

芫花甘草反药组合对小鼠肝脏损伤的机制研究

王 义*, 安 媛, 武海滨[#](西安市儿童医院, 西安 710003)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3106-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.25

摘要 目的:从肝脏转运体角度,研究芫花甘草反药组合对小鼠肝脏的损伤机制。方法:40只小鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、甘草[15 g(生药)/kg]组、芫花[15 g(生药)/kg]组、芫花与甘草1:1[15 g(生药)/kg]组、芫花与甘草1:3[15 g(生药)/kg]组($n=8$),ig给药,每天1次,连续7 d。HE染色,光学显微镜下观察肝组织病理形态学,并统计病理分级;Western blot法检测小鼠肝脏转运体Ntcp蛋白的表达;检测小鼠肝组织中胆汁酸盐(TBA)的含量。结果:与正常对照组比较,芫花与甘草1:1、1:3组小鼠肝脏转运体Ntcp蛋白表达增强;芫花与甘草1:1组肝细胞变性等级“+++”的小鼠只数增加(8只),肝细胞中TBA含量增加;芫花与甘草1:3组小鼠肝细胞变性等级“+++”“++”的小鼠只数增加(分别为2、6只)。结论:芫花甘草反药组合可诱发小鼠肝脏损伤,其机制可能与增强Ntcp表达、致TBA大量蓄积于肝脏内有关。

关键词 芫花;甘草;肝损伤;反药组合;Ntcp转运体;小鼠

Study of Liver Damage Mechanism in Mice Caused by the Incompatibility of *Daphne genkwa* Combined with *Glycyrrhiza uralensis*

WANG Yi, AN Yuan, WU Hai-bin(Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the liver damage mechanism in mice caused by the incompatibility of *Daphne genkwa* combined with *Glycyrrhiza uralensis* in aspect of liver transporter. METHODS: 40 mice were equally randomized into a normal control (isometric normal saline) group, a group of *G. uralensis* [15 g (medicinal materias)/kg], a group of *D. genkwa* [15 g (medicinal taterias)/kg], a group of *D. genkwa* with *G. uralensis* in the ratio of 1:1 [15 g (crude drug)/kg], a group of *D. genkwa* with *G. uralensis* in the ratio of 1:3 [15 g (medicinal materias)/kg] ($n=8$). The mice were given the corresponding drug, ig, once a day for 7 consecutive days. HE staining was performed and then the pathomorphology of liver tissues were observed under the light microscope, and calculation was made for pathological grading. Western blot method was employed to determine the protein expression of the transporter Ntcp protein in the livers of mice. The contents of total bile acids (TBA) in livers of mice were determined. RESULTS: Compared to the mice in the normal control group, those in the group of 1:1 and 1:3 demonstrated higher protein expression of Ntcp. In the group of 1:1, the mice with grade “+++” hepatocyte degeneration were more (8). The mice with grade “+++” and “++” hepatocyte degeneration in the groups of 1:3 were more (2 and 8 respectively). CONCLUSIONS: *D. genkwa* combined with *G. uralensis* can induce liver damage in mice by a mechanism which may be related to the accumulation of a large amount of TBA in the liver as a result of the increase in the expression of Ntcp in mice.

KEYWORDS *Daphne genkwa*; *Glycyrrhiza uralensis*; Liver damage; Combination of incompatible drugs; Transporter Ntcp; Mice

我国有着非常丰富的天然药物资源,并在长期的临床实践中,形成了我国独立的中药材使用历史^[1]。通过长达千年的摸索,人们逐渐掌握了一些特殊药物的配伍规律,并明确了“十八反”的用药配伍禁忌。芫花与甘草作为“十八反”中一对常见的反药,通过大量临床研究报道证实,该组合具有一定的毒性^[2]。近几年来,关于芫花甘草反药的作用机制主要集中在肝药酶代谢与毒性成分的研究上^[3],基于肝脏转运体对芫花甘草组合毒性的研究却非常少。因此,本研究拟通过对芫花甘草反药组合对小鼠肝脏Ntcp转运体的影响,探索该组合对肝脏损伤的机制。

1 材料

1.1 仪器

LGZ/PGZ800~1800型离心机(江苏华大离心机股份有限

* 主治医师。研究方向:重症医学。电话:029-87692203。E-mail: wangyichengxian@163.com

通信作者:副主任医师,硕士。研究方向:重症医学。电话:029-87692028。E-mail: whb139191280571@126.com

公司);AU5800型全自动生化分析仪(美国Beckman-Coulter公司);TE70XP型转膜仪(美国Hofer公司);DYY-11B型电泳仪(广州昱然机电设备有限公司);YLN-2000型电泳凝胶成像分析系统(北京亚力恩机电技术研究所);XBT-1X型线胶片(日本Kodak公司);TGL20M-II型低温高速离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)。

1.2 饮片

芫花(亳州市同盛源药业有限公司,批号:091102);甘草(宁夏中宁县枸杞草枸杞开发有限公司,批号:091025)。

1.3 药品与试剂

山羊抗兔IgG二抗/辣根酶标记(北京九州天瑞科技有限公司);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国GE Healthcare公司);RIPA裂解液(北京赛驰生物科技有限公司);兔多克隆抗体(美国Abcam公司);胆汁酸盐(TBA)试剂盒、 β -actin抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 动物

KM小鼠40只,♀,体质量为20~22 g,购自新疆维吾尔自

治区实验动物研究中心[动物生产许可证号:SCXK(新)2010-0001]。小鼠饲养于新疆医科大学第一附属医院实验动物科学部虚拟清洁级动物房内,喂饲全价营养颗粒饲料,自由饮水。

2 方法

2.1 水煎液的制备

芫花称定质量后,以15倍量蒸馏水浸泡90 min,煎煮,煮沸60 min后提取,药液冷却后采用布氏漏斗行滤过处理,提取液减压回收,得质量浓度为0.375 g(生药)/ml的芫花水煎液^[4]。甘草按上述方法制备,得质量浓度为0.375 g(生药)/ml的甘草水煎液。芫花-甘草以1:3、1:1的比例混合并按上述水煎液制备方法制备,得质量浓度为0.375 g(生药)/ml的合煎液。3种水煎液均于4℃贮藏,备用。

2.2 分组与给药

40只KM小鼠随机均分为5组,即甘草组、芫花组、芫花与甘草1:1组、芫花与甘草1:3组、正常对照(等容生理盐水)组。ig给药,给药剂量均为15 g(生药)/kg,每天1次,连续7 d^[5]。

2.3 各组小鼠肝组织病理检查

末次给药后,断颈处死小鼠,摘取肝脏,于福尔马林溶液中固定24 h;行二甲苯透明、乙醇脱水、石蜡包埋、切片、HE染色处理,光学树脂封片;置于光学显微镜下对小鼠肝组织病理形态学进行观察^[6]。根据肝脏变性情况,可分为4级:“+++”指点灶状肝细胞坏死,细胞嗜酸变,炎细胞浸润;“++”指少量肝细胞坏死,炎细胞浸润;“+”指肝组织水肿,未发现肝细胞坏死;“-”指肝组织结构清晰及形态正常^[7]。

2.4 各组小鼠肝脏转运体Ntcp蛋白表达测定

以Western blot法测定蛋白表达。取小鼠肝组织标本,置于匀浆器内,加入RIPA裂解液提取蛋白。采用十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳对上面提取的蛋白行分离处理,转膜,抗体及靶蛋白结合。曝光及显影后采用凝胶图像分析成像系统对图片中特异条带进行分析,完成目的条带面积灰度值的分析。采用ImageJ 1.34版本行光密度分析,并对分析结果行蛋白校正,对目标蛋白的相对含量进行考察^[8]。

2.5 各组小鼠肝组织中TBA含量测定

提取100 mg小鼠肝组织,全部剪碎,置于75%乙醇溶液中,匀浆。肝匀浆液于50℃下孵育2 h后,6 000×g离心10 min,取0.05 ml上清液,备用。以胆汁酸酶循环法遵循试剂盒说明书要求测定TBA含量^[9]。

2.6 统计学方法

采用SPSS 20.0软件处理实验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用LSD检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠肝组织病理检查结果

正常对照组小鼠肝组织结构非常清晰,且肝细胞形态正常,病理分级均为“-”。芫花组小鼠肝组织部分呈羽毛状变性,肝窦扩张以及坏死;3个样本病理分级为“++”级,5个样本为“+”级。甘草组小鼠肝组织少量肝细胞呈水肿;7个样本病理分级为“+”级,1个样本为“-”级。芫花与甘草1:1组小鼠肝细胞呈弥散性水肿,表现出颗粒、气球样变,炎症细胞浸润,散在点灶状肝细胞坏死,散在肝细胞嗜酸变;肝细胞受损最严重,病理分级均为“+++”级。芫花与甘草1:3组小鼠肝细胞呈弥散性水肿,表现出气球样变,被膜下肝细胞呈现弥散性羽毛

状变性,散在肝细胞坏死,散在肝细胞嗜酸性变,炎症细胞浸润;2个样本病理分级为“+++”级,6个样本为“++”级。各组小鼠肝组织病理检查结果见图1。

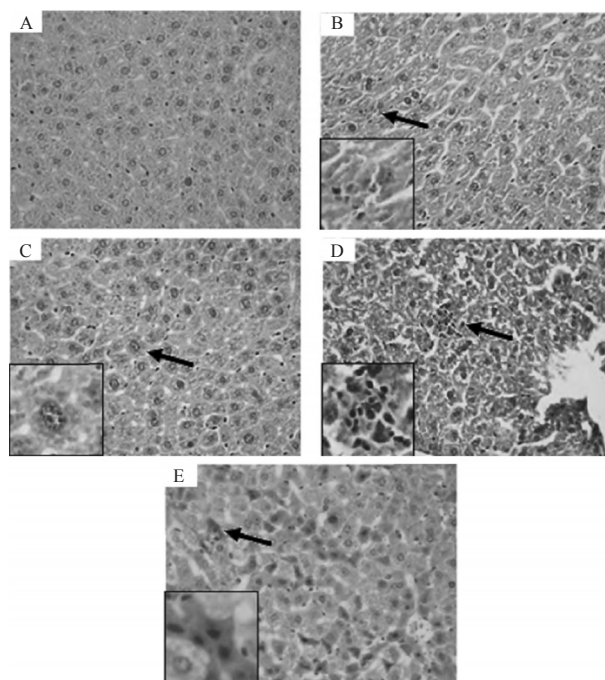


图1 各组小鼠肝组织病理检查结果

A.正常对照组;B.芫花组;C.甘草组;D.芫花与甘草1:1组;E.芫花与甘草1:3组

Fig 1 Pathological results of livers of mice in all groups

A. normal control group; B. group of *D. genkwa*; C. group of *G. uralensis*; D. group of *D. genkwa* with *G. uralensis* in the ratio of 1:1; E. group of *D. genkwa* with *G. uralensis* in the ratio of 1:3

3.2 各组小鼠肝脏转运体Ntcp蛋白表达测定结果

与正常对照组比较,芫花与甘草1:1组、芫花与甘草1:3组小鼠肝脏转运体Ntcp蛋白表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组小鼠肝脏转运体Ntcp蛋白表达测定结果见图2。

3.3 各组小鼠肝组织TBA含量测定结果

与正常对照组比较,芫花组、芫花与甘草1:1组小鼠肝组织TBA含量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠肝组织TBA含量测定结果见图3。

4 讨论

芫花又名“老鼠花”“药鱼草”“黄大戟”等,其花蕾入药,是治疗水肿、喘咳、痰饮癖积、疟母、心腹症结胀满、胁痛、食物中毒等疾病的重要药材^[10]。甘草又名“甜草”“甜根子”等,其根茎及根入药,是一种临床中非常常用的补益类中草药,具有滋阴润肺、缓急解毒、补脾益气、调和百药的功效。芫花与甘草在我国中药材使用史上发挥了非常重要的作用,但两者合用却是我国中医界公认的“十八反”配伍禁忌。金恩波等^[2]学者通过提取芫花与甘草合煎液,并对小鼠一次性ig给药,观察小鼠给药后情况,发现2 d内死亡达到半数。陈夏娟等^[11]在研究中发现,芫花与甘草配伍使用,可致大鼠肝脏等重要器官严重损伤。张颖等^[12]同样通过动物实验证实,芫花配伍甘草在病理学检查中可以观察到大鼠的肝脏组织以及血管表现出非常明显的充血现象,细胞组织浊肿变性、炎细胞浸润以及空泡样改

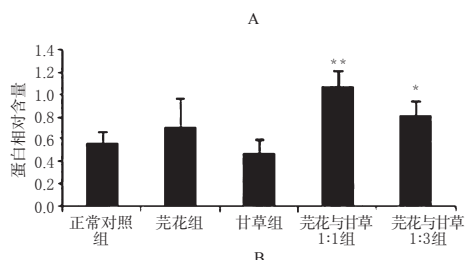
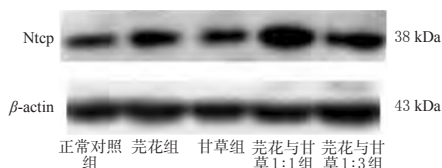


图2 各组小鼠肝脏转运体Ntcp蛋白表达测定结果

A. 电泳图; B. 柱形图

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig 2 Determination results of the expression of transporter Ntcp protein in the livers of mice in all groups

A. electrophoregram; B. histogram

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

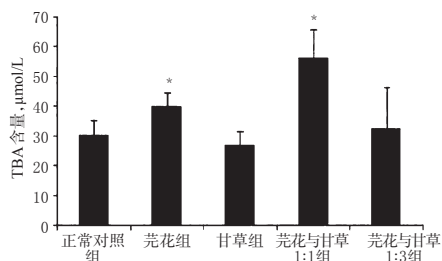


图3 各组小鼠肝组织TBA含量测定结果

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$

Fig 3 Determination results of the contents of TBA in liver tissue of mice in all groups

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$

变,得出芫花配伍甘草具有较强的毒副作用的结论。

本研究结果显示,芫花具有较为显著的诱导小鼠Ntcp表达的作用,而甘草却可对小鼠Ntcp表达进行抑制,两种中药单独使用,并不会造成肝脏损伤。而两种中药合用,无论是何种比例,都会导致小鼠肝脏受损;但相对来说,芫花与甘草(1:3)合煎液造成的肝脏损伤程度比1:1比例合煎液更小。这主要是由于甘草中的甘草次酸、甘草酸与芫花中的芫花酯乙、芫花酯甲、芫花酯己相互作用,其溶出率迅速上升。芫花酯甲是致使芫花毒性的主要成分,其水溶性较差,常用于人工流产。当芫花与甘草配伍使用,甘草中的皂苷类成分可使芫花酯甲的溶解度增加、溶出量增大,进而致使毒性增强。甘草与芫花含有一种共同的成分——黄酮类成分,尽管该类成分并不会对肝脏造成不利影响,但却可影响其他成分在机体中的分布、吸收和代谢^[13]。甘草酸作为甘草的主要成分,极易引起细胞水肿。此外,有研究者从肝药酶方面进行研究发现,甘草可使肝脏CYP₄₅₀酶含量上升,而芫花却会使CYP₄₅₀酶表达下降,两种药材形成较为显著的拮抗反应,增加肝脏负担^[14]。

Ntcp转运体主要在肝细胞膜上表达,其可转运TBA,确保肝细胞对其的吸收。TBA是胆汁中非常重要的成分,在肝脏内以有机阴离子形式存在,对肝脏有一定毒性作用^[15]。若肝细

胞中TBA大量堆积,可致肝细胞发生病理变化甚至凋亡。本研究结果显示,芫花与甘草配伍用药,Ntcp表达与TBA含量呈正相关,即Ntcp表达水平上升,TBA含量同样呈现为上升,导致肝脏受损程度增大。

综上所述,芫花与甘草合用,可致小鼠肝脏Ntcp的表达明显增强,进而致TBA大量蓄积在肝细胞内,致小鼠肝脏受损。但关于芫花、甘草合用对肝细胞Ntcp表达造成影响的具体机制,本研究尚未得出明确结论,还需进一步研究。

参考文献

- [1] 陈夏娟,徐立,余果,等.海藻、芫花反甘草的研究进展[J].中草药,2012,43(5):1 024.
- [2] 金恩波,姜名璞,黄启福,等.中药十八反的药理研究:芫花、大戟、甘遂、海藻与甘草配伍时的相互作用[J].中成药,1982,9(2):28.
- [3] 葛珍珍,张超,冯光远,等.何首乌提取物对正常与荷肝癌小鼠的急性肝毒性研究[J].中国药房,2014,25(15):1 358.
- [4] 袁杨,耿璐璐,庄贺飞,等.芫花致肝毒性部位筛选及其肝毒性部位UPLC指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2013,38(1):70.
- [5] 崔嵩生.反药甘草甘遂治疗肝硬化腹水的临床疗效观察[D].广州:广州中医药大学,2007.
- [6] 李全志,段京莉.甘草酸二铵治疗药物性肝损害的系统评价[J].中国药房,2010,21(12):1 100.
- [7] 衡晴晴,卞勇,李璘,等.海藻、大戟、甘遂和芫花分别与不同剂量的甘草配伍对小鼠肠功能的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2013,27(3):374.
- [8] Landrier JF, Eloranta JJ, Vavricka SR, et al. The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and-beta genes[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290(3):G476.
- [9] 石敏娟,王卫峰,李芳,等.“十八反”中药甘草芫花不同配伍方式的HPLC对比分析[J].中华中医药学刊,2011,29(12):2 784.
- [10] 丁爱华,华永庆,段金殿,等.甘草与大戟、甘遂、芫花的反药组合对大鼠离体回肠运动的影响[J].南京中医药大学学报,2012,28(4):345.
- [11] 陈夏娟,余果,宋宏绣,等.基于析因设计评价芫花-甘草反药组合对小鼠自发活动的影响[J].南京中医药大学学报,2012,28(3):249.
- [12] 张颖,高建联,苗明三.中药“十八反”现代研究及分析[J].中医研究,2010,23(2):11.
- [13] 陈艳琰,钱大玮,尚尔鑫,等.基于化学成分相互作用探讨芫花与甘草配伍禁忌的机制[J].药学报,2012,47(8):1 043.
- [14] Wei Y, Zhao L. Passive lung-targeted drug delivery systems via intravenous administration[J]. Pharm Dev Technol, 2013(10):1.
- [15] 陈艳琰.基于“十八反”的中药配伍禁忌理论基础研究:芫花-甘草配伍毒效表征与物质基础研究[D].南京:南京中医药大学,2014.

(收稿日期:2015-01-30 修回日期:2015-03-15)

(编辑:张 静)