

了哥王“汗渍法”炮制后对大鼠肝脏抗氧化能力的影响

彭礼珍^{1*}, 冯果^{1,2#}, 李来来¹, 许琴¹, 李玮¹, 任晨晨¹, 朱光林¹, 王文静¹, 苏红梅¹

¹贵州中医药大学, 贵州 贵阳

²国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳

收稿日期: 2021年10月22日; 录用日期: 2021年11月19日; 发布日期: 2021年11月26日

摘要

目的: 通过大鼠肝组织中抗氧化应激指标变化, 分析“汗渍法”炮制了哥王前、后大鼠肝脏的抗氧化能力变化。方法: 将健康SD雄性大鼠随机分为空白对照组、了哥王生品提取物高、中、低浓度组(0.4050、0.2025、0.1013 g/kg)、了哥王炮制品提取物高、中、低浓度组(0.4050、0.2025、0.1013 g/kg), 每组6只。灌胃给药15天后, 取肝脏, 检测大鼠肝组织抗氧化相关因子超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)含量或活性。结果: 与空白对照组比较, 给药了哥王生品组的SOD、CAT、GSH相对降低, MDA含量相对升高, 炮制品组各指标无显著性差异。结论: 了哥王经“汗渍法”炮制后, 降低了药物对大鼠肝组织的毒性, 修复大鼠肝脏抗氧化能力。

关键词

了哥王, 汗渍法, 抗氧化, 肝毒性, SD大鼠

Effect of “Sweat Soaking Method” of the *Wikstroemia indica* on the Antioxidant Capacity of Rat Liver

Lizhen Peng^{1*}, Guo Feng^{1,2#}, Lailai Li¹, Qin Xu¹, Wei Li¹, Chenchen Ren¹, Guanglin Zhu¹, Wenjing Wang¹, Hongmei Su¹

¹Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang Guizhou

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 彭礼珍, 冯果, 李来来, 许琴, 李玮, 任晨晨, 朱光林, 王文静, 苏红梅. 了哥王“汗渍法”炮制后对大鼠肝脏抗氧化能力的影响[J]. 药物资讯, 2021, 10(6): 365-371. DOI: 10.12677/pi.2021.106045

Abstract

Objective: Through the changes of the anti-oxidative stress indexes in the liver tissues of rats, the changes in the anti-oxidation ability of the livers of rats before and after processing by the “Sweat Soaking Method” of *W. indica* were analyzed **Methods:** Healthy male SD rats were randomly divided into a blank control group, a high, medium, and low concentration group of *W. indica* raw product ethanol extract (0.4050, 0.2025, 0.1013 g/kg), and a high, middle and low concentration group of *W. indica* raw product ethanol extract (0.4050, 0.2025, 0.1013 g/kg). After 15 days of intragastric administration, the liver was taken, and the antioxidant-related factors superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) and glutathione (GSH) in rat liver tissue were detected. **Results:** Compared with the blank control group, the anti-oxidation test of rat liver tissue showed that the SOD, CAT, GSH of the *W. indica* raw material group were relatively lower, and the MDA content was relatively higher. There was no significant difference in the indicators of the processed product group. **Conclusion:** After being processed by the “Sweat Soaking Method” of *W. indica*, the toxicity of the drug to the liver tissue of rats is reduced, repairing the antioxidant capacity of rat liver.

Keywords

Wikstroemia indica, Sweat Soaking Method, Anti-Oxidation, Liver Toxicity, SD Rat

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

了哥王(*Wikstroemia indica* (L.) C. A. Mey.)来源于瑞香科茛菪花属植物干燥根或根皮[1], 其味苦、微辛, 性寒, 有大毒, 归肝、肺经。具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、镇咳祛痰、降低心肌耗氧量等药理作用[2] [3]。了哥王作为毒性药材, 其果实、茎、叶、根皮均有毒, 若服用过量或处理不当可导致中毒[4], 时常伴有呕吐、腹泻等消化道不良反应。了哥王的毒性在历代本草中曾有记载, 如《生草药性备要》记载其“有毒, 能杀人, 不可乱服, 此药毒狗, 犬食必死”。了哥王化学成分复杂, 药理作用广泛, 疗效确切, 但因其毒性较大, 临床应用受到限制。目前, 研究者对于了哥王的研究集中于化学成分、药理药效, 在毒性方面的研究较少。课题组前期急性毒性实验发现了了哥王经“汗渍法”炮制后, 有减少药物的毒性的作用[5]。此外, 药效学发现了了哥王“汗渍法”炮制后有减毒存效的作用[6] [7]。

据文献报道, 冯果等人发现了了哥王不同极性部位提取物对大鼠肝脏有不同程度的损伤, 其中了哥王乙醇、乙酸乙酯提取部位具有明显的肝毒性[8]。临床用药了哥王片致重症多形红斑型药疹伴药物性肝损伤1例[9], 说明了了哥王对肝脏有一定毒副作用。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)为抗氧化应激指标, 存在于各种生物体内, 本次研究以肝组织中抗氧化应激指标的变化对比了了哥王“汗渍法”炮制前和炮制后的乙醇提取物对大鼠肝脏抗氧化能力。

2. 材料

2.1. 实验动物

健康 SPF 级 SD 雄性大鼠，动物许可号：SCXK(湘)2019-0013，购买后在实验室适应性饲养 5 天，室内采取 12 h 光照，12 h 避光循环饲养，且控制室内温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ，相对湿度为 $(50 \pm 10)\%$ ，期间自由饮水、进食。本研究动物实验已通过相关伦理许可。

2.2. 仪器

电热恒温水浴锅(批号 09444)购自天津市泰斯特仪器有限公司；高速冷冻离心机(批号 12316030028)购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；LC-SFJ-10 手持匀浆机(批号 201912680)购自上海力辰邦西仪器科技有限公司；全自动酶标仪(批号 TO9-1S)Thermo scientific 公司；JM-A10002 电子天平(批号 00000792-1)购自诸暨市超泽衡器设备有限公司。

2.3. 试剂

了哥王生品乙醇提取物及炮制品提取物(批号 20190725)均由贵州中医药大学药剂实验室自制；氯化钠注射液(批号 E120121712)购自贵州科伦药业有限公司；SOD 试剂盒(批号 0313A21)上海茁彩生物科技有限公司；MDA 试剂盒(批号 20210310)购自北京索莱宝；CAT 试剂盒(批号 20210301)购自索莱宝生化试剂盒事业部；GSH 试剂盒(批号 20210312)购自南京建成生物工程研究所；CMC-Na(批号 20170110)购自天津恒兴化学试剂制造有限公司。

3. 方法

3.1. 了哥王生品及炮制品样品制备

了哥王按照课题组前期的“汗渍法”炮制，并采用乙醇渗漉提取得到了了哥王生品与炮制品的醇提取物[10]。

3.2. 动物分组与给药

将雄性 SPF 级 SD 大鼠(许可证号：SCXK(湘)2019-0013)42 只，随机分为 7 组，即生品高、中、低剂量组、炮制品高、中、低剂量组、空白组。通过灌胃的方式给药(生品给药剂量高：0.4050 g/kg、中：0.2025 g/kg、低：0.1013 g/kg，炮制品给药剂量与生品组一致，以 1.0% CMC-Na 溶液为溶剂)，空白组(灌胃等体积 1% CMC-Na)，一次/d，连续给药 15 天。

3.3. 组织采集

大鼠给药 15 天后，取材前 12 h 禁食，麻醉后取肝脏组织于 -80°C 条件保存。

3.4. 肝组织中 SOD 含量检测

称取肝脏组织 0.1 g，加入 1 ml 提取液冰浴匀浆，得肝组织匀浆液，8000 g， 4°C 离心 10 min，取上清液备用。用准备好的上清液按 SOD 试剂盒操作，测定样品中 SOD 含量。

3.5. 肝组织中 MDA 含量检测

按 3.4 项下方法制备肝组织样品，按 MDA 试剂盒操作，测定样品中 MDA 含量。

3.6. 肝组织中 CAT 含量检测

按 3.4 项下方法制备肝组织样品, 按 CAT 试剂盒制备各组肝组织样品, 并测定各组样品中 CAT 含量。

3.7. 肝组织中 GSH 含量检测

先称取肝脏组织, 按照牛血清白蛋白(BSA)标准试剂盒说明书制定标准曲线并测定大鼠肝组织蛋白含量。按照 GSH 试剂盒测定各组样本组织 GSH 活性。用酶标仪检测 405 nm 波长处各孔 OD 值。GSH 含量按试剂盒说明书公式计算。

3.8. 数据分析

实验数据结果采用 SPSS 分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 具有统计学差异。

4. 结果

4.1. 了哥王生品及炮制品对大鼠肝组织 SOD 含量的影响

了哥王生品与炮制品对大鼠肝组织中 SOD 含量影响, 如表 1 所示, 了哥王生品组随着给药浓度的升高, SOD 值逐渐下降, 且生品低剂量组与生品高剂量组有显著性差异($P < 0.05$); 了哥王炮制品高、中、低剂量组随着浓度变化无显著性差异, 炮制品高、中、低剂量组 SOD 值较生品相应浓度组高, 且炮制品各剂量组与生品高剂量组均有显著性差异($P < 0.05$); 各给药组与空白组比较, 生品高剂量组比空白组 SOD 值显著下降($P < 0.05$), 生品中剂量组比空白组 SOD 值稍有降低, 但无显著性变化。生品低剂量组与炮制品各浓度组比空白组稍有上升, 但无显著性变化。

Table 1. The effect of the “Sweat Soaking Method” on the SOD enzyme before and after processing by *W. indica* ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

表 1. 了哥王“汗渍法”炮制前后对 SOD 酶的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	SOD/(U/g)
生品高剂量	575.8631 ± 57.4938*
生品中剂量	635.8710 ± 29.4585
生品低剂量	645.0644 ± 41.0062 [#]
炮制品高剂量	650.9996 ± 48.6431 [#]
炮制品中剂量	645.8091 ± 48.1465 [#]
炮制品低剂量	670.1925 ± 25.963 [#]
空白组	640.6407 ± 39.381

注: 与空白组对比, * $P < 0.05$; 与生品高剂量组对比, [#] $P < 0.05$ 。

4.2. 了哥王生品及炮制品对大鼠肝组织 MDA 含量的影响

了哥王生品与炮制品对大鼠肝组织中 MDA 含量影响, 如表 2 所示, 了哥王生品组随着给药浓度的升高, MDA 值逐渐上升, 生品高剂量组与低剂量组有显著差异($P < 0.05$); 了哥王炮制品各组随着浓度变化无显著性差异, 与生品组比较, 各剂量组 MDA 值相对较低, 且炮制品各剂量组与生品高剂量比较具有显著性差异($P < 0.05$); 各给药组与空白组比较, 生品高剂量组显著上升($P < 0.05$), 其余各组无显著性差异。

Table 2. The effect of the “Sweat Soaking Method” on the MDA enzyme before and after processing by *W. indica* ($\bar{x} \pm s$, n = 4)**表 2.** 了哥王“汗渍法”炮制前后对 MDA 的影响($\bar{x} \pm s$, n = 4)

组别	MDA/nmol/g
生品高剂量	62.3409 ± 2.7694*
生品中剂量	55.7103 ± 5.2393
生品低剂量	53.6028 ± 5.969 [#]
炮制品高剂量	52.0821 ± 3.9851 [#]
炮制品中剂量	51.1598 ± 6.4521 [#]
炮制品低剂量	53.5479 ± 4.0269 [#]
空白组	53.9978 ± 4.5222

注：与空白组对比，*P < 0.05；与生品高剂量组对比，[#]P < 0.05。

4.3. 了哥王生品及炮制品对大鼠肝组织 CAT 含量的影响

了哥王生品与炮制品对大鼠肝组织中 CAT 含量影响，如表 3 所示，了哥王生品组随着给药剂量升高 CAT 值下降，生品高剂量组与低剂量组有显著差异(P < 0.05)；炮制品组随着给药剂量升高稍有降低，但无显著性差异，炮制品各组 CAT 值较生品组高，且与生品高剂量组比较，炮制品各剂量组显著性升高；各给药组与空白组比较，生品高、中剂量组显著降低(P < 0.01、P < 0.05)，其余各组与空白组比较无显著性差异。

Table 3. The effect of the “Sweat Soaking Method” on the CAT enzyme before and after processing by *W. indica* ($\bar{x} \pm s$, n = 4)**表 3.** 了哥王“汗渍法”炮制前后对 CAT 的影响($\bar{x} \pm s$, n = 4)

组别	CAT 活性(U/g)
生品高剂量	153.4734 ± 9.5766**
生品中剂量	160.6406 ± 10.2206*
生品低剂量	173.7326 ± 20.1797 [#]
炮制品高剂量	178.2241 ± 3.7110 [#]
炮制品中剂量	180.8043 ± 12.3785 ^{##}
炮制品低剂量	184.8179 ± 14.8291 ^{##}
空白组	182.7155 ± 11.1357

注：*表示与空白组比较，*P < 0.05，**P < 0.01；[#]表示与生品高剂量组比较，[#]P < 0.05，^{##}P < 0.01。

4.4. 了哥王生品及炮制品对大鼠肝组织 GSH 含量的影响

了哥王生品及炮制品对大鼠肝组织 GSH 含量的影响如表 4 所示，了哥王生品组随着给药剂量升高，GSH 值稍有下降。生品组与空白组比较，其中生品高、中剂量组显著性下降(P < 0.01、P < 0.05)；炮制品组与空白组比较无显著差异。炮制品组与生品组比较，炮制品各剂量组 GSH 值较生品高剂量组显著性升高(P < 0.05)。

Table 4. The effect of the “Sweat Soaking Method” on the GSH enzyme before and after processing by *W. indica* ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)**表 4.** 了哥王“汗渍法”炮制前后对 GSH 的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	GSH 含量($\mu\text{mol/gprot}$)
生品高剂量	34.6681 \pm 2.6291**
生品中剂量	36.1637 \pm 1.6609*
生品低剂量	37.5108 \pm 4.0197
炮制品高剂量	39.6895 \pm 3.5287#
炮制品中剂量	39.7472 \pm 2.5396#
炮制品低剂量	40.3144 \pm 3.8643#
空白组	41.2123 \pm 1.7663

注: *表示与空白组比较, *P < 0.05, **P < 0.01; #表示与生品高剂量组比较, #P < 0.05, ##P < 0.01。

5. 讨论

古人曰:“用药如用兵”,有毒中药素有“将军”之称,是因用之得法,效捷力宏,“以毒攻毒”,非寻常药物所能比[11]。根据古往今来中药炮制经验可知,合理的炮制工艺可以起到一定的降低药材毒性、提升药物效果等作用[12]。了哥王为毒性药材,化学成分复杂,药理作用广泛,临床用药疗效确切,但因其毒性较大,临床曾发现口服了哥王可导致死亡[13],使得了哥王的临床应用受限制。课题组前期研究发现“汗渍法”炮制可降低了哥王毒性,“汗渍法”来源民间,即将药材捆于人腰部,以汗液浸渍、以体温温煦药材,从而达到降低药材毒性的目的。了哥王的毒性可体现在体内肝脏组织中造成一定肝损伤,于是本次实验比较了了哥王经“汗渍法”炮制前、后对大鼠肝毒性影响。

SOD、CAT、GSH 酶是生物体内的抗氧化酶,广泛存在各种生物内,对人体存在抗氧化、抗衰老、抗辐射等作用。大量的自由基堆积会造成细胞损伤,SOD、CAT、GSH 酶均能清除过量的自由基,修复细胞损伤。MDA 是自由基与脂质结合发生过氧化反应的产物,MDA 的堆积造成细胞毒性。因此本实验以 SOD、MDA、CAT、GSH 为肝组织损伤的检测指标,当肝组织受到损伤时,使得抗氧化因子 SOD、CAT、GSH 等活力显著下降,MDA 升高[14]。基于此,实验以肝组织抗氧化应激指标的变化,判断了哥王炮制前、后对肝脏损伤情况。

实验结果发现,生品组和炮制品组各组间因浓度的变化无显著性差异,可能与实验设计的给药剂量有关,但总体整个实验,炮制品组的抗氧化效果较生品组好。和空白对照组比较,了哥王生品组的 SOD、CAT、GSH 酶活力都相对较低,MDA 活力相对升高,且生品高、中剂量组 CAT、GSH 显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),生品高剂量 SOD,MDA 有显著性差异($P < 0.05$);了哥王炮制品组各指标和空白组比较无显著性差异,与生品高剂量组比较,SOD、CAT、GSH 活力显著上升,MDA 活力显著下降。本实验结果说明了哥王生品乙醇提取物降低大鼠肝脏的抗氧化能力,经“汗渍法”炮制后了哥王有修复肝脏抗氧化的效果。了哥王对大鼠存在肝毒性,本实验进一步证明大鼠肝脏的抗氧化能力与肝损伤有关,了哥王毒性致肝损伤引起氧化与抗氧化平衡的紊乱,“汗渍法”炮制后可上调肝脏抗氧化因子 SOD、CAT、GSH 活力或含量,下调 MDA 含量,从而减轻肝脏损伤,增加肝脏的抗氧化能力。

基金项目

国家自然科学基金资助项目(No.81760766);(No.82060767);全国中医药创新骨干人才培训项目(No.

国中医药人教函〔2019〕128号); 贵州省高层次创新型人才项目(No.黔人领发〔2020〕4号); 贵州中医药大学“千层次”人才项目(No.贵中医[ZQ2018001])。

参考文献

- [1] 谢宗万, 主编. 全国中草药汇编[M]. 上册. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 212.
- [2] Shao, M., Huang, X.J., Liu, J.S., et al. (2016) A New Cytotoxic Biflavonoid from the Rhizome of *Wikstroemia indica*. *Natural Product Research*, **30**, 1417-1422. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1062379>
- [3] 张金娟, 熊英, 李玮, 等. 了哥王炮制前后的药效比较研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(5): 1118-1120.
- [4] 余朋千, 唯文发. 中药的中毒与防治[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1993: 56.
- [5] 冯果, 李玮, 何新, 等. 苗族了哥王不同炮制品乙醇提取物对小鼠的急性毒性作用比较[J]. 中国药房, 2017, 28(25): 3536-3540.
- [6] 郑传奇, 冯果, 李玮, 等. 苗族了哥王“汗渍法”炮制前后抗小鼠免疫性炎症的“量-效-毒”关系研究[J]. 中国药房, 2020, 31(6): 661-665.
- [7] 张金娟, 熊英, 李玮, 等. 了哥王炮制前后的药效比较研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(5): 1118-1120.
- [8] 冯果, 李玮, 何新, 等. 苗族了哥王不同提取物对正常大鼠肝毒性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 96-102.
- [9] 刘梦醒, 陈永刚, 罗季, 等. 了哥王片致重症多形红斑型药疹伴药物性肝损伤 1 例[J]. 中国药物警戒, 2018, 15(5): 314-315+317.
- [10] 冯果, 李玮, 何新, 等. 正交试验结合综合评分法优化苗族了哥王的提取工艺[J]. 中国药房, 2017, 28(16): 2216-2219.
- [11] 高绿纹. 有毒中药临床精要[M]. 北京: 学苑出版社, 2000: 102.
- [12] 许姣群. 火制法对中药饮片化学成分及临床疗效影响的研究[J]. 新中医, 2019, 51(10): 227-229.
- [13] 张庆文, 余奕明, 曾力生, 等. 口服了哥王中毒致死 1 例[J]. 中国法医学杂志, 2008, 23(5): 353.
- [14] 周传凤, 范金成, 陆艳. 外源超氧化物歧化酶对人体机能影响的研究进展[J]. 宁夏农林科技, 2012, 53(7): 76-77+83.