

·研究生园地·

乳香没药对大鼠胆汁分泌的影响*

朱桃桃,王安红,周 昆,卢国彦,马志会

摘要 [目的] 观察乳香、没药对大鼠胆汁分泌的影响。[方法] Wistar 大鼠连续给予乳香、没药及乳香没药 2 周,剂量均为生药 3 g/kg,对照组给予自来水。末次给药后收集胆汁,分别测试胆汁中总胆汁酸(TBA)、谷胱甘肽(GSH)含量。Western blot 法检测肝脏法尼醇 X 受体(FXR)、胆盐输出泵(BSEP) 蛋白表达。各组胆汁及乳香、没药生药用乙酸乙酯萃取,采用高效液相色谱(HPLC)法检测。[结果] 乳香、没药及乳香没药组胆汁流量明显高于对照组($P<0.05$),但各给药组胆汁中 TBA、GSH 浓度均明显低于对照组($P<0.05$)。通过胆汁分泌的 TBA 量乳香、乳香没药组显著低于对照组($P<0.05$),而 GSH 量各给药组无明显变化。与对照组相比,给药组 BSEP 蛋白表达量差异无统计学意义,FXR 有上调趋势,HPLC 图中给药组在 2~5 min 出现乳香、没药成分色谱峰。[结论] 乳香、没药均可使大鼠胆汁分泌量增加,但 TBA 排出量减少,可能是乳香、没药或其代谢产物在排入胆管时竞争性抑制胆汁酸的排出。

关键词 乳香;没药;胆汁分泌;总胆汁酸;谷胱甘肽

中图分类号 R285.6

文献标识码 A

文章编号 1673-9043(2012)02-0111-03

2010 版药典首次将乳香、没药收录其中,乳香、没药均有活血止痛的功效,常作为对药使用,但药典中并未有乳香、没药毒性的记载。五味是指药物因功效不同而具有辛、甘、酸、苦、咸味,五味与归经、毒性有关系,五味是产生毒性的物质基础,药物的毒性主要来自辛、苦味;五味归经具有普遍性,其中以归肝经者为多,苦、咸味主归肝经,辛味主归肺、脾、肝经^[1]。乳香,辛、苦、温,归心、肝、脾经;没药,辛、苦、温,归心、肝、脾经^[2-3]。本组实验人员在研究中也发现乳香、没药对 Beagle 犬及大鼠有较明显的肝脏毒性,肝内可见轻度胆汁淤积^[4-5]。笔者观察了乳香、没药对大鼠胆汁分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 受试药 乳香、没药(购自天津市顺时德大药房)粉碎后以生药粉给药。

1.2 动物 Wistar 大鼠 [购自天津市山川红实验动物科技有限公司,合格证号 SCXK(津)2009-0001],所用饲料为全价颗粒饲料(天津市华荣实验动物科技有限公司生产),饲养于天津中医药大学实验动

物中心。

1.3 试剂和仪器 总胆汁酸(TBA)试剂盒(中生北控生物科技有限公司),谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程研究所),JJ2000 精密电子天平(常熟双杰测试仪器厂),AE200S 电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),Micro95 半自动生化仪(荷兰威图科学公司),Agilent 1100 HPLC 系统(美国 Agilent 公司),DYY-III B 电泳仪(北京六一仪器厂),转膜装置(Bio-Rad,美国),ENEGENIUS 凝胶成像系统(Bio Imaging System, Syngene, 英国)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组及样本采集 Wistar 大鼠 48 只,雌雄各半,体质量 180~220 g,采用随机数字表法随机分为 4 组,分别为对照组 9 只、乳香组 12 只、没药组 11 只、乳香没药组 10 只,各给药组剂量均为生药 3 g/kg,按 10 mL/kg 体质量灌胃给药,每日 1 次,连续灌胃给药 2 周,对照组给予等体积的自来水。末次给药后麻醉动物,腹中线开 2 cm 切口,在十二指肠系膜处分出胆管,在距十二指肠 2 cm 的胆管处切口插入塑料软管,收集给药后 0.5~1.5 h 内的胆汁。胆汁收集完后取肝脏,将收集标本置于 -70 °C 超低温冰箱冻存。

1.4.2 TBA 和 GSH 检测 将收集的胆汁用半自动生化仪分别测试 TBA、GSH 含量,其中测胆汁 TBA 时将胆汁稀释 100 倍。TBA 采用酶循环法,GSH 采

* 基金项目 重大新药创制专项基金项目(2011ZX09201-201-21)。

作者单位 300193 天津中医药大学中医药研究院 天津市中药药理重点实验室。

作者简介 朱桃桃(1987-),女,硕士研究生,研究方向中药药理毒理。

通讯作者 周 昆。

用比色定量测定法。

1.4.3 肝脏胆盐输出泵(BSEP)和法尼醇 X 受体(FXR)检测 提取肝组织蛋白,蛋白样品置于 SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,将分离的蛋白条通过转移电泳方式转印至 PVDF 膜上。分别用非标记一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗对其进行孵育、检测。电泳条件为 80 V, 30 min, 湿转条件为 65 V 转膜 2 h。一抗稀释比例(1:1 000), 二抗稀释比例(1:3 000)。

1.4.4 高效液相色谱(HPLC)法检测 将收集的胆汁用乙酸乙酯萃取涡旋 2 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取有机层氮气吹干, 用甲醇复溶进样。乳香、没药生药粉同胆汁相同方法处理进行 HPLC 检测。

色谱条件 色谱柱 Agilent TC-C18(4.6 mm×150 mm, 5.0 μm)。流动相为乙腈:水=65:35, 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃, 紫外检测波长 245 nm。进样量 20 μL。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件处理, 计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 正态分布计量资料的组间比较采用单因素方差分析, 偏态分布计量资料的组间比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳香、没药对大鼠胆汁流量及胆汁中 TBA、GSH 的影响 乳香、没药和乳香没药组大鼠胆汁流量均明显高于对照组($P < 0.05$), 见表 1。胆汁中 TBA 浓度各给药组均显著低于对照组($P < 0.01$), 乳香组明显低于没药组($P < 0.01$), GSH 浓度各给药组均低于对照组($P < 0.05$), 乳香、乳香没药组明显低于没药组($P < 0.01$)。通过胆汁分泌的 TBA 量乳香、乳香没药组显著低于对照组($P < 0.05$), 乳香组明显低于没药组($P < 0.05$); 而通过胆汁分泌的 GSH 量各组之间差异无统计学意义, 见表 2。

2.2 BSEP、FXR 蛋白的表达 与对照组相比, 各给药组 BSEP 蛋白的表达差异无统计学意义, FXR 有上升的趋势, 见图 1。

表 1 乳香、没药对大鼠胆汁流量的影响($\bar{x} \pm s$)

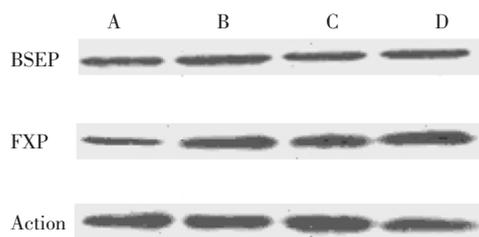
组别	n	胆汁量(mL)
对照组	9	0.91±0.20
乳香组	12	1.65±0.43**
没药组	11	1.33±0.26*
乳香没药组	10	1.50±0.68**

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 2 乳香、没药对大鼠 TBA、GSH 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	浓度		通过胆汁分泌的量(μmol)	
		TBA(mmol/L)	GSH(μmol/L)	TBA	GSH
对照组	9	12.25±4.41	107.91±30.68	11.42±5.45	0.10±0.02
乳香组	12	3.03±0.76** ^{△△}	57.44±7.20** ^{△△}	5.01±1.73** [△]	0.09±0.03
没药组	11	6.47±2.56**	88.60±12.02*	8.55±3.68	0.12±0.03
乳香没药组	10	5.05±2.17**	65.58±9.49** ^{△△}	7.19±3.93*	0.09±0.04

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与没药组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ 。



A 对照组 B 乳香组 C 没药组 D 乳香没药组

图 1 BSEP、FXR 蛋白的表达

2.3 HPLC 分析 由胆汁及生药液相色谱可知, 乳香、没药均有多种成分进入胆汁, 在此色谱条件下主要集中在 2~5 min, 见图 2。

3 讨论

实验表明, 连续给予乳香、没药 2 周能增加大鼠胆汁流量, 但排入胆管的 TBA 量减少, 且乳香对胆汁流量及 TBA 分泌量的影响强于没药。肝细胞通过胆汁分泌的 TBA 量减少会导致 TBA 在肝细胞内过度蓄积, 这可能是乳香、没药导致肝损伤的一个原因。

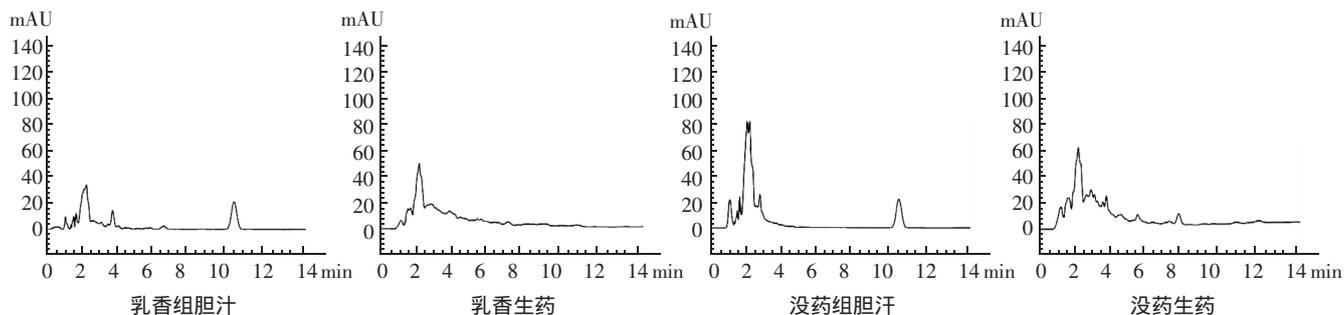


图 2 胆汁及生药的 HPLC 图

肝脏是药物从体内清除的主要场所,胆汁排泄是许多化合物的代谢及消除途径。胆汁的形成是由于胆汁酸盐和其他有机离子通过主动运输方式进入毛细胆管,造成渗透压梯度,使水被动排入从而形成胆汁流。胆流主要分为胆盐依赖性胆流和胆盐非依赖性胆流两种,TBA及GSH分别是胆盐依赖性胆流和胆盐非依赖性胆流的主要驱动力^[5]。BSEP是胆汁酸转运的主要载体,GSH的主要转运载体是多药耐药相关蛋白2(MRP2)^[6-8],作为胆汁酸的受体FXR可以直接结合在BSEP的启动子上调控BSEP的表达来维持胆汁酸的内环境稳定。乳香、没药均能增加胆汁流量,但胆汁中TBA、GSH浓度均大幅降低,并且乳香、乳香没药组通过胆汁分泌的TBA量也显著减少,而通过胆汁分泌的GSH量无明显变化,提示MRP2蛋白的表达没有受到影响,而BSEP的表达可能受到了抑制。但是接下来的BSEP蛋白表达结果显示,BSEP的表达并没有受到抑制。TBA、GSH是胆汁流的主要驱动力,其排出量降低时会导致胆汁流量减少,而乳香、没药在使胆汁排出的TBA量显著降低的情况下胆汁流量反而增加了,在排除了BSEP蛋白表达受抑制的前提下,推测乳香、没药有成分通过BSEP转运至胆汁,或可以抑制BSEP的转运能力。对胆汁及乳香、没药生药萃取物的HPLC分析结果显示,给药组胆汁中存在乳香、

没药的多种成分,证实乳香、没药有的成分可通过胆汁分泌。本实验表明乳香、没药排入胆管使胆汁流量增加,对TBA的排出形成竞争性抑制,使TBA浓度降低,但乳香、没药转运的相关载体有哪些还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 周昆,代志,柳占彪,等. 壮骨关节丸中肝毒性药材的筛选研究[J]. 中国药物警戒, 2009, 6(11): 641.
- [2] 郭辉,张玲. 乳香中化学成分和药理作用的研究进展[J]. 食品与药品, 2007, 9(15): 50-52.
- [3] 韩淑芬,金仲品. 没药的药理活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 1502-1506.
- [4] 谈英,徐鑫,周昆,等. 乳香没药及其提取物对大鼠肝毒性的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 221.
- [5] 张雪莹,杨劲,尹雪芬,等. 谷胱甘肽的肝脏转运及其在胆汁淤积中的作用[J]. 药学学报, 2009, 44(4): 327.
- [6] Nathanson MH, Boger JL. Mechanisms and regulation of bile secretion[J]. Hepatology, 1991, 14(3): 551.
- [7] 张雪莹,杨劲,尹雪芬,等. 谷胱甘肽的肝脏转运及其在胆汁淤积中的作用[J]. 药学学报, 2009, 44(4): 327-332.
- [8] 陆伦根,曾民德. 胆汁酸对线粒体的毒性作用[J]. 肝脏, 2008, 13(4): 343-346.

(收稿日期 2011-12-16)

Influence of Olibanum and Myrrha on bile secretion

ZHU Tao-tao, WANG An-hong, ZHOU Kun, LU Guo-yan, MA Zhi-hui

(Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the influence of Olibanum and Myrrha on bile secretion. [Methods] Wistar rats were treated with Olibanum, Myrrha and Olibanum + Myrrha, 3.0 g/kg once a day for 2 weeks and the control group treated with water. After the last administration, bile samples of each group were collected. The level of total bile acid (TBA), and glutathione (GSH) in bile were determined respectively. Protein levels of farnesoid receptor (FXR), bile salt export pump (BSEP) were determined by Western blot, bile samples of each group and Olibanum, Myrrha were extracted with ethyl acetate and determined by HPLC. [Results] Compared with control group, three treatment groups had a higher bile flow but lower concentrations of TBA and GSH in bile ($P < 0.05$). The amount of TBA in bile of Olibanum and Olibanum + Myrrha groups increased significantly ($P < 0.05$), while the amount of GSH had no obvious difference to all the treatment groups. Protein level of BSEP had no difference when compared with control group, while FXR had a tendency of increasing. The treatment groups had a peak value of Olibanum and Myrrha at 2~5 min, while control group did not have. [Conclusion] Olibanum and Myrrha can increase the bile secretion favorably, but the amount of TBA in bile is not increased. The probable reason is that Olibanum, Myrrha or their metabolites can competitively inhibit the excretion of TBA when they excreted into bile duct.

Key words: Olibanum; Myrrha; bile secretion; TBA; GSH