

阿魏酸钠减轻对乙酰氨基酚致小鼠肝损

汪晖, 彭仁秀 (湖北医科大学药理教研室, 武汉 430071, 中国)

R985.2

Sodium ferulate alleviated paracetamol-induced liver toxicity in mice

WANG Hui, PENG Ren-Xiu

(Department of Pharmacology, Hubei Medical University, Wuhan 430071, China)

ABSTRACT Sodium ferulate (SF) is one of the effective components of *Angelica sinensis* Diels. Pretreatment with SF ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig, qd $\times 10$ d) inhibited the activity of serum alanine aminotransferase, prevented the depletion of liver glycogen and glutathione, increased the liver homogenate and microsomal glutathione S-transferase activities, and reduced the malondialdehyde content, the membrane fluidity of liver microsome and the mitochondria in paracetamol ($130 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip)-induced liver toxicity in mice. These results demonstrated the hepatoprotective action of SF in mice.

KEY WORDS sodium ferulate; paracetamol; glutathione; glutathione transferases; malondialdehyde; membrane fluidity; liver microsomes; liver mitochondria

A

摘要 小鼠 ig 阿魏酸钠($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, qd $\times 10$ d)可减轻 ip 对乙酰氨基酚所致肝损, 使血清丙氨酸转氨酶活性下降, 肝糖原、谷胱甘肽含量回升、肝脏和肝微粒体谷胱甘肽 S-转移酶活性增加, 肝丙二醛含量减少以及膜表层流动性降低。说明阿魏酸钠对小鼠肝脏有保护作用。

关键词 阿魏酸钠; 对乙酰氨基酚; 谷胱甘肽; 谷胱甘肽转移酶类; 丙二醛; 膜流动性; 肝微粒体; 肝线粒体

阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)是当归(*Angelica sinensis* Diels)的有效单体成分, 有抗氧化, 抗自由基^[1,2], 抗血小板聚集作用^[3]。SF 对肝脏方面的药理作用, 尚未见报道。我

Received 1992-07-19

Accepted 1993-06-03

们曾证实 SF 能抑制 CCl_4 诱发的肝脂质过氧化^[4]。本文采用对乙酰氨基酚(paracetamol, Par, acetaminophen)肝损害的小鼠, 从多途径研究了 SF 对肝脏的保护作用。

MATERIALS AND METHODS

细胞色素 C、还原型辅酶 II (NADPH)、还原型谷胱甘肽(glutathione, reduced form, GSH)、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)、thio-barbituric acid (TBA) 及 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate (ANS) 均为 Sigma 产品。SF 为广东利民制药厂产品, 批号 8807182, 用时用生理盐水配制。Par 为山东济南药厂产品, 批号 890317。

小鼠¹ 昆明种 57 只, $20 \pm 2 \text{ g}$, 湖北省医科院提供。经 ig SF 0, 50, 100, 150 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, qd $\times 10$ d。末次给药时 ip Par $130 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 等容量生理盐水作对照, 3 h 后断头处死, 制备血清。另一批小鼠 80 只, 经给予 SF、Par 以及 SF 加 Par 后, 剥腹取肝, 每 3—4 只鼠肝合一标本, 用冰冷的 Tris-HCl $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 7.4) 制成 25% (wt:vol) 匀浆, 差速离心法^[5] 制备肝脏亚细胞组分, -80°C 保存。

在岛津 uv-3000 双波长双光束 uv 分光光度计上测细胞色素 P-450、 b_6 含量和 NADPH-细胞色素 C 还原酶活性。以 CDNB 为底物测谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)活性^[6]。改良金氏法测血清丙氨酸转氨酶(serum alanine transaminase, SALT)活性。酚试剂法测蛋白含量。蒽酮法测糖原含量。GSH 含量按 Ellman 法^[7] 测定。丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量用 TBA 比色法。以 ANS 为荧光探剂, 在岛津 RF-540 荧光分光光度计上测膜脂表层荧光强度^[8]。肝组织切片及电镜样品按常规方法。

RESULTS

SALT 活性和肝糖原含量 Par $130 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 使 SALT 活性增至正常对照组的 4.5 倍 ($P < 0.01$)。在量-效关系中, SF $50\text{--}200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

$\cdot \text{kg}^{-1}$ 使 SALT 降至 Par 组的 38—67%。其中以 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 作用为著，加大剂量不能进一步降低 SALT 活性 (Tab 1)。

Tab 1. Effect of ig sodium ferulate (SF, qd $\times 10$ d) on ip paracetamol (Par)-induced serum alanine transaminase (SALT) in mice. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$ vs control; ** $P < 0.05$; * $P < 0.01$ vs Par.**

Par $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	SF $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Mice	SALT/IU·L $^{-1}$
0	0	7	2370 ± 340
130	0	10	$10570 \pm 1020^{\text{a}}$
130	50	10	$5010 \pm 1410^{\text{a}}$
130	100	10	$3960 \pm 510^{\text{a}}$
130	150	10	$4680 \pm 1470^{\text{a}}$
130	200	10	$7070 \pm 3090^{\text{a}}$

Par 使正常对照组肝糖原含量由 11.3 ± 2.7 降至 $5.4 \pm 1.6 \text{ mg/g liver}$ ($P < 0.01$)，结果

与文献⁹相符。SF $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对正常小鼠肝糖原无影响，但能减轻 Par 所致肝糖原含量的降低，使糖原含量增至 $8.8 \pm 2.2 \text{ mg/g liver}$ ，接近正常。

肝 GST 活性、GSH 和 MDA 含量及膜流动性 Par $130 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 使肝脏和微粒体 GST 活性分别降至对照组的 75% 和 21% ($P < 0.01$)。SF $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能增加正常小鼠肝微粒体的 GST 活性 ($P < 0.01$)，并能减轻 Par 引起的肝脏和微粒体 GST 的变化，使其活性完全或部分恢复 ($P < 0.01$)。SF 本身对肝 GSH 含量无明显影响，经 SF 预处理后则有明显防止 Par 引起 GSH 耗竭 ($P < 0.01$) 和减少 Par 所引起肝微粒体、线粒体 MDA 含量增加的作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，使其皆接近对照组水平 (Tab 2)。SF 能增加正常小鼠肝微粒体和线粒体膜荧光强度，降低膜表层流动性。对 Par

Tab 2. Effects of sodium ferulate (SF) on liver glutathione S-transferase (GST), liver glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), fluidity of subcellular membrane, and liver cytochrome P-450 system components in paracetamol (Par)-treated mice. $n = 4-6$ samples of pooled 3—4 livers. $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs control; ^ $P > 0.05$, ^ $P < 0.05$, ^ $P < 0.01$ vs Par.**

Parameters	Control	SF	Par	SF + Par
GST, $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} / \text{g protein}$				
Liver	145 ± 12	$134 \pm 15^{\text{a}}$	$109 \pm 14^{\text{c}}$	$137 \pm 10^{\text{a}}$
Microsome	18.7 ± 1.7	$25.1 \pm 3.6^{\text{b}}$	$3.8 \pm 1.9^{\text{c}}$	$6.8 \pm 2.1^{\text{a}}$
GSH, mmol/g liver				
Liver	0.29 ± 0.10	$0.24 \pm 0.09^{\text{a}}$	$0.10 \pm 0.01^{\text{c}}$	$0.29 \pm 0.07^{\text{a}}$
MDA, $\mu\text{mol/g protein}$				
Microsome	0.199 ± 0.022	$0.251 \pm 0.093^{\text{a}}$	$0.254 \pm 0.053^{\text{b}}$	$0.177 \pm 0.022^{\text{a}}$
Mitochondria	0.139 ± 0.022	$0.150 \pm 0.020^{\text{a}}$	$0.186 \pm 0.019^{\text{c}}$	$0.161 \pm 0.026^{\text{a}}$
Fluorescence intensity				
Microsome	47.5 ± 2.7	$51.7 \pm 1.9^{\text{b}}$	$44.0 \pm 1.7^{\text{b}}$	$47.5 \pm 2.3^{\text{a}}$
Mitochondria	54.6 ± 2.5	$57.1 \pm 2.7^{\text{b}}$	$52.1 \pm 1.1^{\text{b}}$	$54.4 \pm 2.4^{\text{a}}$
Protein, $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$				
Microsome	15.0 ± 0.5	$16.9 \pm 1.7^{\text{b}}$	$13.4 \pm 0.9^{\text{c}}$	$17.0 \pm 3.4^{\text{a}}$
Cytochrome P-450, $\mu\text{mol/g protein}$				
Microsome	0.22 ± 0.04	$0.27 \pm 0.05^{\text{b}}$	$0.10 \pm 0.04^{\text{c}}$	$0.21 \pm 0.06^{\text{a}}$
NADPH-cytochrome C reductase, $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} / \text{g protein}$				
Microsome	142 ± 10	$134 \pm 8^{\text{a}}$	$96 \pm 6^{\text{c}}$	$123 \pm 10^{\text{a}}$
Cytochrome b₅, $\mu\text{mol/g protein}$				
Microsome	0.549 ± 0.023	$0.537 \pm 0.052^{\text{a}}$	$0.514 \pm 0.019^{\text{b}}$	$0.512 \pm 0.038^{\text{ad}}$

引起微粒体和线粒体膜荧光强度的降低, SF 则可使其恢复至正常水平 (Tab 2).

肝微粒体 P-450 酶系成分含量 与正常对照组相比, 小鼠 ip Par 3 h 后肝微粒体蛋白质、细胞色素 P-450、NADPH-细胞色素 C 还原酶和细胞色素 b₁ 水平均明显降低, SF 能增加小鼠肝微粒体蛋白质和 P-450 含量至正常对照组的 1.1 和 1.2 倍 ($P < 0.05$), 能减轻 Par 引起的微粒体蛋白质、P-450 和 NADPH-细胞色素 C 还原酶水平的变化, 对 b₁ 含量无明显影响 (Tab 2).

肝细胞形态 Par 组 (Fig 1-B, Plate 4) 肝小叶中心性坏死, 坏死区肝细胞核出现固缩、破裂或溶解, 线粒体固缩, 滑面内质网扩张, 粗面内质网数量减少, 核蛋白体不规则脱落, 糖原颗粒减少, 可见空泡; 经 SF 预处理后再给 Par (Fig 1-C, Plate 4) 则细胞形态与正常对照组 (Fig 1-A, Plate 4) 相似, 核等大等圆, 线粒体呈圆形或椭圆形, 双层膜结构完整, 粗面内质网丰富, 呈板层状排列, 并附有大量核蛋白体颗粒, 糖原颗粒丰富, 未见空泡.

DISCUSSION

大剂量 Par 可引起 GSH 耗竭, 此时 Par 经 P-450 酶系统代谢生成过量的 NAPQI (*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine) 与细胞内大分子相结合而致肝细胞破坏^[10]. 耗竭或增加肝 GSH 可加剧或减轻 Par 肝毒作用, 这一结果为干预 Par 肝毒性提出了一条有效的途径. 本实验显示, SF 本身并不引起肝 GSH 变化, 但对 Par 所致的 GSH 减少 SF 则有明显的逆转作用. 我们还观察到在 SF 有效地降 SALT 的剂量范围内都可看到这一效应 (资料未列出). 同时 SF 尚有不同程度恢复肝脏与肝微粒体 GST 活性的作用. 这些可能是 SF 有益的护肝作用的基础. SF 对 Par 减少肝微粒体蛋白和 P-450 含量以及降低依赖 NADPH-细胞色素 C 还原酶活性的作用也有逆转效果, 从理论上分析, 虽有由此致使 NAPQI 增加的可能性,

但其净效应 (net effect) 仍是 SF 具有的保护作用, 此点在组织学观察上得到证实.

脂质过氧化在 Par 引起细胞损害中所起的作用仍有争议, 而抗氧化剂如 Vit E 预处理后, 确可获得抗 Par 所致的肝毒作用^[11]. 文献报道, SF 也是抗氧化剂, 而本实验中也显示经 SF 预处理后 Par 不再使 MDA 含量增加.

本资料为阐明当归抗肝损害的有效成分提供了实验依据.

REFERENCES

- Ju HS, Li XJ, Zhao BJ, Hou JW, Han ZW, Xin WJ. Scavenging effects of sodium ferulate and 18 β -glycyrrhetic acid on oxygen free radicals. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11: 466-70.
- Yin ZZ, Wang JP, Xu LN. Effect of sodium ferulate on malondialdehyde production from platelets of rats. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7: 336-9.
- Yin ZZ, Zhang LY, Xu LN. The effect of dang-gui (*Angelica sinensis*) and its ingredient ferulic acid on rat platelet aggregation and release of 5-HT. *Acta Pharm Sin* 1980; 15: 321-6.
- Wang H, Peng RX. Protective effect of sodium ferulate on CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. *Acta Acad Med Hubei* 1992; 13: 147-50.
- Lei SB, Peng RX. Subcellular distribution of glutathione S-transferase in Chinese fetal liver. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11: 389-91.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-9.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-7.
- Qi SP, Liu CM, Zhang JJ, Wu RQ. The effect of the derivatives of the component of Radix Paeoniae Rubra on the fluidity of mitochondrial membrane by fluorescence probes. *Acta Biochim Biophys Sin* 1986; 18: 246-51.
- Hinson JA, Mays JB, Cameron AM. Acetaminophen-induced hepatic glycogen depletion and hyperglycemia in mice. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 1979-88.
- Dahl DC, Miwa GT, Lu AYH, Nelson SD. *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine: A cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1327-1331.
- Black M. Acetaminophen hepatotoxicity. *Annu Rev Med* 1984; 35: 577-93.