

## 利胆止痛片对 $\alpha$ -萘异硫氰酸致急性肝损伤的保护作用

闫俊岭<sup>1)</sup>, 郭丽蓉<sup>1)</sup>, 徐松<sup>1)</sup>, 张信岳<sup>2)</sup>, 张立群<sup>1)</sup>, 陈爱君<sup>2)</sup>

(1) 云南白药集团股份有限公司云南白药研究院, 云南昆明 650500; 2) 浙江省医学科学院药物研究所, 浙江杭州 310013)

**[摘要]** **目的** 研究利胆止痛片对小鼠急性肝损伤的保护作用. **方法** 采用  $\alpha$ -萘异硫氰酸 (ANIT) 造成小鼠急性肝损伤模型, 观察利胆止痛片 [1.5、0.75、0.375 g (浸膏) /kg 体重] 对肝损伤小鼠的体重、肝脏系数、肝功能指标、肝组织中丙二醛 (MDA) 与超氧化物歧化酶 (SOD) 的影响, 并对肝脏组织进行病理学观察. **结果** 利胆止痛片 (1.5、0.75、0.375 g/kg) 能明显改善 ANIT 所致急性肝损伤小鼠体重的减轻, 改善肝功能, 减低肝组织中 MDA 含量、提高 SOD 活性, 改善肝组织病理损伤, 提示利胆止痛片对急性肝损伤具有良好的保护作用. **结论** 利胆止痛片对 ANIT 所致小鼠急性肝损伤具有明显的保护作用.

**[关键词]** 利胆止痛片; 急性肝损伤; 肝功能; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

**[中图分类号]** R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 07 - 0030 - 04

## Protective Effect of Li dan zhi tong Tablets on Acute Hepatic Injuriy Induced by $\alpha$ -Naphthyl Isothiocyanate

YAN Jun - ling<sup>1)</sup>, GUO Li - rong<sup>1)</sup>, XU Song<sup>1)</sup>, ZHANG Xin - yue<sup>2)</sup>, ZHANG Li - qun<sup>1)</sup>, CHEN Ai - jun<sup>2)</sup>

(1) Academy of Yunnan Baiyao, Yunnan Baiyao Group Co.Ltd, Kunming Yunnan 650500; 2) Medical Material Research Institute, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou Zhejiang 310013, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the protective effect of Li dan zhi tong tablets on mice model with the acute hepatic lesion induced by  $\alpha$ -Naphthyl isothiocyanate (ANIT). **Methods** The rats were randomly divided into six groups, namely, the normal group, the ANIT group, the Xiao yan li dan tablets group and the Li dan zhi tong tablets group (1.5, 0.75, 0.375 g extractum/kg body weight). The mice model with the acute hepatic lesion was established by ANIT after 8 days by giving corresponding drugs to each group. Body weights and liver coefficients of the mice were determined 48 hours later, and such hepatic functions as glutamic-pyruvic transaminase (ALT), glutamic-oxaloacetic transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL) and total bile acid (TBA) were examined. Also the levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver tissue homogenates were determined by observing the liver tissues pathologically under the microscope. **Results** Compared with ANIT group, body weights of the mice in Li dan zhi tong tablets group (1.5, 0.75, 0.375 g extractum/kg body weight) were significantly restored, the hepatic functions were improved and the tissue pathological damages were alleviated, which indicated that the levels of MDA were markedly lowered in Li dan zhi tong tablets treatment group with the activities of SOD being markedly increased. **Conclusion** Li dan zhi tong tablet has preferable preventive and therapeutic effects on the mice with acute liver injure induced by ANIT.

**[Key words]** Li dan zhi tong tablets; Acute hepatic injuriy; Hepatic function; Malondialdehyde; Superoxide dismutase

云南白药集团股份有限公司生产的利胆止痛片是由柴胡、赤芍、枳壳、甘草、茵陈、延胡索等12味药材制成的复方制剂. 具有清热利胆, 理气

止痛之功效, 用于肝胆湿热所致的胁痛, 黄疸 (如急、慢性肝炎, 胆囊炎) 等症的治疗. 本研究采用  $\alpha$ -萘异硫氰酸酯 ( $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate,

**[作者简介]** 闫俊岭 (1973~), 男, 河南平顶山市人, 药理学博士, 工程师, 主要从事药品研发工作.

ANIT) 建立小鼠急性肝损伤模型, 探讨利胆止痛片对胆汁淤积型肝损伤的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与试剂

利胆止痛片(浸膏粉), 黄褐色粗粉, 由云南白药集团丽江药业有限公司生产提供, 规格: 1 kg/包, 每 g 含生药 2.0 g, 批号: 00708020。消炎利胆片, 广州白云山和记黄埔中药有限公司产品, 批号: E8A004。临床用法: 6 片/次, 3 次/d。

戊巴比妥钠, 中国医药(集团)上海化学试剂公司进口分装, 批号: 20021216;  $\alpha$ -萘异硫氰酸酯(ANIT), 北京通县育才精细化工厂生产, 批号: 081019。

谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、总胆汁酸(TBA)测定试剂盒, 购自宁波赛克生物技术有限公司; 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)测定试剂盒, 购自南京建成生物工程公司。

### 1.2 动物及饲养环境

ICR 小鼠由浙江省实验动物中心提供, 合格证: SCXK(浙)2003-0001 号, 全价颗粒饲料购自浙江省实验动物中心。

### 1.3 仪器

AEL-200 电子天平, 日本 SHIMADZU 公司生产; 721 可见分光光度计, 上海分析仪器厂生产; AT-738PLUS 半自动生化仪, 上海安泰分析仪器有限公司生产; MOTIC 生物图像采集分析系统, 厦门麦奥迪克仪器公司生产。

### 1.4 利胆止痛片对 ANIT 所致小鼠急性肝损伤的影响

取雄性 ICR 小鼠 70 只, 体重 18~22 g, 随机取 10 只作为正常对照, 其余 60 只随机分为模型对照组、消炎利胆片(0.3 g/kg)阳性对照组、利胆止痛片(浸膏)0.375、0.75、1.5 g/kg 剂量组, 每组 12 只, 分别灌胃给药, 每天 1 次, 连续 10 d, 给药体积均为 20 mL/kg, 正常对照以及模型对照组给予等容积生理盐水, 第 8 天除正常对照组外, 其余小鼠按文献所示方法灌胃给予 105 mg/kg 的 ANIT(食用油配制)造模<sup>[1,2]</sup>, 末次给药后禁食过夜(约 12 h), 取血分离血清, 检测 ALT、AST、ALP、TBIL、DBIL、TBA; 取肝脏称重, 计算肝脏系数; 取部分肝脏, 滤纸吸干称重, 然后制备 10%匀浆液, 测 SOD 活性及 MDA 含量; 另取同一

部位小块组织, 用 10%甲醛溶液固定, 常规石蜡切片, HE 染色, 光镜下观察各组的肝损伤病理变化情况<sup>[3,4]</sup>。

### 1.5 统计学处理

所有计量数据均表示为均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ), 采用 SPSS 软件进行单因素方差分析, 计数数据采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 利胆止痛片对 ANIT 致急性肝损伤小鼠体重和肝脏系数的影响

结果显示, 模型组小鼠体重增长明显低于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 利胆止痛片各剂量组体重虽明显低于正常对照组, 但较模型组有所增加, 其中高、中剂量组体重明显高于模型组 ( $P < 0.05$ ), 表明利胆止痛片对 ANIT 致肝损伤小鼠的体重恢复正常增长具有改善作用; ANIT 造模后, 模型组和各给药组的肝重以及肝系数均明显高于正常组 ( $P < 0.05$ ), 但利胆止痛片各剂量组的肝脏系数与模型组相比呈下降趋势, 见表 1。

### 2.2 利胆止痛片对 ANIT 致急性肝损伤小鼠肝功能的影响

结果显示, 模型组血清生化指标中 ALT、AST、ALP、TBIL、DBIL、TBA 等肝功能指标较正常组均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 提示 ANIT 致肝损伤造模成功, 利胆止痛片各剂量组用药后 ALT、AST、ALP、TBI、DBI、TBA 指标较模型组有不同程度地降低, 高剂量组肝功能指标与模型组相比均有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 中剂量组部分指标与模型组相比有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 提示利胆止痛片对 ANIT 致肝损伤有一定的保护作用, 见表 2。

### 2.3 利胆止痛片对 ANIT 致急性肝损伤小鼠肝组织 SOD 和 MDA 的影响

结果显示, 模型对照组肝组织中 MDA 较正常组明显升高, SOD 活性明显下降, 利胆止痛片各剂量组用药后肝组织中 MDA 水平明显低于模型组 ( $P < 0.05$ ), SOD 活性明显升高 ( $P < 0.05$ ), 提示利胆止痛片能够明显减轻 ANIT 所致肝脂质过氧化作用, 见表 3。

### 2.4 利胆止痛片对 ANIT 致急性肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

病理组织学检查显示, 正常组小鼠肝组织未见炎症细胞浸润, 也未见肝细胞变性或坏死, 肝小叶结构清晰(见图 1A); 模型组可见中央静脉旁大量炎症细胞浸润及液化坏死灶(见图 1B); 与模型

组相比, 阳性对照药消炎利胆片组的肝损伤有一定程度的减轻 (见图 1C)。利胆止痛片各剂量组的肝组织损伤程度明显减轻 (见图 1D、图 1E 和图 1F), 提示利胆止痛片对 ANIT 致肝损伤小鼠肝组织病理学具有良好的改善作用。

### 3 讨论

ANIT 被广泛应用于肝内胆胆汁淤积模型的复制, 该模型复制简单易行, 重现性好, 是筛选和研究保肝药物及利胆药的理想实验动物模型<sup>[5]</sup>。ALT 与

AST 主要分布在肝细胞内, 能灵敏的反应肝脏的炎症情况, 其升高程度与肝细胞损伤程度相一致, 是最重要的肝功能指标<sup>[6]</sup>。而 TBIL、ALP、ALT、TBA 是判断胆汁淤积程度 4 项常规指标, 同时也是衡量受试药物疗效的主要指标。

本实验采用 ANIT 造模后 48 h, 血清中 ALT、AST、TBIL、DBIL、ALP 和 TBA 明显升高; 肝病理镜检结果证实, 肝实质细胞和肝内胆管损伤最重, 表明造模成功。给药组 [利胆止痛片 1.5、0.75、0.375g (浸膏) /kg] 小鼠血清中 ALT、AST、TBIL、DBIL、ALP 和 TBA 水平均明显低于模型

表 1 利胆止痛片对 ANIT 致急性肝损伤小鼠体重以及肝脏系数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Effects of Li dan zhi tong tablets on body weight and liver coefficient in acute hepatic injury mice by ANIT ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 (g/kg)	体重 (g)		肝重 (g)	肝系数 (mg/g)
			实验前	实验后		
正常组	10	-	21.1 ± 1.3	26.7 ± 1.9	1.24 ± 0.16	46.5 ± 5.9
模型组	12	-	20.8 ± 1.3	22.0 ± 1.4 <sup>#</sup>	1.47 ± 0.12 <sup>#</sup>	64.8 ± 7.4 <sup>#</sup>
消炎利胆片	12	0.3	20.8 ± 0.9	24.3 ± 1.5 <sup>#*</sup>	1.43 ± 0.24 <sup>#</sup>	58.9 ± 8.2 <sup>#</sup>
利胆止痛片	12	1.5	20.9 ± 1.4	24.2 ± 1.1 <sup>#*</sup>	1.41 ± 0.16 <sup>#</sup>	58.3 ± 4.9 <sup>#</sup>
利胆止痛片	12	0.75	20.6 ± 2.0	23.9 ± 1.4 <sup>#*</sup>	1.45 ± 0.12 <sup>#</sup>	60.5 ± 4.3 <sup>#</sup>
利胆止痛片	12	0.375	20.9 ± 1.8	23.2 ± 1.2 <sup>#</sup>	1.44 ± 0.17 <sup>#</sup>	61.9 ± 5.2 <sup>#</sup>

与正常组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

表 2 利胆止痛片对 ANIT 致急性肝损伤小鼠肝功能的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Effects of Li dan zhi tong tablets on hepatic function in acute hepatic injury mice by ANIT ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 (g/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)
正常组	10	-	31.5 ± 11.1	147.0 ± 92.0	183.6 ± 46.3
模型组	12	-	138.2 ± 34.0 <sup>#</sup>	273.1 ± 109.6 <sup>#</sup>	395.9 ± 145.5 <sup>#</sup>
消炎利胆片	12	0.3	65.6 ± 25.4 <sup>#*</sup>	138.3 ± 38.5 <sup>*</sup>	248.1 ± 44.9 <sup>#*</sup>
利胆止痛片	12	1.5	108.0 ± 27.2 <sup>#*</sup>	165.3 ± 55.7 <sup>*</sup>	250.6 ± 99.5 <sup>#*</sup>
利胆止痛片	12	0.75	84.7 ± 38.2 <sup>#*</sup>	177.7 ± 97.6 <sup>*</sup>	268.1 ± 79.2 <sup>#*</sup>
利胆止痛片	12	0.375	123.9 ± 31.8 <sup>#</sup>	203.6 ± 88.6	280.5 ± 121.6 <sup>#</sup>

与正常组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

表 3 利胆止痛片对 ANIT 致急性肝损伤小鼠肝组织 SOD 和 MDA 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Effects of Li dan zhi tong tablets on hepatic SOD and MDA in acute hepatic injury mice by ANIT ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 (g/kg)	肝脏 MDA (nmol/mg 蛋白)	肝脏 SOD (nmol/mg 蛋白)
正常组	10	-	13.2 ± 1.9	77.6 ± 12.0
模型组	12	-	15.1 ± 2.0 <sup>#</sup>	49.8 ± 10.6 <sup>#</sup>
消炎利胆片	12	8 片 /kg	11.4 ± 3.3 <sup>*</sup>	57.1 ± 18.4 <sup>#</sup>
利胆止痛片	12	1.5	12.5 ± 2.5 <sup>*</sup>	62.0 ± 7.1 <sup>#*</sup>
利胆止痛片	12	0.75	11.4 ± 2.1 <sup>#*</sup>	60.3 ± 5.9 <sup>#*</sup>
利胆止痛片	12	0.375	11.6 ± 1.7 <sup>#*</sup>	62.8 ± 9.3 <sup>#*</sup>

与正常组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

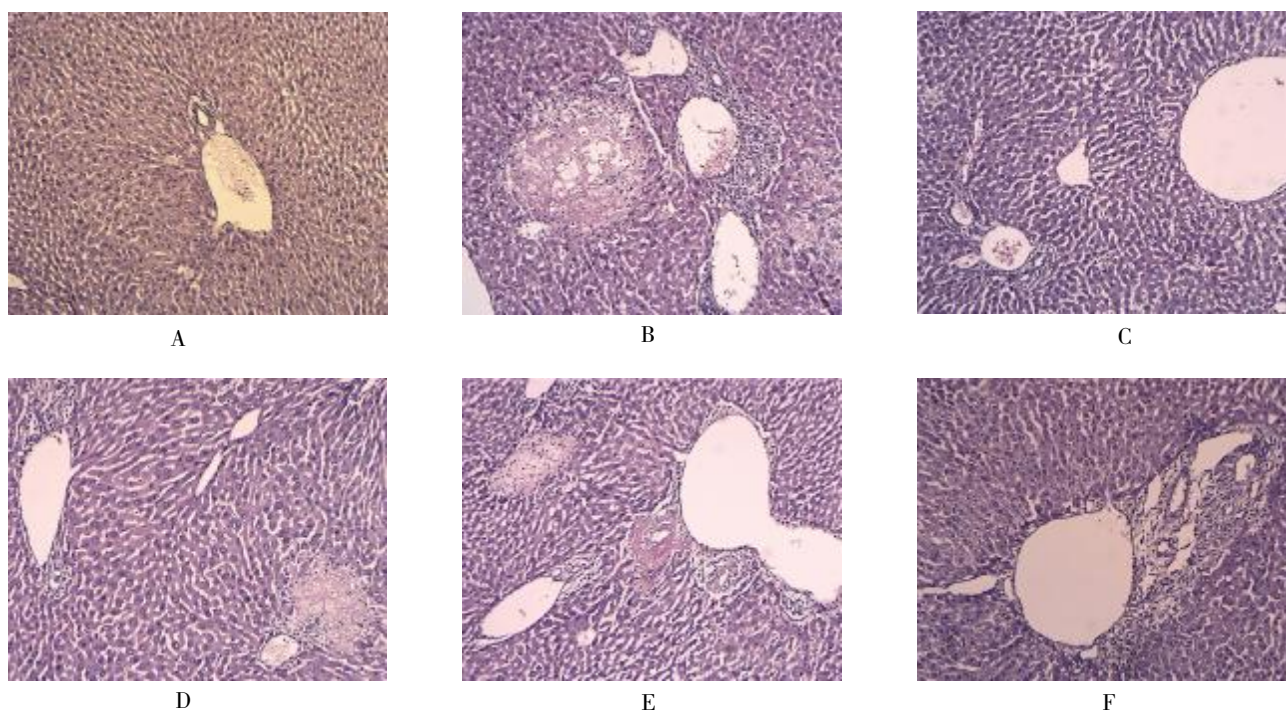


图1 各组小鼠肝组织病理形态学变化 (HE × 200)

Fig. 1 Pathological changes of livers in each group (HE × 200)

A: 正常组; B: 模型组; C: 阳性对照组 (消炎利胆片组); D: 利胆止痛片组 (高剂量组); E: 利胆止痛片组 (中剂量组); F: 利胆止痛片组 (低剂量组) .

组, 并呈现一定的剂量依赖性, 结合肝病理变化较轻的结果, 表明利胆止痛片对 ANIT 造成的肝损伤具有较好的保护作用.

实验结果显示, 与正常对照组比, ANIT 模型造模后肝脏 SOD 活性明显降低, MDA 含量明显升高. 这种现象, 表明 ANIT 作为外源性过氧化物在肝脏转化, 经氧化还原后在肝内产生多种自由基, 导致组织过氧化损伤的结果. 而利胆止痛片治疗组肝脏 SOD 活性明显升高, MDA 含量显著降低, 说明利胆止痛片具有较好抗氧化、减少自由基产生, 减轻肝组织过氧化损伤的作用, 其保护肝脏的作用机制可能与此有关.

综上, 利胆止痛片可通过增强机体抗氧化能力, 加速自由基的清除, 修复受损的肝细胞, 从而对 ANIT 所造成肝损伤的起到良好保护作用, 使肝功能得到改善.

#### [参考文献]

- [1] 于珊, 徐雪钰, 李昆峰, 等. 苯丙氨酸二肽类化合物 Y101 对  $\alpha$ -萘基异硫氰酸酯致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 解放军药学报, 2011, 27(2): 118 - 121.
- [2] 张颖, 钟正贤, 卢文杰等. 多叶越南槐对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 福建医科大学学报, 2012, 19(4): 325 - 326.
- [3] 葛文龙, 窦志华, 罗琳, 等. 芍药总苷对  $\alpha$ -萘异硫氰酸酯诱导的小鼠胆汁淤积型肝损伤的保护作用 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2 881 - 2 882.
- [4] 朱青艳, 彭文娟, 王竞春, 等. 虎杖合剂防治  $\alpha$ -异硫氰酸萘酯致大鼠急性肝损伤的实验研究 [J]. 世界中医药, 2009, 4(2): 109 - 111
- [5] 张锦雀, 黄丽英. 肝损伤动物模型研究进展 [J]. 福建医科大学学报, 2009, 43(1): 86 - 88.

(2013 - 04 - 15 收稿)