

星点设计-效应面法优选七珠胶囊预防 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤 最佳剂量配伍的研究 *

陶 山¹, 李 倩¹, 范 妤^{1,2Δ}, 翟秉涛², 史晓燕¹, 段丽芳¹

(1. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046;

2. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

摘要: **目的** 优选七珠胶囊各组分在预防 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤中的最佳剂量配伍比例。**方法** 复制 CCl₄ 致小鼠急性化学性肝损伤模型, 检测小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)含量并以此作为药效评价指标, 应用星点设计对太白橐木总皂苷、湖北海棠总黄酮、叶下珠总多酚进行多因素水平配伍实验设计, 对实验结果进行多元回归拟合, 获得二项多次回归模型方程, 根据二项式拟合方程绘制出的因素对指标影效趋势的三维效应面图, 筛选七珠胶囊各组分预防急性肝损伤的最佳剂量配伍比例。**结果** 实验过程中各组小鼠饮食、活动佳, 未见不良反应, 无死亡。通过星点设计-效应面法得到七珠胶囊的最佳剂量配伍为太白橐木总皂苷 0.05 g/kg, 湖北海棠总黄酮 0.84 g/kg, 叶下珠总多酚 1.25 g/kg。**结论** 星点设计-效应面法用于七珠胶囊剂量配伍优化筛选, 方法简便且预测性好, 可为七珠胶囊的临床应用提供有效的科学依据。

关键词: 七珠胶囊; 星点设计-效应面法; 急性肝损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2020)05-0016-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2020.05.004

Study on the Optimal Compatibility Ratio of Qizhu Capsule in Preventing Acute Liver Injury Caused by CCl₄ in Mice by Central Composite Design-Response Surface Methodology

TAO Shan¹, LI Qian¹, FAN Yu^{1,2}, ZHAI Bintao², SHI Xiaoyan¹, DUAN Lifang¹

(1. The Basic Medical College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Shaanxi Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Foundation and New Drug
Research, Xianyang 712046, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the best dosage and proportion of each component of Qizhu Capsule in the prevention of CCl₄ induced acute liver injury in mice. **Methods** The CCl₄ induced acute chemical liver injury model in mice was established. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were detected and used as pharmacodynamic evaluation indexes. The experimental design of multi factor compatibility of total saponin of *Aralia elata*, total flavonoid of *Begonia hupehensis* and total polyphenol of *Phyllanthus* were carried out by using the central composite design-response surface methodology. The experimental results were fitted by multiple regression, and more than two items were obtained according to the binomial fitting equation, the three-dimensional effect surface map of the influence trend of factors on the index was drawn, and the best dosage and compatibility ratio of each component of Qizhu Capsule were screened. **Results** During the experiment, the mice in each group had good diet and activity, no adverse reactions and no

收稿日期: 2020-07-31

* 基金项目: 陕西省中医药管理局项目(15-ZY002);陕西省中药基础与新药研究重点实验室开放基金(2017KF03);陕西中医药大学创新团队项目(2019-YL14)

第一作者简介: 陶山(1994-),女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合基础研究。

Δ通信作者: 范妤, E-mail: 806919125@qq.com

death. The best compatibility of Qizhu Capsule was 0.05 g/kg total saponins of *Aralia taibaiensis*, 0.84 g/kg total flavonoids of *Begonia hupehensis* and 1.25 g/kg total polyphenols of *Phyllanthus*. **Conclusion** Central composite design-response surface methodology could be applied to optimize the compatibility conditions of Qizhu Capsule. This method is simple and predictive, which may provide an effective scientific basis for its clinical application.

KEY WORDS: Qizhu Capsule; central composite design-response surface methodology; acute liver injury

七珠胶囊由太白橐木、湖北海棠、叶下珠 3 味中药组成,针对“湿热毒邪内侵,肝失疏泄,气滞血瘀”的中医理论^[1],以解毒祛湿、疏肝化瘀为治法进行组方遣药,主要用于治疗急慢性肝炎、肝损伤、肝纤维化。太白橐木具有驱风湿、散瘀血、止痛的功效。近年研究发现,太白橐木具有抗氧化、抗炎等作用,临床多用于治疗各种肝炎、肝硬化以及淋巴结肿大等症^[2-4]。湖北海棠具有养肝和胃、消积化滞等功效,以往研究表明,湖北海棠对急慢性肝损伤有显著的保护作用^[5-8]。叶下珠具有平肝清热、利水解毒的功效,在治疗传染性肝炎、痢疾等病中有很好的疗效^[9-10]。本实验以太白橐木、湖北海棠、叶下珠 3 味药的有效部位提取物—太白橐木总皂苷、湖北海棠总黄酮、叶下珠总多酚作为七珠胶囊原料进行配伍,通过腹腔注射 CCl₄ 橄榄油溶液复制急性肝损伤小鼠模型,应用星点设计-效应面法优选确定七珠胶囊在预防急性肝损伤中各组分配伍的最佳剂量,为其临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6 周龄昆明种小鼠 136 只,雌雄各半,体质量(20±2)g,清洁级,由西安交通大学动物实验中心提供,动物生产许可证号:SCXK(陕)2012-003。适应性饲养于(25±2)℃恒温动物房中,正常明暗交替,自如饮食饮水。

1.2 药物与试剂 太白橐木药材购于陕西眉县药材公司,经陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为五加科(*Araliaceae*)植物太白橐木(*Aralia taibaiensis*)的根皮;湖北海棠药材购自湖北神农架药材公司,经陕西中医药大学王继涛老师鉴定为苹果属(*Malus* Mill)湖北海棠(*Malus hupehensis*(Pamp.)Rehd)的干燥叶;叶下珠药材购自陕西昊源中药饮片有限公司,陕西中医药大学王继涛老师鉴定为大戟科植物叶下珠(*Phyllanthus urinaria* L.)的带根全草;CCl₄(天津天士力化学试剂有限公司,批号:20140228);橄榄油(广州花之王化工有限公司,批号:20140528);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒

(南京建成生物工程研究所,批号分别为:20140909、20140923);其它试剂均为分析纯。

1.3 仪器 Centrifuge 5417R 台式冷冻高速离心机(Germany Eppendorf),HHS-4A 电热恒温水浴锅(沪越实验仪器厂),JA2003 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司,精度:1 mg),BIO-RAD Model 680 酶标仪(北京伯乐生命科学发展有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 洁净级 136 只昆明种小鼠,随机分为 17 组,每组 8 只。以七珠胶囊各组分作为星点设计实验方案的考察因子,以太白橐木总皂苷、湖北海棠总黄酮、叶下珠总多酚作为因素,各因素分别在前期实验筛选结果确定的有效剂量范围内均匀选取 3 个水平^[11-12],分组情况见表 2。

1.4.2 造模方法 昆明种小鼠雌雄分笼饲养,适应性饲养 5 d 后用于实验。各给药组均按表 1 所设计剂量进行灌胃给药 7 d,1 次/d。末次给药后 2 h,将 0.1% 的 CCl₄ 橄榄油溶液按 0.1 mL/10 g 进行腹腔注射,建立小鼠急性肝损伤模型^[13]。在给药及建立急性肝损伤模型过程中,各组小鼠饮食、活动佳,均未见不良反应,无死亡。

1.4.3 取材 末次给药后禁食不禁水,16 h 后摘眼球取血,3 000×g 离心 10 min 分离血清,放入-20℃冰箱保存备用。

1.4.4 血清生化指标 ALT、AST 的测定 微板法检测小鼠血清 AST、ALT 含量,严格按照试剂盒说明书步骤进行,酶标仪 570 nm 处测定 OD 值,实验重复 3 次。

2 结果

2.1 星点设计法优选最佳配伍比例 根据星点设计原理^[14-15],在单因素基础上,选取太白橐木总皂苷(X_1)、湖北海棠总黄酮(X_2)、叶下珠总多酚(X_3)为考察因素,每个因素设 3 个水平,用代码值-1、0、1 来表示。因素水平见表 1,实验安排和结果见表 2。

表1 星点设计因素与水平

水平	因素		
	$X_1/(g \cdot kg^{-1})$ 太白橐木总皂苷	$X_2/(g \cdot kg^{-1})$ 湖北海棠总黄酮	$X_3/(g \cdot kg^{-1})$ 叶下珠总多酚
-1	0.05	0.21	0.32
0	0.13	0.53	0.79
1	0.21	0.84	1.25

表2 星点试验设计与结果表

实 验 号	X_1 太白橐木 总皂苷	X_2 湖北海棠 总黄酮	X_3 叶下珠 总多酚	AST 水平/ (IU·L ⁻¹)	ALT 水平/ (IU·L ⁻¹)	综合 评分 OD值
1	0	0	0	169.113	92.859 9	0.311 9
2	0	1	1	170.956 1	73.173 9	0.386 6
3	1	-1	0	183.970 7	84.050 1	0.000 0
4	0	0	0	167.073 5	94.316 0	0.323 2
5	0	1	-1	170.214 3	112.108 9	0.153 9
6	-1	-1	0	108.896 6	101.6621	0.570 8
7	-1	0	-1	96.873 6	118.977	0.000 0
8	0	-1	-1	134.973 6	94.117 4	0.552 6
9	0	-1	1	134.870 3	93.571 8	0.559 2
10	-1	0	1	160.918 4	94.252 9	0.378 0
11	1	0	-1	175.922 6	97.987 4	0.205 8
12	0	0	0	159.284 4	98.159 7	0.358 9
13	1	1	0	163.652 3	95.952 9	0.342 4
14	0	0	0	164.451 5	96.331 5	0.332 9
15	-1	1	0	166.104 3	105.443 1	0.246 2
16	0	0	0	165.733 8	95.372 4	0.328 5
17	1	0	1	176.319 2	102.716 0	0.176 6

注:1、4、12、14、16号为重复实验;AST、ALT为负向指标, $d=(Y_{max}-Y_i)/(Y_{max}-Y_{min})$,并将各指标归一值求算几何平均值得总评归一值, $OD=(d_1 \times d_2 \dots \times d_n)^{1/n}$ 进行综合评价,考察对2个指标(AST、ALT)的综合影响。

2.2 模型拟合 用ANOVA分析效应面的回归参数。利用Design-Expert 8.0.6软件对表2数据进行多元回归拟合,得到七珠胶囊不同配伍组血清中AST、ALT指标对太白橐木/A、湖北海棠/B、叶下珠/C二项多次回归模型方程:综合评分 $Y=0.33-0.059A-0.069B+0.074C+0.17AB-0.10AC+0.057BC-0.13A^2+$

$0.091B^2-8.877E-003C^2$,式中评分代表肝损伤小鼠血清含AST、ALT酶的活力,A、B、C分别代表太白橐木总皂苷,湖北海棠总黄酮,叶下珠总多酚3种组分的含量。该方程的相关系数 $R^2=0.835 0$,整体模型达到显著水平($P=0.042 3$),能够反映血清酶活力与3味提取物给药量的关系。由表3可知,本实验设定区域范围内,整体模型达到显著水平($P=0.042 3$),表明太白橐木总皂苷、湖北海棠总黄酮对酶的活力有明显影响,二次项中A、B的偏回归系数达显著水平,其他各项的偏回归系数均未达到显著水平。但是,回归方程失拟检验显著($P=0.000 5$),说明未知因素对实验结果有一定干扰,后续需要进一步研究;模型拟合检验极显著,说明该方程与实际情况拟合很好,较好地反映了血清酶活力与3味提取物给药量的关系,因此得到的回归方程能较好的预测七珠胶囊不同配伍对急性肝损伤小鼠血清ALT、AST随各参数的变化规律。

表3 以AST和ALT为指标的拟合回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
Model	0.38	9	0.042	3.94	0.042 3
X_1	0.028	1	0.028	2.59	0.151 8
X_2	0.038	1	0.038	3.59	0.100 2
X_3	0.043	1	0.043	4.05	0.084 1
X_1X_2	0.11	1	0.11	10.41	0.014 5
X_1X_3	0.041	1	0.041	3.88	0.089 5
X_2X_3	0.013	1	0.013	1.20	0.310 2
X_1^2	0.073	1	0.073	6.88	0.034 3
X_2^2	0.035	1	0.035	3.26	0.114 2
X_3^2	3.318E-004	1	3.318E-004	0.031	0.865 1
残差	0.075	7	0.011		
失拟性	0.074	3	0.025	80.80	0.000 5
纯误差	1.214E-003	4	3.035E-004		
总差	0.45	16			

2.3 配伍优化与预测 在因变量与另两因素拟合为三维曲面图中,因只能表达含2个因素变量的函数,故固定3个变量中的1个为中值,以拟合的目标函数为数学模型,绘制因变量曲面图(图1、2、3),最终确定七珠胶囊最佳剂量配比为:太白橐木总皂苷0.05 g/kg,湖北海棠总黄酮0.84 g/kg,叶下珠总多酚1.25 g/kg。

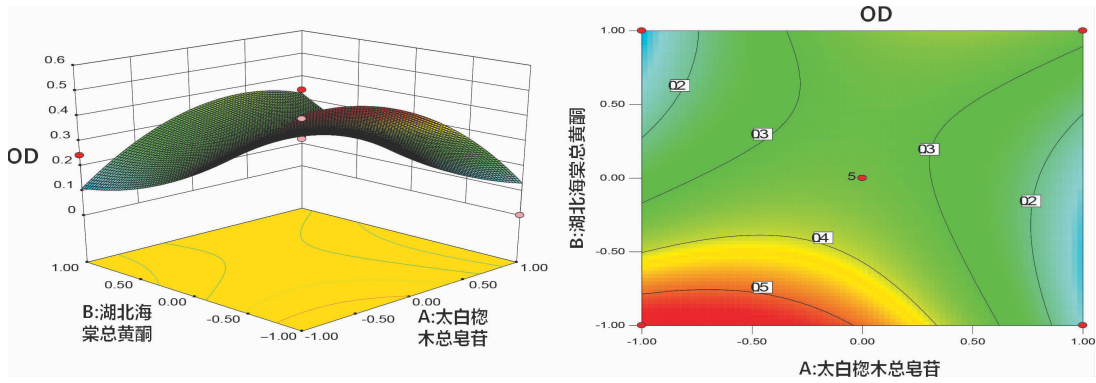


图 1 太白椴木总皂苷与湖北海棠总黄酮对 AST、ALT 的影响

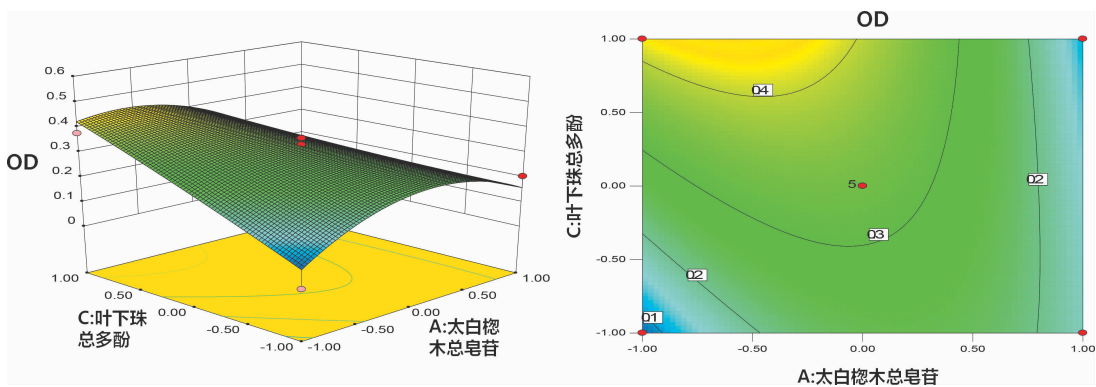


图 2 太白椴木总皂苷与叶下珠总多酚对 AST、ALT 的影响

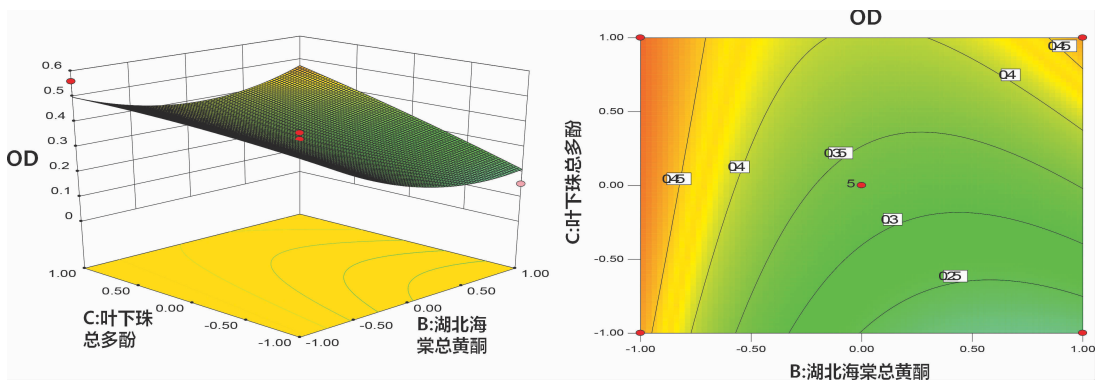


图 3 湖北海棠总黄酮与叶下珠总多酚对 AST、ALT 的影响

3 讨论

肝毒剂 CCl₄ 所诱导的肝损伤是最经典的化学性动物肝损伤造模方法,因模型简单易于执行、造模时间短等特点被广泛用于研究化学性肝损伤、肝纤维化发生的细胞分子机制以及保肝药物的筛选^[16-17]。ALT、AST 均为肝细胞内酶,其中,ALT 是最常用的判断肝细胞是否受损的敏感性指标,AST 水平高低则代表着肝细胞损伤的程度。正常情况下,血清中 ALT、AST 的含量较少,当肝损伤发生时,大量的 ALT、AST 从肝细胞进入血液,使血液中含有量显著升高^[18]。目前,血清

ALT、AST 是检测肝损伤的特异性标志,也是判断肝细胞损伤程度最为敏感的指标^[19]。

七珠胶囊原制剂为汤剂,是由太白椴木、湖北海棠、叶下珠 3 味药组成,可有效治疗急慢性肝炎、肝纤维化,但携带不便,课题组前期研究中将其改为胶囊剂^[20]。太白椴木总皂苷为太白椴木的主要活性成分,来源于其根皮。研究发现太白椴木总皂苷对于脑、心脏、肝脏都有保护作用^[2,4]。湖北海棠总黄酮是从湖北海棠叶中提取的黄酮类成分,对于急慢性肝损伤治疗作用显著。研究发现湖北海棠叶总黄酮可减轻 CCl₄

及酒精所致的大鼠肝脏损伤程度,以及抑制血吸虫所致的肝纤维化^[6-7]。叶下珠总多酚具有较高的抗氧化活性,可降低肝细胞氧化应激损伤,有效保护肝功能,在治疗免疫性肝损伤中作用显著^[9]。本实验结果显示,各给药组小鼠在以不同剂量组合灌胃后,血清中ALT、AST与模型组比较均有不同程度降低,表明七珠胶囊各成分配伍给药均能有效抑制肝损伤,修复受损肝组织。

星点设计-效应面法以实验所考察的自变量对效应的作用为依据,选取最佳指数并对其进行优化^[21]。即通过建立数学模型描绘三维效应面,读取效应面较优区域的较佳配伍条件范围,继而回推出自变量取值范围即最佳实验条件的优化方法^[22]。本实验通过效应面法,以急性肝损伤小鼠血清中ALT、AST的活性水平作为指标,对七珠胶囊各组分配伍进行优化配比,得到最佳剂量配伍为:太白橐木总皂苷0.05 g/kg,湖北海棠总黄酮0.84 g/kg,叶下珠总多酚1.25 g/kg。

星点设计-效应面法精密度高、预测性好,能较为全面、精确地反映七珠胶囊在预防小鼠急性肝损伤中最佳的药物成分配伍,可为七珠胶囊的后续实验以及临床应用提供有效的科学依据。

参考文献:

- [1] 徐培平. 叶下珠复方抗慢性乙型肝炎的免疫药效学研究[D]. 广州:广州中医药大学,2001.
- [2] 郭东艳,覃鸿恩,唐志书,等. 基于谱效相关的星点设计-效应面法优化太白橐木提取工艺[J]. 西北药学杂志,2012,27(5):399-402.
- [3] 史海涛,刘欣,刘超,等. 太白橐木对肝星状细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版),2017,38(2):295-298.
- [4] 李成全,周健,徐洲,等. 太白橐木的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中南药学,2017,15(10):1401-1409.
- [5] 刘基. 湖北海棠总黄酮体外抗氧化活性评价及脂质体乳液研究[D]. 西安:陕西中医药大学,2019.
- [6] 杜幼芹,冯天艳,邓改改,等. 湖北海棠叶总黄酮对日本血吸虫感染小鼠肝纤维化的抑制作用[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2011,23(5):551-554.
- [7] 冯天艳,汪鋈植,周继刚,等. 湖北海棠叶总黄酮抗CCL₄所致大鼠肝纤维化作用研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(2):72-76.
- [8] 杜幼芹,冯天艳,邓改改,等. 湖北海棠叶总黄酮对日本血吸虫感染小鼠肝纤维化的抑制作用[J]. 中药药理与临床,2011,23(5):551-554.
- [9] 朱仙慕,陈丹,马国萍,等. 叶下珠薄层色谱鉴别及福林酚法测定总多酚含量研究[J]. 中国中医药科技,2018,25(4):514-519.
- [10] 戴卫波,梅全喜,曾聪彦,等. 叶下珠总多酚对胆汁淤积性肝炎大鼠胆红素、胆汁酸的含量及胆汁酸转运蛋白Mrp3表达的影响[J]. 中药材,2019,42(7):1656-1659.
- [11] 范好,郭东艳,郑蓓. 太白橐木总皂苷对小鼠急性酒精性肝损伤的干预作用[J]. 医学研究杂志,2018,47(10):54-57.
- [12] 范好,郭东艳,郑蓓,等. 湖北海棠总黄酮对两种急性肝损伤小鼠模型的实验研究[J]. 现代中医药,2018,38(5):116-120.
- [13] 周程艳,余海平,陶志彬,等. 杜仲水提物对四氯化碳所致小鼠肝损伤保护作用[J]. 时珍国医国药,2009,20(9):2321-2323.
- [14] 马宏达,崔亚玲,吴琼,等. 星点设计-效应面法优化肝素钠肌醇烟酸酯乳膏处方配比[J]. 中国医药导报,2017,14(25):8-12.
- [15] 张博达,董艳,李俊玲,等. 星点设计-效应面法优化三子养亲汤的水提取工艺[J]. 时珍国医国药,2018,29(9):2168-2170.
- [16] 何育佩,吴秋玲,黄丽贞,等. 羊耳菊水提物对CCL₄-D-GalN致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 科学技术与工程,2019,19(23):42-46.
- [17] 刘利平,陶旭锋,韩旭,等. 中药抗四氯化碳所致急性肝损伤作用研究进展[J]. 中国药师,2017,20(9):1638-1642.
- [18] 刘钰华,叶少武,陈伟坚,等. 复方肝宁颗粒的制备及其对CCL₄诱导小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(14):18-22.
- [19] 高金波,侯丽然,李国清,等. 桔梗皂苷-纳米硒复合物对CCL₄致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 佳木斯大学学报(自然科学版),2019,37(4):606-609.
- [20] 党娟丽,郑蓓,郭东艳,等. 星点设计-响应面法优选七珠胶囊成型工艺[J]. 现代中药研究与实践,2016,30(5):46-49.
- [21] 荣娟娟,高家荣,方朝晖,等. 多指标综合评分法优选芪归糖痛宁颗粒提取工艺[J]. 安徽医药,2011,15(6):674-676.
- [22] 陈伟,夏红,吴伟. 星点设计-效应面法优化水飞蓟素滴丸的制备工艺[J]. 中草药,2005,36(5):679-683.