

# 银杏叶醇提取物对异烟肼和利福平肝毒性保护作用的实验研究\*

王建刚 周海梅 侯湘波 宋晓伟 赵立发 王淑英 吴银萍(洛阳 471003 洛阳医学高等专科学校)

**摘要** 目的:观察银杏叶醇提取物对异烟肼和利福平肝毒性的保护作用及其机制探讨。方法:分别测定肝损害组和银杏叶醇提取物大、小剂量组小鼠的血清谷丙转氨酶(SGPT)、肝指数、肝匀浆丙二醛(MDA)含量、肝微粒体 $P_{450}$ 和线粒体 $Ca^{2+}$  ATP酶活性,以及肝病理检查,并与对照组比较。结果:银杏叶醇提取物大、小剂量均可对抗异烟肼和利福平引起的MDA、SGPT、肝微粒体 $P_{450}$ 的增高( $P < 0.05$ ),以及对抗其引起的形态学改变;银杏叶醇提取物大剂量对抗其线粒体 $Ca^{2+}$  ATP酶活性的降低。结论:银杏叶醇提取物可对抗异烟肼和利福平所致肝毒性。

**关键词** 银杏叶醇提取物;肝保护;异烟肼;利福平;肝毒性

## Protective effect of ethanol extracts of ginkgo biloba leaves on mice hepatic toxic injury induced by isoniazid and rifampicin

Wang Jiangang( Wang JG ), Zhou Hai mei( Zhou HM ), Hou Xiangbo( Hou XB ), et al ( Luoyang Medical College , Luoyang 471003 )

**ABSTRACT** **OBJECTIVE**:To observe the protective effect of ethanol extracts from ginkgo biloba leaves on mice hepatic toxic injury induced by isoniazid and rifampicin. **METHODS**:The level of SGPT, liver index, content of malondialdehyde (MDA) of liver homogenate, activity of hepatic microsome enzyme and mitochondrial membrane  $Ca^{2+}$  ATP enzyme, and degree of liver cell injury were measured. **RESULTS**:The ethanol extracts from ginkgo biloba leaves decreased the level of SGPT, liver index, content of MDA of liver homogenate, activity of hepatic microsome enzyme ( $P < 0.05$ ), and the degree of liver injury. On the other hand, ethanolic extracts from ginkgo biloba leaves increased the activity of mitochondrial membrane  $Ca^{2+}$  ATP enzyme. **CONCLUSION**:The ethanol extracts from ginkgo biloba leaves had the protective effect on mice hepatic toxic injury induced by isoniazid and rifampicin.

**KEY WORDS** ethanol extracts from ginkgo biloba leaves, protective effect of liver, isoniazid, rifampicin, hepatic toxic injury

异烟肼与利福平是目前结核病短程疗法的必需药物<sup>[1]</sup>。但异烟肼和利福平联合用药毒性明显增加,严重影响了病人的健康和结核病的疗效<sup>[2]</sup>。因此寻找既能增加异烟肼和利福平疗效又能对抗它们不良反应的药物,显得很有必要。近年来研究资料表明,银杏叶含有多种化学成份,有着广泛的药理作用<sup>[3,4]</sup>,尤其是它的抗脂质过氧化作用,为其保肝作用提供了理论基础。本文就银杏叶醇提取物对异烟肼肝毒性的保护作用及

其机制予以探讨。

### 1 材料和方法

#### 1.1 银杏叶醇提取物的制备与银杏叶提取物鉴定

10月底收集银杏落叶,洗净风干,研成粉末干燥备用。

本课题为河南省教委自然科学基金资助项目(编号:920017)

王建刚,男,40岁。1990年毕业于上海医科大学,硕士,副教授,从事药理学教学与科研,擅长药物不良反应监测及毒理学研究

称取银杏叶粉适量,加 70%乙醇水浴热回流 2 次,每次 3h,合并滤液,减压蒸馏除去溶剂,挥干,用 20%乙醇溶解,过滤,水浴蒸去溶剂后挥干,以少量乙醇溶解,上硅胶柱,依次用 95%乙醇、75%乙醇和水洗脱,合并乙醇洗脱部分,挥去溶剂后得糖浆状提取物<sup>[5]</sup>。干燥后用生理盐水溶解备用。按文献方法以芦丁作对照(芦丁对照品:中国药品生物制品检定所)为标准,70%乙醇为溶剂测定黄酮含量,结果提取物总黄酮含量为 17.12%。实验用提取物 100mg/kg,相当于总黄酮 17.12mg/kg;50mg/kg 相当于 8.56mg/kg。

**1.2 动物与用药** 昆明种小鼠 40 只,雌雄各半(河南医科大学实验动物中心),体重 18~24g(21.3±1.8)g,随机分为 4 组(I 组:生理盐水对照组):生理盐水 ip,0.1ml/10g,每天 1 次连用 5d;II 组(肝损伤组:异烟肼+利福平):异烟肼(广州明兴制药厂,批号:971221-14),利福平(武汉制药厂,批号:970403);异烟肼和利福平分别用生理盐水配制为 0.4%和 0.1%溶液。均以 0.1ml/10g,ip,每日 1 次,利福平连用 5d,异烟肼用药 2d 于第 4~5 天各 ip 1 次。III 组(银杏叶醇提取物小剂量组):在 II 组用药的基础上,再用 0.5%银杏叶提取物,ip,0.1ml/10g(50mg/kg),连用 5d;IV 组(银杏叶醇提取物大剂量组):在 II 组用药的基础上,腹腔注射 1%银杏叶提取物,0.1ml/10g(100mg/kg),连用 5d。全部动物于第 6 天称体重,断头取血,剖腹取肝洗净揩干称重。

**1.3 主要仪器与试剂** 721 分光光度仪(上海第三分析仪器厂),FZQ-2 型旋涡混旋器,电动细胞匀浆机,TGL-16G 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。试剂均用分析纯。

**1.4 用赖氏法测定血清谷转氨酶(SGPT)活性。**

**1.5 肝指数及形态学观察** 肝指数 = 肝重(mg)/处死前体重(g)。取肝左叶,立即用福尔马林液固定 2 周,常规切片,HE 染色。

**1.6 肝匀浆 MDA 测定** 准确取肝 0.3g,加 3ml 生理盐水,用电动细胞匀浆机匀浆 1min 制成细胞匀浆。按 TBA 显色法测定丙二醛含量<sup>[6]</sup>。

**1.7 肝微粒体细胞色素 P<sub>450</sub> 含量和肝线粒体 Ca<sup>2+</sup> ATP 酶活性测定** 取肝 0.5g,用 0.25mol/L 蔗糖-Tris-HCl 缓冲液(pH=7.4)用电动匀浆机制成 20%肝匀浆,然后用差速离心法制备肝微粒体和线粒体<sup>[7]</sup>,然后测定及计算肝微粒体 P<sub>450</sub> 含量<sup>[8]</sup>和肝线粒体 Ca<sup>2+</sup> ATP 酶活性测定<sup>[9]</sup>。

**1.8 统计学处理** 2 组间显著性测定用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 银杏叶醇提取物对小鼠体重、肝湿重及肝指数的影响** 银杏叶醇提取物大剂量组在实验后体重有所降低( $P < 0.05$ ),肝指数增加。肝指数增加是由于体重降低所致(表 1)。

表 1 银杏叶醇提取物对小鼠体重、肝湿重及肝指数的影响

组别	实验前体重	处死前体重	肝湿重	肝指数
	/g	/g	/g	/ $\bar{x} \pm s$
I 组	21.7 ± 1.8	23.3 ± 2.8	1.38 ± 0.19	5.96 ± 0.54
II 组	21.4 ± 2.2	23.3 ± 2.7	1.44 ± 0.22	6.18 ± 0.48
III 组	21.4 ± 1.8	22.2 ± 3.2	1.41 ± 0.25	6.35 ± 0.59
IV 组	21.6 ± 1.4	20.4 ± 2.0*	1.35 ± 0.15	6.54 ± 0.48

注: I、III 和 IV 组均与 II 组比较,\*  $P < 0.05$

**2.2 银杏叶醇提取物对小鼠 SGPT 和肝病理性改变的影响** 异烟肼和利福平组的 SGPT 明显升高,银杏叶醇提取物大小剂量组均与正常对照无差别;形态学检查在光学显微镜下,异烟肼和利福平组的多数小鼠都有肝细胞水泡样变性,有些还可见坏死,而银杏叶组损害程度明显减轻。根据损伤轻重分为 4 级,(-)为正常,(+)肝细胞轻度水泡样变性,(++) 变性程度加重,且偶见散在点状坏死;(+++) 每个视野均可见点状坏死病灶。其结果见表 2。

表 2 银杏叶醇提取物对小鼠 SGPT 和肝病理性改变的影响

组别	sGPT( $\bar{x} \pm s$ / 赖氏单位)	病理改变			
		-	+	++	+++
I 组	30.41 ± 7.29* <sup>1</sup>	6	4	0	0* <sup>1</sup>
II 组	47.86 ± 9.41	2	3	4	1
III 组	33.44 ± 4.28* <sup>1</sup>	6	3	1	0* <sup>1</sup>
IV 组	28.12 ± 4.31* <sup>2</sup>	7	3	0	0* <sup>1</sup>

注: I、III 和 IV 组均与 II 组比较,\*<sup>1</sup>  $P < 0.05$ ; \*<sup>2</sup>  $P < 0.01$

**2.3 银杏叶醇提取物对肝匀浆 MDA、细胞色素 P<sub>450</sub>、Ca<sup>2+</sup> ATP 酶活性影响** 异烟肼和利福平组的 MDA 及细胞色素 P<sub>450</sub> 含量均明显增加而 Ca<sup>2+</sup> ATP 酶活性则明显降低。银杏叶醇提取物大小剂量组则能对抗异烟肼和利福平增加 MDA 及细胞色素 P<sub>450</sub> 含量的作用及降低 Ca<sup>2+</sup> ATP 酶活性(但小剂量  $P > 0.05$ )的作用(见表 3)。

## 3 讨论

异烟肼和利福平的肝损害机制为利福平诱导了肝药酶,从而加速了异烟肼的代谢<sup>[10,11]</sup>,其代谢物具有脂质过氧化作用,引起细胞膜及线粒体膜的脂质过氧化,线粒体膜 Ca<sup>2+</sup> ATP 酶活性降低,细胞内及线粒体内 Ca<sup>2+</sup> 过多,致使细胞变性甚至死亡;而银杏叶提取物自

表3 银杏叶醇提取物对小鼠肝匀浆 MDA、P<sub>450</sub>和 Ca<sup>2+</sup> ATP 酶活性的影响

组别	MDA /nmol·g 组织 <sup>-1</sup>	P <sub>450</sub> /nmol·g 微粒体蛋白 <sup>-1</sup>	Ca <sup>2+</sup> ATP 酶活性 /μmol Pi·mg pr <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>
I 组	158.0 ± 57.9 <sup>*1</sup>	5.89 ± 2.17 <sup>*1</sup>	21.57 ± 3.77 <sup>*1</sup>
II 组	210.9 ± 57.4	7.57 ± 1.90	16.95 ± 4.34
III 组	142.2 ± 24.3 <sup>*2</sup>	5.34 ± 0.42 <sup>*2</sup>	19.41 ± 4.26
IV 组	122.1 ± 40.2 <sup>*2</sup>	4.83 ± 0.75 <sup>*2</sup>	22.06 ± 4.26 <sup>*2</sup>

注: I、III和 IV组均与 II组比较, <sup>\*1</sup> P < 0.05; <sup>\*2</sup> P < 0.01

由基的清除作用及可能的肝药酶抑制作用,以及继发的线粒体膜的 Ca<sup>2+</sup> ATP 酶保护作用,可能是肝保护作用的药理基础。

### 参考文献

- 1 何国钧.抗结核化疗的进展和存在的问题浅议.中华结核和呼吸杂志,1993,16(2): 67.
- 2 焦晓玲,杨毓章,肖跃平,等.抗结核药不良反应监测.药物流行病学杂志,1995,4(2): 77.
- 3 冯汉林,郑意端.银杏叶的药用.中国中药药杂志,1996,3(10): 13.

- 4 王巧明,台育秦.银杏叶的研究概况.甘肃中医学院学报,1998,15(1): 48.
- 5 庄向平,虞杏英,杨更生.银杏叶提取物.中草药,1992,23(2): 122.
- 6 Okawa H, Ohishi N, Yaji K. Assay for lipid peroxidex in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 1979,95(2): 351.
- 7 刘晓芳,伸来福,夏元洵.维生素 E 对氯丁二烯所致大鼠肝损害的预防作用.中国药理学与毒理学杂志,1995,9(4): 283.
- 8 姚朗,石晓者,腾翁和,等.青蒿琥酯及四种经典抗疟药对大鼠肝线粒体亚铁螯合酶活性的影响.中国药理学与毒理学杂志,1996,10(3): 239.
- 9 赵保昌,姚晓丹,顾淑珍,等.四氯化碳中毒大鼠肝脏 Ca<sup>2+</sup> ATP 酶和磷酸化 a 活性的研究.中华劳动卫生职业病杂志,1990,8(4): 215.
- 10 张仁亮,王振钺,李端,等.利福平对大鼠异烟肼及其代谢物乙酰肼 药物动力学的影响.中国药理学报,1992,13(6): 494.
- 11 Sarma GR. Rifampicin-induced release of hydrazine from isoniazid. Am Rev Respir Dis, 1986,133: 1072.

收稿日期:1999 - 01 - 15