

茵芩清肝汤对酒精性肝病大鼠血清 NO, GSH-Px 的影响

张压西^{1*}, 石松², 向婷婷², 于慧杰², 叶之华²

(1. 武汉市中医医院肝胆消化内科, 武汉 430014; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] 目的: 研究茵芩清肝汤对酒精性肝病大鼠血清一氧化氮(NO)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的影响。方法: 按每天 8~12 mL·kg⁻¹ 52 度白酒(随时间延长而递增, 第 1 周为 8 mL·kg⁻¹, 第 2 周 10 mL·kg⁻¹, 第 3 周起 12 mL·kg⁻¹, 以后继续维持此量, 直至实验结束)配合高脂肪饲料喂养, 造成大鼠酒精性肝病模型。随机分为模型组、正常组、茵芩清肝汤(20 g·kg⁻¹ ig)组, 硫普罗宁(5 mg·kg⁻¹ ig)组、水飞蓟宾(5 mg·kg⁻¹ ig)组进行比较。每组 30 只, 分别于实验第 4 周、第 8 周、第 12 周每组各取大鼠 10 只, 称重后以乙醚麻醉动物, 迅速断头取血, 按常规方法分离血清, 测量 NO, GSH-Px 含量。结果: 模型组大鼠血清 NO 各阶段水平较正常组(15.36 ± 7.2) μmol·L⁻¹ 明显升高(P < 0.01), 第 12 周达到(40.8 ± 7.5) μmol·L⁻¹ (P < 0.01), GSH-Px 各阶段水平较正常组(146.3 ± 51.9) U·mg⁻¹ 明显降低(P < 0.01), 第 12 周达到(86.4 ± 6.4) U·mg⁻¹ (P < 0.01)。各治疗组大鼠血清 NO 各阶段水平较模型组均降低(P < 0.05), 茵芩清肝汤组第 12 周达到(31.12 ± 4.7) μmol·L⁻¹ (P < 0.01); GSH-Px 水平(107.7 ± 31.1) U·mg⁻¹ 较模型组均明显升高(P < 0.01)。结论: 茵芩清肝汤可降低血清 NO 含量、提高 GSH-Px 活性, 抑制脂质过氧化反应, 这可能是它防治酒精性肝病的机制之一。

[关键词] 酒精性肝病; 茵芩清肝汤; 一氧化氮; 谷胱甘肽过氧化物酶; 过氧化酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0181-04

[收稿日期] 20111125(007)

[基金项目] 湖北省卫生厅基金课题(鄂卫函[2005]455号)

[通讯作者] * 张压西, 硕士, 教授, 从事肝胆消化与失眠研究, Tel:027-82835626, E-mail:2004wyjs@163.com

机制之一是机体 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg 细胞减少, 免疫调节功能紊乱, 免疫复合物沉积于母胎界面, 引起母胎界面组织损伤, 母体对胚胎排斥, 导致妊娠丢失。安子合剂干预 ACA 导致妊娠丢失的免疫调节机制是通过增加 CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg 细胞的比例来实现的, 其作用的强弱与药物的剂量相关。

[参考文献]

- [1] Girardi G, Berman J, Redecha P, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome[J]. Clin Invest, 2003, 112(11): 1644.
- [2] Jessica Berman, Guillermina Girardi, Jane E Salmon, et al. TNF-α is a critical effector and a target for therapy in antiphospholipid antibody induced pregnancy loss[J]. Immunology, 2005, 174: 485.
- [3] 陆启滨, 任青玲. 安子合剂治疗抗心磷脂抗体阳性致

先兆流产 191 例临床研究[J]. 中华临床医学杂志, 2006, 11(5): 35.

- [4] Holers V M. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody induced fetal loss[J]. Exp Med, 2002, 195(2): 211.
- [5] Redecha P. Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury[J]. Blood, 2007, 110(7): 2423.
- [6] Paust S, Cantor H. Regulatory T cells and autoimmune disease[J]. Immunol Rev, 2005, 204: 195.
- [7] Ziegler S F. FOXP3: of mice and men[J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24: 209.
- [8] Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells[J]. Nat Immunol, 2005, 6: 338.
- [9] Khattry R, Cox T, Yasayko S A, et al. An essential role for scurfinin CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 337.

[责任编辑 聂淑琴]

Impact of Yinqin Qinggan Decoction on Serum NO, GSH-Px in Rats with Alcoholic Liver Disease

ZHANG Ya-xi^{1*}, SHI Song², XIANG Ting-ting², YU Hui-jie², YE Zhi-hua²

(1. Department of Gastroenterology, Wuhan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430014, China; 2. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To study the impact of Yinqin Qinggan decoction on serum nitric oxide (NO), glutathione peroxidase (GSH-Px) in rats with alcoholic liver disease. **Method:** The rats were fed alcohol and high-fat diet to result in alcoholic liver model in rats. The rats were randomly divided into model group, control group, the Chinese medicines (Yinqin Qinggan decoction), west medicine group 1 (tiopronin film), west medicine group 2 (silibinin capsules), with 30 each group respectively. At 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks, respectively 10 rats in each group were executed to collect blood, sample and to measure NO, GSH-Px levels. **Result:** The serum levels of NO in the various stages of model group were significantly higher than the normal group ($P < 0.01$). GSH-Px levels in the various stages was significantly lower than normal ($P < 0.01$). Forth treatment groups in the various stages NO levels were lower than in model group ($P < 0.05$); GSH-Px levels were significantly higher than in model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Liver Yinqin Qinggan decoction can decrease serum NO levels, increase GSH-Px activity and inhibit of lipid peroxidation, which may be one of the mechanisms.

[Key words] alcoholic liver disease; Yinqin Qinggan decoction; NO; GSH-Px; peroxidase

酒精性肝病(ALD)是一种由于长期过度饮酒引起的中毒性肝脏疾病,在全世界范围内都有较高的发病率和病死率。随着人民的生活水平的提高,人均酒精摄入量也逐渐增多,进而导致ALD的发病率呈逐年上升趋势,已成为仅次于病毒性肝病的第二大肝病病种^[1]。在西方发达国家,80%~90%的肝硬化由此疾病引起。在我国酒精性肝病仅次于病毒性肝炎,居肝硬化病因第2位^[2]。西医通过护肝降酶降脂对ALD进行控制,效果比较明显,而中药防治的临床疗效也已经得到医学界的广泛认可。临床研究表明茵陈清肝汤治疗ALD有很好的疗效^[3]。为了探讨中医药对酒精性肝病的损伤保护,做以下实验进行研究探讨。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠,雄性,体重(200±20)g,华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,许可证号SCXK(鄂)2004-0007。自由进食、饮水,喂标准颗粒饲料,室温18~22℃,相对湿度40%~60%,自然光照环境中饲养常规观察3d后实验。

1.2 茵陈清肝汤(由柴胡6g,白芍10g,郁金10g,黄芩10g,茵陈10g,木香10g,法半夏10g,鸡内金10g,金钱草15g,虎杖10g组成,武汉市中医院药剂科提供)经60%乙醇煎煮后旋蒸至含生药1g·

mL⁻¹,参照人体用量,折算出大鼠用量给予ig;硫普罗宁片(河南新谊药业股份有限公司,批号030414-1)临用时用生理盐水稀释成100mg·L⁻¹混悬液;水飞蓟宾胶囊(天津天士力制药股份有限公司,批号05H01)临用时用生理盐水稀释成100mg·L⁻¹混悬液,ALT试剂盒,四川省迈克科技公司产品,批号040302,AST试剂盒,四川省迈克科技公司产品,批号040205,NO测试盒,南京建成生物工程研究所,批号20040828,GSH-Px测试盒,南京建成生物工程研究所,批号20040415。

1.3 仪器 紫外-可见分光光度仪(北京普析通用仪器有限责任公司)。

2 方法

2.1 动物分组与模型建立 150只实验大鼠随机分为5组:模型组(白酒ig组)、正常组(蒸馏水ig组)、茵陈清肝汤组、硫普罗宁组、水飞蓟宾组、每组30只,组内大鼠以红蓝黑记号笔标记分为3组。以上各组均自由饮水,自然光照。大鼠正常喂养3d后开始造模。正常组采用普通饲料喂养,每天清早ig蒸馏水20mL·kg⁻¹;其余各组采用高脂肪饲料(在普通饲料基础上加10%猪油、2%胆固醇)喂养,并于每天清早ig52度黄鹤楼白酒,酒的摄入量为每日8~12mL·kg⁻¹,并随时间延长而递增,即第1周

为 $8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 第 2 周 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 第 3 周起 $12 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以后继续维持此量, 直至实验结束, 复制大鼠酒精性脂肪肝模型。茵芩清肝汤组以 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的茵芩清肝汤 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$; 硫普罗宁组以 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的硫普罗宁混悬液 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$; 水飞蓟宾组以 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的水飞蓟宾混悬液 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$; 模型及正常组以等体积的蒸馏水 ig 。以上 5 组均下午给药, 1 次/日。分别于实验第 4 周、第 8 周、第 12 周每组各取大鼠 10 只, 称重后以乙醚麻醉动物, 迅速断头取血, 按常规方法分离血清, 待测。

2.2 检测方法

2.2.1 一般情况 观察动物饲养过程中的精神状态、活动情况、毛发光泽度、食欲、大小便、体重等变化。

2.2.2 肝脏标本大体观及肝指数 观察肝脏的大小、色泽、质地、切面情况等, 计算肝指数。

$$\text{肝指数} = \frac{\text{大鼠肝脏的质量(g)}}{\text{大鼠体重(g)}} \times 100\%$$

2.2.3 血清 ALT, AST, GSH-Px, NO 检测 大鼠断头取血 $\rightarrow 3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 分离血清 \rightarrow 按试剂盒操作步骤操作得出相应的 ALT, AST 值。

GSH-Px 检测(二硫代二硝基苯甲酸比色法): 大鼠断头取血 $\rightarrow 3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 分离血清 \rightarrow 用紫外-可见分光光度计, 按试剂盒操作步骤操作检测 GSH-Px 活性。

NO 检测(化学法): 大鼠断头取血 $\rightarrow 3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 分离血清, 将血清和试剂充分旋涡混匀 30 s \rightarrow 室温静置 10 min $\rightarrow 3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min \rightarrow 取上清加入显色剂混匀, 静置 15 min \rightarrow 用紫外-可见分光光度计于 550 nm 处, 0.5 cm 光径, 空白管调零, 测

各管吸光度(A)。

$$\text{NO 含量} = \frac{(A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}})}{(A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}})} \times \text{对照品浓度} (20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{样品测试前稀释倍数}$$

2.3 统计学方法 实验数据采用 SPSS 15.0 软件进行统计学处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠肝脏指数的影响 大鼠肝脏指数模型组较正常组明显升高 ($P < 0.01$)。各治疗组较模型组均降低 ($P < 0.05$), 其中茵芩清肝汤组比硫普罗宁、水飞蓟宾组降低更明显 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 茵芩清肝汤治疗前后不同时间大鼠肝脏指数的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肝指数		
		4 周	8 周	12 周
模型	-	7.65 ± 0.5	8.21 ± 0.8	9.64 ± 0.8
正常	-	6.73 ± 0.7	7.02 ± 0.5	7.59 ± 0.7
茵芩清肝汤	20	$6.95 \pm 0.5^{2)}$	$7.25 \pm 0.4^{2,3)}$	$7.98 \pm 0.1^{2,3)}$
硫普罗宁	0.005	$7.19 \pm 0.6^{1)}$	$7.99 \pm 0.2^{1)}$	$8.21 \pm 0.1^{1)}$
水飞蓟宾	0.005	$7.12 \pm 0.7^{2)}$	$7.34 \pm 0.6^{2)}$	$7.78 \pm 0.1^{2)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与硫普罗宁组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与水飞蓟宾组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对大鼠血清酶学的影响 模型组血清酶 ALT, AST 水平较正常组明显升高 ($P < 0.01$)。各治疗组与模型组相比较血清酶水平明显降低 ($P < 0.01$)。中药组与西药 2 组相比血清酶水平有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 茵芩清肝汤治疗前后不同时间大鼠血清酶学变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	AST			ALT		
		4 周	8 周	12 周	4 周	8 周	12 周
模型	-	133.8 ± 26.4	115.4 ± 12.1	105.5 ± 21.4	98.3 ± 2.3	77.2 ± 27.8	68.4 ± 3.4
正常	-	38.2 ± 9.7	40.2 ± 7.7	47.2 ± 1.5	38.4 ± 1.6	43.5 ± 5.5	40.2 ± 1.9
茵芩清肝汤	20	$82.1 \pm 23.2^{2,5)}$	$68.42 \pm 3.14^{2,3,5)}$	$50.13 \pm 2.21^{2,5)}$	$52.4 \pm 1.3^{2,5)}$	$48.5 \pm 1.7^{2,5)}$	$36.2 \pm 4.1^{2,5)}$
硫普罗宁	0.005	$86.5 \pm 21.8^{2)}$	$54.9 \pm 9.4^{2)}$	$46.7 \pm 9.8^{2)}$	$55.4 \pm 4.5^{2)}$	$36.2 \pm 1.2^{2)}$	$33.7 \pm 5.5^{2)}$
水飞蓟宾	0.005	$116.1 \pm 25.8^{2)}$	$82.3 \pm 11.3^{2)}$	$60.4 \pm 8.7^{2)}$	$76.3 \pm 11.8^{2)}$	$60.4 \pm 4.7^{2)}$	$47.3 \pm 2.1^{2)}$

3.3 对大鼠血清 NO, GSH-Px 的影响 血清 NO 模型组水平较正常组明显升高 ($P < 0.01$)。中药组与模型组相比均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 第 12 周数据显示差异更明显 ($P < 0.01$)。西药 1

组与模型组相比只在第 12 周有统计学意义 ($P < 0.05$)。西药 2 组与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在第 4 和第 8 周的数据显示中发现, 中药组与西药 1 组的数据比较有统计学意义 ($P <$

0.05),但在第 12 周无统计学意义。在血清 GSH-Px 方面,模型组水平较正常组明显降低 ($P < 0.01$)。各治疗组与模型组相比都有明显升高 ($P < 0.01$,西

药 1 组第 4 周除外)。中药组与西药 1 组比较有统计学意义 ($P < 0.05$),第 4,12 周更明显 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 茵陈蒿汤治疗前后不同时间大鼠血清 NO, GSH-Px 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			GSH-Px/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$		
		4 周	8 周	12 周	4 周	8 周	12 周
模型	-	32.3 ± 1.3	33.5 ± 9.2	40.8 ± 7.5	103.7 ± 26.1	97.2 ± 27.8	86.4 ± 6.4
正常	-	15.1 ± 1.2	14.81 ± 2.12	15.36 ± 7.2	162.3 ± 18.3	152.35 ± 31.39	146.3 ± 51.9
茵陈蒿汤	20	27.3 ± 11.1 ^{1,3)}	30.54 ± 4.8 ^{1,3)}	31.12 ± 4.7 ²⁾	147.3 ± 21.1 ^{2,4)}	133.37 ± 11.1 ^{2,3)}	107.7 ± 31.1 ^{2,4)}
硫普罗宁	0.005	31.3 ± 2.7	32.1 ± 7.1	35.48 ± 2.8 ¹⁾	121.3 ± 14.0 ¹⁾	131.35 ± 14.0 ²⁾	141.5 ± 44.0 ²⁾
水飞蓟宾	0.005	26.2 ± 2.0 ¹⁾	29.87 ± 6.6 ¹⁾	32.22 ± 1.8 ¹⁾	159.2 ± 32.0 ²⁾	143.24 ± 21.0 ²⁾	128.2 ± 22.4 ²⁾

4 讨论

酒精性肝病,中医又称为酒疸。因酒食不节,以致脾胃受伤,运化失常,湿浊内郁生热,湿热交蒸而成。茵陈蒿汤是在张仲景《伤寒论》小柴胡汤与茵陈蒿汤的基础上加減而成。全方由柴胡、白芍、郁金、黄芩、茵陈、木香、法半夏、鸡内金、金钱草、虎杖 10 味药组成。方中柴胡、黄芩、半夏配伍达到清肝和胃的功效,茵陈、虎杖、金钱草配伍可以利湿退黄,木香、郁金行气凉血、止痛解郁,白芍柔肝养阴止痛,鸡内金健胃消食。全方具有清肝益胃、利湿退黄的功效,切中了 ALD 的病机特点。目前认为酒精通过多种途径作用而影响肝脏和其他器官,导致酒精性肝病的加重^[4]。机体摄入酒精后由多种代谢途径产生大量活性氧基团(ROS),ROS 能损伤或完全降解细胞内一些重要的大分子,包括脂肪分子,进而形成脂质过氧化产物,NO 就是其中一种。GSH-Px 则是清除 ROS 的主要酶之一,通过清除超氧阴离子自由基起到抗氧化损伤的作用^[5]。现代药理研究发现,茵陈蒿汤能有效改善硫氰酸脂(ANIT)诱发实验性肝内胆胆汁淤积大鼠肝功能变化^[6]。黄芩醇提物具有不同程度的抗肝微粒体脂质过氧化的作用^[7]。

本实验结果提示,模型组大鼠血清 GSH-Px 活性较正常组明显降低,进而血清 NO 含量明显升高。说明长期大量酒精摄入,体内 ROS 增多,致使动物抗氧化能力明显降低,脂质过氧化反应增强,从而导致肝细胞的过氧化损伤。而茵陈蒿汤和阳性对照

药则能通过提高 GSH-Px 增强机体的抗氧化能力,从而降低 NO 含量,减轻肝脏的过氧化损伤,从而保护肝脏。但是不同的药物在起效时间与作用程度上有不同,故临床上应根据病情采用联合用药能达到更好的疗效。

[参考文献]

- [1] 殷晓轩,尹常健.酒精性肝病中医用药规律探讨[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):285.
- [2] 陈灏珠.实用内科学[M].12 版.北京:人民卫生出版社,2005:2004.
- [3] 张压西,杨春花,周黎,等.茵陈蒿汤联合硫普罗宁治疗酒精性肝病的临床研究[J].中国中西医结合消化杂志,2010,18(6):373.
- [4] 时静华,潘桂兰,陈晓东.酒精氧化应激和自由基损伤[J].包头医学院学报,2007(3):336.
- [5] 尹蓉,王沁,富翠芹.姜黄素对酒精诱导的大鼠脂质过氧化反应的影响[J].世界华人消化杂志,2008(13):1383.
- [6] 朱平生,龙爱华,王兵.不同经典方剂对肝内胆胆汁淤积大鼠肝肾功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):200.
- [7] 杨艳,梁日欣,杨滨,等.黄芩等 5 种中药醇提物的抗脂质过氧化作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(9):46.

[责任编辑 聂淑琴]