

软肝颗粒主要药效学研究

李小芹, 沈鸿, 霍海如, 吴子伦, 周爱香, 贺蓉, 郭淑英, 回连强, 邹德嵩
(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

中图分类号: R285.5 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2001)02-0042-03

软肝颗粒是根据中医药理论及多年临床经验总结而成的复方制剂, 由黄芪、寄生、女贞子等8味药组成, 具有益气活血、软坚散结等功能。为更好地提供临床用药依据, 现将主要药效学试验结果报告如下。

1 材料

1.1 受试药物 软肝颗粒由北京华荣制药有限公司提供, 为棕黄色(液体)膏状, 1g液体(膏状)约为2.3g生药, 批号991015。

1.2 动物 Wistar大鼠, 体重190~210g, ♂昆明种小鼠, 体重18~20g, ♀♂各半, 均由中国医学科学院动物研究所提供, (医动字01-3008; 医动字第01-3001号); BALB/c纯系小鼠, ♂11-14g, 购自北京中国医科院肿瘤医院动物房(京动许字1999 D015)。

1.3 剂量设计 软肝颗粒临床人日用量为80g生药, 人按60kg计算为1.3g生药/kg体重, 试验用剂量按动物与人公斤体重折算, 中剂量约相当于人临床等效剂量, 大鼠ig剂量为14.7g生药/kg。小鼠ig剂量为28.14.7g生药/kg体重。阳性对照药: 朝阳丸, 北京双桥制药公司, 批号: 991107, 动物给药剂量按动物与人公斤体重折算, 大鼠临床等效剂量为

0.18g/kg, 小鼠为0.36g/kg。

1.4 试剂 丙氨酸氨基转换酶(990726)、天门冬氨酸氨基转换酶(990726), 总蛋白(2000229)、白蛋白(2000229)测定试剂盒, 均由北京北化精细化学品有限公司临床诊断试剂分厂出品。弗氏完全佐剂。美国产品, (030)431-8585。

1.5 仪器 UV-754连续式分光光度计, 上海第三分析仪器厂产品。

2 方法和结果

2.1 对四氯化碳致大鼠肝硬化的影响^[1] 取Wistar大鼠, 按体重随机分为5组, 即正常对照组、肝损伤模型组、朝阳丸组、软肝颗粒高剂量组和中剂量组。各组动物每日ig给药一次(1ml/100g体重, 正常对照组ig同体积的蒸馏水), 连续给药7周。同时, 各组动物ip30%CCl₄植物油溶液0.2ml/100g体重, 每周2次, 共7周, 正常对照组ip生理盐水。实验结束前, 动物禁食12h, 将动物摘眼球采血, 以3000转/分离心10min, 分离血清, 测定ALT、AST、TP和ALB; 之后, 将动物处死, 取肝组织作羟脯氨酸测定胶原蛋白含量^[2], 结果见表1、2。另取肝组织作组织化学及组织病理学检查, 结果见表3、4。

表1 软肝颗粒对四氯化碳致大鼠肝硬化的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	肝功能			
			ALT	AST	TP	ALB
			(nmol/s)/L	(nmol/s)/L	(g/L)	(g/L)
对照		10	221.92 ± 85.44	702.00 ± 60.24	68.70 ± 5.40	40.60 ± 1.90
模型		8	782.24 ± 312.80 ^{##}	1163.92 ± 147.04 ^{##}	60.10 ± 4.3 ^{##}	36.00 ± 1.90 ^{##}
朝阳丸	0.18	8	435.12 ± 240.48 [*]	936.00 ± 240.24 [*]	68.40 ± 7.80 [*]	39.80 ± 2.60 ^{**}
软肝颗粒	14.0	9	377.36 ± 240.88 ^{**}	936.08 ± 253.84 [*]	67.50 ± 8.40 [*]	38.90 ± 3.40 [*]
软肝颗粒	7.0	10	432.70 ± 228.62 [*]	1036.24 ± 294.80	67.80 ± 5.40 ^{**}	39.60 ± 2.00 ^{**}

注: 与对照组相比, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组相比, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ (下同)。

表 2 软肝颗粒对慢性肝损伤大鼠

肝胶原蛋白增生的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	胶原蛋白含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 干粉)
正常对照组		10	29.26 $\pm$ 6.02
模型组		8	40.54 $\pm$ 4.63 ^{##}
朝阳丸	0.18	8	33.10 $\pm$ 6.03 [*]
软肝颗粒	14.0	9	31.36 $\pm$ 6.09 [*]
软肝颗粒	7.0	10	33.11 $\pm$ 5.42 [*]

表 1、2 结果表明,软肝颗粒可抑制多次注射 CCL₄ 引起的大鼠血清转氨酶的升高、总蛋白和白蛋白降低,减少肝胶原蛋白含量。

表 3 软肝颗粒对大鼠肝损伤程度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数	肝损伤程度	抑制率 (%)
对照组		10	0	
模型组		8	2.75 $\pm$ 0.71	
朝阳丸	0.18	8	1.88 $\pm$ 0.64 [*]	31.82
软肝颗粒	14.0	9	1.78 $\pm$ 0.71 [*]	36.36
软肝颗粒	7.0	10	1.89 $\pm$ 0.78 [*]	31.31

注:HE 染色 10 $\times$ 20 倍光镜连续观察三个视野

记分标准:

0 分:肝组织正常结构,无病变;

1 分:肝细胞局限性肿胀,纤维化,大部分肝小叶再生;

2 分:肝细胞肿胀,纤维化较轻,肝细胞再生较多;

3 分:部分肝细胞肿胀,纤维化,有炎症细胞浸润,肝细胞再生少;

4 分:肝细胞呈弥漫性肿胀,纤维化,脂变,间质有炎症细胞浸润。

表 4 软肝颗粒对大鼠肝糖原的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数	肝糖原含量 (分数)
对照组	—	10	4.00 $\pm$ 0
模型组	—	8	0.75 $\pm$ 0.89
朝阳丸	0.18	8	1.38 $\pm$ 0.52
软肝颗粒	14.0	9	1.50 $\pm$ 0.53
软肝颗粒	7.0	10	1.11 $\pm$ 0.61

注:肝糖原记分法

0 分:未见糖原颗粒;

1 分:可见糖原颗粒;

2 分:肝细胞内糖原颗粒散在;

3 分:部分肝细胞内有糖原颗粒;

4 分:大部分肝细胞内有明显糖原颗粒;各组记分经统计学处理。

病理检查结果表明,给药不同剂量组:肝细胞肿胀、纤维化、脂肪变等肝脏病变与模型对照组相比有所减轻,其中软肝颗粒中剂量组肝脏病变比其它给药剂量组有明显减轻,周边完好的肝小叶糖原颗粒有增加趋势。

2.2 对小鼠迟发型超敏反应的影响(DTH) (足跖增厚法)^[3] 取昆明种小鼠,体重 18~20g, δ 随机分为 5 组,即正常对照组、朝阳丸组、软肝颗粒高、中、低三个剂量组,每组 10 只。每日上午 ig 给药一次(正常对照组 ig 同体积的蒸馏水),连续给药 5d 后,小鼠 iv 2% (V/V) 绵羊红细胞(SRBC) 0.2ml,致敏 4d 后,用游标卡尺测量左后足跖厚度,然后在测量部位皮下注射 20% SRBC (20 μl /鼠),注射后 24h 再次测量左后足跖厚度。以攻击前后足跖厚度差值(足跖肿胀度)来表示 DTH 的程度。

表 5 软肝颗粒对正常小鼠迟发型变态反应的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	足跖肿胀度(mm)
正常对照组		0.24 $\pm$ 0.03
朝阳丸	0.36	0.30 $\pm$ 0.06 [*]
软肝颗粒	28.0	0.31 $\pm$ 0.08 [*]
软肝颗粒	14.0	0.28 $\pm$ 0.08
软肝颗粒	7.0	0.25 $\pm$ 0.05

表 5 结果表明,软肝颗粒高剂量及阳性药朝阳丸对小鼠迟发型超敏反应有一定的增强作用。

2.3 对小鼠脾脏抗体生成检测(分光光度法)^[4]

取昆明种小鼠,体重 18~20g,随机分为 6 组,即正常对照组、模型组、朝阳丸组、软肝颗粒高、中、低三个剂量组,每组 10 只。每日上午 ig 给药一次(正常对照组 ig 同体积的蒸馏水),每只鼠 iv 2% (V/V) SRBC 0.2ml 致敏,5d 后放血处死小鼠,取出脾脏,用磷酸缓冲液制成脾细胞悬液(5×10^6 脾细胞/ml)。依次加入脾细胞悬液 0.2% SRBC 和豚鼠血清(补体),混匀,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中温育 1h,离心,吸取上清液,用分光光度计(413nm 波长)测定吸收度。

表 6 软肝颗粒对正常小鼠脾脏抗体生成细胞数的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	光密度(OD 值)
正常对照组		2.56 $\pm$ 0.08
模型组		1.99 $\pm$ 0.23 ^{##}
朝阳丸	0.36	2.34 $\pm$ 0.31 [*]
软肝颗粒	28.0	2.35 $\pm$ 0.23 ^{**}
软肝颗粒	14.0	2.29 $\pm$ 0.23 ^{**}
软肝颗粒	7.0	2.11 $\pm$ 0.27

结果表明,软肝颗粒高、中剂量及朝阳丸能明显提高小鼠脾脏抗体细胞生成量,与模型组相比有显

著性差异。

2.4 对小鼠免疫性肝损伤的保护作用^[1] 取昆明种小鼠断头处死,用生理盐水从门静脉冲洗肝脏以驱除肝内存血。取肝脏剪成小块,再以生理盐水浸洗至无色。取湿重 10g 肝组织加 100ml 生理盐水在匀浆器内制成 10% 肝匀浆,再用高速冷冻离心机(10000xg)低温离心 30min(0~ 4℃)。取上清液加等量弗氏完全佐剂制成乳化液。给刚断乳纯种小鼠背部注射进行免疫,每鼠每次皮下注射乳化液 0.1ml,每周 2 次,共 3 周,然后改为每周 1 次,共 4 周,前后

共 10 次。免疫 2 周后开始给药,将动物随机分为 6 组,每组 20 只,分别于免疫后 2.5、8 周进行肝脏病理检查,给药 6 周后,动物眼眶取血,测肝功能指标并称重,观察软肝颗粒对肝损伤小鼠谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)及体重的影响。

结果表明,软肝颗粒高、中、低剂量组与空白剂量组、造型组比较均有显著性差异($P < 0.05$),软肝颗粒对小鼠免疫性肝损伤有保护作用(见表 7)。

表 7 软肝颗粒对小鼠免疫性肝损伤的影响($\bar{x} \pm s; n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	AST (nmol/s)/L	ALT (nmol/s)/L	TP (g/L)	ALB (g/L)
空白对照		898.40 ± 128.72	316.00 ± 18.66	61.67 ± 3.27	39.36 ± 0.82
造型组		1555.20 ± 76.95 [#]	390.24 ± 35.60 [#]	53.84 ± 2.77 [#]	36.12 ± 3.52 [#]
朝阳丸	0.36	955.20 ± 146.92 ^{**}	344.40 ± 13.13 ^{**}	63.59 ± 5.36 ^{**}	39.33 ± 1.89 [*]
软肝颗粒	28.0	919.20 ± 127.19 ^{**}	338.64 ± 28.49 ^{**}	64.08 ± 3.08 ^{**}	39.18 ± 0.74
软肝颗粒	14.0	990.40 ± 118.77 ^{**}	348.40 ± 12.14 [*]	61.77 ± 3.65 ^{**}	39.13 ± 3.33 [*]
软肝颗粒	7.0	1103.20 ± 172.59 ^{**}	362.00 ± 22.88 ^{**}	64.48 ± 3.79 ^{**}	39.02 ± 1.47 [*]

3 小结

软肝颗粒所试剂量可抑制 CCL₄ 所致大鼠血清 ALT、AST 升高,提高血清蛋白量,肝组织检查显示,能改善病理变化并抑制肝糖原含量降低,对免疫系统的影响,能明显提高小鼠脾脏抗体生成量,并对羊红细胞所致小鼠迟发型超敏反应有一定的增强作用;软肝颗粒对小鼠免疫性肝损伤有保护作用。

参考文献:

[1] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海,上海科学技

术出版社,1991,463—465.

[2] 赵敏崎,韩德五. 甘草甜素 甘草次酸与柴胡皂甙对防治大白鼠实验性肝硬化的作用[J],药学报,1983,18(5):325.
[3] 陈奇. 中药药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993. 708.
[4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第二版,北京:人民卫生出版社,1991. 1230.