

四逆散传统饮片汤剂和配方颗粒对 两种因素致小鼠肝损伤模型的药效比较

何蓉蓉^{1,2}, 李秋兰³, 向飞军², 吴晓明², 曹晖², 于留荣², 苏薇薇^{1,2*}, 栗原博^{3*}

(1. 中山大学生命科学院, 广州 510275; 2. 康美药业股份有限公司, 广东 普宁 515341;
3. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广州 510632)

[摘要] **目的:**四逆散传统汤剂和配方颗粒是在临床中同时存在的两种用药形式,本研究拟对比研究四逆散传统汤剂和配方颗粒的疏肝解郁药效作用,为四逆散配方颗粒的临床使用提供实验依据。**方法:**昆明种小鼠随机分为空白组、应激模型组、阳性药组、四逆散传统汤剂低、高剂量(600, 1 200 mg·kg⁻¹)组、四逆散配方颗粒汤剂低、高剂量(600, 1 200 mg·kg⁻¹)组共7组,每组10只。小鼠连续灌胃给药1周,实验第6天时给予小鼠一次性拘束应激18 h,测定血浆丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平。昆明种小鼠随机分为空白组、粉刺杆菌-脂多糖(*Propionibacterium acne*-LPS)致肝炎模型组、阳性药组、四逆散传统汤剂低、高剂量(600, 1 200 mg·kg⁻¹)组、四逆散配方颗粒汤剂低、高剂量(600, 1 200 mg·kg⁻¹)组共7组,每组10只。小鼠尾静脉注射20 mg·kg⁻¹热灭活粉刺杆菌生理盐水溶液5 d后,尾静脉注射5 μg·kg⁻¹脂多糖生理盐水溶液,5 h测定血浆ALT,AST水平。**结果:**与正常对照组相比,应激模型组和*P. acnes*-LPS的血浆ALT均显著增高(43.4 ± 2.0) U·L⁻¹ vs (12.2 ± 2.8) U·L⁻¹, *P* < 0.05; (114.9 ± 23.3) U·L⁻¹ vs (18.8 ± 5.2) U·L⁻¹, *P* < 0.05, AST水平也显著增高。与模型组相比,四逆散传统饮片汤剂和配方颗粒均能显著降低应激负荷和粉刺杆菌-脂多糖升高的血浆ALT和AST水平,但是两药药效没有统计学差异。**结论:**四逆散传统饮片汤剂和配方颗粒均有较好的保肝作用。

[关键词] 四逆散; 疏肝解郁; 拘束应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0153-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1158.005.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 11:58

[收稿日期] 20111202(004)

[基金项目] 中国博士后科学基金面上项目(20110490972);广东省医学科研课题(B2010167)

[第一作者] 何蓉蓉,在站博士后, Tel:13560494769, E-mail:rongronghe66@163.com

[通讯作者] *苏薇薇,教授,博士生导师,从事中药质量研究与开发, E-mail:lsssw@126.com

*栗原博,教授,博士生导师,从事中药活性研究, E-mail:hiroshi_kurihara@163.com

- [6] 李晓秋,许晶. 抑郁动物模型的研究进展[J]. 中华精神科杂志,2002,35(3):184.
- [7] Alexandre C, Popa D, Fabre V, et al. Early life blockade of 5-hydroxytryptamine 1A receptors normalizes sleep and depression-like behavior in adult knock-out mice lacking the serotonin transporter[J]. J Neurosci,2006,26(20):5554.
- [8] Novati A, Roman V, Cetin T, et al. Chronically restricted sleep leads to depression-like changes in neurotransmitter receptor sensitivity and neuroendocrine stress reactivity in rats[J]. Sleep,2008,31(11):1579.
- [9] 陶明,施慎逊,顾牛范. 5-羟色胺受体的研究现状[J]. 中华精神科杂志,1998,31(3):12.
- [10] 张先慧,黄世敬. 血管性抑郁症中医药研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(5):1012-1014
- [11] 黄世敬,吴巍,方尚芬. 培元开郁法治疗血管性抑郁症探讨[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(3):85.
- [12] 崔翰明,黄世敬,白鸽,等. 开心解郁汤对抑郁模型大鼠脑皮质内单胺类神经递质和行为学的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(3):276.
- [13] 孔梅,邢长永,舒晓春. 逍遥散干预抑郁症睡眠障碍模型大鼠海马5-HT1A受体,5-HT2A受体的变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(10):157.
- [14] 谢忠礼,李杰. 加味四逆散对慢性应激大鼠海马区5-羟色胺2A受体(5-HT2AR)及其mRNA表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):150.

[责任编辑] 聂淑琴]

Comparison of the Liver-protective Effects between Traditional Decoction and Chinese Medicinal Dispensing Granule of Sini San

HE Rong-rong^{1,2}, LI Qiu-lan³, XIANG Fei-jun², WU Xiao-ming², CAO Hui²,
YU Liu-rong², SU Wei-wei^{1,2*}, Kurihara Hiroshi^{3*}

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Kangmei Pharmaceutical Co., Ltd., Puning 515341, China; 3. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the liver-protective effects between traditional decoction and Chinese medicinal dispensing granule of Sini San. **Method:** Liver injury models were induced by establishing restraint stress and *Propionibacterium acnes*-lipopolysaccharide (LPS) in mice. Kunming mice were divided into 7 groups, normal control, stress model, positive control, Sini San decoction (600, 1 200 mg·kg⁻¹) and Sini San dispensing granule (600, 1 200 mg·kg⁻¹). Mice were administered for consecutive 6 days and restrained for 18 h. Hepatic function was evaluated by assessing alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) level in plasma. Kunming mice were divided into 7 groups, such as normal control, *P. acnes*-LPS model, positive control, Sini San decoction (600, 1 200 mg·kg⁻¹) and Sini San dispensing granule (600, 1 200 mg·kg⁻¹). Mice were injected with 20 mg·kg⁻¹ *P. acnes* and 5 μg·kg⁻¹ LPS to induce liver injury. Hepatic function was evaluated by ALT and AST level in plasma. **Result:** Compared with the model groups, the traditional decoction and Chinese dispensing granule of Sini San significantly reduced ALT and AST levels induced by restraint stress or *P. acne*-LPS. However, there were no significant difference between the two samples. **Conclusion:** The traditional decoction and Chinese medicinal dispensing granule of Sini San both are effective on improving the liver function in liver-injury mice model.

[Key words] Sini San; liver function; restraint stress

四逆散出自《伤寒论》的经典名方,由柴胡、枳实、芍药、甘草等比例构成,有透邪解郁、疏肝理脾功效。现代药理研究表明,四逆散能增强肝对四氯化碳中毒时药物的转化并显著减轻四氯化碳致小鼠肝损伤的丙氨酸转氨酶(ALT)变化^[1]。临床研究证明,四逆散对肝纤维化和肝硬化有较好的预防和治疗效果^[2-3]。四逆散是广东中医院临床多用的保肝中药处方,该院药房常以中药饮片制成汤剂的形式建议患者服用。同时,该方也是广东省第二中医院常用中药处方,但是该院建议病人以单味药配方颗粒按处方比例调配成免煎汤剂服用。基于这两种汤剂形式在不同医院的共存现象,有必要对该方传统饮片汤剂与配方颗粒汤剂的药效活性进行比较研究。本实验建立小鼠拘束应激负荷和小鼠粉刺杆菌-脂多糖诱发免疫性肝炎模型,进行四逆散传统饮片汤剂和配方颗粒的药效学比较研究。

1 材料

1.1 样品的配制 四逆散传统汤剂是由康美药业

股份有限公司提供的柴胡、枳实、芍药、炙甘草各 250 g,10 倍量水浸泡 20 min,煮沸 60 min,提取 3 次合并滤液浓缩,提取率为 15.6%。四逆散配方颗粒是由广东一方制药提供的柴胡、枳实、芍药、炙甘草单味配方颗粒根据 1:1:1:1 比例配制成配方颗粒汤剂。

1.2 试剂 热灭活的粉刺杆菌(*Propionibacterium acnes*)由日本 Suntory 实验中心提供,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, Sigma 公司),丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所),环孢菌素 A(CAS,杭州中美华东制药有限公司),维生素 C(VC, Sigma 公司)。

1.3 动物 SPF 级 7~8 周龄昆明种小鼠,雄性,体重 18~22 g,购自广东省医学实验动物中心,许可证号 SCXK(粤)2008-0002。实验动物饲养环境温度(23±2)℃,照明时间 12 h·d⁻¹(7:00~19:00),饲养 1 周后进行实验。

1.4 仪器 MK3 型酶标仪(Labsystem, Finland),

3-18K 型台式高速冷冻离心机 (Sartorius, Germany), BS210S 电子分析天平 (Sartorius, Germany), WH-861 型漩涡混合器 (太仓市科教器材厂), 及 pH S-25 型酸度计 (上海伟业仪器厂)。

2 方法

2.1 拘束应激负荷实验 小鼠随机分为空白组、应激模型组、应激模型 + 维生素 C 组 (200 mg·kg⁻¹)、应激模型 + 四逆散传统汤剂高、低剂量组 (1 200, 600 mg·kg⁻¹)、应激模型 + 四逆散配方颗粒汤剂高、低剂量组 (1 200, 600 mg·kg⁻¹) 共 7 组, 每组 10 只。小鼠连续给药 1 周, 实验第 6 天时给予小鼠一次性拘束应激 18 h (14:00 ~ 8:00)。期间所有小鼠禁食禁水。拘束 18 h 后, 小鼠乙醚麻醉, 心脏采血后置于肝素处理的离心管中, 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分离血浆储存在 -20 °C 用于 ALT 和 AST 测定。

2.2 灭活粉刺杆菌-脂多糖诱发免疫性肝炎实验

小鼠随机分为空白组, *P. acnes*-LPS 模型组, *P. acnes*-LPS 模型 + CSA 组 (25 mg·kg⁻¹), *P. acnes*-LPS 模型 + 四逆散传统饮片汤剂高、低剂量组 (1 200, 600 mg·kg⁻¹), *P. acnes*-LPS 模型 + 四逆散配方颗粒汤剂高、低剂量组 (1 200, 600 mg·kg⁻¹) 共 7 组, 每组 10 只。除空白组外, 小鼠尾静脉注射 20 mg·kg⁻¹ 热灭活 *P. acnes* 生理盐水溶液, *P. acnes* 负荷 5 d 后尾静脉注射 5 μg·kg⁻¹ LPS 生理盐水溶液。 *P. acnes* 负荷前 1 d 起给药每天 ig 1 次, 连续 7 d ig 四逆散汤剂水溶液, LPS 注射 30 min 前末次给药, 对照组给予等容量生理盐水。CsA 从 *P. acnes* 负荷前 1 d 起隔日 ip。实验动物在 LPS 注射 5 h 后乙醚麻醉, 心脏取血, 分离血浆储存在 -20 °C 用于 ALT 和 AST 测定。

2.3 小鼠血浆 ALT/AST 的测定 根据试剂盒说明书进行测定。

2.4 统计分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件, 利用 ANOVA 检验和 Dunnett's 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对应激负荷小鼠血浆 ALT, AST 的影响 小鼠拘束应激负荷后, 血浆 ALT 和 AST 水平显著上升, 表明应激负荷诱发肝损伤。与模型组相比, VC、四逆散传统汤剂及四逆散配方颗粒高、低剂量均能显著降低应激负荷小鼠血浆 ALT 和 AST 水平 ($P < 0.05$)。然而, 四逆散传统汤剂高剂量与配方颗粒高剂量相比, 组间没有统计学差异。四逆散传统汤剂低剂量与配方颗粒低剂量相比, 组间也没有统计

学差异。以上结果表明, 四逆散传统汤剂与市售配方颗粒均能有效降低应激负荷小鼠血浆 ALT 和 AST 水平, 而两药之间的药效没有明显差别。见表 1。

表 1 四逆散传统汤剂与市售配方颗粒对应激负荷小鼠血浆 ALT 和 AST 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹
正常对照	-	12.2 ± 2.8	44.1 ± 10.6
应激模型	-	43.4 ± 2.0 ¹⁾	129.7 ± 20.0 ¹⁾
VC	200	10.9 ± 2.5 ²⁾	84.4 ± 9.4 ²⁾
四逆散传统汤剂	1 200	18.8 ± 6.4 ²⁾	108.3 ± 11.8 ²⁾
	600	17.8 ± 4.8 ²⁾	110.4 ± 10.4 ²⁾
四逆散配方颗粒	1 200	13.3 ± 3.4 ²⁾	94.3 ± 10.0 ²⁾
	600	24.4 ± 5.9 ²⁾	104.3 ± 6.3 ²⁾

注: 与正常对照组相比¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组相比²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 对 *P. acnes*-LPS 致免疫性肝炎小鼠血浆 ALT 和 AST 的影响 *P. acnes*-LPS 致小鼠免疫性肝炎后, 血浆 ALT 和 AST 水平显著上升。与模型组相比, 阳性药、四逆散传统汤剂高、低剂量及四逆散市售配方颗粒高、低剂量均能显著降低免疫性肝炎小鼠血浆 ALT 和 AST 水平 ($P < 0.05$)。然而, 四逆散传统汤剂高剂量与市售配方颗粒高剂量相比, 组间没有统计学差异。四逆散传统汤剂低剂量与市售配方颗粒低剂量相比, 组间也没有统计学差异。以上结果表明, 四逆散传统汤剂与市售配方颗粒均能有效降低应激负荷小鼠血浆 ALT 水平, 而两药之间的药效没有明显差别。见表 2。

表 2 四逆散传统汤剂与市售配方颗粒对 *P. acnes*-LPS 致免疫性肝炎小鼠血浆 ALT 和 AST 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹	AST /U·L ⁻¹
正常对照	-	18.8 ± 5.2	47.1 ± 14.8
<i>P. acnes</i> -LPS 模型	-	114.9 ± 23.3 ¹⁾	106.3 ± 14.9 ¹⁾
CSA	25	85.1 ± 7.4 ²⁾	88.2 ± 14.2 ²⁾
四逆散传统汤剂	1 200	87.7 ± 9.6 ²⁾	92.5 ± 11.7 ²⁾
	600	95.1 ± 6.5 ²⁾	93.2 ± 11.2 ²⁾
四逆散配方颗粒	1 200	83.1 ± 11.0 ²⁾	86.0 ± 15.4 ²⁾
	600	89.1 ± 5.0 ²⁾	90.2 ± 9.4 ²⁾

4 讨论

中药的传统服药方法以汤剂为主, 中药配方颗粒是近些年中药饮片改革的一个重要产物^[4]。中

药配方颗粒具有“安全、高效、稳定、可控”的特点,而且还携带服用方便,便于医院调剂,便于中药生产实现产业化^[5]。但是,目前已有研究对传统汤剂和配方颗粒汤剂的药效进行了比较,但不同的处方所得结论并不一致^[6]。因此,传统汤剂改革的一个关键问题是对中药配方颗粒与传统共煎汤药的药效进行比较,而药效比较的前提则是选择稳定有效的动物模型。

本课题以经典处方四逆散为载体,选用应激性肝损伤动物模型和 *P. acnes*-LPS 免疫性肝损伤两种模型,对的传统饮片汤剂和中药配方颗粒制剂的保肝药效作用进行比较研究。应激是指机体负荷各种刺激后所做出的一系列广泛而复杂的防御性反应,引起应激反应的因素包括生物、环境及心理等能够扰乱生理和心理内环境稳定的内外界应激源的负荷^[7]。拘束应激原能使动物产生综合的应激反应,产生一系列行为学及生化物质上的变化,在药理学、生理学和病理学等方面的有着广泛的应用^[8]。小鼠进行 18 h 禁食禁水拘束,属于受到突然、强烈、持久的情绪刺激,就会消极地影响其生理或身体的功能活动,使脏腑气血功能紊乱,形成疾病^[9]。因此,拘束应激学说与中医七情学说在认识上存在着共同点,可以用来模仿人类情志致病,用于研究四逆散的疏肝解郁作用。ALT 和 AST 是诊断肝脏疾病最常用的酶指标。拘束应激负荷模型实验结果表明,拘束负荷能诱导小鼠肝损伤,与空白组对比,拘束负荷模型组小鼠血浆 ALT 和 AST 异常升高。与模型组对比,四逆散传统饮片汤剂和市售配方颗粒汤剂均能够降低病理状态下的 ALT 和 AST 水平,但是两种汤剂之间的药效没有明显差别。

拘束应激负荷模型实验结果证明了四逆散传统饮片汤剂和配方颗粒在对于这种非器质性肝损伤作用并没有明显差别。本实验采用 *P. acnes*-LPS 致免疫性肝炎模型,进一步验证四逆散传统饮片汤剂和配方颗粒的保肝作用。*P. acnes*-LPS 致免疫性肝炎模型实验结果表明,尾静脉注射 *P. acnes*-LPS 的小

鼠血浆 ALT 和 AST 水平与空白组相比异常升高,因此成功诱发小鼠急性免疫性肝炎,建立模型。与模型组相比,四逆散传统饮片汤剂和市售配方颗粒汤剂均能够降低病理状态下的 ALT 和 AST 水平,但是两种汤剂之间的药效没有明显差别。因此,拘束应激负荷模型和 *P. acnes*-LPS 致免疫性肝炎模型都表明四逆散传统饮片汤剂和配方颗粒的疏肝解郁作用没有明显差异。

本研究结果表明,四逆散传统饮片汤剂和配方颗粒均有较好的保护肝损伤作用。

[参考文献]

- [1] 王传晶,黄世领,龚传美. 四逆方煎液及醇提液对四氯化碳致小白鼠肝损害的影响[J]. 解放军医学高等专科学校学报,1998,26(1):15.
- [2] 王东强. 四逆方的保肝作用及机制研究[D]. 天津:天津中医药学院,2002.
- [3] 郭标. 四逆方有效成分提取和成分分析研究[D]. 成都:成都中医药大学,2002.
- [4] 林渊,周良良,吴水生. 对中药汤剂剂型改革研究的思考[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):264.
- [5] 崔景朝,赵自明. 中药配方颗粒研究进展(I)——文献综合分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):235.
- [6] 赵自明,崔景朝. 中药配方颗粒研究进展(III)——药效学研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):270.
- [7] de Kloet E R, Joels M, Holsbor F. Stress and the brain: from adaptation to disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6:463.
- [8] 何蓉蓉,姚新生,栗原博. 拘束应激动物模型的研究现状与应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(11):80.
- [9] 宝丽,姚新生,何蓉蓉,等. 广东凉茶颗粒对拘束负荷诱发小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志,2008,33(6):664.

[责任编辑 聂淑琴]