

甘遂半夏汤对大鼠肝功能及形态学的影响

王付^{1*}, 程秀娟², 王帮民³, 潘晓丽¹, 李安祥¹, 李晓燕¹

(1. 河南中医学院 经方研究所, 郑州 450046; 2. 河南中医学院, 郑州 450046;
3. 郑州大学 附属肿瘤医院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**探讨甘遂半夏汤水煎液对正常大鼠肝脏的慢性毒性作用。**方法:**将80只SD大鼠随机分为甘遂半夏汤高、中、低剂量组(37, 18.5, 9.25 g·kg⁻¹)及正常组, 每组20只, 各组大鼠采用等体积不等浓度ig, ig体积均为0.02 mL·g⁻¹。实验组ig给药, 正常组ig给予蒸馏水。给药90 d。最后1次给药后禁食15 h, 各组随机抽取一半大鼠, 取血, 采用全自动生化分析仪检测肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST), AST/ALT, 总胆红素(TBIL)和直接胆红素(DBIL), 及血脂指标胆固醇(CHO), 甘油三酯(TG), 高密度脂蛋白(HDL), 低密度脂蛋白(LDL); 取肝, HE染色观察大体形态和组织学形态。剩余动物停药后继续观察2周, 重复以上检查指标。**结果:**给药期, 与正常组比较, 甘遂半夏汤高剂量组ALT, AST, AST/ALT, TBIL和DBIL均明显升高($P < 0.01$), 中剂量组ALT, AST, DBIL($P < 0.05$)和AST/ALT均明显升高($P < 0.01$), 低剂量组无显著变化; 与正常组比较, 各剂量组CHO, TG, HDL, LDL无显著性变化; 随着剂量增大, 肝脏组织病理变化逐渐加重。恢复期, 各组大鼠各项检测指标及肝脏组织学形态无显著差异。**结论:**长期服用甘遂半夏汤可导致大鼠肝损伤, 对大鼠肝功能及肝组织形态学的影响存在着剂量依赖性, 小剂量长期使用影响较小, 随着剂量的增加, 影响的程度逐渐加重, 但损伤具有可逆性。

[关键词] 甘遂半夏汤; 肝功能; 形态

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0160-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080160

Effect of Gansui Banxia Tang on Functions and Morphology in Rats Liver WANG Fu^{1*}, CHENG Xiu-juan², WANG Bang-min³, PAN Xiao-li¹, LI An-xiang¹, LI Xiao-yan¹ (1. Henan College of Traditional Chinese Medicine (TCM) Classic Prescription Institute, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan College of TCM, Zhengzhou 450046, China; 3. The Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the chronic toxicity of Gansui Banxia Tang (GBT) on normal rat liver. **Method:** Eighty healthy SD rats were randomly divided into four groups: the normal group, the high-, middle-, and low-dose GBT groups (37, 18.5, 9.25 g·kg⁻¹) of 20 in each group. The corresponding medicines at 0.02 mL·g⁻¹ were intragastrically administered to rats for 90 days. After the last dose, blood samples of the half rats from each group were collected. The heart functions indexes including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), the ratio of AST/ALT, total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), and the blood lipid indexes including cholesterol (CHO), triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL) were detected. The morphology and histology of the liver were observed by HE staining. The remaining rats in each group were observed continuously for two weeks, and the above indexes were detected again. **Result:** In medicine taking, compared with the control group, the ALT, AST, AST/ALT, TBIL and DBIL had significant changes in high-dose GBT group ($P < 0.01$), the ALT, AST, DBIL ($P < 0.05$) and AST/ALT ($P < 0.01$) had significant changes in the middle-dose GBT group. The above indexes had no significant changes in the low-dose GBT group. The CHO, TG, HDL and LDL had no significant changes in all dose groups. The liver histopathological changes are gradually aggravated with the increase of the dose. While during the following

[收稿日期] 20140829(016)

[基金项目] 河南省科学技术厅科技攻关项目(2009A360015)

[通讯作者] * 王付, 教授, 从事经方配伍及临床应用研究, Tel: 13083602901, E-mail: 1034383171@qq.com

observation, all the above indexes had no significant changes in all dose GBT groups. **Conclusion:** GBT has good effect on liver function and morphology of rats in a dose-dependent manner by long-term medication. Small dosage has little influence, the influence degree aggravates gradually as the increase of the dose, while the damage is reversible.

[**Key words**] Gansui Banxia Tang; liver functions; morphology

甘遂半夏汤是《伤寒杂病论》中辨治留饮的重要用方之一,根据张仲景辨治病证表现可治疗现代医学中的肠结核、甲状腺炎^[1]等病。方由甘遂、半夏、芍药、炙甘草、蜂蜜所组成。方中用“甘遂与甘草”为传统中药学中“十八反”内容之一,为此笔者结合临床运用甘遂半夏汤治病体会^[2],再结合以往相关对甘遂半夏汤的研究则发现其研究仅仅局限于相反药对及单味药^[3]。本课题重点开展甘遂半夏汤方药配伍的整体性及其相互关联性的慢性毒性实验研究,观察其水煎液对大鼠的肝功能及形态学的毒性,为临床安全用药提供科学安全实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康SD大鼠80只,雌雄各半,体重(100±20)g,由河南省实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(豫)2010-0002。

1.2 药物及试剂 实验所需的中药材由河南中医学院第三附属医院提供,并经本院中药鉴定实验室陈随清教授鉴定为正品,药材批号20110012。丙氨酸氨基转移酶(ALT,南京神州英诺华科技有限公司,批号23502000),天门冬氨酸氨基转移酶(AST,南京神州英诺华科技有限公司,批号23502010),总胆红素(TBIL,南京神州英诺华科技有限公司,批号23502030),直接胆红素(DBIL,南京神州英诺华科技有限公司,批号23502050),低密度脂蛋白(LDL,南京神州英诺华科技有限公司,批号23502200),高密度脂蛋白(HDL,南京神州英诺华科技有限公司,批号23502190),胆固醇(CHO,南京神州英诺华科技有限公司,批号23502110),甘油三酯(TG,南京神州英诺华科技有限公司,批号23502120)。

1.3 仪器 DG302型自动生化分析仪(南京神州英诺华科技有限公司),TDL-5-A型电动离心机(上海安亭科学仪器厂),LEICA2025型轮转式切片机(德国徕卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 剂量与分组 剂量设计采取拟用临床剂量法(ACD法),根据同类药物或国外资料或推荐临床剂量,采用15,30,60倍临床剂量^[3]。取大鼠80只,适应性喂养1周后,随机分为正常组(等体积蒸馏水

代替)、低剂量组(相当于临床用量的15倍)、中剂量组(相当于临床用量的30倍)、高剂量组(相当于临床用量的60倍)4组,每组动物各20只,雌雄各10只,每笼5只。

2.2 药物制备方法 结合张仲景《金匮要略》所载甘遂半夏汤用量,依据《经方学用基本功》中甘遂半夏汤方的用量,电砂锅水煎煮然后浓缩所需浓度。具体制备方法如下:按生白芍15g,醋甘遂5g,法半夏12g,甘草5g的比例称取各药适量,加水浸泡2d,550W电砂锅恒温加热,水沸后以小火煎煮50min,过滤,第2次加8倍量的清水煎熬,水沸后小火煎熬30min,过滤,合并2次滤液,加适量的蜂蜜。最后,将所得水煎液浓缩成46.25%(0.4625g生药/mL),92.5%(0.925g生药/mL),185%(1.85g生药/mL)的溶液足量,分瓶装,冰箱保存备用,每次ig前水浴加热。

2.3 给药途径与方法 高、中、低剂量组分别按生药量37,18.5,9.25g·kg⁻¹的比例ig给药,每日1次,每100g体重大鼠ig2mL,即所需的给药质量浓度分别为1.85,0.925,0.4625g·mL⁻¹。正常组灌等体积的蒸馏水,每日按顺序ig给药1次,ig前禁食12d,每周连续ig6d,休息1d,持续90d。每周称体重2次,根据体重变化调整给药量。

2.4 检测指标及方法

2.4.1 肝功能检测 最后1次给药后禁食15h称重,每组各取一半动物(雌雄各5只)进行实验。适量水合氯醛麻醉后腹主动脉采血,离心,用全自动生化分析仪检测肝功能相关指标AST,ALT及AST/ALT,TBIL,DBIL,LDL,HDL,CHO,TG。

2.4.2 肝脏形态学观察 肝脏大体形状观察,采血后解剖大鼠,肉眼观察肝脏形状、体积大小、色泽、质地及有无隆起、水肿、充血等现象。肝脏组织学观察:取大鼠肝脏同一部位,称重,4%甲醛溶液固定48h,修剪组织切片,乙醇脱水,常规石蜡包埋,组织切片厚6μm,HE染色,光镜观察。

2.4.3 可逆性观察 余下动物停药,正常饲养2周后,同上次操作检测各项指标,以了解毒性反应的可逆程度和可能出现的迟缓性毒性。

2.5 统计学分析 采用SPSS 13.0统计分析软件

处理实验结果。各项检测指标的测定值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较,资料服从正态分布和方差齐采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法,方差不齐采用 Tamhane 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠 ALT, AST 及 AST/ALT 的影响 与正

表 1 甘遂半夏汤对大鼠 ALT, AST 及 AST/ALT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Gansui Banxia Tang on ALT, AST and AST/ALT in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	时间	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ALT/ $U \cdot L^{-1}$
正常	给药期	-	45.7 ± 7.03	119.62 ± 14.42	2.57 ± 0.87
	恢复期	-	49.83 ± 5.94	108.16 ± 19.34	2.23 ± 0.85
甘遂半夏汤	给药期	37	51.3 ± 5.85 ¹⁾	133.80 ± 11.88 ¹⁾	2.76 ± 0.74
	恢复期	37	39.12 ± 7.50	84.37 ± 11.19	2.05 ± 0.58
	给药期	18.5	49.55 ± 7.44	125.88 ± 13.07 ¹⁾	2.70 ± 0.72 ¹⁾
	恢复期	18.5	46.33 ± 7.19	98.88 ± 13.65	2.58 ± 0.41
	给药期	9.25	50.44 ± 6.12 ^{2,3)}	113.77 ± 13.16	2.33 ± 0.29
	恢复期	9.25	49.25 ± 5.75	103.25 ± 12.31	2.22 ± 0.99

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与高剂量组比较²⁾ $P < 0.01$;与中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对大鼠 TBIL, DBIL 的影响 与正常组比较,甘遂半夏汤高剂量组 TBIL, DBIL 均显著升高 ($P < 0.01$),中剂量组 DBIL 亦显著升高 ($P < 0.05$)。与甘遂半夏汤高剂量组相比,低剂量组大鼠 TBIL 显著降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 甘遂半夏汤对大鼠 TBIL, DBIL 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Gansui Banxia Tang on TBIL, DBIL in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	时间	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	DBIL/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
正常	给药期	-	5.46 ± 1.59	1.78 ± 1.22
	恢复期	-	4.60 ± 1.22	1.05 ± 0.57
甘遂半夏汤	给药期	37	8.97 ± 2.91 ¹⁾	4.59 ± 1.09 ¹⁾
	恢复期	37	5.37 ± 2.07	1.63 ± 0.27
	给药期	18.5	8.57 ± 2.50	3.31 ± 1.11 ²⁾
	恢复期	18.5	5.57 ± 2.02	1.67 ± 0.26
	给药期	9.25	6.42 ± 1.22 ³⁾	3.73 ± 1.06
	恢复期	9.25	5.75 ± 1.13	1.47 ± 0.22

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 对大鼠 LDL, HDL 的影响 与正常组比较,甘遂半夏汤高、中、低剂量组大鼠的 LDL, HDL 均有所变化,但无显著性差异。恢复期各组大鼠也无显著的差异。见表 3。

常组比较,甘遂半夏汤高、中剂量组 ALT, AST 和 AST/ALT 均明显升高 ($P < 0.01$),低剂量组无显著性变化。与高剂量组比较,低剂量组 ALT 显著下降 ($P < 0.01$),与中剂量组比较,低剂量组 ALT 明显低于中剂量组 ($P < 0.05$)。恢复期各组大鼠 ALT, AST 及 AST/ALT 相比无显著差异。见表 1。

表 3 甘遂半夏汤对大鼠 LDL, HDL 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Gansui Banxia Tang on LDL, HDL in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	时间	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	LDL/ $mmol \cdot L^{-1}$	HDL/ $mmol \cdot L^{-1}$
正常	给药期	-	0.53 ± 0.15	0.80 ± 0.14
	恢复期	-	0.67 ± 0.10	0.83 ± 0.04
甘遂半夏汤	给药期	37	0.60 ± 0.12	0.80 ± 0.14
	恢复期	37	0.68 ± 0.19	0.88 ± 0.09
	给药期	18.5	0.53 ± 0.11	0.79 ± 0.20
	恢复期	18.5	0.64 ± 0.18	0.87 ± 0.12
	给药期	9.25	0.56 ± 0.12	0.79 ± 0.09
	恢复期	9.25	0.50 ± 0.08	0.875 ± 0.10

3.4 对大鼠 CHO, TG 的影响 与正常组比较,甘遂半夏汤高、中、低剂量组大鼠的 CHO, TG 均有所变化,但无显著性差异。恢复期各组大鼠也无显著的差异。见表 4。

3.5 对大鼠肝脏形态学的影响

3.5.1 大体形态 ig 90 d 后,解剖大鼠,观察肝脏大体形态:各组动物肝脏标本,结构完整,表面光滑,色泽正常,体积、形状、大小、质地未见明显异常,切面被膜无外翻,组织无隆起,未见水肿、糜烂及脱落等病变。

3.5.2 组织学形态 显微镜下显示给药期甘遂半夏汤高剂量组大鼠肝小叶结构基本正常,可见肝细

表 4 甘遂半夏汤对大鼠 CHO, TG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

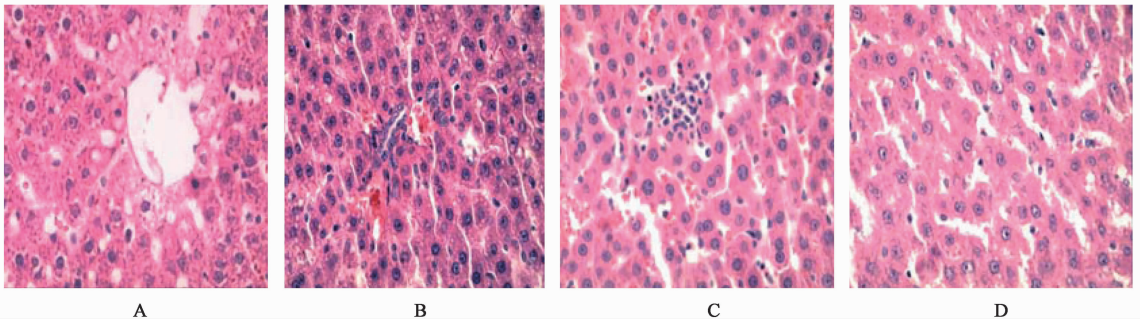
Table 4 Effects of Gansui Banxia Tang on CHO, TG in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	时间	剂量 /g·kg ⁻¹	CHO /mmol·L ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹
正常	给药期	-	1.75 ± 0.15	0.72 ± 0.08
	恢复期	-	1.76 ± 0.16	0.48 ± 0.13
甘遂半夏汤	给药期	37	1.76 ± 0.16	0.41 ± 0.09
	恢复期	37	1.75 ± 0.35	0.60 ± 0.13
	给药期	18.5	1.92 ± 0.30	0.49 ± 0.14
	恢复期	18.5	1.86 ± 0.24	0.69 ± 0.15
	给药期	9.25	1.76 ± 0.17	0.36 ± 0.07
	恢复期	9.25	1.63 ± 0.34	0.67 ± 0.20

胞脂肪变性,胞浆中可见较为细小的脂肪滴,偶见肝细胞点状坏死,伴淋巴细胞浸润,肝细胞无坏死等损伤性改变,汇管区未见纤维组织增生;中剂量组大鼠肝小叶结构基本正常,可见肝细胞脂肪变性,胞浆中可见较为细小的脂肪滴,肝细胞无坏死等损伤性改

变,汇管区未见炎性细胞浸润和纤维组织增生;低剂量组大鼠肝脏的肝小叶结构基本正常,偶可见肝细胞脂肪变性,肝细胞无坏死等损伤性改变,汇管区未见炎性细胞浸润和纤维组织增生;正常组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞索以中央静脉为中心,成辐射状排列,汇管区可见小叶间血管和胆管,肝细胞无变性、坏死等损伤性改变,汇管区未见炎性细胞浸润和纤维组织增生。

恢复期甘遂半夏汤高剂量组大鼠肝小叶结构正常,可见肝细胞脂肪变性,肝细胞无坏死等损伤性改变,汇管区未见炎性细胞浸润和纤维组织增生;中剂量组大鼠肝小叶结构正常,偶见肝细胞脂肪变性,胞浆中较为细小的脂肪滴,肝细胞无坏死等损伤性改变,汇管区未见炎性细胞浸润和纤维组织增生;低剂量组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞无变性、坏死等损伤性改变,汇管区未见炎性细胞浸润和纤维组织增生;正常组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞无变性、坏死等损伤性改变,汇管区未见炎性细胞浸润和纤维组织增生。见图 1,2。



A. 甘遂半夏汤 37 g·kg⁻¹组;B. 甘遂半夏汤 18.5 g·kg⁻¹组;C. 甘遂半夏汤 9.25 g·kg⁻¹组;D. 正常组(图 2 同)

图 1 甘遂半夏汤对大鼠给药期肝脏组织的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effects of Gansui Banxia Tang on dosing phase of liver tissue in rats(HE, ×400)

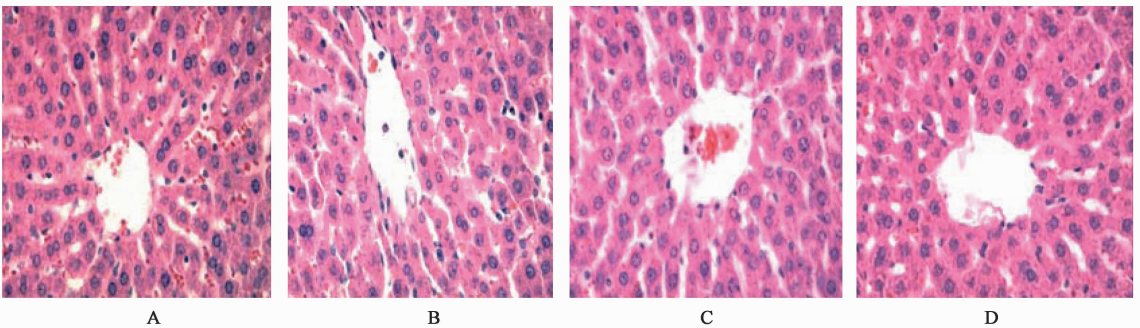


图 2 甘遂半夏汤对大鼠恢复期肝脏组织的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Effects of Gansui Banxia Tang on recovery of liver tissue in rats(HE, ×400)

4 讨论

肝脏是人体酶含量最丰富的器官,肝脏受到损伤,细胞内的酶类会释放到血液中,造成血清中酶活

性的异常升高,因此血清酶学检查是用来探查肝细胞是否受到损害最实用的检测手段。用于肝功能检查的主要是 ALT 和 AST。ALT 主要分布于肝细胞

浆中,AST主要分布于线粒体和胞浆中。正常肝细胞由于细胞膜的包裹,ALT和AST不会释放入血。当肝细胞轻度病变,膜通透性增加时,ALT和AST会从细胞内逸出,ALT比AST上升幅度大,AST/ALT下降,因为只有细胞浆内的酶释放;当肝细胞严重病变、坏死时,线粒体内AST也释放入血,以致AST大幅升高,AST/ALT增大。AST/ALT是临床应用较多的反映肝细胞损害程度的指标^[5]。本实验结果表明,给药期高、中剂量组ALT,AST和AST/ALT均较正常组升高,高剂量组比中剂量组升高更显著,说明长期大剂量服用甘遂半夏汤,可导致大鼠肝细胞损伤,且损伤程度存在着剂量依赖性,小剂量长期使用影响较小,随着剂量的增加,影响的程度逐渐加重。与本实验的肝组织病理形态学改变相符。王茜等^[6-7]的研究亦表明甘遂半夏汤对肝脏ALT,AST及组织形态有影响,而甘遂与半夏不同比例配伍的甘遂半夏汤对肝脏的损伤程度不同。

无论是体内代谢物,还是外源性药物,它们首先都是由肝细胞摄取,再转化或结合,再经肝细胞微细胆管转运系统排泄至胆管,或经肝细胞分泌至血中。肝实质受损时,肝脏分泌排泄功能发生相应变化。临床上常检测血液中的TBIL和DBIL来了解肝脏排泄功能的变化。本实验结果表明,给药组与正常组相比,甘遂半夏汤高剂量组TBIL,DBIL均显著升高,中剂量组DBIL亦显著升高。说明甘遂半夏汤高、中剂量组对大鼠肝脏有一定的损害,影响大鼠肝脏的分泌和排泄功能。

肝脏是脂类代谢的场所,当肝细胞损伤时,脂类代谢发生异常,因此测定血浆脂类成分,是评价肝脏脂类代谢功能的重要手段,CHO,TG是常用的检测指标。另外肝脏可合成部分HDL和LDL。胆固醇必须和脂蛋白结合才能运送到体内各部分。LDL的主要功能是把胆固醇从肝脏运送到全身组织细胞,HDL则是将各组织细胞的胆固醇运送回肝脏代谢。LDL和HDL的测定可以了解肝脏的代谢情况。本实验结果表明,给药组与正常组相比,甘遂半夏汤高、中、低剂量组大鼠的CHO,TG,HDL和LDL均无

显著性差异,说明长期服用甘遂半夏汤对肝脏的脂类代谢无显著影响。

本实验恢复期各组大鼠的各项肝功能检测指标及肝脏组织形态均无显著差异,结合给药期检测结果,说明甘遂半夏汤对大鼠造成的肝损害是一种可逆性损害。停药2周后,肝功能明显好转,肝组织的损害也明显减轻。

综合以上结果的分析,可以看出长期服用甘遂半夏汤可导致大鼠肝损伤,对大鼠肝功能及肝组织形态学的影响存在着剂量依赖性,小剂量长期使用影响较小,随着剂量的增加,影响的程度逐渐加重,但损伤具有可逆性。笔者经过多年临床应用甘遂半夏汤,只要审明病变证机并重视组方配伍用药^[8]特点而用之,常常能取得良好治疗效果^[2,9]。

[参考文献]

- [1] 王付,王帮众.经方运用甘遂配甘草的探索与实践[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):298-299.
- [2] 王付.经方合方辨治疑难杂病[M].郑州:河南科学技术出版社,2014:81-85.
- [3] 黄文权,程相岭,肖鸿,等.甘草甘遂伍用对大鼠心肝肾肾功能及形态的影响[J].第三军医大学学报,2001,23(12):1439-1441.
- [4] 杜贵友,方文贤.有毒中药现代研究与合理应用[M].北京:人民卫生出版社,2003:85.
- [5] 陈文彬.诊断学[M].5版.北京:人民卫生出版社,2001:394-403.
- [6] 王茜,钟赣生,王宏蕾,等.甘遂与甘草不同比例配伍对癌性腹水模型大鼠肝功能的影响[J].科技导报,2012,31(14):201-205.
- [7] 王茜,钟赣生,王宏蕾,等.甘遂半夏汤中甘遂与甘草不同比例配伍对癌性腹水模型大鼠生物效应影响的研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(4):177-181.
- [8] 王付.经方学用基本功[M].北京:人民军医出版社,2012:279.
- [9] 刘宾,孙宁,王付.甘遂半夏汤的临床应用[J].河南中医,2014,38(12):2297-2298.

[责任编辑 周冰冰]