

本文引用:周代俊,何述金,何承东,周邦维,王宇红.九味肝泰片对D-氨基半乳糖所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J].湖南中医药大学学报,2018,38(10):1125-1128.

九味肝泰片对D-氨基半乳糖所致大鼠急性肝损伤的保护作用

周代俊¹,何述金¹,何承东¹,周邦维¹,王宇红²

(1.湖南新汇制药股份有限公司,湖南长沙410200;2.湖南中医药大学,湖南长沙410208)

〔摘要〕目的 探讨九味肝泰片对D-氨基半乳糖(D-GalN)所致大鼠急性肝损伤的保护作用。方法 采用腹腔注射D-GalN的方法复制急性肝损伤大鼠模型,并随机分为6组:模型组,联苯双酯片组(13.5 mg/kg),九味肝泰胶囊组(0.4 g/kg),九味肝泰片高、中、低剂量组(0.8,0.4,0.2 g/kg),另设正常组。连续灌胃给药7 d后,采用生化分析法检测各组大鼠血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性和肝糖原含量,同时检测肝匀浆液中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。结果 与正常组比较,模型组大鼠血清AST和ALT显著升高($P<0.01$);与模型组比较,九味肝泰片能明显降低肝损伤大鼠血清ALT、AST活性及肝组织MDA水平,提高肝糖原含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$);同时与九味肝泰胶囊比较,九味肝泰片还能明显降低GSH-Px活性($P<0.05$)。结论 九味肝泰片对D-GalN所致急性肝损伤大鼠具有明显的保护作用,其作用机制可能与抗氧化有关,且部分指标效果优于九味肝泰胶囊。

〔关键词〕 九味肝泰片;D-氨基半乳糖;急性肝损伤;保护作用

〔中图分类号〕 R256.4;R286

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.10.007

Protective Effect of Jiuwei Gantai Tablet on Rats with Acute Liver Injury Induced by D-galactosamine

ZHOU Daijun¹, HE Shujin¹, HE Chengdong¹, ZHOU Bangwei¹, WANG Yuhong²

(1. Hunan Xinhui Pharmaceutical Co., Ltd., Changsha, Hunan 410200, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the protective effect of Jiuwei Gantai Tablet on rats with liver injury induced by D-galactosamine (D-GalN). **Methods** A rat model of acute liver injury was established by intraperitoneal injection of D-GalN. The rats above were randomly divided into six groups: model group, bifendate tablet group (13.5 mg/kg), Jiuwei Gantai Capsule group (0.4 g/kg), and high-, medium-, and low-dose Jiuwei Gantai Tablet groups (0.8, 0.4, and 0.2 g/kg); meanwhile, a normal group was set. After 7 consecutive days of intragastric administration, the activities of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) in serum and the liver glycogen content were measured by biochemical analysis; additionally, the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver homogenate were measured. **Results** The model group had significantly increased activities of ALT and AST compared with the normal group ($P<0.01$). The Jiuwei Gantai Tablet groups showed significantly reduced activities of ALT and AST in serum and MDA level in liver tissue, but significantly increased liver glycogen content, as compared with the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$), as well as significantly reduced activity of GSH-PX compared with the Jiuwei Gantai Capsule group ($P<0.05$). **Conclusion** Jiuwei Gantai Tablet has obvious protective effects on rats with acute liver injury induced by D-GalN, the mechanism of which may be related to its antioxidation. Moreover, Jiuwei Gantai Tablet shows superior effects in improving certain indices compared with Jiuwei Gantai Capsule.

〔Keywords〕 Jiuwei Gantai Tablet; D-galactosamine; acute liver injury; protective effect

〔收稿日期〕 2016-05-04

〔作者简介〕 周代俊,男,主管药师,主要从事新药研发,E-mail:43263602@qq.com。

九味肝泰胶囊是国家医保品种, 收录入《中华人民共和国药典》2015年版, 九味肝泰胶囊由三七、郁金、蒺藜、姜黄、酒大黄、黄芩、蜈蚣、山药、五味子9味药材组成, 其主要功效是化瘀通络、疏肝健脾, 多用于治疗气滞血瘀兼肝郁脾虚所致的胁肋胀痛或刺痛、抑郁烦闷、食欲不振、食后腹胀脘痞、大便不调、肋下痞块等症状^[1]。肝炎属于中医学“胁痛”范畴, 应以祛邪为主, 不宜妄用补益之法, 治法为化瘀通络, 清解湿热余毒^[2]。

随着九味肝泰胶囊临床应用的日趋广泛^[3], 为了满足广大患者临床需要, 加强九味肝泰解郁方面的效果, 本品原研单位湖南新汇制药股份有限公司将九味肝泰胶囊开发成片剂, 并对姜黄、郁金两味药材乙醇浸泡后再水提, 明显提高了成品中姜黄素含量。因此, 本实验通过观察九味肝泰片对D-氨基半乳糖(D-GalN)所致大鼠急性肝损伤的保护作用来探讨其潜在作用机制, 以期九味肝泰片能更好地临床应用提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠70只, 雄性, 体质量180~200 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK(沪)2014-0016, 合格证号为2014001606577。

1.2 实验药物

九味肝泰胶囊(原制剂)、九味肝泰片(新制剂): 由三七、郁金、蒺藜、姜黄、酒大黄、黄芩、蜈蚣、山药、五味子9味药材组成, 两者的处方及处方量完全一致, 给药途径及服用量一致, 工艺上稍有差别(九味肝泰片增加醇提工序: 姜黄、郁金提前使用2倍剂量的75%乙醇浸泡2 h), 剂型上是胶囊和片剂的区别, 上述药物均由湖南新汇制药有限公司制备成相应剂型。联苯双酯, 规格1.5 mg/粒, 批号140604, 浙江医药股份有限公司新昌制药厂。

1.3 主要试剂

氨基半乳糖(GalN)(sigma, 美国); 谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)检测试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司); 丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、肝/肌糖元、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.4 主要仪器

AF-100制冰机(意大利 Scotsman); Allegra 25R台式高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司); AY-120电子分析天平、UV-1800紫外分光光度计(日本岛津); RT-1904C型半自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

2 方法

2.1 模型的制备^[4]

将D-氨基半乳糖(D-GalN)以无菌生理盐水配成10%溶液, 并用1 mol/L NaOH将pH调至7.0, 取SD大鼠60只, 按800 mg/kg剂量腹腔注射10%GalN溶液, 制备急性肝损伤模型大鼠。

2.2 分组与给药

将60只造模大鼠随机分为6组: 模型组、联苯双酯片组、九味肝泰胶囊组、九味肝泰片高、中、低剂量组(每粒九味肝泰胶囊或片为0.4 g, 折算动物给药剂量为大剂量0.8 g/kg、中剂量0.4 g/kg、低剂量0.2 g/kg), 每组10只, 另取10只SD大鼠作为正常组。各组大鼠灌胃给予相应药物, 连续7 d, 正常组和模型组则给予等容积纯净水。

2.3 检测方法

末次给药1 h后, 用10%水合氯醛将大鼠麻醉, 腹主动脉取血, 静置, 4 000 r/min离心10 min, 取血清, 参照试剂盒说明书, 采用生化分析法检测各组大鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性及肝糖原含量。另取肝脏组织, 用预冷生理盐水洗去浮血, 拭干, 以生理盐水制成10%肝匀浆液, 参照试剂盒说明书, 采用生化分析法检测各组大鼠超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。

2.4 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析, 所有数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。两组间的比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血清AST和ALT的影响

与正常组比较, 模型组大鼠血清AST和ALT显著升高($P < 0.01$), 这说明急性肝损伤模型成功; 与

模型组比较,联苯双酯片组、九味肝泰胶囊组和九味肝泰片各剂量组血清 AST 和 ALT 均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与九味肝泰胶囊组比较,九味肝泰片高剂量组 ALT、AST 显著降低($P<0.01$);而与九味肝泰胶囊组比较,九味肝泰片中、低剂量组 ALT、AST 虽有降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 对 GaIN 致急性肝损伤大鼠 AST 和 ALT 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

分 组	剂量/(g·kg ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)
正常组	-	162.9±19.8	65.5±12.9
模型组	-	12 679.4±3 582.1**	8 058.7±2 163.6**
联苯双酯片组	1.35×10 ⁻²	3 693.0±1 049.1***	5 530.6±1 150.7***
九味肝泰胶囊组	0.40	8 716.1±2 685.7***	5 102.2±1 291.2***
九味肝泰片高剂量组	0.80	3 534.1±1 264.5***▲	2 662.2±508.8***▲
九味肝泰片中剂量组	0.40	7 208.2±2 313.1***	3 897.1±1 287.7***
九味肝泰片低剂量组	0.20	6 022.3±2 321.8***	6 259.2±1 764.1***

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$;与九味肝泰胶囊组比较,▲ $P<0.01$ 。

3.2 对大鼠血清肝糖原的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清肝糖原升高,但在正常值范围内(5.42~8.87 mg/g),差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,联苯双酯片组肝糖原无明显变化($P>0.05$),而九味肝泰胶囊组与九味肝泰片各剂量组大鼠血清肝糖原均明显增加($P<0.01$),提示九味肝泰胶囊与片剂均能有效改善肝损伤;与九味肝泰胶囊组比较,九味肝泰片低剂量组大鼠肝糖原

含量下降($P<0.05$),而高、中剂量组无显著性差异($P>0.05$)。见表 2。

表 2 对 GaIN 致急性肝损伤大鼠血清肝糖原的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

分 组	剂量/(g·kg ⁻¹)	肝糖原/(mg·g ⁻¹)
正常组	-	5.76±0.30
模型组	-	6.77±0.72
联苯双酯片组	1.35×10 ⁻²	6.85±0.36
九味肝泰胶囊组	0.40	10.12±1.95**
九味肝泰片高剂量组	0.80	9.13±0.77**
九味肝泰片中剂量组	0.40	11.52±1.36**
九味肝泰片低剂量组	0.20	8.66±0.84**▲

注:与模型组比较,### $P<0.01$;与九味肝泰胶囊组比较,▲ $P<0.05$ 。

3.3 对大鼠肝组织中 SOD、MDA 和 GSH-Px 的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 SOD、GSH-Px 活性显著降低,MDA 含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,联苯双酯片组大鼠肝组织 SOD、GSH-Px 活性显著升高,MDA 含量显著降低($P<0.01$);而九味肝泰胶囊组和九味肝泰片高、中、低剂量组与模型组比较,大鼠肝组织中 MDA 含量显著降低($P<0.01$),SOD、GSH-Px 活性虽有不同程度的升高,但差异均无统计学意义($P>0.05$);与九味肝泰胶囊组比较,工艺改进后的九味肝泰片各剂量组 GSH-Px 含量明显降低($P<0.05$),而 SOD、MDA 含量差异均无统计学意义($P>0.05$),提示工艺改进后的九味肝泰片在改善 GSH-Px 方面效果更优。见表 3。

表 3 对 GaIN 致急性肝损伤大鼠肝组织 SOD、MDA 和 GSH-Px 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

分 组	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	GSH-Px/(U·mL ⁻¹)
正常组	-	0.419±0.014	13.952±2.079	104.07±27.01
模型组	-	0.341±0.021**	52.023±16.161**	70.38±5.39**
联苯双酯片组	1.35×10 ⁻²	0.389±0.027**	11.587±4.400**	88.47±9.33**
九味肝泰胶囊组	0.40	0.353±0.044	15.060±6.758**	80.71±15.30
九味肝泰片高剂量组	0.80	0.357±0.017	11.220±4.176**	70.70±2.13▲
九味肝泰片中剂量组	0.40	0.351±0.025	16.714±1.900**	70.60±1.41▲
九味肝泰片低剂量组	0.20	0.350±0.028	22.381±7.378**	70.99±1.89▲

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,### $P<0.01$;与九味肝泰胶囊组比较,▲ $P<0.05$ 。

4 讨论

肝病包括肝炎、肝纤维化、脂肪肝、酒精肝、药物性肝损害、肝硬化及肝癌等。肝炎包括病毒性肝炎和非病毒性肝炎两大类,非病毒性肝炎主要是由乙醇、化学毒物或药物引起的中毒性肝炎,可引起肝损

伤^[4]。目前临床上常用于治疗肝病的药物如腺苷蛋氨酸、甘草酸制剂、多烯磷脂酰胆碱和还原型谷胱甘肽等,均有不同程度的抗氧化、抗炎、保护肝细胞膜及细胞器等作用,可改善肝脏生物化学指标,但对于改善肝硬化患者的临床症状及肝纤维化的程度作用有限^[5]。中医学认为,肝胆病病因有情志失调、饮食

所伤、感受湿邪等,与肝、脾密切相关。情志抑郁,肝失疏泄,气机不畅,可致胸胁胀痛、抑郁烦闷;饮食所伤,脾胃受损及感受湿邪,困遏脾运,可见倦怠乏力、腹胀腹痛、食欲不振,故肝胆病治疗上应扶正祛瘀、清热解毒、化痰通络、疏肝健脾^[6]。对于肝炎引起的肝硬化,保肝治疗更是非常重要的手段,研究证明^[7-9]九味肝泰胶囊对于改善肝硬化患者的临床症状及减轻肝纤维化程度效果良好。

吴小红等^[10]研究表明 D-GalN 诱导所致肝损伤动物模型是目前筛选和研究保肝药物较为理想的急性肝损伤模型,能较好地模拟人体肝炎发生的病理过程。肝细胞内许多物质代谢过程与磷酸尿嘧啶核苷密切相关,磷酸尿嘧啶核苷如果发生耗竭,可以引起肝细胞损伤甚至坏死,而 D-GalN 作为一种肝细胞磷酸尿嘧啶核苷干扰剂,通过竞争生成二磷酸尿苷半乳糖使磷酸尿苷耗竭,导致肝细胞内物质代谢障碍,引起肝细胞变性、坏死。此外 D-GalN 作为急性肝损伤工具药,仅需给药 1 次,较四氯化碳(CCl₄)方便,且比 CCl₄ 诱导的肝损伤模型更均衡稳定^[11-13],目前已被广泛用于小鼠和大鼠的肝损伤模型制备。

九味肝泰由三七、蜈蚣、郁金等多味中草药组成,具有化痰通络、疏肝健脾的功效,临床用于治疗慢性乙型肝炎及肝硬化、酒精性肝炎及肝硬化、非酒精性脂肪性肝病等^[14-17]。本实验结果表明,与模型组比较,九味肝泰能明显降低急性肝损伤大鼠血清 ALT、AST 活性及肝组织 MDA 含量,升高肝糖原($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),从而保护肝脏;同时一定程度上提高大鼠肝组织 SOD、GSH-Px 活性,其抗急性肝损伤作用机制可能与其抗氧化作用有关。本研究中九味肝泰片降低大鼠血清 ALT、AST 活性的作用优于九味肝泰胶囊,这说明醇提工艺步骤的增加有利于提高九味肝泰的药效,保护肝细胞。

综上所述,九味肝泰片对 D-GalN 所致急性肝损伤大鼠具有明显的保护作用,且效果较优于九味肝泰胶囊,其作用机制可能与抗氧化作用有关,但具体

机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典·二部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:476-477.
- [2] 崔晨,耿琦,李敬伟,等.蒋健教授胸胁痛经验方介绍及验案举隅[J].环球中医药,2017,10(11):1369-1371.
- [3] 宣小伟,张辉,杜志刚.九味肝泰胶囊联合促肝细胞生长素对慢性乙型肝炎疗效的观察[J].药物与人,2014,27(8):88.
- [4] 吴晓琴,宋晓琳,彭瀛,等.花脸蘑多糖水提取物对 D-氨基半乳糖致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].延边大学医学学报,2013,36(1):22-24.
- [5] 《中国肝病诊疗管理规范》白皮书(节选)[J].临床肝胆病杂志,2014,30(3):197-209.
- [6] 王融冰.肝病的中医药治疗[J].临床肝胆病杂志,2015,31(1):2-6.
- [7] 季雪良,薛博瑜,顾雪峰,等.九味肝泰胶囊联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎临床研究[J].中西医结合肝病杂志,2013,32(4):163-164.
- [8] 向华,施莉,韦炜,等.恩替卡韦联合九味肝泰胶囊治疗失代偿期乙型肝炎肝硬化疗效观察[J].浙江中西医结合杂志,2014,24(7):599-601.
- [9] 秦雪琴,陈悦,吴文琴,等.九味肝泰胶囊联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎肝硬化的临床疗效观察[J].中西医结合肝病杂志,2016,26(6):361-363.
- [10] 吴小红,郭彦,刘晨凤,等.LPS/D-GalN 诱导小鼠急性肝损伤模型的建立[J].中国实验动物学报,2014,22(3):15-19,3.
- [11] 布秀娟.肝损伤动物模型制作研究进展[J].中国医药导报,2014,11(12):166-168.
- [12] 赵冰洁.加味达原饮对急性肝损伤湿邪内蕴证模型大鼠的治疗作用研究[D].成都:成都中医药大学,2011.
- [13] 麦迪乃·赛福丁.维药小茴香根皮不同提取物对急慢性肝损伤的保护作用研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2012.
- [14] 杨增强,陈悦,吴文琴,等.九味肝泰联合恩替卡韦对慢性乙型肝炎早期肝硬化患者肝纤维化及肝功能的影响[J].长春中医药大学学报,2016,32(6):1191-1194.
- [15] 闫嘉茵,许海江,张晓坚,等.九味肝泰胶囊对酒精性肝损伤小鼠的防护作用及其机制[J].中国医院药学杂志,2015,35(15):1347-1351.
- [16] 李鹏.九味肝泰胶囊治疗代偿期酒精性肝硬化临床研究[J].中国处方药,2016,14(2):92-93.
- [17] 陈菲,艾国,盛柳青,等.九味肝泰胶囊对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪肝的治疗作用[J].中草药,2015,46(9):1338-1342.

(本文编辑 李杰)