

· 基础研究 ·

三种何首乌单体成分对大鼠肝损伤作用的研究[△]颜玉静^{1,2a}, 文海若^{2a}, 淡墨², 吕建军², 王超², 苗玉发², 黄芝瑛^{1*}, 汪祺^{3*}

1. 中山大学 药学院, 广东 广州 510006;

2. 中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心/药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176;

3. 中国食品药品检定研究院 中药民族药检定所, 北京 100050

[摘要] 目的: 探究三种何首乌单体对SD大鼠潜在肝脏毒性。方法: 雄性SD大鼠随机分为对照组(0.5%羧甲基纤维素钠)及大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 28、280、1120 mg·kg⁻¹剂量组, 单蒽酮 6.5、65、650 mg·kg⁻¹剂量组, 大黄素甲醚 6.5、65、650 mg·kg⁻¹剂量组, 连续14 d经口灌胃给药, 观察动物临床症状, 分析体质量、肝脏质量、血清生化指标及病理学指标变化, 并检测IL-6、IL-10、TNF- α 和IFN- γ 的表达水平。结果: 连续14 d给予SD大鼠3种何首乌单体对动物无明显整体毒性和肝脏毒性作用, 但与对照组相比, 三种单体给药组IL-10水平均降低($P < 0.05$), 大黄素甲醚给药组IL-6和TNF- α 水平升高($P < 0.05$), 单蒽酮给药组IFN- γ 水平降低($P < 0.05$)。结论: 本研究可见大黄素甲醚存在潜在肝损伤作用。

[关键词] 何首乌; 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 单蒽酮; 大黄素甲醚; 肝损伤; SD大鼠; IL-6; IL-10; TNF- α ; IFN- γ

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)08-1054-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190115003

Effects of Three *Polygonum multiflorum* Monomers on Liver Injury in RatsYAN Yu-jing^{1,2a}, WEN Hai-ruo^{2a}, DAN Mo², LYU Jian-jun², WANG Chao², MIAO Yu-fa²,
HUANG Zhi-ying^{1*}, WANG Qi^{3*}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of
Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China;3. Institute for Control of Chinese Traditional Medicine and Ethnic Medicine, National Institutes for
Food and Drug Control, Beijing 100050, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the potential hepatotoxicity effects of three *Polygonum multiflorum* monomers in SD rats. **Methods:** Male SD rats were randomly divided into control (0.5% sodium carboxymethyl cellulose), 28, 280, 1120 mg·kg⁻¹ of emodin-8-*O*- β -D-glucoside groups, 6.5, 65, 650 mg·kg⁻¹ of anthrone groups and 6.5, 65, 650 mg·kg⁻¹ of physcion groups, and administrated through oral gavage for consecutive 14 days. Clinical symptoms, body weight, liver weight, serum biochemical examinations data and histopathological examination results were analyzed, and the levels of IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ were detected. **Results:** No definite overall toxicity associated with three monomers was observed in SD rats repeated dosed for consecutively 14 days. However, compared with the control group, the levels of IL-10 were elevated in three medicated groups ($P < 0.05$), the levels of IL-6 and IFN- γ were elevated in physcion groups ($P < 0.05$) and the levels of IFN- γ were decreased in anthrone groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** This study demonstrated the potential liver injury caused by physcion.

[Keywords] *Polygonum multiflorum*; emodin-8-*O*- β -D-glucoside; anthrone; physcion; liver injury; SD rat; IL-6; IL-10; TNF- α ; IFN- γ

[△] [基金项目] 国家自然科学基金(81503347); 国家十三五“重大新药创制”专项(2018ZX09201017)

* [通信作者] 黄芝瑛, 教授, 研究方向: 药物安全性评价; Tel: (020)39943025, E-mail: hzhiying@mail.sysu.edu.cn
汪祺, 副研究员, 研究方向: 药理毒理; Tel: (010)67395282, E-mail: sansan8251@sina.com

^a共同第一作者

蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的药理学作用广泛,包括抗肿瘤、抗菌抗炎、抗氧化、保护神经、延缓动脉粥样硬化等^[1-2]。然而近年来,国内外关于何首乌及其制剂的临床不良反应,尤其是肝损伤的报道逐渐增多^[3-4]。临床数据提示,何首乌可导致肝细胞损伤型、胆汁淤积型及混合型的肝损伤,常见临床症状为胆汁淤积、黄疸、肝区疼痛、肝脾肿大等^[5]。目前何首乌中导致肝损伤的具体成分及其机制仍不明确。有研究提示其致肝损伤的机制可能与抑制胆红素代谢过程中的 UDP-葡萄糖醛酸转移酶 1A1 (UGT1A1 酶) 有关,如汪祺等^[6-7]发现大黄素型蒽醌类成分、二蒽酮及蒽酮糖苷类成分可选择性抑制 UGT1A1 酶的活性,使胆红素代谢出现障碍,在肝细胞和血液内蓄积,引发毒性。另有研究提示^[8],何首乌中的鞣质与二苯乙烯苷类成分混合后可对肝实质细胞造成不可逆的损伤。因此,有必要开展体内研究,对何首乌单体成分的肝损伤作用及可能机制进行进一步的探究。

蒽醌类和蒽酮类是何首乌中的主要单体成分。蒽醌类成分包括大黄素、大黄酸、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚等^[9]。目前有关大黄素和大黄酸的致肝毒性作用研究较为充分^[10],针对大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷及大黄素甲醚的肝毒性研究,尤其是体内研究则较少。此外,二蒽酮类化合物大黄素型单蒽酮在新鲜何首乌中含量较高,也有文献报道其在体外的致肝毒性作用^[7]。本研究拟连续 14 d 经口灌胃给予 SD 大鼠大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚和单蒽酮,观察动物临床症状,分析体质量、肝脏质量、细胞因子水平、血清生化指标及病理学指标,探究 3 种单体成分体内的肝毒性作用及可能的机制,为研究何首乌致肝毒性提供体内数据支持。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只(给药时约 6 周龄,体质量约 200 g),购买自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0006^[11]。大鼠在屏障系统内 PC 聚碳酸酯鼠盒饲养,饲养环境保持温度 20~26℃,湿度 40%~70%,提供钴 60 放射灭菌鼠全价颗粒饲料,自由摄取。

1.2 仪器与试剂

H500FR 台式高速冷冻离心机(日本 Kokusan 公

司);7180 型全自动生化分析仪(日本日立公司);PB203-N 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);显微镜(日本 Olympus 公司);樱花 TEC5EMJ-2 型自动包埋机和 DRS-2000 自动染色机及封片机(日本 Sakura 公司);MERCK LIMITED Luminex 200(德国 Merck Millipore 公司)。

大黄素甲醚(中国食品药品检定研究院,批号:110758-201616,纯度:99.0%);大黄素-8-*O*-葡萄糖苷(源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98.0\%$);大黄素型单蒽酮(中国医学科学院药物研究所杨建波博士赠送,纯度 $\geq 95\%$);羧甲基纤维素钠(美国 Sigma Aldrich 公司);Milliplex Map Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Kit(德国 Merck Millipore 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药方式

动物在给药前检疫适应 6 d。检疫期第 6 天按体质量随机分组法分为 10 组,每组 5 只动物。分组时动物体质量约 200 g,个体体质量差异小于平均体质量的 $\pm 20\%$ 。给药方式为经口灌胃,连续给药 14 d,给药剂量为 15 mL $\cdot$ kg⁻¹。

2.2 给药剂量

何首乌的临床每日最大用量约为每人 100 g 生药,按体质量 60 kg 计算,即 1.7 g $\cdot$ kg⁻¹。其中大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷在生药中含量以 2.63 mg $\cdot$ g⁻¹计,为 4.5 mg $\cdot$ kg⁻¹;单蒽酮和大黄素甲醚在生药中含量以 0.62 mg $\cdot$ g⁻¹计,为 1.05 mg $\cdot$ kg⁻¹。根据大鼠与人体表面积系数(6.17)折算,大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷相当于 28 mg $\cdot$ kg⁻¹,以该剂量为最低剂量,分别设置 28、280、1120 mg $\cdot$ kg⁻¹剂量组,约为人最大拟用剂量的 1 倍、10 倍和 40 倍;单蒽酮和大黄素甲醚相当于 6.5 mg $\cdot$ kg⁻¹,以该剂量为最低剂量,分别设置 6.5、65、650 mg $\cdot$ kg⁻¹剂量组,约为人最大拟用剂量的 1 倍、10 倍和 100 倍^[11]。

2.3 检测指标

研究期间每天观察动物临床症状。给药第 1、4、8、11 天及第 15 天解剖日麻醉前各测定 1 次动物体质量。动物经异氟烷麻醉后经眼眶后静脉丛采血。剖检前一天动物禁食过夜,第 15 天麻醉动物后采集腹腔后大静脉血。给药第 2、4、8、11 天和第 15 天采血用于进行血清生化检测,采血量约 1 mL/只。

血液样本在室温放置1~2 h后,以4℃ 3500 r·min⁻¹离心15 min,吸取血清,使用Hitachi 7180型全自动生化仪测定以下血清生化指标:天门冬氨酸氨基转换酶(AST)、丙氨酸氨基转换酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸磷酸激酶(CK)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)。给药第2、第8天和第15天采血用于细胞因子测定,采血量约1 mL/只。血液样本在室温放置1~2 h后,以4℃ 3500 r·min⁻¹离心15 min,取上清液,使用Luminex 200测定以下细胞因子水平:白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、干扰素-γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)。

给药结束后所有动物以CO₂吸入法麻醉,腹腔后大静脉取血完毕后,完全放血处死解剖,记录大体病理学发现。将动物肝脏分离后称质量,并使用10%甲醛固定。固定后的组织经修块取材后逐级75%乙醇脱水,再经石蜡包埋,采用滑动切片切片机切片(厚约3 μm)。切片经苏木精-伊红(HE)染色后,在光镜下进行组织病理学检查^[11]。

2.4 统计学方法

体质量、绝对脏器质量、相对脏器质量、细胞因子含量等数据用($\bar{x} \pm s$)表示。动物数表示为 n 。剔除大于($\bar{x} + 2.5s$)及小于($\bar{x} - 2.5s$)的数据后,采用单因素方差分析对组间数据进行检验, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。临床症状观察及大体病理学、组织病理学检查结果直接列出,不进行统计分析。数据图与统计结果经GraphPad Prism 7软件处理生成^[11]。

3 结果

3.1 整体毒性

实验期间,各组动物临床症状未见与给予3种单体相关的明显异常改变。此外,与对照组相比,大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、单蒽酮、大黄素甲醚各剂量组动物在不同时期的平均体质量(见图1)及肝脏质量(见表1)差异不具有统计学意义($P > 0.05$),提示按照当前的给药方式和给药剂量,3种单体均不会对动物整体产生严重的毒性作用。

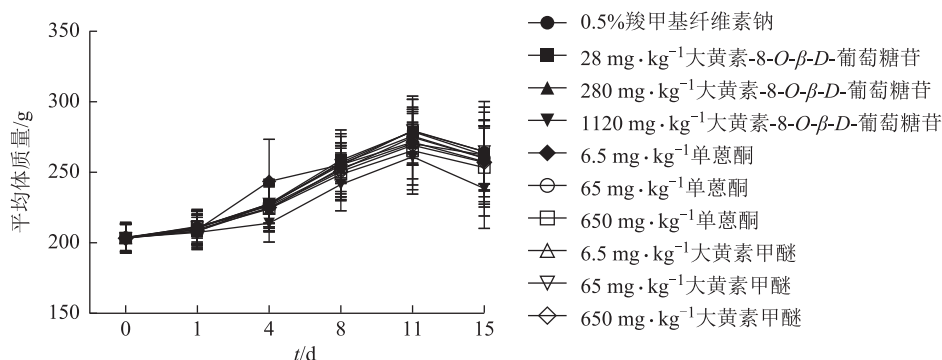


图1 受试物对SD大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

表1 连续给予受试物后SD大鼠肝脏平均绝对质量及相对系数($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

给予物质	给药剂量/mg·kg ⁻¹	体质量/kg	脑质量/g	肝脏质量/g	脏器质量比/g·kg ⁻¹	脏脑质量比/g·g ⁻¹
0.5%羧甲基纤维素钠		264.7 ± 27.9	1.893 ± 0.126	11.824 ± 1.694	0.045 ± 0.002	6.240 ± 0.682
大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	28.0	262.3 ± 20.6	1.941 ± 0.075	12.332 ± 2.025	0.047 ± 0.005	6.336 ± 0.846
	280.0	250.8 ± 26.1	1.901 ± 0.093	12.454 ± 1.775	0.050 ± 0.003	6.561 ± 0.971
	1120.0	238.5 ± 28.2	1.907 ± 0.072	11.642 ± 1.678	0.049 ± 0.005	6.087 ± 0.674
单蒽酮	6.5	257.6 ± 38.6	1.958 ± 0.135	12.068 ± 2.599	0.047 ± 0.003	6.123 ± 0.962
	65.0	260.0 ± 27.3	1.920 ± 0.073	11.616 ± 3.653	0.044 ± 0.011	6.045 ± 1.864
	650.0	253.4 ± 28.0	1.916 ± 0.161	12.245 ± 1.391	0.048 ± 0.003	6.432 ± 0.945
大黄素甲醚	6.5	260.3 ± 22.7	1.977 ± 0.144	11.796 ± 1.926	0.045 ± 0.005	5.951 ± 0.779
	65.0	264.8 ± 35.5	1.955 ± 0.122	12.504 ± 3.090	0.047 ± 0.005	6.341 ± 1.157
	650.0	257.1 ± 29.7	1.983 ± 0.083	13.096 ± 1.690	0.051 ± 0.007	6.595 ± 0.726

3.2 血清生化检测

实验期间分别在给药第2、4、8、11天和第15天采外周血5次,以动态监测受试物对动物与肝脏功能相关的血清生化指标的改变,详见表2~6。大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和单蒽酮各剂量组的血清生化指标数值在各时间点与对照组相比均未见统计学

差异($P > 0.05$),提示在当前给药方式和给药剂量下,大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和单蒽酮未产生明显的肝损伤作用。给药后第4天,大黄素甲醚65 mg·kg⁻¹剂量组动物TBIL的平均值与对照组相比,出现了统计学意义上的升高($P < 0.05$),提示给予大黄素甲醚可一定程度诱导TBIL升高。

表2 给予受试物后第2天SD大鼠与肝脏功能有关的血清生化指标数值($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

给予物质	给药剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	CK/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	TBIL/ μ mol·L ⁻¹
0.5%羧甲基纤维素钠		56 ± 14	155 ± 30	336 ± 59	1212 ± 541	1428 ± 548	1.04 ± 0.14
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	28.0	51 ± 9	145 ± 33	315 ± 52	948 ± 398	1152 ± 347	1.03 ± 0.13
	280.0	52 ± 6	134 ± 19	326 ± 65	797 ± 290	1084 ± 307	1.03 ± 0.26
	1 120.0	51 ± 6	126 ± 42	324 ± 90	744 ± 442	1011 ± 591	0.84 ± 0.29
单蒽酮	6.5	53 ± 7	129 ± 14	384 ± 100	678 ± 161	927 ± 166	0.52 ± 0.10
	65.0	52 ± 6	113 ± 12	383 ± 92	451 ± 96 **	665 ± 182 *	0.96 ± 0.25
	650.0	52 ± 5	114 ± 20	312 ± 35	575 ± 357 *	590 ± 329 *	0.86 ± 0.23
大黄素甲醚	6.5	49 ± 2	128 ± 32	369 ± 61	680 ± 403	887 ± 634	0.96 ± 0.23
	65.0	45 ± 6	103 ± 6 *	316 ± 50	466 ± 125 *	631 ± 209 *	0.72 ± 0.44
	650.0	49 ± 11	111 ± 37 *	342 ± 75	460 ± 332 **	546 ± 238 **	1.03 ± 0.40

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;下同。

表3 给予受试物后第4天SD大鼠与肝脏功能有关的血清生化指标数值($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

给予物质	给药剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	CK/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	TBIL/ μ mol·L ⁻¹
0.5%羧甲基纤维素钠		55 ± 10	144 ± 24	307 ± 59	1095 ± 615	1420 ± 328	0.63 ± 0.15
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	28.0	49 ± 7	151 ± 39	278 ± 50	1081 ± 451	1440 ± 521	0.79 ± 0.15
	280	53 ± 6	147 ± 19	274 ± 49	914 ± 383	1207 ± 242	0.74 ± 0.33
	1 120.0	53 ± 10	115 ± 28	271 ± 79	676 ± 381	921 ± 474	0.73 ± 0.32
单蒽酮	6.5	48 ± 4	132 ± 30	334 ± 67	836 ± 360	1304 ± 301	0.72 ± 0.23
	65.0	48 ± 5	135 ± 11	314 ± 64	1042 ± 188	1214 ± 254	0.79 ± 0.37
	650.0	52 ± 4	135 ± 22	267 ± 34	1270 ± 317	1026 ± 413	0.87 ± 0.37
大黄素甲醚	6.5	47 ± 9	147 ± 40	306 ± 74	1247 ± 570	1224 ± 522	0.97 ± 0.16
	65.0	47 ± 5	109 ± 27	284 ± 53	708 ± 426	828 ± 325	1.22 ± 0.14 *
	650.0	48 ± 11	122 ± 27	283 ± 60	759 ± 361	1055 ± 493	1.07 ± 0.31

表4 给予受试物后第8天SD大鼠与肝脏功能有关的血清生化指标数值($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

给予物质	给药剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	CK/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	TBIL/ μ mol·L ⁻¹
0.5%羧甲基纤维素钠		56 ± 16	135 ± 9	339 ± 47	895 ± 209	1317 ± 296	0.97 ± 0.19
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	28.0	53 ± 6	146 ± 31	300 ± 59	1060 ± 629	1353 ± 406	0.95 ± 0.39
	280.0	51 ± 3	121 ± 14	284 ± 71	670 ± 225	1005 ± 270	0.85 ± 0.33
	1 120.0	53 ± 6	122 ± 18	309 ± 97	669 ± 265	952 ± 346	0.94 ± 0.31
单蒽酮	6.5	54 ± 4	148 ± 27	368 ± 84	853 ± 175	1241 ± 346	0.76 ± 0.26
	65.0	54 ± 5	154 ± 22	330 ± 56	982 ± 463	1295 ± 534	0.85 ± 0.38
	650.0	58 ± 9	139 ± 44	278 ± 22	908 ± 573	1077 ± 776	1.13 ± 0.11
大黄素甲醚	6.5	50 ± 8	149 ± 30	341 ± 99	852 ± 275	1456 ± 444	0.97 ± 0.30
	65.0	51 ± 7	155 ± 29	328 ± 39	1437 ± 1034 *	1482 ± 390	1.03 ± 0.09
	650.0	51 ± 8	131 ± 15	329 ± 88	800 ± 82	1123 ± 186	1.27 ± 0.31

表5 给予受试物后第11天SD大鼠与肝功能有关的血清生化指标数值($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

给予物质	给药剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	ALP/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	CK/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	TBIL/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
0.5%羧甲基纤维素钠		56 ± 14	128 ± 22	326 ± 72	753 ± 263	1301 ± 363	1.00 ± 0.29
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	28.0	56 ± 10	147 ± 31	321 ± 80	865 ± 292	1386 ± 315	0.97 ± 0.14
	280.0	53 ± 6	124 ± 19	278 ± 74	743 ± 321	1041 ± 354	1.05 ± 0.22
	1 120.0	56 ± 7	108 ± 12	310 ± 97	433 ± 132	701 ± 194	1.22 ± 0.21
单蒽酮	6.5	58 ± 6	149 ± 25	369 ± 31	845 ± 94	1137 ± 395	0.79 ± 0.30
	65.0	55 ± 7	129 ± 18	337 ± 44	785 ± 317	1085 ± 354	0.79 ± 0.29
	650.0	60 ± 6	124 ± 26	291 ± 48	554 ± 230	1170 ± 401	0.63 ± 0.26
大黄素甲醚	6.5	50 ± 6	143 ± 26	339 ± 94	1027 ± 488	1392 ± 399	0.90 ± 0.11
	65.0	56 ± 4	158 ± 37	362 ± 43	1704 ± 787 *	1263 ± 404	0.87 ± 0.24
	650.0	56 ± 10	141 ± 28	338 ± 79	822 ± 220	1362 ± 341	1.01 ± 0.56

表6 给予受试物后第15天SD大鼠与肝功能有关的血清生化指标数值($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

给予物质	给药剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	ALP/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	CK/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	TBIL/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
0.5%羧甲基纤维素钠		41 ± 6	154 ± 34	193 ± 56	985 ± 314	1393 ± 499	1.47 ± 0.18
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	28.0	40 ± 8	135 ± 30	158 ± 41	667 ± 200	897 ± 250	1.29 ± 0.13
	280.0	33 ± 7	136 ± 27	143 ± 23	701 ± 301	1148 ± 702	1.27 ± 0.07
	1 120.0	45 ± 9	165 ± 26	143 ± 55	923 ± 262	1470 ± 176	1.39 ± 0.19
单蒽酮	6.5	43 ± 7	170 ± 38	164 ± 23	820 ± 67	1458 ± 139	1.27 ± 0.15
	65.0	42 ± 9	165 ± 42	165 ± 28	735 ± 198	1086 ± 279	1.37 ± 0.46
	650.0	39 ± 6	149 ± 31	126 ± 24	662 ± 219	1167 ± 298	1.18 ± 0.25
大黄素甲醚	6.5	34 ± 4	156 ± 25	162 ± 42	704 ± 195	1314 ± 390	1.42 ± 0.26
	65.0	33 ± 4	144 ± 17	163 ± 17	643 ± 215	1076 ± 292	1.16 ± 0.17
	650.0	40 ± 7	134 ± 19	160 ± 23	657 ± 121	1054 ± 189	1.36 ± 0.43

3.3 组织病理学检查

肝脏组织病理学观察结果详见表7。动物肝脏镜检大黄素甲醚650 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组中1/5可见中度肝细胞变性坏死,其他组织病理学改变包括汇管区炎细胞浸润(见图2),但均缺乏剂量效应关系,考虑与药物作用无关。

表7 肝脏组织病理学检查结果

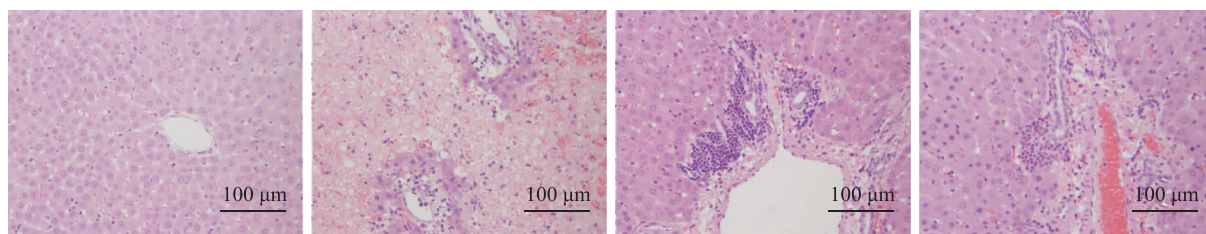
给予物质	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	汇管区炎细胞浸润(极轻度)所见病变动物数	肝细胞变性坏死(重度)所见病变动物数
0.5%羧甲基纤维素钠		0/5	0/5
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	28.0	1/5	0/5
	280.0	2/5	0/5
	1 120.0	0/5	0/5
单蒽酮	6.5	2/5	0/5
	65.0	1/5	0/5
	650.0	2/5	0/5
大黄素甲醚	6.5	2/5	0/5
	65.0	1/5	0/5
	650.0	1/5	1/5

3.4 细胞因子水平

细胞因子是由免疫细胞和某些非免疫细胞产生的多功能肽,具有调节血管生成、细胞生长及修复损伤细胞、组织等多种功能,主要包括:白细胞介

素、干扰素、肿瘤坏死家族、趋化因子、生长因子等。IL-6是促炎介质,可刺激肝内炎症反应^[12]; IL-10是抗炎性细胞因子,可抑制肝内炎症介质的合成和表达,减轻肝细胞损伤和炎症反应^[13]; TNF- α 是前炎症细胞因子,可诱导肝细胞大量表达细胞间黏附分子-1,使其易受细胞毒性T细胞的攻击而大量坏死^[14]; IFN- γ 是炎性细胞因子,可引起肝细胞的细胞周期阻滞和细胞凋亡^[15]。4种细胞因子均在肝脏疾病的发生发展过程中发挥着重要作用。

实验期间分别在给药第2、8天和第15天采血3次动态监测受试物对细胞因子水平的影响,详见表8~10。给药后第2天,与同时期对照组平均数值比较,大黄素甲醚6.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组动物IL-6和TNF- α 的水平出现统计学意义上的显著升高($P < 0.05$);给药后第8天,大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷28、280、1120 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及单蒽酮650 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组动物IL-10的水平降低($P < 0.05$),大黄素甲醚650 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组动物TNF- α 水平升高($P < 0.05$);给药后第15天,单蒽酮65、650 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和大黄素甲醚6.5、65、650 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组动物IL-10水平降低($P < 0.05$),单蒽酮650 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组动物IFN- γ 的水平也显著下降($P < 0.05$)。



A. 0.5%羧甲基纤维素钠 B. 650 mg·kg⁻¹大黄素甲醚中度肝细胞变性坏死 C. 6.5 mg·kg⁻¹单蒎酮汇管区炎细胞浸润 D. 280 mg·kg⁻¹大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷汇管区炎细胞浸润

图2 各组大鼠肝脏镜检结果(HE, ×200)

表8 给予受试物后第2天SD大鼠体内细胞因子平均含量($\bar{x} \pm s$, $n=3 \sim 4$)

给予物质	给药剂量/mg·kg ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹	IL-10/pg·mL ⁻¹	IFN-γ/pg·mL ⁻¹	TNF-α/pg·mL ⁻¹
0.5%羧甲基纤维素钠		5.85 ± 8.28	47.61 ± 37.82	1.08 ± 1.25	4.48 ± 3.32
大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	28.0	6.26 ± 7.98	23.30 ± 15.43	1.30 ± 2.07	2.78 ± 1.05
	280.0	1.87 ± 0.81	30.30 ± 27.33	0.01 ± 0.01	4.01 ± 2.55
	1 120.0	9.66 ± 5.71	36.22 ± 16.83	0.09 ± 0.07	5.09 ± 4.61
单蒎酮	6.5	1.46 ± 0.94	31.76 ± 16.41	0.08 ± 0.16	2.08 ± 0.45
	65.0	3.00 ± 2.65	41.81 ± 28.45	0.01 ± 0.01	3.78 ± 2.95
	650.0	1.73 ± 0.94	27.21 ± 20.27	0.00 ± 0.00	4.86 ± 3.50
大黄素甲醚	6.5	17.65 ± 10.76 *	63.19 ± 13.56	0.11 ± 0.18	23.77 ± 1.35 *
	65.0	2.27 ± 0.00	29.26 ± 30.31	0.09 ± 0.03	3.97 ± 3.60
	650.0	3.24 ± 3.19	24.21 ± 15.50	0.11 ± 0.01	4.17 ± 1.63

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; 下同。

表9 给予受试物后第8天SD大鼠体内细胞因子平均含量($\bar{x} \pm s$, $n=3 \sim 4$)

给予物质	给药剂量/mg·kg ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹	IL-10/pg·mL ⁻¹	IFN-γ/pg·mL ⁻¹	TNF-α/pg·mL ⁻¹
0.5%羧甲基纤维素钠		17.94 ± 16.43	95.15 ± 44.06	266.77 ± 180.19	4.92 ± 2.60
大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	28.0	10.12 ± 10.13	3.43 ± 1.96 *	302.42 ± 82.50	2.47 ± 0.76
	280.0	5.95 ± 5.62 *	8.58 ± 3.42 *	264.27 ± 95.02	3.76 ± 2.39
	1 120.0	16.04 ± 18.08	8.19 ± 2.35 *	247.14 ± 152.44	2.98 ± 1.22
单蒎酮	6.5	6.43 ± 2.51 *	57.80 ± 9.60	325.41 ± 13.31	2.60 ± 1.72
	65.0	22.55 ± 30.82	53.74 ± 10.03	286.84 ± 77.28	7.46 ± 5.13
	650.0	24.15 ± 19.80	18.01 ± 12.61 *	307.60 ± 76.18	4.44 ± 3.31
大黄素甲醚	6.5	28.17 ± 16.75	65.34 ± 48.78	391.04 ± 63.00	5.68 ± 1.50
	65.0	18.02 ± 8.57	80.50 ± 23.47	273.10 ± 70.94	4.55 ± 2.14
	650.0	31.30 ± 18.50	120.23 ± 11.82	231.67 ± 48.16	12.52 ± 3.64 *

表10 给予受试物后第15天SD大鼠体内细胞因子平均含量($\bar{x} \pm s$, $n=3 \sim 4$)

给予物质	给药剂量/mg·kg ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹	IL-10/pg·mL ⁻¹	IFN-γ/pg·mL ⁻¹	TNF-α/pg·mL ⁻¹
0.5%羧甲基纤维素钠		21.46 ± 6.25	81.46 ± 36.47	745.79 ± 116.70	4.75 ± 1.77
大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	28.0	10.97 ± 3.79	9.31 ± 6.32 *	784.37 ± 250.16	3.09 ± 0.84
	280.0	9.87 ± 3.79 *	50.59 ± 12.76	953.71 ± 322.73	4.72 ± 2.02
	1 120.0	17.86 ± 6.25	33.82 ± 31.71	640.42 ± 182.98	5.38 ± 2.44
单蒎酮	6.5	12.72 ± 9.28	36.92 ± 44.48	686.31 ± 435.17	3.39 ± 1.30
	65.0	11.14 ± 6.23	14.34 ± 10.84 *	404.93 ± 274.78	4.07 ± 1.79
	650.0	8.37 ± 4.31 *	5.19 ± 0.83 *	261.28 ± 173.94 *	6.70 ± 5.66
大黄素甲醚	6.5	16.03 ± 6.28	7.27 ± 5.03 *	651.76 ± 210.32	6.83 ± 3.18
	65.0	10.97 ± 3.79	6.19 ± 5.96 *	314.33 ± 248.30	7.33 ± 3.37
	650.0	23.00 ± 14.18	7.05 ± 5.56 *	391.79 ± 239.48	6.69 ± 2.88

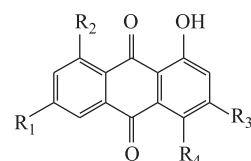
4 讨论

本研究连续 14 d 经口灌胃给予 SD 大鼠 28、280、1120 mg·kg⁻¹ 的大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷, 6.5、65、650 mg·kg⁻¹ 的单蒽酮和大黄素甲醚, 未见异常临床症状及动物体质量和肝脏质量的明显变化, 提示当前给药剂量下 3 种何首乌中重要单体成分对大鼠无明显整体毒性作用。但血清生化指标检测结果提示大黄素甲醚可一定程度诱导 TBIL 升高, 大黄素甲醚 650 mg·kg⁻¹ 剂量组动物肝脏镜检可见中度肝细胞变性坏死, 提示大黄素甲醚可能具有一定的肝毒性作用。

此外, 实验期间各给药组细胞因子水平的变化也可见一些趋势。SD 大鼠连续 14 天给予 3 种单体后, 抗炎性细胞因子 IL-10 水平均有所降低。给药后第 2 天, 大黄素甲醚 6.5 mg·kg⁻¹ 剂量组动物 IL-6 和 TNF- α 水平即显著升高。给药后第 8 天, 大黄素甲醚 650 mg·kg⁻¹ 剂量组动物 TNF- α 水平升高。TNF- α 是与肝脏损伤密切相关的炎症因子, 其水平升高提示肝损伤的发生。IL-6 是促炎介质, 可刺激肝内炎症反应。另外, 杨博^[16]用胆总管结扎术模拟胆汁淤积性肝硬化, 用实时定量聚合酶链反应和蛋白印迹检测的方法检测出 IL-6 在该疾病模型中的表达量明显上升, 提示 IL-6 的升高与胆汁淤积有关。王涛等^[17]研究发现, 何首乌在体内能够影响胆汁代谢转运, 并引起肝损伤。本研究的结果则进一步提示, 大黄素甲醚可能具有一定的肝毒性作用。给药后第 15 天, 单蒽酮 650 mg·kg⁻¹ 剂量组动物 IFN- γ 的水平显著下降。IFN- γ 可以通过对 G1 期的阻滞来抑制细胞周期进程, 从而抑制肝细胞的增殖, 也可以通过激活肝细胞中的信号传导及转录激活因子 1 通路^[18]或增加细胞活性氧的产生和内质网应激^[19]来诱导肝细胞凋亡。此外, IFN- γ 可以抑制血管内皮生长因子及成纤维细胞生长因子的基因转录, 从而抑制血管形成^[20]。基质金属蛋白酶是一类水解酶, 可降解细胞外基质, 破坏阻止肿瘤细胞侵袭的组织学屏障, 促进肿瘤血管生长。IFN- γ 可以抑制该类酶的表达, 从而抑制肿瘤血管的形成^[21]。单蒽酮引起的 IFN- γ 水平下降, 可能导致肝细胞过度增殖, 刺激肿瘤血管的生成, 在病理上有发展为肝癌的可能^[22]。

本研究发现何首乌重要单体成分大黄素甲醚具有潜在肝损伤作用, 结论与本课题组前期的体外研究^[23-24]相符, 其作用机制可能与抑制胆红素代谢酶

的活性相关。大黄素甲醚和大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷均为蒽醌类化合物, 与大黄素、大黄酸含有相同的蒽醌母核结构^[9](见图 3)。目前已有较为充分的研究证实了大黄素和大黄酸的致肝毒性作用^[10], 本研究进一步发现大黄素甲醚具有肝毒性作用, 提示具有大黄素型蒽醌母核结构的单体成分具有潜在的肝毒性风险。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
大黄素	CH ₃	OH	OH	H
大黄酸	COOH	OH	H	H
大黄素甲醚	CH ₃	OH	OCH ₃	H
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	OH	Glu	CH ₃	H

图 3 蒽醌类成分结构图

本研究的给药周期较短, 受试物造成的肝损伤作用并不明显。今后将开展更长给药周期(如 28 d 连续给药)的研究, 并增加每组动物数, 以明确其肝损伤作用特点。同时也可以使用代谢组学的方法, 分析 3 种单体干预后的血浆、尿液等生物样本, 从分子水平探讨其致肝损伤的作用机制, 为临床上何首乌的增效减毒提供依据^[25]。除传统的血清生化指标检测外, 本研究亦分析细胞因子水平来评价受试物的肝损伤作用。给药后第 2 天, 大黄素甲醚给药组动物 IL-6 和 TNF- α 水平即升高, 而血清生化检测结果却未见肝损伤的发生。大黄素甲醚中、高剂量组 AST、CK 和 LDH 水平降低, 单蒽酮中、高剂量组 CK 和 LDH 水平降低, 结果具有统计学意义, 但不具有临床意义, 考虑是由于动物个体差异引起的。可见与血清生化指标检测相比, 细胞因子水平检测可能更为灵敏, 可以及早预测药物的肝毒性作用。

参考文献

- [1] 李洪兵. 何首乌的现代药理学研究综述[J]. 云南中医中药杂志, 2012, 33(6): 72-76.
- [2] LIN L, NI B, LIN H, et al. Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of Polygonum multiflorum Thunb.: A review[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 159(1): 158-183.
- [3] SUN X H, SUN Y W, LI H, et al. Influence of main compo-

- nent of Heshouwu such as emodin, rhein and toluylene glycoside on hepatic cells and hepatoma carcinoma cells [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2010, 19 (11): 1315-1321.
- [4] WEI P F, WU Y Y, JIAO C L. Effect of Polygonum multiflorum Thunb and chrysophanol on hepatocyte apoptosis in mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2010, 16 (14): 172-175.
- [5] 常越, 刘沁雨, 吕成娇, 等. 39例何首乌致急性药物性肝损伤的临床特点 [J]. 肝脏, 2018, 23 (8): 670-672.
- [6] 汪祺, 戴忠, 王亚丹, 等. 何首乌8种成分在大鼠肝微粒体体系中的肝毒性研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53 (8): 589-593.
- [7] 汪祺, 戴忠, 张玉杰, 等. 何首乌中二萜酮类成分肝毒性研究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (2): 268-274.
- [8] 胡锡琴, 李敏, 杨红莲. 何首乌中鞣质与二苯乙烯苷不同对比对大鼠肝功能指标的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2011, 45 (4): 56-59.
- [9] 王文静, 薛咏梅, 赵荣华, 等. 何首乌的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 云南中医学院学报, 2007, 30 (3): 60.
- [10] 全云云, 刘美辰, 周忆梦, 等. 何首乌肝毒性物质基础研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45 (9): 2007-2012.
- [11] 任璐, 文海若, 吕建军, 等. SD大鼠重复给予大黄素甲醚肝毒性与遗传毒性研究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (10): 1719-1726.
- [12] SORESI M, GIANNITRAPANI L, D'ANTONA F, et al. Interleukin-6 and its soluble receptor in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12 (16): 2563-2568.
- [13] SABAT R. Biology of interleukin-10 [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2010, 21: 331-344.
- [14] CAVAILLON J M, ADIB-CONQUY M. Monocytes/macrophages and sepsis [J]. Crit Care Med, 2005, 33 (12): S506-S509.
- [15] 李晓婷, 宋佰芬, 王歆桐, 等. 干扰素 γ 调节肝细胞周期及细胞凋亡的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 523 (7): 67-69.
- [16] 杨博. TNF- α 、TGF- β 1、IL-6在胆汁淤积性肝硬化中对肝脏干细胞分化影响的研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
- [17] 王涛, 王佳颖, 江振洲, 等. 何首乌水提取物大鼠连续灌胃给药28d肝毒性研究-胆汁淤积相关性分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (10): 1445-1450.
- [18] THOMSEN M K, BAKIRI L, HASENFUSS S C, et al. JUNB/AP-1 controls IFN- γ during inflammatory liver disease [J]. J Clin Invest, 2013, 123 (12): 5258-5268.
- [19] HORRAS C J, LAMB C L, MITCHELL K A. Regulation of hepatocyte fate by interferon- γ [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22 (1): 35-43.
- [20] TRAN P L, VIGNERON J P, PERICAT D, et al. Gene therapy for hepatocellular carcinoma using non-viral vectors composed of bisnaphthyl-trencholesterol and plasmids encoding the tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP2 and TIMP3 [J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10 (6): 435-444.
- [21] MA Z, QIN H, BENVENISTE E N, et al. Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN- γ and IFN- β : critical role of STAT-1 α [J]. J Immunol, 2001, 167 (90): 5150-5159.
- [22] 王倩, 杨柱, 龙奉奎, 等. 肝癌癌前病变动物模型研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2017, 33 (8): 212-214.
- [23] 汪祺, 王亚丹, 杨建波, 等. 基于体外肝代谢考察大黄素甲醚肝毒性作用 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44 (11): 2367-2372.
- [24] 汪祺, 王亚丹, 文海若, 等. 基于UGT1A1酶抑制探讨何首乌中顺(反)式二苯乙烯苷体外肝微粒体中潜在毒性作用 [J]. 中国现代中药, 2019, 21 (3): 291-295.
- [25] 焦晨莉, 欧莉, 高峰, 等. 何首乌致肾虚模型大鼠肝损伤的血浆代谢组学研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2018, 35 (8): 620-627.

(收稿日期: 2018-12-21 编辑: 王丽英)