

## 不同配伍组方小柴胡汤的人肝细胞毒性体外检测

*In vitro* detection of human liver cell toxicity induced by various recipes of Xiaocaihu decoction戈 萌<sup>1,2</sup>, 柴逸峰<sup>1\*</sup>, 季红光<sup>2</sup>, 陈晶晶<sup>2</sup>, 李玉琪<sup>2</sup>, 吴 峰<sup>2</sup>, 谢天培<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433; 2. 上海天甲生物医药有限公司, 上海 201203)

**[摘要]** **目的:**系统检测不同配伍组方小柴胡汤对人肝细胞的毒性,为减毒改良提供依据。**方法:**MTT法检测不同配伍组方小柴胡汤水煎液和超声萃取液对人肝癌细胞株(SMMC-7721)活性的影响,以此作为初筛,并用正常人肝细胞进行验证。**结果:**小柴胡汤原方、黄芩、黄芩+柴胡水煎液对人肝癌细胞株生长有显著抑制作用,作用强度原方<黄芩<黄芩+柴胡合煎液;黄芩+半夏、柴胡、半夏、人参、甘草、生姜和大枣水煎液无显著作用;超声法样品比水煎法样品的抑制作用弱。**结论:**小柴胡汤原方水煎液具有肝细胞毒性,主要毒性药材为黄芩,柴胡可增强黄芩的毒性,半夏可降低黄芩的毒性。

**[关键词]** 小柴胡汤;黄芩;肝细胞;毒性试验**[中图分类号]** R 282.71**[文献标识码]** B**[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1266-03

小柴胡汤出自《伤寒论》,由柴胡、黄芩、人参、半夏、甘草、生姜、大枣七味药组成,内科应用广泛<sup>[1]</sup>。近年有关小柴胡汤药理作用报道较多<sup>[2-3]</sup>,但有关毒理作用报道较少。有学者报道小柴胡汤及其类似方引起肝损害<sup>[4-5]</sup>。国内文献报道小柴胡汤提取物大鼠灌胃 180 d 未出现主要脏器病理改变和血液生化指标异常<sup>[6]</sup>。我们对不同配伍组方小柴胡汤进行了体外人肝细胞毒性检测,以明确其是否具有肝毒性及毒性来源,为减毒改良提供依据。

由于正常人肝细胞来源困难,且只能原代培养,难以大量用于筛选,本研究选用肝癌细胞株进行影响肝细胞活性的药物初筛,用正常人肝细胞进行验证。

**1 材料和方法**

**1.1 药物和试剂** 柴胡、制半夏、炙甘草、大枣购自上海康桥中药饮片有限公司;黄芩购自上海德华国药制品有限公司;人参购自上海信德中药公司饮片厂;生姜购于市场;对乙酰氨基酚、三苯氧胺和四甲基偶氮唑盐(MTT)购自Sigma公司;RPMI 1640培养基和小牛血清购自Gibco公司;青霉素和链霉素购自华北制药有限公司;二甲亚砜(DMSO)购自国药集团化学试剂有限公司。

**1.2 细胞株** 人肝癌细胞株 SMMC-7721 购自中国科学院上海细胞资源中心,正常人肝细胞由瑞德肝脏疾病研究所(上海)提供。

**1.3 仪器** 二氧化碳培养箱(Thermo Forma),酶标仪(上海雷勃分析仪器有限公司),超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司)。

**1.4 药材水煎液和超声萃取液的制备**

**1.4.1 小柴胡汤原方水煎液**(《伤寒论》张仲景方) 精密称取柴胡 4.286 g,黄芩 3.214 g,人参 2.143 g,制半夏 3.214 g,炙甘草 1.786 g,生姜 3.214 g,大枣 2.143 g,加 10 倍量水 200 ml,浸润过夜;加热煮沸,小火微沸煎 1 h,收集煎液,4 层纱布过滤,得滤液;剩余药渣加 8 倍量水 160 ml,同前述提取方法得滤液;合并滤液,单层滤纸过滤,加热浓缩至 20 ml,分别经 0.45 μm 和 0.22 μm 的微孔滤膜滤过。

**1.4.2 六味减方水煎液** 分别去掉一味药材的六味水煎液,共 7 种,量及制法同 1.4.1。

**1.4.3 两味减方水煎液** 黄芩分别与柴胡、半夏、人参、甘草、生姜、大枣合煎,共 6 种,量及制法同 1.4.1。

**1.4.4 单味药材水煎液** 单味药水煎液,共 7 种,量及制法同 1.4.1。

**1.4.5 原方超声萃取液** 精密称取 1.4.1 药材量,加 5 倍量水 100 ml,浸润过夜;超声 30 min,4 层纱布过滤,单层滤纸过滤,加热浓缩至 20 ml,分别经 0.45 μm 和 0.22 μm 的微孔滤膜滤过。

**1.4.6 柴胡、黄芩、黄芩+柴胡超声萃取液** 量及制法同 1.4.5。

**1.5 影响肝细胞活性药物的初筛** 所有实验药物终浓度分别为 5、10、20、30、40 mg/ml(相当于原方药材浓度);阳性对照为对乙酰氨基酚(5 mmol/L);阴性对照为 PBS。采用 RPMI 1640 培养基(含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素),将浓度  $5 \times 10^4$  /ml 的细胞接种于 96 孔板,培养过夜。弃原有液体,加含药培养液,每药物每浓度 4 个复孔。培养 24 h 后,加 MTT(5 mg/ml)20 μl/孔。37℃ 温孵 4 h 后,弃原有液体,加 DMSO 200 μl/孔。室温置 30 min,酶标仪 570 nm 测光密度(D)值。计算细胞活性:细胞活性(cell viability, %) = 实验组光密度值/对照组光密度值 × 100%。

**1.6 影响肝细胞活性的药物验证** 由瑞德肝脏疾病研究所完成。所有实验药物终浓度分别为 0.1、1、2、10、20、100 mg/ml(相当于原方药材浓度);阳性对照三苯氧胺(50 μmol/L);阴性对照 PBS。将原代培养的正常人肝细胞接种于 96 孔板,培养箱过夜。弃原有液体,加含药培养液,每药物每浓度 6 个复孔。培养 4 h 后,加 MTT(5 mg/ml)20 μl/孔。37℃ 温孵 4 h 后,弃原有液体,加 DMSO 150 μl/孔。室温震荡 10

**[基金项目]** 上海市科委中药现代化科技专项基金(05DZ19739)。Supported by Special Fund of Science and Technology Commission of Shanghai(05DZ19739)。

**[作者简介]** 戈 萌,硕士生。E-mail: mge@tengen-biomed.com

\* Corresponding author. E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

min, 酶标仪 570 nm 测光密度(D) 值。线性回归法求半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>), 计算细胞活性。

1.7 统计学处理 采用方差齐性检验和 *t* 检验。方差齐性检验的检验水准  $\alpha=0.1$ , *t* 检验的检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 影响肝细胞活性的药物初筛 小柴胡汤原方水煎液对

人肝癌细胞株生长有显著抑制(图 1A), 原方和柴胡超声萃取液无显著作用, 黄芩、黄芩+柴胡超声萃取液有显著抑制(图 1B); 六味减方水煎液中, 不含黄芩的水煎液无显著作用, 其他 6 种均有显著抑制(图 1C); 单药水煎液中, 仅黄芩有显著抑制, 其他单药均无显著抑制作用(图 1D); 两味减方水煎液中, 仅黄芩+半夏合煎液无显著作用, 其他 5 种均有显著抑制(图 1E)。

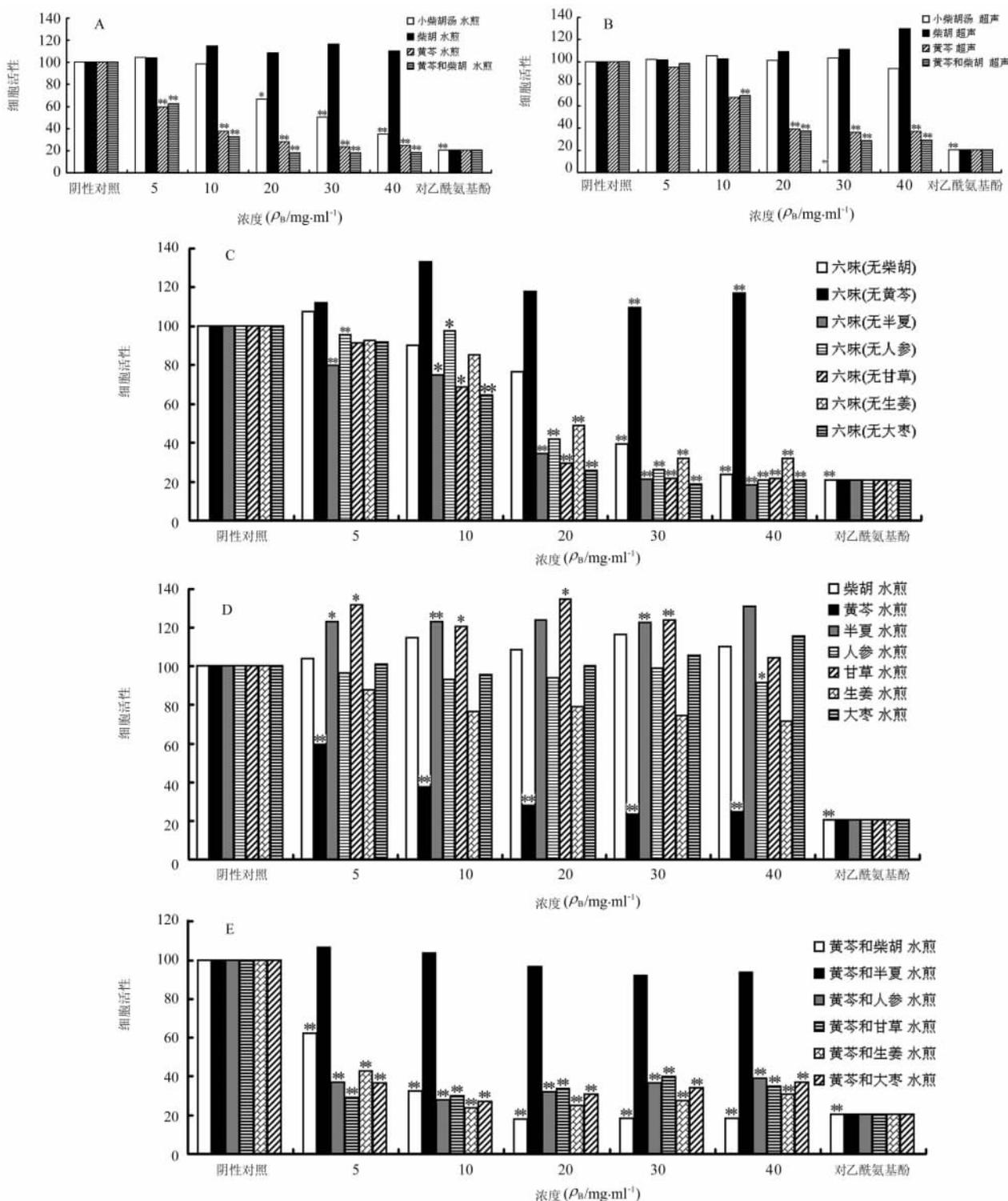


图 1 MTT 法检测不同制法(A,B)及不同配伍减方水煎液(C,D,E)对人肝癌细胞株活性的影响

A: 各水煎液; B: 各超声萃取液; C: 各六味减方水煎液; D: 各单味药水煎液; E: 各两味减方水煎液. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  与阴性对照比较

2.2 影响肝细胞活性的药物验证 小柴胡汤原方水煎液对正常人肝细胞生长有显著抑制作用,IC<sub>50</sub>为87 mg/ml(R<sup>2</sup>=0.670 4),原方超声萃取液无显著抑制(图2)。

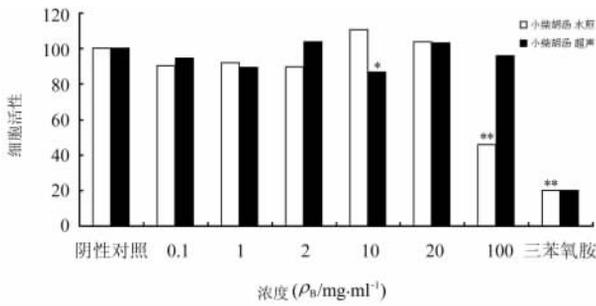


图2 MTT法检测不同制法小柴胡汤对正常人肝细胞活性的影响

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 与阴性对照组比较

### 3 讨论

由于正常人肝细胞来源困难,且只能原代培养,难以大量用于筛选,本研究选用肝细胞株进行影响肝细胞活性的药物初筛,用正常人肝细胞进行验证。

实验表明,小柴胡汤水煎液具有肝细胞毒性,这与其他学者的报道<sup>[4-5]</sup>相吻合。结果提示,小柴胡汤中起主要毒性作用的药材为黄芩;柴胡本身无毒,但可能与黄芩协同作用并增强黄芩的毒性;半夏对肝细胞起保护作用,从而降低了黄芩的毒性。有关该处方中导致肝细胞毒性的化学成分及其毒性机制还有待进一步研究。

本实验结果与国内动物体内实验报道<sup>[6]</sup>不相符,该体内实验中采用小柴胡汤提取物,但具体提取方法及化学组分不详。小柴胡汤为一含有多种成分的复杂化学体系,考虑其药理和毒理作用是多组分综合作用的结果,不同的提取制备工艺可导致其化学组分的改变,因此对其药理和毒理作用也会产生一定影响。本实验研究的小柴胡汤水煎液更接近《伤寒论》张仲景原方药材比例和制备方法。同时本实验仅为体外细胞学实验结果,不能推断出体内实验的情况,体内实验有待进一步开展。

### [参考文献]

[1] 李舒敏. 小柴胡汤在内科临床上的应用概况[J]. 广西中医学院学报, 2000, 17: 52-54.

[2] 郑辉, 左连东. 小柴胡汤诱导内异症异位内膜细胞凋亡的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18: 396-397.

[3] 茅敏, 付虹, 黄秀深, 等. 小柴胡汤诱导荷瘤小鼠 S<sub>180</sub> 细胞凋亡及对细胞周期的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14: 2646-2648.

[4] 甘典辉, 邓嫦. 部分中草药致药物性肝损害的报道综述[J]. 广西中医药, 2004, 27: 315-317.

[5] 顾文君, 刘春红, 沈锡中. 草药的肝毒性[J]. 世界临床药物, 2003, 24: 217-222.

[6] 彭龙玲, 杨亚斯, 曹毓, 等. 小柴胡汤提取物灌胃给药的长期毒性实验研究[J]. 时珍国医国药, 2003, 14: 517-519.

[收稿日期] 2007-07-10

[修回日期] 2007-10-10

[本文编辑] 尹茶

· 读者 作者 编者 ·

## 《第二军医大学学报》对一稿两投问题处理的声明

为维护学术研究的纯洁性和严肃性,同时也为了维护《第二军医大学学报》的声誉和广大读者的利益,现将本刊对一稿两投(包括一稿多投)问题的处理原则声明如下:

(1)本声明中的“一稿两投”主要指所涉及到的两篇论文尽管在文字的表达或讨论的阐述上可能存在某些不同之处,但其涉及的理论、主要实验数据和图表是相同的,或文中核心内容相同。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿以及在一种刊物上发表过摘要(简报)或初步报道而将进一步研究的全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿,应向有关期刊编辑部作出说明。

(2)凡来稿在接到编辑部回执后满3个月未接到退稿通知,则表明该稿件仍在处理过程中,作者如欲转投他刊,应事先与本刊编辑部联系并提出理由。

(3)编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时,将认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者,在作出处理决定前请作者就相关问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

(4)一稿两投一经证实,将择期在本刊刊出其作者单位和姓名以及撤消该论文的通告;2年内,《第二军医大学学报》将拒绝发表该文第一作者所撰写的一切文稿;并将就此事件向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

《第二军医大学学报》编辑部