

五味子影响黄药子肝肾毒性的实验观察 *

【作者】 杨辉¹ 李多娇¹ 王彦云¹ 牟稷征¹ 崔向青² 李冀湘¹ 杨承¹ 李连颖¹ 杨洋¹ 苑景春¹

1 中国中医科学院广安门医院 (北京 100053)

2 北京中医药大学基础医学院 (北京 100029)

【摘要】 目的 观察五味子与黄药子合用时,对黄药子所致生化及肝肾病理改变的缓解作用。方法 对比黄药子组、拮抗组小鼠在给药 60d 后观察肝脏生化指标、病理。结果 拮抗各剂量组对相应剂量黄药子所致的 ALT 升高及病理改变有明显的缓解和抑制作用。

【关键词】 黄药子;五味子;拮抗;肝肾损害

Study on the effect of the *Schisandra chinensis*(Turcz.) Baill on the hepatic and renal toxicity of *Dioscorea bulbifera* L.

【Writers】 Yang Hui¹ Li Duo-jiao¹ Wang Yan-yun¹ Mou Ji-zheng¹ Cui Xiang-qing² Li Ji-xiang¹ Yang cheng¹

Li liang-ying¹ Yang Yang¹ yuan Jing-chun¹

1 Peking University Third Hospital (Beijing 100083)

2 Beijing Pharmaceutical Association (Beijing 100027)

【Abstract】 **Objective Purpose** When *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill and *Dioscorea bulbifera* L. are applied together, observe the capability of lysis on biochemical and liver kidney pathology change caused by *Dioscorea bulbifera* L. **Method** Compare liver biochemical index and pathology of mice in *Dioscorea bulbifera* L. group with those in group after 60 days of dosing. **Results** All dose levels of group demonstrated obvious lysis and containment capabilities against elevated ALT and pathology change caused by *Dioscorea bulbifera* L. at the corresponding dose ranges.

【Key words】 *Dioscorea bulbifera* L.; *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill; detoxification; hepatic and renal toxicity

【中图分类号】 R285.5

【文献标识码】 A

黄药子,薯蓣科植物黄独(*dioscorea bulbifera* L.)的干燥块茎。现代药理研究证实黄药子具有多重治疗作用,尤其在调节甲状腺功能、抑制肿瘤、抗病毒等方面具有明显的优势。近年来随着黄药子临床应用研究的不断发展,它的一些毒副作用逐渐显现。笔者通过对古今相关资料的检索,发现黄药子与五味子配伍使用时未见有不良反应出现,据此尝试以五味子与黄药子共同使用,以期降低黄药子对肝肾造成的不良损害,并对此进行了初步的实验观察。

1 实验材料

1.1 药品和试剂

黄药子饮片:产地河北省(购于北京燕京医药公司),经本院药检室鉴定为薯蓣科植物黄独(*Dioscorea bulbifera* L.)的干燥块茎;炙北五味子饮片:产地辽宁省(购于北京燕京医药公司),经本院药检室鉴定为木兰科植物五味子[*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill]的干燥成熟果实;甲醛溶液:北京旭东化工厂生产(批号 60060623)配成 10% 浓度备用;二甲苯:北京化工厂生产(批号

* 本课题为中国中医科学院广安门医院所级科研课题,课题编码:2004S82

20060412); 苏木精: 北京化学试剂公司生产 (批号 20040727); 伊红: 北京化工厂生产 (批号 20030915); 切片石蜡 56℃~58℃; 上海华灵康复器械厂生产 (批号 20060125); 中性树脂胶: 上海标本模型厂生产 (批号 20050802)。

1.2 实验仪器

DJ1000 电子天平, 上海天平仪器厂; 日本 Sakura 自动脱水机; 德国 Leitz 切片机; 日本 Sakura RSH-100 自动染色机; 日本 Nikon 光学显微镜; 德国 Leica DMLK-HC 自动照相生物显微镜。

1.3 药物制备

1.3.1 黄药子水煎剂制备 黄药子饮片打碎, 加 8 倍水浸泡 1h 后煮沸 25min, 再加 5 倍量水重复提取 1 次, 合并 2 次水煎液 80℃水浴浓缩至每毫升相当于 6g 生药, 4℃以下低温冷藏保存, 使用时用蒸馏水稀释至每毫升相当于 4g 生药备用。

1.3.2 黄药子配五味子水煎剂制备 黄药子和炙五味子饮片分别打碎, 加 8 倍水浸泡 1h 后煮沸 25min, 再加 5 倍量水重复提取 1 次, 合并 2 次水煎液 80℃水浴浓缩至每毫升相当于 5g 生药 (含量以黄药子计, 下同), 4℃以下低温冷藏保存, 使用时用蒸馏水稀释至每毫升相当于 4g 生药备用。

2 实验方法

2.1 最大耐受剂量 (MTD) 实验

根据给药剂量的不同将清洁级昆明小鼠随机分为若干给药组和 1 个对照组, 每组 10 只, 雌雄各半。各组小鼠禁食 5h 后, 24h 内灌胃给药 2 次, 给予不同浓度的黄药子水煎剂, 给药量按每 20g 给予 0.8mL 计, 寻找小鼠能耐受而不引起死亡的最高剂量。对照组给予同等体积的无菌用水。末次给药 1h 后恢复喂食, 观察 7d 处死, 大体解剖, 肉眼观察并摘取肝脏和肾脏制作病理切片。

2.2 亚长期毒性实验

清洁级昆明小鼠 50 只, 体重 (20±2) g, 随机分为 5 组: 黄药子大剂量组、黄药子小剂量组、拮抗大剂量组、拮抗小剂量组、对照组。每组 10 只, 雌雄各半。黄药子大剂量组给予黄药子水煎剂 1/4

MTD, 黄药子小剂量组给予黄药子水煎剂 1/8MTD; 拮抗大剂量组给予黄药子配五味子水煎剂 1/4 MTD, 拮抗小剂量组给予黄药子配五味子水煎剂 1/8 MTD, 对照组给予同等体积的无菌用水, 每日称重后灌胃给药 1 次。不限饮食, 给药 60d。在给药的第 61 天, 禁食后摘眼球取血, 颈椎脱臼处死, 大体解剖, 观察小鼠内脏有无明显的病理改变。血液样本进行 ALT 值测定。取肝脏 (无胆囊) 和肾脏称重, 计算肝肾指数 (肝脏指数=肝脏重量/体重×100%; 肾脏指数=双侧肾重/体重×100%) 后, 固定于 10% 甲醛溶液中, 取材后流水冲洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋, 切片, HE 染色, 光学树脂封片, 光学显微镜下观察。本实验全部数据输入 Excel 数据库, 以 PEMS 3.1 软件进行统计分析, 均数之间的比较选用方差分析和 *t* 检验 (或 *t'* 检验) 进行处理。

3 实验结果

3.1 MTD 实验

实验结果显示黄药子 300%水煎剂 24h 内给药 2 次, 每次给药量按每 20g 给予 0.8mL 计, 观察期内小鼠未出现死亡, 该给药剂量 240.24g·kg⁻¹ 为小鼠的 MTD。

观察期内给药组小鼠在第 2 天 40%出现体重降低, 持续至第 5 天。小鼠普遍出现被毛枯槁、无光泽、少动喜卧、摄食量降低、尿液排泄增多, 个别出现脱毛、脚爪色白、闭目蜷卧、对外界刺激反应迟缓等现象, 体重均低于对照组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

给药组小鼠解剖后肉眼观察可见肝脏不同程度地出现颜色不均、偏黄、纹理粗糙, 个别肝脏颜色灰黄, 呈橙皮样, 布满红色斑点。其中 1 只出现大量蛋清样腹水。光镜观察可见细胞核增大、胞浆嗜酸性变 (图 1)、钙盐沉积 (图 2)、肝窦扩张 (图 3) 等改变。肾脏可见部分肾小管中管形样物质增多 (图 4)。对照组解剖后肉眼观察未见明显改变 (图 5, 6)。

3.2 亚长期毒性实验

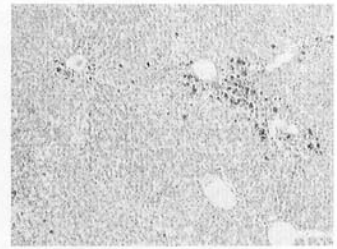
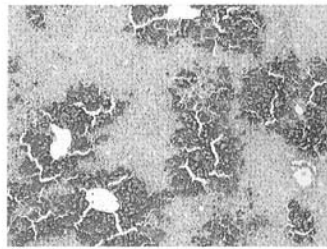
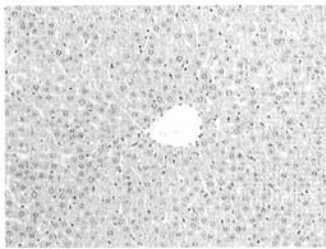


图1 黄药子组胞浆嗜酸性改变 10*20 图2 黄药子组大面积钙盐沉积 10*10 图3 黄药子组肝窦扩张和钙盐沉积 10*10

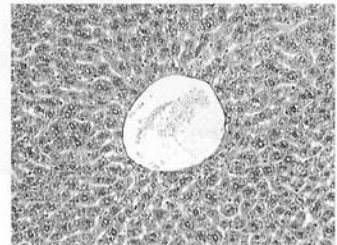
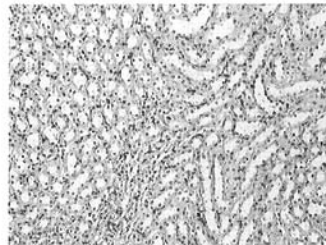
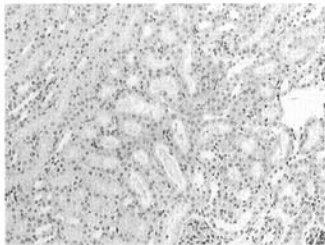


图4 部分肾小管中管形样物质增多 10*20 图5 对照组肾脏 10*10 图6 对照组肝脏 10*10

3.2.1 给药表现 给药第16天黄药子大剂量组雄性小鼠普遍出现毛色枯槁，背毛蓬松；20d时黄药子大剂量组小鼠出现尿量增加、喜卧少动、进食量降低等现象，其余各组未见明显变化；30d时黄药子大剂量组部分雄性小鼠出现脱毛、蜷卧、活动量降低、体重下降；拮抗大剂量组少量雄鼠出现背毛蓬松；45d时黄药子大剂量组体重普遍低于其他组，个别腹部胀大，其中雄鼠出现好斗易怒、相互撕咬，个别小鼠尾部被咬伤出血；黄药子大剂量组部分小鼠背毛出现分层，拮抗大剂量组和黄药子小剂量组少量出现毛色枯槁、喜静少动现象；第50天黄药子大剂量组个别尾部被咬伤的雄性小鼠出现局部坏死、断尾。观察期内各组雌鼠较雄鼠活跃。

3.2.2 对体重影响 黄药子大剂量组与对照组比较， $P<0.05$ ($P=0.0103$) 存在差异；黄药子小剂量

组与对照组比较， $P<0.01$ ($P=0.0047$) 差异明显；拮抗大剂量组与对照组比较 $P>0.05$ ($P=0.1265$)、拮抗小剂量组与对照组比较 $P>0.05$ ($P=0.4028$)，差异均无统计学意义 (见表1)。

3.2.3 对肝指数影响 黄药子大剂量组肝脏指数与对照组比较， $P<0.01$ ($P=0.0000$) 存在显著差异；黄药子小剂量组与对照组比较， $P<0.01$ ($P=0.0000$) 差异明显；黄药子大剂量组与拮抗大剂量组比较， $P<0.01$ ($P=0.0000$)，存在显著差异；黄药子小剂量组与拮抗小剂量组比较， $P<0.01$ ($P=0.0024$)，存在显著差异，其余各组间比较差异无统计学意义，表明五味子对黄药子引起的肝脏肿大有一定的抑制作用 (见表1)。

3.2.4 对ALT影响 黄药子大剂量组与对照组ALT值比较 $P<0.01$ ($P=0.0000$)，存在显著差异；拮抗

表1 不同实验组小鼠体重、肝脏指数及ALT的实验值

分 组	体 重	肝脏指数	ALT
黄药子大剂量组	40.0000 ± 2.3403	4.9206 ± 0.5633**	253.99 ± 104.2095*
拮抗大剂量组	41.1875 ± 8.2529	3.8472 ± 0.4074	87.86 ± 63.5415
黄药子小剂量组	39.1500 ± 5.0723	4.6019 ± 0.4625*	155.53 ± 82.7891*
拮抗小剂量组	44.5000 ± 5.9840	3.8838 ± 0.5891	49.7125 ± 33.0237
对照组	45.1250 ± 6.2952	3.6286 ± 0.3563	59.53 ± 66.5652

注：* $P<0.05$ ；** $P<0.01$

大剂量组与对照组 $P>0.05$ ($P=0.3303$), 差异无统计学意义; 黄药子小剂量组与对照组 ALT 值比较 $P<0.01$ ($P=0.0043$), 存在显著差异; 拮抗小剂量组与对照组 ALT 值比较 $P>0.05$ ($P=0.6834$), 差异无统计学意义 (见表 1)。

3.2.5 组织学改变 肉眼观察结果 (大体), 黄药子大剂量组和小剂量组小鼠的肝、肾大部分呈暗灰黄色, 部分肝肾有不同程度增大, 切面灰黄色, 肝组织易碎。拮抗大剂量组和小剂量组肝肾少部分颜色呈暗灰色, 和黄药子组比明显减轻。对照组肝、肾颜色正常。镜下观察结果, 黄药子大剂量组大部分小鼠肝脏以中央静脉为主肿胀, 细胞核浓缩, 细胞质疏松空网样, 呈气球样变。部分肝脏大面积肿胀, 肝细胞坏死, 破坏了正常肝细胞结构, 排列紊乱, 坏死区域嗜酸样变, 细胞个大, 胞质红染, 未形成纤维化。肝细胞间质有大量炎症细胞浸润, 以小淋巴为主, 并有脂肪滴形成。大部分中央静脉扩张瘀血, 枯否氏细胞明显增生、肥大 (图 7、8)。大部分小鼠肾脏近、远小管肿胀明显, 表现为曲管上皮肿大, 内膜脱落, 形成特殊的蛋白管型, 集合管有小面积蛋白颗粒及瘀血, 炎症细胞浸润, 部分肾小球瘀血、增大, 系膜细胞有增多, 个别小球壁层细胞肿大 (图 9)。黄药子小剂量组小鼠肝细胞可见肿胀、坏死、间质炎症浸润、嗜酸性变, 肝组织有坏死; 肾脏肾曲管有大面积损伤及炎性浸润, 蛋白形成, 与黄药子大剂量组相比肝肾病变有减轻。对照组肝脏、肾脏组织结构正常 (图 10、11)。

拮抗大剂量组大部分小鼠的肝肾细胞肿胀、坏

死、间质炎症浸润、嗜酸性改变等病变明显减轻 (图 12~16); 拮抗小剂量组大部分小鼠肝肾细胞肿胀、间质炎症浸润、嗜酸性变、坏死等病变与黄药子大小剂量组相比明显减轻 (图 17)。

对照组小鼠肝细胞未见肿胀, 间质未见炎症,

表 2 各组小鼠肝脏损伤程度统计

给药组别	损伤程度					
	-	±	+	++	+++	++++
黄药子大剂量组			1	2	5	2
黄药子小剂量组	2		2	3	2	1
拮抗大剂量组	5	2	1	1	1	
拮抗小剂量组	5	1	3	1		
对照组	10					

注: “-”: 组织正常, 未见肿胀, 间质未见炎症, 结构正常; “±”: 肝组织细胞片状肿胀, 炎症不明显; “+”: 肝组织细胞小面积肿胀, 轻度炎症; “++”: 肝组织细胞大片状肿胀, 并有坏死灶, 炎症浸润; “+++”: 肝组织细胞大面积肿胀, 间质炎症浸润明显, 并有坏死嗜酸性变; “++++”: 大部分肝细胞肿胀较弥漫, 并有大片状坏死, 有嗜酸性变, 炎症较重。

表 3 各组小鼠肾脏损伤程度统计

给药组别	损伤程度					
	-	±	+	++	+++	++++
黄药子大剂量组			1	5	2	2
黄药子小剂量组			4	4	1	1
拮抗大剂量组			4	5	1	
拮抗小剂量组	1	2	3	4		
对照组	10					

注: “-”: 肾小球、曲管未见有病变, 结构正常; “±”: 肾小球未见有病变, 曲管肿胀轻; “+”: 肾小球未见有病变, 曲管肿胀局限, 管内未见有明显充血; “++”: 肾小球病变不明显, 曲管有肿胀, 管内轻度少量炎症浸润; “+++”: 部分肾小球系膜细胞增多, 曲管肿胀, 管内有特殊蛋白; “++++”: 大部分肾小球有不同程度增大, 球内瘀血, 系膜细胞增多, 曲管肿胀、坏死, 管内有蛋白颗粒。

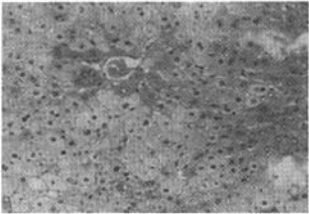


图 7 黄药子大剂量组雌性小鼠肝细胞明显肿胀, 似气球样变, 间质炎症 10*40

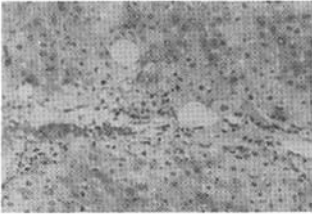


图 8 黄药子大剂量组雄性小鼠肝脏大面积肿胀, 气球样变 10*40

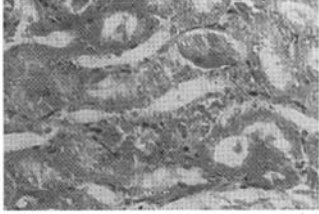


图 9 黄药子大剂量组雌性小鼠肾曲管蛋白管型 10*40

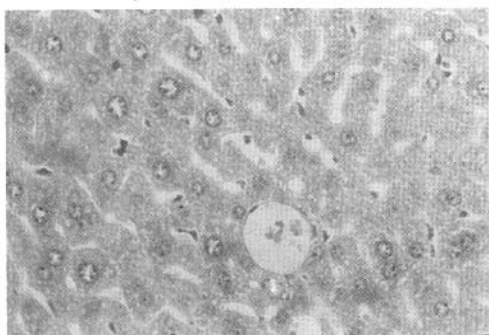


图 10 对照组肝脏组织结构正常 10*40

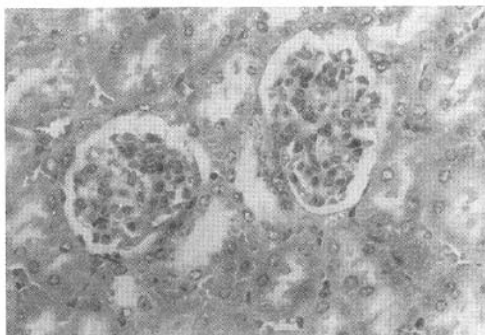


图 11 对照组肾小球结构正常 10*40

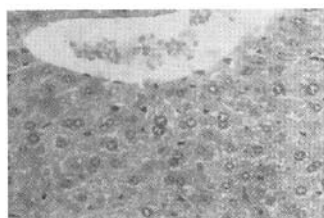


图 12 拮抗大剂量组雄性小鼠肝细胞结构正常，中央静脉轻度扩张 10*40

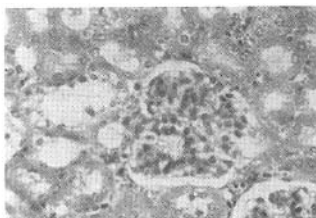


图 13 拮抗大剂量组雄性小鼠肾脏个别肾曲管有网眼变 10*40

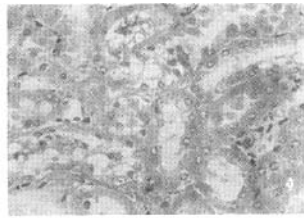


图 14 拮抗大剂量组雄性小鼠肾曲管有少量网眼变 10*40

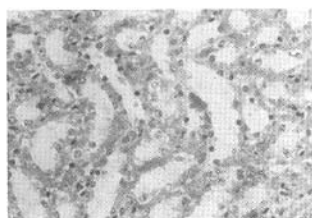


图 15 拮抗大剂量组雌性小鼠肾集合管正常结构 10*40

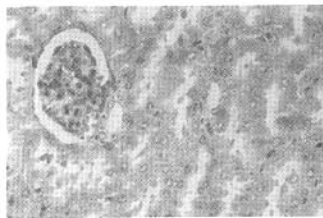


图 16 拮抗大剂量组小鼠肾小球基本正常 10*40

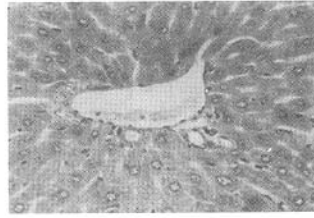


图 17 拮抗小剂量组雌性小鼠肝细胞较正常 10*40

中央静脉未见扩张、瘀血，组织排列整齐，组织结构正常；小鼠肾小球未见增大，系膜细胞未见增多，间质未见炎症，近、远曲小管未见肿胀、脱落，未见有明显的颗粒，组织结构正常（见表 2、表 3）。

4 讨论

本实验在药物选择、制剂方法、给药途径上均参照中医汤剂口服的特点，通过临床药理研究技术的运用，对五味子影响黄药子肝肾毒性进行系统的实验观察，为黄药子的临床合理使用提供实验参考。

MTD 实验中，给药组部分小鼠在未禁食的情况下胃部呈现食物积存少，甚至干瘪呈空腔状，表明小鼠的食欲下降，进食量降低，与报道中黄药子主要导致消化不良反应相一致^[1]；各实验阶段小鼠除肝、肾出现病理改变，心、肺、脾等器官肉眼未见明显异常，显示黄药子主要损伤机体的肝脏和肾脏，对心、肺等器官无明显毒性；亚长期毒性实验中，黄药子的肝、肾毒性在不同剂量下的病理改变存在差异，其对机体的损伤程度随着剂量的上升而加大，表明黄药子对机体肝肾的损害程度与服药

剂量呈现量效关系；结果显示黄药子大、小剂量组与对照组的肝脏指数出现明显差异，此差异与用药剂量呈正比，显示黄药子抑制了小鼠的生长发育并且引起肝脏的肿大，可能因黄药子引起小鼠食欲下降、进食量降低等消化系统反应，导致机体营养失衡，这一点与 MTD 实验的结果相一致。

现代药理研究证实，肝脏细胞膜的氧化损伤和药物代谢过程中生物转化功能异常，是造成肝损伤的重要原因之一^[2]，黄药子可抑制肝微粒中 GST、GSH—PX 及 SOD 的活性，表明其毒性作用的产生与抑制肝抗氧化酶和药物代谢酶活性密切相关^[3]。黄药子除对肝细胞的直接损害外，还可以引起肝脏胆汁生成、排泄的障碍，致使胆汁瘀积，对肝脏造成间接损害。五味子对多种原因造成的急性肝损伤具有保护作用，能减轻肝细胞坏死，防止脂肪变性，抗纤维化，并使血清中 ALT 活性显著降低；五味子可提高肝细胞浆内 SOD 和 CAT 活性，对体内两种不同自由基产生系统所引起的肝细胞膜脂质过氧化损伤均有保护作用，使肝细胞丙二醛的生成及 LDH 和 GPT 酶的释放均减少，肝细胞存活率提高，细胞膜形态保护完整，增强机体抗氧化作用^[4]，其所含的多种成分能明显诱导小鼠和大鼠肝微粒体细胞色素 P450 的活性，增强肝脏的解毒功能。

本实验用五味子与黄药子配伍应用，分别从生化检验、病理观察等方面进行研究分析，以期探讨

可以缓解黄药子肝肾毒性的有效途径。结果表明，拮抗大、小剂量组对黄药子相应剂量引起的 ALT 升高具有较明显的改善作用；病理结果显示拮抗各剂量组的肝脏病理均优于黄药子相应剂量组，表明五味子对黄药子造成的肝脏损害有较好的缓解作用；肾脏病理结果显示拮抗各剂量组与黄药子组比较存在明显差异，但与对照组间亦存在差异，表明其拮抗黄药子肾毒性的作用尚待进一步研究。

近年来因服用中草药引起的不良反应有逐年增加之势，其中以中草药引发的肝、肾损害在临床实践中较为多见，黄药子就是其中之一。通过现代临床药理研究技术的运用，研究黄药子肝肾毒性的致病特点，考察其中毒剂量与有效剂量之间的关系，并运用传统中医理论探索减毒增效的有效方法和途径，在降低或抑制其肝肾毒性的同时最大限度地发挥其特有的临床疗效，为黄药子的临床合理使用提供实验参考，将是我们下一步的主要研究方向。

【参考文献】

- [1] 杨辉, 苑景春. 黄药子临床应用及不良反应综述. 北京中医, 2004, 23 (2): 102-104
- [2] 蔡皓东. 药源性肝损害 (一). 药物不良反应杂志, 2003, (2): 101-106
- [3] 宋崇顺. 黄药子对肝肾毒性的初步实验. 中药通报, 1983, 8 (4): 34-36
- [4] 侯家玉. 中药药理学. 北京: 中国中医药出版社. 2002: 244-247
- (上接第 52 页)
- 三联雾化吸入治疗支气管哮喘临床研究. 中国全科医学, 2006, 3 (9): 209-210
- [5] 李燕, 黎万荣, 余成清, 等. 曲马多超声雾化吸入用于扁挑术后镇痛的临床研究. 五官科护理, 2006, 12 (1): 64-65
- [6] 冉瑞明. 凝血酶吸入雾化治疗咯血 90 例观察. 临床荟萃, 2002, 17 (8): 456-457
- [7] 王俊峰, 郭静. 超声雾化吸入双黄连粉针治疗急性咽喉炎和扁桃腺炎 76 例. 中西医结合实用临床急救, 1999, 3 (6): 130
- [8] 戴殿禄, 尹燕坤, 白希永, 等. 垂体后叶素吸入给药治疗咯血治疗中应用. 中国现代医学杂志, 1999, 11 (9): 49
- [9] Staha K, Claesson M, Lilliehorn P, et al. The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. Int J Pharm, 2002, 233 (1/2): 227-237
- [10] Todo H, Okamoto H, Iida K, et al. Effect of additives on insulin absorption from intratracheally administered dry powders in rats. Int J Pharm, 2001, 220 (1/2): 101-110
- [11] Todo H, Okamoto H, Iida K, et al. Improvement of stability and absorbability of dry insulin powder for inhalation by powder combination technique. Int J Pharm, 2004, 271 (1/2): 41-54
- [12] Terada K, Niizuma T, Ogita S, et al. Responses of varicella zoster virus (VZV) specific immunity in seropositive adults after inhalation of inactivated or live attenuated varicella vaccine. Vaccine, 2002, 20 (31/32): 3638-3643