

肝脾康胶囊药理作用研究

黑龙江省中龙医药专科医院(哈尔滨 150080)

焦柏忠* 刘晓晶 吕美丽

黑龙江中医药大学

田振坤 常存库

摘要 肝脾康胶囊对鸭乙型肝炎病毒感染鸭血清 DHBV-DNA 有显著的抑制作用。能显著降低 CCl₄所致的小鼠血清谷丙转氨酶的升高,降低小鼠肝脏甘油三酯含量,提高肝糖元含量。对肝硬化模型大鼠,能降低肝硬化形成率,降低肝胶原蛋白、血清 γ 球蛋白、肝脏羟脯氨酸和肝总脂含量,减轻肝脏病理变化。能提高细胞免疫功能,增加尿素蛋白质和铜蓝蛋白质合成,增加胆汁流量。

关键词 肝脾康胶囊 慢性乙型肝炎 肝硬化

肝脾康胶囊是由黄芪、熊胆粉、三七、郁金、板蓝根等中药精制而成。具有疏肝健脾、清热活血的功效,临床用于治疗慢性乙型肝炎、肝硬化疗效显著,并对丙肝、脂肪肝、酒精肝等也具有有良好的治疗效果。我们对该药的药理作用进行了实验研究。

1 实验材料

1.1 药物:肝脾康胶囊由哈尔滨市市中龙肝病医药研究所提供,1.5 g 生药/g;无环鸟苷(ACV),湖北科益公司;护肝片:黑龙江省五常制药厂;联苯双酯片:上海第十二制药厂;0.9%氯化钠注射液:哈尔滨制药六厂。

1.2 病毒:鸭乙型肝炎病毒、鸭乙型肝炎病毒 DNA(DHBV-DNA)强阳性血清,采自上海麻鸭, -70℃ 保存。

1.3 实验动物:1 日龄北京鸭,购自中国医学科学院药用植物研究所养鸭场;昆明系小鼠, Wistar 系大鼠均由黑龙江中医学院实验动物中心提供;新西兰种家兔,由黑龙江省兽医研究所动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 肝脾康胶囊在鸭体内对鸭乙型肝炎病毒感染的治疗效果

2.1.1 鸭乙型肝炎病毒感染:1 日龄北京鸭,经腿胫 iv 上海麻鸭 DHBV-DNA 阳性鸭血清,每只 0.2 mL,在感染后 7 d 取血,分离

血清, -70℃ 保存待检。

2.1.2 药物治疗试验:DHBV 感染雏鸭 7 d 后随机分组进行药物治疗试验,每组 5~6 只,给药组第 1,2,3 批均分别口服 1,3,5 g/kg 肝脾康;病毒对照组(DHBV)以生理盐水代替药物;阳性对照组第 1,2 批均分别口服 100 mg/kg 无环鸟苷。每日 2 次,共 10 d,在感染后第 7 天即用药前(T_0),用药第 5 天(T_5),第 10 天(T_{10})和停药后第 3 天(P_3)自鸭腿胫静脉取血,分离血清, -70℃ 保存待检。

2.1.3 结果

①1 日龄北京鸭感染 DHBV 后,3 批实验感染鸭 78 只血清 DHBV-DNA 全部阳性。病毒对照组 17 只雏鸭感染后第 7 天 DHBV-DNA 全部阳性。感染第 7,12,17 和 22 天血清 DHBV-DNA 水平有所变动,但无显著差异,为自然波动。

②阳性药对照组第 1,2 批实验 DHBV 感染鸭 11 只,口服无环鸟苷 100 mg/kg,有明显抑制 DHBV 作用,但停药后略有反跳现象。

③肝脾康胶囊在 DHBV 感染鸭体内对鸭血清 DHBV-DNA 的影响:第 1 批 3 个剂量组中 5 g/kg 组 T_{10} 鸭血清 DHBV-DNA OD 度与 T_0 比较显著下降 ($P<0.05$),与病毒对照组对比有明显的抑制作用 ($P<0.01$),未见

• Address: Jiao Baizhong, Helongjiang Zhonglong Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Haerbin

毒性反应。第2批5 g/kg在T₅,T₁₀都有显著抑制($P<0.01$ 及 $P<0.05$)。第3批实验5 g/kg T₁₀血清DHBV-DNA抑制38.6%,停药后3 d抑制53.6%,与生理盐水对照组相比有显著和非常显著意义。

2.2 对小鼠CCl₄肝损伤的影响:取健康昆明种小鼠70只,体重22~24 g雄性。随机分为7组,每组10只。其中6组分别由sc 1% CCl₄植物油5 mL/kg,隔日1次,共注射3次。于第3次注射CCl₄当日开始给予药物。分别ig肝脾康0.5,1.0,2.0 g/kg,护肝片1.0 g/kg,联苯双酯片100 mg/kg,模型对照组给予等体积生理盐水,容积为0.5 mL/20 g,每日1次,连续7 d,剩余1组不做任何处理作为正常对照组。末次给药后3 h,剖颈取血测定血清谷丙转氨酶,同时取适量肝组织测定甘油三酯,过氧化脂质,谷胱甘肽和谷胱甘肽-S-转移酶等生化指标。并取适量肝组织常规福尔马林液固定,石蜡切片,H.E染色,进行组织学检查,结果见表1,2。

表1 对CCl₄肝损伤谷丙转氨酶的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	血清谷丙 转氨酶(U)
正常对照	—	10	987±245**
模型对照	—	10	2119±524
联苯双酯	0.1	10	1473±412**
护肝片	1.0	10	1623±436**
肝脾康胶囊	0.5	10	1611±257**
	1.0	10	1426±482**
	2.0	10	1150±562**△

与模型对照组比较:* $P<0.05$ ** $P<0.01$
与护肝片组比较:△ $P<0.05$

表2 对CCl₄肝损伤生化指标的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	肝糖元含量 (μg/2 mg 肝)	甘油三酯 (mg/g 湿肝)
正常对照	—	24.07±2.30**	30.31±4.63**
模型对照	—	6.10±1.62	50.20±4.04
联苯双酯	0.1	15.63±2.67**	30.21±46.17**
护肝片	1.0	10.17±2.21**	28.45±6.16**
肝脾康胶囊	0.5	16.73±2.21**△△	22.45±3.14**△△
	1.0	14.96±3.7**	28.21±5.82**
	2.0	11.43±2.45**	35.27±4.66**

与模型对照组比较:** $P<0.01$
与护肝片组比较:△ $P<0.05$ △△ $P<0.01$

病理形态检查模型对照组可见CCl₄所致典型的围绕中央静脉的小叶中心型坏死,外周可见肝细胞的混浊肿胀和气球样变及嗜酸性变等病理改变。肝脾康胶囊中、低剂量组肝细胞虽有混浊变性,但结构完整,细胞核清晰可见;高剂量组可见肝细胞索结构完整,与肝血窦比例正常,肝细胞着色基本正常,胞核清晰。

2.3 肝脾康胶囊对CCl₄致体外培养肝细胞损伤的保护作用:参照Seglen的方法,在乙醚麻醉下经大鼠门脉插管,用0.25%胰蛋白酶缓冲液循环灌流离体肝脏,分离收集肝细胞。肝细胞收获率为1×10⁸~4×10⁸个细胞/肝,台盼蓝染色计数细胞存活率为90%以上。用含10%小牛血清RPMI 1640干粉培养基液稀释成5×10³个细胞/mL,接种于24孔培养板中,每孔1 mL共40孔,细胞置CO₂培养箱中预培养1.5 h后,于肝脾康胶囊组每孔加入15%肝脾康胶囊药物稀释液15 mL,继续培养2 h后,肝脾康胶囊治疗组及模型组内加20% CCl₄酒精溶液15 mL,再培养4 h,各组同时终止培养。分别取上层培养液50 mL测谷丙转氨酶(改良金氏法),50 mL测尿素氮(尿乙酰二肟法),500 mL测铜蓝蛋白含量(微量法),100 μL测丙二醛(MDA)(TBA荧光法)。肝细胞经离心去上清液,加入4 mL冰生理盐水,1 800 r/min离心1 min,制成肝细胞匀浆,分别测MDA(TBA发光法),总蛋白含量(Folln-酚法)及尿素氮含量。于培养板各孔底预先置一小块盖玻片,终止培养后取出,制成扫描电镜标本。

生化测定结果见表3~5。可见CCl₄中毒肝细胞谷丙转氨酶释放明显增加,MDA生成显著增多,尿蛋白质及铜蓝蛋白的合成明显减少。加入肝脾康胶囊药液谷丙转氨酶释放减少,MDA生成减少,尿素蛋白质及铜蓝蛋白的合成明显增加。

电镜下形态:①正常肝细胞膜表面绒毛致密,呈规则指状突起,纹理清楚。②CCl₄中

毒细胞表面绒毛稀疏,排列紊乱,甚至绒毛完全脱失,呈光板状。③加入肝脾康胶囊后可明显减轻肝细胞膜表面的损伤。

表 3 对培养肝细胞谷丙转氨酶释放及 MDA 生成的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	谷丙转氨酶	悬液 MDA	细胞内 MDA
模型组	476.8±10.8**	0.308±0.059	18.4±6.5**
肝脾康胶囊组	421.4±11.2△△	0.206±0.078△△	8.4±3.9△△
正常对照组	421.2±10.9	0.245±0.031	11.8±2.6 *

与正常对照组比: * $P<0.05$ ** $P<0.01$
与模型组比: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ (下表同)

表 4 对 CCl₄损伤肝细胞蛋白质及铜蓝蛋白含量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	总蛋白 (mg/5×10 ⁸ 细胞)	铜蓝蛋白 (μg/5×10 ⁸ 细胞)
模型组	95.6±8.6**	175.5±13.2*
肝脾康胶囊组	120.1±11.4△△	212.9±19.5△△
正常对照组	114.7±11.3	213.4±20.2

表 5 对 CCl₄损伤肝细胞尿素代谢的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组 别	悬液尿素 (μg/5×10 ⁸ 细胞)	胞内尿素 (μg/5×10 ⁸ 细胞)	总尿素 (μg/5×10 ⁸ 细胞)
模型组	86.4±2.3*	17.9±4.9**	101.4±5.5**
肝脾康胶囊组	65.9±1.4△△	50.2±11.2△△	122.6±11.3△△
正常对照组	82.4±2.6	42.8±8.2	125.1±4.1

2.4 肝脾康胶囊对肝硬化模型的影响:取雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重 180~220 g,分为 5 组,即正常对照组、肝硬化对照组、联苯双酯组、护肝片组、肝脾康胶囊组,每组 10 只。除正常组外其余 4 组均采用复合病因(CCl₄、高脂低蛋白膳食及饮酒等刺激)复制肝硬化模型,给药组于实验第 2 天开始 ig 给药,每日 1 次,共 6 周,剂量见表 6,容积为 1 mL/100 g,正常对照组、肝硬化对照组给予等体

积的生理盐水。实验第 6 周末处死动物。取血清做蛋白电泳,肝左叶固定于 10%福尔马林液中,石蜡包埋切片,H.E 及 V.G 染色,进行组织学观察,其余肝组织留作羟脯氨酸测定。处死前收集 16 h 尿,测定尿羟脯氨酸含量。详见表 6,7。

表 6 对肝硬化形成率的影响

组别	剂量 (g/kg)	肝纤维化程度 — + 卅 卅	肝胶原蛋白含量 (mg/g 干肝)	血清 r 球蛋白量 (%)
正常对照	—	10 0 0 0	18.4±0.53**	19.50±1.40*
肝硬化对照	—	0 4 3 3	33.2±3.26	20.6±0.51
联苯双酯	0.05	4 3 3 0	22.8±2.27**	18.2±0.52**
护肝片	2.0	2 3 3 2	26.3±1.51**	19.42±0.88**
肝脾康胶囊	2.0	6 3 1 0	20.4±1.91**	16.44±0.65**

与肝硬化对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

表 7 对尿羟脯氨酸排出量的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量 (g/kg)	尿羟脯氨酸含量 (μg/mL)
正常对照	—	1.92±0.31*
肝硬化对照	—	1.28±0.21
联苯双酯	0.05	1.79±0.34*
护肝片	2.0	1.94±0.72*
肝脾康胶囊	2.0	3.40±0.37*

与肝硬化对照组比较: * $P<0.01$

2.5 肝脾康胶囊对家兔胆汁流量的影响:取新西兰种家兔 36 只,体重(3±0.5) kg,雌雄不拘,随机分为 6 组,分别 ig 给药,给药后 1.5 h,以 3%戊巴比妥钠静脉麻醉,仰卧行剑突下正中偏右全层切—6 cm 长切口,找出胆总管及十二指肠,在胆总管中段切一小口插入内径 1 mm 塑料管,结扎固定,在塑料管下连记滴装置使胆汁流量平衡 10 min,记录胆汁流量(滴/min)共 60 min,结果见表 8。

2.6 对小鼠单核吞噬细胞功能的影响:取 18~22 g 小鼠 48 只,随机分成 6 组,正常对

表 8 对家兔胆汁流量的影响

组 别	剂量 (g/kg)	给药后(min)胆汁流量(滴)					
		10	20	30	40	50	60
生理盐水	—	6.12±0.30	6.34±0.22	6.75±0.40	5.36±0.25	6.00±0.30	5.70±0.22
联苯双酯	0.05	9.33±0.31	11.31±0.40	12.24±1.08	11.75±0.21	11.00±0.04	11.00±0.03
护肝片	1.0	12.30±0.42	12.47±0.51	12.00±2.35	11.25±0.42	9.00±1.40	9.50±1.03
肝脾康胶囊	2.0	14.33±1.10	14.17±1.10	13.33±1.13	13.50±0.70	12.67±1.13	10.64±1.06
	1.0	14.40±0.54	13.42±0.55	12.21±0.50	11.44±0.64	11.34±0.62	12.00±0.73
	0.5	12.50±0.87	12.25±1.02	12.50±1.02	10.00±1.00	11.75±1.12	10.20±2.50

照组、联苯双酯(200 mg/kg)组、护肝片(2 g/kg)组、肝脾康胶囊(4, 2, 1 g/kg)3个剂量组, ig 给药, 每日1次, 共给10 d, 容积为0.5 mL/20 g, 于末次给药后3 min, 尾部iv 印度墨汁0.1 mL/20 g, 注射后2、10 min, 分别从眼眶后静脉丛取血20 mL, 处理后测OD值, 计算廓清指数, 结果见表9。

表9 对小鼠单核吞噬细胞功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	廓清指数 ($\times 10^{-3}$)
正常对照	—	8	5.02 $\pm$ 0.84
联苯双酯	0.2	8	12.35 $\pm$ 3.76**
护肝片	2	8	8.34 $\pm$ 2.08**
肝脾康胶囊	4	8	10.23 $\pm$ 3.43**
	2	8	9.74 $\pm$ 2.56**
	1	8	9.69 $\pm$ 3.32**

与正常对照比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

实验结果表明, 肝脾康胶囊口服5 g/kg组对鸭乙型肝炎病毒感染鸭血清 DHBV-

DNA 有显著的抑制作用。肝脾康胶囊对CCl₄所致小鼠肝损伤有良好的保护作用, 能显著降低血清谷丙转氨酶和肝脏甘油三酯含量, 增加肝糖元含量; 能明显降低模型大鼠的肝硬化形成率, 降低肝胶原蛋白和血清 γ 球蛋白含量, 增加尿羟脯氨酸含量; 具有良好的增加家兔胆汁流量作用, 能提高小鼠单核吞噬细胞功能。提示肝脾康胶囊具有抗乙肝病毒、修复肝损伤、抑制肝纤维化进程、利胆、增强机体免疫力等作用。这与临床用于治疗慢性乙型肝炎、肝硬化等病的效果是完全一致的, 为该药的临床应用提供了可靠的药理学实验依据。

致谢: 肝脾康胶囊在鸭体内对鸭乙型肝炎病毒感染的实验由中国医学科学院医药生物技术研究所以完成。

(1999-08-30 收稿)

白头翁体内抗肿瘤作用的实验研究

解放军第四五四医院(南京 210002) 蔡 鹰* 陆 瑜 梁秉文 余国祥 谢 瑛
江苏省肿瘤医院 张能方 亢寿海

摘 要 以荷 S₁₈₀瘤小鼠及艾氏腹水型小鼠为模型, 研究了白头翁注射液(PWAE)的体内抗肿瘤作用。PWAE 有明显的抗体内移植瘤和延长荷瘤小鼠存活期作用, 并且 PWAE 还能降低荷瘤小鼠脾指数, 升高胸腺指数, 使之趋向正常值。提示 PWAE 不仅能抑制体内肿瘤生长, 还能提高机体的免疫能力。
关键词 白头翁 抗肿瘤作用 胸腺指数 脾指数

白头翁为毛茛科植物 *Pulsatilla chinensis* Regel, 已发现其水提液(PWE)、醇提液(PAE)在体外能显著抑制 7721、HeLa、MKN-45 细胞的生长^[1], 笔者对其体内抗肿瘤作用进行了实验研究。

1 材料

白头翁: 本院中药房提供。白头翁水提取2次, 4层纱布过滤, 滤液浓缩, 加入95%酒精使含醇量达70%, 置冰箱过夜, 取上清液, 回收酒精, 再配成含醇量80%混悬液, 置冰箱过夜, 取上清液, 回收酒精和水至干, 加蒸馏水配成0.5 g 生药/mL 溶液, 3号垂熔漏

* Adress: Cai Ying, No. 454 Hospital of PLA, Nanjing
蔡 鹰 女, 32岁, 南京中医药大学中药学硕士研究生毕业, 现在解放军第四五四医院工作, 任主管药师, 从事新药开发质量标准制订研究工作, 近年来从事于抗肿瘤中草药筛选工作, 发表论文10余篇。