

李晶晶,王思芦,李金婷,等. 小柴胡汤及其拆方对体外四氯化碳致肝细胞损伤的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(16):217-221.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.16.043

小柴胡汤及其拆方对体外四氯化碳致肝细胞损伤的影响

李晶晶,王思芦,李金婷,刘凯,肖文渊

(西昌学院动物科学学院,四川西昌 615013)

摘要:为探究小柴胡汤及其拆方对肝细胞损伤的影响,建立四氯化碳(CCl_4)致急性肝细胞损伤体外模型;给药后用 ELISA 试剂盒检测培养基中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸基转移酶(AST)、丙二醛(MDA)的含量和 MTT 法检测细胞活率。结果表明,小柴胡汤及其组成成分中黄芩对 CCl_4 损伤的肝细胞保护效果最好,其次是柴胡、党参;小柴胡汤优化试验结果表明,保肝效果 2 号方剂高浓度组最好。对小柴胡汤及其拆方的抗肝细胞损伤效果进行探讨分析,研究结果表明,2 号方剂高浓度组可减缓 CCl_4 致肝细胞损伤,培养基中 ALT、AST、MDA 水平显著降低,有效减轻了 CCl_4 所致的肝细胞病理损伤,对抗化学性肝细胞损伤具有辅助保护功能。

关键词:中药;四氯化碳(CCl_4);肝损伤;小鼠肝细胞;小柴胡汤

中图分类号: S853.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)16-0217-05

小柴胡汤出自张仲景《伤寒论》,由柴胡 45 g、黄芩 45 g、党参 45 g、半夏 30 g、炙甘草 15 g、生姜 20 g、大枣 60 g 组成^[1],是人医临床上用于治疗肝硬化、肝纤维化、肝癌等肝病的经典名方。现代研究表明,小柴胡汤通过抵御肝功能减弱和四氯化碳(CCl_4)、乙醇诱导的肠-肝-脑损伤和炎症,降低了四氯化碳、乙醇诱发小鼠肝癌时的死亡率和肝癌发生率^[2]。孙兰等研究表明,中药小柴胡汤对小鼠硫代乙酰胺、醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性增加均有一定的抑制作用^[3];加味小柴胡汤对小鼠肝损伤有明显的保护作用,是通过显著地降酶、抗氧化、抑制脂质过氧化及调节体内免疫功能发挥其抗肝损伤作用^[4]。在兽医临床上多种致病因子容易引起肝细胞损伤,如肝炎病毒、细菌、寄生虫和工业污染中的 CCl_4 等都可直接或间接造成肝小叶坏死,严重的可引起肝功能衰竭、营养失衡等。肝损伤直

接影响动物的消化功能,可导致动物消化不良、食欲减退、脂类代谢障碍等,更容易继发其他疾病,如脂肪肝、感染性疾病、肝硬化、肝坏死、肝癌等,直接造成畜禽养殖户的经济损失^[5]。小柴胡汤是人医临床治疗多种肝脏疾病的经典名方,现为将其开发成兽医临床上抗肝损伤有效、低成本的中兽药,对其进行拆方。首先在 7 味中药中找到保肝药效较好的几味药材,再重新组合,并对其抗急性体外肝细胞损伤效果进行分析探讨,旨在为该方剂在兽医临床上应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

柴胡(CH)、黄芩(HQ)、党参(DS)、半夏(BX)、甘草(GC)、生姜(SJ)、大枣(DZ)(购自西昌市长安大药房);小鼠肝细胞(NCTC 1469)、RPMI-1640 培养基、胰酶、PBS、胎牛血清、青链霉素混合液(购自武汉普诺赛生命科技有限公司);四甲基噻唑蓝(MTT)(购自上海碧云天生物技术有限公司);二甲基亚砜(DMSO)、四氯化碳、生理盐水(购自成都市科龙化工试剂厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 小鼠肝细胞株(NCTC 1469)的培养 将冷冻保存的 NCTC 1469 复苏后,以 1640 完全培养基

收稿日期:2019-09-19

基金项目:国家级“大学生创新创业训练计划”(编号:201810628020);四川省科技厅应用基础研究项目(编号:2017JY0108)。

作者简介:李晶晶(1997—),女,四川资阳人,主要从事中兽医学研究。E-mail:2690348346@qq.com。

通信作者:王思芦,博士,副教授,主要从事兽医药理学研究。E-mail:157943181@qq.com。

(含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液) 培养于细胞培养瓶中, 在 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养, 隔天换液。当细胞长至单层, 以 PBS 洗 3 遍, 再用 1 mL 0.25% 胰酶消化 1.5 min, 吹打成单个细胞悬液后计数并调节数量为 1.5×10^5 个/mL。在 96 孔细胞培养板的每孔中加细胞悬液 100 μ L, 48 孔细胞培养板的每孔中加细胞悬液 500 μ L, 放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后用于以下试验。

1.2.2 CCl₄ 致肝细胞损伤体外模型的建立

1.2.2.1 CCl₄ 诱导肝细胞损伤单因素试验 CCl₄ 和 DMSO 用 0.45 μ m 针式过滤器过滤后等比例混合, 取混合物以培养基 10 倍稀释至第 3 管, 从第 4 管以 2 倍稀释至第 6 管, 得到 6 个不同 CCl₄ 终浓度, 分别为 160.0、16.0、1.6、0.8、0.4、0.2 mg/mL, 按“1.2.1”节方法进行细胞培养, 经 48 h 长至 85% 96 孔细胞培养板旧培养基弃去, 将含以上 6 个不同浓度的含 CCl₄ 培养基每孔 100 μ L 加入培养板, 每个浓度 6 个重复, 另设 6 个孔只加完全培养基作空白组, 培养 24 h 后, 检测细胞活率, 即每孔加 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT PBS 溶液继续培养 4 h 后, 弃去培养基, 每孔加 200 μ L DMSO 在微量振荡器上振荡 15 min, 用酶标仪测 490 nm 处的吸光度代表细胞活率, $D_{490\text{ nm}}$ 值越大, 细胞活率越高。

1.2.2.2 DMSO 对肝细胞使用剂量的安全检测

DMSO 采用 0.45 μ m 针式过滤器过滤, 用培养基将 DMSO 配成 0.10%、0.08%、0.06%、0.04% 共 4 个浓度。将培养 48 h 长至 85% 96 孔细胞培养板旧培养基弃去, 混匀含 DMSO 的培养基并迅速加液, 每孔 100 μ L, 每个浓度 6 个重复, 另设 6 个孔加完全培养基作空白组, 培养 24 h 后检测细胞活率。

1.2.2.3 CCl₄ 引起肝细胞损伤的 2 因子 4 水平正交试验 该试验是为了筛选出 CCl₄ 诱导肝细胞损伤的最佳作用浓度和作用时间组合。CCl₄ 和 DMSO 等体积混合后用 0.45 μ m 针式过滤器过滤, 用培养基将 CCl₄ 配成 1.6 mg/mL (0.10%)、1.3 mg/mL (0.08%)、0.9 mg/mL (0.06%)、0.6 mg/mL (0.04%) 共 4 个浓度。将培养 48 h 长至 85% 的 96 孔细胞培养板旧培养基弃去, 用混匀含 CCl₄ 的培养基迅速加液, 每孔 100 μ L, 每个浓度 6 个重复, 6 个孔加完全培养基作空白组, 放培养箱培养 6 组为建模成功, 且可减少 CCl₄ 的用量以及培养时间。培养 6、12、18、24 h 后检测细胞活率。

并用 SPSS 21.0 软件进行分析得出 CCl₄ 浓度

与作用时间的最佳组合, 以该组合制备细胞模型的细胞活率显著低于空白对照。

1.2.3 小柴胡汤及其拆方对体外 CCl₄ 致肝细胞损伤的影响

1.2.3.1 8 种水煎剂的制备 采用常规煎煮法^[2] 分别制备小柴胡汤全方及其各味药材的共 8 种水煎剂, 以 g(生药质量)/mL 表示各水煎剂母液的浓度。

1.2.3.2 8 种水煎剂对肝细胞最大安全浓度测定

将 8 种水煎剂以 0.45 μ m 滤膜过滤后, 采用细胞培养液将各中药的水煎液通过 2 倍稀释成 6 个不同浓度。取 8 个 96 孔板, 分别用于检测 8 种水煎剂的以上浓度对肝细胞活率的影响。各培养板按“1.3.1”节的方法分别接种等量细胞, 培养 48 h 后, 弃去旧培养基, 每个板加入一种水煎剂, 每个浓度 6 次重复, 每个孔加 100 μ L 含药培养基; 每个细胞培养板设 6 个孔加 100 μ L 纯培养基为空白组。常规培养 24 h 后, 按“1.2.2.1”节检测细胞活率。

1.2.3.3 8 种水煎剂对体外 CCl₄ 致肝细胞损伤的影响 以正交试验筛选出的 CCl₄ 浓度及作用时间制备出体外肝细胞损伤模型, 将“1.2.3.2”节筛出的各最大安全浓度的水煎剂以含 CCl₄ 的培养基 2 倍稀释至第 7 管, 得到 7 个供试浓度。取 8 个培养板, 分别检测 8 个水煎剂的不同浓度对体外 CCl₄ 致肝损伤的影响, 每个浓度设 6 个重复, 同时设有空白组和模型组。按“1.2.2.1”节检测细胞活率。

1.2.4 优化小柴胡汤对体外 CCl₄ 致肝细胞损伤的保护作用 将“1.2.3.3”节筛选出的最佳有效浓度的小柴胡汤水煎剂设为 1 号供试液; 将“1.2.3.3”节筛选出与模型组比有显著差异的单味中药按原方比例混合药材后, 按“1.2.3.1”节制备水煎剂设为 2 号供试液; 将“1.2.3.3”节中各单味药的最佳有效浓度等比例混合后设为 3 号供试液。各供试液用含与“1.2.3.3”节相同浓度的含 CCl₄ 培养基 2 倍稀释成高中低 3 个浓度。取 1 个 48 孔细胞培养板, 接种细胞培养 48 h 后, 弃去原培养基, 设空白组、模型组、3 个供试液不同浓度共 11 个组, 每个组 4 个重复, 其中空白组加 500 μ L 培养基, 模型组加 500 μ L 含 CCl₄ 的培养基, 其余各组分别加入不同浓度供试液的含 CCl₄ 培养基。按“1.2.2.1”节方法检测细胞活率, 并收集培养液, 用 ELISA 试剂盒检测培养液中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和丙二醛 (MDA) 含量的变化。

1.2.5 数据处理与分析 采用 SPSS 21.0 软件对

结果进行统计分析,所有数据采用“均数 ± 标准差”表示,各组数据间进行方差多重比较,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 CCl₄ 诱导肝细胞损伤单因素试验

由表 1 可知,160.0 mg/mL CCl₄ 组、16.0 mg/L CCl₄ 组的细胞活率显著低于空白组 ($P < 0.05$),表明 160.0 ~ 16.0 mg/mL CCl₄ 会对肝细胞造成明显的损伤;1.6 mg/mL CCl₄ 组细胞活率与空白组和 16.0 mg/mL CCl₄ 组细胞活率均无显著性差异,为“1.2.2.3”节试验使用的 CCl₄ 浓度提供参考。

表 1 CCl₄ 对肝细胞毒性试验结果

| 组别 | $D_{490\text{ nm}}$ |
|------------------------------|---------------------|
| 空白组 | 0.099 ± 0.026bc |
| 160.0 mg/mL CCl ₄ | 0.009 ± 0.007a |
| 16.0 mg/mL CCl ₄ | 0.041 ± 0.019a |
| 1.6 mg/mL CCl ₄ | 0.049 ± 0.018ab |
| 0.8 mg/mL CCl ₄ | 0.087 ± 0.039bc |
| 0.4 mg/mL CCl ₄ | 0.091 ± 0.057bc |
| 0.2 mg/mL CCl ₄ | 0.126 ± 0.087c |

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。表 2 同。

2.2 DMSO 对肝细胞使用剂量的安全检测

由表 2 可知,与空白组相比,各试验组不同浓度的 DMSO 对肝细胞活率的影响均无显著性差异,表明 DMSO 的使用浓度对肝细胞无损伤作用,只有助溶效果,为试验“1.2.2.3”节提供参考。

表 2 DMSO 的毒性试验结果

| 组别 | $D_{490\text{ nm}}$ |
|------------|---------------------|
| 空白组 | 0.151 ± 0.033a |
| 0.04% DMSO | 0.148 ± 0.015a |
| 0.06% DMSO | 0.152 ± 0.031a |
| 0.08% DMSO | 0.147 ± 0.015a |
| 0.10% DMSO | 0.150 ± 0.010a |

2.3 正交试验结果

由表 3 至表 5 可知,由Ⅲ型平方和比较可知,影响因素中 CCl₄ 浓度和培养时间对体外 CCl₄ 致肝细胞损伤模型都具有显著性影响,2 个因素的主次关系是 CCl₄ 浓度 > 培养时间,最佳组合应为 A₂B₄。试验组 $D_{490\text{ nm}}$ 显著低于空白组,表明肝细胞体外损伤模型建模成功。经过正交试验优化的肝细胞损伤模型中 CCl₄ 浓度为 1.3 mg/mL,培养时间为 24 h。

表 3 正交试验因素水平

| 水平 | CCl ₄ 浓度 (mg/mL) | 培养时间 (h) |
|----|--------------------------------|-------------|
| 1 | 1.6 | 6 |
| 2 | 1.3 | 12 |
| 3 | 0.9 | 18 |
| 4 | 0.6 | 24 |

表 4 正交试验主体间效应的检验

| 源 | Ⅲ型平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 |
|---------------------|-------|-----|-------|---------|-------|
| 校正模型 | 0.024 | 7 | 0.003 | 3.754 | 0.022 |
| 截距 | 0.844 | 1 | 0.844 | 908.735 | 0.000 |
| 培养时间 | 0.011 | 3 | 0.004 | 3.812 | 0.040 |
| CCl ₄ 浓度 | 0.014 | 4 | 0.003 | 3.711 | 0.034 |
| 误差 | 0.011 | 12 | 0.001 | | |
| 总计 | 0.879 | 20 | | | |
| 校正总计 | 0.036 | 19 | | | |

表 5 正交试验结果

| CCl ₄ 浓度 (mg/mL) | $D_{490\text{ nm}}$ | 培养时间 (h) | $D_{490\text{ nm}}$ |
|--------------------------------|---------------------|-------------|---------------------|
| 1.6 | 0.185 | 6 | 0.229 |
| 1.3 | 0.178 | 12 | 0.218 |
| 0.9 | 0.207 | 18 | 0.206 |
| 0.6 | 0.215 | 24 | 0.168 |

2.4 小柴胡汤及其拆方后 8 种水煎剂对肝细胞的最大安全浓度

由表 6 可知,组成小柴胡汤的 7 味药材中,安全浓度最大的是半夏 (BX),安全浓度最小的是黄芩 (HQ)。

表 6 8 种水煎剂的最大安全浓度

| 药名 | 最大安全浓度 (mg/mL) |
|------|----------------|
| XCHT | 20 |
| CH | 15 |
| HQ | 2 |
| DS | 19 |
| GC | 12 |
| BX | 310 |
| SJ | 89 |
| DZ | 10 |

2.5 8 种水煎剂对 CCl₄ 致肝细胞损伤的影响

由表 7 可知,空白组细胞活性显著高于模型组细胞活性,表明体外肝细胞损伤模型建立成功。CH 组、HQ 组的细胞活性显著高于模型组细胞活性;XCHT 组、DS 组、GC 组、BX 组的细胞活性极显著高

于模型组,结果表明黄芩保肝效果最好,与模型组相比较细胞活率提高 54.5%,其次是柴胡、党参;除了生姜和党参,其余各水煎剂对损伤的肝细胞有保护作用。

| 表 7 8 种水煎剂对 CCl ₄ 损伤肝细胞活率的影响 | | |
|---|-------------------|---------------------|
| 组别 | 最佳药物浓度 (μg/mL) | D _{490 nm} |
| 空白组 | — | 0.178 ± 0.048 * |
| 模型组 | — | 0.134 ± 0.054 |
| XCHT | 5.0 | 0.234 ± 0.057 ** |
| CH | 5.0 | 0.203 ± 0.027 * |
| HQ | 0.2 | 0.207 ± 0.021 * |
| DS | 5.0 | 0.210 ± 0.097 ** |
| GC | 3 000.0 | 0.211 ± 0.050 ** |
| BX | 3 900.0 | 0.212 ± 0.059 ** |
| SJ | — | 0.135 ± 0.034 |
| DZ | — | 0.140 ± 0.045 |

注: *、** 分别表示同列数据与模型组比较 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 。下表同。

2.6 优化小柴胡汤对体外 CCl₄ 诱导肝细胞损伤的保护作用

由表 8 可知,空白组细胞活性与模型组差异显著,表明体外肝损伤模型建立成功。模型组肝细胞活性显著低于 1 号方剂高浓度组、2 号方剂高浓度组、3 号方剂高、中浓度组,表明以上 4 组供试药物及浓度对 CCl₄ 引起肝细胞损伤有显著的抑制作用,且 2 号方剂高浓度组对肝细胞保护效果最好。

由表 9 可知,模型组比空白组 MDA 含量升高 303.6% ($P < 0.01$),AST 含量升高 68.9% ($P < 0.01$),ALT 含量升高 57.3% ($P < 0.05$);1 号方剂高浓度组与模型组比MDA含量降低70.4% ($P <$

| 表 8 优化小柴胡汤对体外 CCl ₄ 致肝细胞损伤的保护作用 | | |
|--|-----------------|---------------------|
| 组别 | 药物浓度 (μg/mL) | D _{490 nm} |
| 空白组 | — | 0.19 ± 0.01 * |
| 模型组 | — | 0.16 ± 0.004 |
| 1 号方剂高浓度组 | 5.00 | 0.18 ± 0.01 * |
| 1 号方剂中浓度组 | 2.50 | 0.17 ± 0.02 |
| 1 号方剂低浓度组 | 1.25 | 0.16 ± 0.01 |
| 2 号方剂高浓度组 | 4.20 | 0.18 ± 0.01 * |
| 2 号方剂中浓度组 | 2.10 | 0.17 ± 0.01 |
| 2 号方剂低浓度组 | 1.10 | 0.16 ± 0.01 |
| 3 号方剂高浓度组 | 6 910.20 | 0.18 ± 0.01 * |
| 3 号方剂中浓度组 | 3 455.10 | 0.18 ± 0.01 * |
| 3 号方剂低浓度组 | 1 727.60 | 0.15 ± 0.01 |

0.01)、AST 含量降低 38.3% ($P < 0.01$)、ALT 含量降低 33.6% ($P < 0.05$);2 号方剂高浓度组与模型组相比 MDA 含量降低 73.0% ($P < 0.01$)、AST 含量降低 39.4% ($P < 0.01$)、ALT 含量降低 55.7% ($P < 0.05$),说明 2 号方剂在该浓度时也有效抑制了 CCl₄ 对肝细胞的损伤;3 号方剂高浓度组与模型组相比 MDA 含量降低 71.3% ($P < 0.01$)、AST 含量降低 37.1% ($P < 0.01$)、ALT 含量降低 39.3% ($P < 0.05$);3 号方剂中浓度组与模型组相比 MDA 含量降低了 68.4% ($P < 0.01$)、AST 含量降低 26.8% ($P < 0.01$)、ALT 含量降低了 25.8% ($P < 0.05$)。结果表明,体外肝细胞损伤模型建立成功,保肝效果 2 号方剂高浓度组 > 1 号方剂高浓度组 > 3 号方剂高浓度组 > 3 号方剂中浓度组。

3 讨论

肝脏疾病是常见病和多发病,有着发病率高、

| 表 9 优化小柴胡汤对损伤肝细胞 MDA、AST 和 ALT 的影响 | | | |
|------------------------------------|----------------|-----------------|---------------|
| 组别 | MDA 含量(nmol/L) | AST 含量(U/L) | ALT 含量(ng/L) |
| 空白组 | 3.32 ± 1.82 ** | 15.93 ± 1.56 ** | 6.26 ± 0.57 * |
| 模型组 | 13.40 ± 4.82 | 26.91 ± 3.53 | 9.85 ± 1.64 |
| 1 号方剂高浓度组 | 3.97 ± 2.57 ** | 16.61 ± 1.71 ** | 6.54 ± 1.41 * |
| 1 号方剂中浓度组 | 8.87 ± 1.13 | 23.29 ± 4.88 | 8.13 ± 1.20 |
| 1 号方剂低浓度组 | 11.89 ± 2.46 | 25.62 ± 7.11 | 8.44 ± 0.39 |
| 2 号方剂高浓度组 | 3.62 ± 2.09 ** | 16.30 ± 2.84 ** | 4.36 ± 0.86 * |
| 2 号方剂中浓度组 | 9.80 ± 3.95 | 21.89 ± 1.38 | 8.18 ± 1.15 |
| 2 号方剂低浓度组 | 11.71 ± 1.91 | 29.19 ± 1.01 | 8.62 ± 2.80 |
| 3 号方剂高浓度组 | 3.85 ± 1.78 ** | 16.92 ± 3.78 ** | 5.98 ± 1.10 * |
| 3 号方剂中浓度组 | 4.24 ± 1.17 ** | 19.71 ± 1.28 ** | 7.31 ± 2.33 * |
| 3 号方剂低浓度组 | 9.84 ± 1.35 | 23.13 ± 3.19 | 8.10 ± 1.00 |

治疗难度大、易恶化的特点,是近年来全世界临床治疗的重点和难点。多数肝疾病共有的病变结果是肝细胞的损伤,长期的肝损伤会导致脂肪肝、肝硬化、肝纤维化甚至肝癌^[6-7],所以肝病严重威胁人们的身体健康且造成直接经济损失。 CCl_4 致肝损伤经典模型常用于快速评价和筛选保肝药物^[8],当 CCl_4 损害肝细胞时不但会增加细胞膜通透性同时改变细胞膜代谢、功能和结构,对机体造成进一步损害^[9-10]。当肝细胞膜通透性升高,使得 ALT 和 AST 大量渗入细胞外液,使得培养基中 ALT 和 AST 含量突然大量升高^[11-12]。ALT 与 AST 是诊断肝脏疾病最常用的酶,其中 ALT 被世界卫生组织 (WHO) 推荐为最敏感的肝功能检测指标之一^[13]。MDA 在体内自然生成,是氧化应激的标志物,可对细胞进一步产生破坏作用。体内抗氧化系统能力的降低是脂质过氧化产生的前提,过氧化肝损伤时肝组织 MDA 含量增高,MDA 含量不仅反映了肝细胞生物膜脂质过氧化的程度,还反映了肝脏疾病的严重程度,因此可作为评价反映脂质过氧化的程度和肝损伤程度的指标^[14-15]。

本试验首次对小柴胡汤及其拆方的抗肝细胞损伤效果进行探讨分析,采用 1.3 mg/mL CCl_4 培养小鼠肝细胞 24 h 建立体外肝损模型,通过测定中药水提物 24 h 后培养基中 ALT、AST、MDA 的含量,评价不同浓度的小柴胡汤及其拆方对体外 CCl_4 致肝细胞损伤的保护作用。结果表明,2 号方剂高浓度组 (4.2 $\mu\text{g/mL}$) 与其拆方中黄芩 (0.2 $\mu\text{g/mL}$)、柴胡 (5.0 $\mu\text{g/mL}$) 水提物可减轻 CCl_4 致肝细胞损伤,培养基中 ALT、AST、MDA 水平显著或极显著降低,有效减轻化学性毒物所致的肝细胞病理性损伤,对抗化学性肝损伤具有辅助保护功能,其机制可能与中药提取物抑制转氨酶、稳定细胞膜的结构、抗氧化及清除自由基等作用有关。本试验用 8 mmol/mL CCl_4 损伤小鼠肝细胞建立体外肝损模型,在检测 CCl_4 毒性试验时,由于 CCl_4 不溶于培养基,采用等体积的 DMSO 助溶,检测后设定可正交试验需要 CCl_4 的浓度,所以 DMSO 的毒性试验只需要检测需要 DMSO 浓度的毒性,其结果表明实验组与对照组差异不显著,正交试验细胞的损伤均由 CCl_4 造成。通过测定给药 24 h 后培养基中 ALT、AST、MDA 的含量,评价不同浓度的小柴胡汤与其拆方对体外 CCl_4 致肝损伤的保护作用。在建模过程使用更少的 DMSO 助溶,减少了化学药物的使用,既节约了

能源又减轻了环境的负担,培养 24 h 能有效缩短培养时间并能达到相同的试验目的。小柴胡汤与其拆方水提物可减轻 CCl_4 致肝损伤,培养基中 ALT、AST、MDA 水平显著降低,有效减轻了化学性毒物所致的肝组织病理损伤,对化学性肝损伤具有辅助保护功能,其作用机制与抑制转氨酶稳定细胞膜的结构、抗氧化、清除自由基等作用有关。

参考文献:

- [1] 刘钟杰,许剑琴. 中兽医学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社, 2002:209.
- [2] 胡小剑,刘晓秋. 小柴胡汤对四氯化碳/乙醇诱发小鼠肝癌肠-肝-脑损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23): 207-212.
- [3] 孙 兰,朱晓洪,李庆勇. 中药配方颗粒制备小柴胡汤的药效研究[J]. 中药药理与临床,2004,20(2):4-5.
- [4] 谢 斌. 加味小柴胡汤抗实验性肝损伤及肝细胞凋亡作用的研究[D]. 广州:广州中医药大学,2006.
- [5] 贺菊萍,潘迎捷,赵 勇. 牛蒡提取物对四氯化碳诱导肝损伤小鼠的保护作用[J]. 现代食品科技,2014,30(11):6-11.
- [6] 李 静,韩俊洋,张 露,等. 新疆奎屯地区石棉暴露致肝损伤现况调查[J]. 新疆医科大学学报,2015,38(2):231-234.
- [7] 李小雨,王楷扬,胡建辉,等. 葡萄籽原花青素对 CCl_4 诱导小鼠氧化性肝损伤的保护作用及其机制研究[J]. 中国药房,2016,27(13):1752-1755.
- [8] Abbas A T, El - Shitany N A, Shaala L A, et al. Red Sea suberea mollis sponge extract protects against CCl_4 - induced acute liver injury in rats via an antioxidant mechanism [J]. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2014, 67(23):745-606.
- [9] 吕 宁,单万水,黄慧谦. 检测丙氨酸转氨酶及天门冬氨酸转氨酶在病毒性肝炎中的临床意义[J]. 中国现代药物应用,2009,3(24):73-74.
- [10] 徐 博,沈 楠,安 英,等. 汉防己多糖对急性酒精性肝损伤小鼠氧化应激及肝细胞凋亡的影响[J]. 中国药房,2017,28(7):885-888.
- [11] Dai H J, Li D W, Wang Y X, et al. Induction of heat shock protein 27 by bicyclol attenuates D - galactosamine/lipopolysaccharide - induced liver injury [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791(1):482-490.
- [12] Ye N H, Liu S T, Lin Y Y, et al. Protective effects of intraperitoneal injection of TAT - SOD against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Life Sciences, 2011, 89(23):868-874.
- [13] 王 宫,王 瑾,陈耀金. 沉水樟芝对大鼠四氯化碳所致急性肝损伤的保护作用[J]. 海峡药学,2018,30(4):29-31.
- [14] 林久茂,王瑞国. 卷柏对试验性肝损伤小鼠保护作用的试验研究[J]. 福建中医学院学报,2006,16(2):28-30.
- [15] 陈红艳,严 莉,王建华,等. 甘草提取物对小鼠四氯化碳急性肝损伤的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(7):24-25.