

· 论著 ·

基于均匀设计的祛湿化痰方防治脂肪肝不同作用环节的主效应中药剖析

陈少东^{1,2}, 冯琴¹, 彭景华¹, 许丽莉¹, 胡义扬¹

(¹上海中医药大学附属曙光医院上海中医药大学肝病研究所, 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海市高校中医内科学E-研究院, 上海 201203; ²厦门大学医学院, 厦门 361005)

摘要: 目的: 以对实验性脂肪肝有显著防治作用的祛湿化痰方为切入点, 探索中药复方多途径、多环节药理作用的相应物质基础的研究方法。方法: 采用CCl₄复合高脂低蛋白饮食诱导的大鼠脂肪肝模型, 运用“均匀设计法”, 根据复方中的5味中药(茵陈、栀子、虎杖、田基黄、姜黄), 选用U11(1110)表进行组方设计所得10种组合进行干预, 分别以肝甘油三酯(triglyceride, TG)、血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、丙二醛(malonyl-dialdehyde, MDA)为不同病理环节的考察指标, 根据回归方程获得针对上述不同指标所提示的最佳效应中药或某种配伍组合, 并根据其提示的效应中药或组合, 重新分组实验进行验证。结果 回归方程显示, 降低肝脏TG的最佳效应组合是茵陈0.07g、田基黄0.05g、栀子0.17g、姜黄0.03g, 降低ALT的最佳效应组合是茵陈0.33g、虎杖0.25g、田基黄0.25g、姜黄0.17g。而针对MDA未获得回归方程。验证实验证实了上述“筛选”结果的可靠性。结论: 均匀设计是可靠的剖析某一病理环节主效应中药或配伍组合的分析方法; 在整体实验水平, 针对某一指标环节的最佳效应中药仍以中药配伍组合方式出现, 也说明了中药配伍复方针对复杂病理变化的科学性。

关键词: 祛湿化痰方; 脂肪肝; 均匀设计; 效应中药

基金资助: 国家自然科学基金项目(No.30672635), 上海市优秀学科带头人计划项目(No.06XD14018), 上海市重点学科建设项目(No.Y0302), 上海高校创新团队建设项目(第1期)

Research of effects of main herbs in Qushi Huayu Decoction on adiposis hepatica based on uniform design

CHEN Shao-dong^{1,2}, FENG Qin¹, PENG Jing-hua¹, XU Li-li¹, HU Yi-yang¹

(¹ShuGuang Hospital Affiliated to Shanghai Chinese Medical University, Institute of Liver Disease of Shanghai Chinese Medical University, Shanghai 201203, China; ²Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Objective: To investigate the analysis method of basic material for multi-channels and multi-links pharmacologic action of complex prescription on basis of study effect of Qushi Huayu (QSHY) Decoction on adiposis hepatica. Methods: The adiposis hepatica model was induced by CCl₄ with high fat and low protein diet. Apply the uniform design U11 (1110) form for QSHY Decoction. Different decoctions groups were added with medicine respectively. The following indexes were detected: triglyceride (TG), alanine aminotransferase (ALT) and malonyl dialdehyde (MDA). Results: The content of TG decreased markedly in groups based on Artemisia capillaris Thunb. 0.07g, Gardenia jasminoides Ellis 0.17g, hypericum japonicum Thunb. 0.05g and curcuma 0.03g. While the activity of ALT decreased markedly in groups based on Artemisia capillaris Thunb. 0.33g, Giant knotweed rhizome 0.25g, hypericum japonicum Thunb. 0.25g and curcuma 0.17g. The QSHY Decoction group can decrease the content of MDA. Conclusion: Uniform design was a reliable method for main effects Chinese medicine analysis of a pathological aspect or for compatibility analysis. The results showed that the Chinese medicine produced the best effect as the compatible forms, it indicated the compatibility of Chinese medicine complex prescription was scientific.

Key words: Qushi Huayu Decoction; Adiposis hepatica; Uniform Design; Effective herbs

Fund assistance: National Natural Science Foundation (No.30672635), Alma Plan of Excellent Subject in Shanghai (No. 06XD14018), Construction of the Key Subjects Program of Shanghai(No.Y0302) and Construction of Innovation Team in Colleges and Universities of Shanghai(The first stage)

中药复方具有多途径、多环节的作用特点,是中药复方综合治疗复杂性疾病的特色和优势所在。因此,进一步剖析以及如何剖析中药复方不同作用途径的主要中药或主要物质基础,即揭示中药复方药理功能与其物质基础关系,对中药复方理论进行

深入的诠释,具有重要意义。笔者曾以对实验性脂肪肝有显著防治作用的祛湿化痰方(茵陈、栀子、虎杖、田基黄、姜黄5味中药组成)^[1-2]为切入点,在体外实验中运用均匀设计方法发现了方中茵陈是该方抗脂毒性的主效应中药,提示可用均匀设计来剖析中

通讯作者: 胡义扬, 上海市浦东新区张衡路528号肝病楼南一楼肝病研究所, 邮编: 201203, 电话: 021-51328888-8111, 传真: 021-51328500
E-mail: yuhuliven@163.com

药复方不同作用途径的主要中药或主要物质基础^[3]。

为此,本文进一步从大鼠脂肪肝模型的整体实验水平,从已证实的祛湿化痰方抗实验性脂肪肝的改善脂质代谢、抗炎症损伤、抗脂质过氧化等不同作用环节为切入点,探索均匀设计法在剖析中药复方不同作用途径效应中药或组合中的意义。

材料和方法

1. 材料

1.1 实验动物 Wistar雄性大鼠121只,清洁级,购自中国科学院上海实验动物中心,合格证号:SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药物 茵陈、虎杖、姜黄、田基黄、栀子5味中药组成祛湿化痰方,购自上海华浦中药饮片有限公司。

1.3 主要试剂 四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)购自中国医药集团上海化学试剂公司,批号:No.2006100331。甘油三酯(TG)试剂盒购自浙江东瓯生物工程有限公司,批号:No.2007110332。谷丙转氨酶(ALT)、丙二醛(MDA)、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、苏木素染料购自南京建成生物制品研究所。

1.4 主要仪器 轮转切片机(RM2035)、LEICA ASP300自动脱水机、LEICA EG1160石蜡包埋机均购自德国Leica公司。低温高速离心机(1.0R),德国Heraeus公司制造。M5多功能酶标仪,美国Molecular Devices公司产品。ALT试剂盒(批号:2007110332),MDA试剂盒(批号:2007110335),考马斯亮蓝蛋白测定试剂(批号:2007110337)。

2. 方法

2.1 模型制备 参见文献^[2]方法进行。

2.2 均匀设计实验方案 根据均匀设计方案^[4],选用U11(11¹⁰)表,将方中5味中药作为考察因子,以 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 分别代表茵陈、虎杖、田基黄、栀子、姜黄,每个因子各取10个水平(水平为100g大鼠每日给药量),分别为 X_1 在0.07-0.33g, X_2 、 X_3 在0.05-0.25g, X_4 、 X_5 在0.03-0.17g的剂量范围内,两两重复递增5次。根据U11(11¹⁰)使用表安排各因子和水平,进行组方设计。见表1。

2.3 分组与用药

2.3.1 “筛选”实验 Wistar雄性大鼠76只,体质量(150±5)g,鼠龄6周。自造模之日起,按计算机随机数字表,将大鼠分为正常组6只、造模组70只,2周后,将造模组随机分为模型组10只、均匀设计组1-组10(各6只)。均匀设计各组按1mL/100g鼠质量分别灌服相应药物。

表1 均匀设计实验方案

组方号	茵陈(X_1)	虎杖(X_2)	田基黄(X_3)	栀子(X_4)	姜黄(X_5)	生药量(g/mL)
组1	0.07g	0.05g	0.10g	0.10g	0.13g	0.45
组2	0.07g	0.10g	0.15g	0.17g	0.07g	0.55
组3	0.13g	0.15g	0.25g	0.07g	0.17g	0.77
组4	0.13g	0.20g	0.05g	0.17g	0.10g	0.65
组5	0.20g	0.25g	0.10g	0.07g	0.03g	0.65
组6	0.20g	0.05g	0.20g	0.13g	0.17g	0.75
组7	0.27g	0.10g	0.25g	0.03g	0.10g	0.75
组8	0.27g	0.15g	0.05g	0.13g	0.03g	0.63
组9	0.33g	0.20g	0.15g	0.03g	0.13g	0.85
组10	0.33g	0.25g	0.20g	0.10g	0.07g	0.95

2.3.2 “验证”实验 Wistar雄性大鼠45只,体质量(200±6)g,鼠龄7周。将大鼠分为正常组6只、造模组39只。造模第3周起,将造模组随机分为模型组11只、药物组28只(祛湿化痰方组10只、针对ALT的中药配伍组9只、针对TG的中药配伍组9只),药物组按1mL/100g鼠质量分别灌服相应药物。

2.4 检测项目与方法 取肝组织和血清标本进行肝组织甘油三酯(TG)含量、血清ALT活性、肝组织MDA含量、肝组织HE染色等检测,检测方法均参见文献^[1]。

3. 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。计量资料均写成 $\bar{x} \pm s$ 形式。组间比较采用单因素方差分析Q检验。“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)。

结果

1. “筛选”实验

1.1 各组大鼠一般情况的变化 造模过程中,模型组及均匀设计组1、组2各有2只大鼠,组3、组4、组6、组8各有1只大鼠因意外因素死亡。

1.2 针对TG、ALT、MDA等变化的效应中药分析 表2为根据均匀设计表所设计的各组实验结果(均值),经多元逐步回归分析(见表3),结果显示:针对脂质代谢关键指标(TG)和炎症损伤关键

表2 均匀设计各组大鼠肝组织TG、MDA含量和血清ALT活性均值

组方号	n	TG(mg/g)	ALT(U/L)	MDA(nmol/mgprot)
组1	4	82	102	12.8
组2	4	58	87	18.3
组3	5	129	60	11.7
组4	5	70	112	11.0
组5	6	94	120	13.0
组6	5	112	97	12.8
组7	6	138	66	13.4
组8	5	75	126	11.7
组9	6	124	65	10.2
组10	6	112	64	10.9

表3 根据TG、MDA、ALT检测的均匀设计逐步回归分析结果

指标	回归方程	最佳配伍提示
TG	$YTG=103+6069x_1+3x_2+5-246x_4$	茵陈0.07g+田基黄0.05g+栀子0.17g+姜黄0.03g
ALT	$YALT=130-183x_3-26556x_1+2x_3+5$	茵陈0.33g+虎杖0.25g+田基黄0.25g+姜黄0.17g
MDA	未获得回归方程	

指标(ALT)获得回归方程,提示最大限度降低肝组织内TG含量的效应中药及其剂量是茵陈0.07g,田基黄0.05g,姜黄0.03g,栀子0.17g。而最大限度降低血清ALT活性的效应中药及其剂量是茵陈0.33g,虎杖0.25g,田基黄0.25g,姜黄0.17g。但针对过氧化损伤产物指标(MDA)未获得相应的回归方程。

2. “验证”实验

2.1 各组大鼠一般情况的变化 造模过程中,模型组、祛湿化痰方组、针对TG的中药配伍组各有2只大鼠,针对ALT的中药配伍组有1只大鼠因意外因素死亡。

2.2 各组对脂质代谢指标TG的影响 祛湿化痰方组、针对TG的中药配伍组的肝组织TG含量显著低于模型组($P<0.05$)。针对ALT的中药配伍组对TG仅有下降趋势(见表4)。

表4 根据回归方程最佳配伍提示的分组验证结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TG(mg/g)	ALT(U/L)	MDA(nmol/mgprot)
正常组	6	13.0±6.0	35.0±2.0	10.1±1.9
模型组	9	100.5±30.0	127.0±22.0	18.7±2.7
祛湿化痰方组	8	73.0±29.0	88.0±45.0	14.2±3.5
针对ALT的中药配伍组	8	116.0±13.0	97.0±30.0	19.5±3.1
针对TG的中药配伍组	7	69.0±20.0	127.0±18.0	16.8±5.1

注:与正常组比较, $P<0.01$;与模型组比较, $P<0.05$, $^{*}P<0.01$ 。

2.3 各组对炎症损伤指标ALT的影响 祛湿化痰方组、针对ALT的中药配伍组的血清ALT活性显著低于模型组($P<0.05$)。但针对TG的中药配伍组却无此效(见表4)。

2.4 各组对脂质过氧化损伤指标MDA的影响 药物组中仅祛湿化痰方组的MDA含量显著低于模型组($P<0.05$)(见表4)。

2.5 各组大鼠肝组织HE染色的变化 依据非酒精性脂肪肝诊疗指南^[3],模型组大鼠肝脏脂肪变性明显,肝细胞肿大变圆,胞浆疏松,内含大的脂肪滴,部分细胞可见细胞核挤向胞膜,呈以大泡性为主的脂肪变性,并可见广泛的气球样肝细胞及点灶状坏死,为典型的F4/G3表现。祛湿化痰方组大鼠脂肪变性及炎症反应较模型组明显减轻,以F2-F3/G1-G2表现为主;针对TG的中药配伍组炎症反应较模型组有所减轻,但以脂肪变性减轻改变最为显著,为F2-F3/G2表现;针对ALT的中药配伍组炎性细胞浸润明显减少,而脂滴数量仍多,为F3-F4/G1表现。

讨论

中药复方多途径药理效应的物质基础是有待深入研究的课题,其方法学是一大关键。笔者既往研究已发现祛湿化痰方对单纯高脂饮食诱导以及CCl₄复合高脂低蛋白饮食诱导的大鼠脂肪肝及其炎症有显著的防治作用,其机制与改善脂质代谢、抗脂质过氧化损伤等机制有关。并成功运用均匀设计法进行了祛湿化痰方抗FFA诱导HepG₂细胞肝脂毒性主效应中药的研究^[3],筛选出茵陈是其抗肝脂毒性作用的主效应中药。本研究继续运用均匀设计法,从整体实验层面选择TG、ALT、MDA分别作为脂质代谢、炎症损伤、脂质过氧化等不同环节的筛选分析指标。实验结果提示,运用“均匀设计法”通过多元逐步回归分析,发现针对抑制TG含量的最佳效应中药是茵陈、田基黄、姜黄、栀子的组合,而针对抑制ALT活性的最佳效应中药是茵陈、田基黄、虎杖、姜黄的配伍组合。将这筛选得到的针对肝脏脂质沉积和炎症损伤两方面的不同“主效应”中药组合进行分组用药进行再次实验,结果获得充分证实。再次表明了均匀设计法运用于复方针对不同作用环节主效应中药筛选的可靠性。

本研究也发现,与病理途径比较单一的体外细胞实验有所不同,在整体实验水平,针对某一指标环节的最佳效应中药仍以中药配伍组合方式出现。这似乎与笔者设计之初所期颐的针对某一环节“筛选到某一、二味中药”的设想相违,事实上,由于ALT、TG的变化在整体实验中仍受多方面机制的影响,因此这种“仍以配伍组合方式出现”的结果恰恰是非常合理的,从中也从一个侧面说明了中药配伍复方针对复杂病理变化的科学性。

因此,均匀设计法是可靠的剖析某一病理环节主效应中药或配伍组合的分析方法。笔者认为,运用均匀设计技术,从整体-细胞-靶点的途径和层面进行逐步深入的分析,有可能最终揭示出中药复方多途径药理作用的物质基础。

参考文献

- [1] 冯琴,张慧,胡义扬,等.祛湿化痰方对单纯高脂饮食诱导的大鼠脂肪肝的防治作用.中西医结合肝病杂志,2006,16(1):26-29
FENG Qin,ZHANG Hui,HU Yi-yang,et al.Effect of Qushi Huayu decoction on prevention and treatment of fatty liver induced by high-fat diet in rats. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases,2006,16(1):26-29
- [2] 张慧,冯琴,胡义扬,等.祛湿化痰方对CCl₄复合高脂低蛋白饮食诱导的大鼠脂肪肝的防治作用.上海中医药杂志,2006,40(3):1031-1034
ZHANG Hui,FENG Qin,HU Yi-yang,et al.Prevention and Treatment of 'Qushi Huayu Decoction' on Fatty Liver of Rats Induced by Carbon Tetrachloride Along with High-Fat and Low-

Protein Diet. Shanghai Journal of TCM,2006,40(3):1031-1034

[3] 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及其意义.中国中西医结合杂志,2008,28(5):422-426

CHEN Shao-dong,HU Yi-yang,FENG Qin,et al.Analysis Depending Uniform Design on the Major Herbs in Qushi Huayu Compound for Anti-hepatic Lipotoxicity. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2008,28(5):422-426

[4] 方开泰.均匀设计及其应用.数理统计与管理,1994,13(1):57

FANG Kai-tai.Application of Uniform Design.Application of Statistics and Management,1994,13(1):57

[5] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组.非酒精性脂肪性肝病诊疗指南.中华肝脏病杂志,2006,14(3):161-163

Fatty Liver and Alcoholic Liver Disease Study Group of Hepatopathythe Branch of Chinese Medicine Academy. Guidelines for diagnosis and treatment of nonalcoholic fatty liver diseases. Chinese Journal of Hepatology,2006,14(3):161-163

(收稿日期:2009年3月16日)

· 论著 ·

白芥子挥发油提取工艺优化及其化学成分鉴定

吴圣曦, 赖兰香, 吴国欣, 南淑蕾, 程涛, 黄鹭强
 (福建师范大学生命科学学院, 福州 350108)

摘要: 目的: 优化白芥子挥发油提取工艺, 并对其化学成分进行鉴定。方法: 应用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化白芥子挥发油的提取工艺, 并以气相色谱-质谱联用法(GC-MS)联用法分析其化学成分。结果: 缓冲液pH值、抗坏血酸浓度对白芥子挥发油得率的影响达到了极显著水平, 水解温度对得率的影响也达到了显著水平, 影响程度从大到小依次是缓冲液pH值>抗坏血酸浓度>水解温度; GC-MS联用共分离出10个峰, 鉴定出7种成分, 占挥发油总量的99.999%, 主要组成为异硫氰酸烯丙酯(89.411%)、异硫氰酸-3-丁烯酯(7.364%)、3-丁烯腈(1.275%)。结论: 最佳提取条件为水解温度50、缓冲液pH值为5.0、抗坏血酸浓度为0.5mmol/L, 挥发油提取率可达0.164%, 且此工艺稳定可行。所提取的白芥子挥发油中大部分为异硫氰酸盐类, 并含有少量醛类、醚类和腈类物质。

关键词: 白芥子; 挥发油; 正交实验; 提取工艺; 化学成分

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(No.C0410010), 福建省科技厅科技项目基金(No.2008F5017)

Optimizing extraction process of volatile oil from Semen Sinapis Albae and analyzing its chemical components

WU Sheng-xi, LAI Lan-xiang, WU Guo-xin, NAN Shu-lei, CHENG Tao, HUANG Lu-qiang

(The College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Abstract: Objective: To optimize the extraction process of the volatile oil from Semen Sinapis Albae by orthogonal test, and analyze the chemical components of the volatile oil. Methods: The optimum extraction condition was investigated by the orthogonal design $L_9(3^4)$, and the chemical components of the volatile oil were analyzed by GC-MS. Results: The influence of the pH value of buffer solution and the concentration of ascorbic acid was significantly, and the influence of the hydrolysis temperature was also obviously (from great to little): the pH value of buffer solution > the concentration of ascorbic acid > the hydrolysis temperature. 7 Components had been identified from 10 separated peaks, these accounted for 99.999% of the total volatile oil. The main components were Allyl isothiocyanate (89.411%), 3-Butenyl isothiocyanate (7.364%) and 3-Butenenitrile (1.275%). Conclusion: The optimum extraction conditions were: hydrolysis temperature 50, pH value of buffer solution 5.0, concentration of ascorbic acid 0.5mmol/L. The yield rate of the volatile oil of this process can reach 0.164%, and this process was stable and feasible; the main components of the volatile oil were isothiocyanates, and the volatile oil also contained a small amount of aldehydes, ethers and nitriles.

Key words: Semen Sinapis Albae; Volatile oil; Orthogonal test; Extraction process; Chemical components

Fund assistance: Natural Science Foundation of Fujian (No.C0410010), Science and Technology Program Foundation of Fujian (No.2008F5017)

通讯作者: 吴国欣, 福建师范大学生命科学学院旗山校区理工楼12号楼305室, 邮编: 350108, 电话: 0591-83431462
 E-mail: gxwu@fjnu.edu.cn