

- [7] LI W, LIU J, HE P, et al. Hydroxysafflor yellow A protects methylglyoxal-induced injury in the cultured human brain microvascular endothelial cells [J]. *Neurosci Lett*, 2013(549):146-150.
- [8] KAMADA H, YU F, NITO C, et al. Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 activation after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats: relation to blood-brain barrier dysfunction [J]. *Stroke*, 2007, 38(3):1044-1049.
- [9] GRUNDY S M, BENJAMIN I J, BURKE G L, et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 1999(100):1134-1146.
- [10] NI Z, ZHUGE Z, LI W, et al. Inhibitory effects of hydroxysafflor yellow A on the formation of advanced glycation end products *in vitro* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(11):2050-2053.
- [11] FANG S H, LIN K N, HUANG X Q, et al. Nuclear translocation of cysteinyl leukotriene receptor 1 is involved in oxygen-glucose deprivation-induced damage to endothelial cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(12):1511-1517.
- [12] CHIOU S H, CHEN S J, PENG C H, et al. Fluoxetine up-regulates expression of cellular FLICE-inhibitory protein and inhibits LPS-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cell. [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343(2):391-400.
- [13] KIRKOVA M, TZVETANOVA E, VIRCHEVA S, et al. Antioxidant activity of fluoxetine: studies in mice melanoma model [J]. *Cell Biochem Funct*, 2010, 28(6):497-502.

收稿日期: 2013-12-30

石榴皮醇提物的急性肝毒性研究

郭新慧, 李园利, 刘晓晓, 刘昕, 战奕巍, 贾凤兰, 阮明, 张宝旭* (北京大学公共卫生学院毒理学系, 国家中医药管理局中药配伍减毒重点实验室, 北京 100191)

摘要: 目的 评价石榴皮醇提物对小鼠肝脏的影响。方法 将 40 只小鼠随机分成阴性对照组、石榴皮醇提物低、中、高剂量组(30, 45, 60 mg·kg⁻¹)。所有小鼠在禁食 12 h 后, 各剂量组给予相应剂量的石榴皮醇提物, 阴性对照组给予等体积的蒸馏水。给药 24 h 后, 所有小鼠麻醉后眼眶取血, 麻醉脱臼处死。测定 ALT, AST, LDH 血清酶指标。留取肝组织测定 MDA、GSH、GSSG 评价氧化损伤的指标。留取 1/2 肝大叶经福尔马林溶液固定, HE 染色观察小鼠肝脏病理改变。结果 与阴性对照组比较, 石榴皮醇提物中、高剂量组体质量、肝重、肝体比明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), ALT、LDH、MDA 明显升高($P < 0.05$), GSH/GSSG 明显降低($P < 0.05$), 石榴皮醇提物高剂量组 AST 明显升高($P < 0.05$)。结论 石榴皮醇提物能够引起小鼠肝脏的急性损伤, 并且剂量越大, 毒性越大。

关键词: 石榴皮; 石榴皮醇提物; 肝损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)06-0654-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.06.003

Hepatotoxicity of Pomegranate Peel Ethanol Extract *in Vivo*

GUO Xinhui, LI Yuanli, LIU Xiaoxiao, LIN Xin, ZHANG Yiwei, JIA Fenglan, RUAN Ming, ZHANG Baoxu* (*Department of Toxicology, Public Health Institute, Peking University Health Science Center, Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine of Compatibility Attenuated, Beijing 100191, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the hepatotoxicity of pomegranate fruit peel ethanol extract in mice. **METHODS** An experimental study was carried out in mice. After random allocation of the intervention, forty mice were received pomegranate fruit peel ethanol extract(30, 45, 60 mg·kg⁻¹) or distilled water while in a fasted state for 12 h. After 24 h, the level of serum enzyme was measured with automatic biochemistry analyzer, which included ALT, AST, and LDH. MDA, GSH and GSSG were measured in liver homogenates to assess the oxidative damage. Histological changes in liver were observed by HE staining. **RESULTS** Compared with the control group, there were significant decreases of body weight, liver weight, liver weight and body weight ratio, significant increases of ALT, LDH, MDA, GSH/GSSG in both the middle and high dose of pomegranate fruit peel ethanol extract groups($P < 0.05$), and significant increase of AST in the high dose group. **CONCLUSION** These results indicates that oral administration of pomegranate fruit peel ethanol extract afford statistically significant toxicity to

基金项目: 国家科技部科技基础性工作专项(2007FY230500)

作者简介: 郭新慧, 女, 硕士生 Tel: (010)82801527 E-mail: 573319747@qq.com *通信作者: 张宝旭, 男, 博士, 硕导 Tel: (010)82801527 E-mail: bxzhang@bjmu.edu.cn

mice liver, and thus, the higher the dose, the more serious liver damage.

KEY WORDS: pomegranate fruit peel; pomegranate fruit peel ethanol extract; hepatotoxicity

长久以来, 石榴作为一种中药在中国^[1-2]、突尼斯^[3]和印度^[4]被广泛采用。据文献记载, 石榴具有抑菌^[3]、治疗糖尿病^[4]和止血^[5]等作用。随着科技的进步, 在传统中药应用的基础上, 石榴的不同部位和各部位提取物的生物学活性越来越受到人们的重视。石榴皮为石榴的干燥果皮, 经研究发现, 具有抗凋亡^[6]、抗真菌^[7]、促进伤口愈合^[8-9]之功效, 临床应用较广泛。石榴皮的乙醇提取物是对石榴皮进行加工的初始阶段, 是石榴皮的主要有效部位, 对石榴皮的临床安全用药至关重要。文献^[10]指出, 石榴皮提取物能引起多种实验动物呼吸麻痹及运动障碍。肝脏是外源性物质主要的代谢和解毒器官, 是对毒物较敏感的靶器官, 因此, 本研究探讨了石榴皮醇提取物(pomegranate fruit peel ethanol extract)对小鼠的肝毒性, 为石榴皮的临床安全用药提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

95%乙醇(北京现代东方精细化学品有限公司, 规格: 500 mL, 分析纯); 谷胱甘肽(GSH)标准品(丽珠东风生物技术有限公司); 2-硫代巴比妥酸(TBA, 上海晶纯试剂有限公司)。

1.2 提取

干石榴皮购买于安国市蔺氏药材有限责任公司(批号: 080801), 由北京大学公共卫生学院毒理学系张宝旭教授鉴定。干石榴皮打成粗粉, 过 60 目筛。用索氏提取法对石榴皮干粉进行提取, 温度 200 °C, 将石榴皮粗粉 100 g, 用 500 mL 95%乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 减压抽滤, 合并滤液, 用旋转式蒸发仪在 60 °C 下将乙醇旋干, 得到棕褐色浸膏, 产率 37.97%。

1.3 动物及分组

ICR 小鼠, ♂, 体质量 18~20 g, 由北京大学医学部实验动物科技部提供, 生产许可证号: SCXK(京)2011-0012, 使用许可证号: SYXK(京)2011-0039。小鼠随机分为阴性对照组, 石榴皮醇提取物低、中、高剂量组, 每组 10 只。

1.4 仪器

ARA520 型电子精密天平(美国 OHAUS 公司); F97Pro 荧光分光光度计(上海棱光技术有限公

司); 850 型荧光分光光度计(日本日立公司); TGL-16G 和 TDL-5 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 7170A 自动分析仪(日本日立公司)。

1.5 方法

石榴皮醇提取物用去离子水配成水悬液, 根据预实验的结果, 确定石榴皮醇提取物高、中、低剂量分别为 60, 45, 30 g·kg⁻¹。小鼠禁食 12 h 后, 石榴皮醇提取物低、中、高剂量组分别灌胃给药, 给药体积 0.4 mL·(10 g)⁻¹, 阴性对照组给予等体积的蒸馏水。在给药 24 h 后, 小鼠麻醉眼眶取血, 麻醉后脱臼处死。用自动分析仪测定血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平, 用 TBA 反应法^[11]检测肝组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 采用改良 Hisson 法测定肝组织中 GSH 和氧化型谷胱甘肽(GSSG)的含量, 并采用 HE 染色, 在光学显微镜下观察小鼠肝组织病理学改变。

1.6 统计学处理

各项指标均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS 13.0 软件进行方差分析和均数之间的比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 或 $\alpha=0.01$ 。

2 结果

2.1 石榴皮醇提取物各剂量组小鼠的精神状态与行为活动

石榴皮醇提取物中、高剂量组小鼠在灌胃给药 2 h 后出现不同程度的中毒表现, 表现为行动迟缓、精神萎靡、趴伏、抱团、被毛不光滑、白色眼屎等现象, 剂量越高, 中毒表现越明显, 甚至出现死亡。同时, 高剂量组部分小鼠出现单只眼球突出, 皮肤发凉。

2.2 石榴皮醇提取物对小鼠体质量、肝重和肝体比的影响

与阴性对照组比较, 石榴皮醇提取物低剂量组小鼠体质量、肝重、肝体比有所降低, 但差异无统计学意义; 石榴皮中、高剂量组小鼠体质量、肝重、肝体比明显下降, 差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。石榴皮醇提取物的剂量越高, 体质量、肝重、肝体比下降越明显。结果见表 1。

表 1 石榴皮醇提物对小鼠体质量、肝重、肝体比的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of pomegranate fruit peel ethanol extract administration on body weight, liver weight, ratio of liver weight and body weight in mice ($n=10, \bar{x} \pm s$)

分组	死亡动物数/只	体质量/g	肝重/g	肝体比/%
阴性对照组	0	23.6±0.8	1.44±0.05	6.12±0.17
石榴皮醇提物				
低剂量组	0	22.6±2.3	1.38±0.25	6.06±0.80
中剂量组	0	21.1±1.5 ¹⁾	1.13±0.14 ²⁾	5.24±0.61 ¹⁾
高剂量组	2	19.4±3.4 ¹⁾	1.10±0.15 ²⁾	5.07±0.42 ²⁾

注：与阴性对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

2.3 石榴皮醇提物对小鼠血清转氨酶(ALT、AST、LDH)的影响

与阴性对照组比较，石榴皮醇提物低剂量组小鼠血清 ALT、AST、LDH 水平变化不明显；石榴皮中剂量组小鼠血清 ALT、LDH 水平明显升高，差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，AST 升高不明显；石榴皮高剂量组小鼠血清 ALT、AST、LDH 水平明显升高，差异有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 2。

表 2 石榴皮醇提物对小鼠血清转氨酶 ALT、AST、LDH 水平的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of pomegranate fruit peel ethanol extract administration on the levels of ALT, AST and LDH in serum ($n=10, \bar{x} \pm s$)

分组	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹
阴性对照组	47±8	131±48	878±336
石榴皮醇提物			
低剂量组	65±20	127±25	972±354
中剂量组	375±139 ²⁾	424±256	2 215±943 ¹⁾
高剂量组	1051±396 ²⁾	1225±541 ²⁾	2 747±722 ²⁾

注：与阴性对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

2.4 石榴皮醇提物对小鼠肝组织中 MDA 含量和 GSH 与 GSSG 比值的影响

与阴性对照组比较，石榴皮醇提物中、高剂量组 MDA 含量明显升高($P<0.01$)，差异具有统计

学意义；石榴皮醇提物中、高剂量组剂量组 GSH/GSSG 明显降低($P<0.01$)，差异具有统计学意义，结果见表 3。

表 3 石榴皮醇提物对小鼠肝组织中 MDA 含量和 GSH/GSSG 比值的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of pomegranate fruit peel ethanol extract administration on MDA and GSH/GSSG ratio in mice liver homogenate ($n=10, \bar{x} \pm s$)

分组	MDA/nmol·mg ⁻¹	GSH/GSSG
阴性对照组	0.665±0.251	9.967±1.767
石榴皮醇提物		
低剂量组	0.910±0.339	11.937±3.232
中剂量组	1.398±0.431 ¹⁾	3.825±0.713 ¹⁾
高剂量组	1.979±0.664 ¹⁾	4.021±0.459 ¹⁾

注：与阴性对照组比较，¹⁾ $P<0.01$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$

2.5 石榴皮醇提物对小鼠肝脏组织病理变化的影响

形态学观察：阴性对照组小鼠肝脏颜色暗红，被膜光滑完整，富有弹性，有光泽，无淤血和出血。石榴皮中剂量组小鼠肝脏颜色略黄，质地较脆，无光泽，表面有出血点和坏死。石榴皮高剂量组小鼠肝脏出血点和坏死较中剂量组增多。

组织学观察：阴性对照组肝细胞结构清晰，包膜完整，细胞核大而清晰，肝细胞索围绕中央静脉呈放射状整齐排列，肝细胞无坏死、变性，无炎性细胞浸润；石榴皮醇提物低剂量组小鼠肝脏与阴性对照组基本一致；石榴皮醇提物中剂量组以中央静脉为中心肝细胞有不同程度的坏死，肝细胞界限不清楚，胞质深染，细胞核固缩或裂解，炎性细胞浸润，肝细胞索排列紊乱；石榴皮醇提物高剂量组以中央静脉为中心，肝细胞大量坏死，仅汇管区存留少量正常肝细胞，肝细胞正常结构破坏，胞质深染，细胞核固缩或裂解，无肝细胞索。从形态和组织病理结果看出，石榴皮醇提物具有肝脏毒性。剂量越高，肝组织损伤越严重。结果见图 1。

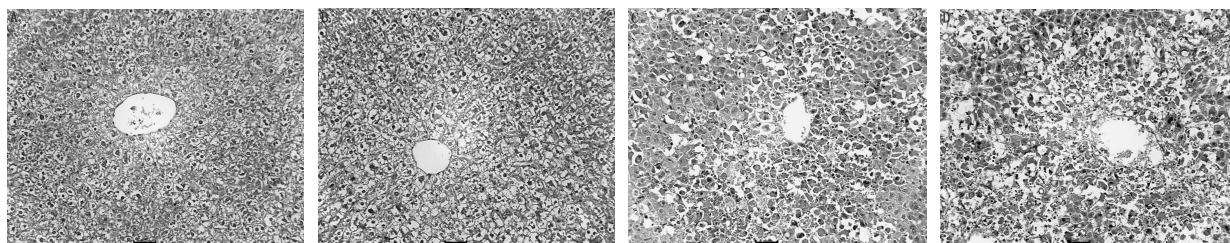


图 1 石榴皮醇提物对小鼠肝脏组织病理变化的影响

A-阴性对照组；B-石榴皮醇提物低剂量组；C-石榴皮醇提物中剂量组；D-石榴皮醇提物高剂量组

Fig 1 Effects of pomegranate fruit peel ethanol extract administration on liver pathological changes

A-control group; B-low dose of pomegranate fruit peel ethanol extract group; C-middle dose of pomegranate fruit peel ethanol extract group; D-high dose of pomegranate fruit peel ethanol extract group

3 讨论

ALT 和 AST 是肝细胞非特异性功能酶, 它们的活动与肝功能密切相关。当肝细胞损伤时, 肝细胞中的 ALT 和 AST 大量释放入血, 血清中 ALT 和 AST 水平明显升高。LDH 是糖酵解过程中的一种重要的酶, 任何原因导致的肝损伤均可引起 LDH 活性的升高。石榴皮醇提取物中、高剂量组小鼠血清 ALT、AST、LDH 水平明显升高, 剂量越高, 升高越明显, 从血清转氨酶水平说明石榴皮醇提取物对小鼠肝脏造成损伤。

在生物膜结构中, MDA 是多不饱和脂肪酸受到自由基攻击后形成的脂质过氧化产物之一, 它的含量多少间接反映脂质过氧化的严重程度^[12]。GSH 是组织中的自由基清除剂, 并发挥重要的抗氧化功能, 它的含量的高低反映了机体清除自由基的能力。由结果分析可以看出, 石榴皮醇提取物中、高剂量组肝组织 MDA 含量升高, GSH/GSSG 比值降低, 反应石榴皮醇提取物对肝脏的氧化损伤, 从而引起肝脏毒性反应。

肝脏组织病理变化是诊断肝脏损伤的重要指标, 由小鼠肝脏组织病理变化可以看出, 随着石榴皮醇提取物给药剂量的增高, 小鼠肝脏出现不同程度的以中央静脉为中心的坏死, 剂量越高, 坏死越严重。

对于石榴皮醇提取物的肝损伤机制, 有文献报道, 生物碱类^[13-14]和鞣质^[15]可以引起肝脏的毒性反应, 通过定性分析发现石榴皮醇提取物中含有生物碱类和鞣质。因此石榴皮醇提取物中的生物碱类和鞣质可能是引起小鼠肝脏毒性的原因之一, 但对于石榴皮醇提取物的毒作用机制尚不明确, 有待进一步研究。在实验过程中, 观察发现高剂量组部分小鼠单只眼球脱出, 呈血红色, 推测可能与石榴皮醇提取物的血液毒性有关^[15]。

本次试验结果表明, 石榴皮醇提取物具有肝脏毒性, 剂量越高, 毒性越明显。因此, 在饮用传统中药石榴皮的同时, 不要忽略石榴皮的毒性作用。石榴皮引起肝毒性的有效成分和机制有待于

今后进一步的研究。

REFERENCES

- [1] ZHOU B H, TU J, LIU M M, et al. Improving effect of tannins in *Pomegranate rind* on chronic glomerulonephritis [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2013, 33(21): 1739-1743.
- [2] NI L, YANG X. Determination of Cinnamaldehyde and Piperine in Shiliu Jianwei Pill by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2012, 29(1): 67-69.
- [3] BOUKEF K, SOUISSI H R, BALANSARD G. Contribution to the study of plants used in traditional medicine in Tunisia [J]. *Plant Med Phytother*, 1982, 16(3): 260-279.
- [4] NAGARAJU N, RAO K N. A survey of plant crude drugs of Rayalaseema, Andhra Pradesh, India [J]. *India J Ethnopharm*, 1990, 29(2): 137-158.
- [5] PRASHANTH D, ASHA M K, AMIT A. Antibacterial activity of *Punica granatum* [J]. *Fitoterapia*, 2001, 72(2): 171-173.
- [6] DIKMEN M, OZTURK N, OZTURK Y. The antioxidant potency of *Punica granatum* L. fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer [J]. *J Med Food*, 2011, 14(12): 1638-1646.
- [7] ENDO E H, CORTEZ D A, UEDA-NAKAMURA T, et al. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans* [J]. *Res Microbiol*, 2010, 161(7): 534-540.
- [8] MURTHY K N, REDDY V K, VEIGAS J M, et al. Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel [J]. *J Med Food*, 2004, 7(2): 256-259.
- [9] HAYOUNI E A, MILED K, BOUBAKER S, et al. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced *in vivo* healing potential on dermal wounds [J]. *Phytotherapy*, 2011, 18(11): 976-984.
- [10] YAO J M, ZHANG L J, WANG J P, et al. Toxicity test of pomegranate fruit peel and gallnut in mice [J]. *Chin J Tradit Vet Sci*(中国兽医学杂志), 2004, 48(6): 7-8.
- [11] LI C Q, LI G, SU J F. Prophylactic effects of compound phyllanthus urinaria II on liver fibrosis in rats induced by Dimethylnitrosamine [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*(辽宁中医杂志), 2009, 36(8): 1413-1415.
- [12] HALLIWELL B, GUTTRIDGE J M C. In *Free Radicals in Biology and Medicine* [M]. 2nd Ed. Japan: Japan Scientific Societies Press, 1989.
- [13] FERRARA L, SCETTINO O, FORGIONE P, et al. Identification of the root *Punica granatum* in galenic preparations using TLC [J]. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 1989, 65(5): 385-390.
- [14] TRIPATHI S M, SINGH D K. Molluscicidal activity of *Punica granatum* Bark and *Canna indica* root [J]. *Bra J Med Biol Res*, 2000, 33(11): 1351-1355.
- [15] AL-SHAFI S M. Toxic effect of tannic and related compounds on human plasma proteins [J]. *Saudi Med J*, 2002, 23(2): 221-225.

收稿日期: 2013-08-31