

· 药理 ·

健脾活血方抗酒精性肝损伤脂质过氧化主效应中药分析

傅琪琳^{1,3}, 胡义扬^{1,2}, 皇甫¹, 徐琳¹, 王文静¹, 曹健美¹, 彭景华¹, 赵瑜¹, 姚东升¹, 冯琴^{1*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院·上海中医药大学肝病研究所, 上海 201203;

2. 上海市中医临床重点实验室, 上海 201203; 3. 浙江中医药大学附属第二医院, 杭州 310005)

[摘要] 目的:探索具有显著抗酒精性肝损伤作用的中药复方健脾活血方抗脂质过氧化的主效应中药,并分析相关作用机制。方法:采用均匀设计法及 Lieber-DeCarli 乙醇液体饲料诱导的大鼠乙醇性肝损伤模型,以肝组织丙二醛(MDA)含量作为效应指标筛选主效应中药,并再次以该模型验证其药效;进一步检测肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮合酶(NOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及血清铁离子(Fe^{2+})含量以分析主效应中药抗脂质过氧化的机制。结果:含 8 味中药的健脾活血方中“抗脂质过氧化”主效应药物组合为:葛根、泽泻、五味子、姜黄(剂量比为 250:50:17:50),验证及药理分析实验显示:与模型组相比,抗脂质过氧化主效应中药组肝组织 MDA, NOS, iNOS 及血清 Fe^{2+} 含量显著降低, SOD, GSH-Px 活性显著升高。结论:健脾活血方 8 味中药中对大鼠乙醇性肝损伤模型“抗脂质过氧化”的主效应中药组合为“葛根 + 泽泻 + 五味子 + 姜黄”,其药理机制在于抑制促氧化物质 NOS, iNOS 及血清 Fe^{2+} 产生,增加抗氧化自由基清除酶 SOD, GSH-Px 活性。

[关键词] 健脾活血方; 脂质过氧化; 主效应中药; 作用机制; 均匀设计

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0186-06

[doi] 10.11653/syjf2013130186

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130424.1458.001.html>

[网络出版时间] 2013-04-24 14:58

Analysis of Major Effective Compositions in Jianpi Huoxue Decoction against Lipid Peroxidation in Alcoholic Liver Injury

FU Qi-lin^{1,3}, HU Yi-yang^{1,2}, HUANG Fu¹, XU Lin¹, WANG Wen-jing¹, CAO Jian-mei¹,
PENG Jing-hua¹, ZHAO Yu¹, YAO Dong-sheng¹, FENG Qin^{1*}

(1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203, China;

3. Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the major effective compositions in Jianpi Huoxue decoction against lipid peroxidation which can protect alcohol-induced liver injury remarkably and its possible action mechanism. **Method:** The rats were given Lieber-DeCarli liquid diet daily to make the alcoholic liver injury model. And Uniform design was adopted to design the experiments. malonyldialdehyde (MDA) in liver tissue was detected as the index. The same mode was used to screen the major herbs and verify the efficacy. The superoxide dismutase (SOD), nitric oxide synthase (NOS), induced nitric oxide synthase (iNOS), glutathione peroxidase (GSH-

[收稿日期] 20121107(003)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(30801536);上海市教委创新团队(第一期):中医肝病团队;国家中医药管理局中医肝病重点学科项目(sh2010)

[第一作者] 傅琪琳, 博士, 住院医师, 从事中医药防治肝病研究, Tel:18858187827, E-mail: fuqilin2271063@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 冯琴, 博士, 副研究员, 从事中医药防治肝病研究, Tel:021-20256526, Fax:021-20256521, E-mail: fengqin1227@163.com

Px) in liver and Fe^{2+} in serum were detected. **Result:** Puerariae Lobatae Radix, Alismatis Rhizoma, Schisandrae Chinensis Fructus, and turmeric were the major herbs in Jianpi Huoxue decoction against lipid peroxidation. And the verification experiment showed that compared with the model group, the major herbs could reduce the MDA, NOS, iNOS and Fe^{2+} significantly and promote the activity of SOD, GSH-Px apparently. **Conclusion:** The combination of Puerariae Radix, Alismatis Rhizoma, Schisandrae Chinensis Fructus, and turmeric were the major effective compositions of Jianpi Huoxue decoction against lipid peroxidation. The possible action mechanism may lie in inhibiting NOS, iNOS and Fe^{2+} in serum which promote oxidation, and increase the activity of free radical scavenger SOD, GSH-Px which provide anti-oxidation.

[**Key words**] Jianpi Huoxue decoction; lipid peroxidation; the major effective herbs; action mechanism; uniform design

多途径、多靶位的作用特点是中药复方治疗复杂性疾病的特色和优势,然而其综合药理效应终究是复方中特定的物质基础反应。复方产生具体的某种药理效应肯定存在最主要的效应物质(方中特定的某味或某几味中药)。“健脾活血方”是长期以来临床治疗乙醇性肝损伤疗效确切的中药复方^[1],前期系列基础研究已经证实^[2-4],该方对 Lieber-Decarli 乙醇饲料诱导的乙醇性肝损伤具有“抗脂质过氧化”、“改善肠渗漏”及“抑制内毒素二次攻击”等多途径综合药理效应。健脾活血方中针对乙醇性肝损伤“脂质过氧化”、“肠渗漏”等病理环节分别是全方 8 味药中的哪几味药物起主要作用,通过什么机制起作用?笔者课题组前期研究证实采用数学模型均匀设计方法可以分析中药复方某特定药理环节主效应中药^[5],并运用了 Lieber-Decarli 乙醇饲料诱导的大鼠肝损伤模型结合均匀设计数学模型分析了健脾活血方中改善乙醇性肠渗漏的主效应中药^[6],本文探讨了健脾活血方中抗脂质过氧化的主效应中药筛选验证及作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,SPF 级,(200 ± 10) g,购自必凯实验动物有限公司,合格证号 SCXK(沪)2008-0016,大鼠合格证号 SYXK20090069。实验大鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心。

1.2 药物及制备 健脾活血方组成:白术、丹参、枳壳、白芍、葛根、泽泻、五味子、姜黄。白术(浙江,批号 HY2010061101)、丹参(山东,YT2010011307)、枳壳(江西,HY2010033101)、白芍(安徽,HP201004223)、葛根(安徽,HY2010040201)、泽泻(四川,LY2010040313)、五味子(辽宁,DH2010061304)、姜黄(福建,DH2010031909)。中药购自上海华宇药业有限公司。

各味药单独提取,其中白术、枳壳、姜黄 60% 醇

提;五味子 70% 醇提;丹参、泽泻、葛根、白芍水提。

①白术、枳壳、姜黄第 1 次加 10 倍量 60% 乙醇浸泡 1 h,回流提取,第 1 次提取 2 h,滤过,第 2 次加 8 倍量 60% 乙醇,提取 1 h,滤过,合并 2 次滤液,回收乙醇(旋转蒸发仪 55 r·min⁻¹,60 °C,0.08 MPa);②五味子第 1 次加 10 倍量 70% 乙醇浸泡 1 h,回流提取,第 1 次提取 2 h,滤过,第 2 次加 8 倍量 70% 乙醇,提取 1 h,滤过,合并 2 次滤液,回收乙醇;③丹参、葛根、泽泻、白芍加 8 倍量水浸泡 30 min,加热煮沸后,文火煎煮 1.5 h,滤过;药渣加 6 倍量水加热煮沸后,文火煎煮 1.5 h,滤过;合并两次滤液,浓缩至药液与原药材比例 1:1,冷藏备用。临用时按照均匀设计各组药物配比、健脾活血方及抗脂质过氧化主效应中药组合药物配比合并醇提液及水提液,配成相应的药液。

1.3 试剂 肝组织丙二醛(MDA)检测试剂盒(批号 20100620),总蛋白测定试剂盒(考马斯亮蓝法,批号 P0012),血清丙氨酸转氨酶(ALT)测定试剂盒(批号 20100522),血清天冬氨酸转氨酶(AST)测定试剂盒(批号 20100522),超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(批号 20100807),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号 20100626),一氧化氮合酶(NOS)测定试剂盒(批号 20100604),诱导型一氧化氮合酶(iNOS)测定试剂盒(批号 20100604),血清铁测定试剂盒(批号 20100620),均购自南京建成生物制品研究所。甘油三酯(TG)试剂盒,浙江东欧生物工程有限公司(批号 2010120002)。

1.4 仪器 LEICA ASP300 自动脱水机、LEICA EG1160 石蜡包埋机、轮转切片机(RM2035)、HI1210 恒温水浴、HI1220 烤片机(购自德国 Leica 公司)。低温高速离心机(L.0R,德国 Heraeus 公司)。倒置显微镜(37 × B)、AA-200 分析电子天平(美国 Denver 公司)。XHF-1 高速分散器(上海金

达生化仪器厂)。pH 计(Beckmanwc 公司)。M5 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

2 方法

2.1 模型制备 采用 Lieber-DeCarli 乙醇液体饲料饲养 6 周,诱导大鼠乙醇性肝损伤模型,具体饲料配方及方法参照文献[7]。

2.2 主效应中药“筛选实验”

2.2.1 均匀设计筛选实验方案 根据均匀实验设计方案选用 U17(17¹⁶)表,将方中 8 味中药作为考察因子,以 X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 分别代表白术,丹参,枳壳,白芍,葛根,泽泻,五味子,姜黄,每个因子各取 16 个水平(水平为大鼠每日给药剂量),X2, X4, X5 剂量范围为 1.33 ~ 2.50 g·kg⁻¹, X3, X6, X8 为 0.5 ~ 1.67 g·kg⁻¹, X1 为 0.83 ~ 2.0 g·kg⁻¹, X7 为 0.17 ~ 1.33 g·kg⁻¹。同时根据 U17(17¹⁶)使用表安排各因子和水平,进行组方设计,得到表 3 的均匀设计实验方案,其中一列为一种药,一行就是一种组方,按表中行数值取相应克数的药混合即得此组方,共 16 组。见表 1。

表 1 均匀设计实验方案 g

组方号	白术 (X1)	丹参 (X2)	枳壳 (X3)	白芍 (X4)	葛根 (X5)	泽泻 (X6)	五味子 (X7)	姜黄 (X8)
组 1	0.830	1.830	1.170	2.170	1.330	0.670	1.000	1.500
组 2	1.000	2.500	0.670	1.830	1.330	0.830	0.500	1.170
组 3	1.170	1.830	1.500	1.330	1.500	1.170	1.330	0.830
组 4	1.330	2.500	0.830	2.330	1.500	1.330	0.830	0.500
组 5	1.500	1.670	1.670	2.000	1.670	1.670	0.330	1.500
组 6	1.670	2.330	1.170	1.500	1.670	0.500	1.330	1.170
组 7	1.830	1.670	0.500	2.500	1.830	0.670	0.833	0.830
组 8	2.000	2.330	1.330	2.170	1.830	1.000	0.330	0.500
组 9	0.830	1.500	0.830	1.670	2.000	1.170	1.170	1.670
组 10	1.000	2.170	1.670	1.330	2.000	1.500	0.670	1.330
组 11	1.170	1.500	1.000	2.330	2.170	1.670	0.170	1.000
组 12	1.330	2.170	0.500	1.830	2.170	0.500	1.170	0.670
组 13	1.500	1.330	1.330	1.500	2.330	0.830	0.670	1.670
组 14	1.670	2.000	0.670	2.500	2.330	1.000	0.170	1.330
组 15	1.830	1.330	1.500	2.000	2.500	1.330	1.000	1.000
组 16	2.000	2.000	1.000	1.670	2.500	1.500	0.500	0.670

2.2.2 主效应中药“筛选”实验动物分组、给药及取材 SD 大鼠 95 只随机分正常组(5 只),无乙醇液体饲料对照组(5 只),Lieber-DeCarli 乙醇液体饲料造模组(85 只),第 4 周开始将存活的造模组大鼠随机分均匀设计 1 ~ 16 组及模型组。均匀设计实验

设正常组,无乙醇液体饲料对照组及模型组作为模型制备情况监测。

从第 4 周起均匀设计各组按 10 mL·kg⁻¹ 体重 ig 各配方药物,每日 1 次,正常组、无乙醇液体饲料对照组及模型组灌服等量高压灭菌饮用水,连续 3 周。

实验结束后称取动物体重,用 2% 戊巴比妥钠 3 mL·kg⁻¹ ip 麻醉,打开腹腔,下腔静脉采血制备血清,Eppendorf 管分装, - 70 °C 保存。另取下肝、脾,在肝右叶同一位置切取小块组织,置入 10% 中性福尔马林缓冲液中固定。在肝左叶同一位置切取小块组织, - 70 °C 低温保存。其余肝组织分装于 Eppendorf 管中, - 70 °C 低温保存。

2.2.3 肝组织 MDA 含量检测 MDA 含量采用生化试剂盒方法检测。

2.3 主效应中药药效“验证”实验大鼠分组、造模、给药及取材方法及指标检测 从 2.2.2 实验获得健脾活血方中“抗脂质过氧化主效应中药”,再次采用 Lieber-DeCarli 液体饲料诱导的大鼠乙醇性肝损伤模型,验证其抗脂质过氧化的药效。研究分正常组,模型组,“抗脂质过氧化主效应中药组”、健脾活血方组,每组各 10 只大鼠。造模、用药及取材方法同 2.2 实验。

大鼠血清 AST 及 ALT 活性,肝组织 TG 及 MDA 含量,SOD 及 GSH-Px 活性,肝组织 NOS, iNOS 及血清铁含量均采用生化试剂盒方法检测。

肝脏脂肪变性炎症程度评分参照中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和乙醇性肝病学组制定的《乙醇性肝病诊疗指南(2010 年修订版)》病理分级标准^[8],肝脂肪变程度:依据脂肪变性肝细胞占肝组织切片的比例分为 4 度(F0 ~ 4),依次计 0 ~ 4 分,F0: < 5% 肝细胞脂肪变;F1: 5% ~ 33% 肝细胞脂肪变;F2: 33% ~ 66% 肝细胞脂肪变;F3: 66% ~ 75% 肝细胞脂肪变;F4: > 75% 肝细胞脂肪变。

2.4 统计学方法 数据均采用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较使用单因素方差分析;组间两两比较使用 *q* 检验;病理积分采用秩和检验;均匀设计筛选实验采用逐步回归分析,以 $\alpha = 0.05$ 为显著水准进行统计检验。

3 结果

3.1 主效应中药“筛选”实验

3.1.1 无乙醇饲料对照组与乙醇饲料模型组大鼠血清 AST,ALT 活性和肝组织 MDA 含量 乙醇饲料模型组血清 AST,ALT 活性和肝组织 MDA 含量显著

高于无乙醇液体饲料对照组 ($P < 0.05$),提示乙醇性肝损伤造模成功模型,且伴有显著的脂质过氧化损伤(见表2)。

3.1.2 各组大鼠肝组织 MDA 含量 均匀设计药物 1~16 各组肝组织 MDA 含量依次为 20.15, 23.86, 30.79, 28.44, 27.79, 21.50, 19.03, 18.78, 31.67, 19.63, 15.35, 12.46, 13.49, 14.77, 15.47, 12.90 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

3.1.3 肝组织 MDA 含量回归方程及主效应中药分析结果 根据均匀设计各组肝组织 MDA 含量,运用 SPSS 16.0 软件进行逐步回归分析,获得回归方程为: $Y = 32.914 - 110.806X5 + 654.126X6X7 + 312.614X6X8$,根据方程,纳入的考察因子为 X5(葛根),X6(泽泻),X7(五味子),X8(姜黄),提示健脾活血方中“抗脂质过氧化”主效应药物组合为: X5(葛根),X6(泽泻),X7(五味子),X8(姜黄),且最大限度降低肝组织 MDA 的药物剂量为“葛根 2.5 g + 泽泻 0.5 g + 五味子 0.17 g + 姜黄 0.5 g”(剂量为每 1 kg 大鼠每日给药量)。

3.2 主效应中药验证实验

表2 各组大鼠血清 AST,ALT 活性和肝组织 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALT/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$
无乙醇饲料对照	5	64.4 ± 11.9	8.5 ± 5.4	11.85 ± 1.82
乙醇饲料模型	4	83.6 ± 27.5 ¹⁾	48.4 ± 17.6 ²⁾	23.00 ± 10.47 ¹⁾

注:与无乙醇饲料对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表3 各组大鼠血清 AST,ALT 及肝组织 TG,MDA 变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	ALT/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	肝组织 TG/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	肝组织 MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$
无乙醇饲料对照	10	91.47 ± 8.52	14.98 ± 7.52	20.05 ± 5.20	38.95 ± 4.23
乙醇饲料模型	10	106.92 ± 15.33 ²⁾	35.65 ± 8.12 ²⁾	103.31 ± 21.76 ²⁾	44.47 ± 3.56 ¹⁾
抗脂质过氧化主效应中药	10	77.25 ± 9.76 ⁴⁾	25.83 ± 10.84 ⁴⁾	79.41 ± 25.75 ³⁾	35.77 ± 7.23 ³⁾
健脾活血方	9	97.36 ± 7.58	24.04 ± 8.98 ⁴⁾	75.212 ± 24.90 ³⁾	35.64 ± 4.14 ³⁾

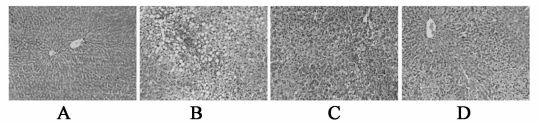
注:与无乙醇饲料对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与乙醇饲料模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;抗脂质过氧化主效应中药剂量:3.67 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,健脾活血方中药剂量:9 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

3.2.3 各组大鼠肝组织病理变化 乙醇液体饲料组大鼠视野内 1/2 以上的肝细胞出现大泡型或小泡型脂肪变性,以肝腺泡 3 带为中心,大部分肝细胞变性肿胀与气球样变,视野内有时可见肝细胞坏死及炎细胞浸润;“抗脂质过氧化”主效应中药组肝细胞脂肪变性程度较模型组显著减轻,炎症损伤程度有减轻趋势(图 1)。

3.2.4 各组大鼠肝脏脂肪变性程度半定量分析 参照中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和乙醇性肝病学组制定的《乙醇性肝病诊疗指南(2010 年修订

3.2.1 各组大鼠死亡情况,进食量及体重 在造模过程中各组大鼠进食量无明显差异,其所摄入的乙醇量和热卡也大致相等,排除了饮食及乙醇量的差异对实验结果的影响。造模开始时各组大鼠体重无明显差异,造模结束时,各组大鼠体重也无明显差异。在造模第 5 周健脾活血方组有 1 只大鼠因 ig 不当死亡。

3.2.2 各组大鼠血清肝功能,肝组织 TG 及 MDA 含量变化 与无乙醇饲料对照组相比,乙醇液体饲料模型组血清 ALT,AST 活性及肝组织 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$);与乙醇液体饲料模型组相比,“抗脂质过氧化”主效应中药组均能显著降低 ALT,AST 活性 ($P < 0.01$),健脾活血方能显著降低血清 ALT,AKP 活性(表 2)。与正常组及无乙醇饲料对照组相比,乙醇液体饲料模型组肝组织 MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$),抗脂质过氧化主效应中药组及健脾活血方组均较模型组显著降低 ($P < 0.05$),抗脂质过氧化主效应中药组与降低 MDA 幅度与健脾活血方两组间无显著差异,疗效相当(表 3)。



A. 无乙醇饲料对照;B. 乙醇饲料模型;
C. 抗脂质过氧化主效应中药 3.67 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$;
D. 健脾活血方抗脂质过氧化主效应中药 9 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

图1 各组大鼠肝组织病理变化(HE, ×200)

版)》病理分级标准^[8]统计各组脂肪变性程度。结果显示抗脂质过氧化主效应中药组及健脾活血方组脂肪变性积分与乙醇饲料模型组肝组织相比均有显

著统计学差异 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 各组肝组织脂肪变性积分

组别	剂量		脂肪变性积分				
	/g·kg ⁻¹	n	0	1	2	3	4
无乙醇饲料对照	-	10	10	0	0	0	0
乙醇饲料模型	- ¹⁾	10	0	0	4	6	0
抗脂质过氧化中药	3.67 ²⁾	10	0	6	4	0	0
健脾活血方	9 ²⁾	9	0	7	2	0	0

注:与无乙醇饲料对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与乙醇饲料模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

表 5 各组大鼠肝组织 SOD, GSH-Px 活性, NOS, iNOS, 血清 Fe²⁺ 含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	SOD/U·mg ⁻¹	GSH-Px/U·g ⁻¹	NOS/U·mg ⁻¹	iNOS/U·mg ⁻¹	血清 Fe ²⁺ /mg·L ⁻¹
无乙醇饲料对照	-	10	473.95 ± 18.01	300.81 ± 30.25	3.79 ± 0.82	4.61 ± 1.17	1.97 ± 0.32
乙醇饲料模型	-	10	433.00 ± 39.54 ¹⁾	240.46 ± 17.43 ²⁾	18.23 ± 1.63 ²⁾	20.92 ± 3.46 ²⁾	2.47 ± 0.48 ²⁾
抗脂质过氧化中药	3.67	10	480.05 ± 34.18 ³⁾⁵⁾	270.36 ± 36.49 ³⁾	14.93 ± 2.92 ⁴⁾	17.39 ± 3.78 ³⁾	2.08 ± 0.21 ³⁾
健脾活血方	9	9	430.04 ± 24.16	281.04 ± 43.91 ³⁾	13.23 ± 2.04 ⁴⁾	14.97 ± 3.78 ⁴⁾	1.63 ± 0.34 ⁴⁾

注:与无乙醇饲料对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与乙醇饲料模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与健脾活血方组比较⁵⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

前期研究已经证实中药复方健脾活血方对乙醇性肝损伤有多途径药理效应,本研究运用数学模型均匀设计法,探讨健脾活血方针对乙醇性肝损伤重要的病理环节之一“脂质过氧化”的主要效应中药,并进一步分析效应药物发挥抗脂质过氧化药理作用的主要环节点。

由于 MDA 是强毒力的脂质过氧化终产物,其含量的多少直接反映了机体脂质过氧化损伤的程度,即含量越高,损伤越重,因此本研究将之作为判断脂质过氧化程度的终局筛选指标^[9]。“筛选”实验结果显示健脾活血方中最大限度降低肝组织 MDA 的药物组合为:葛根,泽泻,五味子,姜黄(剂量分别为 2.5, 0.5, 0.17, 0.5 g·kg⁻¹),提示该组合为健脾活血方中“抗脂质过氧化”主效应药物。再次运用相同模型进行“验证”实验,结果显示“筛选”实验获得的抗脂质过氧化主效应中药确实能显著降低乙醇诱导升高的肝组 MDA 含量,且效应与含 8 味药的健脾活血方全方疗效相当。研究结果证实了运用均匀设计与药效学分析的方法分析中药复方针对某一作用环节的主效应中药结果的准确性和可靠性。

研究筛选获得的抗脂质过氧化主效应中药药效确切,但其具体抗脂质过氧化的相关病理环节是什么?正常情况下,机体的氧化与抗氧化保持着动态平衡。但当长期大量饮酒时,机体内产生过多的自由基,抗氧化物质被耗尽,机体内氧化与抗氧化平衡

3.3 主效应中药抗脂质过氧化机制研究 与无乙醇饲料对照组相比,乙醇饲料模型组肝组织 SOD, GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),而抗脂质过氧化主效应中药组均较模型组显著升高 ($P < 0.05$),且抗脂质过氧化主效应中药组改善 SOD 活性显著优于健脾活血方 ($P < 0.01$)。与无乙醇饲料对照组相比,乙醇饲料模型组肝组织 NOS, iNOS 与血清 Fe²⁺ 含量显著升高 ($P < 0.01$),而抗脂质过氧化主效应中药组与健脾活血方组均较模型组显著降低 ($P < 0.01$),与健脾活血方组疗效相当(见表 5)。

机制被打破^[10]。机体本身具有保护机制用来削弱 ROS 及氧化应激造成的损害,包括 SOD, GSH-Px 等^[11]。自由基清除酶 SOD 和 GSH-Px 是人体内抗氧化损伤的第一道防线^[12]。NO 能够通过增强氧化应激水平加重乙醇性肝损伤,因此是乙醇性肝损伤过氧化损伤的一个重要指标^[13],体内 NO 主要来自 NOS 催化 L-精氨酸的反应而生成,可通过检测 NOS 的活性来间接测量 NO 的含量^[13]。铁离子与自由基的产生和脂质过氧化反应有着密切的关系,也是乙醇促进过氧化反应的重要因素^[14]。

围绕这些相关病理机制,我们的研究观察了肝组织 SOD, GSH-Px, NOS, iNOS 及血清 Fe²⁺ 等与脂质过氧化密切相关的病理环节,研究结果提示该主效应中药组合药理机制在于抑制促氧化物质 NOS, iNOS 及血清 Fe²⁺ 产生,增加抗氧化自由基清除酶 SOD, GSH-PX 活性。

[参考文献]

[1] 何东仪,胡义扬,薛惠明,等. 健脾活血方治疗脂肪肝的临床疗效观察[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2001, 9(1): 35.

[2] 方志红,胡义扬,崔剑巍,等. 酒精性肝损伤与肠内毒素渗漏的关系及健脾理气活血方的干预作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(9): 813.

[3] Cui J W, Hu Y Y, Fang Z H, et al. Intervention effects of Jianpi Liqi Huoxue decoction on lipid peroxidative liver injury induced by alcohol[J]. Chin J Integr Med, 2006, 12(4): 281.

左归丸对去卵巢大鼠股骨中 核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 表达的影响

王艳杰¹, 任艳玲^{1*}, 宋因², 吕海波³, 李亚玲⁴

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学附属第二医院, 沈阳 110034;
3. 山东世博金都药业有限公司北京医药研发中心, 北京 100070;
4. 鹤壁职业技术学院医学院, 河南 鹤壁 458030)

[摘要] 目的: 观察左归丸对去卵巢骨质疏松大鼠股骨中核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 表达的影响, 探讨其对骨质疏松的防治机制。方法: 280 只 SPF 级 SD 雌性大鼠, 分为 3 组: 正常组 40 只、假手术组 40 只、其余采取双侧背部卵巢切除术进行绝经后骨质疏松症造模。21 d 后, 随机分为 5 组: 模型组、尼尔雌醇组、左归丸高、中、低剂量组。左归丸高、中、低剂量组分别给予 $ig 6.4, 3.2, 1.6 g \cdot kg^{-1}$ 剂量的左归丸混悬液, 1 次/d; 尼尔雌醇组 ig 尼尔雌醇混悬液 $0.21 mg \cdot kg^{-1}$, 每周 1 次。于连续给药 60, 120, 180 d, 分别取大鼠左后肢股骨近端 1/3 部分, 采用 RT-PCR 方法测定核心结合因子 $\alpha 1$ 的 mRNA 表达水平。结果: 与正常组比较, 模型组股骨中核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 水平明显降低 ($P < 0.01$); 和模型组比较, 给药 60, 120, 180 d 的左归丸各剂量组, 股骨中核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。结论: 骨组织中核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 表达水平的下调可能是 PMOP 发生的重要机制之一, 左归丸能够上调骨组织中核心结合因子 $\alpha 1$ mRNA 表达, 从而有效防治骨质疏松。

[关键词] 左归丸; 骨质疏松症; 核心结合因子 $\alpha 1$

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0191-05

[doi] 10.11653/syfy2013130191

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130425.1503.005.html>

[网络出版时间] 2013-04-25 15:03

[收稿日期] 20121225(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873226); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20102133110001); 辽宁省教育厅创新团队项目(LT2010068); 辽宁省科技厅自然科学基金(201102148)

[第一作者] 王艳杰, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药对脏腑调控作用的信号转导机制研究, E-mail: wangyj76@yahoo.com.cn

[通讯作者] *任艳玲, 教授, 博士生导师, 从事方药配伍规律及作用机制的研究, E-mail: yanlingren@tom.com

- [4] 彭景华, 方志红, 崔剑巍, 等. 健脾活血方对酒精复合 LPS 诱导的肝损伤大鼠库普弗细胞活化信号通路的干预[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(3): 302.
- [5] 陈少东, 冯琴, 彭景华, 等. 基于均匀设计的祛湿化痰方防治脂肪肝不同作用环节的主效应中药剖析[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 677.
- [6] 傅琪琳, 胡义扬, 冯琴, 等. 基于均匀设计的健脾活血方改善酒精性肠渗漏的主效应中药分析[J]. 中西医结合学报, 2011, 9(11): 1234.
- [7] 方志红, 崔剑巍, 曹健美, 等. Lieber-DeCarli 酒精性肝损伤模型的复制[J]. 中西医结合学报, 2006, 4(6): 596.
- [8] 中华医学会肝脏病学分会分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南(2010年修订版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3): 167.
- [9] 陈韶华, 厉有名. 酒精性肝病的免疫学研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2009, 29(4): 258.
- [10] Neuman M G. Cytokines central factors in alcoholic liver disease [J]. Alcohol Res Health, 2003, 27(4): 307.
- [11] Miranda-Mendez A, Lugo-Baruqui A, Armendariz-Borunda J. Molecular basis and current treatment for alcoholic liver disease [J]. Int J Environ Res Public Health, 2010, 7(5): 1872.
- [12] 王杰, 姚风云, 杨伟鹏, 等. 肝加欣片治疗酒精性肝病的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(8): 39.
- [13] 张压西, 石松, 向婷婷, 等. 茵苓清肝汤对酒精性肝病大鼠血清 NO, GSH-Px 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 181.
- [14] 时鸿超, 陈延丽, 赵敏. 酒精性肝病的铁代谢调控机制[J]. 中华保健医学杂志, 2009, 11(5): 404.

[责任编辑 聂淑琴]