药 学 文章编号:0253-3626(2009)02-0212-04

# 大黄和泽泻提取物对二甘醇致小鼠肝脏损伤的保护作用

朱深银[1],周远大[1],杜冠华[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院临床药理研究室,重庆 400016;2. 中国协和医科大学 & 中国医学科学院药物研究所,北京 100050)

【摘 要】目的:考察大黄和泽泻提取物对二甘醇(Diethylene glycol,DEG)致肝脏损伤的保护作用,并探讨其作用机制。方法:采用 DEG(18.7 ml/kg,ig)造成小鼠肝脏损伤模型。大黄醇提物 0.8 及 0.4 g/kg、大黄水提物 0.8 及 0.4 g/kg 和泽泻醇提物 3.6 及 1.8 g/kg 连续灌胃给药 4 d,第 5 d DEG 染毒造模后 1 h,再分别灌胃给药 1 次,染毒 24 h 后观察小鼠中毒表现;测定血清中丙氨酸基转移酶(Alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase,AST)、总胆红素(Total billirubin,TBIL)水平;取肝脏制备匀浆,测定超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化酶活性(Glutathion peroxidase,GSH-PX)、丙二醛含量(Malondialdehyde,MDA)变化。结果:小鼠二甘醇染毒后,出现明显中毒表现,肝脏体重比增加,血清中 ALT、AST 和 TBIL 水平显著升高,肝组织 SOD 和 GSH-PX 活性降低、MDA 含量增加;大黄醇提物、大黄水提物和泽泻醇提取物给药组小鼠中毒表现明显减轻,肝脏体重比减少,血清中 ALT、AST 和 TBIL 水平明显降低,肝组织 SOD 和 GSH-PX 活性升高、MDA 含量降低。结论:大黄和泽泻提取物对 DEG 所致的小鼠急性肝脏损伤具有明显的保护作用,该作用与其改善肝脏抗氧化酶活性及抑制脂质过氧化反应有关。

【关键词】二甘醇;肝脏损伤;大黄;泽泻;脂质过氧化

【中国图书分类法分类号】R965.4,R282.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-13

# Protective effect of extract from rhubarb and alismae rhizome on acute liver injury induced by diethylene glycol

*ZHU Shen-yin, et al*

(*Department of Clinical Pharmacology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore protective effect of extract from rhubarb and alismae rhizome on acute liver injury induced by diethylene glycol (DEG) and its mechanism. *Methods*: Animal model of acute liver injury induced by DEG (18.7 ml/kg) was applied to investigate the protective effect of extract from rhubarb and alismae rhizome. Mice were administered intragastrically with n-butanol extract from rhubarb 0.8 and 0.4 g/kg, aqueous extract from rhubarb 0.8 and 0.4 g/kg and ethanol extract from alismae rhizome 3.6 and 1.8 g/kg for 4 days, respectively. DEG(18.7 ml/kg) was administered intragastrically to the mice 1 hour before extract from rhubarb and alismae rhizome administration on day 5. The manifestation of the poisoned mice were observed, the serum was prepared and the mice were then sacrificed after ig DEG for 24 h. The contents of ALT, AST and TBIL in serum of mice were assayed, and the liver tissues were collected and the homogenate was prepared, the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase(GSH-PX) and the contents of malonaldehyde(MDA) in liver homogenate were also detected. *Results*: After the administration of DEG, the poisoned manifestations of the mice were obviously visible, the ratio of liver to body weight increased, the contents of ALT, AST and TBIL in serum significantly increased, the activities of SOD and GSH-PX in liver homogenate decreased, and the contents of MDA in liver homogenate increased. Compared with that in DEG model group, in extract from rhubarb and alismae rhizome treatment groups, the poisoned manifestations were obviously relieved, the ratio of liver to body weight decreased, the contents of ALT and AST and TBIL significantly lowered, the activities of SOD and GSH-PX were also markedly improved and the contents of MDA significantly decreased. *Conclusion*: DEG can obviously damage liver, but extracts from rhubarb and alismae rhizome have an obvious protective effect against DEG-induced acute liver injury, and the protection role is related to the improvement of antioxidation enzyme activities and suppression of lipid peroxidation.

【Key words】Diethylene glycol; Liver injury; Rhubarb; Alismae rhizome; Lipid peroxidation

**作者介绍**:朱深银(1971- ),男,讲师,博士,研究方向:新药发现和评价,临床药学。

**基金项目**:国家高新技术研究发展计划(863 计划);重大专项项目(2004AA273782)。

二甘醇(Diethylene glycol,DEG),又称乙二醇醚或二乙二醇醚,因其具有独特的物理和化学性能,常作为有机溶剂、增塑剂、防冻剂、脱水剂、润滑剂、软化剂、整理剂,而广泛应用于石油化工、橡胶、塑料、

树脂、纺织、涂料、粘合剂、制药及精细化工等行业；同时在日用化学品如化妆品、牙膏等作为保湿剂和酒类生产中作为调味剂也有应用[1,2]。二甘醇为无色、无嗅、味略甜的粘稠液体，其理化性质与丙二醇、丙三醇极其相似，常被不法制药企业作为丙二醇或丙三醇的替代品，作为药物制剂辅料，但其毒性远大于丙二醇或丙三醇，不能供药用[3]。二甘醇中毒悲剧事件时有发生，主要发生在包括我国等发展中国家，其毒性主要表现为神经毒性（中枢和外周急性脱髓鞘）、肝毒性及肾毒性（水肿性坏死），还表现有胰腺、心肌毒性，而以肾毒性（急性肾功能衰竭）为主要表现，是导致死亡的原因[3-5]。目前二甘醇中毒尚无有效的防治药物，因此，发现并开发能够防治 DEG 损伤的药物具有现实意义。

我国传统的中医药对许多毒物引起的机体中毒具有明显的防治作用，常采用泻热通肠、凉血解毒、利水渗湿等治法。现代医学研究表明，中药大黄具有通便泻下、保肝利胆、促进血液凝固、降血脂、抑制病原体生长、利尿、抗肿瘤、解热抗炎镇痛等作用[6,7]；泽泻具有抗血栓形成、降低血脂、降低血浆黏度、抑制动脉粥样硬化斑块形成、利尿、解痉、保肝、抗炎、免疫调节、降血糖等作用[8]。二者发挥功效的物质基础即化学成分部分已明确[6-8]。前文已报道了 DEG 致肾脏的损伤作用及大黄和泽泻提取物对肾脏损伤的保护作用（待刊出），本文探讨 DEG 对肝脏的损伤作用，以大黄和泽泻作为干预药物，考察其提取物对 DEG 造成的急性肝脏损伤的防治作用，为二甘醇肝脏中毒的药物干预提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康清洁级 KM 小鼠 80 只，雌雄各半，体重（20 ± 2）g，由中国协和医科大学实验动物研究所提供。实验前饲养 3 d 以适应环境。在 21 ~ 25℃，12 h 白天 12 h 夜晚光照周期条件下常规饲养，自由进食进水。

### 1.2 大黄和泽泻提取物的制备

大黄（Radix et Rhizoma Rhei）和泽泻（Rhizoma Alismatis）药材于 2004 年 4 月购自北京同仁堂药店，大黄为甘肃产，泽泻为福建产。提取前将其粉碎成粗粉待用。

1.2.1 大黄醇提物及水提物制备 将大黄粗粉先用 95% 乙醇回流提取 2 次，每次 1 h，合并滤液，过滤，减压浓缩得到深褐色糖浆状浸膏，浸膏得率为 33.4%。然后将浸膏用正丁醇萃取 3 次，萃取液浓缩得到大黄的正丁醇提取物，其中脂溶性蒽醌含量为 5.32 mg/g。萃取后的水层干燥得大黄水提物，其中水溶性蒽苷含量为 7.92 mg/g。脂溶性蒽醌和水溶性蒽苷含量测定为高效液相色谱法。

1.2.2 泽泻醇提物的制备 将泽泻粗粉先用 80% 乙醇回流提取 2 次，每次 1 h，合并滤液，过滤，减压浓缩得到深褐色糖浆状提取物，该样品得率为 17.79%，其中泽泻醇 B-23 乙酸酯的含量为 5.86 mg/g。

### 1.3 试剂与主要仪器

DEG 由 J&K Chemical 公司提供。大黄水提物、大黄醇提物、泽泻醇提物：中国协和医科大学 & 中国医学科学院药物研究所国家药物筛选中心提供，使用时以 1% 羧甲基纤维素钠配成均匀的混悬液。丙氨酸基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、TBIL、MDA、SOD、GSH-PX 测试试剂盒：南京建成生物工程研究所产品。M5 *microplate reader*：美国 MD 公司生产。

### 1.4 药物处理及小鼠二甘醇肝脏损伤模型制备

选取具有利尿渗湿功效的大黄水提物、大黄醇提物、泽泻醇提物作为干预药物。将 80 只小鼠随机平均分为 8 组：正常对照组、模型对照组（二甘醇 18.7 ml/kg）、大黄水提物大剂量组（0.8 g/kg）、大黄水提物小剂量组（0.4 g/kg）、大黄醇提物大剂量组（0.8 g/kg）、大黄醇提物小剂量组（0.4 g/kg）、泽泻醇提物大剂量组（3.6 g/kg）与泽泻醇提物小剂量组（1.8 g/kg）共八组，每组 10 只动物。药物处理组连续灌胃给药 4 d，d 5 灌胃给予二甘醇 18.7 ml/kg 1 次（预实验得，小鼠 DEG 单次灌胃给药 LD50 为 23.41 ml/kg，DEG 18.7 ml/kg 小鼠灌胃 24 h 内无死亡，而血 ALT、AST、TBIL 明显增加），制备二甘醇肝脏损伤模型，1 h 后再给 1 次相应药物，对照组只给予等体积溶媒。观察 24 h 内小鼠中毒表现、死亡情况。实验结束脱臼处死小鼠，取肝脏，称重，并肉眼观察肝脏大体变化。

### 1.5 血清 ALT、AST、TBIL 浓度测定

二甘醇肝脏损伤 24 h 后，眼眶取血，制备血清，用 ALT、AST、TBIL 测定试剂盒按照试剂盒测定说明书测定其血清浓度。

### 1.6 肝组织蛋白定量及 MDA、SOD、GSP-PX 含量或活性测定

取约 100 mg 肝组织，用中性磷酸盐缓冲液制备 10% 组织匀浆。用 Bradford 方法测定组织蛋白质含量；用 MDA、SOD、GSP-PX 测定试剂盒按照试剂盒测定说明书测定其含量或活性。

### 1.7 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，全部数据用 SPSS 11.5 统计软件进行处理，各组间比较采用单因素方差分析及 LSD 或 Dunnett's 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 大黄和泽泻提取物对 DEG 中毒表现及肝脏体重比的影响

小鼠二甘醇染毒后，表现为活动明显减少、倦缩、毛色失去光泽、肢体无力、步态不稳、呼吸困难，中毒严重的表现为萎靡，出现旋转、惊厥、抽搐、甚至

死亡；活体解剖见肝脏充血肿大。大黄醇提物、大黄水提物和泽泻醇提取物组小鼠中毒表现明显减轻，活体解剖肝脏充血肿大明显减轻。与正常对照组比较，模型组肝脏体重比显著增加（$P<0.01$）；大黄水提物、醇提物和泽泻醇提物给药组与模型组比较，肝脏体重比明显降低（$P<0.01$ 或 0.05），结果见表 1。

**表 1 大黄和泽泻提取物对 DEG 中毒小鼠肝脏体重比的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）**

| 组别 | 剂量（g/kg） | 肝脏体重比（g/10g） |
|---|---|---|
| 对照组 | - | 0.45 ± 0.05 |
| 模型组 | - | 0.57 ± 0.06## |
| 大黄水提物组 | 0.8 | 0.50 ± 0.07* |
| | 0.4 | 0.52 ± 0.08 |
| 大黄醇提物组 | 0.8 | 0.47 ± 0.05** |
| | 0.4 | 0.50 ± 0.09* |
| 泽泻醇提物组 | 3.6 | 0.48 ± 0.05** |
| | 1.8 | 0.50 ± 0.04* |

注：#$P<0.05$，##$P<0.01$ 与对照组比较；*$P<0.05$，**$P<0.01$，与模型组比较

### 2.2 大黄和泽泻提取物对 DEG 损伤小鼠血清 ALT、AST 和 TBIL 的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠血清 ALT、AST、TBIL 显著升高；与模型组比较，大黄醇提物、大黄水提物和泽泻醇提取物给药组血清 ALT、AST、TBIL 显著降低，提示大黄和泽泻提取物能改善二甘醇诱发的肝功能损伤，结果见表 2。

### 2.3 大黄和泽泻提取物对 DEG 损伤小鼠肝组织 MDA、SOD、GSP-PX 活性的影响

与对照组比较，模型组小鼠肝组织 SOD、GSP-PX 活性显著降低，MDA 含量显著增加，提示二甘醇能损害肝脏的抗氧化酶活性，增加脂质过氧化反应；大黄醇提物、大黄水提物和泽泻醇提取物给药组与模型组比较，肝组织 SOD 及 GSP-PX 活性显著改善、MDA 含量显著降低，提示大黄和泽泻提取物能减轻二甘醇损伤肝脏中脂质过氧化反应。

## 3 讨　论

二甘醇中毒主要发生在发展中国家，因其污染食物或饮水，或在制药中将其作为辅料导致中毒事件，如 1937 年发生在美国的“磺胺酏”事件，2006 年 4 月我国出现的“亮菌甲素注射液”事件[2,3]。二甘醇中毒不是由原形即母体药物所致，是由其代谢产物诱发。该代谢主要由肝脏内醇脱氢酶氧化成毒性更大的代谢产物 2-羟基-乙氧基乙酸，约占总给药的 10%~30%[9-11]。二甘醇中毒临床尸检发现肝肿大，病理改变为肝脏小叶中心区域水泡性坏死，实验室检查发现高血钾、酸中毒、肌酐水平升高和低血糖等[3~5]。

本实验发现，小鼠二甘醇染毒后，表现为活动明显减少、倦缩、毛色失去光泽、肢体无力、步态不稳、中毒严重的表现为萎靡，出现旋转、惊厥、抽搐、甚至死亡；活体解剖见肝脏充血肿大，肝脏体重比增加；血清 ALT、AST、TBIL 水平明显升高，说明二甘醇染毒造成小鼠明显的肝脏损伤。而大黄和泽泻提取物能改善小鼠二甘醇肝脏中毒表现，减轻肝脏体重比，降低血 ALT、AST、TBIL 水平，表明大黄和泽泻提取物能减轻二甘醇肝脏损伤，改善肝脏功能。

二甘醇分子结构中含有醚键和羟基两种官能团，具有很强的亲脂性，容易和细胞膜结合，破坏细胞膜结构和功能[4]，从而启动膜脂质过氧化反应；同时二甘醇在肝脏内由醇脱氢酶氧化成毒性更大的代谢产物 2-羟基-乙氧基乙酸，同时产生大量的自由基[9,11]，对肝脏产生损伤。本实验也证实二甘醇中毒小鼠肝脏抗氧化酶 SOD、GSP-PX 活性显著降低，而脂质过氧化产物 MDA 明显增多，说明过氧化损伤可能是二甘醇产生肝脏毒性的原因之一。

目前发现大黄的有效成分约 20 余种，包括蒽醌类、二蒽酮类、苷类及多糖，是一类作用很强的自由基清除剂和脂质过氧化抑制剂，对多种自由基具有清除作用[6,7]。研究发现大黄素、大黄酸、芦荟大黄素等含有羟基，参与电子转移反应，具有清除氧自由基作用，能抑制超氧阴离子的产生、抑制线粒体膜脂质过氧化反应，并抑制 IL-1 及花生四烯酸的产生[12,13]。实验也发现大黄多糖能降低肝组织 MDA 含量，降低血清中 ALT、AST 水平，有效地提高肝组织的 GSH-PX 的活性[14]。本实验也证实大黄醇提物和水提物能改善二甘醇中毒小鼠肝脏 SOD、GSP-PX 活性，降低肝脏脂质过氧化产物 MDA 含量。

泽泻含有三萜类、倍半萜类及类脂类和糖类等化学成分，而脂溶性泽泻醇类为主要有效成分[8]。而文献报道泽泻保肝作用的活性成分为泽泻醇类，同时泽泻中含有的不饱和脂肪酸具有抗氧化和清除自由基作用[15]。本实验也发现泽泻醇提物能改善二甘醇中毒小鼠肝脏 SOD、GSP-PX 活性，降低肝脏脂质过氧化产物 MDA 含量。

另外大黄中番泻苷等具有泻下作用[6]，泽泻中泽泻醇类具有利尿作用[8]，这样使二甘醇在肠道吸收减少，促进二甘醇及其代谢产物从尿排出体外，最

表 2 大黄和泽泻提取物对 DEG 损伤小鼠血清 ALT、AST 和 TBIL 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

| 组别 | 剂量(g/kg) | ALT(U/L) | AST(U/L) | TBIL(μ mol/L) |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | - | 44.71 ± 11.01 | 134.84 ± 24.77 | 3.22 ± 0.53 |
| 模型组 | - | 234.72 ± 44.53## | 432.05 ± 54.03## | 24.84 ± 4.53## |
| 大黄水提物组 | 0.8 | 141.31 ± 27.52** | 231.07 ± 32.05** | 15.74 ± 3.08* |
| | 0.4 | 210.63 ± 30.14 | 342.72 ± 73.91 | 19.70 ± 3.22 |
| 大黄醇提物组 | 0.8 | 128.14 ± 26.23** | 281.63 ± 58.06** | 13.63 ± 1.33** |
| | 0.4 | 185.48 ± 27.74** | 345.48 ± 40.67* | 18.11 ± 2.94* |
| 泽泻醇提物组 | 3.6 | 135.09 ± 31.38** | 290.63 ± 68.12** | 14.16 ± 3.44** |
| | 1.8 | 201.07 ± 33.41* | 341.63 ± 47.70* | 17.89 ± 2.70* |

注:#$P<0.05$,##$P<0.01$ 与对照组比较; *$P<0.05$,**$P<0.01$,与模型组比较

表 3 大黄和泽泻提取物对 DEG 损伤小鼠肝组织 MDA、SOD、GSP-PX 的影响($\bar{x}\pm s$, n=10)

| 组别 | 剂量(g/kg) | SOD(U/mg prot) | GSP-PX(U/mg prot) | MDA(nmol/mg prot) |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | - | 43.06 ± 7.08 | 63.83 ± 12.56 | 2.35 ± 0.47 |
| 模型组 | - | 32.93 ± 3.62## | 47.54 ± 12.26## | 3.78 ± 0.58## |
| 大黄水提物组 | 0.8 | 38.56 ± 5.03* | 59.73 ± 5.80* | 2.64 ± 0.39** |
| | 0.4 | 34.87 ± 5.01 | 54.14 ± 11.98 | 3.01 ± 0.62 |
| 大黄醇提物组 | 0.8 | 39.39 ± 4.80** | 59.26 ± 14.56* | 2.63 ± 0.66** |
| | 0.4 | 35.27 ± 4.48 | 54.75 ± 12.14 | 2.86 ± 0.29* |
| 泽泻醇提物组 | 3.6 | 40.87 ± 6.55** | 60.22 ± 12.68* | 2.60 ± 0.37** |
| | 1.8 | 35.45 ± 4.34 | 52.09 ± 12.53 | 2.91 ± 0.43* |

注:#$P<0.05$,##$P<0.01$ 与对照组比较; *$P<0.05$,**$P<0.01$,与模型组比较

终导致体内二甘醇含量减少,也可能与大黄醇及泽泻醇取物抗小鼠二甘醇急性肝损伤作用有关。

综前所述,大黄醇提物和水提物、泽泻醇取物对二甘醇引起的小鼠急性肝损伤均有保护作用,其抗肝损伤作用可能与提高肝脏抗氧化酶活性、减少肝脏脂质过氧化产物生成有关。

[致谢:本研究在中国协和医科大学 & 中国医学科学院药物研究所国家药物筛选中心完成,由国家高技术研究发展计划(863 计划)重大专项项目的资助(编号为 2004AA273782)。]

## 参 考 文 献

[1] 周邦荣.二甘醇市场应用的广阔前景[J].精细化工原料及中间体,2006,(3): 22-24.

[2] 李美英,杨 昕.二甘醇相关资料[J]. 临床药物治疗杂志,2006,4(4):23-24.

[3] 许关煜,李敏华.药品污染致二甘醇中毒及其救治[J].中国处方药,2006, (6):73-75.

[4] Ferrari L A,Giannuzzi L. Clinical parameters, postmortem analysis and estimation of lethal dose in victims of a massive intoxication with diethylene glycol[J]. Forensic Sci Int, 2005,153(1):45-51.

[5] Daubert G P,Katiyar A,Wilson J,et al. Encephalopathy and peripheral neuropathy following diethylene glycol ingestion[J]. Neurology, 2006, 66(5):782-783.

[6] 何正显,信玉琼,陈 明.大黄的化学成分、药理作用及其在临床急症中的应用[J]. 中国中医急症,2007,16(2):227-228.

[7] 丁玉玲.大黄蒽醌类的研究概况[J]. 时珍国医国药,2005,16(11):1160-1162.

[8] 易 醒,黄丹菲,肖小年,等.泽泻的研究现状与展望[J].时珍国医国药, 2007,18(2):331-333.

[9] Lenk W,Lohr D,Sonnenbichler J. Pharmacokinetics and biotransformation of diethylene glycol and ethylene glycol in the rat[J]. Xenobiotica, 1989,19(9):961-979.

[10] Heilmair R,Lenk W,Lohr D. Toxicokinetics of diethylene glycol (DEG) in the rat[J]. Arch Toxicol,1993,67(10):655-666.

[11] Mathews J M, Parker M K,Matthews H B. Metabolism and disposition of diethylene glycol in rat and dog[J]. Drug Metab Dispos,1991,19(6):1066-1070.

[12] 郭美姿,徐海荣,李孝生.大黄酸对小鼠急性肝损伤的影响[J].中医药研究,2002,18(1):37-38.

[13] 万绍晖,丁原全,蒲晓辉,等.掌叶大黄蒽醌类衍生物对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2006,22(11):1405-1406.

[14] 刘 莉,梅其炳,李保莉,等.唐古特大黄多糖及其组分的抗氧化损伤作用[J]. 第四军医大学学报,2001,22(6):530-533.

[15] 陈晓蕾,李红阳.泽泻生品及不同炮制品对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中药材,2006,29(6):592-593.

(责任编辑:冉明会)