

- Alzheimer's disease [J]. *Am J Med*, 1997, 103(3A): 11.
- [2] Li Y K. *Methodology in Pharmacological Experiment on Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1991.
- [3] Yang H X, Wang W X, Ke J S, *et al.* Detection of whole blood acetylcholine by the method of alkali hydroxylamine compared with color [J]. *J Clin Lab Sci* (临床检验杂志), 1995, 10(2): 84-85.
- [4] Asthana S, Craft S, Baker L D, *et al.* Cognitive and neuroendocrine response to transdermal estrogen in post-menopausal woman with Alzheimer's disease: results of a placebo-controlled, double-blind, pilot study [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 1999, 24(6): 657.
- [5] Dong H T, Zhang T S, Chen Y L, *et al.* Survey and analysis on Alzheimer's disease treated by traditional Chinese medicine [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2000, (4): 17-19.
- [6] Li Q B, Mei R. *Traditional Chinese and Western Medical Diagnosis and Treatment of Senile Dementia* (老年痴呆症的中西医诊断与治疗) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1999.

甘草苷对四氯化碳肝脏毒性的保护作用

逮胜,戴德哉*

(中国药科大学 药理研究室,江苏 南京 210009)

离体肝灌注技术最初由英国生理学家 Trowell 于 1942年创立,1951年 Miller 等人改进了灌注方法,首次以此技术进行了血浆蛋白质合成的研究。近年来,离体肝灌注技术得到普遍使用,被广泛用于药理毒理学研究,适用于研究药物或化学物质引起的肝毒性^[1]。本实验采用离体肝灌注技术,通过灌注一定量的 CCl₄造成肝脏毒性,同时给予一定量的甘草苷,观察甘草苷对肝脏毒性的保护作用,据此分析甘草解毒的物质基础及机制。

1 材料

1.1 药品与试剂:甘草苷由本实验室分离纯化制得,经 UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 等结构测定与文献报道甘草苷一致, HPLC 检测为单一成分,纯度达到 98% 以上。RPMI Medium 1640, GIBCO BRL (Life Technologies, Inc. Grand Island N. Y. 14072 U. S. A)。ALT/GPT 测试盒,南京建成生物工程研究所,批号 20000908 AST/GO T测试盒,南京建成生物工程研究所,批号 20000909

1.2 仪器:SHZ-B 水浴恒温振荡器,上海跃进医疗器械厂。BT03-200 恒流泵,河北保定兰格恒流泵有限公司。754型分光光度计,上海第三分析仪器厂。

1.3 动物:SD大鼠,体重 200~250 g,雌雄各半,由南京医科大学实验动物中心提供

2 方法

2.1 离体大鼠肝灌注模型制备^[1]:取健康大鼠,体重 200~250 g,雌雄兼用,用 3% 戊巴比妥钠 0.3

mL/100 g ip 麻醉,将麻醉大鼠仰置手术板上,沿腹部正中作工字型切口,翻开腹部两侧皮肤,将肠管推向左侧,充分暴露肝门区域,用玻璃分离针分离出门静脉,同时分离出肾静脉。在离肝门及门下约 5~6 mm 处分别用 2 根线穿过门静脉底部,各扣一个松节,用 1 根线穿过肾静脉并从肾静脉注入 6% 肝素钠 0.1 mL/mg,稍后关闭灌注泵,将离肝门远端下约 6 mm 处的线结扎,系紧门静脉,并同时结扎肾静脉的线。迅速在近端用手术剪剪一斜形切口(防止剪断),立即插入口径约 0.5 mm 塑胶管,深度约 3~4 mm,经检查插管确已入门静脉(塑胶管内有血液进入),调节深浅合适后即行节扎,开动蠕动泵剪断腹部下静脉,肉眼观察肝脏内血液基本冲洗将尽时随后分离肝脏,以正常位置置肝脏于水浴恒温 37℃ 灌注杯(防止门静脉扭曲)。

2.2 离体肝灌注:先以经过纯度 > 99.5% 氧气饱和、水浴恒温 37℃ 的 Krebs-Henseleit 等渗缓冲液,非循环性的灌注冲洗肝脏中的血液。流速约 2 mL/(g·min),灌至肝脏颜色呈土黄色,稳定 5 min 后,将塑胶管插入经过纯度 > 99.5% 氧气饱和、水浴恒温 37℃ 的 RPMI-1640 缓冲灌注液中,看到从肝脏中流出液呈红色(1640 灌注液呈红色)时,将肝脏从盛 Krebs-Henseleit 的杯中移至盛 1640 灌注液的杯中,循环性前向性的灌注(顺流),流速约 2 mL/(g·min)。不同剂量的药物用严密消毒的注射器缓慢注入盛 1640 灌注液的杯中,分别在给药

* 收稿日期:2003-04-15

基金项目:江苏省教育厅自然科学基金资助课题(KJB360003)

作者简介:逮胜(1962-),男,安徽省广德人,博士,现在中国药科大学药学博士后流动站从事博士后研究工作。

Tel (025) 3271270 E-mail dxs0162@sina.com

前 (0 min) 给药后 15, 30, 60, 90 min 取灌流液各 0.5 mL 放入消毒洁净的子弹头型试管中, 并立即放入冰箱冷藏待测 (用于测定 AST, ALT), 同时立即补入 1640 灌流液 0.5 mL

2.3 测定方法^[2]

2.3.1 AST测定: 采用赖氏法, 样品 0.1 mL 加 AST 基质液 0.5 mL, 置 37℃ 水浴 60 min 后, 加 2,4-二硝基苯胍液 0.5 mL, 置 37℃ 水浴 20 min, 加 0.4 mol/L NaOH 5 mL 混匀, 10 min 后, 用 754 分光光度计于 520 nm 以蒸馏水调吸光度零点, 测定各管的吸光度 (A) 值

2.3.2 ALT测定: 采用赖氏法, 样品 0.1 mL 加 ALT 基质液 0.5 mL, 置 37℃ 水浴 30 min 后, 加 2,4-二硝基苯胍液 0.5 mL, 置 37℃ 水浴 20 min, 加 0.4 mol/L NaOH 5 mL 混匀, 10 min 后, 用 754 分光光度计于 505 nm 以蒸馏水调吸光度零点, 测定各管的 A 值

3 结果

3.1 CCl₄对离体大鼠肝灌流中 AST, ALT 的影响: 取健康大鼠 12 只, 体重 200~250 g, 雌雄各半, 分 2 组: 1640 灌流液 200 mL 组, CCl₄ 1.0 mL (约 1.06 g CCl₄) / 200 mL 灌流液组, 每组 6 只。按上述方法测定 AST 及 ALT 含量, 结果见表 1 1640 灌流液对肝脏基本无损伤, 灌流液中加入 CCl₄对肝脏有极明显的损伤作用, 该模型对有毒物质的反应是敏感的

3.2 甘草苷对离体大鼠肝灌流中 AST, ALT 的影响: 取健康大鼠 12 只, 体重 200~250 g, 雌雄各半, 分 2 组: 1.0 mL CCl₄+ 30 mg 甘草苷 / 200 mL 灌流液组, 1.0 mL CCl₄+ 60 mg 甘草苷 / 200 mL 灌流液组, 每组 6 只。按上述方法测定 AST, ALT 含量, 结果见表 1 由表 1 可见, 甘草苷对 CCl₄造成的肝脏损伤有明显保护作用, 且呈一定的量效关系

4 讨论

表 1 CCl₄及甘草苷对离体大鼠肝灌流中 AST, ALT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effects of CCl₄ and liquiritin on contents of AST, ALT in isolated perfused liver of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	AST					ALT				
	0 min	15 min	30 min	60 min	90 min	0 min	15 min	30 min	60 min	90 min
1640 对照	4.63±1.08	6.50±1.31	8.63±1.23	12.70±2.64	16.63±2.51	5.38±1.38	8.55±1.99	10.42±2.31	13.72±2.73	15.42±3.08
CCl ₄	4.82±1.01	24.42±4.38 [*]	48.52±5.19 [*]	74.73±3.61 [*]	93.65±2.95 [*]	5.87±1.15	32.12±5.18 [*]	47.93±5.83 [*]	64.92±5.31 [*]	85.23±9.64 [*]
CCl ₄ + 甘草苷 (30 mg)	4.45±0.81	14.98±2.14 [#]	31.55±3.08 [*] #	39.75±3.99 [*] #	50.77±3.51 [*] #	5.60±1.27	19.53±2.87 [*] #	28.03±3.66 [*] #	34.55±3.07 [*] #	44.58±2.68 [*] #
CCl ₄ + 甘草苷 (60 mg)	4.55±0.64	11.97±2.04 [*] #	20.92±1.82 [*] #	31.05±2.81 [*] #	38.37±3.63 [*] #	5.53±1.41	12.78±2.41 [*] #	19.62±2.28 [*] #	26.15±2.35 [*] #	33.55±2.66 [*] #

与 1640 对照组比较: * P < 0.01 ** P < 0.001; 与 CCl₄ 组比较: # P < 0.001

* P < 0.01 ** P < 0.001 vs 1640 control group # P < 0.001 vs CCl₄ group

甘草俗称“国老”, 能解百毒。但其解毒作用机制尚不很清楚, 可能有甘草甜素的吸附作用, 甘草次酸的肾上腺皮质激素样作用及类似葡萄糖醛酸的结合解毒作用, 以及药酶诱导、细胞膜稳定作用等

本实验通过测定肝灌流液中释出的 AST 及 ALT, 评价甘草苷对 CCl₄造成的肝脏毒性的保护作用。实验结果表明, CCl₄能极显著升高灌流液中 AST,

ALT 含量, 造成肝脏毒性 CCl₄为化学致毒物质, 当加入一定量的甘草苷时, 升高的 AST, ALT 显著降低, 说明甘草苷对肝脏毒性有明显保护作用。甘草苷为甘草中有效成分, 属黄酮类化合物。本研究结果从另一角度揭示甘草解毒的物质基础及其解毒机制

References

[1] Meeks R G, Harrison S D, Bull R J. *Hepatotoxicology* [M]. London: CRC Press, 1991.

山东药圣生物科技 (平邑) 有限公司荣誉推出“药圣 1+ 1[®]天然澄清剂”

“药圣 1+ 1[®]天然澄清剂”主要用于: 1. 传统中药“水提醇沉”工艺中乙醇的替代; 2. 传统中药提取物 (如银杏叶干浸膏、山楂叶黄酮、叶绿素等) 工艺中有机溶媒的水溶媒替代; 3. 中药水针、粉针、冻干粉针的澄清处理; 4. 无菌、无热原的中医药原料、生化原料澄清处理; 5. 中草药、生化药品、保健食品、口服液、果汁、茶饮料、啤酒等产品的澄清处理; 6. 氨基酸类、维生素类、有机酸类、抗生素类发酵液的澄清处理; 7. 对重金属污染的工业废液 (水) 及其他工业废水的澄清处理; 8. 对出口食品、药品、药材、保健品重金属农药残留超标的有效处理

收得率分别提高 30%~10 倍; 含量提高 10%~50%; 工厂成本下降 30%~80%; 还生产硫酸软骨素、黄连素系列、注射用黄芩苷 (95%), 双花连翘苷, 银杏叶干浸膏、丹参素、丹参川芎浸膏等, 以及口服级中药提取物, 亦可根据客户要求生产。

地址: 山东平邑县浚河路 78 号 电话: (0539) 4088727 13355026077

传真: (0539) 4089366 四川地址: 青神县用九大厦三楼

电话 (传真): (0833) 8811413 13568248000 13890355787