

- 104(1); 59-66.
- [9] Hortelano S, Castrillo A, Alvarez A M, *et al.* Contribution of cyclopentenone prostaglandins to the resolution of inflammation through the potentiation of apoptosis in activated macrophages [J]. *J Immunol*, 2000, 165(11): 6525-6531.
- [10] Karin M, Lin A. NF-kappa B at the crossroads of life and death [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3: 221-227.
- [11] Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation [J]. *J Leukoc Biol*, 1997, 61(4): 375-380.
- [12] Haslett C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease [J]. *Br Med Bull*, 1997, 53: 669-683.
- [13] Pope R M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 527-535.
- [14] Willis D, Moore A R, Frederick R, *et al.* Hemoxygenase; a novel target for the modulation of the inflammatory response [J]. *Nat Med*, 1996, 2(1): 87-90.
- [15] Poss K D, Tonegawa S. Heme oxygenase-1 is required for mammalian iron utilization [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 10919-10924.
- [16] Soares M P, Lin Y, Anrather J, *et al.* Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival [J]. *Nat Med*, 1998, 4: 1073-1077.

沙苑子黄酮对 CCl₄及 D-氨基半乳糖致急性肝损伤的保护作用

刘春宇¹, 顾振纶¹, 韩 蓉¹, 朱路佳¹, 周文轩², 郭次仪²

(1. 苏州大学医学院 药理教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 香港保健协会, 香港)

摘要:目的 探讨沙苑子黄酮(FAC)对肝损伤的保护作用。方法 采用0.1% CCl₄(10 mL/kg)、D-氨基半乳糖(D-Gal, 700 mg/kg)分别ip造成小鼠急性肝损伤模型,并ig不同剂量的FAC,测定血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性,观察肝组织病理改变;用CCl₄损伤原代培养大鼠肝细胞,测定细胞培养液ALT、AST活性,MTT法测定肝细胞增殖活性。结果 FAC能显著降低小鼠CCl₄和D-Gal损伤原代培养大鼠肝细胞模型ALT和AST活性($P < 0.01$),病理学观察显示,FAC明显减轻肝组织损伤程度($P < 0.01$)。FAC显著提高肝细胞活性,促进肝细胞增殖。结论 FAC具有显著的保肝作用。

关键词:沙苑子; 黄酮; CCl₄; D-氨基半乳糖; 肝损伤

中图分类号:R286.55

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)12-1838-04

Protection of flavonoids from *Astragalus complanatus* seed on acute liver injury induced by carbon tetrachloride and D-galactosamine

LIU Chun-yu¹, GU Zhen-lun¹, HAN Rong¹, ZHU Lu-jia¹, ZHOU Wen-xuan², GUO Ci-yi²

(1. Department of Pharmacology, Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China; 2. The Hong Kong Association for Health Care, Hong Kong, China)

Key words: the seed of *Astragalus complanatus* R. Br.; flavone; CCl₄; D-Gal; hepatic injury

沙苑子系豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Br. ex Bunge 的种子,是补益肝肾的传统中药,主要含有黄酮类、三萜苷类、有机酸、氨基酸、多肽、蛋白质、鞣质、甾醇、微量元素等^[1]。前期实验结果表明沙苑子醇提取物具有明显的保肝作用^[2],为了进一步研究沙苑子保肝有效成分,本课题组从醇提取物中分离出黄酮成分,采用CCl₄、D-氨基半乳糖(D-Gal)致小鼠急性肝损伤模型和CCl₄损伤原代培养大鼠肝细胞模型,观察沙苑子黄酮(FACS)的保肝作用。

1 材料

1.1 药物:沙苑子黄酮(FACS,含黄酮70%)自

制,临用时用生理盐水溶解。联苯双酯片(江苏鹏鹞药业有限公司),临用时碾成细粉加生理盐水制成混悬液。

1.2 试剂:CCl₄分析纯(南京化学试剂厂),以橄榄油稀释成0.1%溶液;D-Gal(Sigma公司),临用前蒸馏水溶解稀释成70 mg/mL溶液;四甲基偶氮唑盐(MTT, Amersco 分装);谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)测定试剂盒(上海科欣生物技术研究所)。

1.3 动物:昆明种小鼠,雄性,SPF级,18~24 g;Wistar大鼠,雄性,250~300 g,均由苏州大学实验动物中心提供。

收稿日期:2005-03-22

基金项目:香港保健协会研究项目(ZHK00200009)

作者简介:刘春宇(1961—),女,江苏人,副教授,主要从事中药有效成分及药理作用研究。

Tel: (0512) 65125280 E-mail: chunyu998@msn.com

2 方法

2.1 CCl₄小鼠模型^[3]:昆明种小鼠 50 只,随机分成 5 组,即正常组、CCl₄损伤模型组、联苯双酯组 (25 mg/kg)、FACS (30、120 mg/kg) 组。正常组和模型组 ig 生理盐水,其他各组 ig 相应药物,每天 1 次,连续 10 d。给药后第 11 天,除正常组给予等体积橄榄油外,其余各组小鼠 ip 0.1% CCl₄, 0.1 mL/10 g,禁食,16 h 后摘眼球取血,制备血清,测定血清 ALT 和 AST 活性;取肝左叶小块置 10% 福尔马林固定,进行苏木精-伊红染色,光镜下观察。

2.2 D-Gal 小鼠模型:小鼠 50 只,随机分成 5 组,即正常组、D-Gal 损伤模型组、联苯双酯组 (25 mg/kg)、FACS (30、120 mg/kg) 组。正常组和模型组 ig 生理盐水,其他各组 ig 给予相应药物,每天 1 次,连续 6 d。给药后第 7 天,除正常组给予等体积生理盐水外,其余各组小鼠 ip D-Gal 700 mg/kg,禁食 24 h 后,摘眼球取血,制备血清,测定血清 ALT 和 AST 活性;取肝左叶小块置 10% 福尔马林固定,切片经 HE 染色,光镜下观察肝细胞损伤程度。

2.3 CCl₄损伤培养大鼠肝细胞:参照夏志强等^[3]方法分离制备肝细胞悬液。0.3% 台盼蓝染色判断存活率,血细胞记数板测定细胞浓度。肝细胞悬液调节细胞数为 5×10⁴/mL,分别加于 24 孔培养板,每孔 1 mL,预培养 20 h,换液。根据添加药物的不同分成 5 组,每组 4 个复孔。正常组加入 RPMI-1640 培养液;肝损伤对照组加入 CCl₄溶液至终浓度为 20 mmol/L;FACS 各组分别加入 FACS 至终质量浓度为 1.0、0.5、0.25 mg/mL,并加入 CCl₄溶液至终浓度为 20 mmol/L,继续培养 4 h,取细胞上清液,测定 ALT 和 AST 活性。

2.4 肝细胞增殖测定:参照李跃华等 MTT 法^[4]测定,肝细胞悬液调节细胞数为 5×10⁴/mL,于 96 孔板加细胞悬液,每孔 100 μL,正常组加入 RPMI-1640 培养液,肝损伤对照组加入 CCl₄溶液至终浓度

为 20 mmol/L;FACS 组分别加入 FACS 至终质量浓度为 1.0、0.5、0.25 mg/mL,并加入 CCl₄溶液至终浓度为 20 mmol/L。24 h 后培养板中加入 5 mg/mL MTT 溶液,每孔 20 μL,共同孵育 4 h 后加入 10%十二烷基磺酸钠 (SDS),每孔 0.1 mL 以终止反应及溶解黑色结晶,酶标仪于 570 nm 波长处测定吸光度 (A) 值,反映细胞增殖活性。

2.5 统计学方法:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计程序进行单因素方差分析处理,组间采用 Dunnett 方法比较,等级资料用 Ridit 检验。

3 结果

3.1 对 CCl₄肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 的影响:与正常组相比,模型组小鼠 ALT 和 AST 明显升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,FACS 大、小剂量组小鼠血清 ALT、AST 明显下降 ($P < 0.01$),提示 FACS 对 CCl₄肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性升高均有明显的拮抗作用,见表 1。

表 1 FACS 对 CCl₄肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of FACS on ALT and AST activities in serum of liver-injured mice induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
正常	—	35.0±26.2**	128.0±40.0**
模型	—	205.6±98.7	200.3±63.4
联苯双酯	25	52.2±30.6**	147.6±39.7**
FACS	30	90.5±34.4**	125.3±19.9**
	120	82.6±36.5**	122.4±0.0**

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

3.2 对 CCl₄肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响:与正常组相比,模型组小鼠炎症细胞浸润严重,肝细胞点状坏死、碎屑样坏死多见,肝细胞浊肿样变性明显。FACS 组上述症状明显减轻,碎屑样坏死偶见。提示 FACS 对 CCl₄小鼠肝细胞损伤有明显的保护作用,见表 2。

表 2 FACS 对 CCl₄肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

Table 2 Effect of FACS on pathological changes in liver tissue of liver-injured mice induced by CCl₄

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	炎细胞浸润				坏 死				细胞浊肿			
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++
正常	—	10	0	0	0**	10	0	0	0**	10	0	0	0**
模型	—	0	0	2	6	0	0	1	7	0	0	2	6
联苯双酯	25	6	4	0	0**	7	3	0	0**	6	4	0	0**
FACS	30	7	2	0	0**	9	0	0	0**	2	7	0	0**
	120	6	2	0	0**	9	0	0	0**	5	4	0	0**

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

3.3 对 *D*-Gal 肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 的影响:与正常组相比,*D*-Gal 可使小鼠 ALT 和 AST 明显升高 ($P<0.01$),与模型组比较 FACS 组和联苯双酯组血清中 ALT、AST 活性均明显下降 ($P<0.01$),提示 FACS 对 *D*-Gal 肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性升高有明显的拮抗作用,见表 3。

表 3 FACS 对 *D*-Gal 肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of FACS on ALT and AST activities in serum of liver-injured mice induced by *D*-Gal ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
正常	—	15.71±3.12**	75.51±9.61**
模型	—	126.87±37.40	130.09±19.47
联苯双酯	25	47.65±16.28**	97.14±11.37**
FACS	30	59.01±20.46**	91.58±11.85**
	120	52.98±19.24**	82.73±12.54**

与模型组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs model group

表 4 FACS 对 *D*-Gal 肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

Table 4 Effect of FACS on pathological changes in liver tissue of liver-injured mice induced by *D*-Gal

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	炎细胞浸润				坏死				嗜酸性小体			
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++
正常	—	8	2	0	0**	7	3	0	0**	9	1	0	0**
模型	—	0	1	4	5	0	1	5	4	1	2	4	3
联苯双酯	25	5	4	1	0**	7	2	1	0**	8	2	0	0**
FACS	30	6	3	1	0**	7	2	1	0**	7	3	0	0**
	120	7	2	1	0**	7	3	0	0**	7	3	0	0**

与模型组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs model group

表 5 FACS 对 CCl₄损伤原代培养大鼠肝细胞 ALT 和 AST 活性及增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 5 Effect of FACS on ALT, AST activities, and proliferation of primary cultured hepatocytes of liver-injured rat induced by CCl₄ ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	A ₅₇₀
正常	—	23.13±2.09**	102.27±6.87**	1.32±0.19**
模型	—	43.71±3.48	184.91±8.38	0.75±0.09
FACS	0.25	32.23±2.92**	169.24±6.44	1.45±0.06**
	0.5	22.95±3.05**	150.87±5.66**	2.87±0.11**
	1.0	21.39±1.68**	132.49±6.17**	3.07±0.03**

与模型组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs model group

3.6 对 CCl₄ 损伤培养大鼠肝细胞增殖的影响:与正常组相比,模型组大鼠肝细胞增殖明显降低 ($P<0.01$),FACS 组与模型组相比肝细胞增殖明显增加 ($P<0.01$),其作用呈一定的量效关系,且细胞增殖高于正常组。提示 FACS 对 CCl₄ 致肝细胞损伤有直接保护作用,并能显著促进体外培养肝细胞生长,

3.4 对 *D*-Gal 肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响:正常组小鼠肝组织结构正常。模型组小鼠肝细胞浊肿,体积增大,细胞质内充满大量嗜伊红性较粗颗粒,可见气球样变肝细胞,嗜酸性变多见于灶状坏死的边缘。主要为肝细胞点状坏死,较重者可见灶状坏死,汇管区炎细胞浸润明显。FACS 组绝大部分肝组织结构正常,偶尔可见到单个坏死肝细胞和嗜酸性变肝细胞,汇管区炎细胞浸润明显减轻。提示 FACS 对小鼠 *D*-Gal 肝细胞损伤有明显的保护作用,见表 4。

3.5 对 CCl₄ 损伤培养大鼠肝细胞 ALT 和 AST 及肝细胞增殖的影响:与正常组相比,模型组原代培养大鼠肝细胞培养液 ALT 和 AST 明显升高 ($P<0.01$);FACS (0.5、1.0 mg/mL) 组使肝细胞 ALT 和 AST 活性均明显下降 ($P<0.01$),FACS (0.25 mg/mL) 组对 AST 活性无明显影响 ($P>0.05$),其作用呈现一定的量效关系,提示 FACS 对原代培养肝细胞 CCl₄ 损伤具有保护作用,见表 5。

见表 5。

4 讨论

CCl₄ 和 *D*-Gal 诱导的肝损伤模型是两种评价肝损伤药物疗效的标准模型,在 CCl₄ 肝损伤模型中,脂质过氧化是其主要肝损伤机制,*D*-Gal 是肝细胞磷酸尿嘧啶核苷的干扰剂,其诱发急性肝损伤病理学表现为肝细胞弥漫性变性、坏死、大量炎性细胞浸润,与临床病毒性肝炎病理变化极为相似,是形成急性肝功能衰竭比较理想的模型。实验结果显示 FACS 对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤、*D*-Gal 小鼠急性肝损伤均有明显的保护作用,提示 FACS 为沙苑子保肝的有效部位之一。

离体培养的原代肝细胞系统及其体外损伤模型,既可排除整体水平时神经体液的调节作用,又可排除离体器官水平时不同细胞之间的相互影响,从而可以观察各种药物对肝细胞的直接作用。本实验用胶原酶在体灌注肝脏的酶法分离大鼠肝细胞,

CCl₄损伤后,培养液中的ALT和AST活性显著升高,细胞增殖活性明显降低,FACS明显降低肝细胞ALT和AST活性,显著促进肝细胞增殖,具有促进体外培养肝细胞生长的作用,从细胞水平证实了FACS对肝细胞的保护作用。

References:

- [1] Liu C Y, Gu Z L. The chemical constituents and pharmacological effects of *Astragalus complanatus* R. Br. [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2002, 21(2): 1-3.
- [2] Liu C Y, Gu Z L, Han R, et al. Protective effect of extract in seed of *Astragalus complanatus* on acute hepatic injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(12): 1104-1106.
- [3] Xia Z Q, Dong C, Lu S G. Method of liver perfusion for separating rat hepatocytes and primary culture [J]. *Acta Acad Med Xuzhou* (徐州医学院学报), 1999, 19(6): 458-459.
- [4] Li Y H, Wu C Z, Que L L. Danshensu for enhancing hepatocyte growth and its protective effect on drug-induced liver cell injury [J]. *Acta Acad Med Nanjing* (南京医科大学学报), 1996, 16(4): 346-348.

麻黄汤对大鼠大脑额叶皮层氨基酸类神经递质水平的影响

魏凤环, 罗佳波*, 谭晓梅, 贺 丰

(南方医科大学 中医药学院, 广东 广州 510515)

摘 要:目的 研究麻黄汤(HED)对大鼠额叶皮层中天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)和γ-氨基丁酸(GABA)等氨基酸类神经递质水平的影响,及其量效和时效关系。方法 2,4-二硝基氟苯为衍生化试剂,HPLC-UV法测定大鼠额叶皮层中氨基酸水平。结果 给药5d,HED 15、18g/kg剂量组Asp、Glu和GABA水平与空白对照组相比有显著性升高,Gly无显著性改变。4种氨基酸均在ig 5d时,与空白对照组相比有显著性升高。结论 HED显著升高了大鼠额叶皮层中氨基酸水平,并呈现一定的量效、时效关系。在试验剂量范围内15g/kg是较敏感的剂量;给药5d是最佳时间。

关键词:麻黄汤;氨基酸;量效关系

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)12-1841-04

Effect of *Herba Ephedrae* Decoction on levels of amino acid neurotransmitters in prefrontal cortex of rats

WEI Feng-huan, LUO Jia-bo, TAN Xiao-mei, HE Feng

(School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Key words: *Herba Ephedrae* Decoction (HED); amino acid; dose-effect relationship

麻黄汤(*Herba Ephedrae* Decoction, HED)由麻黄配伍桂枝、杏仁、炙甘草组成。具有发汗解表、宣肺平喘的功效。现代研究表明,麻黄中的主要活性成分左旋麻黄碱和右旋伪麻黄碱具有增强小鼠自主活动、升高动脉血压、增加心率、导致神经变性等不良反应^[1~4],在临床应用中体现的是产生失眠、震颤、心悸等。有学者认为麻黄碱致神经变性的原因,可能与谷氨酸(glutamic acid, Glu)的过量释放有关^[1]。Glu和天冬氨酸(aspartic acid, Asp)是脑部重要的兴奋性神经递质,γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric, GABA)及甘氨酸(glycin, Gly)是脑部重要的抑制性神经递质。本实验根据HED中主要成分所产

生的上述中枢神经系统的不良反应,及脑组织中氨基酸类神经递质的性能,研究了HED对大鼠大脑皮质额叶中氨基酸水平的影响。

1 材料

1.1 动物与试药:SPF级Wistar大鼠,体重为(215±15)g,雌雄兼用,由南方医科大学实验动物中心提供。麻黄汤参考文献方法制备^[5],浓缩至含麻黄生药1.5g/mL,作为麻黄汤储备液。氨基酸对照品均购自Sigma公司;2,4-二硝基氟苯(DNFB,日本);乙腈、甲醇为色谱纯(Merck,德国);醋酸钠、冰醋酸等试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器:HP-1100高效液相色谱仪(美国安捷

收稿日期:2005-02-12

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(30030150)

作者简介:魏凤环(1976—),女,山东人,博士生,研究方向为方剂配伍规律及中药新药的研究开发。E-mail: awag8486@sohu.com

*通讯作者 罗佳波 Tel: (020) 61648266 E-mail: ljb@fimmu.com