

瑶药紫九牛醇提物急性毒性及其对乙醇所致急性肝损伤的影响^①

黄健, 韦亚军, 韦庆宁, 黄少美, 李珊, 廖长秀^②

(右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: ncy225@163.com)

摘要: **目的** 在系统检测瑶药紫九牛醇提物对小鼠的急性毒性和其主要成分之一总蒽醌含量的基础上, 进一步观察其对乙醇所致小鼠急性肝损伤的影响, 为紫九牛在肝病应用中的安全性和有效性提供依据。 **方法** 采用超声结合乙醇回流方法制备紫九牛提取物, 以最大浓度和最大给药体积给药, 观察其急性毒性大小。建立乙醇所致小鼠急性肝损伤模型, 观察紫九牛提取物对肝损伤小鼠肝功能指标、抗氧化指标和组织学的影响。 **结果** 急性毒性试验发现小鼠对紫九牛醇提物的最大耐受量为(生药)240 g/kg, 为人常规用量(0.25~0.5 g/kg)的480~960倍。分光光度法检测发现紫九牛乙醇提取物总蒽醌含量为0.085%。紫九牛(生药)16.7 g/(kg·d)连续灌胃给药7 d能降低乙醇所致小鼠血清谷丙转氨酶的升高, 提高肝脏过氧化氢酶和总抗氧化能力, 且可明显减轻肝组织病理改变。 **结论** 本研究结果提示紫九牛醇提物毒性低, 对乙醇肝损伤有防治作用, 其机制与增强肝脏抗氧化功能有关。其总蒽醌是否参与肝保护作用尚需进一步研究。

关键词: 紫九牛; 毒性试验, 急性; 蒽醌类; 肝损伤

中图分类号: R29

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2014)03-0323-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.03.001

Acute toxicity and effects of Ventilago leiocarpa on ethanol-induced acute liver injury

Huang Jian, Wei Yajun, Wei Qingning, Huang Shaomei, Li Shan, Liao Zhangxiu

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China

E-mail: ncy225@163.com)

Abstract: **Objective** To observe the acute toxicity and the content of total anthraquinone in Ventilago leiocarpa (Chinese medicine from Yao nationality) ethanol extract, and to further study the effects of Ventilago leiocarpa ethanol extract on ethanol-induced acute liver injury. To study the safety and effectiveness of Ventilago leiocarpa in treatment liver disease. **Methods** The Ventilago leiocarpa extract was prepared by using ultrasonic extraction combined ethanol reflux. Its acute toxicity was observed at maximal concentration and maximal volume. Mice Ethanol-induced liver injury model was established. The effects of Ventilago leiocarpa ethanol extract on mice liver function, antioxidative function and histology were observed. **Results** Acute toxicity tests in mice showed that the maximal tolerance dose was crude drug 240 g/kg, which was 480~960 times of regular dose in human(0.25~0.5 g). The total anthraquinone content of 0.085% in the extract was obtained by using spectrophotometry. The intragastric administration of Ventilago leiocarpa benth 16.7 g/(kg·d) for 7 days could reduce the elevated -alanine transaminase (ALT) activity, also could ameliorate pathological injury and improve the liver activity of catalase and total antioxidant capacity in mice with ethanol-induced liver injury. **Conclusion** Our results suggest the toxicity of Ventilago leiocarpa is low, and Ventilago leiocarpa can prevent and treat ethanol-induced acute liver injury due to its antioxidative action. The role of total anthraquinone plays in liver protecting need to be further investigated.

Key words: Ventilago leiocarpa; toxicity tests, acute; anthraquinones; liver injury

① **基金项目:**国家自然科学基金(81060040);2010年“广西高校优秀人才资助计划”资助(桂教人[2010]41号序号51);2012年广西壮族自治区大学生创新创业训练计划;右江民族医学院2010~2012年度普高学生科研项目立项课题(序号1)

② **通讯作者:** E-mail: liao Zhangxiu@163.com

广西是瑶族人民聚居地之一,具有丰富的瑶药资源。肝炎是瑶药主治疾病之一,广西民间用多种瑶药治疗肝炎,如:“五虎九牛十八钻七十二风”中的猛老虎、紫九牛、大钻、葫芦钻、铜钻、五爪风、白面风、过墙风、独脚风、黄骨风等^[1]。但这些瑶药治疗肝炎大多数没有明确的毒理和相关药理数据,某些瑶药的药理学研究甚至完全空白,如:紫九牛和黄骨风等,极大限制这些药物在肝炎相关疾病中的应用。瑶药紫九牛(*Ventilago leio-carpa*)是鼠李科植物翼核果的根茎,别名血风藤、铁牛入石、红穿破石、青筋藤、牛参等,分布于我国广西、广东和海南等省,民间用于补气补血、舒经活络,治疗气血两虚、月经不调、风湿筋骨痛、四肢麻木、跌打损伤、肝炎、肾炎水肿等症^[2-3]。本研究拟从紫九牛醇提物的急性毒性、总蒽醌含量和对乙醇所致急性肝损伤影响三方面系统观察其安全性和有效性,为其在治疗肝脏疾病中的应用和开发提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器 紫九牛购于广西柳州,由右江民族医学院民族医教研室覃道光教授鉴定,粉碎备用。乙醇等其他试剂均为国产分析纯。UV-2401紫外分光光度计为日本岛津公司产品,BA310 Digital 数码显微镜为厦门麦克奥迪实业集团有限公司产品。

SPF级昆明种小鼠,体重18~22 g,由右江民族医学院实验动物中心提供,动物许可证号为:SCXK桂2012-0003。

1.2 方 法

1.2.1 紫九牛乙醇提取物制备 将产于广西柳州的紫九牛用自来水洗净,再用去离子水冲洗,切片,风干后磨成粗粉,精密称取适量紫九牛粗粉,置于5 000 ml圆底烧瓶中,用10倍80%乙醇回流提取3次,每次1.5 h,将提取液混合减压抽滤,挥干乙醇,得到紫九牛浸膏。取适量浸膏用蒸馏水配成所需浓度的混悬液,用于后续的急性毒性实验和药效实验。

1.2.2 紫九牛总蒽醌提取 精密称取紫九牛(翼核果)粉末40 g,按1.2.1方法进行乙醇回流提取,将提取液合并过滤,减压蒸馏浓缩至40 ml(每ml提取液相当于生药1 g)。从中准确量取1 ml置于3 mol/L硫酸60 ml水中水浴加热水解2 h,过滤,将滤液转移至分液漏斗中,加入氯仿进行萃取(上层为酸水层,下层为氯仿)3次,每次30 ml,合并氯仿液,用减压旋转蒸发仪回收氯仿,用甲醇定容至50 ml,即得紫九牛醇提物总蒽醌样品。参照文献^[4],以大黄素为标准品,以0.5%乙酸镁-甲醇液为显色剂,制备标准曲线,检测紫九牛醇提物总蒽醌含量。

1.2.3 紫九牛醇提物的急性毒性实验 随机选取小白鼠20只,雌雄各半,每组10只,禁食不禁水12 h。以紫九牛醇提物最大浓度(生药4 g/ml),按0.3 ml/10 g灌胃给药2次,间隔6 h,连续观察7 d内小鼠的一般情况,以死亡为主要观察指标。

1.2.4 紫九牛醇提物对小鼠急性肝损伤的保护作用 取雄性小白鼠30只,随机分为3组,即正常对照组、模型对照组、紫九牛给药组,每组10只。紫九牛给药组每天按0.1 ml/10 g灌胃给药,剂量为生药16.7 g/kg,1次/天,连续7 d,正常对照组和模型对照组给予等容量蒸馏水。乙醇所致急性肝损伤模型参照文献^[5],略有改动。末次给药1 h后,模型对照组和给药组灌胃45%乙醇(6.1 g/kg体重),间隔19 h后再给1次45%乙醇(5.4 g/kg体重),正常对照组同时等容积给蒸馏水,24 h所有小鼠摘眼球取血,取血后立即处死解剖取肝脏。将取到的全血离心分离血清,按试剂盒说明测定丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)的酶活性。摘取肝脏,称重,部分组织用10%福尔马林固定,测定肝脏病理改变;余下组织用生理盐水制备成10%匀浆,离心取上清液,分别按试剂盒说明测定匀浆中蛋白含量、过氧化氢酶(catalase, CAT)和总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)。

1.2.5 统计学方法 应用SPSS 17.0软件进行统计学处理,计量资料均用($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 紫九牛醇提物对小鼠的急性毒性实验结果 结果表明,紫九牛醇提物在最大药物浓度(生药4 g/ml)和给药体积为0.6 ml/10 g(分两次给),剂量为生药240 g/kg时,观察7 d,小鼠无死亡,体重无明显变化。说明紫九牛醇提物最大耐受量为生药240 g/kg,为人常规用量(0.25~0.5 g/kg)的480~960倍。

2.2 紫九牛醇提物总蒽醌含量测定 以大黄素为标准品,以0.5%乙酸镁-甲醇液为显色剂,制备标准曲线为 $A=0.0395C+0.0759$, $r=0.9997$,线性范围:2~20 mg/L(吸光度A为纵坐标,浓度C为横坐标)。以此标准曲线,测得紫九牛醇提物总蒽醌含量为0.085%。

2.3 紫九牛醇提物对乙醇致肝损伤小鼠肝功能指标的影响 45%乙醇24 h内灌胃给药2次后,小鼠血清ALT含量较正常对照组明显增加($t=2.687$, $P=0.015$),肝指数增加($t=3.335$, $P=0.004$),说明肝损伤模型制备成功。紫九牛可改善乙醇引起的ALT增高的症状($t=2.982$, $P=0.008$),但对肝指数无明显影响($t=3.450$, $P=2.003$),见表1。

表1 紫九牛醇提物对乙醇所致肝损伤肝功能的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分组	肝指数(g/kg)	ALT(u/L)
正常对照组	41.6±3.7	18±3
模型对照组	46.9±3.4	31±15
紫九牛醇提物	46.6±2.7	14±10
F	2.170	7.100
P	0.002	0.003

2.4 紫九牛醇提物对乙醇肝损伤小鼠抗氧化指标的影响 本研究进一步观察了紫九牛醇提物对肝脏抗氧化功能的影响。结果表明,乙醇灌胃给药后肝匀浆中过氧化氢酶CAT和总抗氧化能力T-AOC活性均明显降低,分别降至正常对照组的75%和61.5%($t=2.915$, $P=0.009$; $t=3.676$, $P=0.002$)。紫九牛可使乙醇降低的肝组织中抗氧化酶CAT和T-AOC活性,接近正常对照组水平($t=2.236$, $P=0.038$; $t=2.875$, $P=0.010$),见表2。

表2 紫九牛醇提物对乙醇所致肝损伤
抗氧化功能的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分组	CAT (u/g·pro)	T-AOC (u/g·pro)
正常对照组	56±9	26±5
模型对照组	42±12	16±7
紫九牛醇提物	54±12	25±7
F	4.660	7.400
P	0.018	0.003

2.5 紫九牛醇提物对乙醇所致小鼠肝组织形态学变化的影响 病理学组织结果表明,正常小鼠肝组织肝索存在,肝脏结构完整,肝细胞胞浆未见脂肪变性及气球样变(见图1A、B)。24 h内两次乙醇处理后小鼠肝细胞气球样变性明显(见图1C、D),未见肝索,肝脏正常结构破坏,炎性细胞增生。紫九牛给药组可见肝索,肝脏结构基本完整,肝细胞气球样变性程度均明

显轻于乙醇模型组(见图 1E、F), 炎性细胞增生减轻(见图 1E)。

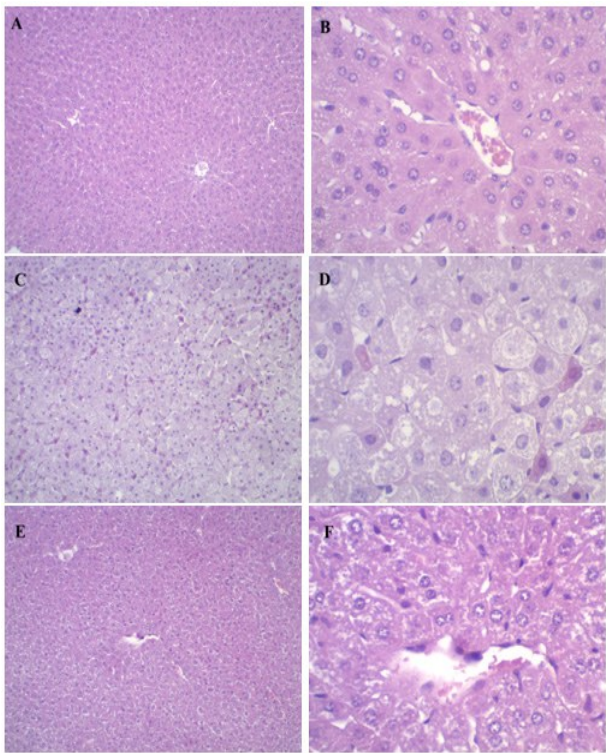


图 1 紫九牛醇提物对乙醇所致肝损伤肝脏病理改变的影响
正常对照组:A($\times 100$)、B($\times 200$);乙醇模型组:C($\times 100$)、D($\times 200$);紫九牛醇提物组:E($\times 100$)、F($\times 200$)

3 讨论

瑶药是我国应用较多的一类民族药,许多瑶药虽然在民间应用疗效确切,但尚无药理学和毒理学数据证明其确实安全有效。本研究发现在人常规用药的 480~960 倍剂量的紫九牛醇提物给予小鼠,未出现死亡及明显的毒性反应,说明紫九牛毒性较低,较为安全。

随着生活水平的提高,越来越多的人饮酒,乙醇所引起的急、慢性肝损伤已成为当前世界范围内的一大公害。关于紫九牛对急性酒精性肝损伤是否有确切的作用及机制尚未见报道。由于不同小鼠对乙醇敏感性个体差异较大,本研究中乙醇的剂量与文献所用剂量略有调整^[5],通过 24 h 内两次给予 45% 乙醇,小鼠肝脏肿大、肝指数明显增加、肝索紊乱、出现气球样变及炎性细胞增多,说明急性酒精性肝损伤模型建立成功。紫九牛(生药)16.7 g/(kg·d)连续灌胃给药 7 d 能改善乙醇所致小

鼠肝损伤,提高肝脏抗氧化酶和抗氧化能力,且可明显减轻肝组织病理改变。该结果提示紫九牛可通过提高肝脏抗氧化功能而对乙醇所致肝损伤有保护作用。

有文献报道翼核果(紫九牛)属植物含有丰富的蒽醌类化合物,从此种植物根中分离得大黄素、大黄素-6,8-二甲醚、1-羟基-6,7,8-三甲氧基-3-甲基蒽醌、翼核果醌和羽扇豆醇^[6-7]。本实验采用乙醇回流提取后减压浓缩,利用分光光度法测得广西柳州紫九牛总蒽醌含量为 0.0848%,与蒙毅等利用 HPLC 测定广西各地红穿破石(紫九牛)中大黄素的含量 0.0303%~0.1353% 接近^[8],说明本法用于测定紫九牛蒽醌含量是可靠的。万绍晖等^[9]发现掌叶大黄蒽醌类衍生物是其抗四氯化碳肝损伤的活性部位,田立元^[10]也发现决明子总蒽醌是其抗肝损伤的有效成分之一。本研究中紫九牛含有的总蒽醌是否为其抗乙醇所致肝损伤的活性部位尚需进一步研究。

综合以上,本研究发现紫九牛醇提物毒性低,且可保护乙醇所致肝损伤,为紫九牛在酒精性肝损伤的临床应用提供依据和奠定基础,并为瑶药抗肝炎的开发提供依据。

参考文献:

- [1] 戴斌,李钊东,丘翠嫦,等. “虎牛钻风”类传统瑶药的调查研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1998, 31(2): 28-34, 46.
- [2] 尹显洪. 瑶医常用植物药化学与药理研究[M]. 广州: 广东旅游出版社, 2008: 25.
- [3] 覃迅云, 罗金裕, 高志刚. 中国瑶药学[M]. 北京: 民族出版社, 2002: 52.
- [4] 高雅言, 孙盼盼, 张超, 等. 茵陈蒿方传统与现代浸提方法对比[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 18-22.
- [5] 汪晖, 彭仁琇, 孔锐, 等. 大蒜素对乙醇引起肝损伤的拮抗作用[J]. 卫生研究, 1998, 27(6): 415-417.
- [6] 王雪芬, 卢文杰, 陈家源, 等. 翼核果化学成分的研究[J]. 药学学报, 1993, 28(2): 122-155.
- [7] 应百平, 韩玖, 利国威, 等. 翼核果中蒽醌的研究[J]. 药学学报, 1988, 23(2): 126-129.
- [8] 蒙毅, 范卫锋, 钟一雄, 等. HPLC 法测定红穿破石中大黄素和大黄素甲醚[J]. 中草药, 2007, 38(9): 1410-1411.
- [9] 万绍晖, 丁原全, 蒲晓辉, 等. 掌叶大黄蒽醌类衍生物对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(11): 1405-1406.
- [10] 田立元. 决明子的不同提取物及炮制品对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 2005-2006.

收稿日期: 2014-04-28