

蒙药槟榔十三味丸(高尤-13) 对慢性应激抑郁模型大鼠肝肾毒性的影响

佟海英¹ 范盎然² 李婧³ 乌吉斯古冷⁴ 张月² 张少乾² 于雪² 呼日乐巴根³ 陈潮光²

(1 北京中医药大学 民族医药学研究所 北京 100029; 2 北京中医药大学 基础医学院 北京 100029;
3 内蒙古医科大学 蒙医药学院 呼和浩特 010110; 4 内蒙古国际蒙医医院 呼和浩特 010020)

摘要 为观察槟榔十三味丸(高尤-13)对慢性应激抑郁模型大鼠肝肾毒性的影响,随机将48只Wistar雄性大鼠根据蔗糖水消耗量分为6组:槟榔十三味丸低、中、高剂量组(0.25、0.5、1.0 g·kg⁻¹)、氟西汀组(3.3 mg·kg⁻¹)、模型组和正常对照组,每组8只。除正常对照组外,其余大鼠均采用慢性轻度不可预见性应激结合孤养方法制备抑郁模型,造模同时灌胃给药,每日1次,连续给药28 d后,检测大鼠血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素(UREA)、肌酐(CREA)含量,HE染色法观察肝肾组织形态学变化。结果显示:模型组大鼠较正常对照组血清ALT含量显著升高($P < 0.01$)。肝细胞轻度肿胀、变性,肝窦狭窄,细胞界限不清($P < 0.05$)。槟榔十三味丸低、中、高剂量组较模型组血清ALT含量显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。给药各组与氟西汀组大鼠的肝脏未见与药物相关的毒性病变($P > 0.05$)。各组大鼠血清AST、UREA、CREA含量无显著差异,肾脏病理变化不显著($P > 0.05$)。说明槟榔十三味丸对慢性应激抑郁模型大鼠无肝肾毒性,并具有肝损伤修复作用。

关键词 槟榔十三味丸; 抑郁症; 肝肾功能; 肝肾病理变化

中图分类号 Q956; R965.3 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)03-0057-04

Effect of Mongolian Betel Shisanwei Ingredients Pill (Gao-You-13) on Liver and Kidney Toxicity of Chronic Stress Depression Model Rats

Tong Haiying¹, Fan Angran², Li Jing³, Wujisiguleng⁴, Zhang Yue²,
Zhang Shaoqian², Yu Xue², Hurilebagen³, Chen Chaoguang²

(1 Institute of Ethnic Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 School of Basic Medical Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3 College of Mongolian Medicine and Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 4 Inner Mongolia International Mongolian Medicine Hospital, Hohhot 010020, China)

Abstract In order to observe the effects of Betel Shisanwei ingredients pill (Gao-You-13) on the liver and kidney toxicity of chronic stress depression model rats, 48 male Wistar rats were randomly divided into six groups according to the sugar consumption test (8 rats in each group): low, medium and high dose group (0.25, 0.5, 1.0 g·kg⁻¹) of Gao-You-13 group, fluoxetine group (3.3 mg·kg⁻¹), model group and normal control. Each group was treated with the chronic unpredictable mild stress stimulation under separation except the normal control group. Meanwhile, the rats were given the drugs once daily for 28 days. Then the contents of ALT, AST, UREA and CREA in rats' serum were tested. The liver and kidney tissue morphological changes were observed by HE staining. The results showed that compared with the normal control, ALT levels in model group increased significantly ($P < 0.01$) and most liver cells appeared mild swelling and degeneration, hepatic sinus narrowed, cell boundaries were unclear ($P < 0.05$); while ALT levels in Gao-You-13 group decreased significantly compared with the model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Drug related toxicity lesions did not appear in Gao-You-13 and fluoxetine treatment group ($P > 0.05$). AST, UREA, CREA contents and kidney pathological changes did not show significant differences in each group ($P > 0.05$). It was confirmed that Gao-You-13 could repair liver damages without liver and kidney toxicity for the chronic stress depression model rats.

Keywords Betel Shisanwei ingredients pill; depression; hepatorenal function; liver and kidney pathological changes

收稿日期 2016-12-20

作者简介 佟海英(1976-),女,主任医师,副研究员,博士,研究方向:蒙药基本理论与临床应用,E-mail: haiyingtong@sohu.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81202998)

槟榔十三味丸(高尤-13)源自19世纪蒙医方剂学经典著作《蒙医金匱》(又名方海),由槟榔、肉豆蔻、沉香、当归、木香、草乌(制)、葶苈、紫硃砂、葶苈子、丁香、广枣、干姜、胡椒等13味药组成^[1]。本方能够调节赫依、安神止痛,用于心悸、失眠、精神失常、游走刺痛等症^[2]。目前临床常用槟榔十三味丸治疗抑郁症,疗效甚佳^[3]。本课题组发现该方在小鼠强迫游泳、悬尾、利血平拮抗抑郁模型实验中,具有确切的抗抑郁作用^[4]。槟榔十三味丸对慢性应激致抑郁模型大鼠行为学、海马和额叶皮层5-HT、NE、DA等单胺类神经递质,以及下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)和AC-cAMP-PKA信号通路也具有显著的改善作用^[5-7]。通过上述研究,明确了该方治疗抑郁症的确切疗效以及部分机制。但槟榔十三味丸中含有毒性药材草乌(制)以及矿物药紫硃砂,在临床长期应用后是否产生肝肾毒性等尚不清楚。故本文观察了槟榔十三味丸对慢性应激抑郁模型大鼠肾功能以及肝肾组织形态学的影响,初步探讨该方的肝肾毒性,为临床长期安全用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

槟榔十三味丸[槟榔60g,沉香120g,肉豆蔻60g,丁香48g,木香36g,广枣60g,草乌(制)60g,干姜42g,葶苈42g,胡椒42g,紫硃砂30g,当归60g,葶苈子60g,内蒙古蒙药股份有限公司,批号120805,国药准字Z15020412];羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂,批号20120330);盐酸氟西汀分散片(Patheon France,批号2076A);蔗糖(北京化工厂,批号20110303)。肌酐(CREA)测定试剂盒、尿素(UREA)测定试剂盒、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒、谷草转氨酶(AST)试剂盒(中生北控生物科技)。

48只180~200g清洁级Wistar雄性大鼠[北京斯贝福实验动物科学技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2011-0004],SPF级动物房饲养,室温20~22℃(除冷热刺激)自由摄食和饮水(除造模过程中禁食禁水),60%~70%相对湿度,12h光照周期,7:00~19:00光照,19:00~7:00黑暗(昼夜颠倒刺激除外)。

半自动生化分析仪(Microlab300,荷兰威图科

学公司),1/10万电子天平(ES125SM,瑞士precisa),电子天平(常熟市双杰测试仪器厂),离心机(Sigma公司)。

1.2 分组和给药

Wistar雄性大鼠适应性喂养7d后禁水24h,给予1%蔗糖水,测1h内的消耗量,依据蔗糖水消耗量随机分为6组:槟榔十三味丸低、中、高剂量(0.25,0.5,1.0g·kg⁻¹·d⁻¹)组、氟西汀组(3.3mg·kg⁻¹·d⁻¹)、模型组和正常对照组(灌胃0.5%CMC-Na),每组8只。除正常对照组每笼4只外其他各组孤养,按10mL·kg⁻¹连续给药28d。

1.3 制备模型

参照文献[8-10]并改良建立慢性轻度不可预见性应激(CUMS)结合孤养模型,除正常对照组外各组大鼠共接受刺激28d,包括禁食禁水24h,昼夜颠倒24h,4℃冰水游泳5min,45℃热环境5min,夹尾1min,电击足底(电压36V,1min刺激1次,每次10s,共30次)。

1.4 肝肾功能检测

禁食禁水24h后处死大鼠,用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,腹主动脉采血8~10mL,室温下放置1h后,4℃3000r·min⁻¹离心10min,分离血清,按照试剂盒说明书测定血清ALT、AST、UREA和CREA含量。

1.5 肝肾组织形态学

取大鼠同一部位肝组织和同侧的肾组织,福尔马林固定后用石蜡包埋,切片4μm再HE染色,光镜下观察肝肾组织病理变化。

1.6 统计学处理

采用SPSS 19.0分析统计数据,单因素方差分析法进行组间比较,非参数秩和检验比较肝肾组织形态学检测组间差异, $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结果

2.1 槟榔十三味丸对大鼠肝肾功能的影响

槟榔十三味丸对大鼠肝肾功能的影响结果见表1。由表1可知:应激处理后第28d,模型组大鼠血清ALT含量较正常组显著升高($P < 0.01$);槟榔十三味丸低、中、高剂量组血清ALT含量较模型组显著降低($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);各组大鼠血清AST、CREA、UREA含量无显著差异($P > 0.05$)。

表1 槟榔十三味丸对大鼠肾功能相关生化指标变化的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

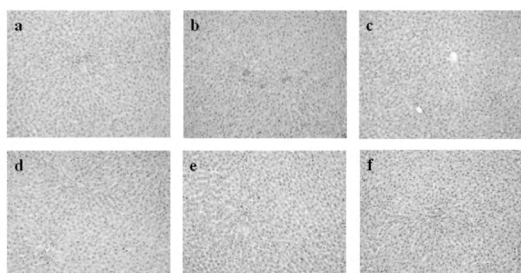
Tab.1 Effects of Betel Shisanwei ingredients pill on liver and kidney function-related biochemical indexes in rats

组别	剂量/ ($g \cdot kg^{-1}$)	ALT 含量/ ($U \cdot L^{-1}$)	AST 含量/ ($U \cdot L^{-1}$)	c(CREA) / ($\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$)	c(UREA) / ($\text{mmoL} \cdot L^{-1}$)
正常对照组	-	29.16 ± 6.79	129.33 ± 30.66	45.13 ± 5.22	5.16 ± 0.53
模型组	-	40.90 ± 8.79**	146.11 ± 31.02	44.16 ± 6.49	5.13 ± 0.85
氟西汀组	0.0033	35.22 ± 8.55	129.94 ± 30.09	43.15 ± 5.52	4.56 ± 0.36
槟榔十三味丸低剂量	0.25	30.75 ± 9.62▲	137.51 ± 26.66	46.00 ± 5.68	4.66 ± 0.38
槟榔十三味丸中剂量	0.5	27.20 ± 5.96▲▲	127.70 ± 19.44	44.94 ± 7.05	4.61 ± 0.50
槟榔十三味丸高剂量	1.0	30.63 ± 6.89▲	128.72 ± 23.42	45.18 ± 6.02	4.69 ± 0.88

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

2.2 槟榔十三味丸对大鼠肝肾组织形态学的影响

槟榔十三味丸对大鼠肝组织形态学的影响结果见图1。由图1可见,正常对照组除个别动物(4号动物)汇管区多发灶状炎症细胞浸润外,均未见肝细胞肿胀、变性和坏死,肝小叶结构完整,肝细胞呈放射状围绕中央静脉排列,间质未见炎症细胞浸润,组织结构正常;模型组大部分动物(7/8只)的肝细胞轻度肿胀、变性,肝窦狭窄,细胞界限不清,个别动物(1/8只)肝组织结构正常,未见明显病变,较正常组有显著性差异($P = 0.019 < 0.05$);氟西汀以及槟榔十三味丸给药各组的肝脏未见与药物相关的毒性病变($P > 0.05$)。



a) 正常对照组; b) 模型组; c) 氟西汀组;
d~f) 槟榔十三味丸低、中、高剂量组

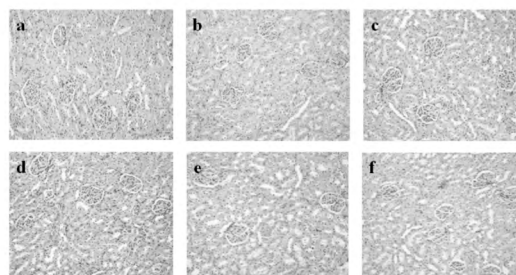
图1 各组大鼠肝脏组织病理结果(HE × 200)

Fig.1 Pathological results of rat liver tissue in each group (HE × 200)

槟榔十三味丸对大鼠肾组织形态学的影响结果见图2。由图2可见,正常对照组动物肾小球和肾小管未见明显病变,组织结构正常;模型组动物除个别动物(8号动物)肾间质灶状炎症细胞浸润外,其余动物肾小球、肾小管未见明显病变,组织结构正常($P > 0.05$);氟西汀以及槟榔十三味丸给药各组的肾组织未见明显病变($P > 0.05$)。

3 讨论

目前广泛应用 CUMS 结合孤养建立大鼠抑郁模型,研究抑郁症发病机制和抗抑郁药物作用机



a) 正常对照组; b) 模型组; c) 氟西汀组;
d~f) 槟榔十三味丸低、中、高剂量组

图2 各组大鼠肾脏组织病理结果(HE × 200)

Fig.2 Pathological results of rat renal tissue in each group (HE × 200)

制^[11]。文中实验大鼠通过敞箱、蔗糖水消耗等行为学实验,基本模拟了抑郁症的临床表现,造模成功,给予药物槟榔十三味丸和氟西汀治疗有效地改善了其抑郁症状^[12]。本文重点关注该方的肝肾毒性,以ALT、AST、UREA、CREA 4个反映肝肾功能的生化指标为毒性评价指标,并结合组织形态学观察。实验结果表明:模型组大鼠血清ALT含量较正常组显著升高,给予槟榔十三味丸后,各剂量组ALT较模型组显著降低,其余指标无显著差异。

ALT、AST是临床上常用来反映肝功能的酶学指标,是检测肝功能受损的首选指标。ALT主要存在于肝细胞浆,1%的肝细胞坏死能使血清中ALT活力增加1倍^[13]。AST在肝细胞浆内仅占20%,其余80%存在于线粒体中,当肝细胞严重病变、坏死时,线粒体内AST便释放出来^[14]。本实验结果显示:模型组大鼠血清中ALT的含量显著升高,同时肝组织形态学显示,其大部分动物(7/8只)的肝细胞轻度肿胀、变性,肝窦狭窄,细胞界限不清。因此CUMS结合孤养诱导的抑郁模型能损害大鼠的肝脏功能,在28d模型中,尤其对ALT的影响更显著。王国力等^[15]经CUMS造模28d后,大鼠血清ALT、AST含量显著升高,肝组织切片HE染色显示,大鼠中央静脉扩张,肝细胞中度水肿,肝细胞体积明显增大,局部胞浆内可见凋亡细胞,肝血窦受压明显变窄,汇管

区血管扩张明显,中等量炎细胞浸润,纤维组织增生。本实验中,仅ALT显著升高,AST和肝组织病理学变化不显著,由于AST在肝脏发生严重破坏或坏死时会显著升高,故本结果的不同与大鼠种类、造模方法、刺激强度、检测方法等有关。经槟榔十三味丸干预后,ALT含量下降,组织形态学结果也进一步证实了其对肝功能的修复作用,与本方中肉豆蔻^[16]、当归^[17]、葶苈^[18]、干姜^[19]、胡椒^[20]等的保肝作用以及木香^[21]的利胆作用有关,充分体现了经典名方安全有效的合理性,值得深入研究。阳性药氟西汀对大鼠的肝功能未产生显著影响。

CREA和UREA是常用的肾功能评价指标,本实验结果显示:CUMS结合孤养诱导的抑郁模型对大鼠肾功能无显著影响,模型组动物除个别动物肾间质灶状炎症细胞浸润外,其余动物肾小球、肾小管未见明显病变,组织结构正常。经槟榔十三味丸干预后,大鼠肾功能和组织形态学未见显著变化,说明槟榔十三味丸对抑郁模型大鼠肾功能无显著的毒性作用。

综上,大鼠经CUMS结合孤养建立抑郁模型后,大鼠血清ALT含量显著升高,肝细胞轻度肿胀、变性,肝窦缩窄,细胞界限不清。槟榔十三味丸能降低ALT的升高,对肾脏无显著影响,亦无肝肾毒性,并具有肝损伤修复作用,故为该复方的临床长期安全应用提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] 占布拉却吉丹森普日勒. 蒙医金匱(蒙文版)[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1977:6.
- [2] 内蒙古自治区卫生厅. 内蒙古蒙成药标准[S]. 赤峰:内蒙古科学技术出版社,1984:354-355.
- [3] 萨仁图雅,孟根,乌仁其木格. 蒙西医结合诊治精神疾病[J]. 中国蒙医药,2006,2(4):49-54.
- [4] 佟海英,王大伟,王斌,等. 槟榔十三味丸对小鼠抗抑郁作用的实验研究[J]. 中国民族医药杂志,2011,17(2):49-52.
- [5] 佟海英,乌吉斯古冷,白亮凤,等. 蒙药槟榔十三味丸(高尤-13)对抑郁模型大鼠神经-内分泌-免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):194-198.
- [6] 佟海英,莲花,高玉峰,等. 槟榔十三味丸对慢性应激抑郁模型大鼠行为学及下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响观察[J]. 中南民族大学学报(自然科学版),2012,31(1):42-46.
- [7] 佟海英,乌吉斯古冷,白亮凤,等. 槟榔十三味丸对抑郁模型大鼠海马和前额叶皮层AC-cAMP-PKA信号通路的影响[J]. 中国中药杂志,2014,39(10):1946-1949.
- [8] Kaye J, Morton J, Bowcutt M, et al. Stress, depression and psychoneuroimmunology[J]. J Neurosci Nurs, 2000, 32(2):93-100.
- [9] 王建醒,周丽,徐华锋,等. 慢性应激大鼠抑郁模型的建立及其评价[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2006,27(6):644-646.
- [10] Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation[J]. Psychopharmacology, 1997, 134(4):319-329.
- [11] Mao Q Q, Xian Y F, Ip SP, et al. Long-term treatment with peony glycosides reverses chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior via increasing expression of neurotrophins in rat brain. [J]. Behav Brain Res, 2010, 210(2):171-177.
- [12] 乌吉斯古冷,佟海英,斯日古楞,等. 蒙药槟榔十三味丸(高尤-13)对慢性应激抑郁大鼠行为学及海马神经元凋亡的影响实验研究[J]. 中医学报,2014,29(193):759-762.
- [13] 俸家富,涂植光. 肝功能相关的血清酶学研究进展[J]. 医学综述,2007,13(3):225-230.
- [14] 孙志强,毛远丽. 肝病酶学指标及临床应用进展[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(6):659-663.
- [15] 王国力. 慢性应激诱发抑郁大鼠肝实质损伤机制及疏肝中药的保护作用[D]. 北京:北京中医药大学,2016:32-34.
- [16] 李德智,吕友权,吕喜涛,等. 肉豆蔻乙醇提取物对D-氨基半乳糖中毒大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 吉林工程技术师范学院学报(工程技术版),2003,19(6):41-45.
- [17] 李青,邓长生,朱尤庆,等. 当归注射液对实验性大鼠肝纤维化的防治作用[J]. 医药导报,2000,19(2):110.
- [18] 昭日格图,白朝鲁门,博格日勒图,等. 葶苈宁对小鼠酒精性脂肪肝的预防作用[J]. 食品科学,2014,35(13):232-235.
- [19] 张竹心,刘连生,王贵林. 生姜油对肝损害的保护作用[J]. 中成药,1989,11(8):25-26.
- [20] Koul I B, Kapil A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers[J]. Planta Med, 1993, 59(5):413-417.
- [21] 邵芸,黄芳,王强,等. 木香醇提取物的抗炎利胆作用[J]. 江苏药学与临床研究,2005,13(4):5-6.