

蒋洁云<sup>1</sup>, 徐 强<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>中国药科大学中药药理教研室, 南京 210009;<sup>2</sup>南京大学生命科学院医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093

**【摘要】** 目的: 对四逆散进行初步拆方研究, 探讨组成四逆散的各单味中药在全方中所起的作用。方法: 运用 CCl<sub>4</sub> 体外致肝细胞损伤及 2, 4, 6-三硝基氯苯 (PCI) 致迟发型变态反应 (PCI-DTH) 诱导肝损伤模型, Con A 致淋转试验, LPS 诱导巨噬细胞释放 NO 试验及活化脾细胞释放 IV 胶原酶能力试验, 考察四逆散全方及各单味中药对肝细胞及免疫细胞的影响。结果: 四逆散复方作用明显优于各单味中药; 而各单味药分别作用于肝损伤过程的不同环节, 柴胡主要通过保护肝细胞膜及促进肝保护因子 NO 的产生而影响肝损伤过程的主要环节, 白芍则主要抑制免疫细胞的活化及过度活化的免疫细胞的功能而发挥免疫调节作用, 甘草具有保肝、促进 NO 产生及免疫调节作用。结论: 四逆散全方作用优于各单味中药, 系各单味中药对疾病过程中不同靶点综合效应的结果。

**【关键词】** 四逆散; 实验性肝损伤; 拆方研究; 肝细胞; 免疫调节

**【中图分类号】** R282, R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1672-3651(2004)01-0045-05

四逆散方源《伤寒论》, 由柴胡、白芍、枳实、甘草各等份组成, 方中柴胡疏肝解郁、调畅气机, 为君药; 芍药柔肝、养阴、和血, 与柴胡配合, 助疏肝解郁之力, 为臣药; 枳实泻脾气、调运化, 佐柴胡芍药; 甘草调和诸药, 缓急止痛, 为使药。全方疏肝理脾、透解郁热、和中缓急, 配伍十分精妙, 散收结合、升中有降。许多临床报道, 四逆散及其加减方治疗肝炎的临床有效率在 90% 以上<sup>[1-4]</sup>。我们的前期研究已经发现四逆散对多种实验性肝损伤有明显的改善作用, 其作用机理主要包括对肝细胞膜的保护作用, 促进肝细胞保护性因子 NO 的产生, 以及抑制免疫细胞的活化、阻止其向肝脏“迁移”并通过诱导其凋亡而消除其杀伤肝细胞的能力等<sup>[5]</sup>, 本文进一步考察组成四逆散各单味中药对肝细胞、免疫细胞的影响, 并与全方的作用相比, 以探讨各单味药在全方中所起的作用, 为阐明其配伍原理及物质基础研究奠定基础。

## 1 实验材料

### 1.1 药品与试剂

**【收稿日期】** 2003-10-29

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目 (编号: 39970887)

**【\*通讯作者】** 徐 强: 教授, 博导, 长江学者, 南京大学生命科学院副院长, Tel/Fax: 025-3597620, E-mail: molpham@163.com

柴胡购自中国药材公司, 白芍、枳实、甘草均购自南京中医药大学中西医结合专家门诊部, 经中国药科大学中药复方研究室余伯阳教授鉴定品种: 柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根; 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. 的干燥根; 炙甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根茎切片的炒制品。

四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>, 分析纯); 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS, from *E. coli*, O55: B5), 批号 981022 (Sigma); 2, 4, 6-三硝基氯苯 (PCI, 东京化成工业株式会社); 胶原酶 (Collagenase, 182 units/mg)、乙二醇-双(α-氨基乙基)-醚-四乙酸 (Ethylene glycol-bis-(aminoethyl)-*N, N'*-tetraacetic acid, EGTA)、*N*-双(2-羟乙基) 呱嗪-*N'*-2-(乙磺酸) (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, HEPES)、*N, N, N', N'*-四甲基乙二胺 (*N, N, N', N'*-tetramethyl ethylenediamine, TEMED), 过硫酸胺 (Ammonium persulfate, APS) 均购自和光纯药工业株式会社; 刀豆球蛋白 A (Concanavalin A, Con A) (Sigma); 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) (上海化学试剂公司); 三氯乙酸 (Trichloroacetic acid) (上海远航化学试剂厂); 丙烯酰胺 (Acrylamide) 及双丙烯酰胺

(Bis-acrylamide, BS) (上海生工生物技术有限公司); 明胶(Gelatin, 日本岩城硝子试剂株式会社); 考马斯亮兰 (Coommassie brilliant blue, Fluka); Triz base (Sigma)。溴化乙啶 (Ethidium Bromide, EB) (NACALAI TESQUE 工业株式会社)。

细胞培养液为含 100 U/ml 青霉素, 100 mg/ml 链霉素, 10% 新生牛血清 (newborn bovine serum, NBS, 南京卫岗血清厂) 的 RPMI-1640 (Gibco) 重蒸馏水溶液 (RPMI-1640-10% NBS)。血清谷丙转氨酶 (ALT) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

## 1.2 实验动物

BALB/c 小鼠, 4-6 周龄 (18 ~ 22 g), 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。饲养于  $21 \pm 2$  °C 的环境中, 自由摄食和饮水, 室内采取 12 h 光照/黑暗循环。

## 2 方法

### 2.1 四逆散、柴胡、白芍、枳实及甘草醇提物的制备

四逆散醇提物 (SNS) 的制备: 称取等量柴胡、白芍、枳实、甘草药材, 用 8 倍量 70% 乙醇加热回流两次, 每次 1 h, 过滤, 合并滤液, 回收乙醇后冷冻干燥得干粉末, 收率为 18%, 实验中所用的剂量均以该粉末计算。

各单味药醇提物的制备: 方法同 SNS。收率分别为柴胡 (CH) 15.5%、白芍 (BS) 10%、枳实 (ZS) 18%、甘草 (GC) 24%。

### 2.2 PCI-DTH 诱发小鼠肝损伤<sup>[9]</sup>

取 BALB/c 小鼠, 刮去腹毛, 涂 1% (w/v) PCI 的乙醇溶液 100  $\mu$ l 致敏, 5 d 后同法再次致敏, 再 5 d 后, 用 0.2% (w/v) PCI 橄榄油 (Sigma 产品) 溶液 10  $\mu$ l 肝内注射, 于注射后 12 h 按下述方法分离肝实质细胞与非实质细胞及脾细胞。

### 2.3 肝实质细胞、非实质细胞的分离

采用修改的两步灌流法分离正常小鼠及肝损伤小鼠的肝实质细胞与非实质细胞。小鼠 ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉, 开腹、肝门脉插管, 先用无钙镁 Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) (内含 0.5 mmol/L EGTA、25 mmol/L HEPES) (pH 7.4) 灌流, 至肝脏中血被冲洗干净, 再换用含 0.1% 胶原酶、4 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、0.8 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 的 HBSS 液继续灌流几分钟, 然后立即取下肝脏至冷的 HBSS 液中, 分散肝细胞, 100 目筛网过滤, 50 g

离心 2 min, 沉淀为肝实质细胞 (Hepatocytes, HC), 上清于 300 g 离心 5 min, 得肝非实质细胞 (Non-parenchymal cells, NPC)。肝细胞、肝非实质细胞经培养液两次洗涤后以台盼蓝染色, 计数, 存活率分别在 80% 和 90% 以上。通常在分离后立即用于培养。

### 2.4 肝细胞培养与转氨酶释放实验<sup>[9]</sup>

HC 经计数调成  $1.0 \times 10^5$  个细胞/ml, 在 96 孔板上接种 HC 悬液 0.2 ml/孔, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下预培养 5 h, 弃上清, HC 单层用 RPMI-1640 培养液洗两次后, 加入  $8.0 \times 10^5$  个细胞/ml 的 NPC 0.1 ml (效应细胞-靶细胞为 4:1), 或含 0.3% CCl<sub>4</sub> 的培养液 0.1 ml (CCl<sub>4</sub> 终浓度为 0.15%) 或 0.1 ml RPMI-1640 培养液, 共同培养 3 h 后, 收集上清, 测定 ALT 的活性。

### 2.5 Con A 致小鼠脾淋巴细胞增殖

无菌摘取脾脏, 置含 5 ml HBSS 液的平皿中, 经挤压及吹打后, 八层纱布过滤, 于 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 0.17 mol/L Tris-0.75% NH<sub>4</sub>Cl 去除红细胞, 再经两次洗涤, 悬浮于 1640 培养液中, 计数, 调成  $10^7$  细胞/ml, 存活率大于 95%。

在 96 孔培养板上, 每孔加入 100  $\mu$ l 细胞悬液, 50  $\mu$ l Con A (终浓度为 5  $\mu$ g/ml) 及 50  $\mu$ l 不同浓度的药物, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 培养 68 h 后, 每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu$ l, 继续培养 4 h 后, 500 g 离心 7 min, 去上清, 每孔加入 200  $\mu$ l 二甲亚砜, 混匀, 用酶标仪于 540 nm 处测定 OD 值。结果以刺激指数 (SI, 即含 Con A 孔的 OD 值与不含 Con A 孔的 OD 值之比) 表示。

### 2.6 LPS 诱导 J774A.1 细胞产生 NO 及其测定

J774A.1 细胞株, 购自中国科学院上海细胞所, 用 RPMI-160-10% NBS 传代培养。取处于对数生长期的 J774A.1 细胞株, 于 24 孔培养板内接种  $2 \times 10^6$  细胞/孔, 贴壁培养 2 h, 去除上清, 洗 2 遍, 加入 LPS, 使 LPS 终浓度为 10  $\mu$ g/ml, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h, 收集上清测定 NO。

用 Griess 法测定细胞培养上清 NO: 于 96 孔培养板中每孔加入上述上清 0.1 ml, 0.1 ml Griess 试剂 [0.1% 萘乙二胺盐酸盐与 1% 对氨基苯磺酰胺 (用 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 溶解) 等体积混合], 室温放置 10 min, 在酶标仪上于 540 nm 处测吸收度, 以 NaNO<sub>2</sub> 为标准, 作吸收度-NaNO<sub>2</sub> 摩尔浓度标准曲线。结果以 NaNO<sub>2</sub> 摩尔浓度表示 NO 水平。

## 2.7 IV型胶原酶活性分析<sup>[7]</sup>

将PCI第2次致敏后6h小鼠的脾细胞 $5 \times 10^5$ 以无血清RPMI-1640培养液于 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养24h,离心,收集上清。将20  $\mu\text{l}$ 上清与10  $\mu\text{l}$  Tris缓冲液(含62.5 mmol/L Tris/HCl, 10%甘油, 0.00125%溴酚蓝, 2% SDS)混合,以含0.2%明胶的5%SDS-PAGE分离。电泳后将凝胶用漂洗缓冲液(含50 mmol/L Tris/HCl, 2.5% triton X-100, 5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\mu\text{mol/L}$   $\text{ZnCl}_2$ , 0.05%  $\text{NaN}_3$ )中洗胶2次,每次30 min,以除去SDS。而后将凝胶置于孵育缓冲液(50 mmol/L Tris/HCl, 5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\mu\text{mol/L}$   $\text{ZnCl}_2$ , 0.05%  $\text{NaN}_3$ )中于 $37^\circ\text{C}$ 孵育24h,用去离子水漂洗2次,移入染色缓冲液(含0.1%考马斯亮兰, 10%乙酸, 10%异丙醇)中染色30 min,于脱色缓冲液(含10%乙酸, 10%异丙醇)中脱色2h,可见IV型胶原酶92 kD和72 kD两条白色条带,IV型胶原酶属基质金属蛋白酶(MMP)家族成员,92 kD和72 kD分别为MMP-9和MMP-2。

## 2.8 统计

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行t-检验分析组间差异。

## 3 结果

### 3.1 四逆散及方中单味药对 $\text{CCl}_4$ 体外致肝细胞损伤的影响

分离正常小鼠的HC,预培养后加入不同浓度的药物共培养3h,洗去药液后加入 $\text{CCl}_4$ 共培养。结果与HC的转氨酶自动释放值相比, $\text{CCl}_4$ 使HC释放ALT显著增加,而四逆散及各单味药对 $\text{CCl}_4$ 引起的肝细胞损伤均呈现不同程度的保护作用,并有明显的量效关系;四逆散全方的作用优于各单味中药,其中 $10^{-4}$  g/ml四逆散与相应浓度单味药白芍、枳实、甘草间均有显著差异( $P < 0.05$ );而各单味药中,以柴胡的保肝作用最强,甘草次之,白芍与枳实作用较弱(图1)。

### 3.2 四逆散及方中单味药对巨噬细胞产生NO的影响

J774A.1细胞与四逆散及各单味药和/或LPS共培养48h后,检测上清中NO水平。结果,四逆散、甘草及柴胡均浓度依赖性地促进了LPS诱导的巨噬细胞J774A.1产生NO,四逆散全方的作用优于各单味中药,其中 $10^{-5}$  g/ml四逆散与相应浓度枳实( $P < 0.01$ )、白芍( $P < 0.05$ )间、 $10^{-4}$  g/ml

四逆散与相应浓度枳实( $P < 0.01$ )、白芍( $P < 0.01$ )、柴胡( $P < 0.05$ )间均有显著差异;而在各单味药中,甘草作用较强,柴胡次之,白芍与枳实对NO的产生无明显促进作用(图2)。

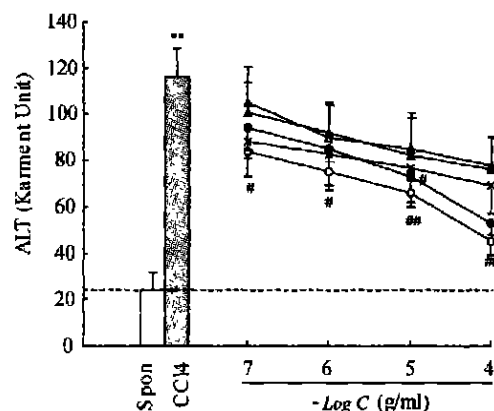


Fig 1 Effect of Si-Ni-San and its individual component drugs on  $\text{CCl}_4$ -induced hepatocyte damage *in vitro*.

—○—SNS; —●—Radix Bupleuri; —△—Radix Paeoniae alba; —▲—Fructus Aurantii immaturus; —×—Radix Glycythizae  
Each datum represents the  $\bar{x} \pm s$  of 3 experiments and each experiment includes triplicate sets. \*\* $P < 0.01$  vs Spontaneous (Spon); # $P < 0.05$  vs  $\text{CCl}_4$  group.

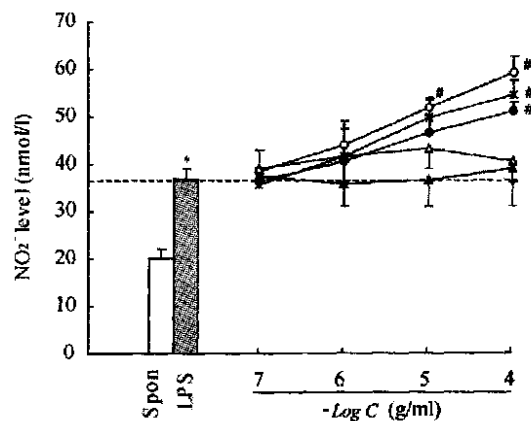


Fig 2 Effect of Si-Ni-San and its individual component drugs on LPS-induced NO production by J774A.1 cells *in vitro*.

Each datum represents the  $\bar{x} \pm s$  of 3 experiments and each experiment includes triplicate sets. \* $P < 0.05$  vs Spontaneous (Spon); # $P < 0.05$  vs LPS group

### 3.3 四逆散及方中单味药对Con A致淋转的影响

小鼠脾淋巴细胞在Con A刺激下与不同浓度的药物共培养3d,结果,各药物不同程度的浓度依赖性地抑制Con A所致小鼠脾淋巴细胞增殖反应,四逆散全方的作用优于各单味中药,其中 $10^{-6}$  g/ml四逆散与相应浓度枳实( $P < 0.05$ )间、 $10^{-5}$  g/ml四逆散与相应浓度枳实( $P < 0.05$ )、柴胡( $P < 0.05$ )甘草( $P < 0.05$ )间、 $10^{-4}$  g/ml四逆散与相应

浓度枳实 ( $P < 0.01$ )、柴胡 ( $P < 0.01$ )、甘草 ( $P < 0.01$ )、白芍 ( $P < 0.05$ ) 间均有显著差异; 而各单味药中, 以白芍对淋转的抑制作用较强, 甘草与柴胡次之, 枳实较弱(图 3)。

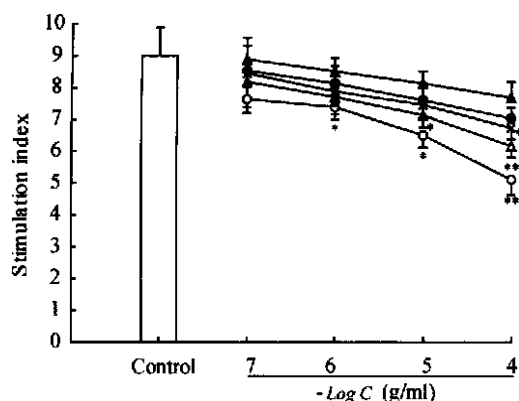


Fig 3 Effect of Si-Ni-San and its individual component drugs on T-lymphocyte proliferation induced by Con A.

Each datum represents the  $\bar{x} \pm s$  of three experiments and each experiment consists of triplicate sets. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control

### 3.4 四逆散及方中单味药对 PCI-DTH 肝损伤小鼠 NPC 杀伤 HC 的影响

HC 与 NPC 取自 PCI 肝内注射后 12 h 的肝损伤小鼠, 进行 HC 与 NPC 共培养致转氨酶释放试验。结果如图 4 所示, 与 HC 的转氨酶自动释放值

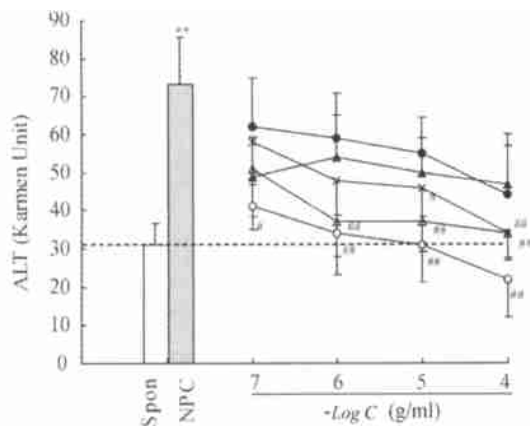


Fig 4 Effect of Si-Ni-San and its individual component drugs on the potential of non-parenchymal cell (NPC) to induce release of alanine transaminase (ALT) from parenchymal hepatocytes (HC) *in vitro*.

Each datum represents the  $\bar{x} \pm s$  of 3 experiments and each experiment includes triplicate sets. \*\* $P < 0.01$  vs Spontaneous (Spon); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs NPC.

相比, NPC 与 HC 共同培养 3 h 后转氨酶释放显著增加; 培养前 NPC 用不同浓度的四逆散及其各单味药处理 1 h, 则不同程度的浓度依赖性地抑制 ALT 的释放, 四逆散全方的作用优于各单味中药, 其中  $10^{-6}$  g/ml 四逆散与相应浓度柴胡 ( $P < 0.05$ )

间、 $10^{-5}$  g/ml 四逆散与相应浓度柴胡 ( $P < 0.05$ )、枳实 ( $P < 0.05$ )、甘草 ( $P < 0.05$ ) 间、 $10^{-4}$  g/ml 四逆散与相应浓度柴胡 ( $P < 0.05$ )、枳实 ( $P < 0.05$ )、甘草 ( $P < 0.05$ )、白芍 ( $P < 0.05$ ) 间均有显著差异; 而各单味药对 NPC 杀伤 HC 的影响与其对淋转的抑制作用相似, 即白芍对 NPC 杀伤 HC 的抑制作用较强, 甘草次之, 柴胡与枳实较弱。

### 3.5 四逆散及方中单味药对活化脾细胞分泌 MMP 的影响

分离 PCI 两次致敏小鼠的脾细胞, 在无血清环境中与不同浓度的药物共培养 24 h, 收集上清, 检测上清中 IV 胶原酶 (MMP-2, MMP-9) 活性。结果, 四逆散及各单味药不同程度地抑制了活化的小鼠脾细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9(图 5)。

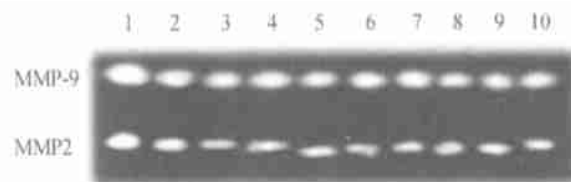


Fig 5 Zymograms analyzing gelatinase secreted by spleen cell isolated from mice 6 h after PCI-DTH induced liver injury.

Lane 1: Control; lane 2-3: CH  $10^{-5} \sim 10^{-4}$  g/ml; lane 4-5: BS  $10^{-5} \sim 10^{-4}$  g/ml; lane 6-7: ZS  $10^{-5} \sim 10^{-4}$  g/ml; lane 8-9: GC  $10^{-5} \sim 10^{-4}$  g/ml; lane 10: SNS  $10^{-4}$  g/ml.

## 4 讨论

前期工作已从整体-细胞-分子水平研究了四逆散对多种实验性肝损伤的改善作用及其机理, 发现四逆散对多种实验性肝损伤有明显的改善作用, 其主要通过对肝细胞膜的保护作用, 促进肝细胞保护性因子 NO 的产生, 以及抑制免疫细胞的活化、阻止其向肝脏“迁移”并通过诱导其凋亡而消除其杀伤肝细胞的能力等来完成的<sup>[5,8]</sup>。而四逆散是由柴胡、芍药、枳实、甘草以典型的君、臣、佐、使规律配伍而成, 那么, 各单味药在方中的作用是否体现出一定的差异? 不同的药物是否针对于肝损伤过程的不同环节? 为了回答这一问题, 探讨组成四逆散的各单味中药在全方中所起的作用, 以更好地阐明四逆散的配伍规律, 本文运用前期已建立的探讨四逆散作用机理的各体外模型<sup>[3]</sup>, 对四逆散进行了初步的拆方研究。

结果表明, 四逆散全方对肝损伤各个环节的作用均优于方中各单味中药; 而各单味药对肝细胞膜、肝细胞保护性因子 NO<sup>[9,10]</sup> 及免疫细胞的功

能均有不同程度的影响,保护肝细胞膜作用以柴胡较强,甘草次之,白芍与枳实较弱;对LPS诱导的巨噬细胞J774A.1产生NO,甘草及柴胡均有剂量依赖性地促进作用,甘草作用较强,柴胡次之,白芍与枳实对NO的产生无明显影响;而对免疫细胞的活化、迁移及其功能的影响则以白芍较强,甘草次之,柴胡与枳实较弱。提示,方中各组成中药分别作用于肝损伤过程的不同环节,柴胡主要通过保护肝细胞膜及促进肝保护因子NO的产生而影响肝损伤过程的主要环节,白芍则主要抑制免疫细胞的活化及过度活化的免疫细胞的功能而发挥免疫调节作用,甘草具有保肝、促进NO产生及免疫调节作用。配伍后的复方作用优于各单味中药,系各单味中药对疾病过程中不同靶点综合效应的结果。

#### 参考文献

- [1] 任豪(Ren H). 四逆散合五苓散加减治疗急性黄疸型肝炎20例[J]. 湖北中医(*Hubei J Trad Chin Med*), 1992, 14(5): 55.  
[2] 程润泉(Chen RQ). 四逆散临床应用三则[J]. 四川中医

(*Sichuan J Trad Chin Med*), 1986, 4(8): 13.

- [3] 陈继明(Chen JM). 慢性肝炎辨治一得[J]. 中医杂志(*J Trad Chin Med*), 1986, 27(3): 13-15.  
[4] 蒲青海(Pu QH). 黄疸肝炎临证十二法. 四川中医(*Sichuan J Trad Chin Med*), 1986, 4(8): 20  
[5] Jiang J, Zhou C, Xu Q. Alleviating effects of Si-Ni-San, a traditional Chinese prescription on experimental liver injury and its mechanisms [J]. *Biol Pharm Bull.* 2003, 26(8): 1089-1094.  
[6] Xu Q, Jiang J, Cao J, 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 Sci*, 1998, 62(15): 1281-1292.  
[7] Leppert D, Waubant E, Galardy R, et al. T cell gelatinases mediated basement membrane transmigration in vitro [J]. *J Immunol*, 1995, 154: 4397-4389.  
[8] 孙洋(SUN Y), 徐强(Xu Q). 四逆散药对及全方对刀豆蛋白A活化的小鼠脾细胞移动和粘附能力的影响[J]. 中国天然药物(*Chin J Nat Med*), 2003, 1(2): 103-106  
[9] Wang G, Liu G. Role of nitric oxide in immunological liver damage in mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 1995, 49(9): 1277-1281.  
[10] Cao J, Xu Q, Koda A. Protective involvement of nitric oxide in the liver injury induced by delayed-type hypersensitivity to picryl chloride [J]. *Inflamm Res*, 2000, 49: 578-583.

## Effect of Si-Ni-San and Its Individual Component Drugs on Experimental Liver Injury

JIANG Jie-Yun<sup>1</sup>, XU Qiang<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology for Chinese Materia Medica, Nanjing 210009;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China

**【ABSTRACT】** AIM: To examine the function of the four constituent medicines of Si-Ni-San (Composition of Radix Bupleuri, Radix Paeoniae alba, Fructus Aurantii immaturus and Radix Glycyrrhizae) and each single drug on alleviating experimental liver injury. **METHOD:** Hepatocyte damage induced by CCl<sub>4</sub> and PCI-DIH, Con A-induced lymphocyte proliferation, LPS-induced NO production in macrophage and gelatin zymography assay were used. **RESULT:** The results show that the activities of Si-Ni-San were stronger than those of each constituent. Among the four constituent medicines, Radix Bupleuri mainly affected the main process of liver injury through protecting hepatocyte membrane and enhancing NO, a protective factor, production in macrophages; Radix Paeoniae alba mainly affected immune cells through inhibiting the activation, migration and infiltration of lymphocytes, and inducing the dysfunction of liver-infiltrating cells; Radix Glycyrrhizae had both hepatoprotective and immunomodulatory activities contributing to SNS alleviating liver injury. **CONCLUSION:** Each constituent of Si-Ni-San affects the different target of liver injury and their comprehensive effect resulted in the stronger effect of the prescription.

**【KEY WORDS】** Si-Ni-San; Experimental liver injury; Hepatocyte; Immuno-modulation

**【Foundation Item】** This project was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39970887)