

丹酚酸 B-镁盐抗大鼠 D-半乳糖胺肝损伤的作用

上海市中医药研究院肝硬化研究室(上海 200032) 刘 平

日本大阪市立大学医学部生化学教室 森泽成司 沟口靖弘

内容提要 应用丹参水溶性活性成分——丹酚酸 B-镁盐抗大鼠 D-半乳糖胺肝损伤, 可显著降低血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)活性, 减轻肝细胞坏死。提高肝非实质细胞花生四烯酸代谢产物 6-酮基-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$)、前列腺素 D_2 (PGD $_2$) 及前列腺素总的生成量。表明丹酚酸 B-镁盐可能是丹参抗肝损伤的主要成分, 其提高肝非实质细胞前列腺素(PGs)总的生成量可能是其抗肝损伤的机制之一。

关键词 丹参 丹酚酸 B-镁盐 D-半乳糖胺 肝损伤 前列腺素

近年来的研究表明, 丹参水溶性提取物或丹参注射液具有抗大鼠四氯化碳或 D-半乳糖胺肝损伤的作用^(1, 2)。临床上用于治疗慢性肝病患者也显示出一定的效果⁽³⁾。最近从丹参中分离出水溶性成分——丹酚酸 B-镁盐⁽⁴⁾, 可改善、提高大鼠的肾功能及尿中前列腺素 E_2 (PGE $_2$) 的排泄量⁽⁵⁾。而花生四烯酸代谢产物与肝脏疾病的关系已引起了广泛关注⁽⁶⁾。我们就丹参酚性酸 B-镁盐对大鼠 D-半乳糖胺肝损伤的防治作用及其对肝非实质细胞花生四烯酸代谢的影响进行了探讨。

材料与方法

一、材料 Wistar 雄性大鼠, 体重 200~220 g, 由日本 SLC 公司(日本静冈)供给。

D-半乳糖胺(D-galactosamine, D-Galn), 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)分别购自日本和光纯药株式会社(大阪)及 Difco 公司。[1- 14 C] 花生四烯酸(arachidonic acid, AA)购自 NEN 公司, 链霉菌蛋白酶 E(Pronase E), III 型胶原酶及 HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)分别购自 Merck 公司、和光纯药株式会社及 Sigma 公司; 丹参酚酸 B-镁盐(Magnium Lithospermate B, LSA-B)由日本九州大学药学部西冈五夫教授馈赠。

二、方法

1. D-Galn 肝损伤大鼠模型的制备与治疗 动物禁食 16 h 后, 于腹腔内分别注入 D-Galn(每只 140 mg/ml 生理盐水)与 LPS(每只 1 μ g/ml 生理盐水)。其后, 治疗组经口投予 LSA-B(每只 1 mg/ml 生理

盐水), 对照组投予同量的生理盐水。4 h 后, 在乙醚麻醉下开腹, 经下腔静脉采血, 测定 ALT、AST 活性。同时取部分肝组织, 以 8% 福尔马林液固定, HE 染色作病理组织学观察。然后进行肝脏灌流, 分离肝非实质细胞。

2. 肝非实质细胞的分离 大鼠于开腹状态下, 暴露门静脉, 插入 18 G 置留针, 连接恒流泵, 流速 12 ml/min。先流入含有 HEPES、无 Ca^{2+} 的 HBSS (Hank's balanced salt solution) 溶液 100 ml, 继而灌流含 0.05% 胶原酶-HEPES 的 HBSS 溶液 100 ml, 0.05% Pronase E-HEPES 的 HBSS 溶液 50 ml。灌流后, 摘出肝脏并细切, 于含 0.05% Pronase E, HEPES 的 HBSS 溶液 100 ml 中, 37°C, 振荡 30 min, 以双层纱布滤过, 去除未消化的肝组织后, 离心(400 rpm, 3 min, 4°C)去除细胞碎屑, 其上清经离心(1800 rpm, 5 min)收集细胞, 通过低渗处理溶解混存的红细胞。再用 HBSS 液沉洗 3 次后, 收集细胞, 用于下列实验。

3. 肝非实质细胞生成前列腺素的测定 以含 2 mmol $CaCl_2$ 的 PBS 溶液悬浮获取的肝非实质细胞(1×10^7 个/ml)。细胞先以 37°C, 振荡温浴 5 min 后, 加入 [1- 14 C] · AA (10^4 cpm/nmol · μ l 乙醇) 25 μ l/ml, 钙离子载体 A 23187 (calcium ionophore A 23187, Cal A 23187; 1 nmol/ml 乙醇) 5 μ l/ml 细胞悬浮液, 继续振荡温浴 30 min。反应结束后, 先添加蚁酸(100 μ l/ml)调节 pH 至 3.0, 再加入 2 倍量的三氯甲烷并作充分混合后, 经离心(3000 rpm, 10 min)分离三氯甲烷相, 蒸发干燥后的样品以甲醇溶解, 作逆相高效相色谱法分析。移动相为乙腈: 水: 磷

酸(33:67:0.1),流速1.0 ml/min;分析柱(TSK-gel 120 T,TOSOH)的流出液以195 nm波长检测其吸光度,同时,每30 s收集1次流出液于闪烁杯中,用液体闪烁计数器检测各流分的放射活性,探讨细胞在外因性AA条件下所生成PG的量。

结 果

一、LSA-B对大鼠D-Galn肝损伤血清ALT、AST活性及肝病理组织学的影响

正常大鼠在腹腔内注射D-Galn和LPS 4 h后,血清ALT、AST活性显著升高,分别为 523 ± 118 、 856 ± 115 IU;病理组织学可见到肝细胞普遍颗粒变性,少量为水样变,有明显的坏死灶,大量炎性细胞浸

润。LSA-B治疗组的血清ALT、AST活性分别为 172 ± 131 、 245 ± 195 IU,均显著低于对照组($P < 0.01$),肝细胞变性坏死均较对照组为轻,有大量炎性细胞浸润。

二、LSA-B对大鼠D-Galn肝损伤肝非实质细胞PG生成的影响

大鼠肝非实质细胞悬浮液与外源性AA反应后,经RP-HPLC分析表明,可生成 PGD_2 、 PGE_2 、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 及血栓素 B_2 (TXB_2)。与正常组大鼠比较,大鼠D-Galn肝损伤肝非实质细胞 PGD_2 及 TXB_2 的生成量均显著降低,而LSA-B治疗组动物的6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 PGD_2 及PG的总量(PGs)的生成量均显著较对照组为高($P < 0.05$),见附表。

附表 LSA-B对大鼠D-Galn肝损伤肝非实质细胞PG生成量的影响 (cpm, $\bar{x} \pm S$)

组别	鼠数	6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$	TXB_2	PGD_2	PGE_2	PGs
正常	3	$1073 \pm 117^*$	$4269 \pm 792^*$	$9573 \pm 1128^*$	647 ± 153	$15922 \pm 1591^*$
肝损伤	4	775 ± 235	2266 ± 1201	2756 ± 491	592 ± 169	6389 ± 1875
LSA-B	4	$1503 \pm 474^*$	$3146 \pm 957^*$	$4558 \pm 1124^*$	677 ± 179	$9885 \pm 1027^*$

注:与肝损伤组比较, $*P < 0.05$

讨 论

有关丹参治疗肝病的临床和实验研究已有较多的报道^[3],但其成分极其复杂,已经有30余种化学成分被分离和完成结构测定^[7]。但何种成分具有抗肝损伤效用至今尚未见有报道。我们应用新近从丹参中分离获得的有效成分——丹酚酸B-镁盐进行抗大鼠D-Galn肝损伤的研究,表明该成分可显著降低肝损伤大鼠的血清ALT、AST活性,病理组织学观察也见到LSA-B防治组的肝细胞坏死明显较对照组为轻。提示LSA-B可能是丹参抗肝损伤的主要成分。

近年来,AA代谢变化在损伤中的作用已广泛受到关注^[6]。大鼠D-Galn肝损伤时,肝非实质细胞的 PGD_2 生成量显著低下,且与肝损伤的程度密切相关^[8]。本实验也得到相同的结果,与正常组相比,大鼠D-Galn肝损伤肝非实质细胞的 PGD_2 及PGs生成量显著低下。而LSA-B防治组大鼠肝非实质细胞的6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 PGD_2 及PGs生成量较对照组显著提高。外因性PG的投予可显著降低急性肝功能不全动物的死亡率。 PGE_1 治疗急性或亚急性重症肝炎取得了令人满意的疗效^[6]。丹参防治大鼠D-Galn肝损伤的病理组织学结果见到肝内枯否氏细胞增生活跃,活性增强^[2]。可以推测,LSA-B显著提高肝损伤大

鼠肝非实质细胞的PG生成量,可能是其抗肝损伤的作用机制之一。

参 考 文 献

1. 王桢苓,等. 活血化瘀防治实验性肝病的研究. 中医杂志 1982; 24(1): 67.
2. 戚心广,等. 丹参、赤芍对实验性肝损伤肝细胞保护作用机理研究. 中西医结合杂志 1991; 11(2): 102.
3. 王桢苓. 丹参治疗慢性肝炎的临床应用及实验研究现状. 中西医结合杂志 1985; 5(8): 509.
4. Tanaka T, et al. Magnesium and ammonium-potassium lithospermates, the active principles having a uric acid preventive effect from salvia miltiorrhiza. Chem Pharm Bull 1989; 37: 340.
5. Yokozawa T, et al. Effect of magnesium lithospermate B on urinary prostaglandins in rats with renal failure. J Natural Products 1990; 53: 662.
6. 溝口靖紘. 肝のアラキドン酸代謝とその生理的意義. 現代医療 1991; 23: 665.
7. 郑国樾. 丹参化学成分的研究概况. 中国药学杂志 1989; 24: 6.
8. 刘平,他. D-galactosamine肝障害誘導の肝非实质細胞酸にすいけるアラキドン代謝について. 日消志 1991; 80: 1361.

but not in younger ones, this drug seems to have different action from testosterone preparations. In another animal experiment, the reproduction promoting effect of WYL was shown by the increase of sperm count and motility of sperms in old male rats as well as its reproductive ability.

Key words Wuzi Yanzong Liquid, norepinephrine, dopamine, serotonin, testosterone, estradiol, reproduction

(Original article on page 349)

Effects of Magnesium Lithospermate B on D-Galactosamine Induced Rat Liver Injury

Liu Ping (刘平), Yasuhiro Mizoguchi*, Seiji Morisawa*

Dept. of Hepatology, Shanghai Academy of TCM, Shanghai (200032)

* Division of Biochemistry, Dept. of Medicine, Osaka City University, Japan

To investigate the effective ingredients of *Salvia miltiorrhizae* on anti-liver injury, the water soluble component of the above drug, magnesium lithospermate B, was used to conduct the experimental treatment of acute liver injury by D-galactosamine (10 mg/kg body weight, orally). The results showed that the component could obviously attenuate the necrosis of liver tissues, lower the activities of serum alanine amino transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST), $P < 0.05$. Compared with those of the normal rats, the levels of the products of cyclo-oxygenase (6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$, prostaglandin D_2 and total prostaglandins) in the metabolism of arachidonic acid in non-parenchymal cells of acute liver-injured rats were markedly decreased ($P < 0.05$). These data revealed that magnesium lithospermate B might be one of the main components of *Salvia miltiorrhizae* in anti-liver injury, while increasing the levels of total prostaglandins in liver non-parenchymal cells was perhaps one of the mechanisms of anti-liver injury.

Key words *Salvia miltiorrhizae*, magnesium lithospermate B, D-galactosamine, liver injury, prostaglandin

(Original article on page 352)

Effects of *Salvia Miltiorrhizae Compositae* on Phosphoinositides Metabolism of Acute Myocardial Ischemia

Tao Yue-Yu (陶月玉), et al

Navy No. 414 Hospital, Nanjing (210015)

The effects of *Salvia miltiorrhizae compositae* (SMC) on phosphoinositides metabolism of acute myocardial ischemia in rats were studied. The results showed that the function of the phosphoinositide signaling system was enhanced 10 min. after acute myocardial ischemia. Both of the accumulations of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) and inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) were higher than those of the non-ischemic control group ($P < 0.01$, $n=7$). The rise of the levels of PIP_2 and IP_3 caused by acute myocardial ischemia was remarkably inhibited by the SMC (2g/kg body wt.), and the levels of PIP_2 and IP_3 were lower than those of the ischemic group ($P < 0.01$, $n=7$).

Key words myocardium, ischemia, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, inositol-1,4,5-trisphosphate, *Salvia miltiorrhizae*

(Original article on page 354)