

多年临床经验精心研制而成,其制方严谨,配伍精妙,经多年临床验证,疗效确切。方由肉苁蓉、北芪、王不留行、泽兰组成。方中君药肉苁蓉味甘咸温,入肾、大肠经,具温肾阳、益精血、润肠通便之效;臣以北芪,味甘、微温,入脾、肺、肝、肾经,为补气健脾之要药,有益气固表、敛汗固脱、托疮生肌、利水消肿之功;王不留行味苦平,入肝、胃经,善于行血通经、消肿止痛;泽兰性苦辛、微温,归肝、脾经,善于活血化瘀,利水消肿,尤宜治水瘀互结之证,与王不留行相须为用,共为佐药。4药合用,攻补兼施,共奏益肾活血通瘀散结之功。动物实验研究发现益肾通方具有一定的抗炎、抑制腺上皮增生的作用^[7]。

在代表组织炎症程度的 IL8 的表达方面, CNP-YST 组明显低于 CNP 组($P<0.01$),说明益肾通抑制前列腺炎效果明显;而 BPH-YST 组与 BPH 组比较,无明显变化($P>0.01$), CNP+BPH-YST 组却明显低于 CNP+BPH 组($P<0.01$),进一步说明益肾通对前列腺增生的抑制效果是通过抑制前列腺炎而获得的。在代表细胞增殖程度的 Ki67 的表达方面,也有力的说明了这一点。BPH-YST 组 Ki67-LI 与 BPH 组比较,差异无统计学意义($P>0.01$);而 CNP+BPH-YST 组 Ki67-LI 明显低于 CNP+BPH 组($P<0.01$)。

本研究表明,慢性前列腺炎(CNP)能加速良性前列腺增生(BPH)的疾病进程,益肾通胶囊可通过抑制前列腺的炎性组织学改变而抑制前列腺的增生。

参考文献:

- [1] Emberton M, Andriole GL, de la Rosette J, et al. Benign prostatic hyperplasia: a progressive disease of aging men[J]. Urology, 2003, 61 (2): 267-268.
- [2] Dimitrakov J, Diembr T, Ludwig M, et al. Recent developments in diagnosis and therapy of the prostatitis syndromes[J]. Curr Opin Urol, 2001, 11: 87-91.
- [3] 吴自余, 马松, 王洪兵, 等. 组织学前列腺炎对前列腺增生临床进展的影响因素分析[J]. 医学临床研究, 2011, 28(8): 1460-1462.
- [4] Collins MM, Meigs JB, Barry MJ, et al. Prevalence and correlates of prostatitis in the health professionals follow-up study cohort[J]. J Urol, 2002, 167: 1363-1366.
- [5] Nickel J, Downey J, Young I, et al. Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia[J]. Br J Urol Int, 1999, 84: 976-981.
- [6] Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, et al. Proliferation, bcl-2 expression and angiogenesis in pituitary adenomas: relationship to tumor behaviour [J]. Br J Cancer, 2000, 82(8): 1441.
- [7] 徐发彬, 李洪杰, 崔学教, 等. 益肾通方对大鼠前列腺增生模型的影响[J]. 新中医, 2004, 36 (10): 75-76.

(编辑: 邓响潮)

麻黄连翘赤小豆汤三方对 H_2O_2 诱导损伤的 L-O2 人肝细胞的保护作用

吴 军, 周春祥, 赵凤鸣, 周 韬(南京中医药大学基础医学院, 江苏 南京 210046)

摘要: **目的** 研究麻黄连翘赤小豆汤三种组方(简称“三方”)对外肝细胞损伤的保护作用及其机制。**方法** 培养 L-O2 人肝细胞, 采用 H_2O_2 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 体外诱导肝细胞损伤, 检测细胞上清中天门冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、丙二醛(MDA)的含量及超氧化物歧化酶(SOD)活力, cck-8 法检测细胞活性。**结果** 与阴性对照组比较, H_2O_2 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可抑制肝细胞活性, 增加 MDA 的生成和 ALT、AST 的水平, 降低 SOD 的活力($P<0.01$, $P<0.05$); 与模型组比较, 麻黄连翘赤小豆汤三方均可拮抗 H_2O_2 对肝细胞的损伤作用, 可促进细胞增殖, 显著降低细胞上清 ALT(除楸树皮方低剂量组)和 AST 水平(除楸树皮方高剂量组)及 MDA 含量(除梓白皮方低剂量组), 明显提升 SOD 活力($P<0.01$, $P<0.05$)。**结论** 麻黄连翘赤小豆汤三方对体外肝细胞损伤均有直接保护作用, 该作用可能与其抗氧化作用有关。

关键词: 麻黄连翘赤小豆汤; L-O2 肝细胞; 过氧化氢; 抗氧化作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)04-0367-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.011

收稿日期: 2013-02-28

作者简介: 吴军, 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 中药复方抗炎、抗肿瘤免疫研究。Email: wjmsn@hotmail.com。通讯作者: 周春祥, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药复方抗炎、抗肿瘤免疫研究。Email: zhaofengming0117@sina.com。

基金项目: 江苏省研究生科研创新计划项目(2010)。

Protective Effect of Three Kinds of *Mahuang Lianqian Chixiaodou* Decoction on L-02 Hepatocyte Injury Induced by H_2O_2

WU Jun, ZHOU Chunxiang, ZHAO Fengming, ZHOU Tao (Praclical Medicine School of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046 Jiangsu, China)

Abstract: Objective To observe the protective effect of *Mahuang Lianqian Chixiaodou* Decoction (MLCD), including the original recipe, and two kinds of variation recipes with *Sangbaipi* (Cortex Mori), *Qiushupi* (Cortex Catalpae Gungei) taking the place of *Zibaipi* (Cortex Catalpae Ovatae Radicis), on L-02 hepatocyte injury induced by H_2O_2 and to reveal the mechanism. **Methods** L-02 hepatocytes were incubated, and then injured by H_2O_2 . The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) activity in the supernatant were detected. Cell proliferation was assayed by cck-8 reduction method. **Results** Compared with negative control group, H_2O_2 at $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ inhibited the activity of L-02 hepatocytes, increased MDA, ALT and AST levels, and decreased SOD activities. And *Mahuang Lianqian Chixiaodou* Decoction counteracted the above changes ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), except for ALT in middle-dose *Qiushupi*-MLCD, AST in high-dose *Qiushupi*-MLCD, and MDA in middle-dose *Zibaipi*-MLCD. **Conclusion** *Mahuang Lianqian Chixiaodou* Decoction has protective effect on H_2O_2 -induced hepatocytes injury in vitro, and the mechanism might be associated with its anti-oxidation activity.

Keywords: *Mahuang Lianqian Chixiaodou* Decoction; L-02 hepatocytes; hydrogen peroxide (H_2O_2); Anti-oxidation activity

麻黄连翘赤小豆汤乃《伤寒论》治疗阳明病瘀热在里之经典方，临床应用非常广泛，但是针对麻黄连翘赤小豆汤的实验研究，国内外研究甚少。然囿于梓白皮药源不清或药房未备等因素，临床应用多以其他药物(桑白皮、楸树皮)取而代之。为了确认后世桑白皮、楸树皮替代梓白皮的合理性，课题组用桑白皮、楸树皮分别代替麻黄连翘赤小豆汤中梓白皮组成三种方剂简称“三方”，旨在治疗不同机制的肝损伤模型。以往研究发现^[1]三方对 CCl_4 和 BCG+LPS 所致化学性肝损伤有保护作用，本研究进一步观察了三方对体外肝细胞损伤的保护作用，以探索三方的药效和作用机制。

1 材料与方法

1.1 药材 麻黄连翘赤小豆汤由麻黄、连翘、杏仁、赤小豆、大枣、梓白皮(楸树皮、桑白皮)、生姜、炙甘草组成。麻黄，南京鹿江中药饮片厂，批号：20091206；杏仁，徐州彭祖中药饮片有限公司，批号：20100319；桑白皮，安徽神州中药饮片公司，批号：20101101；梓白皮、楸树皮，周口市楸树良种繁育基地，批号：20110601；其他药材均购于本校国医堂门诊部，批号：20111023。

1.2 试剂 谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒，南京建成生物工程研究所，批号分别为：20120217、20120209、20120418、20120424；过氧化氢(H_2O_2)，批号：

201101212，上海凌峰化学试剂有限公司；DMEM 培养基，批号：20120220，美国 Gibco 公司；胰蛋白酶，批号：20111125，美国 Sigma 公司；胎牛血清，批号：20111012，杭州四季青公司。

1.3 细胞 L-02 人肝细胞株，批号：20111205，上海细胞所。

1.4 方法

1.4.1 药液制备 麻黄连翘赤小豆汤组成：麻黄 10 g、连翘 10 g、杏仁 5 g、赤小豆 50 g、大枣 4 枚(15 g)、梓白皮(桑白皮、楸白皮)15 g、生姜 10 g、炙甘草 10 g。取麻黄连翘赤小豆方 125 g 浸泡 30 min，煎煮 30 min，收集第 1 次滤液；剩余药液再加水煎煮 30 min，收集第 2 次滤液；合并 2 次滤液浓缩至 66.67 mL，浓度为 $1.877 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，4 ℃ 保存备用。将原液($1.877 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)稀释 550 倍($3400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作为高剂量组，再稀释 10 倍($340 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作为低剂量组。

1.4.2 L-02 细胞培养 取 L-02 细胞置 37 ℃，5 % CO_2 培养箱中培养，细胞生长至单层致密状时，用 0.25 % 胰蛋白酶消化后以 1:3 传代，待细胞长满后再次传代。

1.4.3 筛选 H_2O_2 浓度 取处于指数生长期的细胞，加入适量 0.25 % 胰蛋白酶消化约 5 min。用 DMEM 培养基配成 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液，加入 96 孔板。阴性对照组含细胞悬液 160 μL ，生理盐水 40 μL ；模型组含细胞悬液 160 μL ，浓度分别为 100，200，

400, 600, 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 20 μL , 生理盐水 20 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 培养箱中孵育 24 h 后加入 10 μL cck-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h 后用酶标仪在 490 nm 处测定每孔 OD 值。

1.4.4 细胞活性测定 取处于指数生长期的细胞, 加入适量 0.25 %胰蛋白酶消化 5 min。用 DMEM 培养基配成 $2\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞悬液, 加入 96 孔板, 阴性对照组含细胞悬液 160 μL , 生理盐水 40 μL ; 模型组每孔含细胞悬液 160 μL , H_2O_2 20 μL , 生理盐水 20 μL ; 药物组: 麻黄连翘赤小豆汤(含梓白皮)低、高剂量组, 以下简称梓白皮方; 麻黄连翘赤小豆汤(含楸树皮)低、高剂量组, 以下简称楸树皮方; 麻黄连翘赤小豆汤(含桑白皮)低、高剂量组, 以下简称桑白皮方, 含细胞悬液 160 μL , H_2O_2 20 μL , 药液 20 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 培养箱中孵育 24 h 后加入 10 μL cck-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h 后用酶标仪在 490 nm 处测定每孔 OD 值。

1.4.5 细胞形态观察 取处于指数生长期的细胞, 加入适量 0.25 %胰蛋白酶消化 5 min。用含 10 %小牛血清的 DMEM 培养液配成细胞悬液, 种入小细胞瓶, 24 h 后, 阴性对照组加 2.4 mL 培养基, 0.6 mL 生理盐水, 模型组加 2.4 mL 培养基, 0.3 mL 生理盐水, 0.3 mL H_2O_2 , 药物组加 2.4mL 培养基, 0.3 mL 药液, 0.3 mL H_2O_2 , 于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 培养箱中培养 24 h。直接用倒置相差显微镜观察细胞的形态及生长状况, 并拍照。

1.4.6 赖氏法测定 AST 和 ALT 水平 按试剂盒说明检测。

1.4.7 MDA 含量和 SOD 活力测定 按试剂盒说明检测。

1.5 统计学处理方法 应用 SPSS 16.0 统计软件, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 H_2O_2 诱导损伤的 L-O2 细胞活性的影响 见表 1、表 2。表 1 显示, 与阴性对照组比较, 100 ~

800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且存在着明显的量效关系, 即随着 H_2O_2 浓度的升高, 对细胞活性的抑制作用明显增加。在参考相关文献和实验结果的基础上, 我们选择了 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为模型组的造模浓度。表 2 显示, 与阴性对照组比较, 模型组 L-O2 细胞活性差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 桑白皮方、梓白皮方和楸树皮方高、低剂量组 L-O2 细胞活性差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 可以抑制细胞 L-O2 活性, 而各用药组均能拮抗此抑制作用。

表 1 H_2O_2 对 L-O2 细胞活性的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 1 Effects on the proliferation of H_2O_2 -treated L-O2 cells culture

组别	$\text{H}_2\text{O}_2/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	OD 值
阴性对照组	0	0.511 $\pm$ 0.014
模型组 1	100	0.407 $\pm$ 0.032*
模型组 2	200	0.411 $\pm$ 0.022*
模型组 3	400	0.348 $\pm$ 0.019**
模型组 4	600	0.310 $\pm$ 0.009**
模型组 5	800	0.284 $\pm$ 0.012**

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 2 对 L-O2 细胞活性的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 2 Effects of medication on the proliferation of L-O2

组别	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	OD 值
阴性对照组	-	0.701 $\pm$ 0.089
模型组	-	0.475 $\pm$ 0.033*
桑白皮方高剂量组	3400	0.554 $\pm$ 0.045*
桑白皮方低剂量组	340	0.615 $\pm$ 0.097*
梓白皮方高剂量组	3400	0.552 $\pm$ 0.021**
梓白皮方低剂量组	340	0.613 $\pm$ 0.067**
楸树皮方高剂量组	3400	0.544 $\pm$ 0.046*
楸树皮方低剂量组	340	0.634 $\pm$ 0.045**

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 对 H_2O_2 诱导损伤的 L-O2 细胞形态的影响 见图 1。阴性对照组细胞生长状态良好, 贴壁较牢, 细胞间连接紧密、边界清楚, 大小均匀; 模型组细胞数量明显减少, 细胞边界不清, 甚至损伤破裂, 有

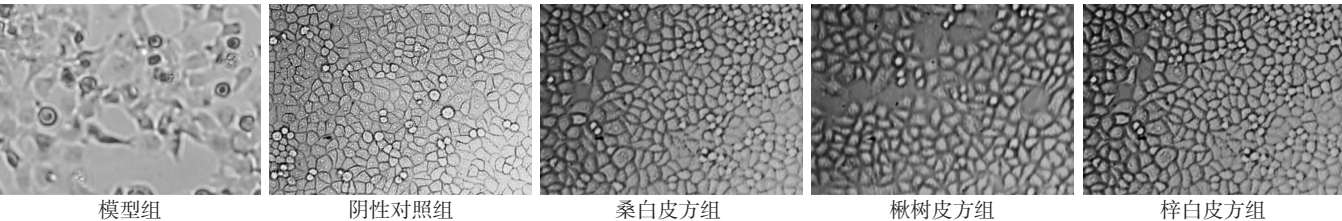


图 1 对 L-O2 细胞形态的影响($\times 100$)
Figure 1 The morphological observation of L-O2 cells

细胞脱落；而各药物组细胞数量和形态与模型组比较，得到明显改善，基本接近阴性对照组。

2.3 对 H₂O₂ 诱导损伤的 L-O2 细胞 ALT 和 AST 水平的影响 见表 3。与阴性对照组比较，模型组 ALT 和 AST 水平显著升高($P < 0.01$)；与模型组比较，除楸树皮高剂量组的 AST、低剂量组 ALT 外，各用药组 ALT 和 AST 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)，表明麻黄连翘赤小豆汤三方对 L-O2 细胞有保护作用。

表 3 各组细胞上清 AST、ALT 的水平($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	AST/U $\cdot\text{L}^{-1}$	ALT/U $\cdot\text{L}^{-1}$
阴性对照组	—	13.03 $\pm$ 1.77	2.70 $\pm$ 0.93
模型组	—	31.62 $\pm$ 3.64 [#]	18.14 $\pm$ 1.09 [#]
桑白皮方高剂量组	3400	23.76 $\pm$ 4.71 ^{**}	12.61 $\pm$ 3.64 [*]
桑白皮方低剂量组	340	18.55 $\pm$ 2.41 ^{**}	6.93 $\pm$ 1.83 ^{**}
梓白皮方高剂量组	3400	25.45 $\pm$ 4.50 [*]	10.38 $\pm$ 4.50 ^{**}
梓白皮方低剂量组	340	17.20 $\pm$ 5.53 ^{**}	9.04 $\pm$ 2.33 ^{**}
楸树皮方高剂量组	3400	39.43 $\pm$ 9.55	9.49 $\pm$ 1.49 ^{**}
楸树皮方低剂量组	340	18.66 $\pm$ 6.02 ^{**}	16.95 $\pm$ 4.04

注：与阴性对照组比较，[#] $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

2.4 对 H₂O₂ 诱导损伤的 L-O2 细胞 SOD 活力和 MDA 含量的影响 见表 4。L-O2 肝细胞与 H₂O₂ 共育 24 h 后，与阴性对照组比较，模型组 SOD 活力降低、MDA 含量升高，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)；与模型组比较，除梓白皮方低剂量组 MDA 外，各用药组 SOD 活力显著提高、MDA 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，显示其有良好的抗氧化作用。

表 4 各组细胞上清 SOD 活力及 MDA 水平($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	SOD/U $\cdot\text{mL}^{-1}$	MDA/nmol $\cdot\text{mL}^{-1}$
阴性对照组	—	16.51 $\pm$ 3.42	2.38 $\pm$ 0.31
模型组	—	8.12 $\pm$ 1.03 [#]	3.23 $\pm$ 0.16 [#]
桑白皮方高剂量组	3400	14.10 $\pm$ 1.38 ^{**}	2.43 $\pm$ 0.02 ^{**}
桑白皮方低剂量组	340	16.66 $\pm$ 6.12 [*]	2.60 $\pm$ 0.47 [*]
梓白皮方高剂量组	3400	14.76 $\pm$ 1.80 ^{**}	2.07 $\pm$ 0.02 ^{**}
梓白皮方低剂量组	340	15.37 $\pm$ 5.24 [*]	3.05 $\pm$ 0.89
楸树皮方高剂量组	3400	16.10 $\pm$ 4.19 [*]	1.40 $\pm$ 0.65 ^{**}
楸树皮方低剂量组	340	14.41 $\pm$ 1.67 ^{**}	2.82 $\pm$ 0.13 ^{**}

注：与阴性对照组比较，[#] $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

3 讨论

氧化应激是指由内源性的活性氧(ROS)所致的细胞毒性损伤，细胞内氧化系统与抗氧化系统失衡，氧化应激损伤是慢性病毒性肝炎、酒精性肝病(ALD)、自身免疫性肝脏疾病(AILD)和非酒精性脂肪

肝(NASH)的共同病理学特征，在一定程度上可能与肝细胞和肝脏其他类型细胞的功能障碍或死亡有关，并导致疾病的发生和发展^[3-5]。肝细胞受到氧化损伤时，自由基及其过氧化反应产物破坏细胞膜和细胞结构，导致细胞肿胀坏死，并可使细胞内清除自由基酶的活性下降，导致其清除自由基能力下降，使肝细胞损伤进一步加重，肝细胞内 ALT 和 AST 等酶外逸，细胞肿胀死亡^[6]。H₂O₂ 是一种重要的活性氧，极易通过细胞膜与细胞内铁离子反应形成高活性 OH $\cdot$ 损伤肝细胞^[7]。

本实验显示，100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 可诱导肝细胞损伤，而麻黄连翘赤小豆汤三方均不同程度地减轻其损伤，通过提高受抑的肝细胞活性，改善细胞生长状态，降低 ALT、AST 水平及 MDA 含量，提升 SOD 活力，从而减少肝细胞坏死；减轻膜脂质过氧化和细胞通透性的增加。由此推测，麻黄连翘赤小豆汤三方是通过降低转氨酶、抗脂质过氧化、防止过氧化损伤、减少过氧化脂质的生成等环节，起到抗 H₂O₂ 致肝细胞损伤的作用。

通过对三方的药效分析发现，三方对细胞增殖的影响均存在量效关系，在降低 AST 水平方面，三方的中剂量组要优于高剂量组；而桑白皮低剂量组在降低 ALT 水平方面效果较为显著；但在提升 SOD 活力和减少 MDA 生成方面，三方所表现的效应则近似；总之，三方在改善受抑的肝细胞活性，提升 ALT、AST 和 SOD 的表达以及降低 MDA 的生成方面不存在明显的差异，并与前期动物实验结果基本一致，提示桑白皮代用梓白皮的合理性，并为《伤寒论》中药物的代用和弃用等现象研究提供了方法和思路。

参考文献：

[1] 赵娟. 《伤寒论》麻黄连翘赤小豆汤之梓白皮研究[D]. 南京：南京中医药大学，2011：16-24.
[2] 杨燕，陈敏珠. 黄芩总提物对体外肝细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学，2000，5(4)：294-297.
[3] Medina J, Moreno-Otero R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease[J]. Drugs, 2005, 65: 2445-2461.
[4] Tribble DL, Aw TY, Jones DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury [J]. Hepatology, 1987, 7: 377-386.
[5] 顾伟，范昕建，吴疆，等. 胡黄连苷 II 对 H₂O₂ 损伤 L-O2 细胞的保护作用[J]. 世界华人消化杂志，2008，16(29)：3274-3278.
[6] Kalf FG, Pastgb, Snyder R. Sewent toxicology recent vances in the toxicology of benzene, the glycolethers, and catetrachloride [J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1987, 27: 39.
[7] 曹艳，许自川，何小解，等. 儿茶素拮抗过氧化氢诱导的大鼠皮祖细胞凋亡[J]. 中国当代儿科杂志，2009，11(1)：61-66.

(编辑：邓响潮)