

· 论著 ·

茵陈蒿汤抗游离脂肪酸对HepG2细胞脂毒性作用的效应中药研究

陈少东, 周海虹, 李雪梅, 林锦培, 范应, 徐维佳

(厦门大学医学院, 厦门 361005)

摘要: 目的: 探讨对游离脂肪酸(FFA)诱导人肝癌细胞株(HepG2)细胞脂肪沉积和对肿瘤坏死因子(TNF- α)分泌有显著抑制作用的茵陈蒿汤的效应中药或组合。方法: 采用FFA诱导HepG2细胞脂肪沉积和TNF- α 分泌的体外细胞模型和药物血清技术, 运用数学模型“均匀设计法”, 根据复方中的3味中药(茵陈、栀子、大黄), 选用U7(7⁶)表进行组方设计所得6种中药组合进行干预, 以对甘油三酯(TG)及TNF- α 的抑制效应作为考察指标, 筛选效应中药或组合, 并重新区间分组验证。结果: 茵陈和栀子在高剂量组合时有显著降低细胞TG及TNF- α 含量的效应, 与全方无显著性差异, 其中单一茵陈也可显著降低细胞TG及TNF- α 含量。结论: 茵陈及其与栀子的组合是茵陈蒿汤抑制FFA诱导HepG2细胞脂肪沉积和TNF- α 分泌作用的效应中药。

关键词: 茵陈蒿汤; HepG2细胞; 肝脂毒性; 游离脂肪酸; 甘油三酯; 肿瘤坏死因子; 均匀设计

基金资助: 福建省自然科学基金(No.2009J05089), 厦门大学医学院院长基金

Inhibitory effects of Yinchenhao Decoction on fatty deposition and TNF- α secretion in HepG2 cells induced by free fatty acid

CHEN Shao-dong, ZHOU Hai-hong, LI Xue-mei, LIN Jin-pei, FAN Ying, XU Wei-jia

(TCM College of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Objective: To study the effects of effective herbs in Yinchenhao Decoction (YD) on fatty deposition and TNF- α secretion of hepatic lipo-toxicity model in vitro. Methods: TG and TNF- α as the inspection target, apply the steatosis with TNF- α secretion lipo-toxicity model in vitro of HepG2 induced by long-chain FFA and uniform design U7 (76) form for YD, which had 3 herbs, to compound 6 kinds of different prescriptions, in order to look for the effective herbs or optimized group in YD. Results: The Chinese medicine Yinchen and its optimized group-Yinchen and Zhizi combination can remarkably reduce the TG and TNF- α content. Conclusion: The Chinese medicine Yinchen and its optimized group-Yinchen and Zhizi combination were effective herbs in YD for inhibiting fatty deposition and TNF- α secretion of hepatic lipo-toxicity model in vitro.

Key words: Yinchenhao Decoction; HepG2 cells; Hepatic lipotoxicity; Free fatty acid; TG; TNF- α ; Uniform design

Fund assistance: Natural Science Foundation of Fujian Province (No.2009J05089), Prexy Foundation of Medical College of Xiamen University

近年来临床实践和研究表明中医药对非酒精性脂肪肝的治疗有良好的效应和前景^[1]。但如何进一步剖析中药复方多途径、多环节的作用特点, 揭示其药理功能与物质基础的关系具有重要意义。本研究在既往对经方“茵陈蒿汤”(由中药茵陈、栀子、大黄组成)具有显著的抗脂肪肝效应基础上^[2], 采用游离脂肪酸(FFA)诱导HepG2细胞脂毒性的体外模型, 结合均匀设计法深入探讨该方针对抑制脂肪变性和肿瘤坏死因子(TNF- α)分泌作用环节的主效应中药或组合, 现报道如下。

材料与方法

1. 材料

1.1 细胞株 采用HepG2细胞, 购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。

1.2 动物 SD雄性大鼠, SPF级, 体质量300g左右, 购自中国科学院上海实验动物中心, 合格证号: SCXK(沪)2007-0005。用于制备药物血清。

1.3 药物 茵陈蒿汤由茵陈、栀子、大黄组成, 药物制备及质量控制如下: 茵陈1 000g, 加6 000mL 90%乙醇回流提取3次, 每次3h, 合并滤液, 60℃减压回

收乙醇,得含0.33g生药/mL的提取物。大黄1 000g制备方式同茵陈,得含0.165g生药/mL的提取物。栀子1 000g,加纯水6 000mL浸泡1h,煎取3次,水提液浓缩至相对密度[1.08-1.12(80[°])]后,采用60%乙醇纯化工艺,以尽可能保留有效成分,除去杂质,得含0.165g生药/mL的提取物。中药购自北京同仁堂福建药业有限公司。

1.4 试剂 胎牛血清(FBS)购自上海实生细胞生物技术有限公司。PRMI-1640培养基干粉购自GIBCO公司。棕榈酸(palmitic acid, P0500),油酸(oleic acid, O1008)购自Sigma公司。甘油三酯(TG)、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒购自南京建成生物制品研究所。酶联免疫吸附分析(ELISA)人血浆TNF-检测试剂盒购自Biosource公司。

1.5 主要仪器 低温高速离心机(1.0R)和CO₂培养箱,德国Heraeus公司制造。HFsafe-1500型生物安全柜,HEAL FORCE公司产品。倒置显微镜(37×B),上海生产。Philips Tecnai电子显微镜。M5多功能酶标仪,美国Molecular Devices公司产品。0.22、0.45μm微孔滤膜,上海半岛实业有限公司净化器材厂产品。60mm培养皿,6、24、96孔培养板,均为美国Corning公司产品,购自上海实生细胞生物技术有限公司。分析电子天平,美国Denver公司生产,高压消毒锅,美国Yamato Scientificwc公司产品。

2. 方法

2.1 细胞培养方法 HepG2细胞株以0.25%胰酶/0.02%EDTA消化传代,以含10%胎牛血清的PRMI-1640培养液在含5%CO₂/95%空气的37[°]培养箱中培养。加药前以无血清PRMI-1640洗涤2次。

2.2 FFA刺激HepG2模型制备 参照文献以FFA刺激HepG2刺激24h造模^[3]。FFA组成为油酸:棕榈酸为0.5mmol :0.25mmol。

2.3 均匀设计实验方案 根据均匀实验设计方案^[4]选用U7(7⁶)表,将方中3味中药作为考察因子,以X1、X2、X3分别代表茵陈、栀子、大黄,每个因子各取6个水平(水平为100g大鼠每日给药量),分别为X1在0.07-0.334g,X2、X3在0.035-0.167g的剂量范围内递增所得。同时根据U7(7⁶)使用表安排各因子和水平,进行组方设计,得均匀设计“筛选”实验组方见表1,表中每列为各味中药,每行为1种不同药物剂量的组方,按表中行数值取相应克数的药混合即得此组方,共6组。各组均为单味药物煎取后再混合所得。

2.4 药物血清制备 根据表1均匀设计实验方

案,按10mL/kg鼠体质量给大鼠灌服相应药物提取液,2次/d,连续3d,末次灌胃结束后禁食,1h后无菌条件下从腹腔静脉取血,静置3-4h,3 000r/min、20min、4[°]离心,超净台上分离血清。将分离得到的血清置于56[°]水浴中30min灭活,-70[°]冷藏备用。

表1 均匀设计“筛选”实验组方(g)

组方号	茵陈(X1)	栀子(X2)	大黄(X3)
组1	0.174	0.14	0.167
组2	0.07	0.061	0.113
组3	0.334	0.087	0.14
组4	0.28	0.167	0.061
组5	0.122	0.113	0.087
组6	0.226	0.035	0.035

2.5 分组与用药

2.5.1 均匀设计实验:按表1均匀设计组1-组6,同期另设正常组与模型组以检验模型有效性,每组各4皿。正常组、模型组添加10%正常大鼠血清,均匀设计各组分别添加相应10%药物血清,同时添加FFA(除正常组外)刺激24h后收集细胞,测细胞内TG含量及细胞上清TNF- α 水平,并进行统计分析,筛选效应中药或组合。

2.5.2 均匀设计结果验证:在上述均匀设计实验结果基础上,对实验结果进行验证。分正常组、模型组、药物组(茵陈蒿汤组、效应中药组),每组各4皿。正常组、模型组添加10%正常大鼠血清,药物组分别添加相应10%药物血清,同时添加FFA(除正常组外),刺激24h后收集细胞,测细胞内TG、细胞上清TNF- α 含量。

2.6 检测项目和方法

2.6.1 细胞内TG含量:参考Heider J G等^[5]方法提取细胞层总脂质,采用试剂盒测定。

2.6.2 细胞上清TNF- α 含量:酶联免疫吸附分析法(ELISA)。

2.7 统计学方法 所有数据均使用SPSS 12.0软件包进行统计学分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。均匀设计实验采用逐步回归分析(以 $\alpha=0.05$ 为显著水准进行统计检验)。组间比较采用单因素方差分析q检验。

结果

1. 对细胞内TG及上清TNF- α 含量影响的效应中药的逐步回归分析 根据均匀设计表所设计的各组实验结果(均值)见表2,经多元逐步回归分析,结果显示:针对抑制脂肪沉积关键指标(TG)和炎症损伤

关键指标(TNF- α)获得回归方程,根据线性差值的统计学原理得出,最大限度降低细胞内TG含量的效应中药及其剂量是茵陈0.334g,栀子0.167g。而最大限度降低上清TNF- α 含量的效应中药及其剂量是茵陈0.334g,见表3。

表2 均匀设计各组细胞内TG含量及上清TNF- α 含量的检测结果($\bar{x} \pm s$, n=4)

组别	TG (mg g ⁻¹ prot ⁻¹)	TNF- α (pg mg ⁻¹ prot ⁻¹)
组1	423	55.3
组2	397	55.4
组3	305	35.6
组4	385	29.8
组5	378	28.1
组6	297	23.5

表3 逐步回归分析结果

指标	回归方程	P
TG	Y=536-978X1X2	0.009
TNF- α	Y=56.14-52.7X1	0.022

2. 效应中药或组合药物血清抑制TG沉积作用的验证结果

2.1 细胞内TG含量变化 FFA刺激24h,模型组细胞内TG含量较正常组极显著升高(P<0.01),而药物组(茵陈蒿汤组、效应中药组、茵陈组)细胞内TG含量均较模型组有所降低。其中茵陈蒿汤组、茵陈组与模型组比较有统计学差异(P<0.05),由茵陈与栀子组成的效应中药组较模型组明显降低,两者比较具有极显著差异(P<0.01),见表4。

表4 各药物血清组对HepG2细胞内TG含量及上清TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s$, n=4)

组别	TG (mg g ⁻¹ prot ⁻¹)	TNF- α (pg mg ⁻¹ prot ⁻¹)
正常组	75 \pm 19	69 \pm 12
模型组	348 \pm 38	148 \pm 35
茵陈蒿汤组	247 \pm 55 [*]	82 \pm 23 [*]
效应中药组	234 \pm 32 ^{**}	72 \pm 13 [*]
茵陈组	270 \pm 29 [*]	75 \pm 11 [*]

注:与正常组比较, P<0.05, ^{*}P<0.01;与模型组比较,^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01。

2.2 细胞上清TNF- α 含量变化 FFA刺激24h,模型组细胞上清TNF- α 含量较正常组显著升高(P<0.05),而茵陈蒿汤组、效应中药组、茵陈组细胞上清TNF- α 含量均较模型组有所降低,比较有统计学差异(P<0.05),见表4。

讨论

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是生理(病理)的遗传环境下多种代谢失调的结果^[6]。在NAFLD的发病中,FFA异常增多起着重要的作用。在病理状态下,FFA具有很强的细胞毒性,它可作为去垢剂损害细胞质、线粒体和溶酶体膜等,引起生物膜损伤^[7]。FFA作为潜在的细胞毒素,能引起脂质在非脂肪组织中过量蓄积,进而引起细胞损伤和死亡,因此是一个重要的脂毒性介导因子^[8]。Feldstein等^[3]研究发现,FFA可以通过肝细胞溶酶体途径刺激血清TNF- α 表达,造成肝脏脂毒性。本实验结果显示,FFA刺激24h后,模型组TG含量显著增高,胞质内脂滴明显增多,同时细胞内TNF- α 表达也显著升高,提示该模型存在显著的脂肪变性、肝损伤。

均匀设计法是将数论和多元统计相结合的一种实验设计方法,适用于多因素、多水平的实验研究。其方法是让实验点在其实验范围内充分地“均匀分散”,这样每个实验点就可以具有更好的代表性,实验点的数目也可大幅度地减少,且实验结果可通过计算机处理,运用回归方程分析各因素对实验结果的影响,得出理论的最佳实验条件,因此具有方便、适用、预测性好的特点。目前均匀设计已广泛应用于工艺筛选,近年来也越来越多的应用于复方药物筛选的研究,如余日跃等^[9]用均匀设计法分析了大承气汤的配伍规律。

本研究以对实验性脂肪肝有显著抑制作用的茵陈蒿汤为研究对象,运用FFA诱导HepG2细胞脂肪沉积和TNF- α 分泌的体外细胞模型和药物血清技术,采用“均匀设计法”进行作用位点效应中药或组合的分析。经均匀设计筛选及验证实验证实,茵陈与栀子两味药物组合是抑制脂肪沉积的效应中药,最佳剂量分别是0.334、0.167g,而对TNF- α 具有抑制作用的主效应中药是茵陈,最佳剂量为0.334g。从而提示了经方茵陈蒿汤中的茵陈及其与栀子的组合是其抑制FFA诱导HepG2细胞脂肪沉积和TNF- α 分泌作用的效应中药。

通过本研究发现,均匀设计法有助于解决中药复方“物质基础不明,效应中药不清”的科学难题,还为实现中药复方效应中药的“去粗取精”,为今后开展中药复方配伍理论研究提供了新的思路与方法。

参 考 文 献

[1] 胡义扬.加强中医药治疗脂肪性肝病的深入研究.中国中西医结合杂志.2004,24(1):12

HU Yi-yang.To Strengthen Further Study on Treatment of Lipoidal Liver Diseases by Traditional Chinese Medicine.Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine,2004,24(1):12

[2] 梁惠卿,陈少东,张其清.茵陈蒿汤防治大鼠非酒精性脂肪性肝炎的实验研究.光明中医,2009,23(2):212-214
LIANG Hui-qing,CHEN Shao-dong,ZHANG Qi-qing.Study Lntervening Effect of Yinchenhao Decoction on Nonalcoholic Fatry Liver D:sease(NAFLD)Model in Rats.Guangming Journal of Chinese Medicine,2009,23(2):212-214

[3] Feldstein A E,Werneburg N W,Canbay A,et al.Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway.Hepatology,2004,40:185-194

[4] 方开泰.均匀设计及其应用.数理统计与管理,1994,13(1):57
FANG Kai-tai.Application of uniform design.Application of Statistics and Management,1994,13(1):57

[5] Heider J G,Boyett R L.The picomole determination of free and total cholesterol in cells in culture.J Lipid Res,1978,19(4):514-518

[6] Unger R H.Lipotoxic diseases.Annu Rev Med,2002,53:319-336

[7] Unger R H.The physiology of cellular liporegulation.Annu Rev Physiol,2003,65:333-347

[8] Unger R H,Orci L.Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. Biochim Biophys Acta,2002,1585:202-212

[9] 余日跃,朱家谷,谢文光,等.均匀设计法对大承气汤泻下作用的实验研究.中药药理与临床,1999,15(5):729
YU Ri-yue,ZHU Jia-gu,XIE Wen-guang,et al.Experiment research of purgation effect of Da Chengqi Tang by uniform design. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica,1999,15(5):729

(收稿日期:2010年3月20日)

· 论著 ·

试论经筋理论对推拿治疗腰椎间盘突出症的指导意义

雷龙鸣¹, 韦英才²

(¹广西中医学院第一附属医院, 南宁 530023; ²广西民族医药研究所壮医推拿科, 南宁 530001)

摘要: 在推拿治疗腰椎间盘突出症的理论与临床研究中, 多从传统经络腧穴理论或现代生物力学理论寻找理论依据或突破口, 而关于经筋理论对推拿治疗本病的指导却少有涉及与研究。事实上民间尤其是部分少数民族地区却广泛流传着应用经筋理论通过寻找并弹拨经筋结聚处的方法来治疗各种疼痛性疾病的经验。基于此, 文章从经筋理论基本概念、经筋理论对腰椎间盘突出症病因病机的认识以及指导如何选取推拿操作部位、如何运用推拿手法等几个方面, 就经筋理论对推拿治疗本病的指导意义这一问题进行了探讨。

关键词: 经筋; 经筋理论; 腰椎间盘突出症; 病因病机; 推拿部位; 推拿手法

基金资助: 国家“十一五”科技支撑计划项目资助(No.2007BAI48B07-2), 广西卫生厅重点课题(No.重200937)

Discussing on treatment of lumbar disc herniation by massotherapy from musculature theory

LEI Long-ming¹, WEI Ying-cai²

(¹The First Affiliated Hospital of Guangxi TCM University, Nanning 530023, China; ²Massage Department of Guangxi National Medicine Institute, Nanning 530001, China)

Abstract: Studies on theory and clinic of massage in treating lumbar disc herniation were usually done some aspects of traditional meridians and acupoints theory or modern biomechanics theory, few was down on basis of the guidance of musculature theory for massage in treating lumbar disc herniation. In fact, it was used generally by civilian doctors and minor ethnic doctors in clinic. So, this article discussed the guidance of musculature theory for massage in treating lumbar disc herniation from following aspects: basic concept of musculature theory, the understanding on etiopathogenesis and pathogenesis of lumbar disc herniation in musculature theory, the selection of massage location and manipulation maneuver, etc.