

# 痰热清注射液及 5 种中间体对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用探讨

龙爽<sup>1</sup>, 刘绍勇<sup>2</sup>, 徐英<sup>3\*</sup>

(1. 上海中医药大学 中药研究所, 上海 201203; 2. 上海凯宝药业股份有限公司, 上海 201401;  
3. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

**[摘要]** 目的:观察痰热清注射液及 5 种中间体对四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导急性肝损伤的保护作用,初步探讨痰热清注射液治疗急性肝损伤药效物质基础。方法:采用多次皮下注射复制  $\text{CCl}_4$  急性肝损伤模型,雄性大鼠随机分为正常组、模型组、痰热清注射液组、痰热清注射液治疗组、甘利欣注射液阳性药组、黄芩治疗组、熊胆粉治疗组、山羊角治疗组、连翘治疗组和金银花治疗组,大鼠尾静脉注射给药连续 7 d。观察各组大鼠体质量、肝体比及肝功能各项血清生化指标,并观察肝组织病理状态,并采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测钠离子-牛磺胆酸协同转运蛋白(NTCP),磺基转移酶 2<sub>A1</sub>(SULT2<sub>A1</sub>),谷胱甘肽-S-转移酶 A<sub>2</sub>(GSTA<sub>2</sub>)和细胞色素 P450 酶 3<sub>A11</sub>(CYP3<sub>A11</sub>)mRNA 水平的变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠肝体比显著升高,体质量下降,丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(T-Bil),直接胆红素(D-Bil)和总胆汁酸(TBA)水平显著增高,肝细胞大面积坏死变性明显,NTCP, GSTA<sub>2</sub> 和 CYP3<sub>A11</sub> mRNA 表达显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较,痰热清注射液能显著恢复肝系数,降低各项血清生化指标,肝组织病理炎症减轻;而各中间体的血清肝功能指标改善的优劣顺序分别是连翘、金银花、山羊角、熊胆粉。痰热清注射液和连翘能上调 NTCP, GSTA<sub>2</sub> 和 CYP3<sub>A11</sub> mRNA 表达,熊胆粉仅能上调 SULT2<sub>A1</sub> 和 GSTA<sub>2</sub> mRNA 的表达,金银花上调 SULT2<sub>A1</sub>, GSTA<sub>2</sub> 和 CYP3<sub>A11</sub> mRNA 的表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论:痰热清注射液具有显著改善  $\text{CCl}_4$  诱导的大鼠急性肝损伤作用,而其中起保肝作用的主要药效部位可能为熊胆粉、山羊角、连翘和金银花,其作用机制可能与上调 NTCP, SULT2<sub>A1</sub>, GSTA<sub>2</sub> 和 CYP3<sub>A11</sub> 的表达,加速肝内胆汁酸代谢有关。

**[关键词]** 痰热清注射液; 四氯化碳; 急性肝损伤; 药效物质基础

**[中图分类号]** R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0073-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181126

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.1013.037.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-15 14:44

## Protective Effect of Tanreqing Injection and Its Five Intermediates on $\text{CCl}_4$ -induced Acute Liver Injury in Rats

LONG Shuang<sup>1</sup>, LIU Shao-yong<sup>2</sup>, XU Ying<sup>3\*</sup>

(1. Institute of Traditional Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Kaibao Pharmaceutical Co. Ltd., Shanghai 201401, China;

3. Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of Tanreqing injection and its five intermediates on carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ )-induced acute liver injury in rats and preliminarily discuss its pharmacodynamical

**[收稿日期]** 20171225(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81403089)

**[第一作者]** 龙爽,在读硕士,从事药效物质基础研究, Tel: 021-51322506, E-mail: xinlanglongshuan@sina.com

**[通信作者]** \*徐英,博士,高级工程师,从事药物分析及新药开发, Tel: 021-51322505, E-mail: skyxu\_1983@163.com

basis against acute liver injury. **Method:** Subcutaneous injection was given for several times to establish  $\text{CCl}_4$ -induced acute liver injury models. Then the male rats were randomly divided into normal group,  $\text{CCl}_4$  model group, Tanreqing injection group, Tanreqing injection treatment group, diammonium glycyrrhizinate injection group, Scutellariae Radix group, Selenarcti Fel group, Caprae Hircus Cornu group, Forsythiae Fructus group and Lonicerae Japonicae Flos group. The drugs were given to experimental rats for seven days by tail intravenous injection. Rats' body weight, liver/body weight ratio, serum biochemical analyses and histological assays were measured. Quantitative real-time fluorescent PCR (Real-time PCR) was employed to detect the mRNA levels of  $\text{Na}^+$ -dependent taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP), sulfotransferase 2<sub>A1</sub> (SULT2<sub>A1</sub>), glutathione-S transferase A<sub>2</sub> (GSTA<sub>2</sub>) and cytochrome P450 3<sub>A11</sub> (CYP3<sub>A11</sub>). **Result:** As compared with the normal group, the body weight was significantly decreased, liver/body weight ratio was significantly increased, serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (T-Bil), direct bilirubin (D-Bil) and total bile acid (TBA) were also significantly increased, with significant necrosis and denaturation of hepatocytes, and the mRNA expression levels of NTCP, GSTA<sub>2</sub> and CYP3<sub>A11</sub> were significantly reduced in  $\text{CCl}_4$  model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). As compared with the model group, Tanreqing injection could significantly restore liver coefficient, reduce serum biochemical indexes, and alleviate pathological inflammation of liver tissues. Moreover, the improvement effect of the intermediates on serum liver function indexes was showed as Forsythiae Fructus > Lonicerae Japonicae Flos > Caprae Hircus Cornu > Selenarcti Fel. As compared with the model group, the mRNA expression levels of NTCP, GSTA<sub>2</sub> and CYP3<sub>A11</sub> were markedly up-regulated in Tanreqing injection group and Forsythiae Fructus group; the mRNA levels of SULT2<sub>A1</sub> and GSTA<sub>2</sub> were significantly up-regulated in Selenarcti Fel group; and the mRNA levels of SULT2<sub>A1</sub>, GSTA<sub>2</sub> and CYP3<sub>A11</sub> were up-regulated in Lonicerae Japonicae Flos group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Tanreqing injection exerts a potent protective effect against  $\text{CCl}_4$ -induced hepatic injury, and the possible pharmacodynamical parts of this activity likely included Selenarcti Fel, Caprae Hircus Cornu, Forsythiae Fructus and Lonicerae Japonicae Flos. The possible mechanism of this activity may be related to up-regulating the mRNA expressions of NTCP, SULT2<sub>A1</sub>, GSTA<sub>2</sub> and CYP3<sub>A11</sub> in liver and accelerating the metabolism of bile acids in hepatocytes.

[**Key words**] Tanreqing injection; carbon tetrachloride; acute liver injury; pharmacodynamical basis

痰热清注射液属国家二类新药,由黄芩、熊胆粉、山羊角、连翘和金银花 5 味配伍而成,具有清热、解毒、化痰之功效<sup>[1]</sup>。临床上痰热清注射液主要用于治疗急性肺炎、急性支气管炎等呼吸系统疾病,也有报道用于辅助治疗病毒性肝炎、黄疸型肝炎、胆囊炎等肝胆疾病。病毒性乙型肝炎是由乙型肝炎病毒感染所致的传染病,常伴有黄疸症状,目前尚无确切疗效的特异性药物或疗法,多采用调节饮食和选择抗病毒药物、免疫调节药物或保肝降酶药物对症治疗。临床研究表明痰热清用于治疗病毒性黄疸型肝炎,能有效改善肝功能降低胆红素,清除内毒素血症,与还原型谷胱甘肽、凯西莱、强力宁、甘利欣等联合用药时,能协同增效,减少毒副作用<sup>[2-3]</sup>。急性胆囊炎是常见急腹症之一,主要因革兰阴性杆菌感染所致,多用抗生素治疗;临床研究表明痰热清注射液辅助抗生素治疗急性胆囊炎,疗效明显优于单用抗生素,治愈率高于对照组,且无明显毒副作用<sup>[4]</sup>。

现代药理研究也表明痰热清注射液能明显降低卡介苗致敏脂多糖攻击诱导免疫性肝损伤小鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性,降低肝脏指数,能明显减轻小鼠肝脏的病理形态学损害<sup>[5]</sup>。同时痰热清注射液也能显著降低四氯化碳 ( $\text{CCl}_4$ )/ $\alpha$ -异硫氰酸萘酯/*D*-氨基半乳糖和脂多糖诱导的急性化学性肝损伤大鼠 (或小鼠) 血清中 ALT, AST 活性,明显改善肝细胞的肿胀坏死和减少出血区域<sup>[6-9]</sup>。尽管临床试验和药理研究均已证实痰热清注射液具有保护急性肝脏损伤作用,但由于处方组成复杂其作用机制尚不清楚,药效部位也不明确,极大限制了临床的应用。前期本课题组采用 HPLC-UV/MS 分析技术对痰热清复方中的成分进行鉴定,主要包括黄酮类、环烯醚萜类、苯乙醇苷类、有机酸类、胆汁酸类、氨基酸等 6 类成分,为后续药效物质基础研究奠定了化学基础<sup>[10-12]</sup>。本实验采用多次皮下注射  $\text{CCl}_4$  复制大鼠急性肝损

伤模型,观察痰热清注射液、黄芩、熊胆粉、山羊角、连翘和金银花等 5 种中间体对肝损伤大鼠的保护作用,探讨痰热清注射液保护肝脏的药效物质基础和作用机制,为其增加治疗肝胆病的临床适应症和药物开发提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** Wistar 大鼠,体质量( $200 \pm 20$ ) g,清洁级,雄性,共 100 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号 SCXK(沪)2012-0002,动物伦理委员会编号 SZY201606010。大鼠饲养温度( $22 \pm 1$ ) °C,相对湿度( $65 \pm 10$ )%,照明时间每天 12 h,自由饮食饮水。饲养于上海中医药大学实验动物中心,许可证号 SYXK(沪)2009-0069。本研究动物实验均符合上海中医药大学动物伦理委员会标准。

**1.2 药物及试剂** 痰热清注射液(规格 10 mL/支)、黄芩、熊胆粉、山羊角、连翘、金银花中间体(上海凯宝药业股份有限公司,批号分别为 1409203,1405206,1406203,1406203,1406208,1407209);甘利欣注射液( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,江苏正大天晴药业有限公司,批号 150807104); $\text{CCl}_4$ (化学纯)、橄榄油(化学纯)、三氯甲烷(分析纯)、异丙醇(分析纯)和无水乙醇(分析纯)(国药集团,批号分别为 20150813, F20100512, 20150703, 20140624, 20161021);ALT, AST, 碱性磷酸酶(ALP)试剂盒购(日本世诺临床诊断制品株式会社,批号分别为 H662, I663, D656);总胆红素(T-Bil),直接胆红素(D-Bil)试剂盒(日本光纯药工业株式会社,批号分别为 DR066, DN848);总胆汁酸(TBA,烟台奥斯邦生物工程有限公司,批号 160912);trizol, RNAase-free 水,逆转录试剂盒和 SYBR 荧光定量试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号分别为 AA5702-1, A3402A, AK5301, AK9004]。

**1.3 仪器** 5424R 型低温高速离心机及 Mastercycler 5333 型基因扩增仪(德国 Eppendorf 公司);HITACHI 7080 型全自动生化分析仪(日本日立公司);ASP300 型脱水机,EG1160 型石蜡包埋机及 RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);Nanodrop 2000 型微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司);Q-GARD T1 型纯水仪(美国 Millipore 公司);QuantStudio 6 Flex 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);TL48E 型高通量研磨仪(上海净信科技公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、模型复制与给药** Wistar 雄性大鼠

随机分为 10 组,分别是正常组, $\text{CCl}_4$  模型组,痰热清注射液组(仅给予痰热清注射液)、痰热清注射液治疗组(同时给予  $\text{CCl}_4$  和痰热清注射液)、甘利欣注射液治疗组(阳性药组)、黄芩中间体治疗组、熊胆粉中间体治疗组、山羊角中间体治疗组、连翘中间体治疗组、金银花中间体治疗组(后面表述均去除“中间体”)。痰热清注射液治疗组和痰热清注射液组给药体积为  $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于临床 70 kg 成人日用量的 7 倍),各中间体给药剂量按痰热清注射液  $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  折算(见表 1),甘利欣注射液阳性药组给药体积为  $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于临床 70 kg 成人日用量的 7 倍)。

表 1 痰热清注射液及 5 种中间体给药剂量

Table 1 Dosage of Tanreqing injection and its five intermediates

组别	生药量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	中间体剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	药液质量 浓度 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	药液体积 $/\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$
正常	-	-	-	-
$\text{CCl}_4$ 模型	-	-	-	-
痰热清注射液	0.67	-	-	2
痰热清注射液治疗	0.67	-	-	2
甘利欣注射液治疗	-	-	-	3
黄芩治疗	0.20	17.00	8.50	2
熊胆粉治疗	0.06	12.30	6.15	2
山羊角治疗	0.05	11.15	5.58	2
连翘治疗	0.16	5.28	2.64	2
金银花治疗	0.20	5.00	2.50	2

参考文献[13]方法,本实验皮下注射  $\text{CCl}_4$  造模 3 次,即第 1,4,8 天。首次造模除正常组和痰热清注射液组外,其他 8 组均皮下注射  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{CCl}_4$  原液;第 2 次造模,同第 1 次给药方式,其他 8 组皮下注射 50%  $\text{CCl}_4$  橄榄油溶液( $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ );第 3 次造模,同第 1 次给药方式,其他 8 组皮下注射 20%  $\text{CCl}_4$  橄榄油溶液( $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。正常组和痰热清注射液组大鼠分别皮下注射相同体积的橄榄油。

首次造模后 18 h 开始,除正常组和模型组外,其他 8 组大鼠每日均尾静脉注射给予相应的药物,1 次/d,连续 7 d。正常组和模型组尾静脉注射给予相同体积的生理盐水。大鼠处理前 12 h 禁食不禁水, $\text{CCl}_4$  末次造模 18 h 后大鼠称体质量并腹主动脉取血并剪取肝脏。

**2.2 肝重和肝体比** 大鼠肝脏称质量,并计算肝体比。

肝体比 = 肝重(g)/体质量(g) × 100%

**2.3 血清肝功能生化指标检测** 大鼠麻醉后腹主动脉取血,血液室温静置 2 h,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min,取上层血清,全自动生化分析仪测定血清 ALT,AST,ALP 活性,T-Bil,D-Bil 和 TBA 含量,检测方法均参照试剂盒说明书。

**2.4 肝组织病理观察** 切取肝大叶中间部分肝组织(约 1 cm<sup>3</sup>)用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切成 4~5 μm 薄片,苏木素-伊红(HE)染色,树脂封固,在光学显微下观察肝脏的病理状态。

**2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定肝脏钠离子-牛磺胆酸协同转运蛋白(NTCP),磺基转移酶 2<sub>A1</sub>(SULT2<sub>A1</sub>),谷胱甘肽-S-转移酶 A<sub>2</sub>(GSTA<sub>2</sub>)和细胞色素 P450 酶 3<sub>A11</sub>(CYP3<sub>A11</sub>) mRNA 表达** 取冻存肝组织,采用 trizol 法逐步提取肝组织总 RNA。引物序列均由上海捷瑞公司合成设计,见表 2。取总 RNA 1 μg,根据 Takara 逆转录试剂盒说明书加入 5 × Primescript RF Master Mix, RNAase-free 水,终体积 20 μL,37 °C 15 min,85 °C 5 s 反转录为 cDNA,-20 °C 保存。以 SYBR GREEN Mix 5 μL,上下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 0.3 μL,模板 1 μL,终体积 10 μL,进行 Real-time PCR 反应,反应条件为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,共扩增 40 个循环。采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法统计 mRNA 相对表达量。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,计量资料结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 one-way ANOVA 进行分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 2 Real-time 基因引物序列和扩增片段长度

Table 2 Primer sequence and amplified fragment length of Real-time PCR

基因	序列 5'-3'	片段长度 /bp
GAPDH	上游 TCGGCCCTTCGCTGATG	340
	下游 CACGGAAGGCCATGCCAGTGA	
NTCP	上游 CTCCTCTACATGATTTTCCAGCTTG	275
	下游 CGTCGACGTTTCGTTCTTTTCTTG	
SULT2 <sub>A1</sub>	上游 ATCAAAAAGAAAGGACCAC	199
	下游 GGAACCATTCAACATAAGT	
GSTA <sub>2</sub>	上游 CTTGTAGGTAACAGGCTGAC	154
	下游 GCAGGAACCTCTTCACATGG	
CYP3 <sub>A11</sub>	上游 TATGTATATCTGCCCTTTG	215
	下游 TTTATGACTGCATCCCGTG	

### 3 结果

**3.1 痰热清注射液及 5 种中间体对 CCl<sub>4</sub> 所致肝损伤大鼠体质量变化的影响** 模型组和痰热清注射液组与正常组比较均显著降低( $P < 0.01$ )。熊胆粉中间体连续给药 6,7,8 d 过程中大鼠腹泻较为严重,体质量明显降低,与模型组比较有显著性差异( $P < 0.05, P < 0.01$ )。痰热清注射液组、黄芩治疗组、山羊角治疗组、连翘治疗组和金银花治疗组给药 7 d 后,大鼠体质量与模型组比较有降低趋势,但无显著性差异。以上结果表明,痰热清注射液及其单味药能降低大鼠的体质量,其中熊胆粉治疗组的体质量变化最为明显,可能是其致泻作用引起。见表 3。

表 3 痰热清注射液及 5 种中间体对 CCl<sub>4</sub> 诱导急性肝损伤大鼠体质量变化的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Tanreqing injection and its five intermediates on body weight against CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) g

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	1 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d
正常	-	195.77 ± 6.75	216.70 ± 8.60	223.59 ± 9.44	227.04 ± 10.30	233.13 ± 10.07	237.39 ± 9.45
CCl <sub>4</sub> 模型	-	196.81 ± 8.83	196.11 ± 15.32 <sup>2)</sup>	195.38 ± 15.73 <sup>2)</sup>	196.59 ± 16.60 <sup>2)</sup>	205.10 ± 16.98 <sup>2)</sup>	208.96 ± 15.43 <sup>2)</sup>
痰热清注射液	2 <sup>5)</sup>	194.24 ± 7.42	210.23 ± 7.64	211.66 ± 7.42 <sup>1)</sup>	212.62 ± 8.07 <sup>1)</sup>	217.35 ± 7.62 <sup>2)</sup>	218.47 ± 7.75 <sup>2)</sup>
痰热清注射液治疗	2 <sup>5)</sup>	193.44 ± 8.48	195.26 ± 10.83	191.42 ± 12.45	191.98 ± 14.27	195.40 ± 14.74	199.16 ± 13.58
甘利欣注射液治疗	3 <sup>5)</sup>	197.31 ± 9.46	199.98 ± 14.20	198.88 ± 15.07	200.74 ± 17.85	206.68 ± 19.10	209.68 ± 16.71
黄芩治疗	17.00	198.79 ± 11.58	191.67 ± 15.19	191.38 ± 16.37	192.66 ± 15.99	198.57 ± 17.28	202.88 ± 14.59
熊胆粉治疗	12.30	195.16 ± 8.40	189.03 ± 11.47	187.23 ± 10.80	179.21 ± 15.26 <sup>4)</sup>	191.35 ± 11.88 <sup>3)</sup>	193.19 ± 10.51 <sup>4)</sup>
山羊角治疗	11.15	194.56 ± 8.75	189.75 ± 10.34	190.25 ± 10.42	189.23 ± 9.83	201.28 ± 9.52	203.88 ± 8.43
连翘治疗	5.28	193.11 ± 7.57	189.54 ± 11.29	189.05 ± 10.26	194.80 ± 12.25	201.59 ± 10.45	205.36 ± 9.94
金银花治疗	5.00	194.00 ± 7.64	191.68 ± 12.64	190.16 ± 13.43	195.61 ± 11.32	204.48 ± 11.42	205.42 ± 12.64

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ;<sup>5)</sup>剂量单位 mL·kg<sup>-1</sup>(表 4~6 同)。

**3.2 痰热清注射液及 5 种中间体对 CCl<sub>4</sub> 所致肝损伤大鼠肝体比的影响** 与正常组比较, CCl<sub>4</sub> 致急性肝损伤大鼠肝体比显著增高 ( $P < 0.01$ )。痰热清注射液治疗组、熊胆粉治疗组、山羊角治疗组和连翘治疗组剂量连续给药 7 d 后, 大鼠肝体比明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 其中痰热清注射液治疗组和熊胆粉治疗组给药 7 d 后, 大鼠肝体比变化尤为显著, 山羊角中间体和连翘中间体次之。见表 4。

**3.3 痰热清注射液及 5 种中间体对 CCl<sub>4</sub> 急性肝损伤大鼠血清肝功能生化指标的影响** 模型组 ALT, AST, ALP, T-Bil, D-Bil 和 TBA 水平与正常组比较显著增高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 表明 CCl<sub>4</sub> 致急性大鼠肝损伤造模成功。经各治疗药物给药后, 痰热清注射液治疗组大鼠血清中 ALT, AST, ALP, T-Bil 和 TBA 水平明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 而山羊角、连翘、金银花、熊胆粉治疗组能明显降低 CCl<sub>4</sub> 所致肝损伤大鼠血清中 ALT, ALP, T-Bil 和 TBA 活性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 但未能显著逆转 AST 活性的升高。黄芩治疗组血清中仅 ALP 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而甘利欣注射液组仅对 T-Bil 水平的上升有显著逆转作用 ( $P < 0.05$ ), 其他指标无显著

表 4 痰热清注射液及 5 种中间体对 CCl<sub>4</sub> 所致急性肝损伤大鼠肝系数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of Tanreqing injection and its five intermediates on liver/body weight ratio against CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	肝体比/%
正常	-	3.10 ± 0.10
CCl <sub>4</sub> 模型	-	4.56 ± 0.27 <sup>2)</sup>
痰热清注射液	2 <sup>5)</sup>	3.15 ± 0.08
痰热清注射液治疗	2 <sup>5)</sup>	4.15 ± 0.32 <sup>4)</sup>
甘利欣注射液治疗	3 <sup>5)</sup>	4.35 ± 0.47
黄芩治疗	17.00	4.68 ± 0.40
熊胆粉治疗	12.30	3.94 ± 0.17 <sup>4)</sup>
山羊角治疗	11.15	4.20 ± 0.43 <sup>3)</sup>
连翘治疗	5.28	4.28 ± 0.45 <sup>3)</sup>
金银花治疗	5.00	4.38 ± 0.55

变化。以上结果表明, 痰热清注射液治疗组、连翘治疗组、山羊角治疗组、金银花治疗组和熊胆粉治疗组对 CCl<sub>4</sub> 所致急性大鼠肝损伤均具有不同程度的保护作用。见表 5。

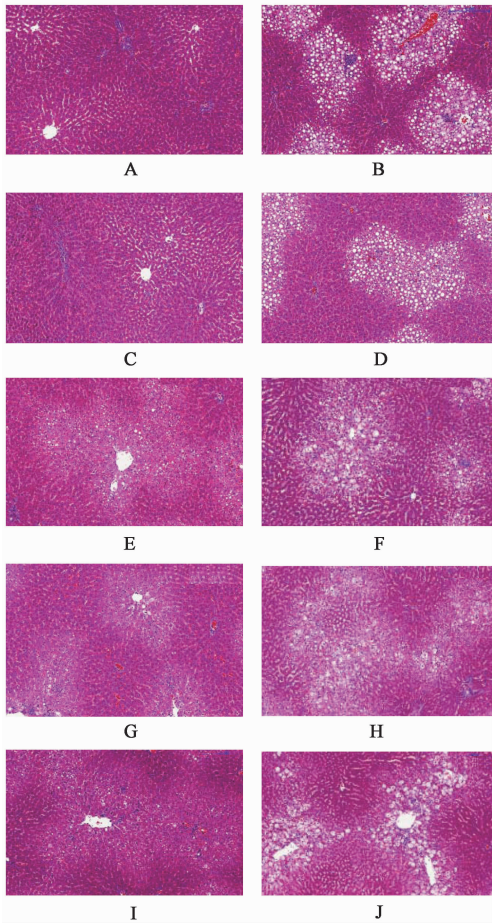
表 5 痰热清注射液及其 5 种中间体对 CCl<sub>4</sub> 所致急性肝损伤大鼠血清生化指标 ALT, AST, T-Bil, D-Bil, ALP 和 TBA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 5 Effect of Tanreqing injection and its five intermediates on serum biochemical parameters of ALT, AST, T-Bil, D-Bil, ALP and TBA against CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>	T-Bil /μmol·L <sup>-1</sup>	D-Bil /μmol·L <sup>-1</sup>	ALP /U·L <sup>-1</sup>	TBA /μmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	35.60 ± 10.48	183.30 ± 65.53	0.48 ± 0.15	0.00 ± 0.00	256.30 ± 71.23	10.07 ± 5.28
CCl <sub>4</sub> 模型	-	136.70 ± 115.04 <sup>2)</sup>	460.20 ± 295.96 <sup>2)</sup>	1.01 ± 0.27 <sup>2)</sup>	0.15 ± 0.14 <sup>1)</sup>	465.30 ± 138.12 <sup>2)</sup>	49.31 ± 28.76 <sup>2)</sup>
痰热清注射液	2 <sup>5)</sup>	32.40 ± 3.84	175.60 ± 22.22	0.36 ± 0.07	0.04 ± 0.05	215.90 ± 34.75	18.08 ± 4.45
痰热清注射液治疗	2 <sup>5)</sup>	52.80 ± 17.57 <sup>3)</sup>	199.30 ± 48.91 <sup>4)</sup>	0.48 ± 0.16 <sup>4)</sup>	0.09 ± 0.07	308.60 ± 81.47 <sup>4)</sup>	20.80 ± 8.76 <sup>4)</sup>
甘利欣注射液治疗	3 <sup>5)</sup>	107.64 ± 84.32	388.73 ± 219.91	0.69 ± 0.23 <sup>3)</sup>	0.12 ± 0.15	347.36 ± 96.02	31.31 ± 13.98
黄芩治疗	17.00	84.30 ± 46.21	377.40 ± 151.85	0.77 ± 0.39	0.18 ± 0.12	326.40 ± 158.38 <sup>3)</sup>	34.53 ± 34.47
熊胆粉治疗	12.30	59.40 ± 16.03 <sup>3)</sup>	345.00 ± 82.66	0.54 ± 0.15 <sup>4)</sup>	0.02 ± 0.04	280.20 ± 69.64 <sup>4)</sup>	16.24 ± 3.48 <sup>4)</sup>
山羊角治疗	11.15	51.90 ± 20.53 <sup>4)</sup>	345.00 ± 133.44	0.61 ± 0.22 <sup>4)</sup>	0.07 ± 0.05	298.40 ± 65.27 <sup>4)</sup>	16.16 ± 7.00 <sup>4)</sup>
连翘治疗	5.28	49.70 ± 18.71 <sup>4)</sup>	304.70 ± 90.97	0.47 ± 0.18 <sup>4)</sup>	0.05 ± 0.07	248.80 ± 52.86 <sup>4)</sup>	14.50 ± 5.96 <sup>4)</sup>
金银花治疗	5.00	49.30 ± 15.28 <sup>4)</sup>	339.10 ± 91.70	0.54 ± 0.14 <sup>4)</sup>	0.07 ± 0.07	262.00 ± 68.00 <sup>4)</sup>	17.12 ± 6.40 <sup>4)</sup>

**3.4 痰热清注射液及 5 种中间体对 CCl<sub>4</sub> 所致肝损伤大鼠肝脏组织病理学影响** 正常组大鼠肝组织结构正常、清晰, 排列整齐, 无出血、肝细胞变性坏死, 未见脂肪沉积及炎症细胞浸润。CCl<sub>4</sub> 模型组大鼠肝脏中央静脉扩张瘀血, 小叶排列结构紊乱, 大面积肝细胞水肿、变性, 中央静脉周围片状肝细胞气球

样变明显, 水变性区间质灶性淋巴细胞浸润, 提示 CCl<sub>4</sub> 造模后肝脏出现损伤。熊胆粉和连翘给药后, 与模型组比较, 小叶中央肝细胞、中央静脉肝细胞水肿、脂肪变性显著减轻, 炎症细胞浸润减少, 但仍可见散在肝细胞气球样变, 少量淋巴细胞浸润。痰热清注射液治疗、甘利欣注射液组与模型组比较炎性

细胞浸润稍减轻,肝细胞坏死减少,但仍可见瘀血的肝窦,胞质淡染、呈气球样变的肝细胞。山羊角、黄芩和金银花治疗组肝脏病理切片与模型组比较肝细胞损伤程度依次微减轻,但无显著性差异。见图 1。



A. 正常组; B.  $\text{CCl}_4$  模型组; C. 痰热清注射液组; D. 痰热清注射液治疗组; E. 甘利欣注射液治疗组; F. 黄芩治疗组; G. 熊胆粉治疗组; H. 山羊角治疗组; I. 连翘治疗组; J. 金银花治疗组

图 1 痰热清注射液及 5 种中间体对  $\text{CCl}_4$  所致急性肝损伤大鼠肝组织病理形态的影响 (HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of Tanreqing injection and its five intermediates on histological figures of liver section against  $\text{CCl}_4$ -induced acute hepatic injury (HE,  $\times 200$ )

**3.5 痰热清注射液及 5 种中间体对  $\text{CCl}_4$  致肝损伤大鼠肝脏中 NTCP,  $\text{SULT2}_{A1}$ ,  $\text{GSTA}_2$  和  $\text{CYP3}_{A11}$  mRNA 表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 NTCP,  $\text{GSTA}_2$  和  $\text{CYP3}_{A11}$  mRNA 表达量明显减少 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,痰热清注射液治疗组和连翘治疗组可明显上调 NTCP,  $\text{GSTA}_2$  和  $\text{CYP3}_{A11}$  mRNA 表达 ( $P < 0.01$ ),金银花治疗组可明显上调  $\text{SULT2}_{A1}$ ,  $\text{GSTA}_2$  和  $\text{CYP3}_{A11}$  mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),而熊胆粉治疗组仅对

$\text{SULT2}_{A1}$  和  $\text{GSTA}_2$  mRNA 表达有明显上调作用 ( $P < 0.05$ ),见表 6。

#### 4 讨论

$\text{CCl}_4$  模型是国内外急性肝损伤模型常用的诱导剂,其机制主要为自由基的形成及引发的链式过氧化反应攻击肝细胞膜,大量生成脂质过氧化物导致肝细胞损伤,主要表现以中央静脉为中心的大量细胞坏死和出血,脂肪变性十分明显<sup>[14]</sup>。

黄芩为痰热清注射液处方中的君药,其中主要指标成分黄芩苷具有较强的抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒等药理作用。Taira 等<sup>[15]</sup>研究发现黄芩苷、黄芩苷元可降低  $\text{CCl}_4$  诱导急性肝损伤大鼠血清 ALT 水平;Park 等<sup>[16]</sup>研究腹腔注射黄芩苷对  $\text{CCl}_4$  诱发的急性肝损伤小鼠有保护作用,提示其作用机制可能为诱导 HO-1 的表达及抑制促炎因子的释放。熊胆粉为处方中的臣药,主要有利胆、保肝、溶解胆石、抗炎、抑菌、解热等,其中特征性成分熊去氧胆酸已经开发成保肝商品药物优思弗<sup>[17]</sup>。金银花中黄酮类物质如金丝桃苷等,具有较好的抗氧化作用<sup>[18]</sup>,降低血清 ALT 升高,明显减轻病理性损伤<sup>[19]</sup>;绿原酸、咖啡酸有显著的利胆功效<sup>[20]</sup>。连翘中苯乙醇苷类、五环三萜类对肝损伤也有保护作用<sup>[21]</sup>,连翘苷、齐墩果酸和熊果酸均能降低实验性肝损伤动物的血清 ALT 水平<sup>[22]</sup>。

本实验采用  $\text{CCl}_4$  诱导大鼠急性肝损伤,比较痰热清注射液及方中黄芩、熊胆粉、山羊角、连翘和金银花 5 种组分中药中间体的保肝作用。痰热清注射液能显著降低大鼠血清中 ALT, AST, ALP, T-Bil 和 TBA 水平,肝实质损伤与炎性浸润减轻,且药效优于阳性对照药甘利欣,与以往研究报道一致<sup>[23]</sup>。甘利欣阳性药组肝组织病理检查结果显示甘利欣有一定保肝作用,但血清生化指标有下降的趋势并无统计学意义,可能是该组大鼠 ALT, AST 结果组内误差太大影响了统计推断。痰热清注射液及各中间体治疗肝脏急性损伤实验结果表明,痰热清注射液保肝降酶、利胆退黄的综合作用最优,且减轻熊胆粉的致泻作用,说明该组方配伍具有一定优势。连翘中间体、金银花中间体、山羊角中间体和熊胆粉中间体的降酶保肝作用次于全方,但改善  $\text{CCl}_4$  诱导急性肝损伤大鼠引发的胆汁酸胆红素代谢异常作用更显著,同时熊胆粉中间体还能显著逆转  $\text{CCl}_4$  急性肝损伤大鼠肝体比的升高,具有减轻肝实质损伤和炎症的作用。由此推测痰热清注射液中起保肝作用的主要部位为熊胆粉、山羊角、连翘和金银花;黄芩尽管单

表 6 痰热清注射液及 5 种中间体对 CCl<sub>4</sub> 致肝损伤大鼠肝脏中 NTCP, SULT2<sub>A1</sub>, GSTA<sub>2</sub> 和 CYP3<sub>A11</sub> mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 6 Effect of Tanreqing injection and its five intermediates on expression of NTCP, SULT2<sub>A1</sub>, GSTA<sub>2</sub> and CYP3<sub>A11</sub> mRNA in rat livers

( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	NTCP	SULT2 <sub>A1</sub>	GSTA <sub>2</sub>	CYP3 <sub>A11</sub>
正常	-	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.40	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.29
CCl <sub>4</sub> 模型	-	0.35 ± 0.10 <sup>2)</sup>	0.80 ± 0.51	0.28 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.19 ± 0.06 <sup>2)</sup>
痰热清注射液	2 <sup>5)</sup>	0.93 ± 0.16	1.80 ± 0.72	0.88 ± 0.18	0.54 ± 0.06 <sup>1)</sup>
痰热清注射液治疗	2 <sup>5)</sup>	0.59 ± 0.11 <sup>4)</sup>	1.36 ± 0.54	0.58 ± 0.13 <sup>4)</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>4)</sup>
甘利欣注射液治疗	3 <sup>5)</sup>	0.34 ± 0.16	1.03 ± 0.43	0.49 ± 0.21	0.26 ± 0.12
黄芩治疗	17.00	0.41 ± 0.14	1.09 ± 0.15	0.36 ± 0.05	0.19 ± 0.12
熊胆粉治疗	12.30	0.39 ± 0.16	1.52 ± 0.44 <sup>3)</sup>	0.72 ± 0.34 <sup>3)</sup>	0.14 ± 0.09
山羊角治疗	11.15	0.38 ± 0.20	1.04 ± 0.39	0.50 ± 0.22	0.20 ± 0.17
连翘治疗	5.28	0.68 ± 0.15 <sup>4)</sup>	1.50 ± 0.70	0.70 ± 0.22 <sup>4)</sup>	0.42 ± 0.13 <sup>4)</sup>
金银花治疗	5.00	0.52 ± 0.15	1.71 ± 0.34 <sup>3)</sup>	0.73 ± 0.26 <sup>4)</sup>	0.34 ± 0.12 <sup>3)</sup>

个中间体的药效不显著,但不能忽视其协同作用。根据痰热清注射液不同组分配伍药代动力学研究报道<sup>[24-25]</sup>,方中其他成分能够抑制黄芩苷体内消除,延长其体内药效作用时间,进一步说明方中 5 种中间体相互配伍发挥药效的重要性。

CYP3<sub>A11</sub>, SULT2<sub>A1</sub> 和 GSTA<sub>2</sub> 为药物和胆汁酸等代谢过程中的 I 相和 II 相代谢酶, CYP3<sub>A11</sub>, SULT2<sub>A1</sub> mRNA 表达下调提示 CCl<sub>4</sub> 所致的急性肝损伤导致代谢酶活性受损,肝细胞代谢药物与异源性物质功能降低,胆汁酸磺基化反应和与谷胱甘肽结合反应被抑制, GSTA<sub>2</sub> 催化的亲核性谷胱甘肽与 CCl<sub>4</sub> 代谢产生亲电子外源化学物的结合反应减弱<sup>[26-27]</sup>。经痰热清注射液给药治疗后, CYP3<sub>A11</sub> 和 GSTA<sub>2</sub> mRNA 表达量与模型组比较都是显著性升高,有利于改善肝脏胆汁酸代谢及清除肝内亲电子外源化学物,从而降低 CCl<sub>4</sub> 及其代谢产物造成的肝毒性,恢复肝功能。痰热清注射液的保肝作用与代谢相关基因 CYP3<sub>A11</sub> 和 GSTA<sub>2</sub> 表达增加有关,同理熊胆粉、连翘和金银花可能通过同样的方式改善肝脏药物与异源性物质代谢的功能。

肝细胞基底外侧的跨膜载体蛋白 NTCP 负责从血液中摄取胆汁酸和大量有机阴离子。CCl<sub>4</sub> 模型组 NTCP 相关基因的表达下调,限制了肝细胞内胆汁酸等化学物质的积累<sup>[28]</sup>。痰热清注射液和连翘中间体治疗后, NTCP 表达上调,考虑可能为肝功能好转后, NTCP 反馈性的向正常水平的回调。

本实验初步探讨了痰热清注射液的药效物质及可能的机制,与其调节胆汁酸摄取相关的转运体及代谢酶相关基因的表达有关,而这些转运蛋白及相

关酶类又受到多种肝细胞核因子和核受体的调控,因此痰热清注射液治疗肝损伤作用分子机制还有待于深入研究。中药是一个复杂体系,单味药材并不能完整体现整个复方的药效,所以后续研究除继续深入研究有效部位中单体成分的药效物质基础外,还需建立多部位、多成分、多靶点的药效学评价模型,不能忽视多种成分相互协同作用的结果。

[参考文献]

[1] 高益民,王忠山. 对痰热清注射液临床药理学初步评价[J]. 首都医药, 2004, 12(12): 44-46.

[2] 付万智. 痰热清注射液治疗病毒性肝炎高胆红素血症 30 例[J]. 中国中医急症, 2010, 19(7): 1220-1221.

[3] 高纯清,黄莉芳. 痰热清治疗黄疸型肝炎疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(15): 1661-1662.

[4] 程宝泉,樊薇,周涛,等. 痰热清注射液治疗急性胆囊炎临床观察[J]. 中国中医急症, 2005, 14(12): 1170-1198.

[5] 邓秀兰,钟相根,张晓晶,等. 痰热清注射液对小鼠免疫性肝损伤的防护作用[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 636-638.

[6] 钟相根,邓秀兰,张晓晶,等. 痰热清注射液对 ANIT 诱导大鼠急性肝损伤的防护作用[J]. 中成药, 2011, 33(5): 773-775.

[7] 盛云华,马静,张志超,等. 四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型的优化及痰热清注射液的保肝作用[J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(2): 221-225.

[8] 雷扬,周爱民,郭涛,等. 一种改良的 ANIT 急性肝损伤方法及痰热清注射液的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 179-182.

[9] 雷扬,陶艳艳,刘成海. 痰热清注射液对急性肝衰竭

- 小鼠的保护作用研究[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(4): 51-57.
- [10] 张振华, 钟萃萃, 徐英. 基于 HPLC-ESI-MS/MS 技术分析痰热清胶囊和痰热清注射液化学成分的差异[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 44-51.
- [11] 张振华, 钟萃萃, 徐英. HPLC 法同时测定痰热清胶囊中 7 种成分的含量[J]. 中国药房, 2017, 28(30): 4256-4260.
- [12] 钟萃萃, 刘绍勇, 张小利, 等. 痰热清胶囊 HPLC 指纹图谱研究[J]. 江苏科技信息, 2016, 20: 37-40.
- [13] 雷扬, 周爱民, 郭涛, 等. 痰热清注射液对急性肝损伤大鼠的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1226-1230.
- [14] Ohta Y, Nishida K, Sasaki E, et al. Attenuation of disrupted hepatic active oxygen metabolism with the recovery of acute liver injury in rats intoxicated with carbon tetrachloride [J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997, 95(2): 191-207.
- [15] Taira Z, Yabe K, Hamaguchi Y, et al. Effects of Sho-saiko-to extract and its components, Baicalin, baicalein, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, on pharmacokinetic behavior of salicylamide in carbon tetrachloride intoxicated rats [J]. Food Chem Toxicol, 2004, 42(5): 803-807.
- [16] Park S W, Lee C H, Kim Y, et al. Protective effect of baicalin against carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice [J]. J Pharmacol Sci, 2008, 106(1): 136-143.
- [17] Buko V U, Lukivskaya O Y, Naruta E E, et al. Protective effects of norursodeoxycholic acid versus ursodeoxycholic acid on thioacetamide-induced rat liver fibrosis [J]. J Clin Exp Hepatol, 2014, 4(4): 293-301.
- [18] Choi J H, Kim D W, Yun N, et al. Protective effects of hyperoside against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice [J]. J Nat Prod, 2011, 74(5): 1055-1060.
- [19] YANG C C, FANG J Y, HONG T L, et al. Potential antioxidant properties and hepatoprotective effects of an aqueous extract formula derived from three Chinese medicinal herbs against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 15(1): 106-113.
- [20] Bassoli B K, Cassolla P, Borba-Murad G R, et al. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia [J]. Cell Biochem Funct, 2008, 26(3): 320-328.
- [21] Kim H Y, Kim J K, Choi J H, et al. Hepatoprotective effect of pinoresinol on carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice [J]. J Pharmacol Sci, 2010, 112(1): 105-112.
- [22] 冯芹. 连翘苷元对四氯化碳大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(3): 426-430.
- [23] 张晓晶, 邓秀兰, 张宇忠, 等. 痰热清注射液对四氯化碳致大鼠急性肝损伤防护作用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(12): 191-193.
- [24] ZHANG F, SUN L, GAO S H, et al. LC-MS/MS analysis and pharmacokinetic study on five bioactive constituents of Tanreqing injection in rats [J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(10): 769-775.
- [25] 刘绍勇, 张小利, 张振华, 等. 痰热清注射液不同组分配伍对主要活性成分药动力学的影响[J]. 中草药, 2013, 44(21): 3030-3034.
- [26] Handschin C, Meyer U A. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors [J]. Pharmacol Rev, 2003, 55(4): 649-673.
- [27] CHAI J, DU X, CHEN S, et al. Oral administration of oleanolic acid, isolated from Swertia mussotii Franch, attenuates liver injury, inflammation, and cholestasis in bile duct-ligated rats [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(2): 1691-1702.
- [28] Aleksunes L M, Slitt A M, Cherrington N J, et al. Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride [J]. Toxicol Sci, 2005, 83(1): 44-52.

[责任编辑 周冰冰]