

茵黄合剂提取物对肝内胆胆汁淤积模型大鼠胆汁分泌和肝脏功能的改善作用^A

席明名^{1*}, 王俐¹, 汤倩¹, 张启春², 顾维^{1#}(1.南京医科大学附属妇产医院, 南京 210004; 2.南京中医药大学药学院, 南京 210029)

中图分类号 R962 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)28-3936-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.28.14

摘要 目的: 考察茵黄合剂提取物(YHA)对肝内胆胆汁淤积模型大鼠胆汁分泌和肝脏功能的改善作用。方法: 将SD大鼠随机分为空白组、模型组、阳性组(熊去氧胆酸, 45 mg/kg)和YHA高、中、低剂量组[37.8、18.9、9.45 g(生药)/kg], 每组10只。各给药组大鼠ig相应药物, 空白组和模型组大鼠ig等容积生理盐水, 每天1次, 连续5 d。给药3 d后, 除空白组外, 其余各组大鼠均单次ig给予 α -异硫氰酸萘酯诱导肝内胆胆汁淤积模型。末次给药1 h后, 检测大鼠2 h胆汁流量和血清中总胆红素(TBIL)、总胆汁酸(TBA)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)及碱性磷酸酶(ALP)水平; 观察大鼠肝脏病理变化。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠2 h胆汁流量明显减少, 血清中TBIL、TBA、ALT、AST及ALP水平显著升高($P < 0.01$); 肝组织病理损伤明显。与模型组比较, 除阳性组和YHA中、低剂量组大鼠血清中ALP水平以及YHA低剂量组大鼠血清中TBIL水平降低不显著外, 其余各组大鼠各指标均明显改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 除YHA低剂量组外, 其余各给药组大鼠病理损伤得到明显改善。结论: YHA对 α -异硫氰酸萘酯致肝内胆胆汁淤积模型大鼠的胆汁分泌和肝脏功能具有一定的改善作用。

关键词 茵黄合剂提取物; 肝内胆胆汁淤积; 肝脏功能; 胆汁分泌; α -异硫氰酸萘酯; 大鼠

Improvement Effects of Yinhuang Mixture Extract on Biliation and Liver Function of Intrahepatic Cholestasis Model Rats

XI Mingming¹, WANG Li¹, TANG Qian¹, ZHANG Qichun², GU Wei¹(1.Obstetrics and Gynecology Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210004, China; 2.School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the improvement effects of Yinhuang mixture extract (YHA) on biliation and liver function of intrahepatic cholestasis model rats. **METHODS:** SD rats were randomly divided into blank group, model group, positive group (ursodesoxycholic acid, 45 mg/kg) and YHA high-dose, medium-dose and low-dose groups [37.8, 18.9, 9.45 g(crude drug)/kg], with 10 rats in each group. Treatment groups were given relevant medicine intragastrically, and blank group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 5 d. 3 d after administration, except for blank group, those groups were given α -naphthyl isothiocyanates intragastrically to induce intrahepatic cholestasis model. 1 h after last administration, 2 h volume of bile, serum levels of TBIL, TBA, ALT, AST and ALP were detected; pathological changes of liver were observed. **RESULTS:** Compared with blank group, the 2 h volume of bile decreased significantly in model group, and serum levels of TBIL, TBA, ALT, AST and ALP increased significantly ($P < 0.01$). The pathological injury was found in liver tissue. Compared with model group, except for serum level of ALP in positive group, YHA low-dose and medium-dose groups and serum level of TBIL in YHA low-dose group, another indexes of other treatment groups were improved significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Except for YHA low-dose group, pathological injure of other treatment groups were improved significantly. **CONCLUSIONS:** YHA can improve the biliation and liver function of rats with intrahepatic cholestasis induced by α -naphthyl isothiocyanates.

KEYWORDS Yinhuang mixture extract; Intrahepatic cholestasis; Liver function; Biliation; α -naphthyl isothiocyanates; Rats

茵黄合剂是南京医科大学附属妇产医院的一种院内制剂, 主要由杜仲、丹参、郁金、茵陈、山栀、黄芩、大黄、田基黄、云茯苓、白鲜皮等10味药材组成, 具有补肾安胎、通瘀利胆、健

^A 基金项目: 南京市2013年度科技发展指导性计划(药项目)(No.2013YX012); 南京市医学科技发展项目(No.YKK13143)

* 副主任中药师。研究方向: 临床药理学和制剂。电话: 025-52226104。E-mail: xmm1976@163.com

通信作者: 副主任药师, 硕士。研究方向: 临床药理学。电话: 025-52226104。E-mail: helloguwei@126.com

脾祛湿的作用^[1]。该药主要用于妊娠期肝内胆胆汁淤积的治疗, 已在临床应用了20多年, 其临床应用综合评分有效率高达90%, 能显著降低围产儿死亡率, 减少产后出血等并发症, 改善妊娠结局。据文献报道, 茵黄合剂对正常和雌激素诱导胆汁淤积症模型大鼠胆汁分泌均有明显的促进作用, 同时还具有改善胆汁淤积症模型大鼠肝脏功能以及调节大鼠胆汁酸转运体的作用^[2-3]。为进一步验证茵黄合剂对胆汁淤积症的改善作用, 笔者利用大孔树脂对茵黄合剂进行了提取纯化, 获得茵黄合剂提取物(简称YHA); 并采用 α -异硫氰酸萘酯复制急性

肝内胆淤积大鼠模型进行YHA的药效评价,为更好地应用和开发此药提供参考。

1 材料

1.1 仪器

7100全自动生化分析仪(日本日立高新技术公司);R2002B旋转蒸发器(安中诺尔仪器有限公司);BX51荧光显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

1.2 药品与试剂

YHA(南京市妇幼保健院药剂科自制,批号:20140912,规格:每1 ml含生药1.8 g); α -异硫氰酸萘酯(美国Sigma-Aldrich公司,批号:13054EC);总胆红素(TBIL)、总胆汁酸(TBA)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(日本和光纯药株式会社);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级SD大鼠60只,♀,体质量180~200 g,由浙江省实验动物中心提供[生产许可证号:SCXK(浙)2014-0001]。大鼠饲养于南京中医药大学实验动物中心[使用许可证号:SYXK(苏)2012-0042],饲养环境室温为20~25℃、相对湿度为40%~70%,饲养期间自由饮水、摄食。将大鼠适应性饲养1周后用于实验。

2 方法

2.1 分组、给药与造模

将60只大鼠随机分为空白组、模型组、阳性组(熊去氧胆酸,0.045 g/kg,成人临床用量的等效剂量)和YHA高、中、低剂量组[37.8、18.9、9.45 g(生药)/kg,分别为成人临床用量的2、1、0.5倍剂量],每组10只。各给药组大鼠ig相应药物,空白组和模型组大鼠ig等体积生理盐水,每天1次,连续5 d。于第3天给药后,除空白组外,其余各组大鼠均单次ig给予4% α -异硫氰酸萘酯溶液(2.5 ml/kg)复制急性肝内胆淤积模型(给药前大鼠禁食12 h)^[4]。

表1 各组大鼠2 h胆汁流量和血清生化指标检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 2 h volume of bile and serum liver function index of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	2 h胆汁流量,g	血清生化指标				
		ALT, U/L	AST, U/L	ALP, U/L	TBIL, μ mol/L	TBA, μ mol/L
空白组	0.605 \pm 0.050	76.12 \pm 13.30	242.26 \pm 54.66	185.50 \pm 18.11	1.03 \pm 0.64	8.73 \pm 2.91
模型组	0.360 \pm 0.080*	418.11 \pm 48.17*	618.94 \pm 127.71*	259.00 \pm 20.47*	85.11 \pm 11.69*	221.89 \pm 44.02*
阳性组	0.574 \pm 0.078**	248.65 \pm 69.44**	418.66 \pm 110.80**	238.20 \pm 32.51	71.69 \pm 9.04**	171.37 \pm 27.29**
YHA高剂量组	0.551 \pm 0.122**	230.19 \pm 86.97**	372.12 \pm 101.72**	211.10 \pm 24.83**	57.49 \pm 9.12**	175.27 \pm 37.21**
YHA中剂量组	0.478 \pm 0.100**	317.27 \pm 73.12**	463.89 \pm 113.43**	243.80 \pm 31.05	64.07 \pm 14.00**	183.51 \pm 23.48**
YHA低剂量组	0.446 \pm 0.102**	339.48 \pm 63.79**	502.50 \pm 105.88**	249.80 \pm 26.91	80.72 \pm 15.33	192.21 \pm 29.81**

注:与空白组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.05$,*** $P<0.01$

Note: vs. blank group, * $P<0.01$; vs. model group, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$

3.2 各组大鼠肝组织病理观察结果

空白组大鼠肝组织正常,无病变。模型组大鼠肝脏可见细胞轻度脂肪变性、中度炎细胞浸润及纤维结缔组织轻度增生等症状。给药后,阳性组和YHA高剂量组大鼠肝脏变化最为明显,肝脏组织仅存在轻度脂肪变性和轻度炎性细胞浸润。YHA中、低剂量组变化较小,YHA中剂量组大鼠肝脏可见细胞轻度脂肪变性、中度炎细胞浸润及纤维结缔组织轻度增生等症状;YHA低剂量组大鼠肝组织病变较模型组无明显变化。各组大鼠肝组织病理观察结果见图1。

2.2 检测指标

2.2.1 2 h胆汁流量检测 末次给药后1 h,10%水合氯醛(3 ml/kg)麻醉大鼠,仰位固定,沿腹中线切开,于十二指肠处定位胆管并剥离周围组织,备线,胆管切口,插入聚乙烯管,止血钳夹闭伤口,覆盖生理盐水湿润的纱布,收集2 h胆汁。用预先称质量并编号的EP管,按规定时间间隔收集2 h内胆汁,胆汁流量用差重法求得:胆汁流量(g)=含胆汁EP管质量(g)-空白EP管质量(g)。

2.2.2 生化指标检测 在胆管插管前,于大鼠眼眶取血,置于EP管中轻摇,4℃过夜,以1 000 \times g离心20 min,收集上层血清。以全自动生化分析仪检测血清中TBIL、TBA、ALT、AST和ALP水平。

2.2.3 病理观察 在胆汁收集完成后,处死大鼠,切取肝脏左外侧叶,0.1%甲醛固定,常规方法制备组织切片,苏木精-伊红(HE)染色。观察组织脂肪细胞变性、炎性细胞浸润和纤维结缔组织增生情况。

2.3 统计学方法

采用SPSS 15.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠2 h胆汁流量及血清生化指标检测结果

与空白组比较,模型组大鼠2 h胆汁流量显著减少,血清中ALT、AST、ALP、TBIL、TBA水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠2 h胆汁流量均不同程度增加、血清中上述生化指标均有不同程度降低;除阳性组和YHA中、低剂量组大鼠血清中ALP水平以及YHA低剂量组大鼠血清中TBIL水平降低不显著外($P>0.05$),其余各组大鼠上述指标差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠2 h胆汁流量和血清生化指标检测结果见表1。

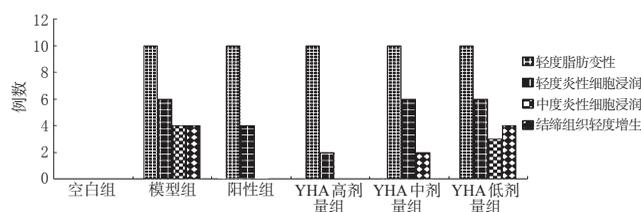


图1 各组大鼠肝组织病理观察结果(HE, $\times 200$)

Fig 1 Liver tissue pathology of rats in each group (HE, $\times 200$)

4 讨论

胆汁淤积是妊娠期常见疾病,主要由肝细胞及毛细胆管胆汁分泌功能障碍或肝内胆小管弥散性梗阻引起,以妊娠期出现皮肤瘙痒及黄疸为特点,可导致胎儿宫内窘迫、早产、新生儿缺氧窒息、死胎及死产^[5-6]。现代医学研究发现,胆汁淤积的发生与多种因素有关(比如感染、药物、免疫、遗传、妊娠等),但其具体发病机制仍不清楚。传统医学认为,胆汁淤积的发生与肝郁脾虚、气滞瘀阻、肝胆湿热蕴积有关,见于中医“黄疸”“妊娠身痒”“胎死腹中”等病证。茵黄合剂是基于中医“肾主生殖”“肝主疏泄”的理论而拟的具有补肾安胎、化痰利胆功效的临床验方。方中以杜仲补肾安胎,丹参、郁金养血和血、行气通瘀,共为君药;茵陈以清利湿热、利胆退黄,白藓皮去风止痒,共为佐药;诸药相合,共奏补肾安胎、通瘀利胆、健脾化湿之效^[7]。

α -异硫氰酸萘酯是公认的急性胆汁淤积模型诱导剂,其引发的胆汁淤积模型在病理上主要表现为肝实质细胞和胆管上皮细胞损伤、胆汁淤积、在汇管区可见炎细胞浸润,与胆汁淤积症临床观察结果的相似性较高^[8]。熊去氧胆酸为一种亲水性胆汁酸,很早以前我国中医就将其应用于多种肝病的治疗。其除了具有改变胆汁酸组成、保护肝细胞膜、调节免疫、抗氧化、增加胆汁中碳酸氢盐等作用外,还具有促进受损肝细胞胆汁分泌、抑制肝细胞凋亡和细胞保护等作用^[9],故在本文中笔者以其为阳性对照药物。

本研究结果显示,模型组大鼠血清中ALT、AST、ALP水平升高,以及因肝细胞胆汁生成功能障碍(2 h胆汁流量明显减少)而导致的血清中TBIL和TBA的利用减少。过高的胆汁酸可诱导心肌细胞、肝脏细胞、肾脏细胞发生凋亡和坏死,并可抑制线粒体 Na^+/K^+ -ATP酶而导致呼吸链功能异常。高浓度的胆红素可加重胆汁酸的细胞毒性^[10-11]。YHA高、中剂量可显著改善 α -异硫氰酸萘酯诱导的肝脏损伤,恢复肝脏功能、促进胆汁的合成和分泌,表现为2 h胆汁流量增加和血清中TBIL、TBA水平降低,以及病理组织学的明显改善,并且高剂量YHA作用与阳性药物熊去氧胆酸作用接近。本实验结果证实了

YHA对 α -异硫氰酸萘酯致大鼠肝内胆淤积及肝功能具有一定改善作用,但其作用的具体机制尚不明确,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张悦.茵黄合剂与熊去氧胆酸治疗妊娠期肝内胆淤积症的疗效比较研究[J].黑龙江医药,2012,25(6):840.
- [2] 赵翠英,陈静琴,陈华,等.茵黄合剂治疗妊娠肝内胆淤积症的临床研究:附100例疗效观察[J].江苏中医,2000,21(3):8.
- [3] 侯莉莉,夏卫军.茵黄合剂对雌激素诱导肝内胆淤积大鼠血生化的影响[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(12):165.
- [4] 姚嘉明,于芳芳,王小奇,等.清热化湿疏肝祛瘀法对急性肝内胆淤积大鼠的防治作用[J].中华中医药学刊,2012,30(10):2251.
- [5] 杨弟芳.妊娠期肝内胆淤积症的发病机制[J].现代医药卫生,2005,21(13):1667.
- [6] 王宇宏,狄英波,刘颖.妊娠期肝内胆淤积症的病因研究进展[J].中国妇幼保健,2007,22(29):4197.
- [7] 刘学华,陆茵,陈震.茵黄合剂治疗妊娠肝内胆淤积症的实验研究[J].江苏中医,2000,21(7):39.
- [8] Korolenko TA, Savchenko NG, Yuz'ko JV, et al. Activity of lysosomal enzymes in the bile and serum of mice with intrahepatic cholestasis[J]. Bull Exp Biol Med, 2008, 145(5):560.
- [9] 陈建清,胡良凯,张建民.熊去氧胆酸在胆汁淤积性肝病中的应用[J].国际消化病杂志,2008,28(6):474.
- [10] 胡玉芹,潘石蕾.妊娠期肝内胆淤积症研究进展[J].中国妇产科临床杂志,2009,10(4):315.
- [11] 张百明,赵致臻.玉米须提取物对胆汁淤积性肝病的改善作用研究[J].中国药房,2010,21(23):2130.

(收稿日期:2016-03-10 修回日期:2016-06-20)

(编辑:林静)

国家卫生和计划生育委员会组织2016年全国大型义诊活动周

本刊讯 近日,国家卫生和计划生育委员会(以下简称国家卫生计生委)办公厅、国家中医药管理局办公室和中央军委后勤保障部卫生局联合印发了《关于举办2016年“服务百姓健康行动”全国大型义诊活动周的通知》,定于2016年9月3-10日开展全国大型义诊活动,并于9月3日在红军长征出发地江西省瑞金市举行启动仪式。

结合纪念红军长征胜利80周年,今年的义诊活动主题定为“传承长征精神 义诊服务百姓”。要求在总结近几年大型义诊活动经验的基础上,因地制宜、紧密结合需求,有重点、有针对性地开展义诊活动。通过活动的开展,方便群众在家门口看病就医;推动卫生计生、中医药和军队卫生系统深入学习贯彻落实“两学一做”学习教育活动有关要求,进一步树立卫生计生、中医药和军队卫生系统良好形象;组织对红军老战士进行慰问、体检和义诊,并提供“家庭医生”签约服务,以实际行动纪念长征胜利80周年;对国家和省级重点贫困县进行义诊

全覆盖,促进健康扶贫。

9月3-10日1周内,全国各地都要组织开展义诊活动。主要在广场、社区、乡村、军营、学校、机关、企事业单位等,开展接诊患者、下乡巡诊、指导查房、疑难病例会诊、实施手术、技术和管理培训、健康教育等多种形式的义诊活动。预计参加义诊的医疗机构将达到2万余家,医务人员达70万人,义诊群众1500余万人次。

同时,国家卫生计生委、国家中医药管理局、中央军委后勤保障部卫生局将组织委(局)属委(局)管医院、军队有关医疗机构,组建9支国家医疗队,分别由三部门领导带队,到江西瑞金、贵州遵义、陕西延安等长征沿途地区开展义诊活动。

通过活动的开展,将进一步方便群众在家门口看病就医,切实提高群众对医疗服务的“获得感”;推动卫生计生、中医药和军队卫生系统深入学习贯彻落实“两学一做”学习教育有关要求;进一步树立卫生计生、中医药和军队卫生系统良好形象。