

补骨脂水提物对小鼠的肝毒性及胆汁酸转运的影响

毕亚男¹, 李震², 卢国彦^{1,3}, 史红¹, 周昆^{1*}

1. 天津中医药大学中医药研究院, 方剂学教育部重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

3. 宁晋县中西医结合医院, 河北 邢台 055550

摘要: **目的** 观察补骨脂水提物对小鼠的肝毒性及对胆汁酸转运体的影响。**方法** 补骨脂水提物连续 ig 给药 4 周, 禁食不禁水 12 h, 麻醉动物后取血检测血清生化, 剖取肝脏称质量并进行肝脏病理组织学检查。肝脏匀浆后 ELISA 法检测胆盐输出泵 (BSEP) 和钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白 (NTCP) 蛋白的表达情况。**结果** 补骨脂水提物以大剂量 ig 给药, 连续给药 2 周 80 g 生药/kg 组小鼠体质量显著降低, 给药 3 周 3 个剂量组小鼠体质量均显著降低。给药期间, 80 g 生药/kg 组小鼠死亡 10 只, 40 g 生药/kg 组小鼠死亡 6 只。给药 4 周结束补骨脂水提物 80 g 生药/kg 和 40 g 生药/kg 组小鼠肝系数显著大于对照组。补骨脂水提物 80 g 生药/kg 组雄性小鼠 ALT 高于对照组, 雌性小鼠 ALP 低于对照组, 40 g 生药/kg 组雌雄小鼠 ALP 均低于对照组。补骨脂水提物可使小鼠肝脏出现肿胀变性。补骨脂水提物 20 g 生药/kg 可导致肝脏 BSEP 和 NTCP 均显著降低。**结论** 补骨脂水提物大剂量 ig 给药对小鼠肝毒性明显, 并可影响胆汁酸转运体的表达。

关键词: 补骨脂; 肝毒性; 小鼠; BSEP; NTCP

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2015)03-0267-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.03.007

Hepatotoxicity of aqueous extract from *Psoralea corylifolia* and its effect on bile acid transportation in mice

BI Ya-nan¹, LI Zhen², LU Guo-yan^{1,3}, SHI Hong¹, ZHOU Kun¹

1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Ningjin County, Xingtai 055550, China

Abstract: Objective To investigate the hepatotoxicity of aqueous extract from *Psoralea corylifolia* and its effect on bile acid transportation in mice. **Methods** The aqueous extract from *P. corylifolia* was given by ig administration for 4 weeks. After fasting for 12 h, mice were anesthetized. The biochemical indices in serum, liver weight, and, histopathological examination were observed. The protein expression of bile salt export pump (BSEP) and sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) in liver homogenate was detected by ELISA methods. **Results** The aqueous extract from *P. corylifolia* in large-doses (80 g crude drug/kg) group was given by ig administration for 2 weeks, the body weight of mice was significantly decreased, continuous ig administration for 3 weeks, the body weight of mice in all three groups was significantly decreased. During the drug administration, ten mice died in 80 g crude drug/kg group and six mice died in 40 g crude drug/kg group. Ig administration for 4 weeks, the liver coefficients of mice in 80 g crude drug/kg group and 40 g crude drug/kg group were significantly larger than those of mice in the control group. In the 80 g crude drug/kg group, the ALT of male mice was higher than that of mice in the control group; The ALP of female mice was lower than that of mice in the control group; In the 40 g/kg group, the ALP of both male and female mice was lower than that of mice in the control group. The aqueous extract from *P. corylifolia* could make the degeneration of liver swelling of mice. The BSEP and NTCP in liver were significantly decreased in 20 g crude drug/kg group. **Conclusion** The aqueous extract from *P. corylifolia* in large dose group could lead the liver injury in mice and influence the expression of bile acid transporter.

Key words: *Psoralea corylifolia* L.; hepatotoxicity; mouse; bile salt export pump; sodium taurocholate cotransporting polypeptide

收稿日期: 2014-12-16

基金项目: 重大新药创制专项项目 (2011ZX09201-201-21); 国家自然科学基金项目 (81202991)

作者简介: 毕亚男, 女, 中医内科学硕士研究生。

*通信作者 周昆 E-mail: z.k.ken@263.net

近年来补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的肝脏毒性开始受到重视, 相继有补骨脂肝毒性的临床和实验研究报道^[1-4], 前期研究表明补骨脂及其水提取物都有一定的肝毒性, 但受限于以补骨脂生药作为对照品, 给药剂量仅为 2.1 g 生药/kg^[4](《中国药典》2010 年版规定补骨脂使用量上限为 10 g/d, 折合大鼠用量为 0.9 g 生药/kg, 小鼠用量为 1.3 g 生药/kg), 本研究仅使用水提取物进行毒性试验, 将给药剂量大幅提高, 观察了连续大剂量 ig 给予补骨脂水提取物时小鼠的毒性表现。在补骨脂肝损害临床病例中有胆汁淤积的表现^[1-2], 所以补骨脂的肝损害表现是否是因为干扰胆汁酸的正常合成转运是本课题的研究重点。胆盐输出泵 (bile salt export pump, BSEP) 和钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白 (sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP) 是肝细胞膜上分别将胆汁酸由肝细胞分泌至细胞间胆管和从血液转运至肝细胞的胆汁酸转运体^[5-6], 它们在胆汁酸的转运中起到重要的作用, 因此本研究考察了肝脏中与胆汁酸转运相关的 BSEP、NTCP 的变化情况, 以了解补骨脂水提取物是否能影响胆汁酸的转运。

1 材料

1.1 受试药

补骨脂水提取物, 生药含量为 4.78 g 生药/g。经 HPLC-DAD 检测其中含有补骨脂苷 27.041 mg/g, 异补骨脂苷 18.641 mg/g, 补骨脂素 1.477 mg/g, 异补骨脂素 0.992 mg/g, 补骨脂酚 1.176 mg/g, 补骨脂甲素和补骨脂乙素未能检出。样品制备及检测均由天津中医药大学天津市现代中药重点实验室王跃飞副研究员实验团队提供。

1.2 动物

ICR 小鼠, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号 SCXK(京)2009-0004, 合格证号 11401300012564。饲养于天津中医药大学实验动物中心, 24 h 通风、温度 20~25 °C, 小鼠自由饮用自来水及饲料。

1.3 试剂与仪器

ALT、AST、ALP、TBIL 试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司); BCA 蛋白检测试剂盒 (南京建成科技有限公司); BSEP、NTCP 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司); PBS 粉剂 (武汉博士德生物工程有限公司); 其他试剂均为国产分析纯。

Legend Micro17 离心机 (赛默飞世尔科技公司); SPH-103B 恒温培养振荡器 (上海世平实验设

备有限公司); ASP300S 全自动封闭脱水机, RM2135 切片机 (Leica); BMJ-1 生物组织包埋机 (天津航空机电公司); 照相显微镜 (OLYMPUS); InfiniteM200 多功能酶标仪 (Tecan); 7020 全自动生化分析仪 (日立)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

96 只小鼠, 按体质量随机分为 4 组, 即对照组、补骨脂水提取物高、中、低剂量 (80、40、20 g 生药/kg) 组, 每组雌雄各 12 只。各组每天按 0.4 mL/10 g 体质量 ig 给药 1 次, 对照组以饮用水代替, 连续给药 4 周。每周称体质量, 根据体质量调整给药量。

2.2 血清生化和病理组织学检查

给药结束, 动物禁食不禁水 12 h, ip 水合氯醛麻醉后腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min 取上层血清备用, 检测血清中 ALT、AST、ALP、TBIL。取相同部位肝脏一叶, 用 12% 甲醛液固定, 常规石蜡包埋、HE 染色, 光镜下进行病理组织学检查。

2.3 ELISA 检测肝脏中 BSEP、NTCP

取肝脏用 PBS 制备肝匀浆, 检测蛋白浓度。根据蛋白浓度, 将肝匀浆稀释合适倍数, 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测肝脏中 BSEP、NTCP 蛋白表达情况。

2.4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ (除特别注明以外) 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 补骨脂水提取物对小鼠体质量的影响

补骨脂水提取物以大剂量 ig 给药对小鼠体质量有较明显的影响, 补骨脂水提取物 80 g 生药/kg 连续给药 2 周, 小鼠体质量显著低于对照组; 给药 3 和 4 周, 3 个剂量组小鼠体质量均显著降低 (图 1)。

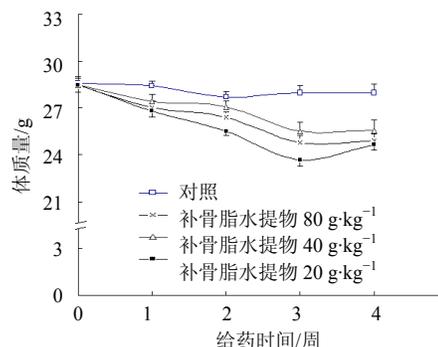


图 1 补骨脂水提取物对小鼠体质量的影响
Fig. 1 Effect of aqueous extract from *P. corylifolia* on body weight in mice

3.2 补骨脂水提取物对小鼠肝系数的影响

给药4周结束,80 g 生药/kg 组小鼠死亡10只,其中雌性3只、雄性7只;40 g 生药/kg 组小鼠死亡6只,其中雌性1只、雄性5只,雄性存活小鼠部分有腹水现象。给药4周结束,补骨脂水提取物80、40 g 生药/kg 组小鼠肝系数显著大于对照组(图2)。

3.3 补骨脂水提取物对小鼠 AST、ALT、ALP 和 TBIL 的影响

给药4周,补骨脂水提取物80 g 生药/kg 组雄性小鼠血清AST和ALT高于对照组,雌性小鼠ALP低于对照组,40 g 生药/kg 组雌雄小鼠ALP均低于对照组,20 g 生药/kg 组小鼠与对照组无显著差别(表1)。

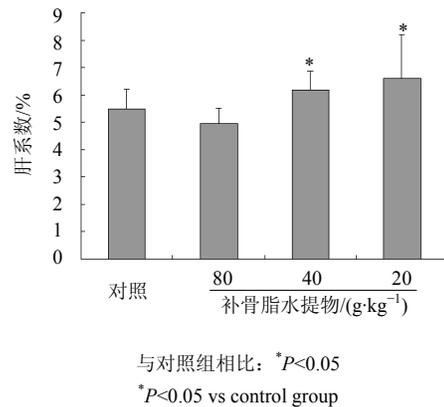


图2 补骨脂水提取物对小鼠肝系数的影响
Fig. 2 Effect of aqueous extract from *P. corylifolia* on liver coefficient in mice

表1 补骨脂水提取物对小鼠血清AST、ALT、ALP和TBIL的影响

Table 1 Effect of aqueous extract from *P. corylifolia* on AST, ALT, ALP, and TBIL in serum of mice

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	性别	n	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	TBIL/(U·L ⁻¹)
对照	—	雌	12	189.3±28.1	33.4±8.1	87.1±31.6	0.1±0.1
		雄	12	208.1±41.9	40.5±18.4	94.3±37.9	0.3±0.1
补骨脂水提取物	80	雌	9	232.4±87.8	39.2±22.9	53.4±28.7*	0.1±0.1
		雄	5	262.8±57.8*	69.6±23.0*	96.2±38.3	0.5±0.5
	40	雌	11	189.8±28.8	32.7±7.6	62.4±22.0*	0.1±0.1
		雄	7	236.9±70.1	52.0±16.1	54.4±21.9*	0.2±0.3
	20	雌	12	191.1±22.5	33.1±9.8	77.3±14.6	0.1±0.1
		雄	12	194.7±30.6	45.3±2.41	71.8±30.0	0.3±0.2

与对照组相比: *P<0.05
*P<0.05 vs control group

3.4 小鼠肝脏的病理变化

对照组小鼠的肝脏中肝细胞形态正常,无变性坏死,肝细胞排列整齐;补骨脂水提取物给药4周,可引起小鼠肝脏中肝细胞肿胀变性。80、40 g 生药/kg 所有存活小鼠都存在肝细胞变性;20 g 生药/kg 组小鼠有8/12存在明显的肝细胞变性。但各组未发现肝脏内有明显的胆汁淤积。见图3。

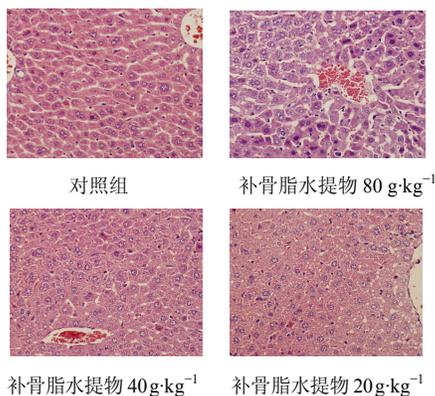


图3 肝脏病理照片
Fig. 3 Pathological picture of liver

3.5 对BSEP、NTCP的影响

补骨脂水提取物20 g 生药/kg 连续给药4周,小鼠肝脏中BSEP和NTCP蛋白水平均显著降低。对照组BSEP/NTCP为1.21,而补骨脂水提取物20 g 生药/kg 组BSEP/NTCP为0.91。

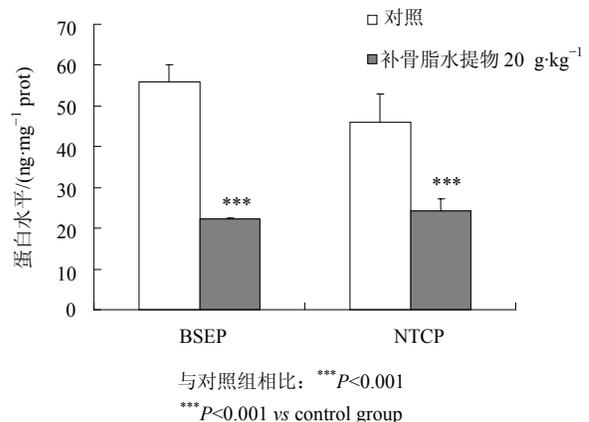


图4 对小鼠肝脏胆汁酸转运体BSEP和NTCP的影响
Fig. 4 Effect of aqueous extract from *P. corylifolia* on bile acid transporters BSEP and NTCP in mice

4 讨论

补骨脂水提物连续大剂量 ig 给药可导致小鼠体质量明显降低, 给药 2 周开始 80 g 生药/kg 小鼠体质量与对照组无显著差异。在补骨脂水提物大剂量连续给药导致小鼠的死亡在雌雄小鼠上表现有一定差别, 80 g 生药/kg 和 40 g 生药/kg 剂量下均是雄性小鼠死亡更多, 尽管该差异并无统计学意义, 而且雌雄动物的血清 ALT、ALP 变化表现也不尽相同, 因此提示补骨脂水提物的毒性可能存在性别差异。

补骨脂水提物剂量过大时动物存在较多死亡, 因此对 BSEP 和 NTCP 的检测仅限于没有动物死亡的 20 g 生药/kg 组。ELISA 结果显示补骨脂水提物可使小鼠肝脏中 BSEP 和 NTCP 蛋白水平均显著降低, 也就是胆汁酸从肝细胞排出和吸收入肝细胞的能力均降低, 但如果以 BSEP/NTCP 作为胆汁酸在肝细胞内浓度的影响因素, 那么补骨脂水提物 20 g 生药/kg 组小鼠 BSEP/NTCP 与对照组相比降低约 25%, 这表明补骨脂水提物对胆汁酸转运体的影响是降低其将胆汁酸排出肝细胞的能力, 有引起肝细胞中胆汁酸浓度水平升高的可能。细胞内胆汁酸浓度的升高可导致细胞损伤^[7], 这也许是补骨脂水提

物造成肝损伤的作用途径。

参考文献

- [1] Nam S W, Baek J T, Lee D S, *et al.* A case of acute cholestatic hepatitis associated with the seeds of *Psoralea corylifolia* [J]. *Clin Toxicol*, 2005, 43(6): 589-591.
- [2] Cheung W I, Tse M L, Ngan T, *et al.* Liver injury associated with the use of *Fructus Psoraleae* (Bol-gol-zhee or Bu-gu-zhi) and its related proprietary medicine [J]. *Clin Toxicol*, 2009, 47(7): 683-685.
- [3] 邓平香, 徐敏. 补骨脂单味应用和复方应用对大鼠肝脏毒性的比较 [J]. 广西中医药, 2005, 28(2): 49-50.
- [4] 周昆, 代志, 柳占彪, 等. 补骨脂水提物引起的大鼠肝损害 [J]. 天津中医药大学学报, 2013, 32(4): 221-224.
- [5] Pauli-Magnus C, Meier P J. Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis [J]. *Hepatology*, 2006, 44(4): 778-787.
- [6] Zollner G, Trauner M. Mechanisms of cholestasis [J]. *Clin Liver Dis*, 2008, 12(1): 1-26.
- [7] Palmeira C M, Rolo A P. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids [J]. *Toxicology*, 2004, 203(1-3): 1-15.