

# 消炎利胆片对实验性肝炎及急性炎症的影响

尹小萍<sup>1</sup>, 栗原博<sup>1\*</sup>, 宝 丽<sup>2</sup>, 姚新生<sup>1,2</sup>

(1. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632;

2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 研究消炎利胆片对痤疮丙酸杆菌和脂多糖(*P. acnes*-LPS)诱发小鼠肝炎和急性炎症的影响。方法: 建立 *P. acnes*-LPS 诱发小鼠肝炎模型, 测定小鼠血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性。观察消炎利胆片对 2,4-二硝基氟苯(DNFB)诱发变应性接触性皮炎(ACD)的影响, 以及对巴豆油致小鼠急性耳肿胀和角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响, 评价消炎利胆片对迟发性过敏反应及急性炎症的作用。结果: 与模型组相比, 消炎利胆片能抑制由 *P. acnes*-LPS 诱发肝炎小鼠血浆 ALT 活性的升高。此外, 消炎利胆片对 DNFB 诱发的 ACD、巴豆油致小鼠耳肿胀及角叉菜胶引起足肿胀也显示一定程度的抑制作用。结论: 消炎利胆片对 *P. acnes*-LPS 诱发小鼠肝炎有较好的抑制效果, 对于急性炎症也显示一定的改善作用。

[关键词] 消炎利胆片; 痤疮丙酸杆菌-脂多糖; 抗炎

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)11-0045-04

## Effects of Xiaoyanlidanpian on Experimental Hepatitis and Acute Inflammation

YIN Xiao-ping<sup>1</sup>, KURIHARA Hiroshi<sup>1\*</sup>, BAO Li<sup>2</sup>, YAO Xin-sheng<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. School of Traditional Chinese Materia Medica Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Xiaoyanlidanpian (XLP) on mice model of experimental hepatitis and acute inflammation. **Methods:** The experimental hepatitis model was established by injection of *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide (*P. acnes*-LPS) via lateral tail vein. Hepatic function was evaluated by assessing Alanine aminotransferase level (ALT) in plasma. The effect of Xiaoyanlidanpian on allergic contact dermatitis (ACD) induced by DNFB was studied in mice to observe its effect on delayed-type hypersensitivity (DTH). Croton oil and Carrageenan were used as well to observe its effect on acute inflammation. **Results:** Compared to the model group, Xiaoyanlidanpian can inhibit the activities of ALT in mice plasma. Meanwhile, Xiaoyanlidanpian could ameliorate the ear swelling in ACD model and acute inflammatory model induced by croton oil. It also reduced the thickness of the mice hind paw induced by carrageenan as well. **Conclusion:** Xiaoyanlidanpian exerted potential effects on experimental hepatitis. Xiaoyanlidanpian also show partial effect on acute inflammation.

[Key words] Xiaoyanlidanpian; *P. acnes*-LPS; anti-inflammation

[收稿日期] 2008-04-07

[基金项目] 广州市中药现代化研究重大科技专项资助项目 (2004Z1E5011)

[通讯作者] \* 栗原博, Tel: (020) 85221352; E-mail: Hiroshi.Kurihara@163.com

由穿心莲、溪黄草和苦木组成的消炎利胆片, 具有清热、祛湿、利胆等功效。穿心莲为爵床科植物 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, 其成分主要为穿心莲内酯、新穿心莲内酯、穿心莲内酯苷、黄酮类等。溪黄草为唇形科植物 *Rabdosia lophanthoides* (Buch-Ham. ex D. Don) Hara Var. *gerardiana* (Benth.)

Hara, 其成分主要有黄酮类、咖啡酸衍生物类、单萜类、二萜类等。苦术为苦木科植物苦木 *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn. 的干燥枝及叶, 富含苦木苦味素和生物碱。至今为止的研究证明消炎利胆片对急性肝损伤、慢性迁延性及慢性活动性肝炎具有较好的临床疗效<sup>[1-2]</sup>, 但尚未见有关消炎利胆片对实验性肝炎保护作用的研究报道。

本研究探讨消炎利胆片对 *P. acnes*-LPS 诱发肝炎小鼠血浆中丙氨酸氨基转移酶(ALT) 的影响。同时, 也利用 2, 4-二硝基氟苯(DNFB) 建立小鼠变应性接触性皮炎(ACD) 模型评价其对迟发性超敏反应(DTH) 的改善效果, 用巴豆油诱发小鼠耳肿胀模型和角叉菜胶致小鼠足肿胀模型评价其急性抗炎作用。

## 1 材料

**1.1 实验动物** 7 周龄 (18~22) g 雄性清洁级昆明种小鼠, 购自广东省医学实验动物中心(许可证号 SCXK(粤) 2003-0002)。实验动物在清洁级层流架中饲养, 饲养温度(23±2) °C, 照明时间 12 h·d<sup>-1</sup> (7:00~19:00 开灯)。适应性饲养 1 周后进行实验。

**1.2 药物与试剂** 消炎利胆片(XLP, 批号: 05021002) 由广州白云山和记黄埔中药有限公司提供, 其组成穿心莲、溪黄草和苦木由广州市药品检验所的刘柏英主任鉴定; *P. acnes* 菌株(ATCC6919) 由日本 SUNTORY 公司研究中心提供; 环孢菌素 A (CsA) 购自杭州中美华东制药有限公司; 醋酸地塞米松(DEX) 为天津药业集团新郑股份有限公司产品; ALT 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 脂多糖(LPS) DNFB、巴豆油(Croton oil)、伊文斯兰及角叉菜胶(CAR) 均为 Sigma 产品。实验用水为双蒸水。磷酸、丙酮等均为国产分析纯。

**1.3 分析仪器** Multiskan MK3 型酶标仪(Thermo Labsystems Inc., Finland); 3~18 K 型台式高速冷冻离心机(Sartorius, Göttingen, Germany); BS210S 电子分析天平(Sartorius, Göttingen, Germany); pH5-25 型酸度计购自上海伟业仪器厂; 绝对原点编码型 Digimatic 卡尺为日本三丰公司(Mitutoyo) 500 系列, 分辨率为 0.01 mm。

## 2 方法

**2.1 XLP 对 *P. acnes*-LPS 肝炎模型的影响**

**2.1.1 热灭活 *P. acnes* 干粉的制备<sup>[3]</sup>** *P. acnes* 菌株接种在添加 0.03% L-半胱氨酸和 0.03% 吐温 80

的脑-心浸萃液态培养基培养液中, 置于厌氧培养装置内 37 °C 培养 48 h。培养后回收菌液在 4 °C、10 000 g 离心 15 min, 并以 PBS 洗涤。洗涤后的菌细胞重新以 PBS 分散, 80 °C 加热 30 min 灭活后冷冻干燥, 并回收得 *P. acnes* 干粉。

**2.1.2 *P. acnes*-LPS 肝炎模型制备及给药方法<sup>[4]</sup>**

单次小鼠尾 iv 20 mg·kg<sup>-1</sup> 热灭活 *P. acnes* 生理盐水溶液, 5 d 后再尾 iv 5 μg·kg<sup>-1</sup> LPS-PBS 溶液。实验动物在 LPS 注射 5 h 后乙醚麻醉下心脏取血, 置于肝素处理后的离心管中, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 回收血浆储于-20 °C, 用于 ALT 活性分析。

实验动物分组按表 1 所示, 共 6 组, 每组 10 只。*P. acnes* 负荷前 1 d 起每天 1 次连续 7 d ig 给予消炎利胆片水溶液, 末次给药在 LPS 注射 30 min 前, 对照组给予等容量水溶液。CsA 从 *P. acnes* 负荷后 1 d 起隔日 ip。

**2.1.3 ALT 活性测定** 小鼠全血以 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 分离血浆。直接以赖氏法测定 ALT 活性。

**2.2 XLP 对 DNFB 诱发小鼠耳廓 DTH 的影响** 雄性小鼠随机分为模型对照组、消炎利胆片 125, 250, 500 mg·kg<sup>-1</sup> 及 DEX 1 mg·kg<sup>-1</sup> 组, 共 5 组, 每组 10 只。受试药物于致敏前 1 d 到 DNFB 攻击当天连续 7 d ig。用 15 mg·mL<sup>-1</sup> DNFB 乙醇溶液 50 μL 在小鼠背部 sc 致敏。第 6 d 在小鼠右耳涂 10 mg·mL<sup>-1</sup> DNFB (丙酮: 橄榄油 4: 1) 溶液 25 μL 作攻击, 24 h 后处死。处死前 1 h, 按 0.1 mL·10 g<sup>-1</sup> 剂量小鼠尾 iv 10 mg·mL<sup>-1</sup> 伊文氏兰生理盐水溶液。用直径 8 mm 打孔器取下耳组织片, 以两耳片重量差代表肿胀度。称重后将耳组织片放入 1 mL 1 mol·L<sup>-1</sup> KOH 水溶液中, 37 °C 下浸泡 24 h 后, 添加 9 mL 0.6 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸丙酮(5: 13) 溶液, 充分搅拌后 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 上清液于 620 nm 波长处测定吸光度, 作为血管通透性指标。

**2.3 XLP 对巴豆油诱发小鼠耳廓肿胀的影响** 动物分组及给药方法同 2.2。将 3 mg·mL<sup>-1</sup> 巴豆油丙酮溶液 25 μL 均匀涂抹在小鼠右耳缘中央造模。受试药物于致炎前 1 h 及致炎同时两次给药。致炎 3 h 后按 0.1 mL·10 g<sup>-1</sup> 剂量小鼠尾 iv 10 mg·mL<sup>-1</sup> 伊文氏兰生理盐水溶液。1 h (即致炎 4 h) 后, 用直径 8 mm 打孔器取下耳组织片, 评价指标同 2.2。

**2.4 XLP 对角叉菜胶(CAR) 诱发小鼠足肿胀的影响** 动物分组及给药方法同 2.2。实验时自足跖中下

部向上注入  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  角叉菜胶水溶液  $10 \mu\text{L}$  造模。受试药物于致炎前 1 h 及致炎同时两次给药。致炎 4 h 后, 用 Digimatic 卡尺测量足肿胀厚度。

**2.5 统计学处理** 实验数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 采用单因素方差分析法及  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 XLP 对 *P. acnes*-LPS 诱发小鼠肝炎血浆 ALT 水平的影响** 如表 1 所示, 与正常对照组相比, 模型小鼠血浆 ALT 活性显著升高 ( $P < 0.01$ )。而 XLP 剂量依赖性改善模型小鼠血浆 ALT 水平。其中 XLP 大剂量组抑制率达 40.95% ( $P < 0.01$ )。

表 1 XLP 对 *P. acnes*-LPS 致肝炎小鼠血浆 ALT 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Treated with	ALT( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Inhibition (%)
—	$38.01 \pm 3.95^{2)}$	—
<i>P. acnes</i> -LPS	$116.67 \pm 12.97$	—
<i>P. acnes</i> -LPS+ $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CsA	$54.91 \pm 4.08^{2)}$	52.94
<i>P. acnes</i> -LPS+ $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$112.51 \pm 9.39$	3.57
<i>P. acnes</i> -LPS+ $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$84.15 \pm 16.82$	27.88
<i>P. acnes</i> -LPS+ $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$68.90 \pm 9.86^{1)}$	40.95

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (下同)

表 2 XLP 对 DNFB 诱发耳肿胀及耳血管通透性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Treated with	Ear weigh difference (mg)	Evans blue leakage ( $\mu\text{g} \cdot \text{ear}^{-1}$ )
DNFB	$28.29 \pm 0.68$	$0.1675 \pm 0.0195$
DNFB+ $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DEX	$23.58 \pm 1.18^{2)}$	$0.0506 \pm 0.0039^{2)}$
DNFB+ $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$27.83 \pm 1.33$	$0.1512 \pm 0.0186$
DNFB+ $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$26.33 \pm 1.08$	$0.1302 \pm 0.0162$
DNFB+ $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$25.30 \pm 1.31^{1)}$	$0.0907 \pm 0.0095^{2)}$

**3.2 XLP 对 DNFB 诱发小鼠 DTH 的影响** 如表 2 所示, 不同剂量的 XLP 和 DEX 均显示一定程度抑制 DNFB 引起的耳肿胀及耳血管通透性的增加。其中 XLP 大剂量组具有显著的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。

**3.3 XLP 对 Croton oil 诱发小鼠耳肿胀及耳血管通透性的影响** 如表 3 所示, XLP 各组 and DEX 对小鼠耳肿胀以及血管通透性的增加显示一定程度的抑制作用, 其中 XLP 大剂量组有显著的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。

**3.4 XLP 对 CAR 诱发小鼠足肿胀的影响** 如表 4 所示, 不同剂量的 XLP 和 DEX 均能缓解 CAR 引起

的足肿胀。其中, 中及大剂量组具有显著的抑制作用 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 3 XLP 对 Croton oil 诱发耳廓肿胀及耳血管通透性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Treated with	Ear weigh difference (mg)	Evans blue leakage ( $\mu\text{g} \cdot \text{ear}^{-1}$ )
croton oil	$14.39 \pm 0.78$	$0.0590 \pm 0.0042$
croton oil+ $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DEX	$2.46 \pm 0.37^{2)}$	$0.0268 \pm 0.0029^{2)}$
croton oil+ $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$13.91 \pm 0.74$	$0.0544 \pm 0.0040$
croton oil+ $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$12.33 \pm 1.42$	$0.0473 \pm 0.0063$
croton oil+ $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$12.19 \pm 0.83^{1)}$	$0.0345 \pm 0.0043^{2)}$

表 4 XLP 对 CAR 诱发小鼠足肿胀的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Treated with	Thickness (mm)
CAR	$0.54 \pm 0.06$
CAR+ $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DEX	$0.32 \pm 0.04^{2)}$
CAR+ $125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$0.43 \pm 0.03$
CAR+ $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$0.36 \pm 0.03^{1)}$
CAR+ $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ XLP	$0.34 \pm 0.04^{2)}$

### 4 讨论

由于 *P. acnes*-LPS 诱发肝炎可以被 CsA 等免疫抑制剂所抑制, 因此认为 *P. acnes*-LPS 肝炎模型近似自身免疫性肝炎的病理过程<sup>[5]</sup>。与模型组相比, 我们确认消炎利胆片能够有效的改善模型小鼠血浆 ALT 水平升高, 减轻 *P. acnes*-LPS 负荷引起的肝炎, 且呈一定的剂量依赖性关系。

消炎利胆片对 DNFB 和巴豆油诱发的耳肿胀及血管通透性增加具有明显的抑制作用, 说明消炎利胆片对急性炎症有一定的抑制效果。韩光等人<sup>[6,7]</sup>采用蛋清致大鼠足肿胀模型发现消炎利胆片主要成分穿心莲中的穿心莲内酯类化合物有较好的抗炎活性, 并证明其抗炎活性与该化合物的双键位置相关。此外, 廖雪珍等人<sup>[8]</sup>的研究结果表明消炎利胆片的另一个主要成分溪黄草提取物能有效抑制二甲苯引起的小鼠耳部炎症反应, 并抵抗醋酸引起的小鼠腹腔毛细血管通透性增加及改善  $\text{CCl}_4$  诱发的小鼠急性肝损伤。本研究证明消炎利胆片对 *P. acnes*-LPS 诱发小鼠实验性肝炎及其它急性炎症的抗炎效果, 可以推测与其组成成分穿心莲、苦木及溪黄草含有的穿心莲内酯类化合物、二萜化合物等<sup>[9-11]</sup>活性物质相关。我们的研究结果证实的消炎利胆片抗炎活性, 为其应用提供一定的实验依据。

## [参考文献]

- [ 1 ] 阎玉兰. 超短波联合消炎利胆片治疗慢性胆囊炎的疗效观察[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(2): 230-231.
- [ 2 ] 叶长荣, 长尾由纪子, 李楚源, 等. 消炎利胆片防治大鼠急性肝损伤的实验研究[J]. 中成药, 2006, 28(11): 1616-1619.
- [ 3 ] Shuto Y, Kataoka M, Higuchi Y, *et al.* Roles of CD14 in LPS-induced liver injury and lethality in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*[J]. *Immunol Lett*, 2004, 94(1-2): 47-55.
- [ 4 ] Kurihara H, Fukami H, Shibata H, *et al.* Influence of histamine in a liver injury model induced by *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide[J]. *Biol Pharm Bull*, 2003, 26(10): 1393-1397.
- [ 5 ] Hase K, Ohsugi M, Xiong Q, *et al.* Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB. On experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide[J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(4): 381-385.
- [ 6 ] 韩光, 曾超, 杜钢军, 等. 穿心莲内酯衍生物的合成及其抗炎免疫活性[J]. 中草药, 2006, 37: 1771-1775.
- [ 7 ] 陈国祥, 丁伯平, 陈斌, 等. 穿心莲胶囊的抗炎作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2001, 10(11): 1004-1005.
- [ 8 ] 廖雪珍, 廖惠芳, 叶木荣, 等. 线纹香茶菜、狭基线纹香茶菜、溪黄草水提物抗炎、保肝作用初步研究[J]. 中药材, 1996, 19: 363-365.
- [ 9 ] 邓文龙. 脱水穿心莲内酯琥珀酸半酯的药理作用研究 I - 抗炎作用[J]. 药学学报, 1980, 15(10): 590.
- [ 10 ] 邓文龙. 四种穿心莲内酯的药理作用比较[II]. 药学学报, 1982, 17(4): 195.
- [ 11 ] 薛芳, 许占民. 中国药物大全[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 67-68.