病变，主要以肝细胞坏死为主，可见少量或大量点状肝细胞坏死，嗜酸性小体形成，部分灶内大量炎细胞浸润。与模型组比较，联苯双酯组病变程度有所减轻，表现为偶见散在单个肝细胞坏死，或可见少量肝细胞坏死灶或伴汇管区纤维，嗜酸性小体形成；毛菊苣水提取物各剂量组对 BCG+LPS 所致受损肝细胞均有一定减轻作用，低剂量组呈现中度损伤，部分肝细胞可见点状坏死、灶状坏死；高剂量组小鼠肝细胞轻度损伤，部分肝细胞散在点状坏死，个别可见灶状坏死。表 4 统计结果显示，与模型组比较，毛菊苣水提取物各剂量组和联苯双酯对小鼠 D-GaIN 所致的病理改变均有明显的改善作用($P<0.05$)，且毛菊苣水提取物高剂量组对受损肝脏病理改变的改善作用优于联苯双酯组($P<0.05$)。病理图片见图 2(HE 染色，200 $\times$)。样本损失原因：个别样本血清量不足，或数据离散性大，在 $\bar{x} \pm 4s$ 范围外舍弃。

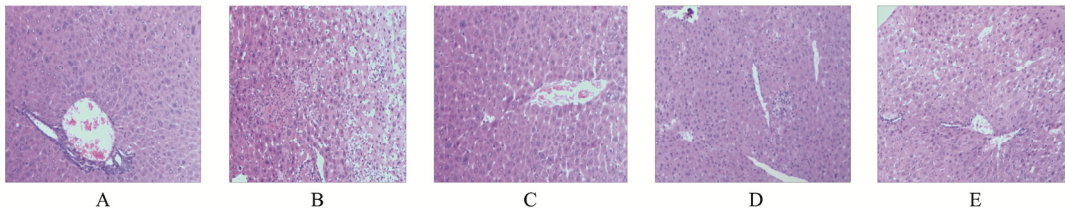


图 1 毛菊苣水提取物对 D-GaIN 致小鼠急性肝损伤实验肝脏组织的影响(HE, 200 $\times$)

A-空白对照组；B-模型组；C-联苯双酯组；D-毛菊苣水提取物低剂量组；E-毛菊苣水提取物高剂量组。

Fig. 1 Effect of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts on liver pathology in induced by D-GaIN liver-injured mice(HE, 200 $\times$)

A-normal group; B-model group; C-Huguang tablets group; D-low dose group of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts; E-high dose group of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts.

表 3 毛菊苣水提取物对 BCG+LPS 致肝损伤小鼠血清 ALT、AST、TBIL 及肝指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effect of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts on serum ALT, AST, TBIL and liver index in liver injury mice induced by BCG+LPS($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹	肝指数
空白对照组	12	26.3±6.9	110.8±22.9	1.4±0.3	5.28±0.5
模型组	10	535.9±178.6 ²⁾	707.5±239 ²⁾	2.1±1.2 ¹⁾	7.48±0.9 ²⁾
联苯双酯组	8	131.9±116.4 ⁴⁾	397.6±289.2 ³⁾	2.1±1.2	7.72±1.4
毛菊苣水提取物低剂量组	11	216.6±157.2 ⁴⁾	282.3±118.9 ⁴⁾	1.6±0.3	7.16±1.1
毛菊苣水提取物高剂量组	11	190.1±148.4 ⁴⁾	267.3±186.4 ⁴⁾	1.7±0.5	7.16±0.7

注：与空白对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ，²⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，³⁾ $P<0.05$ ，⁴⁾ $P<0.01$ 。
Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

表 4 毛菊苣水提取物对 BCG+LPS 致肝损伤小鼠肝脏病理变化的影响

Tab. 4 The effect of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts on liver pathologic in liver-injury mice induced by BCG+LPS

组 别	剂量/ g·kg ⁻¹	n	肝组织病变程度			
			-	+	++	+++
空白对照组	-	12	12	-	-	-
模型组 ¹⁾	-	10	-	-	4	6
联苯双酯组 ²⁾	0.15	8	-	1	4	3
毛菊苣水提取物低剂量组 ²⁾	0.13	11	1	2	2	6
毛菊苣水提取物高剂量组 ²⁾³⁾	0.26	11	1	4	5	1

注：与空白对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ，与模型组比较，²⁾ $P<0.05$ ；与联苯双酯组比较，³⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with bifendate group, ³⁾ $P<0.05$.

3.2.3 毛菊苣水提取物对 ANIT 致小鼠肝损伤的影响 血清转氨酶及肝脏系数结果见表 5，与空白对照组比较，模型组小鼠血清 ALT、AST、TBIL、DBIL 水平均显著升高($P<0.01$)，表明造模成功。与模型组比较，毛菊苣水提取物 0.26 g·kg⁻¹ 剂量组可显著降低模型小鼠血清 AST、ALT、TBIL、DBIL 水平($P<0.01$)。此外，与对照组比较，模型

组肝指数显著升高($P<0.01$)，且毛菊苣水提物给药组对升高的肝指数有明显改善作用。

病理检查结果显示，空白对照组未见明显病理改变。模型组小鼠肝细胞均出现病变，主要表现为肝细胞坏死为主，偶见或可见点状肝细胞坏死，嗜酸性小体形成。与模型组比较，护肝片组病变程度较轻，表现为偶见点状肝细胞坏死/可见少量肝细胞坏死灶，嗜酸性小体形成；毛菊苣水提取物各剂量组均对 ANIT 所致受损肝细胞有一定减轻作用，0.13 g·kg⁻¹ 剂量组呈现中度损伤，表现为 2 例(2/7 例)肝细胞未见明显病理性改变；偶见点状肝细胞坏死/可见少量肝细胞坏死灶，嗜酸性小体形成；个别可见大量点状或灶状肝细胞坏死灶，灶内大量炎细胞浸润。0.26 g·kg⁻¹ 剂量组小鼠肝细胞呈现轻度损伤，部分(4/8 例)小鼠肝细胞未见明显病理改变，部分小鼠肝细胞轻度损伤，表现为偶见点状肝细胞坏死/可见少量肝细胞坏死灶，嗜酸性小体形成结果见表 6，病理图片见图 3(HE 染色，200×)。样本损失原因：个别样本血清量不足，或数据离散性大，在 $\bar{x} \pm 4s$ 范围外舍弃。

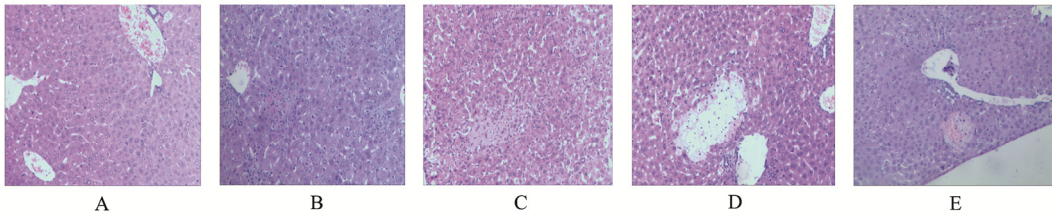


图 2 毛菊苣水提取物对 BCG + LPS 致小鼠急性肝损伤实验肝脏组织的影响(HE, 200×)

A-空白对照组；B-模型组；C-联苯双酯组；D-毛菊苣水提取物低剂量组；E-毛菊苣水提取物高剂量组。

Fig. 2 Effect of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts on liver pathology in induced by BCG+LPS liver-injured mice(HE, 200×)

A-normal group; B-model group; C-Hugan tablets group; D-low dose group of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts; E-high dose group of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts.

表 5 毛菊苣水提取物对 ANIT 致肝损伤小鼠血清 ALT、AST、TBIL、DBIL 及肝指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effect of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts on serum ALT, AST, TBIL and liver index in liver injury mice induced by ANIT($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹	DBIL/μmol·L ⁻¹	肝指数
空白对照组	—	12	30.3±5.6	122.1±24.0	2.3±0.2	0.9±0.1	5.31±0.5
模型组	—	8	653.5±210.2 ¹⁾	1 474.3±607.2 ¹⁾	68.5±45.3 ¹⁾	48.0±30.5 ¹⁾	6.83±0.5 ¹⁾
护肝片组	0.5	9	418.3±185.9 ²⁾	935.7±453.3	23.2±24.0 ²⁾	16.6±18.2 ²⁾	5.82±0.6
联苯双酯组	0.15	10	547.8±197.3	2 219.5±671.8 ²⁾	159.6±46.4 ³⁾	109.3±30.6 ³⁾	6.11±0.8 ²⁾
毛菊苣水提取物低剂量组	0.13	7	424.9±247.4	771.6±414.5 ²⁾	9.3±7.6 ³⁾	7.1±6.0 ³⁾	5.70±0.6 ³⁾
毛菊苣水提取物高剂量组	0.26	8	70.3±36.1 ³⁾⁵⁾	180.4±57.3 ³⁾⁵⁾	1.8±0.6 ³⁾⁴⁾	1.0±0.2 ³⁾⁴⁾	5.81±0.7 ³⁾

注：与空白对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.05$ ，³⁾ $P<0.01$ ；与护肝片组比较，⁴⁾ $P<0.05$ ，⁵⁾ $P<0.01$ 。

Note: compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; compared with Huguang tablets group, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$.

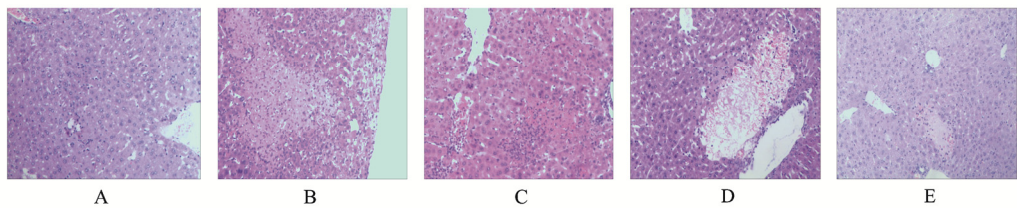


图 3 毛菊苣水提取物对 ANIT 致小鼠肝损伤实验肝脏组织的影响(HE, 200×)

A—空白对照组；B—模型组；C—联苯双酯组；D—毛菊苣水提取物低剂量组；E—毛菊苣水提取物高剂量组。

Fig. 3 Effect of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts on liver pathology in induced by ANIT liver-injured mice(HE, 200×)

Note: A—normal group; B—model group; C—Huguang tablets group; D—low dose group of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts; E—high dose group of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts.

表 6 毛菊苣水提取物对 ANIT 致肝损伤小鼠肝脏病理变化的影响

Tab. 6 Effect of *Cichorium glandulosum* aqueous extracts on liver pathologic in ANIT induced liver-injury mice

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	n	病理损伤程度分级			
			—	+	++	+++
空白对照组	—	12	12	—	—	—
模型组 ¹⁾	—	8	1	3	4	—
护肝片组	0.5	9	4	1	2	2
毛菊苣水提取物低剂量组	0.13	7	2	1	1	3
毛菊苣水提取物高剂量组	0.26	8	4	2	2	—

注：与空白对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$.

4 讨论

维吾尔医习用毛菊苣水提取物可用于清肝利胆、湿热黄疸等，本品虽已应用多年但未见其不良反应和较系统保肝作用的实验研究报道，故本课题依据 2013 年《药物单次给药毒性指导原则(征求意见稿)》设计了其对小鼠的单次给药毒性实验。实验结果表明：本品以最大给药浓度(37.5%)、最大给药容积(0.04 mL·g⁻¹)给予昆明小鼠 1 日灌胃 1 次，最大给药量为 15 g·kg⁻¹ (按生药计为 150 g·kg⁻¹)，为 70 kg 成人 18 g(生药)每日每千克

体质量用量的 500 倍，14 d 内未出现死亡及其他急性毒性反应。提示本提取物在此剂量下无明显毒性，用药安全。

此外课题组采用了目前常用的 D-GaIN 肝损伤模型、BCG+LPS 免疫性肝损伤模型和 ANIT 致小鼠黄疸型肝炎模型，观察了毛菊苣水提取物的保肝、退黄疸作用。

其中，D-GaIN 通过产生大量自由基引起脂质过氧化造成肝细胞损伤，与临床上病毒性肝炎的肝脏病理变化相似^[11]。在本实验中，阳性对照药选用联苯双酯，结果显示：与模型组比较，毛菊苣水提取物低剂量组可显著降低模型小鼠血清 ALT 水平($P<0.05$)，高剂量组和联苯双酯组均可显著降低模型小鼠血清中 ALT、AST 和 TBIL 的水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。病理组织检查方面，毛菊苣水提取物各剂量组和联苯双酯均具有减轻 D-GaIN 致急性肝损伤小鼠肝脏组织学病变程度的作用。且毛菊苣水提取物高剂量和联苯双酯在保护肝脏病理组织损伤方面的作用相当。

BCG+LPS 免疫性肝损伤模型中现代理论推测其损伤机制为单核细胞或巨噬细胞在致炎因子的作用下，向肝脏积聚并致敏。致敏的巨噬细胞

在接触 LPS 后, 会释放一些毒性介质如自由基、TNF- α 、IL-1 等, 造成肝细胞的损伤^[12]。在实验中, 联苯双酯为阳性对照药, 结果显示: 与模型组比较, 联苯双酯和毛菊苣水提取物各剂量组均可显著降低模型小鼠血液中 ALT 和 AST 的水平 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。病理组织检查方面, 各给药组均表现出具有减轻 BCG+LPS 致急性肝损伤小鼠肝脏组织学病变程度的作用。且毛菊苣水提取物高剂量在保护肝脏病理组织损伤方面的作用优于联苯双酯。

ANIT 是一种间接肝毒剂, 它主要损伤肝内胆管上皮细胞, 引起毛细血管增生及小叶间胆管周围产生炎症, 从而造成胆管阻塞, 形成明显的胆汁淤积, 并伴以点状坏死为主的肝实质细胞损害, 产生胆汁淤积性黄疸, 出现高胆红素血症和胆汁分泌减少^[13]。本实验研究发现, 联苯双酯对该模型并没有降酶作用, 相反小鼠血清中 AST、TBIL 和 DBIL 的含量略有升高(结果见表 5), 本实验观察到的现象与 2015 年肖小华报道^[14]基本一致, 由此可确证联苯双酯不宜作为该模型的阳性对照药。同时本实验设定的另一阳性对照药护肝片组对模型动物血清中明显升高的 ALT 和胆红素均有显著的抑制作用($P<0.05$)。与护肝片组比较, 毛菊苣水提取物高剂量组小鼠血清中转氨酶和胆红素水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果提示毛菊苣水提取物对 ANIT 所致小鼠急性肝损伤有显著的保肝降酶退黄作用, 且作用优于护肝片组。

综上, 毛菊苣水提取物对小鼠 D-GaIN 肝损伤模型、BCG+LPS 免疫性肝损伤模型和 ANIT 黄疸型肝炎模型小鼠血清中的转氨酶、胆红素含量和肝脏病理损伤均有较好的改善作用, 确证毛菊苣水提取物具有较好的保肝活性, 这一结果为维吾尔医将毛菊苣水提物用于保肝降酶提供了一定的实验依据, 而关于其保肝活性的作用机制, 仍有待于进一步的研究。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 310.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准-维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 189, 136, 164, 159.
- [3] 艾尔肯·米吉提, 帕尔哈提·吐尔逊, 古丽努尔·塔力甫. 不同种植基地菊苣药材的质量对比研究[J]. 中国民族医药杂志, 2011, 17(9): 82-85.
- [4] QIN D M, HU L P, NIE Y R, et al. Effects of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. on expression of fibronectin, Smad3, IGFBP-rp1, and TGF β 1 in a liver fibrosis rat model [J]. Chin J Hepatol(中华肝病杂志), 2013, 21(10): 776-777.
- [5] WANG Y, LIN Z J, NIE A Z, et al. Effect of Chinese herb chicory extract on expression of renal transporter Glut9 in rats with hyperuricemia[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(5): 958-963.
- [6] QIN D M, WEN Z P, WANG X C, et al. Protective effects of *Cichorium glandulosum* Boiss extracts on liver fibrosis in rats [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2013, 33(18): 1480-1483.
- [7] YANG F, LUO Y Q, XUE G P, et al. Protective effects and mechanism of 90% ethanol extract of different roots and seeds compatibility proportion of *Cichorium glandulosum* on acute liver injuries in mice [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2015, 35(15): 1352-1356.
- [8] ZHANG B Y, ZHANG B, LIN Z J, et al. Chicory extract's influence on gut bacteria of abdominal obesity rat [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39(11): 2081-2085.
- [9] YANG Y, ZHANG Y P, LIANG G Y. Protective effect of Xiaohuaqingfengteng capsule on acute liver injury mice and its acute toxicity test [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30 (11): 1166-1170.
- [10] ZHU Y K, WU H H, WANG L M, et al. Effect of baicalin on immune hepatic injury induced by BCG plus LPS in mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2005, 22(1): 14-17.
- [11] WANG X D, LIU Y G, SU W W. Protective effect of SDS on acute injury in mice liver [J]. Chin Med Mater(中药材), 2004, 27(3): 198-199.
- [12] 陈奇. 中药药效研究思路与方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 499, 505, 507.
- [13] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 458-462.
- [14] XIAO X H, YAO M, XU L Y, et al. The protective effects of bifendate and oleanolic acid on acute hepatic injury induced by ANIT in mice and rat [J]. Lab Animal Sci(实验动物科学), 2015, 32(1): 20-24.

收稿日期: 2017-03-01

(本文责编: 曹粤锋)