

## 蕊木宁对小鼠实验性肝损伤的保护作用

黄婉云<sup>1</sup>、刘耕陶 (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

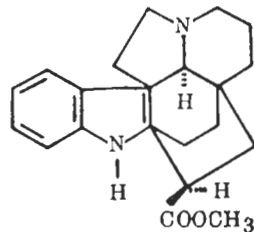
**提要** 蕊木宁系从云南蕊木提出的一种吲哚类生物碱。小鼠 ig 蕊木宁 200 mg/kg 对于醋氨酚、CCl<sub>4</sub>、硫代乙酰胺及泼尼松所致的肝损伤有显著的保护作用。血清转氨酶及肝细胞病理损伤均低于对照组。蕊木宁尚能促进部分切除肝脏小鼠的肝再生, 促进 [<sup>3</sup>H]Leu 参入再生肝蛋白质和 [<sup>3</sup>H]TdR 参入再生肝 DNA, 表明蕊木宁有保肝作用。

**关键词** 蕊木宁; 四氯化碳中毒; 醋氨酚; 中毒性肝炎; 肝再生; 部分肝切除; 肝功能

云南蕊木(*Kopsia officinalis* Tsiang et P. T. Li)为我国特有植物, 当地民间用其树皮煎水治水肿, 用果实和叶煎水治咽喉炎、扁桃腺炎、风湿骨痛和四肢麻木<sup>(1)</sup>。冯孝章等<sup>(2)</sup>从云南蕊木提取多种吲哚类生物碱, 蕊木宁(kopsinine)系其中之一。这类生物碱究竟有何药理作用, 国内外至今尚未见报道。为寻找治肝炎新药, 我们研究了蕊木宁对小鼠实验性肝损伤的保护作用及对小鼠肝再生和再生肝蛋白质和 DNA 生物合成的影响。

1987年10月19日收稿 1988年8月10日接受

<sup>1</sup> 重庆医科大学药理教研室进修教师, 重庆 630046



Kopsinine

### Materials and methods

昆明种小鼠, ♂, 体重  $21 \pm SD 0.9$  g。实验中一般每组 9 只, 断头处死, 取血及肝脏分别测定有关指标。

蕊木宁盐酸盐由本所植化室冯孝章提供, 蒸馏水配制。CCl<sub>4</sub> 溶于花生油。醋氨酚用蒸馏水配制, 稍加热溶解。 [<sup>3</sup>H]亮氨酸和 [<sup>3</sup>H]胸腺嘧啶核苷 ([<sup>3</sup>H]TdR) 由中国科学院原子能研究所供应。

血清谷丙转氨酶(SGPT)和谷草转氨酶(SGOT)按改良金氏法<sup>(3)</sup>测定。肝脏甘油三酯

采用简易快速法测定。醛缩酶按福林-酚<sup>(4)</sup>法测定。肝蛋白质、DNA, RNA的测定系用生理盐水制备10%肝匀浆,加入适量的10%三氯乙酸沉淀。670×g离心5 min,沉淀用Bloor氏液脱脂。60℃水浴15 min,1500×g离心5 min,沉淀中加入10%三氯乙酸4 ml,于60℃水浴中15 min,沉淀用NaOH 1 mol/L溶解后,用比色法<sup>(5)</sup>测蛋白质。上清部分用二苯胺试剂显色测DNA<sup>(6)</sup>,加Orcinol试剂测RNA<sup>(7)</sup>。 [<sup>3</sup>H]亮氨酸和 [<sup>3</sup>H]TdR 参入肝蛋白质和DNA实验中,肝脏用10%三氯乙酸制作成10%匀浆,分离程序及蛋白质和DNA的测定方法同前。取0.1 ml蛋白质溶解液及含DNA的上清液0.1 ml置于5 ml PPO-POPOP二氧六环闪烁液中,于Beckman闪烁仪计数cpm。

## Results

**对小鼠 CCl<sub>4</sub> 肝损伤的防治作用** 预防实验的小鼠分组后,给药组分别ig蕊木宁200 mg/kg×2,两次相隔约8 h,对照组给同容量生理盐水。末次给药16 h后,ip 0.1% CCl<sub>4</sub>-花生油10 ml/kg,禁食16 h后,取血和肝分别测定SGPT, SGOT及甘油三酯。治疗实验的小鼠ig 0.15% CCl<sub>4</sub>花生油10 ml/kg,隔天一次,共3次。于第一次服CCl<sub>4</sub>后当天

下午开始用蕊木宁200 mg/kg, qd×4,末次给药5 h后,测SGPT及甘油三酯。取小块肝组织用10%福尔马林固定作病理切片检查。结果列于Tab 1。

结果表明,提前24 h给蕊木宁200 mg/kg对CCl<sub>4</sub>引起的SGPT和SGOT升高均有显著的降低作用,100 mg/kg的作用不显著。因此,在以下的实验中,蕊木宁剂量均采用200 mg/kg。由于测定血标本数较多,只测定SGPT,未同时测SGOT。先用CCl<sub>4</sub>造成小鼠肝损伤后用蕊木宁治疗实验的结果表明,能显著降低SGPT水平。肝脏病理损伤如嗜酸性变、脂肪变性、炎症浸润及气球样变均比对照组轻。表明蕊木宁对CCl<sub>4</sub>肝损伤有保护作用,但对肝甘油三酯的蓄积没有拮抗作用。

### 对醋氨酚所致的小鼠肝损伤的保护作用

实验用小鼠两组。对照组给自来水。给药组ig蕊木宁200 mg/kg, bid×3。末次给药24 h后,两组小鼠均ip醋氨酚150 mg/kg,24 h后测SGPT和甘油三酯。肝脏留作病理切片检查。

如Tab 1所示,蕊木素对醋氨酚肝损伤小鼠的SGPT及肝甘油三酯均有显著的降低作用。肝脏病理损害亦减轻。

### 对硫代乙酰胺、泼尼松所致的小鼠肝损伤的影响

硫代乙酰胺实验组小鼠处理的方式与

Tab 1. Protective action of kopsinine against liver injury induced by CCl<sub>4</sub>, paracetamol, thioacetamide and prednisolone in mice.  $\bar{x} \pm SD$ . \* $P > 0.05$ . \*\* $P < 0.05$ . \*\*\* $P < 0.01$

Toxin	Kopsinine mg/kg ig	n	SGPT IU%	Liver triglyceride mg/g
CCl <sub>4</sub> 0.01 ml/kg ip	0	9	863±503	19±13
	100	8	479±153*	26±8*
	200	7	303±46***	21±9*
CCl <sub>4</sub> 0.015 ml/kg ig	0	10	1170±993	22±7
	200	9	403±41***	31±10*
Acetaminophen 150 mg/kg ip	0	9	4003±956	35±16
	200	12	1859±573***	22±12**
Thioacetamide 50 mg/kg ip	0	8	1563±403	68±57
	200	8	679±286***	21±18**
Prednisolone 20 mg/kg sc	0	10	708±150	41±16
	200	9	508±124**	37±19*

CCl<sub>4</sub> 实验相同。硫代乙酰胺剂量 50 mg/kg ip, 泼尼松损伤实验组蕊木宁剂量为 200 mg/kg, bid × 4, 对照组给予等容量蒸馏水。于实验 d 3 上午及 d 4 下午, 各组小鼠 sc 泼尼松 200 mg/kg, 末次注射 16 h 后测 SGPT 和肝甘油三酯。由 Tab 1 可见, 蕊木宁对硫代乙酰胺和泼尼松引起的 SGPT 升高均有明显的降低作用。对硫代乙酰胺引起的甘油三酯升高亦有一定降低作用。

**对正常小鼠血清及肝脏谷丙转氨酶和醛缩酶的影响** 实验的两组小鼠, 每组各 9 只。给药组 ig 蕊木宁 200 mg/kg, bid × 7。对照组给同容量蒸馏水。末次给药 16 h 后将小鼠处死, 取血。肝脏用冰冷的生理盐水制成 10% 肝匀浆, 取适量肝匀浆分别测定谷丙转氨酶和醛缩酶。另取血清 50 μl 测谷丙转氨酶。

结果表明, 蕊木宁 200 mg/kg 连续给药 7 d, 对肝脏 GPT、GOT 和醛缩酶以及血清 GPT 活性均无明显影响。

**蕊木宁与肝匀浆温孵对谷丙转氨酶活性的影响** 给 3 只小鼠 sc CCl<sub>4</sub> 50 μl/kg, 16 h 后将小鼠处死, 取小块肝组织用生理盐水制成 0.1% 肝匀浆。合并匀浆。另取正常小鼠 3 只用同样方式制备肝匀浆, 分别取两组的肝匀浆 50 μl 与蕊木宁 1 nmol/L 或生理盐水 50 μl, 37°C 温育 1 h, 测谷丙转氨酶活性的变化。

测定结果表明, 蕊木宁体外与肝匀浆温育对正常小鼠和 CCl<sub>4</sub> 中毒小鼠的肝 GPT 活性无影响。表明该化合物对肝谷丙转氨酶活性无直接抑制作用。

**对部分切除肝脏小鼠肝再生的影响** 小鼠在乙醚麻醉下切除 70% 左右的肝脏, 次日分组。给药组 ig 蕊木宁 200 mg/kg, qd × 3。对照组给予同容量蒸馏水。d 4 将小鼠处死。用生理盐水制成 0.1% 肝匀浆, 分别测定蛋白质、DNA 及 RNA。

[<sup>3</sup>H]亮氨酸和 [<sup>3</sup>H]TdR 参入再生肝蛋白质和 DNA 实验的方法同上。但蕊木宁连续给药 4 d, 末次给药 24 h 后, 每只小鼠 ip [<sup>3</sup>H]亮

Tab 2. Effect of kopsinine (200 mg/kg ig) on regenerating liver weight, protein and nucleic acids in partially hepatectomized mice, n = 10 mice, except 13 mice for liver weight,  $\bar{x} \pm SD$ . \*P > 0.05, \*\*\*P < 0.01

Assay	Control	Kopsinine
Liver wt (g/100 g body wt)	4.0 ± 0.6	4.8 ± 0.6*
Protein (mg/g liver)	102 ± 8	106 ± 11*
(mg/total liver)	385 ± 49	510 ± 100***
DNA (mg/g liver)	3.9 ± 0.6	4.0 ± 0.3*
(mg/total liver)	14.3 ± 2.2	19 ± 4***
RNA (mg/g liver)	23.4 ± 3.0	23.0 ± 3.3*
(mg/total liver)	87 ± 13	110 ± 20***

Tab 3. Effect of kopsinine on incorporation of [<sup>3</sup>H]Leu and [<sup>3</sup>H]TdR into liver protein and DNA, respectively in partially hepatectomized mice. n = 8,  $\bar{x} \pm SD$ . \*P > 0.05, \*\*P < 0.05, \*\*\*P < 0.01

	Control	Kopsinine
[ <sup>3</sup> H]Leu in protein		
cpm/mg	326 ± 28	377 ± 34*
10 <sup>-2</sup> × cpm/total	813 ± 70	1219 ± 11***
[ <sup>3</sup> H]Tdr in DNA		
cpm/mg	9518 ± 1050	12216 ± 1831**
10 <sup>-2</sup> × cpm/total	1219 ± 96	1879 ± 36***

氨酸 370 kBq 或 [<sup>3</sup>H]TdR 555 kBq, 16 h 后处死小鼠。将再生肝用 10% 三氯乙酸制成匀浆。测蛋白质和 DNA 中 cpm。

Tab 2, 3 的结果表明, 蕊木宁不仅使再生肝重量显著增加, 整个肝脏蛋白质和 DNA 及 RNA 含量亦明显增加。给药组 [<sup>3</sup>H]亮氨酸参入再生肝蛋白质的 cpm 比对照组高 49.2%。每毫克 DNA 和全肝中的 cpm 分别比对照组高 28.3 和 47.8%, 差异显著。

## Discussion

CCl<sub>4</sub> 经肝微粒体细胞色素 P-450 激活后生成 CCl<sub>3</sub>, 后者为自由基, 攻击肝细胞膜上磷脂分子, 引起脂质过氧化, 或与肝微粒体脂质和蛋白质发生共价结合, 破坏了肝细胞膜的结构与功能的完整, 蛋白质合成障碍, 甘油三酯蓄积, 胞浆中可溶性酶如转氨酶漏入血

浆<sup>(8)</sup>。醋氨酚剂量较大时其活性代谢产物生成量过多，肝内谷胱甘肽被耗竭，便与肝细胞蛋白质进行共价结合而导致肝坏死。泼尼松引起血清转氨酶升高的机理与上述的毒物不同，系诱导肝转氨酶蛋白质的生物合成增加的结果<sup>(9)</sup>。本文报告的结果表明，蕊木宁对以上的几种肝脏毒物所引起的血清转氨酶升高及肝组织损伤均有保护作用，并能促进肝再生及再生肝蛋白质和DNA的生物合成。蕊木宁对正常小鼠血清和肝脏转氨酶活性并无影响，体外直接温孵亦不抑制转氨酶活性。看来蕊木宁对肝脏小鼠的保护作用并非直接对血清和肝脏转氨酶活性有何直接影响。而可能系影响了肝微粒体细胞色素P-450对CCl<sub>4</sub>等毒物的代谢转换及其活性代谢物对肝细胞生物膜的损害。

### References

- 1 中国科学院植物志编辑委员会。中国植物志。北京：科学出版社 1977：41-3
- 2 Feng XZ, Kan C, Potier P, Kan SK, Lou-nasmaa M. Monomeric indole alkaloids from

*Kopisa officinalis*. *Planta Medica* 1983; 48 : 280

- 3 上海市立医学化验所主编。实用临床检验。上海：上海科学技术出版社 1965：401
- 4 Lowry OH, Roberts NR, Wu ML, Hixon WS, Crawford EJ. The quantitative histochemistry of brain. II Enzyme measurements. *J Biol Chem* 1954; 207 : 19
- 5 Lowry OH, Resebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Ibid* 1951; 193 : 265
- 6 Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 1956 : 62 : 315
- 7 Rowland GF. Simultaneous measurement of RNA, DNA and protein synthesis in mouse tumor and reticuloendothelial tissue slices using glucose-6-<sup>3</sup>H as a common precursor. *Cancer Research* 1969; 29 : 391
- 8 Perrisoud D, Festa B. Hepatic pharmacology: Mechanism of action and classification of antinecrotic hepatoprotective agents. *Trends Pharmacol Sci* 1982; 29 : 371
- 9 谭润生、杨其修、李士谔。3'-甲基-4-二甲氨基偶氮苯诱发大鼠肝癌及癌前期肝内谷丙转氨酶皮质激素诱导后活力的变化及其机制的研究。生物化学与生物物理学报 1965; 5 : 184

*Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Jan, 10 (1) : 65-68

## Protective action of kopsinine against experimental liver injuries in mice

HUANG Wan-Yun<sup>1</sup>, LIU Geng-Tao<sup>2</sup>

(Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

**ABSTRACT** Kopsinine is an indole alkaloid. Kopsinine 200 mg/kg ig significantly protected mice from liver injury induced by CCl<sub>4</sub>, paracetamol, thioacetamide and prednisolone. The elevated serum transaminase levels and liver lesions were reduced by kopsinine. In addition, kopsinine markedly promoted liver regeneration and the incorporation of [<sup>3</sup>H]TdR and [<sup>3</sup>H]leucine into liver protein and DNA, respectively, in partially hepatectomized mice. The

results indicate that kopsinine has a hepatoprotective action in mice.

**KEY WORDS** kopsinine; carbon tetrachloride poisoning; paracetamol; toxic hepatitis; liver regeneration; partial hepatectomy; liver function tests

<sup>1</sup>Now in Department of Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 630046

<sup>2</sup>To whom reprints requests should be addressed.