

2.2.2 质谱 离子源: EI 源(70 eV); 离子源温度: 230 °C; 接口温度: 280 °C; 四极杆温度: 150 °C; 质量扫描范围: 35~ 550 amu。

2.3 橘叶挥发油化学成分分析 取橘叶挥发油供试品溶液, 按上述实验条件进样, 经气相色谱峰面积归一法测定各组分的相对百分含量, 并用气相色谱-质谱联用技术做 GC/MS 离子流色谱检测, 所得质谱图经计算机质谱数据库检索(Nist05 标准质谱图库), 并按照各峰的质谱裂片图(图 1)与文献[7]对照, 确定了橘叶挥发油的化学成分。从橘叶的挥发油中分离出 52 种化合物, 鉴定出名称的化合物有 34 种, 占挥发油总量的 83%, 分析鉴定结果见表 1。

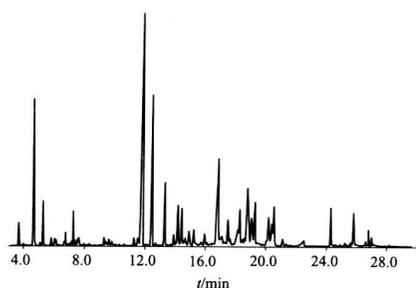


图 1 橘叶挥发油总离子流图

Fig 1 Total ion current spectrum of essential oil from *Folium Citri Reticulatae*

### 3 讨论

本实验采用 GC/MS 联用分析橘叶挥发油的化学成分, 结果表明, 橘叶挥发性成分中, 主要为  $\beta$ -榄香烯(19.96%)、石竹烯(10.27%)、石竹烯氧化物(8.78%)、[1R-(1a, 3a <sup>$\beta$</sup> , 4a, 7 <sup>$\beta$</sup> )]-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 6,

7-八氢-1, 4-二甲基-7-(1-甲基乙烯基)-萹(6.97%)、邻伞花烃(6.27%)等。其中倍半萜类化合物含量最高, 其次是单萜类化合物, 还含有一些含氧衍生物。这些物质中不少成分具有特殊的药效, 如以  $\beta$ -榄香烯为主要成分的榄香烯注射液是我国自主研发成功的二类抗肿瘤新药, 抗癌广泛, 疗效确切, 不良反应少<sup>[8]</sup>; 石竹烯对呼吸系统的细菌有很强的抑制作用, 同时也有止咳、平喘、抗真菌的作用, 是治疗老年慢性支气管炎的有效成分之一<sup>[9]</sup>; 石竹烯氧化物、蒎烯是天然的强驱虫杀虫成分。本研究结果对橘叶药用资源的进一步开发利用提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典(下册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 3742-3743.
- [2] 苏红, 刘琪, 薛平. 橘叶中橙皮苷的含量测定[J]. 中国现代中药, 2006, 8(4): 19.
- [3] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 349.
- [4] 郭素萍, 李庚寅. HPLC 测定橘叶中橙皮苷的含量[J]. 山西中医院学报, 2007, 8(4): 51.
- [5] 范玉田, 杨玉华. 乳癖康胶囊的质量控制[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(16): 1407-1409.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 XD.
- [7] 丛浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 783.
- [8] 花文峰, 蔡绍晖.  $\beta$ -榄香烯抗肿瘤作用的基础与临床研究[J]. 中药材, 2006, 29(1): 93-96.
- [9] 孙彬, 田暄. 应用超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取技术研究中药百里香挥发性化学成分[J]. 西北植物学报, 2001, 21(5): 90.

[收稿日期] 2010-07-01

## 均匀设计法筛选茵陈蒿汤抗脂肪肝脂质代谢异常的效应组分

徐维佳, 范应, 陈少东, 周海虹, 李刚 (厦门大学医学院, 福建 厦门 361005)

[摘要] 目的: 运用均匀设计法筛选茵陈蒿汤抗脂肪肝脂质代谢紊乱的效应组分及其最优剂量配比, 探讨揭示复方配伍理论科学内涵的研究方法。方法: 将茵陈蒿汤(茵陈、栀子、大黄)进行分组设计, 分为 6 种中药组合, 对高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝模型进行干预, 观察各组大鼠肝脏的病理变化, 并以血清三酰甘油(TG)、肝组织 TG、血清低密度脂蛋白(LDL)测定作为筛选指标, 分析不同作用途径的效应组分及其最优剂量配比。结果: 较之正常组, 模型组血清 TG、LDL 和肝组织 TG 含量均明显升高( $P < 0.05 \sim 0.01$ ), 肝组织存在明显脂肪变性; 各药物组上述脂肪病理改变程度均明显减轻。根据均匀设计实验逐步回归分析, 降低血清 TG 和降低肝组织 TG 的效应组分分别是茵陈、栀子。而茵陈与大黄对降低血清 LDL 有明显疗效, 以茵陈 0.3 g + 大黄 0.15 g 为最优剂量组合。结论: 茵陈蒿汤通过多途径调节脂肪肝的脂质代谢, 其不同作用途径存在特定的效应组分及相应的最优剂量配比。

[关键词] 茵陈蒿汤; 脂肪肝; 脂质代谢; 均匀设计; 效应组分; 最优剂量配比

[中图分类号] R96 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)04-0274-04

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(编号: 2009J05089); 厦门大学医学院院长基金资助项目 [作者简介] 徐维佳, 女, 本科, 电话: 0592-2183069, E-mail: xwj1707@gmail.com [通讯作者] 周海虹, 女, 教授, 电话: 0592-2183069, E-mail: hhzhou@xmu.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

## Using uniform design to screen the active ingredients of Yinchenhao decoction in the regulating fatty liver's lipid metabolism

XU Weirjia, FAN Ying, CHEN Shaodong, ZHOU Hairong, LI Gang (Medical College, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To screen the active ingredients and the optimal dose ratio of components in Yinchenhao decoction of anti fatty liver lipid metabolism, and study for the research methods on the connotation of prescription assembling. **METHODS** The active ingredients and optimized prescription were screened out, adopting uniform block design to divide Yinchenhao decoction (*Artemisia capillaries* Thunb, *Gardenia jasminoides* Ellis, rhubarb) into six combinations, by using experiment on high fat diet induced fatty liver rat models, and observing the pathological results. The serum TG, LDL and liver TG were taken as the screening index. **RESULTS** Compared to the normal groups, the serum TG, LDL and liver TG of model group were significantly higher ( $P < 0.05 - 0.01$ ); pathological obvious steatosis; while that pathological changes in all treatment groups were significantly reduced. According to stepwise regression analysis of uniform design, the active ingredients contributed to lower the TG of serum and liver were separately *Artemisia capillaries* and *Gardenia jasminoides*. Both *Artemisia capillaries* and rhubarb were significantly effective in making the serum LDL down, and the optimized prescription was screened out in the studies as: 0.3 g *Artemisia capillaries* + 0.5 g rhubarb. **CONCLUSION** There are many pathway that Yinchenhao decoction takes effect in to regulate fatty liver's lipid metabolism. Each pathway has certain relevant ingredient and the optimized prescription.

**KEY WORDS:** Yinchenhao decoction; fatty liver; lipid metabolism; uniform design; active ingredient; the optimized prescription

近年来,随着人们生活方式与饮食结构的改变,非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率呈快速上升趋势,已成为肝硬化甚至肝癌的重要因素之一<sup>[1]</sup>。本病的发病机制复杂,其中脂质代谢异常在其发生发展中起着非常重要的作用<sup>[2,3]</sup>。中医学认为,脂肪肝发病与痰湿、淤血、肝郁、脾虚密切相关,主要病机为肝气郁结,脾失健运,痰淤阻滞,湿郁化热,以致痰湿淤热互结于胁下<sup>[4]</sup>。《伤寒论》茵陈蒿汤具有清热利湿、活血化淤功效,方中重用茵陈为君药,以其善能利湿清热退黄;臣以栀子清热降火,通利三焦,引湿热自小便而出;佐以大黄泻热逐淤,通利大便,导淤热由大便而下。三药合用,利湿与泄热相伍,使二便通利,前后分消,湿热得行,淤热得下。本方组方精炼,配伍严谨,故临床治疗湿热淤阻型脂肪肝取得较好疗效<sup>[5,6]</sup>。实验研究显示,茵陈蒿汤能够明显抑制肝脂肪沉积,降低肝脏及血清TG含量,具有良好的调节脂质代谢的药理效应<sup>[7]</sup>。本研究以该方抗脂肪肝脂质代谢紊乱的药理效应为切入点,运用数学模型均匀设计法,剖析茵陈蒿汤调节脂质代谢的效应组分及最优剂量配比,为进一步阐明该方治疗脂肪肝的物质基础提供科学实验依据。

### 1 材料

1.1 药物及其制备 茵陈、栀子、大黄均购自同仁堂药房。药物剂量按中国药典 2005 年版一部的成人规范剂量换算,分 6 大份(各组组分药物煎煮剂

量,按表 1 标注的每日给药量,服 40 d 估算)统一煎制而成。各组药物均经 3 次水煎浓缩,各滤得药液 600 mL,贮-4℃冰箱保存备用。

1.2 动物与试剂 SD 大鼠 30 只,♂,体质量(120±10)g,清洁级,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005。三酰甘油试剂盒(F001-1)、血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒(F003-1)、肝素溶液(A051-1)均购自南京建成生物制品研究所。

### 2 方法

2.1 模型制备与分组给药 采用单纯高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝模型。将 30 只大鼠随机分为 8 组,其中正常组和模型组各 6 只,药物 1~6 组每组各 3 只。除正常组进食普通饲料外,其余大鼠均喂以高脂饲料(83.25%基础饲料、10%猪油、1.5%胆固醇、0.2%脱氧胆酸钠、5%糖、0.05%丙硫氧嘧啶)5 周。期间自由饮水。

自第 6 周始,药物组按每天 1 mL·(100 g)<sup>-1</sup>鼠质量分别灌服相应药物,一日一次,持续 5 周。正常组、模型组给予相应量的饮用水灌胃,期间模型组与药物组始终维持高脂饲料喂养,正常组维持普通饲料喂养。末次给药后,禁食不禁水 12 h,摘取眼球取血,并分离取出肝组织。

2.2 “筛选”实验均匀设计方案 见表 1。根据均匀设计方案 U7(7<sup>6</sup>)表,将方中 3 味中药作为考察因子,以 X1、X2、X3 分别代表茵陈、栀子、大黄,每

个因子各取 6 个水平(水平为 100 g 大鼠每日给药量), 确立 X1 因子的 6 个剂量范围在 0.05~ 0.3 g, X2, X3 在 0.025~ 0.15 g 的剂量范围内。同时根据 U7(7<sup>6</sup>) 使用表安排各因子和水平, 进行组方设计, 得均匀设计“筛选”实验组方, 表中每列为 1 味药物, 每行为一个组方, 按表中行数值取相应克数的药混合即得此组方, 共 6 组。

2.3 “筛选”实验检测指标 血清 TG 含量测定、LDL 含量测定, 肝组织 TG 含量测定, 均按生化试剂盒说明书检测。肝组织 HE 染色, 光镜下确定各个样本的肝脂肪变性程度<sup>[8]</sup>。

2.4 统计学处理 所有数据均使用 SPSS 12.0 软件包进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。均匀设计“筛选”实验采用多元逐步回归分析(以  $\alpha = 0.05$  为显著水准进行统计检验)以剖析不同作用途径的相应效应中药或其剂量配比。

表 1 均匀设计“筛选”实验方案及结果( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab 1 Project and result of the screening experiment according to the uniform design ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	100 g 大鼠每日给药量组方 (g): 茵陈(X1) + 栀子(X2) + 大黄(X3)	n	血清 TG/mg·L <sup>-1</sup>	血清 LDL/mg·L <sup>-1</sup>	肝组织 TG/mg·g <sup>-1</sup>
正常组	\	6	519.7 ± 54.3	2.53 ± 1.41	89.2 ± 22.1
模型组	\	6	666.7 ± 64.6 <sup>a</sup>	106.4 ± 13.2 <sup>a</sup>	727.0 ± 41.4 <sup>a</sup>
组 1	0.3 + 0.125 + 0.1	3	463.7 ± 92.9 <sup>c</sup>	54.9 ± 15.4 <sup>c</sup>	282.2 ± 52.8 <sup>c</sup>
组 2	0.25 + 0.075 + 0.025	3	419.2 ± 86.1 <sup>c</sup>	81.6 ± 25.4 <sup>b</sup>	383.4 ± 60.8 <sup>c</sup>
组 3	0.2 + 0.025 + 0.125	3	441.3 ± 117.7 <sup>c</sup>	55.3 ± 21.4 <sup>c</sup>	220.5 ± 22.4 <sup>c</sup>
组 4	0.15 + 0.15 + 0.05	3	546.7 ± 86.8 <sup>b</sup>	64.6 ± 13.9 <sup>c</sup>	156.6 ± 27.4 <sup>c</sup>
组 5	0.1 + 0.1 + 0.15	3	531.4 ± 86.9 <sup>b</sup>	75.0 ± 30.0 <sup>b</sup>	231.0 ± 59.7 <sup>c</sup>
组 6	0.05 + 0.05 + 0.075	3	494.2 ± 160.1 <sup>b</sup>	70.0 ± 15.2 <sup>c</sup>	274.0 ± 50.0 <sup>c</sup>

注:与正常组比较, <sup>a</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup>  $P < 0.05$ , <sup>c</sup>  $P < 0.01$

表 2 均匀设计回归分析结果

Tab 2 Results of regression analysis in uniform design

反映脂质代谢的指标	回归方程	R	P	效应组分及最优剂量配比
血清 TG	$Y = 58.268 - 52.660X_1$	0.790	0.035	茵陈(取最大值 0.3 g)
血清 LDL	$Y = 8.768 - 121.751X_1X_3$	0.771	0.042	茵陈 0.3 g + 大黄 0.15 g
肝 TG	$Y = 83.200 - 452.481X_2$	0.845	0.017	栀子(取最大值 0.15 g)

实验结果运用 SPSS 软件进行回归处理, 得到茵陈蒿汤的均匀设计回归方程。其中, X1、X2、X3 分别为各组药物中茵陈、栀子、大黄的用量, Y 取最小值时, 血清及肝脏 TG、LDL 的治疗效应最优。见表 2, 3。

表 3 变量分析表

Tab 3 Results of variance analysis

变量	方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
血清 TG X1	回归	194.114	1	194.114	8.282	0.035
	剩余(残差)	117.197	5	23.439		
	总和	311.311	6			
血清 LDL X1X3	回归	11.349	1	11.349	7.322	0.042
	剩余(残差)	7.750	5	1.550		
	总和	19.099	6			
肝 TG X2	回归	3 582.937	1	3 582.937	12.465	0.017
	剩余(残差)	1 437.227	5	287.445		
	总和	5 020.164	6			

### 3 结果

3.1 各组大鼠肝组织病理变化 与正常组比较, 模型组肝脏肉眼可见, 肝大而软, 外观呈黄红和灰红相间, 表面和切面油腻。药物组外观色泽接近于正常组。光镜下存在明显脂肪变性。正常组肝小叶完整, 肝索排列整齐, 肝细胞呈不规则多角形或卵圆形, 细胞质丰富, 胞核大而圆, 居中, 有核仁 1~ 2 个; 而模型组小叶内的细胞布满大小不一的脂肪空泡, 肝索排列紊乱。肝细胞肿大而圆, 细胞核被推挤到细胞一侧, 表明模型理想。各药物组上述脂肪病变程度均明显减轻, 尤以药物组 4 最明显, 整个肝小叶仅见少量脂肪空泡。

3.2 均匀设计“筛选”实验 模型组大鼠血清 TG、LDL 及肝组织 TG 含量均较正常组显著升高( $P < 0.01$ )。均匀设计各组数据(见表 1)经统计分析, 得出不同作用途径的效应组分及剂量配比, 见表 2。

### 4 讨论

中药复方是中医辨证论治的特色体现, 是临床治病的主要运用形式。如何在遵循传统方剂配伍法度的基础上, 揭示复方多环节药理作用与其有效组分之间的关系, 已成为目前中医药现代化研究所关注的问题。

均匀设计法是一种将数论和多元统计相结合的实验设计方法, 适用于多因素、多水平的实验研究。目前, 均匀设计法被逐渐运用于中医药研究中, 作为筛选中药复方物质基础或有效组分的现代技术手段之一<sup>[9-11]</sup>, 其筛选作用的可靠性已初步得到验证。该法的运用简化了实验操作, 降低了实验次数, 可以定量地分析各因素对试验结果的影响, 定量地预报优化条件及优化结果的区间估计。在分析复方配伍规律的探索上, 需要涉及各药味对复方药效的影响, 应充分发挥均匀设计法多因素多水平的优势, 同时, 可以利用均匀设计法定量地预报复方的剂量优化条件。

本研究旨在探索一种阐明方剂配伍理论科学内

涵的思路与方法,以茵陈蒿汤为切入点,运用均匀设计法,通过多元逐步回归,从血清 TG、肝组织 TG、血清 LDL 3 个指标说明茵陈蒿汤对脂肪肝脂质代谢的调节作用。实验结果显示,可根据不同的指标筛选出相应的效应组分及其最优剂量配比:由回归方程可知,降低血清 TG 含量的主效应中药为茵陈,最优剂量取范围内最大值 0.3 g,换算为成人剂量约为 18 g;而降低肝组织 TG 含量的主效应中药为栀子,最优剂量取范围内最大值 0.15 g,即相当于成人剂量 9 g;而茵陈和大黄均有显著减低血清 LDL 含量的作用,其疗效以取茵陈 0.3 g(成人 18 g)+ 大黄 0.15 g(成人 9 g) 最优。这表明茵陈蒿汤具有显著的调节脂肪代谢作用,且不同调节途径存在相应的效应组分及最优配伍组合,这可能是中药复方多环节药效特点的理论依据。

参考文献:

[1] Kashi MR, Torres DM, Harrison SA. Current and emerging therapies in nonalcoholic fatty liver disease[J]. Semin Liver Dis, 2008, 28(4): 396-406.

[2] 刘成海,季光,胡义扬. 脂肪肝的中西医治疗[M]. 上海:上海中医药大学出版社,2004: 81-82.  
 [3] Tessari P, Coracina A, Cosma A, et al. Hepatic lipid metabolism and nonalcoholic fatty liver disease[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009, 19(4): 291-302.  
 [4] 王灵台. 中西医结合治疗非酒精性脂肪肝现状的思考[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(12): 1061-1063.  
 [5] 贾孟辉,和晓春,贺晓慧. 茵陈蒿汤加味治疗脂肪肝 58 例[J]. 陕西中医, 2006, 12(12): 312-313.  
 [6] 钟燕春. 中医药治疗脂肪肝进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(2): 64.  
 [7] 梁惠卿,陈少东,张其清,等. 茵陈蒿汤防治大鼠非酒精性脂肪肝的实验研究[J]. 光明中医, 2009, 24(2): 212.  
 [8] 陆再英,钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2009: 435-436.  
 [9] 叶方,杨光义,黄良永,等. 均匀设计法优选房陵参水溶性成分提取工艺[J]. 医药导报, 2010, 29(11): 1469-1472.  
 [10] 高鹏,安宁飞,赵明宏,等. 均匀设计在丹心痛最佳配比筛选中的应用[J]. 中草药, 2003, 34(2): 123-125.  
 [11] 陈少东,胡义扬,冯琴,等. 基于均匀设计的祛湿化痰复方抗脂毒性作用的主效应中药分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(5): 422-426.

[收稿日期] 2010-05-19

## 退热解毒灵抑制甲型 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 流感病毒的体外实验

苏文<sup>1,2</sup>, 徐辉甫<sup>1,2</sup>, 黄浩<sup>1,2</sup>, 涂晋文<sup>2</sup> (1. 湖北中医药大学附属武汉市中西医结合医院, 湖北 武汉 430022; 2. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065)

[摘要] 目的:观察退热解毒灵水煎剂抑制 2009 年新型甲型 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 流感病毒的效果。方法:采用 MTT 法及细胞病变抑制实验,以利巴韦林为阳性对照,检测退热解毒灵水煎剂对 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 流感病毒的抑制作用。结果:退热解毒灵水煎剂对体外试验中 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 流感病毒有一定的抑制作用,其半数中毒质量浓度为 8 954.3 mg·L<sup>-1</sup>, 抑制 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 流感病毒的半数有效质量浓度为 520.6 mg·L<sup>-1</sup>, 治疗指数为 17.2。结论:退热解毒灵水煎剂在体外实验中,对 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 流感病毒有抑制作用。

[关键词] 退热解毒灵水煎剂; 甲型 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> 流感病毒; 抑病毒作用; 细胞病变效应

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)04-0277-03

## Study on the inhibitory effect of decoction of Tuirejieduling on H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> influenza virus *in vitro*

SU Wen<sup>1,2</sup>, XU Huifu<sup>1,2</sup>, HUANG Hao<sup>1,2</sup>, TU Jiwu<sup>2</sup> (1. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Integrative Medicine Hospital of Wuhan City, Hubei Wuhan 430022, China; 2. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Hubei Wuhan 430065, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the antiviral effect of decoction of tuirejieduling on pandemic 2009 H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> influenza virus. **METHODS** The anti H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> influenza virus effect of decoction of Tuirejieduling in MDCK cell culture was investigated by the cytopathic effect (CPE) inhibition assay and MTT assay, with ribavirin as the positive control drug. **RESULTS** Decoction of Tuirejieduling had inhibitory effect on H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> influenza virus in a certain extent *in vitro*. The median toxic concentration (TC<sub>50</sub>) was 8 954.3 mg·L<sup>-1</sup>, the median effective concentration (EC<sub>50</sub>) was 520.6 mg·L<sup>-1</sup> and the therapeutic index (TI) was 17.2.

**CONCLUSION** Decoction of Tuirejieduling has inhibitory effect on H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> influenza virus *in vitro*.

**KEY WORDS:** decoction of Tuirejieduling; H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> influenza virus; antiviral effect; cytopathic effect