

## 六棱菊提取物对醋氨酚致小鼠肝损伤的影响

伍义行, 郝冰洁, 胡少青, 施树云, 王建国, 杨雷香, 赵昱

伍义行, 郝冰洁, 胡少青, 中国计量学院生命科学院药系 浙江省杭州市 310018  
施树云, 杨雷香, 赵昱, 浙江大学药学院 浙江省杭州市 310053

王建国, 浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室 浙江省杭州市 310003

国家自然科学基金资助项目, No. 30701049

浙江省实验动物科技计划基金资助项目, No. 2008F80016

作者贡献分布: 本论文由伍义行设计和撰写; 赵昱提供技术指导; 研究过程具体操作由郝冰洁、胡少青、施树云、王建国及杨雷香完成。

通讯作者: 伍义行, 副教授, 医学博士, 310018, 浙江省杭州市下沙高教园区学源街258号, 中国计量学院生命科学院药系. yihangwu@126.com

电话: 0571-86835702 传真: 0571-86914449

收稿日期: 2009-12-11 修回日期: 2010-02-02

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-08

### **Laggers alata extract prevents acetamidophenol-induced liver damage in mice**

Yi-Hang Wu, Bing-Jie Hao, Shao-Qing Hu, Shu-Yun Shi, Jian-Guo Wang, Lei-Xiang Yang, Yu Zhao

Yi-Hang Wu, Bing-Jie Hao, Shao-Qing Hu, Department of Pharmacy, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

Shu-Yun Shi, Lei-Xiang Yang, Yu Zhao, College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China

Jian-Guo Wang, State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, Zhejiang Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30701049; and the Experimental Animal Science and Technology Project of Zhejiang Province, No. 2008F800169

Correspondence to: Associate Professor Yi-Hang Wu, Department of Pharmacy, College of Life Sciences, China Jiliang University, 258 Xueyuan Street, Xiasha Higher Education Zone, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China. yihangwu@126.com

Received: 2009-12-11 Revised: 2010-02-02

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-08

### **Abstract**

**AIM:** To investigate the protective effects of *Laggers alata* against acetamidophenol-induced liver damage.

**METHODS:** The main components of *Laggers alata* extract (LAE) were quantitatively analyzed by the Folin-Ciocalteu method and high-

pressure liquid chromatography (HPLC). Before mice were intragastrically given high-dosage acetamidophenol (1000 mg/kg), different doses of LAE (50, 100 and 200 mg/kg) was intragastrically administered to investigate its preventive effect against acetamidophenol-induced liver damage.

**RESULTS:** Quantitative analysis of LAE by the Folin Ciocalteu method showed that LAE contains a high content of phenolic compounds (52.6 g GAE/100 g extract). The HPLC analysis indicated that dicaffeoylquinic acids are the major components of LAE, whose content amounts to 53%. LAE at a dose of 100 mg/kg could obviously protect mice from acetamidophenol-induced death. LAE at doses of 50, 100 and 200 mg/kg (especially 100 and 200 mg/kg) significantly reduced serum AST and ALT levels in mice treated with acetamidophenol. Furthermore, LAE at all doses could improve acetamidophenol-induced hepatic injury.

**CONCLUSION:** LAE has potent protective effect against acetamidophenol-induced liver injury in mice. Dicaffeoylquinic acids may be the active ingredients in LAE that are responsible for the hepatoprotective effects of LAE.

**Key Words:** *Laggers alata*; Dicaffeoylquinic acid; Acetamidophenol; Hepatoprotection

Wu YH, Hao BJ, Hu SQ, Shi SY, Wang JG, Yang LX, Zhao Y. *Laggers alata* extract prevents acetamidophenol-induced liver damage in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 711-715

### **摘要**

**目的:** 探讨六棱菊提取物(LAE)对药物性肝损伤的抑制作用。

**方法:** 采用Folin Ciocalteu和HPLC方法对LAE的主要成分进行定量分析; 通过预防给药探讨LAE对大剂量(1000 mg/kg)醋氨酚引起的小鼠中毒死亡的影响; 运用醋氨酚引起的小鼠急性肝损伤模型评价LAE大(200 mg/kg)、中(100 mg/kg)、小(50 mg/kg)剂量对药物性肝损

### **背景资料**

近年来药物性肝炎问题日益突出, 但尚无防治药物性肝炎的有效方法。六棱菊是一种常用的民间草药, 有关该植物化学成分的研究已有不少报道, 但有关其药理学研究报道还比较少, 且尚未见其用于药物性肝损伤的报道。

**同行评议者**  
谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

### 研发前沿

各种原因引起的肝损伤发病率高, 治疗困难, 对传统中药或民间药物中寻找安全高效的保肝药物是抗肝炎药物研究的热点之一, 而深入研究植物提取物的物质基础和药效机制是当前亟待解决的问题。

### 伤的抑制作用。

结果: Folin Ciocalteu法测定结果表明LAE的总酚含量为56.5 g GAE/100 g提取物; HPLC分析结果显示LAE的主要成分为二咖啡酰奎尼酸类化合物, 其含量为53.0%。醋氨酚中毒保护试验表明, LAE在100 mg/kg剂量下对大剂量醋氨酚所致小鼠死亡有明显抑制作用。药效评价结果显示: LAE在50、100和200 mg/kg剂量下灌胃给药, 均能明显降低肝损伤小鼠血清AST和ALT水平, 其中100和200 mg/kg剂量具有显著性影响; 病理组织学检测表明, 模型组小鼠肝组织呈现以中央静脉为中心的放射状坏死和脂肪变性, LAE大、中、小剂量组小鼠肝损伤均有一定程度的改善。

结论: 六棱菊对醋氨酚所致的药物性肝损伤具有较强的抑制作用。二咖啡酰奎尼酸类化合物可能是六棱菊保肝作用的主要物质基础。

关键词: 六棱菊; 二咖啡酰奎尼酸类化合物; 醋氨酚; 保肝作用

伍义行, 郝冰洁, 胡少青, 施树云, 王建国, 杨雷香, 赵昱. 六棱菊提取物对醋氨酚致小鼠肝损伤的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 711-715

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/711.asp>

## 0 引言

菊科六棱菊属(*Laggera genus*)植物约有20余种, 主要分布在非洲热带及亚洲东南部。国内外仅对少数几种该属植物进行过研究, 其中包括产于我国的六棱菊(*Laggera alata*)。他是我国仅有的两种药用六棱菊属植物之一, 主要分布在长江以南及西南地区。六棱菊属植物广泛用于民间, 具有清热解毒、抗菌消炎等功效, 疗效甚著<sup>[1]</sup>。作为一种治疗炎症性疾病的民间草药六棱菊已被使用了300多年, 有关该植物化学成分的研究已有报道<sup>[2-7]</sup>, 但有关其药理学研究报道还很少。在前期对其进行系统的植物化学和抗炎药理研究基础上<sup>[4-6,8]</sup>, 我们对六棱菊提取物的主要成分进行了定量分析, 并采用药物性肝损伤模型-醋氨酚诱导的小鼠急性肝损伤模型研究了该提取物的保肝作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 六棱菊全草采集于云南省腾冲县(标本号: ZY200308LA); AST/GOT测试盒和ALT/GPT测试盒(宁波慈城生化试剂厂); 醋氨酚[含量≥

98.0%, 中国医药(集团)上海化学试剂公司]; 维生素C片(湖北华中药业有限公司); Folin-Ciocalteu试剂(Merck 公司产品)。ICR小鼠, 雌雄各半, 体重20 g±2 g, 清洁级, 浙江省实验动物中心提供。

### 1.2 方法

1.2.1 六棱菊提取物(LAE)的制备与分析: 取干燥药材20 kg, 以950 mL/L乙醇回流提取3次, 提取液合并浓缩得浸膏915 g, 用热水溶解后用乙酸乙酯萃取以除去亲脂性成分, 留下的水溶液用正丁醇分割, 将正丁醇部分浓缩, 得棕黑色粉末320 g, 即LAE; Folin Ciocalteu比色法测定LAE总酚含量; 成分分离: 取2.0 g提取物溶解在水里, 通过Sephadex LH-20柱层析, 用甲醇洗脱分离出3个化合物: A、B和C。HPLC定量分析条件为: Waters 2695型色谱仪, 色谱柱Zorbax SB-C18, 柱温30℃, 流速为0.8 mL/min, 洗脱条件为1 mL/L乙酸和乙腈, 检测波长为280 nm。

1.2.2 LAE对醋氨酚所致小鼠死亡率的影响: ICR小鼠30只, 随机分成3个组: 溶剂(生理盐水)组(NS 10 mL/kg,  $n = 10$ )、维生素C组(VitC 1 000 mg/kg,  $n = 10$ )和LAE组(LAE 100 mg/kg,  $n = 10$ )。各组动物灌胃给药, 每天1次, 连续3 d。末次给药后1 h, 所有小鼠灌胃给予醋氨酚1 000 mg/kg。醋氨酚致毒24 h后记录各组死亡情况<sup>[8,9]</sup>。

1.2.3 LAE对醋氨酚致小鼠急性肝损伤的影响: ICR小鼠60只, 随机分成6个组: 溶剂组(NS 10 mL/kg,  $n = 10$ )、模型组(NS 10 mL/kg,  $n = 10$ )、维生素C组(VitC 1 000 mg/kg,  $n = 10$ )、六棱菊小剂量组(LAE 50 mg/kg,  $n = 10$ )、六棱菊中剂量组(LAE 100 mg/kg,  $n = 10$ )和六棱菊大剂量组(LAE 200 mg/kg,  $n = 10$ )。各组动物灌胃给药, 每天1次, 连续7 d。末次给药后5 h, 各组小鼠(溶剂对照组除外)一次性灌胃醋氨酚500 mg/kg; 末次给药24 h后, 摘眼球取血, 分离血清, 按试剂盒说明测定AST和ALT活性, 同时取肝进行病理组织学检查<sup>[9-11]</sup>。

统计学处理 统计分析采用SPSS version 10.0软件处理, 实验数据以mean±SD表示, 采用单因素方差分析(ANOVA)和Student's *t*-test, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

## 2 结果

2.1 LAE的量化分析 LAE的总酚含量为56.5 g GAE/100 g提取物。经光谱分析和文献对照<sup>[12,13]</sup>, 从提取物中分离的3个化合物分别确定为: 3, 4-*O*-二咖啡酰奎尼酸(A)、3, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸

### 创新盘点

本研究首次采用醋氨酚引起的小鼠急性肝损伤模型探讨六棱菊提取物对药物性肝损伤的影响。

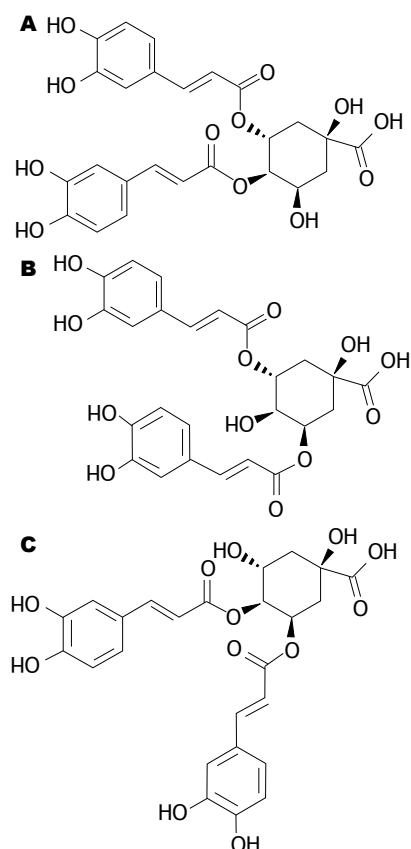


图 1 二咖啡酰奎尼酸类化合物的化学结构. A: 3, 4-*O*-二咖啡酰奎尼酸; B: 3, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸; C: 4, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸.

(B)和4, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸(C), 3个化合物的分子式为:  $C_{25}H_{24}O_{12}$ , 相对分子质量为516.45 Da, 其结构见图1. 二咖啡酰奎尼酸类化合物(3, 4-*O*-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸和4, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸)是LAE的主要成分, 其含量为53.0%.

**2.2 LAE对醋氨酚所致小鼠死亡率的影响** 溶剂组死亡率为90%, VitC组为40%, LAE组死亡率为50%. VitC和LAE对醋氨酚致小鼠死亡的保护率分别为50%和40%(表1).

**2.3 LAE对醋氨酚致小鼠急性肝损伤的影响** LAE大、中、小剂量均能明显降低肝损伤小鼠血清AST和ALT水平, 其中大、中剂量具有显著性作用( $P<0.05$ 或 $0.01$ , 表2). VitC也具有显著保护作用; 型组小鼠肝细胞呈现以汇管区为中心的放射状坏死和脂肪变性, LAE组和VitC组小鼠肝损伤均有一定程度的改善(图2).

### 3 讨论

药物性肝炎(drug-induced hepatitis)是指在治疗过程中由于药物的毒性损害或过敏反应所致的肝脏疾病, 主要是由于用药不慎或滥用

表 1 LAE对醋氨酚所致小鼠死亡率的影响 (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	剂量(mg/kg)	死亡率(%)	保护率(%)
溶剂	-	90	-
VitC	1 000	40	50
中剂量LAE	100	50	40

表 2 LAE对醋氨酚致小鼠肝损伤的影响 (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
溶剂	45.82 $\pm$ 6.13 <sup>b</sup>	21.35 $\pm$ 3.57 <sup>b</sup>
模型组	124.42 $\pm$ 15.64	60.27 $\pm$ 8.69
VitC	79.62 $\pm$ 14.55 <sup>a</sup>	42.53 $\pm$ 10.29 <sup>a</sup>
LAE组(mg/kg)		
50	98.74 $\pm$ 21.05	45.46 $\pm$ 11.67
100	84.51 $\pm$ 11.74 <sup>a</sup>	40.22 $\pm$ 10.26 <sup>a</sup>
200	80.28 $\pm$ 7.62 <sup>b</sup>	33.12 $\pm$ 6.59 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 模型组.

药物引起. 近年来随着新药的不断问世和药物品种及剂量的增加, 药物性肝炎有逐年增多的趋势. 尽管药物性肝炎问题日益突出, 但迄今尚无预防药物性肝炎的有效方法. 当前药物性肝炎的治疗主要是祛除病因治疗, 即停用肝损害药物, 并施以“保肝”治疗药物<sup>[14]</sup>. 醋氨酚(acetamidophenol), 又名扑热息痛, 是临床常用的解热镇痛药, 临床常用剂量不会导致肝损害, 但大剂量的醋氨酚可产生严重的肝损伤, 其损伤机制是在其代谢过程中产生大量的 $N$ -乙酰对苯醌亚胺(NAPQI)超过了GSH的解毒能力, NAPQI具有亲电性和强大的氧化作用, 于是未被清除的NAPQI与生物大分子共价结合, 导致蛋白质巯基被氧化和芳香基化, 以及生物膜系统发生脂质过氧化, 从而导致肝细胞变性坏死<sup>[15]</sup>. 醋氨酚诱导的小鼠肝损伤模型是药物性肝损伤模型的代表, 常用于药物性肝损伤的药效评价.

六棱菊作为一种民间药用植物, 在民间和中医实践中广泛用于炎症性疾病(包括肝炎)的治疗, 疗效甚著. 目前国内外对六棱菊的研究主要停留在植物化学成分和复方研究上, 缺乏现代药理和药效物质基础相关研究, 且尚无六棱菊改善药物性肝损伤的现代研究报道<sup>[2-8]</sup>. 因此, 本课题组在研究六棱菊提取物的抗炎作用的同时, 运用大鼠原代肝细胞损伤模型探索性地考察了LAE的体外抗肝细胞损伤作用, 结果证实其具较

**应用要点**  
本研究将为六棱菊及其提取物用于药物性肝损伤的保肝治疗提供一定理论依据, 同时也为六棱菊植物的民间应用和中医临床用药提供部分科学依据.



### 名词解释

药物性肝炎: 指在治疗过程中由于药物的毒性损害或过敏反应所致的肝脏疾病, 主要是由于用药不慎或滥用药物引起。

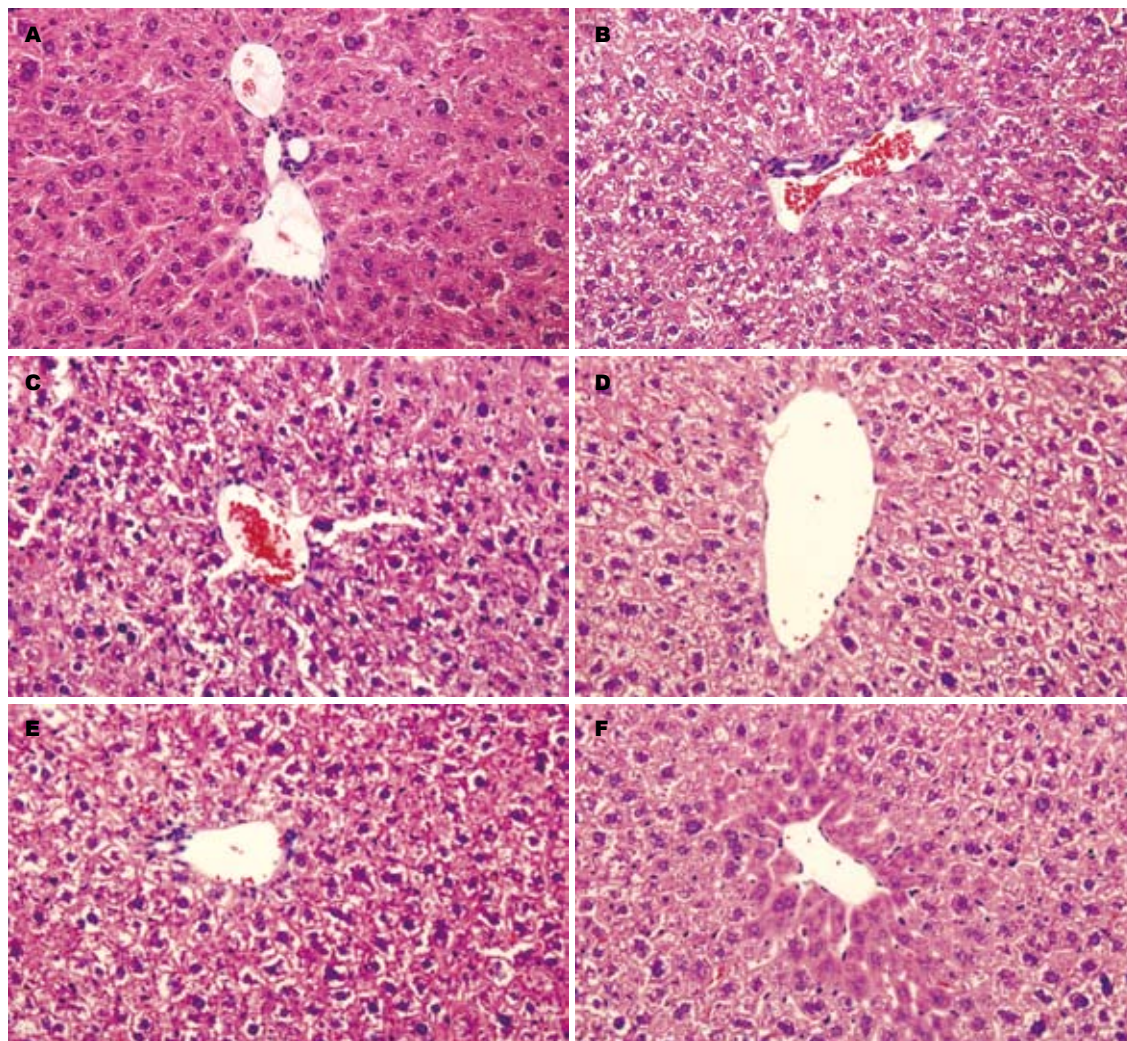


图 2 LAE对醋氨酚致小鼠肝组织病理改变的影响(HE × 400). A: 溶剂组; B: 模型组; C: VitC组; D: 低剂量LAE组; E: 中剂量LAE组; F: 高剂量LAE组。

强的体外抗肝细胞损伤作用。在体外实验的基础上, 我们对LAE的物质基础进行了量化分析(分离鉴定了LAE的主要成分为二咖啡酰奎尼酸类化合物, 并采用HPLC进行定量分析), 并采用CCl<sub>4</sub>、D-GalN引起的化学性肝损伤和BCG-LPS引起的免疫性肝损伤动物模型对该提取物的保肝作用进行了深入研究(部分资料尚未出版), 体内外研究表明, LAE对CCl<sub>4</sub>、D-GalN和BCG-LPS引起的肝损伤具有较强的保护作用<sup>[16]</sup>。

在LAE的保肝作用已明确的基础上, 本论文进一步探讨了LAE对醋氨酚诱导的小鼠急性肝损伤模型的保护作用, 旨在探讨其对药物性肝损伤的影响。故首先研究了LAE对大剂量(1 000 mg/kg)醋氨酚引起的小鼠中毒死亡的影响, 结果表明, LAE和阳性药物VitC对大剂量醋氨酚所致小鼠死亡有明显保护作用。然后以醋氨酚为肝毒物, 建立小鼠急性药物性肝损伤模型, 并用来评价LAE对药物性肝损伤的影响。结果表

明, LAE对醋氨酚引起的肝损伤小鼠血清转氨酶(AST和ALT)升高有明显抑制作用, 同时对醋氨酚导致的肝组织病理改变具有一定程度的改善, 而阳性药物VitC也产生了相似的影响。提示LAE可能具有较强的抗药物性肝损伤的潜力。

总之, 在前期研究基础上, 本研究初步表明LAE对醋氨酚引起的药物性肝损伤具有明显的保护作用, 并初步探索了其药效物质基础, 为该植物的民间应用和中医临床应用提供了部分科学依据。

### 4 参考文献

- 1 江苏新医学院. 中药大辞典(下册). 第1版. 上海: 上海科技出版社, 2009: 1889-1890, 2238-2239
- 2 Bohlmann F, Wallmeyer M, Jakupovic J, Gerke T, King RM, Robinson H. Cuauthemone sesquiterpenoids from *Blumea alata*. *Phytochemistry* 1985; 24: 505-509
- 3 Raharivelomanana P, Bianchini JP, Ramanoelina ARP, Rasoarhona JRE, Faure R, Cambon A.

- Eudesmane sesquiterpenes from *Laggera alata*. *Phytochemistry* 1998; 47: 1085-1088
- 4 Zheng QX, Xu ZJ, Sun XF, Gueritte Françoise, Cesario Michele, Cheng Christopher HK, Sun HD, Zhao Y. New eudesmane and eremophilane derivatives from *Laggera alata*. *Chin Chem Lett* 2003; 14: 393-396
- 5 Zheng QX, Xu ZJ, Sun XF, Guérutte F, Cesario M, Sun HD, Cheng CH, Hao XJ, Zhao Y. Eudesmane derivatives and other sesquiterpenes from *Laggera alata*. *J Nat Prod* 2003; 66: 1078-1081
- 6 Zheng Q, Xu Z, Sun X, Yao W, Sun H, Cheng CH, Zhao Y. Eudesmane and megastigmane glucosides from *Laggera alata*. *Phytochemistry* 2003; 63: 835-839
- 7 Ekundayo O, Oguntimein B, Laakso I, Hiltunen R. Composition of the Essential Oil of *Laggera alata*. *Planta Med* 1989; 55: 573-574
- 8 Wu Y, Zhou C, Song L, Li X, Shi S, Mo J, Chen H, Bai H, Wu X, Zhao J, Zhang R, Hao X, Sun H, Zhao Y. Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammation models. *J Ethnopharmacol* 2006; 108: 243-250
- 9 德清, 丁保国, 马艳青, 赵海璐, Thomas G Nei, Tomlinson Brian, 田亚平, 王成彬, Critchley Julian AJH. 黄芪总黄酮对扑热息痛所致小鼠肝损伤防护作用的研究. *中国中药杂志* 2001; 26: 483-485
- 10 Peterson FJ, Knodell RG. Ascorbic acid protects against acetaminophen- and cocaine-induced hepatic damage in mice. *Drug Nutr Interact* 1984; 3: 33-41
- 11 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1347-1348
- 12 Merfort I. Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica Montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry* 1992; 31: 2111-2113
- 13 Um BH, Polat M, Lobstein A, Weniger B, Aragón R, Declercq L, Anton R. A new dicaffeoylquinic acid butyl ester from *Isertia pittieri*. *Fitoterapia* 2002; 73: 550-552
- 14 霍荻, 杨运高, 敖飞健, 戴炜, 李莉洁, 郭亚兵. 医用三氧与中药对醋氨酚犬中毒性肝炎的保护作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 282-286
- 15 Macrides TA, Naylor LM, Kalafatis N, Shihata A, Wright PF. Hepatoprotective effects of the shark bile salt 5beta-scygnol on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 33: 31-37
- 16 Wu YH, Zhang XM, Hu MH, Wu XM, Zhao Y. Effect of *Laggera alata* on hepatocyte damage induced by carbon tetrachloride in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2009; 126: 50-56

同行评价  
本文研究六棱菊提取物对药物肝损伤的抑制作用, 设计合理, 有一定的科学性。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》 2008年影响因子 0.729

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统, 在“万方数据-数字化期刊群”基础上, 结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD), 以我国正式出版的各学科6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据, 严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后, 进行规范化处理和有效链接, 经统计分析, 编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次, 影响因子0.729, 即年指标0.142, 引用期刊数732, 学科扩散指标0.533, 被引半衰期4.303, H指数8。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)