

四妙方颗粒剂与汤剂防治非酒精性脂肪性肝病的对比研究

邱辉辉¹, 韩瑞婷^{1,2}, 盛丽莉¹, 李后开^{1*}

1. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203

2. 河南中医药大学第一附属医院 呼吸科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 明确四妙方防治非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的作用, 并比较四妙方颗粒剂与汤剂中主要成分质量分数与防治 NAFLD 的药效差异。方法 HPLC 检测四妙方颗粒剂与汤剂中黄柏碱、木兰花碱、 β -蜕皮甾酮、药根碱、巴马汀与小檗碱的质量分数。将 C57BL/6 小鼠随机分为对照组, 模型组, 四妙方颗粒剂低、高剂量 (10、20 g/kg) 组, 四妙方汤剂低、高剂量 (10、20 g/kg) 组, 通过高糖高脂饮食建立 NAFLD 小鼠模型, 给予四妙方颗粒剂与汤剂进行干预, 检测各组小鼠的体质量、肝脏质量、附睾脂肪质量和血清脂质、肝脏脂质水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察各组小鼠肝组织病理变化。结果 四妙方汤剂中 6 种成分的质量分数均高于颗粒剂, 四妙方全方的色谱峰主要来源于黄柏, 其余药味的色谱峰较少。与对照组比较, 模型组小鼠体质量、肝脏质量、附睾脂肪质量和血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、尿酸水平及丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性及肝脏中三酰甘油 (triglycerides, TG) 水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 且脂肪严重变性。与模型组比较, 四妙方颗粒剂与汤剂均能有效降低小鼠体质量、肝脏质量、附睾脂肪质量及血清中 TC、LDL-C、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、尿酸水平及 AST、ALT 活性及肝脏中三酰甘油 (triglycerides, TG) 水平 ($P < 0.05, 0.01$), 且汤剂低剂量组药效优于颗粒剂低剂量组; 四妙方颗粒剂与汤剂均能减少脂质聚积、脂肪变性, 汤剂低剂量组药效优于颗粒剂低剂量组。结论 四妙方汤剂中的化学成分质量分数高于颗粒剂, 低剂量下汤剂药效优于颗粒剂, 高剂量下颗粒剂与汤剂差异较小。

关键词: 四妙方; 非酒精性脂肪性肝病; 颗粒剂; 汤剂; 药效; 黄柏碱; 木兰花碱; β -蜕皮甾酮; 药根碱; 巴马汀; 小檗碱
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)04-1031-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.04.016

Comparative study on prevention of Simiao Formula Granules and Decoction on non-alcoholic fatty liver disease

QIU Hui-hui¹, HAN Rui-ting^{1,2}, SHENG Li-li¹, LI Hou-kai¹

1. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Respiratory department, The First Affiliated Hospital of Henan University of CM, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To verify the effect of Simiao Formula (四妙方) on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and study the difference of ingredients and efficacy between Simiao Formula Granules (四妙方颗粒) and Decoction on NAFLD. **Methods** The contents of phellodendrine, magnoflorine, 20-hydroxyecdysone, jatrorrhizine, palmatine, and berberine in Simiao Formula Granules and Simiao Decoction were detected by HPLC. Male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, low-, high-dose Simiao Granules (10, 20 g/kg), low-, high-dose Simiao Decoction (10, 20 g/kg). Mice received a high fat/high sucrose diet to induce NAFLD. The body weight, liver weight, epididymal white adipose tissue (eWAT) weight, serum lipids, and liver lipids of each group were detected. HE staining was used to observe the pathology of liver tissue. **Results** The results of HPLC showed that the contents of six components in decoction were higher than those in granules. The main chromatographic peaks of Simiao Formula came from *Phellodendri Chinensis Cortex*, few peaks come from the rest of the medicine. The results of pharmacodynamics showed that the

收稿日期: 2020-10-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1700200); 上海市卫健委中医药科研项目 (2020JP016)

作者简介: 邱辉辉 (1992—), 男, 博士研究生, 研究方向为中药防治非酒精性脂肪肝的药效评价与机制研究。E-mail: qhhhello@sina.com

*通信作者: 李后开 (1976—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为功能代谢与肠道微生物组学以及肥胖、非酒精性脂肪肝发病机制的系统生物学研究。Tel: (021)51322729 E-mail: houkai1976@126.com

body weight, liver weight, eWAT weight, serum total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), uric acid, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and liver triglycerides (TG) of the model group were significantly increased compared with the control group ($P < 0.05, 0.01$). HE showed severe steatosis in model group. Compared with model group, both Simiao Formula Granules and Decoction effectively reduced the body weight, liver weight, eWAT weight, serum TC, LDL-C, HDL-C, uric acid, AST, ALT and liver TG of the mice ($P < 0.05, 0.01$). The efficacy in the low dosage decoction group were better than that in the low dosage granules. Liver pathology showed that both Simiao Formula Granules and the Decoction significantly reduced lipid accumulation and steatosis, but the low dosage decoction group was significantly better than the low dosage granule group. **Conclusion** The content of chemical components in Simiao Formula Decoction was higher than that in Granules. The efficacy of Simiao Formula Decoction was better than that of Simiao Formula Granules at low dosage, but the difference was small at high dosage.

Key words: Simiao Formula; non-alcoholic fatty liver disease; granules; decoction; pharmaceutical effect; phellodendrine; magnoflorine; 20-hydroxyecdysone; jatrorrhizine; palmatine; berberine

四妙方源自清代张秉承的《成方便读》，由黄柏、苍术、薏苡仁、牛膝按质量比 2:1:2:1 组成，具有清热利湿的功效。四妙方具有治疗代谢性疾病的作用，如可显著降低湿热困脾型糖尿病小鼠血糖水平，改善糖耐量^[1]；可显著降低高尿酸血症合并高三酰甘油血症患者血清中尿酸和三酰甘油水平^[2]；可改善湿热内阻、气郁痰凝证患者的肝脏脂肪病变^[3]。中药传统汤剂煎煮繁琐，患者依从性差；中药配方颗粒易携带、易储存，且取药方便程度与计量准确度有所提高^[4-5]。配方颗粒剂由药味单煎后组合，传统汤剂由药味配伍后合煎，二者在总化学成分的一致性上存在疑问。研究发现，当归补血汤中的指标性成分高于配方颗粒，且特征峰的数目多于配方颗粒，而中药配方颗粒在治疗表虚盗汗患者的疗效上优于传统汤剂^[6-7]。因此，中药配方颗粒能否代替传统汤剂存有争议。

为明确四妙方防治非酒精性脂肪肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的药理作用，探究颗粒剂与传统汤剂生物等效性和有效成分的含量差异，本研究通过 HPLC 测定四妙方颗粒剂与汤剂的主要化学成分质量分数，并采用小鼠 NAFLD 模型，比较四妙方颗粒剂与汤剂的生物等效性。本研究从功效和成分两方面综合比较颗粒剂与汤剂的差异性，为治疗 NAFLD 的四妙方剂型提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 60 只，4 周龄，体重 (18±2) g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，合格证号 SCXK (沪) 2017-0005。动物饲养于上海中医药大学实验动物中心，温度 20~25 °C，昼夜交替日光灯照明，自由进食饮水，予以正常饲料适应性喂养 1 周。动物实验经上海中医药大学实

验动物福利与伦理委员会审查批准 (批准号 PZSHUCM190301005)。

1.2 药材

黄柏饮片 (批号 17120803) 购自上海信德中药饮片厂；苍术饮片 (批号 1803105)、薏苡仁饮片 (批号 1801114) 购自上海雷允上中药饮片厂有限公司；牛膝饮片 (批号 2018010303) 购自上海余天成中药饮片有限公司。各饮片经上海中医药大学中药研究所吴晓俊研究员鉴定分别为芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮、菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的干燥根茎、禾本科植物薏苡 *Coix lacryma-jobi* L. var. *mayuen* (Roman.) Stapf 的干燥成熟种仁和苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

黄柏配方颗粒 (批号 1706006S，每克相当于 12 g 饮片)、麸炒苍术配方颗粒 (批号 1801001S，每克相当于 6 g 饮片)、薏苡仁配方颗粒 (批号 1802003S，每克相当于 5 g 饮片)、牛膝配方颗粒 (批号 1712002S，每克相当于 2.5 g 饮片) 均购自华润三九医药股份有限公司；盐酸黄柏碱 (批号 JZ19042402，质量分数≥98%) 购自南京卡塞斯医药科技有限公司；木兰花碱 (批号 7799，质量分数≥98%) 购自上海诗丹德标准技术服务有限公司；β-蜕皮甾酮 (批号 D1924074，质量分数≥95%)、盐酸小檗碱 (批号 F1911238，质量分数≥95%) 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；盐酸药根碱 (批号 P11A10F85443，质量分数≥98%)、盐酸巴马汀 (批号 Z23O6L4910，质量分数≥96%) 均购自上海源叶生物科技有限公司；总胆固醇 (total cholesterol, TC) 检测试剂盒 (批号 20181007)、三酰甘油 (triglycerides, TG) 检测试剂盒 (批号 20181007)、

低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 检测试剂盒 (批号 20181007)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 检测试剂盒 (批号 20181007)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 检测试剂盒 (批号 20181018)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 检测试剂盒 (批号 20181018)、尿酸检测试剂盒 (批号 20181007) 均购自南京建成生物工程研究所; 色谱级磷酸购自上海安谱实验科技股份有限公司; 色谱级甲醇、乙腈购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 普通饲料 (批号 1010011) 购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司; 高脂饲料 (批号 D12492) 购自 Research Diet 公司。

1.4 仪器

MS105DU 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水机 (美国 Millipore 公司); ZNHW 型调温电热套 (巩义市英峪予华仪器厂); RE2000A 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。

2 方法

2.1 四妙方颗粒剂的制备

称取黄柏配方颗粒 22.5 g、苍术配方颗粒 22.5 g、薏苡仁配方颗粒 54 g、牛膝配方颗粒 54 g, 加蒸馏水溶解, 得到质量浓度为 1 g/mL (以生药量计) 的四妙方颗粒剂溶液。

2.2 四妙方汤剂的制备

称取黄柏饮片 270 g、苍术饮片 135 g、薏苡仁饮片 270 g、牛膝饮片 135 g, 加入 6.4 L 水煎煮 1.5 h, 滤过; 再加入 4.8 L 水煎煮 1.5 h, 滤过, 合并 2 次煎液, 减压浓缩得到质量浓度为 1 g/mL (以生药量计) 的四妙方汤剂溶液。

2.3 四妙方颗粒剂与汤剂的化学成分分析

2.3.1 四妙方供试品溶液的制备 分别取“2.1”项中四妙方颗粒剂溶液与“2.2”项中四妙方汤剂溶液, 加蒸馏水稀释至 50 mg/mL (以生药量计), 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液经 0.22 μ m 滤膜滤过, 分别得到四妙方颗粒剂和汤剂的供试品溶液。

分别称取黄柏、苍术、薏苡仁和牛膝饮片, 加适量水, 参照“2.2”项下汤剂的制备方法得到黄柏、苍术、薏苡仁、牛膝单味药水提物 (质量浓度分别为 16.7、8.3、16.7、8.3 mg/mL)。分别称取黄柏、苍术、薏苡仁和牛膝配方颗粒, 加水溶解得到黄柏、苍术、薏苡仁、牛膝单味药溶液 (质量浓度分别为

16.7、8.3、16.7、8.3 mg/mL)。12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液经 0.22 μ m 滤膜滤过, 分别得到单味药水提物的供试品溶液与单味药颗粒剂的供试品溶液。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称定盐酸黄柏碱、木兰花碱、 β -蜕皮甾酮、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱对照品, 加甲醇制成对照品储备液。取适量对照品储备液, 加甲醇制成含盐酸黄柏碱、木兰花碱、 β -蜕皮甾酮、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱 (质量浓度分别为 64.00、20.00、100.00、0.64、3.60、200.00 μ g/mL) 的混合对照品溶液。

2.3.3 色谱条件^[8-9] Agilent HPLC SB C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 10%~15% A; 10~20 min, 15%~25% A; 20~30 min, 25%~55% A; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 270 nm; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 进样量为 10 μ L。

2.3.4 样品含量测定 分别取供试品溶液与混合对照品溶液, 进样检测。

2.4 四妙方颗粒剂与汤剂防治 NAFLD 的作用研究

2.4.1 分组、模型建立与给药 C57BL/6 小鼠随机分成对照组, 模型组, 四妙方颗粒剂低、高剂量 (10、20 g/kg, 以生药量计) 组, 四妙方汤剂低、高剂量 (10、20 g/kg, 以生药量计) 组, 每组 10 只。对照组小鼠给予普通饲料并饮用纯净水, 其余各组小鼠给予高脂饲料并饮用 30% 蔗糖水溶液; 造模同时各给药组小鼠 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 16 周。每周称定小鼠体质量并记录其摄食量和饮水量。

2.4.2 样本采集 末次给药后小鼠禁食过夜, 称定体质量, ip 1% 戊巴比妥钠麻醉, 摘眼球取血, 静置 30 min 后, 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 10 min, 分离上清备用。小鼠脱颈椎处死后打开腹腔, 取附睾脂肪、肝脏, 称定质量后将脂肪立即放入液氮中, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。取肝大叶中部于 10% 福尔马林溶液中固定, 石蜡包埋, 以苏木素-伊红 (HE) 染色。

2.4.3 生化指标检测 按照试剂盒说明书检测血清中 TG、TC、LDL-C、HDL-C、尿酸水平及 AST、ALT 活性; 按照试剂盒说明书检测肝脏组织中 TG 和 TC 水平。

3 结果

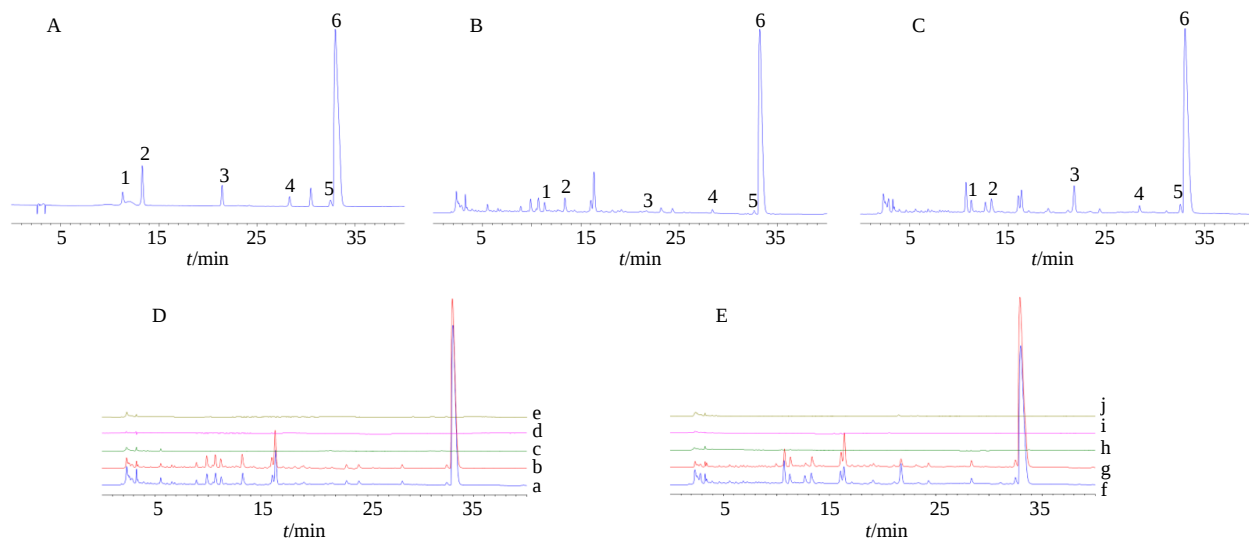
3.1 四妙方颗粒剂与汤剂化学成分的含量测定

如表 1 和图 1 所示, 四妙方颗粒剂中黄柏碱、

表 1 四妙方颗粒剂与汤剂中 6 种化学成分的质量分数

Table 1 Contents of six chemical components of Simiao Formula Granules and Decoction

来源	黄柏碱/(mg·g ⁻¹)	木兰花碱/(mg·g ⁻¹)	β-蜕皮甾酮/(mg·g ⁻¹)	药根碱/(mg·g ⁻¹)	巴马汀/(mg·g ⁻¹)	小檗碱/(mg·g ⁻¹)
四妙方颗粒剂	0.502	0.218	0.270	0.004	0.023	2.077
四妙方汤剂	1.115	0.372	2.464	0.010	0.088	4.037



1-盐酸黄柏碱 2-木兰花碱 3-β-蜕皮甾酮 4-盐酸药根碱 5-盐酸巴马汀 6-盐酸小檗碱

A-混合对照品溶液 B-四妙方颗粒剂 C-四妙方汤剂 D-四妙方颗粒剂 (a) 与各单味药配方颗粒 (b-黄柏、c-苍术、d-薏苡仁、e-牛膝) 叠加图 E-四妙方汤剂 (f) 与各单味药水提物 (g-黄柏、h-苍术、i-薏苡仁、j-牛膝) 叠加图

1-phellodendrine chloride 2-magnoflorine 3-β-ecdysone 4-jatrorrhizine hydrochloride 5-palmatine hydrochloride 6-berberine chloride

A-mixed reference substance solution B-Simiao Formula Granules C-Simiao Formula Decoction D-Overlay chart of Simiaofang Formula Granules (a) and each single medicine formula granule (b-*Phellodendri Cortex*, c-*Attractylodis Rhizoma*, d-*Coicis Semen*, e-*Achyranthis bidentatae Radix*) E-Overlay chart of Simiao Formula Decoction (f) and each single medicine (g-*Phellodendri Cortex*, h-*Attractylodis Rhizoma*, i-*Coicis Semen*, j-*Achyranthis bidentatae Radix*)

图 1 四妙方颗粒剂与汤剂的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of Simiao Formula Granules and Decoction

木兰花碱、β-蜕皮甾酮、药根碱、巴马汀和小檗碱的质量分数分别为 0.502、0.218、0.270、0.004、0.023、2.077 mg/g，四妙方汤剂中黄柏碱、木兰花碱、β-蜕皮甾酮、药根碱、巴马汀和小檗碱的质量分数分别为 1.115、0.372、2.464、0.010、0.088、4.037 mg/g；四妙方汤剂中黄柏碱、木兰花碱、β-蜕皮甾酮、药根碱、巴马汀和小檗碱的质量分数分别为颗粒剂的 2.22、1.71、9.13、2.50、3.83、1.94 倍。对比四妙方颗粒剂与各单味药配方颗粒图谱，发现四妙方颗粒剂色谱图中的主要成分峰来自于黄柏配方颗粒，其余 3 种配方颗粒的色谱峰极少。对比四妙方汤剂与各单味药水提物图谱，发现四妙方汤剂色谱图中的主要成分峰来自于黄柏水提物，其他 3 种水提物的色谱峰较少。

3.2 四妙方颗粒剂与汤剂对 NAFLD 小鼠体质量与脏器质量的影响

如表 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠体质量、肝脏质量、附睾脂肪质量均显著升高 ($P < 0.05$ 、

0.01)，附睾脂肪指数显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较，各治疗组小鼠的体质量、附睾脂肪质量均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)，其中四妙方颗粒剂和汤剂高剂量组均优于低剂量组；四妙方颗粒剂高剂量组和汤剂低、高剂量组小鼠的肝脏质量均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)；四妙方颗粒剂和汤剂高剂量组小鼠的附睾脂肪指数显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.3 四妙方颗粒剂与汤剂对 NAFLD 小鼠血清中血脂和尿酸的影响

如表 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 TC、LDL-C、尿酸水平平均显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较，四妙方颗粒剂高剂量组和汤剂低剂量组小鼠血清中 TC、LDL-C、HDL-C、尿酸水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)，四妙方汤剂高剂量组小鼠血清中 TC、LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

3.4 四妙方颗粒剂与汤剂对 NAFLD 小鼠肝脏脂质和肝功能的影响

如表 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝脏

表 2 四妙方颗粒剂与汤剂对小鼠体质量与各组织质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Simiao Formula Granules and Decoction on body weight and several tissue mass of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g	肝脏质量/g	附睾脂肪质量/g	肝脏指数/%	附睾脂肪指数/%
对照	—	27.96±1.63	0.96±0.10	0.49±0.24	3.45±0.29	1.76±0.76
模型	—	43.54±2.48**	1.52±0.31**	2.79±0.42*	3.49±0.58	6.43±0.95**
四妙方颗粒剂	10	38.64±4.30##	1.26±0.19	2.26±0.45#	3.28±0.27	5.81±0.78
	20	33.76±3.82##	1.13±0.12##	1.70±0.58##	3.38±0.18	4.99±1.24#
四妙方汤剂	10	37.48±6.21#	1.14±0.44#	2.15±0.57#	3.00±0.64	5.71±0.93
	20	33.69±5.42##	1.10±0.22##	1.70±0.64##	3.28±0.16	4.91±1.21##

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组相比: # $P<0.05$ ## $P<0.01$, 下表同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group, same as tables

表 3 四妙方颗粒剂与汤剂对小鼠血清血脂和尿酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Simiao Formula Granules and Decoction on levels of serum lipids of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	尿酸/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	3.64±0.62	0.82±0.30	0.08±0.05	3.97±0.42	76.41±31.40
模型	—	7.94±1.68**	1.11±0.35	1.15±0.43**	4.48±0.61	130.90±47.27**
四妙方颗粒剂	10	6.85±1.27	0.95±0.25	0.60±0.30#	4.52±0.43	71.34±48.93
	20	5.39±1.17##	0.85±0.25	0.29±0.17##	3.61±0.38#	62.22±33.02#
四妙方汤剂	10	5.75±0.72##	0.87±0.38	0.47±0.22##	3.24±0.31##	60.81±43.88#
	20	4.43±1.09##	0.87±0.18	0.46±0.20##	3.79±0.66	73.68±19.33

表 4 四妙方颗粒剂与汤剂对小鼠肝脏脂质和肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Simiao Formula Granules and Decoction on liver lipids and liver function of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TG/(mmol·g ⁻¹)	TC/(mmol·g ⁻¹)	AST/(IU·L ⁻¹)	ALT/(IU·L ⁻¹)
对照	—	0.08±0.01	0.05±0.01	108.98±33.55	77.86±10.42
模型	—	0.10±0.01*	0.04±0.02	162.67±17.04**	401.85±265.22*
四妙方颗粒剂	10	0.08±0.01##	0.04±0.01	133.61±22.70#	115.56±57.96#
	20	0.08±0.01#	0.05±0.01	109.94±21.52##	116.97±67.27#
四妙方汤剂	10	0.07±0.02#	0.05±0.02	109.94±21.52##	89.35±25.42#
	20	0.07±0.02##	0.04±0.01	102.34±11.52##	125.81±53.61#

中 TG 水平和 AST、ALT 活性显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 各给药组小鼠肝脏 TG 水平和 AST、ALT 活性均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.5 四妙方颗粒剂与汤剂对 NAFLD 小鼠肝脏病理变化的影响

如图 2 所示, 对照组小鼠肝大叶结构清晰可见, 肝细胞排列正常、形态正常, 无脂肪变性; 模型组小鼠肝脏组织病变严重, 肝细胞水肿、脂肪变性明显, 细胞排列杂乱, 可见大量脂肪空泡; 与模型组相比, 四妙方颗粒剂低剂量组小鼠肝脏脂滴减少, 肝细胞排列仍杂乱但稍有改善; 四妙方颗粒剂高剂

量组及四妙方汤剂低、高剂量组小鼠肝脏组织脂质空泡大幅度减少, 仅有少量脂肪变性且脂滴较小, 肝细胞排列明显整齐, 肝脏结构更加清晰。在低剂量下, 四妙方汤剂优于颗粒剂; 在高剂量下, 四妙方颗粒剂与汤剂无明显区别。

4 讨论

中医辨证将 NAFLD 分为湿浊内停证、肝郁脾虚证、湿热蕴结证等^[10]。根据临床组方规律, 中医药在治疗 NAFLD 时以活血化瘀、清热祛湿见长^[11]。本研究以高糖、高脂饲养小鼠, 膏粱厚味易化生痰湿、滋腻碍胃, 蕴结日久成为湿热, 宜采用清热利

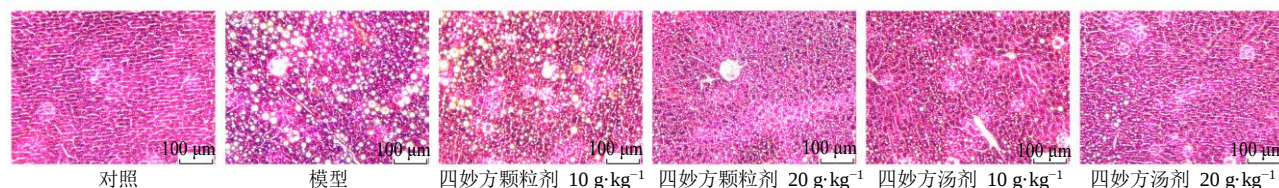


图 2 四妙方颗粒剂与汤剂对非酒精性脂肪性肝病小鼠病理组织学的影响 ($\times 200$)

Fig. 2 Effect of Simiao Formula Granules and Decoction on liver histology of mice with non-alcoholic fatty liver ($\times 200$)

湿法治疗。四妙方中君药黄柏清热燥湿，臣药苍术燥湿健脾，佐药薏苡仁利水渗湿、健脾，使药怀牛膝活血通经，并可引药下行；全方具有清热利湿的功效，临床上主要用于湿热下注所致的痹症，以治疗痛风见长^[12-13]。高尿酸为痛风患者的重要特征，四妙方可显著降低痛风患者血清尿酸水平^[14-15]。流行病学调查发现，血清中尿酸水平与 NAFLD 的发生呈正相关^[16-17]。研究认为，尿酸可作为预测 NAFLD 发生的风险因素^[18]。肝脏中黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase, XO）作为尿酸生成的限速酶可诱导 NOD 样受体蛋白 3（NOD-like receptor protein3, NLRP3）炎性小体活化以促进白细胞介素-1 β 分泌^[19-20]。另外，尿酸促进固醇调节元件结合蛋白 1c（sterol-regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c）表达，从而增加乙酰辅酶 A 羧化酶、脂肪酸合成酶、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 的表达，增加肝脏脂质积累^[21-22]。尽管 NAFLD 与痛风分属不同疾病，但四妙方也能减少血清中尿酸水平，体现了中医异病同治的观点。

中药配方颗粒能否替代传统汤剂一直存在争议。甘草配方颗粒和甘草饮片入药四逆汤对附子的解毒作用差异较大，甘草配方颗粒解毒能力较差，表明甘草在传统汤剂中更有利于解毒物质的溶出^[23]。四物汤传统汤剂与配方颗粒中没食子酸等 6 种成分的含量差异较大，仅没食子酸在四物汤配方颗粒中含量更高，其余 5 种成分均在传统汤剂中含量更高^[24]。归脾汤的配方颗粒剂在贫血女性患者中的显效率、总有效率均优于其汤剂^[25]。不同医院生产的葛根芩连汤配方颗粒，指纹图谱中特征峰的数目均多于传统汤剂^[26]。半夏泻心汤的传统汤剂与配方颗粒对慢性胃炎患者的疗效无明显差异；麻黄汤配方颗粒与传统汤剂在小鼠模型上均能祛痰、发汗，其药理作用无明显差异^[27-28]。吴茱萸汤配方颗粒剂中吴茱萸碱等成分含量与传统汤剂基本一致，四逆汤配方颗粒中甘草苷的含量与传统汤剂无明显区别^[29-30]。配方颗粒与传统汤剂最大的区别在于单煎与合煎。合煎对药物的溶出有一定影响，如白虎加桂枝汤合煎液中新芒果苷等 3 种成分的含量高于单煎液，佛手散合煎药液中绿原酸等 5 种成分的含量均高于单煎药液，人参、白术药对的合煎液中人参皂苷 Rg₁ 等 5 种成分含量明显高于单煎液，提示合煎能促进该类药味的药效物质溶出，此类药味可能不适用于配方颗粒^[31-33]。因此，单煎与合煎导致有效成分的含

量差异可能是传统汤剂与配方颗粒药效差异的重要原因。

四妙方中黄柏的主要成分为生物碱类，如小檗碱、黄柏碱、木兰花碱等，其中含量最高的为小檗碱^[34-35]。小檗碱具有改善胰岛素抵抗、缓解脂肪肝的药理作用，黄柏碱具有抗炎、抗氧化作用^[36-39]。因此，生物碱类成分可能为四妙方防治 NAFLD 的药效物质基础之一。本研究发现，四妙方颗粒剂和汤剂中含有黄柏碱、木兰花碱、药根碱、巴马汀和小檗碱 5 种生物碱。苍术的主要成分为挥发油类，如苍术素、 β -桉叶醇、苍术酮等，多以气相色谱法检测^[40-41]。本研究以 HPLC-DAD 检测苍术素，未在四妙方颗粒剂和汤剂中找到对应色谱峰。薏苡仁的主要成分为脂肪酸类和三酰甘油类，如 1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯、1-棕榈酸-2-亚油酸-3-油酸甘油酯等，常用蒸发光散射检测器，不适用于紫外检测器^[42-43]。牛膝的主要成分为甾酮类和皂苷类，如 β -蜕皮甾酮、竹节参皂苷 Iva，其中 β -蜕皮甾酮具有抑制脂肪堆积、减轻胰岛素抵抗的作用，可能为四妙方防治 NAFLD 的药效物质基础之一^[44-45]。本研究结果显示，四妙方汤剂中黄柏碱、木兰花碱、 β -蜕皮甾酮、药根碱、巴马汀和小檗碱的质量分数高于四妙方颗粒剂，可能是低剂量下的四妙方汤剂药效优于颗粒剂的原因。基于当前检测方法，不论汤剂或颗粒剂，四妙方全方中的成分均来自于君药黄柏，而黄柏的主要成分为生物碱类，表明生物碱类成分可能是四妙方的药效物质基础。中药的产地、炮制、贮存等均为影响品质或成分含量的重要因素，本研究所检测的汤剂样本与配方颗粒样本并非取自同一批次、同一来源的中药饮片，因此对检测结果有一定影响。课题组后续将进行更系统的检测，如纳入不同基原的中药饮片、不同提取批次的中药汤剂、不同厂家与批次的配方颗粒等。此外，本研究发现，四妙方颗粒剂与传统汤剂均能有效降低 NAFLD 小鼠的体质量、白色脂肪与肝脏质量，同等剂量下的四妙方汤剂优于颗粒剂；四妙方颗粒剂与汤剂均能降低 NAFLD 小鼠的血脂和尿酸水平，低剂量下四妙方汤剂优于颗粒剂，高剂量下颗粒剂药效更佳。

综上所述，四妙方颗粒剂与传统汤剂均能有效防治 NAFLD，低剂量下四妙方汤剂药效优于颗粒剂，高剂量下二者无差别，这可能与四妙方汤剂的化学成分含量较配方颗粒剂高有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 程旸, 许立, 许波华, 等. 四妙颗粒对湿热困脾型糖尿病模型小鼠血糖及糖耐量的影响 [J]. 中南药学, 2011, 9(4): 245-248.
- [2] 管向华. 四妙丸治疗高尿酸血症合并高三酰甘油血症效果观察 [J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(11): 1319-1320.
- [3] 李佳, 金春锋. 四妙散临床运用 [J]. 山东中医杂志, 2009, 28(10): 735-736.
- [4] 穆桂荣. 中药配方颗粒和传统中药饮片调剂方式的应用对比分析 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(12): 96-98.
- [5] 苏燕, 李慧. 中药配方颗粒与传统中药饮片的应用对策研究 [J]. 中医临床研究, 2020, 12(1): 129-130.
- [6] 姚静, 施钧瀚, 桂新景, 等. 基于 HPLC 指纹图谱评价的当归补血汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的成分差异分析 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2567-2574.
- [7] 高云华, 张峰. 中药配方颗粒与传统中药饮片临床疗效比较 [J]. 中国继续医学教育, 2017, 9(21): 200-201.
- [8] 黄群莲, 罗颖, 李芹, 等. “一测多评”含量测定法对黄柏配方颗粒与黄柏饮片适用性研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(16): 1470-1474.
- [9] 肖娟, 蔡萍, 万丹, 等. 不同粉体三、四妙丸 HPLC 指纹图谱对比研究 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(23): 27-31.
- [10] 赵红, 谢雯. 非酒精性脂肪性肝病的中西医结合治疗现状 [J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(1): 16-18.
- [11] 丁静, 张斌, 王培劼, 等. 基于数据挖掘和生物信息分析探讨非酒精性脂肪肝用药规律及作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8): 1689-1695.
- [12] 程智玲, 周莎, 易童, 等. 急性痛风性关节炎的中医诊疗进展 [J]. 中国中医急症, 2019, 28(12): 2250-2252.
- [13] 李庆梅. 四妙丸临床验案举隅 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2020, 30(6): 500-501.
- [14] 陈伟, 江文杰, 卢景宜. 加味四妙散治疗急性痛风性关节炎对患者关节肿痛及 CRP、UA 的影响 [J]. 中国实用医药, 2020, 15(22): 156-158.
- [15] 许晓彤, 谢心军, 张雄. 四妙丸加味治疗早期湿热蕴阻型膝关节关节炎临床观察 [J]. 广西中医药, 2020, 43(1): 17-19.
- [16] Kanbay M, Jensen T, Solak Y, et al. Uric acid in metabolic syndrome: From an innocent bystander to a central player [J]. *Eur J Intern Med*, 2016, 29: 3-8.
- [17] Shih M H, Lazo M, Liu S H, et al. Association between serum uric acid and nonalcoholic fatty liver disease in the US population [J]. *J Formos Med Assoc*, 2015, 114(4): 314-320.
- [18] Xu C, Yu C, Xu L, et al. High serum uric acid increases the risk for nonalcoholic Fatty liver disease: A prospective observational study [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11578.
- [19] Xu C, Wan X, Xu L, et al. Xanthine oxidase in non-alcoholic fatty liver disease and hyperuricemia: One stone hits two birds [J]. *J Hepatol*, 2015, 62(6): 1412-1419.
- [20] Gicquel T, Robert S, Loyer P, et al. IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages [J]. *FASEB J*, 2015, 29(10): 4162-4173.
- [21] Choi Y J, Shin H S, Choi H S, et al. Uric acid induces fat accumulation via generation of endoplasmic reticulum stress and SREBP-1c activation in hepatocytes [J]. *Lab Invest*, 2014, 94(10): 1114-1125.
- [22] 刘静, 孙蓉. 小柴胡汤对非酒精性脂肪性肝炎模型小鼠的保护作用研究 [J]. 中草药, 2020, 51(14): 3708-3716.
- [23] 曾欢, 何翠敏, 苏慧琳, 等. 甘草饮片与甘草配方颗粒在四逆汤中减毒作用比较 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(2): 231-235.
- [24] 孟璐, 丁琮洋, 徐帅师, 等. 四物汤传统饮片汤剂与配方颗粒汤剂有效成分比较 [J]. 中成药, 2020, 42(2): 397-401.
- [25] 崔梦茹, 康风娇. 归脾汤中药配方颗粒剂与传统饮片煎剂治疗女性缺铁性贫血临床疗效对比 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2020, 7(33): 132-133.
- [26] 李红, 李妍, 田杰, 等. 葛根芩连汤配方颗粒和传统汤剂的 HPLC 的指纹图谱对比研究 [J]. 世界中医药, 2018, 13(9): 2304-2307.
- [27] 张红霞, 姬艳苏, 赵榕慧. 半夏泻心汤中药饮片与颗粒剂治疗慢性胃炎临床效果研究 [J]. 武警后勤学院学报: 医学版, 2019, 28(5): 22-25.
- [28] 胡耶芳, 颜剑. 麻黄汤配方颗粒剂与传统汤剂的疗效比较研究 [J]. 实用药物与临床, 2017, 20(12): 1365-1367.
- [29] 林伟雄, 乐智勇, 车海燕, 等. 吴茱萸汤颗粒剂、配方颗粒剂及传统汤剂中指标成分的含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(13): 30-34.
- [30] 杨玉琴, 梁光义, 秦利芬, 等. 不同制法四逆汤中甘草苷含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 40-42.
- [31] 彭平, 田瑞华, 杜菁, 等. 白虎加桂枝汤单煎与合煎提取物质量表征特性分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3263-3269.
- [32] 贾智若, 陈明伟, 甄丹丹, 等. 佛手散分煎液与合煎液的有效成分对比分析 [J]. 广西中医药大学学报, 2020,

- 23(2): 90-93.
- [33] 李孟璇, 孙林, 孟兆青, 等. 人参白术药对配伍前后化学成分变化研究 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3549-3552.
- [34] Kim Y J, Lim H S, Kim Y, *et al.* Phytochemical quantification and the *in vitro* acetylcholinesterase inhibitory activity of *Phellodendron chinense* and its components [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 925.
- [35] Liu Y, Chen J, Li X H, *et al.* Simultaneous determination of seven alkaloids in *Phellodendron chinense* Schneid by high-performance liquid chromatography [J]. *J Aoac Int*, 2010, 93(5): 1416-1421.
- [36] Yue S J, Liu J, Wang A T, *et al.* Berberine alleviates insulin resistance by reducing peripheral branched-chain amino acids [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 316(1): 73-85.
- [37] Zhu X, Bian H, Wang L, *et al.* Berberine attenuates nonalcoholic hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 141: 192-204.
- [38] Mai C T, Wu M M, Wang C L, *et al.* Palmatine attenuated dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis via promoting mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome inactivation [J]. *Mol Immunol*, 2019, 105: 76-85.
- [39] Li L, Huang T, Tian C, *et al.* The defensive effect of phellodendrine against AAPH-induced oxidative stress through regulating the AKT/NF- κ B pathway in zebrafish embryos [J]. *Life Sci*, 2016, 157: 97-106.
- [40] 陈文婷, 陈阳, 崔波, 等. 气相色谱“一测多评”用于苍术多成分含量测定的可行性研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 551-556.
- [41] 朱思敏, 崔波, 欧阳丽敏, 等. 一测多评法结合 Q 型聚类分析对苍术中 3 个聚炔类成分的比较研究 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(4): 597-606.
- [42] 许平翠, 寿旦, 吴人杰, 等. 基于 HPLC 指纹图谱聚类分析和主成分分析的麸炒薏苡仁饮片质量评价方法 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(12): 5683-5686.
- [43] 王青霞. 薏苡仁标志性成分检测及即食薏仁粉制备 [D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [44] 张欢, 杨中林, 郑琢, 等. β -蜕皮甾酮对油酸诱导 HepG2 细胞内脂肪堆积的抑制作用 [J]. 海峡药学, 2015, 27(4): 227-229.
- [45] 朱玉霞, 孙丽莎, 杨娇, 等. 蜕皮甾酮对 2 型糖尿病大鼠肝细胞 IRS-2 蛋白表达的影响 [J]. 山东医药, 2014, 54(33): 10-12.

[责任编辑 李亚楠]