

左金丸及其类方对胃寒证大鼠的影响(II)

赵艳玲¹, 史文丽², 山丽梅¹, 王伽伯¹, 赵海平¹, 肖小河^{1*}

(1. 解放军 302 医院中药研究所, 北京 100039; 2. 解放军 302 医院中西医结合科, 北京 100039)

[摘要] 目的: 研究左金丸及其类方对胃寒证大鼠及相关炎性细胞因子的影响。方法: 通过 ig 4℃冷水及 0.3 mol·L⁻¹ 冷 NaOH 建立大鼠胃寒证模型, 考察左金丸及其类方对胃寒证大鼠胃黏膜损伤的作用及血清中相关细胞因子的作用。结果: 左金丸及其类方可不同程度改善胃寒证大鼠胃黏膜损伤; 同时降低胃寒证大鼠血清中白细胞介素 8(IL-8)、白细胞介素 2(IL-2)、干扰素 α(INF-α)、血栓素 B₂(TXB₂)、6-酮前列腺素 1α(6-keto-PGF₁α) 水平, 其中以反左金改善效果最好。结论: 左金丸及其类方对胃寒证大鼠及相关细胞因子的作用与其方剂的寒热程度具有一定的相关性。

[关键词] 左金丸; 类方; 大鼠; 胃寒证; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)12-0062-03

中药四性即寒、热、温、凉 4 种功能之气, 反映了药物对人体盛衰、寒热变化的作用倾向, 是从药物作用于机体后所产生的反应概括出来的药效性质^[1]。事实上, 中药的寒、热、温、凉特性亦是物质效应的反映, 中药作用于机体后必有细胞代谢水平的变化^[1]。吴茱萸和黄连作为对药配伍应用的历史非常悠久, 在长期的实践中形成了吴茱萸和黄连不同配伍组成的“形似而神不同”的经典类方。早在北宋,《太平圣惠方·治水泻诸方》中就载有茱萸原方, 由黄连和吴茱萸(1:1)组成, 主治虚寒型下痢水泻。左金丸方出元·朱丹溪《丹溪心法》, 由黄连和吴茱萸以 6:1 组成, 主治肝火犯胃证。反左金由黄连、吴茱萸按 1:6 组成, 临床用于肝寒犯胃证。《圣济总录·中门》载甘露散, 由黄连和吴茱萸(2:1)组成, 主治暑气为病。研究表明, 左金丸及其类方对胃黏膜均具有一定的保护作用。但由于其寒热偏性的不同, 对于不同胃黏膜损伤的保护作用有选择性^[2]。为进一步比较左金丸及其类方对胃寒证的药理作用, 探讨其对寒证作用的可能机制, 本文以胃寒证大鼠为研究对象, 分析左金丸及其类方对胃寒证动物胃黏膜的选择性保护作用, 并观察了各方对胃寒证大鼠炎症因子的影响, 为左金丸及其类方寒热表达的差异提供研究基

础。

1 材料

1.1 受试药物 ①左金丸即黄连: 吴茱萸(6:1), 每 g 干膏粉含 3.45 g 生药; ②反左金即黄连: 吴茱萸(1:6); 每 g 干膏粉含 2.69 g 生药; ③甘露散即黄连: 吴茱萸(2:1); 每 g 干膏粉含 2.99 g 生药; ④茱萸丸即黄连: 吴茱萸(1:1); 每 g 干膏粉含 2.93 g 生药。按每 kg 大鼠给予 7.2 g 生药量计, 则每 kg 大鼠需左金丸干膏粉 2 g; 反左金干膏粉 2.6 g; 甘露散干膏粉 2.4 g; 茱萸丸干膏粉 2.5 g。使用时分别以蒸馏水配成实验所需浓度。

1.2 试剂 IL-8, IL-2, INF-α, TXB₂, 6-keto-PGF₁α 试剂盒由北京普尔伟业生物科技有限公司提供, 批号: 20080627。

1.3 动物 SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 180 g~200 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号 SCXK(京)2007-2010。动物自由摄食饮水, 饲养室光照 12 h, 黑暗 12 h, 室温为 25~27℃。

1.4 仪器 SN-682 型放射免疫(计数器, 上海核福光电仪器有限公司。DDL-5 型低速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂制造。

2 方法

2.1 胃寒证大鼠造模^[3] 造模时间 3 d。前 2 d 大鼠按 20 mL·kg⁻¹ ig 4℃冰水每天 3 次(隔 6 h 1 次)。然后, 大鼠禁食不禁水 24 h, 给大鼠 ig 0.3 mol·L⁻¹ 的 4℃冷 NaOH 溶液 10 mL·kg⁻¹, 制成胃寒证模型。给予冰 NaOH 溶液, 1 h 后处死动物。

[收稿日期] 2009-03-09

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2007CB5-12607); 国家自然科学基金项目(30772740)

[通讯作者] * 肖小河, Tel: (010) 66933322

2.2 给药方法 按每 kg 大鼠给予 7.2 g 生药量计, 给提取物左金丸干膏粉 $2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 反左金干膏粉 $2.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 甘露散干膏粉 $2.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 茺莢丸干膏粉 $2.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。使用时分别以蒸馏水配成实验所需浓度。采取防+ 治的方法。造模前给药 3 d, 造模开始后继续给药治疗 3 d, 给大鼠 $\text{ig } 0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷 NaOH 溶液 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 1 h 后处死动物。

2.3 检测指标^[4] IL-8, IL-2, INF- α , TXB₂, 6-keto-PGF₁ α 含量测定: 取大鼠股动脉血, 注入试管中待凝固后, 分离血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

2.4 病理组织学检测 大鼠处死后迅速切腹取胃, 向胃内注入 10% 甲醛固定, 10 min 后沿胃大弯曲部剪开, 冲洗干净, 固定于 10% 福尔马林溶液内, 常规石蜡包埋制片, HE 染色, 光镜下观察胃黏膜组织学特点, 并测量胃黏膜损伤的面积, 以损伤区域的最大距离为长轴, 以损伤区域垂直于长轴的适中距离为宽度, 计算损伤面积^[3]。

2.5 统计学方法 各组损伤面积及细胞因子表达水平均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间差异统计用单因素方差分析, $P<0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 左金丸及其类方对胃黏膜损伤的影响

3.1.1 肉眼观察 正常大鼠胃黏膜色泽淡红, 表面光滑有弹性, 黏膜皱壁完整。模型组大鼠胃黏膜呈潮红充血状态, 表面有斑点状糜烂、出血, 胃黏膜表面有苔状分泌物或皱壁明显受损。反左金治疗组大鼠胃黏膜呈淡红色, 基本无充血及斑点。左金丸有少量充血点。茺莢丸少有点状糜烂。与模型组相比, 左金丸及其类方均能保护胃寒证大鼠胃黏膜损伤。其保护作用顺序为: 反左金> 茺莢丸> 甘露散> 左金丸。见表 1。

表 1 左金丸及其类方对胃寒证大鼠胃黏膜损伤的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量 (生药 $\cdot\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	损伤面积(μm^2)
模型组	—	23 675.32 $\pm$ 6 459.98
模型+ 左金丸	7.2	4 920.63 $\pm$ 1 456.71 ²⁾
模型+ 反左金	7.2	2 683.56 $\pm$ 1 341.03 ²⁾
模型+ 甘露散	7.2	3 280.18 $\pm$ 2 436.16 ²⁾
模型+ 茺莢丸	7.2	3 170.00 $\pm$ 3 487.45 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

3.1.2 病理学观察 正常大鼠胃黏膜上皮细胞呈

单层柱状, 排列整齐, 胃底腺形状规则, 结构清晰, 层次分明。模型组可见胃黏膜大片溃疡和遍及全层的炎细胞浸润, 黏膜腺体间炎细胞密度大, 腺体有破坏。坏死的黏膜和渗出物游离。左金丸组可见胃黏膜上皮腺体有轻度坏死脱落, 及部分炎细胞浸润。反左金组胃黏膜较模型组得到明显改善, 胃黏膜溃疡已修复, 炎症较轻。甘露散组大鼠胃黏膜腺上皮有浅溃疡和轻度炎症。茺莢丸组胃腺上皮的溃疡已基本平复, 但炎症还在。综合病理学观察结果可见, 反左金对胃寒证大鼠胃黏膜的保护作用最好。见图 1。

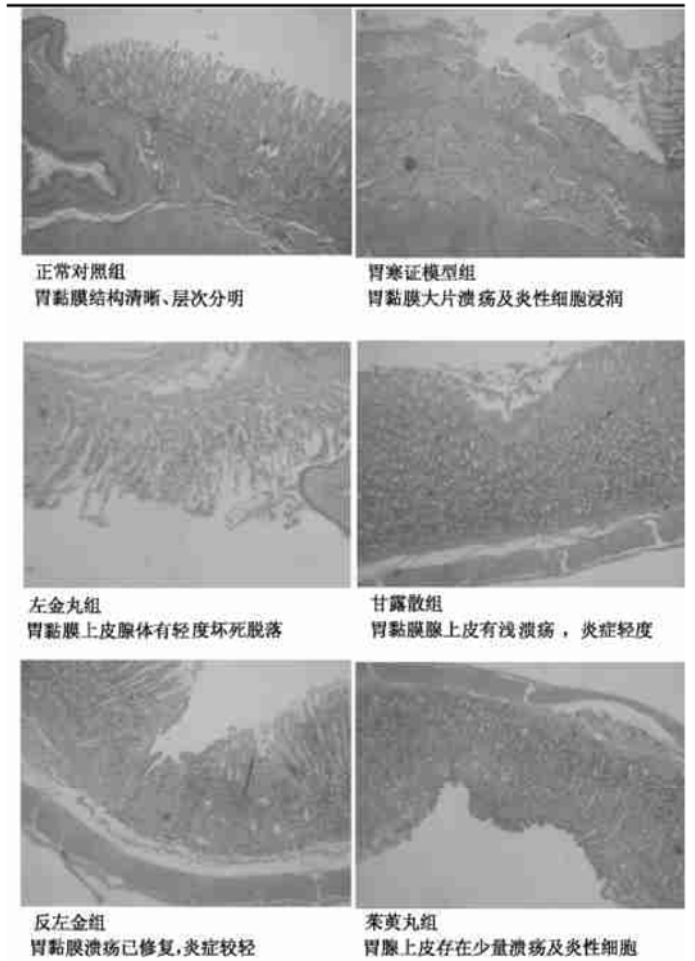


图 1 各组大鼠胃黏膜病理切片(HE $\times 40$ 倍)

3.2 左金丸及其类方对胃寒证大鼠血清中相关炎性细胞因子表达的影响 结果显示, 胃寒证模型组大鼠血清中 IL-8, IL-2, INF- α , TXB₂, 6-keto-PGF₁ α 含量均高于正常组($P<0.01$), 说明以上炎性细胞因子水平与大鼠胃寒证密切相关。左金丸及其类方治疗组可降低 IL-8, IL-2, INF- α , TXB₂, 6-keto-PGF₁ α 含量, 但降低的程度不同(见表 2)。实验结果提示: 反左金丸治疗大鼠胃寒证作用最好。

表 2 左金丸及其类方对胃寒证大鼠炎症细胞因子表达的影响($n=10$)

组别	INF- α ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TXB ₂ ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	6-keto-PGF ₁ α ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-8($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-2($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
正常	0.85 $\pm$ 0.14	217.26 $\pm$ 28.61	160.52 $\pm$ 12.16	0.28 $\pm$ 0.08	2.38 $\pm$ 0.16
模型	1.28 $\pm$ 0.23	353.65 $\pm$ 38.18	386.28 $\pm$ 18.77	0.59 $\pm$ 0.09	4.87 $\pm$ 0.38
左金丸	1.12 $\pm$ 0.18 ¹⁾	339.14 $\pm$ 18.27 ¹⁾	353.57 $\pm$ 31.24 ¹⁾	0.51 $\pm$ 0.11 ¹⁾	4.12 $\pm$ 0.46 ¹⁾
甘露散	1.09 $\pm$ 0.28 ¹⁾	327.66 $\pm$ 29.38 ²⁾	342.87 $\pm$ 26.22 ²⁾	0.48 $\pm$ 0.06 ²⁾	3.67 $\pm$ 0.54 ¹⁾
茺萸丸	0.99 $\pm$ 0.15 ²⁾	271.83 $\pm$ 39.63 ²⁾	238.43 $\pm$ 19.26 ²⁾	0.46 $\pm$ 0.13 ¹⁾	3.32 $\pm$ 0.66 ²⁾
反左金	0.89 $\pm$ 0.11 ²⁾	256.98 $\pm$ 31.26 ²⁾	221.22 $\pm$ 22.18 ²⁾	0.38 $\pm$ 0.12 ²⁾	2.96 $\pm$ 0.73 ²⁾

4 讨论

本文选取中医经典名方左金丸及类方反左金丸、茺萸丸和甘露散为代表方剂,认识和评价中医经典类方的相似性和差异性。我们试行通过“黄连吴茺萸对药”对大鼠胃寒证的研究,为左金丸及类方的研究提供参考。

近年来,不少学者运用现代科学方法对寒热证的本质进行了探讨^[6],并对胃寒证的动物模型、体质研究及形成机理等方面进行了广泛研究^[7]。根据阴(寒)盛伤阳的理论和脾与胃的关系,采用冰水加冰 NaOH 以保证寒凉因素的强度与时间得到满足,从而建立大鼠寒证胃黏膜损伤模型。从造模方法的临床表现和结果分析,采用反复冰水灌胃后再加用冰氢氧化钠方法,动物出现了类似脾胃寒凉的临床症状,所造成的病理改变更接近于中医所谓“寒邪直中脾胃”的胃寒证表现。同时胃黏膜呈现出炎症性质改变,胃黏膜自身结构和机能受到影响。

以往的研究表明:炎症因子 IL-2 和 IL-8 等与中医寒热辨证有一定的相关性,可作为辨证的参考指标^[8]。前列腺素能影响胃黏膜血流量并具有胃肠黏膜的细胞保护作用。胃溃疡、十二指肠溃疡、糜烂性胃炎胃窦部黏膜 TAX2 合成量明显高于正常人^[9]。本实验中,胃寒证模型组大鼠血清 IL-2, IL-8, INF- α , TXB₂, 6-keto-PGF₁ α 显著高于正常对照组,胃寒证使其含量增多。经治疗后,茺萸丸组、甘露散组和左金丸组对大鼠胃寒证炎症因子有一定的降低作用,但有一定差异。对胃寒证大鼠胃黏膜改善作用的顺序为反左金> 茺萸丸> 甘露散> 左金丸。反左金丸组细胞因子水平显著降低,同时有明显改善胃寒证病理改变的作用。实验结果显示,在寒证模型上,温性药为主的反左金发挥了明显的治疗作用,反映出黄

连和吴茺萸二药相伍的意义。同时,验证这种配伍比例的变化对寒热证型的不同适用有利于临床的辨证施治。综上可知,左金丸及其类方在寒证模型上的证治药效不同,同时对炎症因子作用水平亦不同。提示:抑制炎症细胞因子水平可能是左金丸及其类方改善大鼠胃寒证作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 王晓红, 苗明三, 郭 艳, 等. 从药性理论的来源看现代药理研究[J]. 河南中医, 2007, 27(6): 6-8.
- [2] 赵艳玲, 史文丽, 山丽梅, 等. 左金丸及其类方对大鼠胃寒证模型影响的差异(I)[J]. 中西医结合杂志英文版, 2009, 15(3): 286-290.
- [3] 陈艳芬, 陈蔚文, 李茹柳. 大鼠寒热型胃黏膜损伤模型的研究[J]. 中药药理与临, 2002; 18(2): 44-46.
- [4] 张学智, 纪保安, 陈宝雯. 幽门螺杆菌、炎症、IL-8 与十二指肠溃疡的寒热辨证[J]. 中医杂志, 1998, 39(10): 616-618.
- [5] 胡良平. 现代统计学与 SAS 应用[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002, 81-88.
- [6] 成秀梅, 杜惠兰. 寒证动物模型及本质研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(11): 872-875.
- [7] 樊雅莉, 张宇鹏, 蒋小丽, 等. 大鼠虚寒证模型部分指标相关性的初步研究[J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(1): 4-7.
- [8] 张青蓓, 马俊江. 细胞因子在消化道溃疡发生发展及修复过程中的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 1999, 15(1): 73-75.
- [9] Lee KH, Bae SH, Lee SH. Relationship between urokinase-type plasminogen receptor, interleukin-8 gene expression and clinicopathological features in gastric cancer[J]. Oncology, 2004, 66(3): 210-217.