

茵陈蒿汤对乙醇诱导的大鼠急性肝损伤的保护作用研究^{*}

□刘 莲 孙 晖 王喜军^{**} 王 萍 吴泽明 吕海涛 孙文军
(黑龙江中医药大学 哈尔滨 150040)

摘 要:目的:系统评价茵陈蒿汤对乙醇诱导的大鼠急性肝损伤的保护作用。方法:75只 Wistar 大鼠随机分为5组,模型组给予生理盐水,给药组按体重分别给予茵陈蒿汤冻干粉,连续给药14天,于第10日起模型组和给药组同时灌胃给予乙醇50%(v/v)连续5天(5g/kg),空白组给予生理盐水;于第15日处死大鼠,分离血清及肝组织匀浆液,检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)、乙醇脱氢酶(ADH)、 γ -L-谷氨酰转肽酶(γ -GT)、谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)的活性和效价,观察肝脏组织学情况。结果:模型组血清ALT、AST、ADH、 γ -GT及TG活性明显高于正常对照组,有显著性差异($P < 0.01$),表明模型复制成功;与正常对照组相比,治疗组上述指标仅轻度升高,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$);模型组MDA含量明显高于正常对照组,具有显著性差异,治疗组低剂量和中剂量也明显升高,与模型组比较差异无显著性意义($P < 0.05$);治疗组高剂量轻微升高,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$);模型组GSH含量明显低于正常对照组,有显著性差异($P < 0.01$),其在治疗组低剂量和中剂量中也明显降低,与模型组比较无显著性差异,而在治疗组高剂量中轻微降低,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$),同时,组织病理学也得出上述相同的结论。结论:茵陈蒿汤对乙醇诱导的大鼠急性肝损伤具有良好的保护作用。

关键词:茵陈蒿汤 急性肝损伤 肝保护 代谢组学 证本质研究

目前,乙醇的滥用与乙醇性依赖已成为一个重要的社会和医疗问题。肝脏是体内乙醇代谢的主要器

官,乙醇的过量摄入会使肝脏受到不同程度的损伤。已有研究报道,乙醇接触性暴露能够导致实验性动物肝脏损伤^[1,2],因此基于对乙醇性肝损伤动物模型的影响,可以评价药物对人体对乙醇性肝损伤的保护作

收稿日期:2007-05-18

修回日期:2007-07-16

^{*} 国家重大基础研究发展计划(973)资助项目(2005CB523406):基于体内直接作用物质的类方配伍规律研究,负责人:王喜军;国家自然科学基金重大研究计划(90709019):基于代谢组学的中医证候本质及方证相应的研究,负责人:王喜军。

^{**} 联系人:王喜军,本刊编委,教授,博士生导师,主要从事中药血清药物化学及方剂配伍规律研究, Tel:0451-82110818, Email: wxj@hljucm.net。

用。茵陈蒿汤始载于汉代张仲景所著的《伤寒论》，由茵陈蒿、栀子、大黄三味中药配伍组方而成，具有利胆退黄之功，为治疗黄疸等肝胆性疾病的代表方剂^[3,4]。本研究在优化已建立的大鼠急性乙醇性肝损伤动物模型的基础上^[5]，选取系列乙醇性肝损伤表征性生理生化指标 (Biomarkers)，对茵陈蒿汤肝损伤保护作用进行评价，同时也为湿热黄疸的动物模型的复制建立背景资料。

一、实验材料及仪器

1. 药材

茵陈蒿购于日本新内田制药有限公司天津分公司 (天津，中国)，栀子和大黄购于北京同仁堂制药集团哈尔滨药店 (哈尔滨，中国)，以上药材均经黑龙江中医药大学王喜军教授鉴定；

2. 仪器

Waters 2695 型 HPLC 色谱仪匹配 Waters 2996 型 PDA 紫外检测器，Waters 2996 型四元泵系统和 Waters 2996 型自动进样器 (美国 Waters 公司，美国)；Kromasil C18 色谱柱 (4.6mm × 200mm, 5μm) (大连化学物理研究所，大连，中国)，Nova-Pak C18 Guard-Pak™ 保护柱；日立 ky2000 型 clinical spectrometer 半自动生化分析仪；DY89-II 型电动玻璃匀浆机 (宁波新芝生物科技股份有限公司)；PB1501-N 电子天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司)；SK-I 型快速混匀器。

3. 药品与试剂

谷丙转氨酶试剂盒 (ALT)、谷草转氨酶试剂盒 (AST)、甘油三酯试剂盒 (TG) 均购自中生北控生物科技股份有限公司 (批号分别为 060831、060830 和 060820)，乙醇脱氢酶试剂盒 (ADH) 购自长春汇力生物技术有限公司 (批号：20061115)，γ-L-谷氨酰转肽酶试剂盒 (γ-GT)、谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒和丙二醛 (MDA) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所 (批号分别为 20060826、20060818 和 20060825)；无水乙醇购自 (北京化工厂，批号分别为 20051216 和 20060715)；乙腈购自美国天地公司。

4. 动物

Wistar 雄性大鼠，体重 200 ± 20g 购于上海斯莱克实验动物有限公司 (上海，中国)；每日给予大鼠标准食物和饮用水各两次，保持光照和避光循环饲养 (12/12 h)；实验开始前保持室内饲养一周。

二、实验方法

1. 茵陈蒿汤供试品溶液的制备

遵照《伤寒论》原文^[6]，折合成现代剂量，茵陈蒿汤的制备方法为：准确称取 18g 茵陈蒿，加水 1400 mL 煮沸，保持沸腾煎煮至 700 mL，加入 9g 栀子和 6g 大黄，再保持沸腾煎煮 10 min，煎煮液过五层纱布，滤液浓缩至 1g/mL，制成冻干粉 (出粉率约为 20.4%)。精确称取茵陈蒿汤冻干粉 0.4、1.2 和 2.4g 分别溶于 2mL 蒸馏水，制备成浓度分别为 0.2g/mL、0.6g/mL 和 1.2g/mL 的三个高中低给药样品溶液，供实验给药用。

表 1 茵陈蒿汤中绿原酸、栀子苷、6,7-二甲氧基香豆素、茵陈色原酮和大黄酸同时含量测定结果

化合物	samplesQuantity										Mean ± SD (mg/g)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
绿原酸 (mg/g)	4.9345	4.7869	4.8434	4.9033	4.8521	4.9103	4.8283	4.8610	4.8921	4.9055	4.87 ± 0.05
栀子苷 (mg/g)	16.5282	16.2276	16.3039	16.4170	16.1509	16.2031	16.3221	16.3531	16.2025	16.3213	16.30 ± 0.11
6,7-二甲氧基香豆素 (mg/g)	7.3663	7.1360	7.2120	7.2715	7.2986	7.2322	7.1991	7.3015	7.2320	7.2126	7.25 ± 0.06
茵陈原酮 (mg/g)	0.9928	0.9859	0.9727	0.9847	0.9678	0.9821	0.9899	0.9724	0.9839	0.9788	0.98 ± 0.01
大黄酸 (mg/g)	1.4625	1.4936	1.4725	1.4484	1.4703	1.4603	1.4722	1.4745	1.4609	1.464	1.47 ± 0.01

2. 造模及给药

将 75 只 Wistar 大鼠随机分为 5 组,即乙醇模型组 (EG),正常对照组 (CG),茵陈蒿汤高中低三个剂量组 (HG, MG 和 LG); 各给药组按 2g/kg、6g/kg 和 12g/kg 的剂量 (相当于成人每日剂量的 1、3、6 倍) 分别给予茵陈蒿汤冻干粉,模型组及空白组给予生理盐水,连续给药 9 天,第十日起乙醇模型组和给药组同时灌胃给予乙醇 50% (v/v) 连续 5 天 (5g/kg),空白组持续给予等量生理盐水;

3. 样品测定

各组末次灌胃后 16 小时^[7],于腹腔静脉取血,4℃ 下 3000rpm 离心 15min,分离血清,按照相应测定方法^[8],分别测定 ALT、AST、TG、γ-GT、ADH 活性;并用 0.9% 的生理盐水于肝门静脉处灌流肝脏以排除肝脏血液,从左腹位

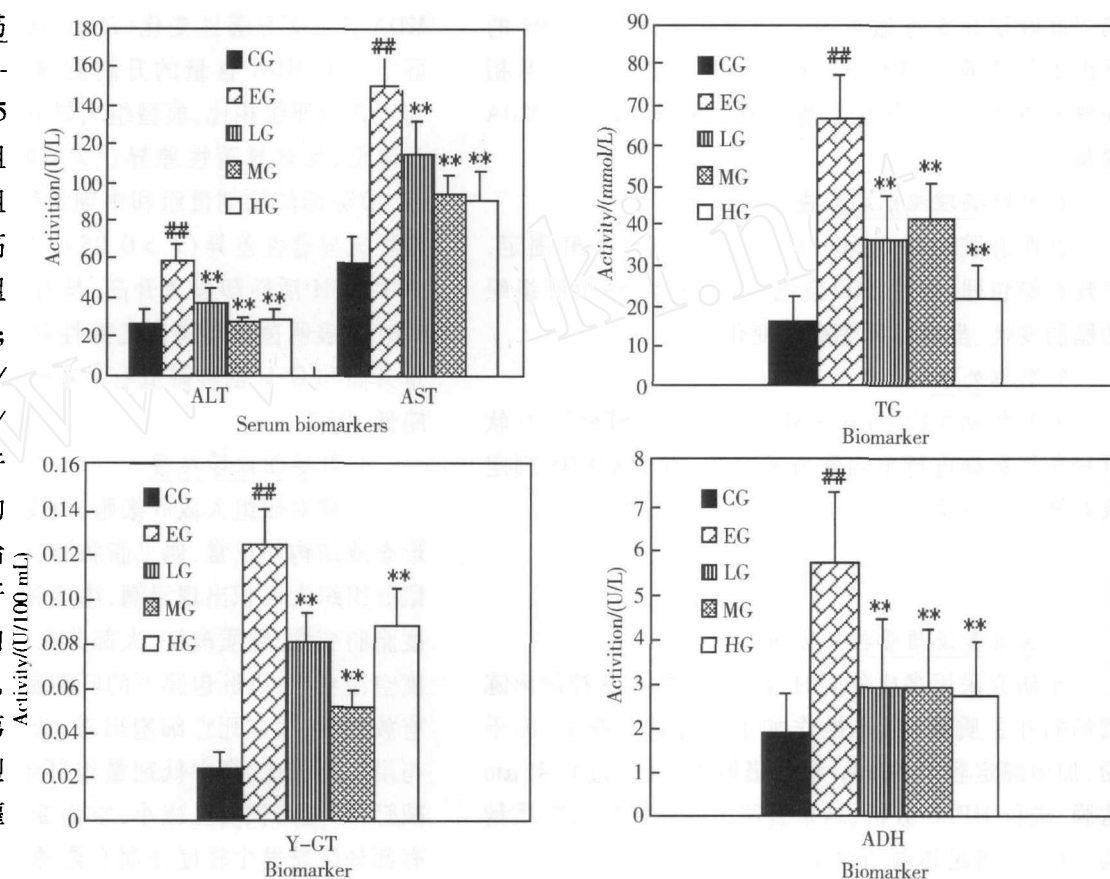


图1 茵陈蒿汤对大鼠血清中 AST, ALT, γ-GT, TG 和 ADH 活性的影响
##与空白组比较有统计学意义 ($P < 0.01$); * 与模型组比较有统计学意义 ($P < 0.01$)

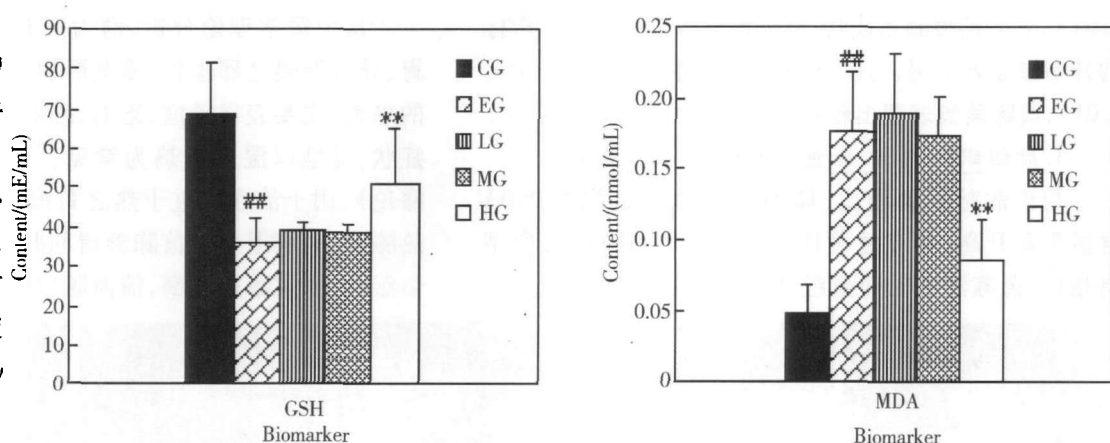


图2 茵陈蒿汤对大鼠肝细胞中 MDA 含量和 GSH 活性的影响
##与空白组比较有统计学意义 ($P < 0.01$); * 与模型组比较有统计学意义 ($P < 0.01$)

第二肝叶切 0.5 克加 4.5mL 生理盐水混匀成 10% 的肝组织匀浆液^[9], 4℃ 下 3000rpm 离心 15min, 按照相应测定方法^[10,11], 分取上清液测定 GSH 活性及 MDA 含量。

4. 肝脏病理组织学检查

在距肝脏边缘 0.5cm 处取材, 用 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜观察, 评价肝组织的脂肪变性、炎症坏死等病理变化。

5. 数据处理

所有数据均以 Mean ± SD 表示, 采用 SPSS11.0 软件对所得数据进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 判定具有统计学意义。

三、结果

1. 茵陈蒿汤质量控制分析

本研究采用多成分同时含量测定的方法控制茵陈蒿汤的外在质量, 具体操作如下: 精确称取 1g 冻干粉, 加甲醇定容至 50ml, 超声提取 1 小时, 过 0.45μm 滤膜, 进行 HPLC 分析, 结果表明茵陈蒿汤提取物质量均一稳定, 满足体内药效学评价的要求(表 1)。

2. 血清中 ALT、AST、ADH、γ-GT 及 TG 活性的测定

与正常对照组相比, 模型组血清 ALT、AST、ADH、γ-GT 及 TG 活性明显升高, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 表明模型制备成功; 茵陈蒿汤各剂量组上述指标的升高被显著抑制, 与模型组相比有显著性差异 ($P < 0.01$), 茵陈蒿汤表现出较好的肝脏保护活性(图 1)。

3. 肝组织中 MDA 含量和 GSH 活性的测定

与正常对照组相比, 模型组大鼠肝组织中 MDA 含量明显升高, 具有显著性差异 ($P < 0.010$); 与模型组相比, 茵陈蒿汤低剂量组和中剂量组大鼠肝组织中

MDA 含量无显著性变化 ($P > 0.05$), 而高剂量组大鼠肝组织中 MDA 含量的升高被显著抑制 ($P < 0.01$)。与正常对照组相比, 模型组大鼠肝组织中 GSH 活性明显降低, 具有显著性差异 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 茵陈蒿汤低剂量组和中剂量组大鼠肝组织中 GSH 活性无显著性差异 ($P > 0.05$), 而高剂量组大鼠肝组织中 GSH 活性却显著升高, 具有有显著性差异 ($P < 0.01$), 表明茵陈蒿汤对乙醇性肝损伤造成的 MDA 含量升高和 GSH 活性降低有一定的调节作用, 但敏感性略低(图 2)

4. 肝脏组织学观察

正常对照组大鼠肝细胞、内皮细胞、肝小叶及血管形态或结构均正常, 偶见脂肪滴; 给予乙醇的模型组大鼠肝组织大面积出现浸润, 渗透和局部灶样性坏死, 中度脂肪变性, 胞质疏松, 大部分大鼠肝组织出现不同程度空泡变性, 以肝包膜下的肝细胞为明显, 肝中央区域有放射性, 散在死亡细胞出现; 茵陈蒿汤干预组大鼠, 与模型组相比, 高中低剂量组肝组织损伤程度均明显减轻, 坏死面积明显减小, 空泡变性情况明显改善, 偶有部分区域发生轻度浸润和渗透现象, 肝细胞死亡数明显减少, 且高剂量组大鼠整体肝细胞状态接近正常对照组大鼠。(图 3)

四、讨论及结论

从中医学理论分析, 酒为湿邪, 过量饮酒, 伤及脾胃, 导致湿热之邪蕴积, 熏蒸肝胆。临床乙醇性肝损伤的患者, 主要表现黄疸、乏力、恶心、纳呆等湿热困脾的症状, 证型以湿重于热为常见。茵陈蒿汤出自于《伤寒论》, 用于治疗湿重于热之黄疸, 茵陈、栀子、大黄清热除湿, 利胆退黄。茵陈善清利肝胆湿热, 栀子清泄三焦湿热, 大黄凉血逐瘀, 清泄肠胃湿热。茵陈配大黄使

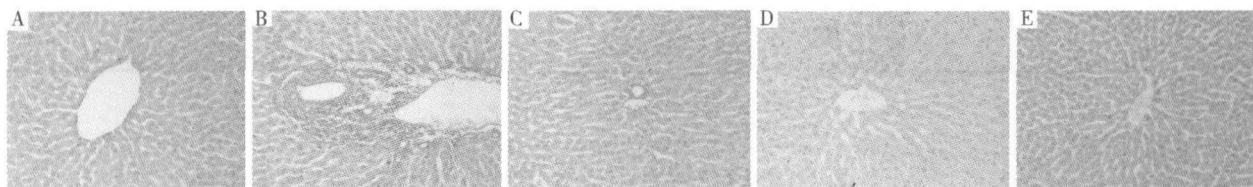


图 3 肝脏组织病理学观察(A:空白对照组;B:模型组;C:茵陈蒿汤低剂量干预组;D:茵陈蒿汤中剂量干预组;E:茵陈蒿汤高剂量干预组)

瘀热从大便而解,茵陈配栀子可使湿热从小便而去,使邪有出路,大黄为佐使,苦寒攻下,可加快胃肠蠕动,减少乙醇在胃肠道吸收。诸药合用,共奏清热解毒利湿、健脾和胃化浊之功;另外茵陈经现代药理研究表明,能明显减轻肝细胞肿胀、气球样变、脂肪变性、坏死,具有保肝作用^[12]。

本研究结果表明,与正常对照组相比,模型组血清 ALT、AST、ADH、 γ -GT 及 TG 活性明显升高,肝组织中 MDA 含量明显升高, GSH 活性明显降低,均具有显著性差异($P < 0.01$),说明乙醇不但可引发肝内脂质过氧化增加,同时也影响体内抗氧化保护系统,最终导致肝细胞损伤。大鼠的肝脏组织发生明显的病理性改变,进而指征乙醇性肝损伤的发生。茵陈蒿汤各干预组均可不同程度的降低血清中 ALT、AST、ADH、 γ -GT 及 TG 活性和肝组织中 MDA 含量,且提高肝组织中 GSH 活性,说明其能调节肝脏的脂质代谢,纠正脂质代谢紊乱,从而减轻肝细胞脂肪性变,同时拮抗氧化反应,抑制氧自由基的产生,提高组织抗氧化能力,增强代谢酶活性,从而达到防治乙醇性肝损伤的作用。与正常对照组相比,茵陈蒿汤中、高剂量干预组作用较为明显。

总之,通过选取系列生物标记物对乙醇诱导的大鼠急性肝损伤动物模型进行评价,结果证实该模型在本实验模式下被成功复制,在此基础上,初步阐明了茵陈蒿汤对乙醇诱导的大鼠急性肝损伤具有良好的保护活性。

参考文献

- 1 Lambert JC, Zhou Z, Wang L, et al. Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 305: 880 ~ 886.
- 2 Zhou Z, Sun X, Lambert JC, et al. Metallothionein-independent zinc protection from alcoholic liver injury. *Am J Pathol* 2002, 160: 2267 ~ 2274.
- 3 李陪生,刘渡舟编,汉·张仲景(著).伤寒论.北京:人民卫生出版社 1987, 328 ~ 330.
- 4 Inao M, Mochida S, Matsui A et al. Japanese herbal medicine Inchin-ko-to as a therapeutic drug for liver fibrosis. *J Hepatol* 2004, 41(4): 584 ~ 591.
- 5 赵静波,王秦岭,张晶,等.大鼠急性乙醇性肝损伤模型分析.中日友好医院学报, 1996, 10(1): 17 ~ 20.
- 6 Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated, experimental liver damage in rats. *Life Science*, 2006, 78: 713 ~ 718.
- 7 Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life Science*, 2006, 78: 713 ~ 718.
- 8 IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1986, 24, 481 ~ 495.
- 9 Moldeus, P., Hogberg, J., et al. Isolation and use of liver cells. *Methods in Enzymology* 1978; 52, 60 ~ 71.
- 10 Hochstein, P., Utley, et al. Hydrogen peroxide detoxication by glutathione peroxidase and catalase in rat liver homogenates. *Molecular Pharmacology* 1968, 574 ~ 579.
- 11 Ohkawa, H., Ohishi, et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979, 142, 290 ~ 296.
- 12 杨牧祥,甄彦君,田元祥,等.解酒护肝饮对大鼠酒精性肝损伤病理组织学影响观察.河北中医.2000.22(12):950~952.

Hepatoprotection of Yin Chen Hao Tang on Acute Rat Liver Injury Induced by Ethanol

Liu Lian, Sun Hui, Wang Xijun, Wang Ping, Wu Zeming, Lv Haitao, Sun Wenjun

(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

This paper evaluates hepatoprotective effects of Yin Chen Hao Tang on acute rat liver injury induced by ethanol. In the investigation, seventy-five rats were randomly divided into five groups, including control group (CG), ethanol treated group (EG), low dose group of Yin Chen Hao Tang (LG), middle dose group of Yin Chen Hao Tang (MG) and high dose group of Yin Chen Hao Tang (HG). The LG, MG and HG were treated with frozen dry powders of Yin Chen Hao Tang at a dosage of 2g/kg/d, 6g/kg/d and 12g/kg/d in line with body weight for fourteen days in a row. The LG, MG and HG were orally administrated with 50% ethanol (v/v) at a dosage of 5g/kg, 2.5 hours after YCHT administration, starting from day ten for five consecutive days. The EG were orally administrated with 50% ethanol (v/v) at a dos-

age of 5g/kg for fourteen consecutive days. The CG received distilled water in an equal amount. On the fourteenth day, all blood samples and liver tissues were collected from the rats under anesthesia for experimental analysis and histological slicing, 12 hours after final ethanol administration. It is found that the levels of ALT and AST were significantly ($P < 0.01$) elevated after ethanol administration, when compared with the CG. The treatment of Yin Chen Hao Tang at a dosage of 2g/kg, 6 g/kg and 12 kg showed a significantly decreased level ($P < 0.01$) of ALT and AST, compared with the EG. However, the serum level of ADH, γ -GT and TG was also significantly ($P < 0.01$) elevated after ethanol administration, compared with the CG. The treatment of Yin Chen Hao Tang at a dosage of 2g/kg, 6 g/kg and 12 kg showed a significantly decreased level ($P \leq 0.05$) of γ -GT, TG and ADH against the EG. Rats administered with ethanol alone were found significantly ($P < 0.01$) lowered in their hepatic GSH levels. The treatment of Yin Chen Hao Tang at a dosage of 12 g/kg exhibited a significantly increased ($P < 0.01$) hepatic GSH level, though the Yin Chen Hao Tang at a dosage of 2g/kg and 6 g/kg simply did not prevent the dropping of hepatic GSH levels, compared with the EG. A significant increase ($P < 0.01$) of liver tissue MDA level was observed in the EG. However, ethanol induced elevation of MDA levels came down significantly ($P < 0.01$) after the treatment of rats with Yin Chen Hao Tang at a dosage of 12g/kg. Application of Yin Chen Hao Tang at a dosage of 2g/kg and 6 g/kg did not show a lowered MDA against the EG. The same result was also seen in histological observations. The preliminary investigation has shown an effective hepatoprotectivity of Yin Chen Hao Tang on acute rat liver injury induced by ethanol.

Keywords: Yin Chen Hao Tang; rat; ethanol; acute liver injury; hepatoprotectivity

(责任编辑:张述庆,责任译审:邹春申)

中国将建设一批生物技术一流基地

科技日报 2007 年 7 月 4 日消息:科技部、天津市政府等日前在天津举行“2007 国际生物经济大会”,中国生物技术的发展中心在会上透露,我国将陆续建立健全一批高质量的基地,为发展生物技术提供平台。

一是重点建设好 10 至 15 个国家(重点)实验室。重点建立健全基因组、蛋白质组、代谢组、系统生物学、干细胞、生物反应器、神经科学、脑和认知科学、生物信息、模式动物等方面的一批国家重点实验室。

二是重点建设好 30 至 35 个生物技术领域的国家工程技术中心。重点建设疫苗及生物药、生物治疗、组织工程、生物医学工程等一批国家工程技术中心,大幅度提升我国生物技术产业化水平与国际竞争力。

三是重点建立健全 10 至 15 个国家生物遗传资

源的保藏中心(库)、研究开发中心。重点建设农作物、林木和质资源中心与分中心、重要微生物资源中心与分中心、濒危动植物资源抢救与保护中心等。

四是建立健全 10 至 15 个国际一流的国际化、标准化、规模化生物技术创新平台和基地。重点建设好北京生命科学研究、国家生物信息中心、生物药中试基地等研发平台,为我国生物技术研究开发与产业化奠定良好的基础条件。

五是建设并完善 80 至 100 个国内领先、国际一流的示范企业与 10 至 15 个生物技术示范园区,强化企业在国家生物技术创新与转化体系中主体地位。重点在生物农业、生物医药、生物能源、发酵工业、生物化工等领域,引入竞争、流动机制,遴选一批示范企业与园区。

信息来源:中国科技信息网