

加味小柴胡汤及其有效物质部位群抗炎实验研究

吴欢欢 周爱军 胡丽娟 陈雪剑 杨梦玲 刘焱文

【摘要】 目的 对加味小柴胡汤及其有效物质部位群进行抗炎活性实验研究,确定其有效物质部位群,以期阐述其药效物质基础,为该经典方剂治疗慢性胃炎的临床疗效提供科学实验依据。**方法** 将加味小柴胡汤复方视为整体,采用系统溶剂法将其提取分离为挥发油、多糖、生物碱、酚酸类、皂苷类等化学物质部位;采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀和角叉菜胶致大鼠足趾肿胀抗炎实验动物模型,对该方剂及其各物质部位进行抗炎实验研究。**结果** 二甲苯致小鼠耳廓肿胀模型实验研究表明,与模型组比较,全方高及低剂量组、皂苷部位高及低剂量组、多糖部位高剂量组均能极显著抑制小鼠耳肿胀($P<0.01$);酚酸类物质部位高剂量组能显著抑制小鼠耳肿胀($P<0.05$)。角叉菜胶致大鼠足趾肿胀模型实验结果表明,与模型组比较,全方高及低剂量组、皂苷部位高及低剂量组、酚酸类物质部位高剂量组均能极显著地减轻大鼠足趾肿胀($P<0.01$);多糖部位高剂量组能显著减轻大鼠足趾肿胀($P<0.05$)。**结论** 确定了加味小柴胡汤及其有效物质部位群的抗炎作用,从而为该临床经验方治疗慢性胃炎提供了现代药理学实验依据。

【关键词】 加味小柴胡汤; 有效物质部位群; 抗炎

【中图分类号】 R285 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.06.005

Experimental study on anti-inflammatory effect of modified Xiaochaihu decoction and its effective fractions WU Huan-huan, ZHOU Ai-jun, HU Li-juan, et al. Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources and Traditional Chinese Medicine Chemistry of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430070, China

Corresponding author: LIU Yan-wen, Email: ywliu2008@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the anti-inflammatory effect of modified Xiaochaihu decoction and its substance fractions. To determine the effective material parts, in order to explain its pharmacodynamic material basis, and to provide a scientific basis for the treatment of gastritis. **Methods** The means of systematic solvent extraction was used to separate volatile oils, polysaccharides, alkaloids, phenolic acids and saponins from the decoction; animal were divided into high and low dose groups. Mouse ear swelling induced by xylene and the rats paw edema induced by carrageenin to establish the animal model of anti inflammatory, the anti-inflammatory effect of modified Xiaochaihu decoction and each substance fractions was investigated. **Results** Xylene-induced mouse ear swelling model, compared with model group, the decoction high and low dose group, saponins high and low dose group, polysaccharide high dose group can significantly inhibit the mouse ear edema ($P<0.01$); phenolic acids part of the high dose group could significantly inhibit the mouse ear edema ($P<0.05$). Carrageenan-induced rat paw edema test, compared with model group, the decoction high and low dose group, saponins high and low

基金项目: 广东省东莞市科技局项目(2013108101036)

作者单位: 430060 武汉,湖北中医药大学湖北省中药资源与中药化学重点实验室[吴欢欢(硕士研究生)、胡丽娟、陈雪剑、杨梦玲(硕士研究生)、刘焱文];东莞市中医院中医药研究所(周爱军)

作者简介: 吴欢欢(1990-),女,2013级在读硕士研究生。研究方向:中药及其制剂的物质基础研究。E-mail:260617673@qq.com

通讯作者: 刘焱文(1945-),本科,教授,博士生导师。研究方向:中药及其制剂的物质基础研究。E-mail: ywliu2008@163.com

dose group, phenolic acids high dose group can significantly inhibit the mouse ear edema ($P < 0.01$), polysaccharides high dose group can significant reduce toes swelling of rats ($P < 0.05$). **Conclusion** The anti-inflammatory effect of modified Xiaochaihu decoction and its effective material site group was determined, which provided modern pharmacology experiment basis for the classic prescription of the clinical treatment of chronic gastritis.

【Key words】 Modified Xiaochaihu decoction; Effective fractions; Anti-inflammatory

加味小柴胡汤以张仲景所著《伤寒论》中小柴胡汤为基本方,加味干姜、黄连、茯苓、白术组成;临床治疗慢性胃炎,疗效确切。

本实验在临床疗效基础上,将加味小柴胡汤复方视为整体,按其不同化学物质类别提取分离为挥发油、多糖、生物碱、酚酸类、皂苷类等物质部位^[1];采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀和角叉菜胶致大鼠足趾肿胀动物实验模型,以小鼠耳廓肿胀度和大鼠足趾肿胀度为考察指标,对加味小柴胡汤及其各物质部位群进行了抗炎实验的研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠,雌雄各半,体质量 18 ~ 22 g,由湖北省实验动物研究中心提供,许可证号:SCXK(鄂)2008-0005;Wistar 大鼠,雄性,体质量 190 ~ 210 g,由湖北省实验动物研究中心提供,许可证号:SCXK(鄂)2015-0018。

1.2 药物与试剂

加味小柴胡汤处方药材(湖北九州通医药集团);阿司匹林肠溶片(沈阳奥吉娜药业有限公司,批号:140910); λ -角叉菜胶(sigma,批号:1408463V);二甲苯(分析纯);氯化钠注射液(双鹤药业,批号:1504080801)。

1.3 器材

万分之一电子天平(Metter Toledo A1204)、直径 6 mm 打孔器、小鼠灌胃针头、大鼠灌胃针头、手术剪、100 μ L 移液枪、镊子、三通阀、10 mL 注射器、5 mL 注射器、1 mL 注射器、橡胶管、2 mL 刻度吸管、铁架台等。

1.4 供试药物的制备

加味小柴胡汤全方水煎液的制备:组成:柴胡 15 g、黄芩 10 g、法半夏 10 g、党参 10 g、生姜 10 g、炙甘草 10 g、干姜 6 g、黄连 3 g、白术 10 g,水煎煮提取、浓缩、干燥,研磨成药粉;称取药粉适量,加水溶解,配制成低与高浓度药液,按生药量计为 3.25 g/mL、6.5 g/mL。

挥发油物质部位药液的制备:处方同前,采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,取挥发油适量,加水摇匀(加 0.8%吐温 80 助溶),配制成低与高浓度药液,按生药量计为 3.25 g/mL、13 g/mL。

总多糖物质部位药液的制备:按加味小柴胡汤处方比例称取除黄连外适量药材,加水煎煮 3 次,合并煎煮液,浓缩至适量体积,少量多次加入 95% 乙醇,搅拌,使药液醇度达 70%,静置过夜,减压抽滤,将醇沉物干燥,得总多糖物质部位 333.2 g (13.3%);取多糖干膏粉适量,加水溶解,配制成低与高浓度药液,按生药量计为 3.25 g/mL、13 g/mL。

生物碱物质部位药液的制备:取上述抽滤后滤液适量,挥至无醇味,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 10 ~ 11,用等体积的氯仿萃取 8 次,合并氯仿萃取液,减压回收氯仿,得氯仿萃取物;另按处方比例称取适量黄连药材,用甲醇-盐酸(100 : 1)超声提取 30 分钟,提取液回收溶剂,与氯仿萃取物合并,干燥,得生物碱物质部位 14.55 g (0.58%);取生物碱物质部位干膏粉适量,加水溶解,配制成低与高浓度药液,按生药量计为 3.25 g/mL、13 g/mL。

酚酸类物质部位药液的制备:将上述氯仿萃取后的水相用 1 mol/L HCL 溶液调 pH 至 3 ~ 4,用等体积乙酸乙酯萃取 8 次,合并乙酸乙酯萃取液,减压回收乙酸乙酯,得酚酸类物质部位 29.19 g (1.17%);取酚酸类部位干膏粉适量,研磨,加水溶解,配制成低与高浓度药液,按生药量计为 3.25 g/mL、13 g/mL。

皂苷类物质部位药液的制备:将上述乙酸乙酯萃取后的水相用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至中性,用等体积水饱和正丁醇萃取 8 次,合并正丁醇层,减压回收正丁醇,得皂苷类物质部位 90.2 g (3.61%);取正丁醇部位干膏粉适量,加水溶解,配制成低与高浓度药液,按生药量计为 3.25 g/mL、13 g/mL。

1.5 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验

1.5.1 实验分组及给药 取昆明小鼠 112 只,雌雄各半,随机分为 14 组,即模型组(等体积生理盐水),阳性药物对照组(阿司匹林:0.05 g/kg),全方水煎液低与高剂量组(按生药量计为 16.25 g/kg、

32.5 g/kg, 相当于 1 倍和 2 倍临床给药剂量), 各物质部位高、低剂量组 (按生药量计为 16.25 g/kg、65 g/kg, 相当于 1 倍和 4 倍临床给药剂量)。每天灌胃给药 1 次, 连续给药 6 天。

1.5.2 实验方法 末次给药 1 小时后, 于各试验组小鼠右耳正反两面各涂二甲苯 20 μ L 致炎, 45 分钟后脱颈椎处死小鼠, 用直径 6 mm 打孔器冲下左右耳同一部位的圆片, 于分析天平上称重^[2]。

肿胀度 = 右耳质量 - 左耳质量

肿胀抑制率 = (模型组肿胀度 - 给药组肿胀度) / 模型组肿胀度 $\times 100\%$

1.6 角叉菜胶致大鼠足趾肿胀实验

1.6.1 实验分组及给药 取 Wistar 雄性大鼠 112 只, 分组同 1.5.1, 模型组给予等量生理盐水, 阳性药物对照组 (阿司匹林; 0.075 g/kg), 全方低与高剂量组 (按生药量计为 11.25 g/kg、22.5 g/kg, 相当于 1 倍和 2 倍临床给药剂量), 各物质部位高、低剂量组 (按生药量计为 11.25 g/kg、45 g/kg, 相当于 1 倍和 4 倍临床给药剂量)。各组每天灌胃给药 1 次, 连续 6 天。

1.6.2 实验方法 末次给药前, 分别在各试验组大鼠右后肢踝关节处作标记, 并测定给药前足趾容积, 末次给药 1 小时, 分别于各试验组大鼠右后足掌心向踝关节方向皮下注射 1% 角叉菜胶 0.1 mL, 致炎后 1、2、3、4、5 小时分别测量各鼠右后足趾体积^[3]。计算各鼠足趾肿胀度。

肿胀度 = 致炎后足容积 - 致炎前足容积

1.7 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计学软件处理数据, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各指标组间比较均采用单因素方差分析, 若方差齐性时采用 LSD 法, 若方差不齐采用 Dunnett's T3 法。小鼠耳肿胀度, 大鼠 3 小时、4 小时、5 小时足趾肿胀度数据资料组间方差齐性, 采用 LSD 法检验, 大鼠 1 小时、2 小时足趾肿胀度数据资料方差不齐, 采用 Dunnett's T3 法检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验结果

各组采用二甲苯涂于小鼠右耳廓使肿胀致炎, 15 分钟后均可见右耳廓明显红肿, 表明小鼠造模成功。供试药物抗炎实验结果表明, 加味小柴胡汤高及低剂量组、皂苷类物质部位高及低剂量组、多糖

高剂量组均能显著抑制模型动物的耳廓肿胀度, 与模型动物组比较具有极显著性差异 ($P < 0.01$), 与阳性药物组比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 酚酸类物质部位高剂量能明显抑制动物模型的耳廓肿胀度, 与模型动物比较, 具有显著性差异 ($P < 0.05$); 其他物质部位也具有一定抑制模型动物的耳廓肿胀效果。因此, 本实验结果表明, 加味小柴胡汤具有明显抗炎效果, 其主要有效物质部位群为皂苷类、多糖和酚酸类物质。研究结果见表 1。

表 1 加味小柴胡汤及各物质部位组对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 (g/kg)	肿胀度 (mg)	肿胀抑制率 (%)
模型组	8	--	7.60 \pm 1.70	--
阳性药物组	8	0.05	4.75 \pm 1.37 ^b	37.5
全方低剂量组	8	16.25	5.56 \pm 1.88 ^b	26.8
全方高剂量组	8	32.5	4.91 \pm 1.38 ^b	35.4
挥发油低剂量组	8	16.25	7.61 \pm 1.44	-0.1
挥发油高剂量组	8	65	6.42 \pm 1.33	15.5
多糖低剂量组	8	16.25	6.26 \pm 2.13	17.6
多糖高剂量组	8	65	4.82 \pm 0.93 ^b	36.6
生物碱低剂量组	8	16.25	6.21 \pm 1.93	18.3
生物碱高剂量组	8	65	6.95 \pm 1.97	8.6
酚酸低剂量组	8	16.25	6.98 \pm 1.27	8.2
酚酸高剂量组	8	65	5.64 \pm 1.17 ^a	25.8
皂苷低剂量组	8	16.25	5.06 \pm 1.02 ^b	33.4
皂苷高剂量组	8	65	4.81 \pm 1.26 ^b	36.7

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

2.2 角叉菜胶致大鼠足趾肿胀实验结果

各组大鼠于右后足掌心向踝关节方向皮下注射 1% 角叉菜胶 0.1 mL, 1 小时后均呈现明显红肿, 各试验组大鼠足趾容积与造模前比较显著增大 ($P < 0.01$), 表明大鼠足趾肿胀造模成功。供试药物抗炎实验结果表明, 加味小柴胡汤高及低剂量组、皂苷物质部位高及低剂量组、酚酸类物质部位高剂量组具有显著抑制大鼠足趾肿胀的药效作用, 与模型动物组比较具有极显著性差异 ($P < 0.01$); 与阳性药物组比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 多糖物质部位能明显减轻大鼠足趾肿胀度, 与模型动物组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$); 其他物质部位也具有一定抑制模型大鼠足趾肿胀的药效作用。因此本项实验结果仍然表明, 加味小柴胡汤具有显著抗炎效果, 其主要有效部位群为皂苷类、酚酸类和多糖类物质。研究结果见表 2。

表 2 加味小柴胡汤及各物质部位对角叉菜胶致大鼠足趾肿胀的影响 (n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	正常足容积 (mL)	肿胀度 (mL)				
			1h	2h	3h	4h	5h
模型组	—	0.99±0.045	0.298±0.068	0.385±0.036	0.472±0.037	0.521±0.033	0.526±0.056
阳性药物组	0.075	1.02±0.055	0.211±0.070 ^a	0.306±0.072 ^a	0.352±0.066 ^b	0.371±0.070 ^b	0.424±0.072 ^b
全方低剂量组	11.25	1.06±0.032	0.221±0.038 ^a	0.340±0.037	0.378±0.059 ^b	0.415±0.072 ^b	0.454±0.038 ^b
全方高剂量组	22.5	1.11±0.081	0.211±0.071 ^a	0.316±0.096 ^a	0.359±0.111 ^b	0.390±0.095 ^b	0.400±0.091 ^b
挥发油低剂量组	11.25	1.01±0.062	0.265±0.112	0.352±0.081	0.435±0.078	0.474±0.046	0.487±0.047
挥发油高剂量组	45	1.01±0.079	0.312±0.127	0.428±0.091	0.510±0.069	0.529±0.067	0.544±0.076
多糖低剂量组	11.25	1.07±0.036	0.324±0.042	0.402±0.026	0.461±0.033	0.508±0.034	0.459±0.039 ^a
多糖高剂量组	45	0.93±0.073	0.224±0.060 ^a	0.428±0.049	0.469±0.053	0.458±0.059 ^a	0.466±0.057
生物碱低剂量组	11.25	1.03±0.086	0.324±0.090	0.390±0.091	0.474±0.082	0.505±0.062	0.494±0.091
生物碱高剂量组	45	0.99±0.05	0.279±0.057	0.414±0.041	0.456±0.043	0.489±0.072	0.471±0.039
酚酸低剂量组	11.25	1.01±0.05	0.290±0.029	0.420±0.039	0.449±0.054	0.480±0.065	0.494±0.059
酚酸高剂量组	45	1.10±0.093	0.208±0.079 ^a	0.301±0.032 ^a	0.386±0.072 ^a	0.406±0.061 ^b	0.399±0.067 ^b
皂苷低剂量组	11.25	1.06±0.044	0.191±0.059 ^a	0.345±0.049 ^a	0.415±0.057	0.431±0.057 ^b	0.439±0.07 ^b
皂苷高剂量组	45	1.09±0.041	0.199±0.040 ^a	0.308±0.058 ^a	0.388±0.073 ^a	0.436±0.063 ^b	0.453±0.052 ^a

注：与模型组比较，^aP<0.05，^bP<0.01。

3 讨论

小柴胡汤是医圣张仲景所著《伤寒论》的代表方,主治脾胃疾患,沿用 2000 余年,经久不衰。张仲景在临床实践中,以柴胡和甘草为小柴胡汤的核心药物,方中其他诸药则可随症加减^[4]。东莞市中医院周爱军主任医师以小柴胡汤为基本方,在长期临床实践中总结出加味小柴胡汤临床经验方治疗慢性胃炎,疗效显著。本研究在临床疗效基础上,采用现代药理学方法对加味小柴胡汤及其有效物质部位群进行抗炎实验研究,研究结果表明加味小柴胡汤具有显著抗炎效果。

中医复方的配伍协同作用是其临床疗效的优势和特色。本论文将加味小柴胡汤视为整体,从中提取分离不同化学物质部位,并通过药理筛选研究,确定了该临床经验方的主要有效物质部位群为皂苷类、酚酸类和多糖类物质部位,其余挥发油和生物碱物质部位具有一定抗炎作用,但效果不明显。加味小柴胡汤中这些药效不明显的物质部位是否存在配伍协同的增效机制,有待进一步深入探讨其成分配伍组方的协同作用^[5]。

据文献报道^[6-7],幽门螺旋杆菌(helicobacter pylori,HP)感染是导致慢性胃炎最常见的病因。本实验室前期对加味小柴胡汤及其有效物质部位群进行了抗 HP 的实验研究,具有明显抑制 HP 的药效作用^[8];本论文研究结果表明,该方剂及其有效物

质部位群具有显著抗炎作用。前次研究结果认为,加味小柴胡汤通过清除 HP 的途径发挥治疗慢性胃炎的作用;本次研究结果表明,该方剂直接通过抗炎效果发挥药效作用。综合分析本研究团队前后两次对加味小柴胡汤的研究结果,为该经验方治疗慢性胃炎的临床疗效提供了科学实验依据,其有效物质抗慢性胃炎的作用机理有待深入研究。

参 考 文 献

[1] 王明军. 试论现代中药衍生的“有效部位配伍”新药模式[J]. 中国中西医结合杂志,2008,28(1):73-76.
[2] 徐小龙,卢杰,余建强,等. 醋制老瓜头镇痛抗炎活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):221-225.
[3] 黄斌学,黄增琼,许小林,等. 乌柏叶提取物镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 中成药,2004,26(6):476-479.
[4] 刘思毅,袁红霞. 从药到方-《伤寒杂病论》小柴胡汤方证辨析[J]. 天津中医药,2014,31(8):504-506.
[5] 刘新军,苏式兵. 中药及其成分配伍组方的研究方法探析[J]. 中西医结合学报,2009,7(7):601-605.
[6] 陶景德,谢瑞华,王少峰,等. 慢性胃炎患者幽门螺杆菌感染与血脂及炎症因子的关系[J]. 中国现代医药杂志,2013,15(4):12-14.
[7] 谢兆兰,周立云,王明林,等. 慢性胃炎病人血清 CagA 抗体和胃黏膜炎症活性及 Hp 密度检测[J]. 齐鲁医学杂志,2014,29(1):40-42.
[8] 胡丽娟,刘蔚,吴欢欢,等. 加味小柴胡汤抗幽门螺杆菌的有效物质部位群研究[J]. 中国现代中药,2015,17(3):307-311.

(收稿日期: 2015-10-14)

(本文编辑: 蒲晓田)