

## 昼夜给予逍遥散对肝损伤大鼠的保护作用

夏珂<sup>1</sup>, 张宁<sup>2\*</sup>, 王业秋<sup>2</sup>, 陈巧云<sup>2</sup>, 李秋红<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学临床药学教研室, 哈尔滨 150040;

2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院中药美容研究所, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] 目的: 研究昼夜不同时间给予逍遥散对 CCl<sub>4</sub> 诱发大鼠肝损伤保护作用的差异。方法: 采用 sc 40% CCl<sub>4</sub> 制备大鼠肝损伤模型, 分别于早上 8 点和晚上 8 点 ig 逍遥散, 连续 12 d, 观测大鼠一般行为状态、体重、血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肝组织超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)以及肝组织病理学变化。结果: 与模型组比较, 逍遥散能显著改善 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝损伤模型的体重曲线和行为状态; 显著降低血清中 ALT, AST 含量; 升高肝组织 SOD 的活性, 降低 MDA 的含量; 减轻肝脏病理损伤程度。同时, 多数指标显示晚间给药和低剂量组的效果更好。结论: 逍遥散具有明显的保肝降酶作用, 其疗效与给药时间密切相关。

[关键词] 逍遥散; 肝损伤; 昼夜节律; 四氯化碳; 保肝

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0168-03

## Protective Effects of Xiaoyao Powder Administrated in the Morning or Evening on Liver Injury in Rats

XIA Ke<sup>1</sup>, ZHANG Ning<sup>2\*</sup>, WANG Ye-qiu<sup>2</sup>, CHEN Qiao-yun<sup>2</sup>, LI Qiu-hong<sup>1\*</sup>

(1. Faculty of Pharmacy Department of Clinical Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine & Cosmetology, Faculty of Jiamusi, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007)

**[Abstract] Objective:** To investigate the hepatoprotective effect and its circadian variations of Xiaoyao Powder and the possible mechanisms for protection on liver injury in rats. **Method:** The rat model of liver injury was induced by subcutaneous injection of 40% CCl<sub>4</sub>. The rats were given Xiaoyao Powder by gavage in the morning or evening for 12 days. General behavior state, body weight change, the levels of ALT, AST in serum and SOD and MDA activities in liver homogenate were detected. The pathology of liver was observed. **Result:** Compared with the model group, the Xiaoyao Powder was found to significantly improve the body weight and general behavior state, reduce the serum levels of ALT, AST and MDA, increase the activity of SOD, improve the pathological changes of liver tissue. Meanwhile, evening administration and the low dose was displayed a very good effect in most of the indexes. **Conclusions:** Xiaoyao Powder shows significant protective action on liver injury in rats. The effect of Xiaoyao Powder may be closely related to administration time.

**[Key words]** Xiaoyao Powder; liver injury; circadian rhythm; carbon tetrachloride; hepatoprotection

[收稿日期] 2009-12-07

[基金项目] 黑龙江省博士后基金资助项目(LRB 09-335)

[通讯作者] \* 张宁, Tel: (0454) 6050350; E-mail: zhangning2006@hotmail.com;

\* 李秋红, Tel: (0451) 82196183; E-mail: liqiuuhong64@163.com

逍遥散出自《太平惠民和剂局方》, 功效为疏肝解郁、健脾和营, 是调和肝脾的经典方, 临床广泛用于慢性乙型肝炎的治疗。本文采用 CCl<sub>4</sub> 肝损伤大鼠模型研究逍遥散的保肝作用及其疗效的昼夜规律性, 为逍遥散临床治疗肝病提供时间生物学及时间药理学依据。

## 1 材料与方

**1.1 药物** 处方饮片均购自北京同仁堂制药集团哈尔滨药店,经黑龙江中医药大学佳木斯学院陈孝忠副教授鉴定。遵照《太平惠民和剂局方》原文,逍遥散的制备方法为:准确称取柴胡 15 g,当归 15 g,白芍 15 g,白术 15 g,茯苓 15 g,甘草 7.5 g,于中草药粉碎机中粉碎成最粗粉,加水 1 500 mL 煮沸,保持沸腾 20 min,加入 5 g 煨姜和 5 g 薄荷,再保持沸腾煎煮 10 min,煎煮液过 5 层纱布,滤液浓缩至含生药 2 g·mL<sup>-1</sup>,经冷冻干燥制成粉末,临用前用蒸馏水配制成混悬液。

**1.2 动物** Wistar 大鼠 80 只,清洁级,体重 180 ~ 220 g,雌雄各半,购自黑龙江中医药大学 GLP 实验室,合格证号 SYXK(黑) 2008-001。

**1.3 试剂** CCl<sub>4</sub>,分析纯,沈阳化学试剂厂;甲醛,分析纯,沈阳市东华试剂厂;丙氨酸氨基转换酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转换酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

**1.4 仪器** FW135 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);MS-500A 型半自动生化分析仪(成都美生科技有限公司);DY89- 型电动玻璃匀浆机(宁波市新芝生物科技股份有限公司);TGL-16G-C 型高速台式冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

**1.5 方法** 80 只大鼠随机分为空白对照组、模型组和早晚逍遥散高、中、低剂量给药组(低剂量为成人剂量换算成大鼠等效剂量,中剂量为低剂量的 2 倍,高剂量为低剂量的 4 倍)。从造模第 1 天起,每天 ig 药物(早晚给药时间分别为早 8 点和晚 8 点)或等体积的纯净水 15 mL·kg<sup>-1</sup> 1 次,连续 12 d。模型组及给药组大鼠 sc 40% CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液 2 mL·kg<sup>-1</sup> 每 2 d 1 次,首次 sc 4 mL·kg<sup>-1</sup>,空白对照组 sc 等量橄榄油。期间记录大鼠的体重、皮肤毛发、行为、活跃程度、情绪反应、兴奋程度、饮食、饮水、睡眠、大便。末次给药 24 h 后,固定大鼠,股动脉放血处死。常规分离血清,按试剂盒所述方法测定血清中 ALT,AST(比色法);取肝脏右叶约 0.5 g,用冰冷的生理盐水漂洗,除去血液,滤纸拭干,称重,在冰浴的平皿上剪碎,加生理盐水,用组织匀浆机制成 10% 肝匀浆,低温离心,按试剂盒说明书测定肝匀浆中 SOD,MDA。另取肝左叶,10% 甲醛固定,常规方

法制备切片,在光镜下进行病理学检查,进行病理分级。

**1.6 统计学处理** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS18.0 软件计量数据进行 *t* 检验,病理分级用非参数等级资料秩和检验统计, *P* < 0.05 为具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般行为状态** 与空白对照组比较,模型组除了饮食状态和饮水状态,其余指标均出现了较大的差别;与模型组比较,逍遥散高、中、低剂量组均出现不同程度的好转,其中以低剂量组的各项表现与空白对照组最为接近,特别是在皮肤毛发、情绪反应和睡眠状态方面。在实验后期,低、中剂量组大鼠出现一定程度的兴奋状态。早晚给药组比较,晚上给药组大鼠整体状态好于早上给药组。早晚低剂量组比较,晚上给药低剂量组在 8 d 时的各项状态都好于早上,而 4 d 和 12 d 时的各项状态相当。

**2.2 血清中 ALT 和 AST 的含量** 结果见表 1。逍遥散组 ALT 值存在一定的反量效关系;低剂量组(早、晚) ALT 值降低最明显,低于中、高给药组,差异有极显著性;昼低剂量 ALT 低于夜高剂量,夜高剂量 AST 低于昼高剂量,其余同剂量昼夜差别不大。

表 1 逍遥散对肝损伤大鼠血清 ALT,AST 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>
空白对照	—	82.1 ±12.0 <sup>2)</sup>	145.6 ±10.9 <sup>2)</sup>
模型对照	—	202.3 ±19.5	254.6 ±43.6
逍遥散(昼)	8.26	119.8 ±12.6 <sup>2)</sup>	175.1 ±20.1 <sup>2)</sup>
	16.52	153.7 ±21.0 <sup>2,4)</sup>	235.2 ±50.5 <sup>4)</sup>
	33.04	168.3 ±23.4 <sup>2,4)</sup>	240.6 ±20.2 <sup>4)</sup>
逍遥散(夜)	8.26	132.1 ±10.5 <sup>2,5)</sup>	158.4 ±13.5 <sup>2)</sup>
	16.52	150.8 ±23.4 <sup>2,3)</sup>	227.5 ±17.7 <sup>4)</sup>
	33.04	171.2 ±18.7 <sup>2,4)</sup>	183.7 ±25.9 <sup>2,3,6)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01;与低剂量组比较<sup>3)</sup> *P* < 0.05, <sup>4)</sup> *P* < 0.01;夜与昼同剂量比较<sup>5)</sup> *P* < 0.05, <sup>6)</sup> *P* < 0.01(下同)。

**2.3 肝组织中 SOD 和 MDA 的含量** 结果见表 2。逍遥散组 SOD 值存在一定的反量效关系;低剂量组(晚) SOD 值最高,高于其余给药组;早晚各相同剂量组 SOD 值比较,晚上给药组高于早上给药组,差异有显著性;给药组 MDA 值存在一定的反量效关系;低剂量组(晚) MDA 值最低,低于中剂量组(早、

晚)、高剂量组(早、晚),同剂量组差异有极显著性;晚上各给药组 MDA 明显低于早上给药组,差异有极显著性。

表 2 逍遥散对肝损伤大鼠肝匀浆 SOD,MDA 的影响(̄±s, n=10)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	SOD /U·mg <sup>-1</sup>	MDA /nm·mg <sup>-1</sup>
空白对照	—	197.3 ±14.2 <sup>2)</sup>	1.24 ±0.58 <sup>2)</sup>
模型对照	—	46.7 ±18.8	6.90 ±1.98
逍遥散(昼)	8.26	136.4 ±14.7 <sup>2,4)</sup>	3.65 ±1.86 <sup>2)</sup>
	16.52	106.2 ±12.9 <sup>2,4)</sup>	5.76 ±0.94 <sup>4)</sup>
	33.04	102.4 ±25.9 <sup>2)</sup>	6.12 ±2.73 <sup>3)</sup>
逍遥散(夜)	8.26	223.7 ±7.2 <sup>2,6)</sup>	2.03 ±0.78 <sup>2,5)</sup>
	16.52	154.7 ±16.3 <sup>2,4,6)</sup>	2.97 ±1.16 <sup>2,6)</sup>
	33.04	141.6 ±37.0 <sup>2,4,5)</sup>	4.21 ±1.72 <sup>2,4)</sup>

**2.4 肝组织病理形态学** 结果见表 3。空白对照组肝小叶结构完整,肝细胞无肿胀、变性、坏死、炎性细胞浸润及纤维增生。模型组大部分纤维组织增生,少数肝小叶正常结构被破坏,肝细胞索排列紊乱,部分肝细胞变性坏死,有细胞水肿现象,提示造模成功。高、中、低剂量组不同程度改善,表现为肝细胞结构趋于正常,肿胀程度减轻,纤维组织增生减轻,脂肪变性,炎性细胞浸润减少;其中低剂量效果最好,晚上给药组略优于早上给药组,但两者之间无显著显著性差异。

表 3 逍遥散对肝损伤大鼠肝脏病理分级的影响(n=10)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	病理分级			
		-	+	++	+++
空白对照	-	10	0	0	0
模型对照	-	0	0	8	2
逍遥散(昼)	8.26	1	6	3	0 <sup>2)</sup>
	16.52	1	4	5	0 <sup>2)</sup>
	33.04	0	4	5	1
逍遥散(夜)	8.26	2	7	1	0 <sup>2)</sup>
	16.52	1	5	4	0 <sup>2)</sup>
	33.04	0	5	4	1 <sup>1,3)</sup>

注:正常肝组织为“-”;肝小叶结构完整,肝细胞点状坏死,炎性细胞浸润,散在的肝细胞脂肪变性为“+”;纤维组织增生向肝组织小叶内延伸“++”;肝细胞结构紊乱,纤维组织增生,桥接坏死,早期肝坏死为“+++”。

**2.5 体重变化** 与空白对照组比较,模型组在 4 ~

7 d 时体重出现较大波动,8 ~12 d 时体重接近平稳但下降趋势开始显现;与模型组比较,逍遥散低剂量组(早、晚)体重在 5 d 后趋于平稳并呈上升趋势,中剂量组(早、晚)和高剂量组(早、晚)体重在后 4 d 呈上升趋势;早晚相同剂量组体重比较,低剂量组(晚)后期体重增长斜率明显高于低剂量组(早),晚上给药组后期体重明显高于早上给药组。

### 3 讨论

本研究在成功建立 CCl<sub>4</sub> 大鼠肝损伤模型的基础上,以高、中、低剂量的逍遥散分昼夜不同时间 ig 对其进行干预,发现逍遥散能减轻肝损伤,显著降低血清转氨酶,改善 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝组织细胞变性、坏死及炎性细胞浸润,使之趋于正常,并能恢复肝小叶的正常结构,减轻肝组织和血清中的过氧脂质化,清除自由基。

早晚相同剂量组比较,晚上给药组(一般行为状态、体重变化,AST, SOD, MDA) 显示出比早上更好的保肝趋势。我国中医药学有悠久的“择时用药”和“因时制宜”原则,根据中医 12 时辰归经理论<sup>[1]</sup>、中药血清药理学和胃肠药动学理论<sup>[2]</sup>,在晚上 8 点给药,在其服药后会出现数个药效作用高峰。逍遥散入肝、脾二经,晚上 1 00 ~3 00(丑时)肝经当令,与肝经活动最旺盛的时间恰好重叠,导致药效增加。

根据时辰生物药剂学和药物动力学<sup>[3]</sup>的理论,药物如果水溶性大,则早晚吸收的差异不大;药物如果水溶性小,则早晚吸收差异显著。据此,本实验室正运用药物动力学手段对造成逍遥散昼夜保肝药效差异的原因进行深入研究。

### [参考文献]

- [1] 冯建勇,张文志,韩全荣.昼夜节律与合理用药[J].河南医药信息,1999,7(9):57.
- [2] 杨奎,蒲旭峰.论“中药胃肠药动学研究”的意义及对策[J].中国实验方剂学杂志,1998,4(1):37.
- [3] 何绍雄.时间药理学与时间治疗学[M].天津:天津科技出版社,1994:116.

[责任编辑 何伟]