

【实验研究】

# 四逆散改善细胞免疫性肝损伤作用机理研究<sup>\*</sup>

周春祥<sup>1</sup>, 徐强<sup>2</sup>, 曹劲松<sup>2</sup>, 蒋洁云<sup>2</sup>, 吴斐华<sup>2</sup>, 王利津<sup>2</sup>, 张先明<sup>2</sup>

(1. 南京中医药大学 伤寒论教研室, 江苏 南京 210029; 2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009)

**摘要:** 目的: 通过对四逆散改善细胞免疫性肝损伤作用机理的研究, 揭示该方在临床肝炎治疗中的作用特色。方法: 运用 Picryl chloride 致迟发性变态反应 (PCI-DTH) 肝损伤动物模型及细胞生物学、分子生物学方法。结果: 四逆散醇提物于上述动物模型诱导相给药作用显著, 效应相给药有改善趋势。该制剂高浓度  $10^4$  g/ml 可明显抑制 Con A 致小鼠脾淋巴细胞转化,  $10^{-7} \sim 10^4$  g/ml 4 个不同浓度呈剂量依赖性地抑制致敏小鼠脾细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9, 改善自 PCI-DTH 肝损伤模型小鼠分离所得的肝非实质细胞 (NPC) 杀伤肝细胞 (HC)。结论: 四逆散醇提物通过影响免疫细胞活化、移动及杀伤能力, 发挥改善细胞免疫性肝损伤的作用。上述作用是该方在临床上治疗肝炎取得疗效的基础。

**关键词:** 四逆散; 免疫性肝损伤(实验性); 作用机理

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3250(2002)05-0047-03

## Studies on Mechanism of Sinisan Alleviating Liver Injury Induced by Cellular Immunological Reaction<sup>\*</sup>

ZHOU Chun-xiang<sup>1</sup>, XU Qiang<sup>2</sup>, CAO Jin-song<sup>2</sup>, JIANG Jie-yun<sup>2</sup>, WU Fei-hua<sup>2</sup>, WANG Li-jing<sup>2</sup>, ZHANG Xian-ming<sup>2</sup>  
(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 210029; 2. China Pharmaceutical University, 210009, China)

**Key words:** SiNiSan; immunological hepatic injury (laboratory type); Mechanism

四逆散出自中医经典著作《伤寒论》, 是临床用于肝炎治疗的重要复方。在病毒性肝炎的病理进程中, 肝细胞的免疫损伤是导致肝功能损害的直接因素。为探讨四逆散能否通过免疫调节来发挥对肝炎的治疗, 我们运用 PCI-DTH 肝损伤动物模型观察了该方改善肝损伤的作用, 并从细胞分子水平对其机理作了初步探讨。

### 实验材料与方法

#### 1 药品与试剂

四逆散 (Si Ni Shan, SNS) 醇提物由北柴胡、炒枳实、生白芍、炙甘草各等分组成。上述生药经中国药科大学余伯阳教授鉴定: 北柴胡为伞形科植物柴胡 *Radix Bupleuri Chinerisis* 的根; 炒枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 幼果的炒制品; 生白芍为芍药科植物白芍 *Paeonia lactiflora* Pall. 干燥根的切片; 炙甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根茎切片的炒制品。上药以 70% 乙醇浸泡后, 置 2000ml 圆底烧瓶中水浴上加热, 70℃ 回流 2h, 得滤

液, 挥去乙醇后, 蒸发皿中隔水挥干水分, 得干燥粉末。收率为 18%, 实验中所用剂量均以该粉末计算。

2, 4, 6-三硝基氯苯 (Picryl chloride, PCI) (Tokyo Kasei Industry Co. Ltd. ); 橄榄油 (Olive oil) (上海化学试剂站分装); 取苯双酯 (biphenyl dimethyl dicarboxylate, BDD) (南京第二制药厂 950502); 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

#### 2 实验动物

昆明种小鼠, ICP 小鼠, 6~8 周龄, 中国药科大学实验动物中心提供。BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 雌性, 南京军区总医院实验动物中心提供。小鼠均饲养于 21℃±2℃ 相对恒温环境, 自由饮食。

#### 3 PCI-DTH 致小鼠肝损伤

刮去小鼠腹毛, 涂以 1% PCI 乙醇溶液 100μl 致敏, 5d 后以同样方法重复致敏, 再 5d 后, 用 0.5% PCI 橄榄油溶液 10μl 行肝内注射。于注射后 18h 采

\* 基金项目: 江苏省博士后管委会及国家自然科学基金资助 (NO. 39970887)

血,分离血清测定谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)。

#### 4 小鼠脾细胞的制备

制备正常及 PCI 2 次致敏 6h 后的小鼠脾细胞。

#### 5 Con A 刺激小鼠脾淋巴细胞转化

以 MTT 法测定,计算刺激指数值(Stimulation Index, SI)。

#### 6 基质金属蛋白酶(MMP)(参照文献<sup>[1]</sup>检测)

#### 7 肝细胞及非实质细胞的分离(参照文献<sup>[2]</sup>)

#### 8 统计分析

以  $\bar{x} \pm s$  表示实验结果,并以 Student's *t*-test 比较组间差异。

## 结 果

### 1 诱导相给药对 PCI-DTH 致肝损伤的影响

从 PCI 首次致敏的当日起连续 10d 按表 1 所示剂量给药。结果表明,与对照组相比,四逆散醇提物小剂量组有明显抑制 ALT 升高的趋势,大剂量组则显著抑制了 ALT 的上升;各剂量组均显著地抑制了模型小鼠 AST 的升高(见表 1)。

表 1 四逆散醇提物诱导相给药对 PCI-DTH 肝损伤小鼠血清 ALT、AST 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Dose (mg·Kg <sup>-1</sup> )	n	SALT (Kamen Unit)	Inhibition (%)	sAST (Kamen Unit)	Inhibition (%)
Normal	—	10	24.25 ± 8.88		91.00 ± 38.41	
Control	—	10	514.99 ± 474.28 <sup>**</sup>		524.00 ± 226.50 <sup>**</sup>	
SNS	100	10	281.78 ± 374.79	45.28	182.67 ± 190.61 <sup>*</sup>	62.61
SNS	200	10	120.89 ± 55.81 <sup>#</sup>	76.53	89.50 ± 34.34 <sup>*</sup>	43.32
BDD	150	10	98.67 ± 49.03 <sup>#</sup>	80.84	126.22 ± 59.94 <sup>*</sup>	89.28

Note: <sup>\*\*</sup> *P* < 0.01 vs. Normal; <sup>#</sup> *P* < 0.05 vs. Control; <sup>\*</sup> *P* < 0.01 vs. Control

### 2 效应相给药对 PCI-DTH 致肝损伤的影响

于 PCI 肝内注射攻击前 2h 及攻击后 4、6h 连续 3 次给予四逆散醇提物及 BDD(结果如表 2 所示)。与对照组相比,四逆散醇提物除低剂量组显著降低

了 AST 水平外,该制剂高剂量组对模型小鼠血清 AST、高低剂量组,对模型小鼠血清 ALT 的影响均表现出降低趋势,而无统计学意义。

表 2 四逆散醇提物效应相给药对 PCI-DTH 肝损伤小鼠血清 ALT、AST 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Dose (mg·Kg <sup>-1</sup> )	n	SALT (Kamen Unit)	Inhibition (%)	sAST (Kamen Unit)	Inhibition (%)
Normal	—	10	48.0 ± 13.56		128.0 ± 26.55	
Control	—	10	570.25 ± 569.07 <sup>**</sup>		505.2 ± 363.56 <sup>**</sup>	
SNS	100	10	213.2 ± 74.12	62.61	238.8 ± 174.51 <sup>#</sup>	52.73
SNS	200	10	323.2 ± 512.02	43.32	286.4 ± 237.96	43.31
BDD	150	10	61.11 ± 13.36 <sup>*</sup>	89.28	181.33 ± 40.1 <sup>#</sup>	64.11

Note: <sup>\*\*</sup> *P* < 0.01 vs. Normal; <sup>\*</sup> *P* < 0.01 vs. Control; <sup>#</sup> *P* < 0.05 vs. Control

### 3 对 Con A 刺激小鼠脾细胞增殖的影响

以四逆散醇提物  $10^{-7} \sim 10^{-4}$  g/ml 4 个不同浓度作用 Con A 刺激的脾细胞,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 96h。后以 MTT 法测吸光度,并以各组吸光度与无 Con A 刺激组吸光度比值作为刺激指数(SI 值)。3 次结果表明,四逆散高浓度  $10^{-4}$  g/ml 能明显抑制淋巴细胞转化(结果见图 1)。

### 4 对 PCI 两次致敏小鼠脾细胞分泌基质金属蛋白酶(MMP)的影响

PCI 两次致敏小鼠的脾细胞在无血清环境中培养 24h,轻轻吸取上清,按文献方法检测其中的基质

金属蛋白酶(MMP-2, 9),结果见图 2。四逆散醇提物随着浓度的增高对致敏小鼠的脾细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 呈现了明显的抑制作用,且表现出剂量依赖性。

### 5 对 PCI-DTH 肝损伤模型小鼠肝非实质细胞(NPC)杀伤肝细胞(HC)的影响

在 PCI 攻击肝脏后 12h,分离 PCI-DTH 肝损伤动物模型 HC 及 NPC。HC 以  $2 \times 10^4$  cells/well 种植于 96 孔板,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中预培养 3h;NPC  $8 \times 10^4$  cells 以四逆散  $10^{-7} \sim 10^{-4}$  g/ml 4 个不同浓度梯度处理 2h,离心收集处理过的 NPC。去除上述 96 孔

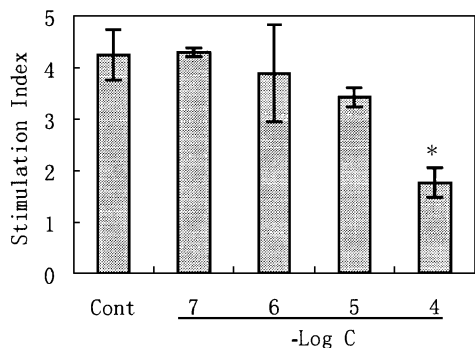
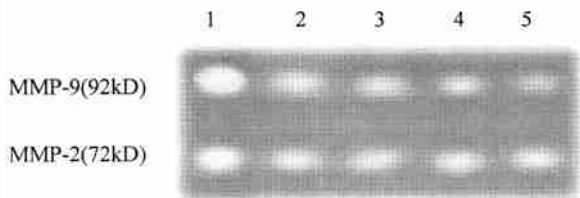


图1 四逆散对 Con A 刺激脾  
淋巴细胞转化的影响  
与 Cont 组比较: \*P < 0.01



1. 对照; 2~5 四逆散  $10^{-7} \sim 10^{-4}$  g/ml

图2 四逆散醇提物对 PCI 两次致  
敏小鼠脾细胞分泌 MMP 的影响

板上种植有 HC 的相应各孔中上清, 以 WE 洗 2 遍, 加入收集获得的经药物处理过的 NPC, 终体积 200 $\mu$ l, 再于 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  培养箱中共培养 3h, 吸取上清测 ALT 值。结果表明, 四逆散浓度依赖性地抑制了 NPC 所致 ALT 的释放(见图 3)。

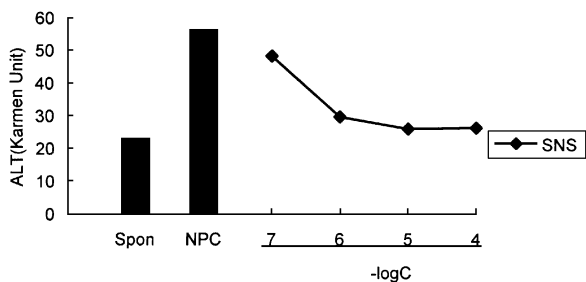


图3 四逆散醇提物对 NPC 杀伤 HC 的影响  
讨 论

PCI-DTH 肝损伤动物模型是由活化的 CD $_4^+$ T 细胞引起的实验性肝损伤模型, 其病理过程包括效应 T 细胞分化成熟的诱导相及效应细胞释放细胞因子及引发炎症的效应相, 该模型较好地模拟了临床病毒性肝炎的免疫病理过程<sup>[3~4]</sup>。在这一病理进程中, 免疫细胞活化、已活化免疫细胞向肝脏的“迁移”及免疫细胞对肝细胞攻击等都是引发肝损伤的重要环节。就对免疫细胞活化的影响而言, 四逆散醇提

物显著地抑制了 Con A 刺激脾淋巴细胞转化, 这一结果令人不难理解为什么四逆散醇提物在该模型诱导相给药作用显著。已有众多研究资料表明, MMP 是影响多种细胞穿过基质的重要酶类<sup>[5~9]</sup>。实验研究证明, 四逆散醇提物能不同程度地抑制已活化脾细胞分泌 MMP, 说明该复方在阻止活化脾细胞向肝脏定向“迁移”中发挥了作用。我们前期研究结果已经证实<sup>[7]</sup>, 事先摘除 PCI 致敏过的小鼠脾脏能使肝细胞损伤显著受抑。因此, 抑制 MMP 分泌、阻止炎症细胞浸润应为该复方改善肝损伤的机理之一。四逆散醇提物能抑制 NPC 直接杀伤 HC, 提示其通过抑制肝浸润淋巴细胞功能进而改善肝损伤的机理。

综上所述, 四逆散通过影响免疫细胞活化、阻止已活化免疫细胞浸润及抑制效应细胞机能而发挥改善肝损伤的作用, 该方的上述作用特色正是其在诱导相及效应相给药均有效的基础。从复方角度分析, 其一方“多能”实际是由该方靶点多样性决定的。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Hongwei Qin, Jason D Moellinger, Alan wells, et al. Transcriptional suppression of Matrix Metalloproteinase-2 gene expression in human ostriaglioma cells by TNF- $\alpha$  and TNF- $\gamma$  [ J ] . J Immunol, 1998, 161: 6664-6673.

[ 2 ] QingXu Jieyun Jiang Jingsong Cao, et al. LFA-1/ICAM-1 interaction is essentially involved in the pathogenesis of delayed-type hypersensitivity-induced liver injury to picryl chloride [ J ] . Life Sciences, 1998, 62(15): 1281-1292.

[ 3 ] Xu Q, et al. Role of Th1/Th2 cytokines in regulating the liver injury induced by delayed-type hypersensitivity to picryl chloride [ J ] . Liver, 1999.

[ 4 ] Xu Q, et al. LFA-1/ICAM-1 interaction is essentially involved in the pathogenesis of delayed-type hypersensitivity-induced liver injury to picryl chloride [ J ] . Life Sciences, 1998, 62: 1281.

[ 5 ] Brown PD. Matrix metalloproteinase inhibitors. Breast Cancer Res [ J ] . Treat, 1998, 52(1-3): 125-136.

[ 6 ] Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion [ J ] . FASEB J, 1999, 13(8): 781-792.

[ 7 ] Xu Q, Jiang J, Cao J, Wu F, Fujii H, Saiki I. LFA-1/ICAM-1 interaction is essentially involved in the pathogenesis of delayed-type hypersensitivity-induced liver injury to picryl chloride [ J ] . Life Sci, 1998, 62: 1281-1292.

收稿日期: 2001-05-08 修回日期: 2001-11-19