

# 基于小鼠胚胎干细胞实验模型评价川芎水煎液的胚胎毒性

夏 荃<sup>1</sup>, 鲍 倩<sup>1</sup>, 蒋德菊<sup>2</sup>, 易 华<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 深圳市龙岗中心医院, 广东 深圳 518116)

**摘要:** **目的** 建立小鼠胚胎干细胞实验模型, 并以其评价川芎水煎液的胚胎毒性。**方法** 体外培养小鼠胚胎成纤维细胞 3T3 和胚胎干细胞 (mESCs) D3, MTT 法检测青霉素 G、苯妥英钠、5-氟尿嘧啶对 3T3、D3 细胞的毒性作用, 绘制细胞存活率-浓度曲线, 计算 3 种受试物对 2 种细胞的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$  3T3 和  $IC_{50}$  D3)。利用悬滴-悬浮-贴壁方法, 体外培养 D3 细胞分化成心肌细胞。通过实时定量 PCR (Q-PCR) 检测心肌细胞中肌球蛋白重链基因 ( $\beta$ -MHC) 的表达。再计算 3 种受试物对 D3 细胞的半数分化抑制浓度 ( $ID_{50}$  D3), 判定其胚胎毒性等级。**结果** 青霉素 G、苯妥英钠、5-氟尿嘧啶分别为无、弱、强胚胎毒性。川芎水煎液的  $IC_{50}$  3T3、 $IC_{50}$  D3、 $ID_{50}$  D3 分别为 9.39、18.78、10.20 mg/mL。**结论** 川芎水煎液胚胎毒性较弱。

**关键词:** 川芎水煎液; 胚胎毒性; 胚胎干细胞实验模型

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)09-1910-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.003

## Evaluation of embryotoxicity of *Chuanxiong Rhizoma* decoction based on mouse embryonic stem cell test model

XIA Quan<sup>1</sup>, BAO Qian<sup>1</sup>, JIANG De-ju<sup>2</sup>, YI Hua<sup>1</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Longgang Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518116, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish mouse embryonic stem cell test model to evaluate the embryotoxicity of *Chuanxiong Rhizoma* decoction. **METHODS** Mouse embryonic fibroblasts 3T3 and embryonic stem cells (mESCs) D3 cultured *in vitro* were applied to testing the cytotoxic effects of penicillin G, phenytoin sodium and 5-fluorouracil on 3T3, D3 cells by MTT assay. According to drawn concentration-effect curves, the half inhibition concentrations of three test substances on two cells were calculated ( $IC_{50}$  3T3 and  $IC_{50}$  D3). Myocardial cells cultured from D3 cells *in vitro* by hanging drop-suspension-attachment method. The expression of myosin heavy chain genes ( $\beta$ -MHC) in these myocardial cells were detected by real-time quantitative PCR (Q-PCR). The calculation of half inhibition cell differentiation concentrations ( $ID_{50}$  D3) of three test substances on D3 cells were subsequently performed, after which their embryotoxicity grades were determined. **RESULTS** Penicillin G was identified with no embryotoxicity, phenytoin sodium was found to be with weak embryotoxicity, and 5-fluorouracil was strongly embryotoxic. The  $IC_{50}$  3T3,  $IC_{50}$  D3,  $ID_{50}$  D3 of *Chuanxiong Rhizoma* decoction were determined to be 9.39, 18.78, 10.20 mg/mL, respectively. **CONCLUSION** *Chuanxiong Rhizoma* decoction demonstrates a weak embryotoxicity.

**KEY WORDS:** *Chuanxiong Rhizoma* decoction; embryotoxicity; embryonic stem cell test model

妊娠期应用中药存在一定的普遍性<sup>[1]</sup>, 但由于历史条件的限制, 许多常用中药未经过严格的胚胎毒性评价。近年来研究发现, 一些传统上认为无毒、在妊娠期常用的中药具有一定的生殖发育毒

性, 如青蒿素对 SD 大鼠有胚胎毒性及较弱的致畸作用<sup>[2]</sup>, 补骨脂、续断、黄芩、黄连等中药均具有潜在的胚胎毒性<sup>[3-5]</sup>。因此, 对妊娠期常用中药的胚胎毒性有必要进行系统研究。

收稿日期: 2017-11-20

基金项目: 广东省自然科学基金课题 (2014A030313414)

作者简介: 夏 荃 (1971—), 女, 博士, 副教授, 从事中药炮制及中药质量评价研究。Tel: 13929598771, E-mail: xiaquan71@126.com

川芎为四物汤、胶艾汤等妊娠期常用安胎方剂的重要组成中药之一,但有记载它也可配伍红花、牛膝等中药用于堕胎,表明在临床应用中存在安胎、堕胎界限不清的现象,故其是否具有胚胎毒性需要系统评价。

目前,胚胎毒性的评价方法包括体内生殖发育毒性试验和体外替代试验,但前者需要使用大量动物,费用较高,试验周期长。近年来,已建立多种胚胎毒性体外测试体系,本实验采用欧洲动物实验替代中心(ECVAM)推荐的体外评价方法——胚胎干细胞实验<sup>[6]</sup>,从细胞毒性和对心肌细胞的分化抑制作用来评价川芎的胚胎毒性,为其安全使用提供科学依据。

## 1 材料

1.1 细胞 小鼠胚胎干细胞 D3 (品系 129/Sv + c/+p, P9, 中国科学院干细胞库编号 SCSP-202, 批号 20160812)、小鼠胚胎成纤维细胞 3T3 (品系 NIH/Swiss, P5, 中国科学院干细胞库编号 SCSP-515, 批号 20160803)、小鼠胚胎成纤维细胞 MEF (品系昆明白, P3, 中国科学院干细胞库编号 SCSP-101R, 批号 20160601) 均购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.2 试药 川芎(购自佛山市南海北沙药材加工厂,批号 150514,经广州中医药大学中药鉴定教研室李薇教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎)。青霉素 G、苯妥英钠、5-氟尿嘧啶、白血病抑制因子、 $\beta$ -巯基乙醇、MTT 粉末均购自美国 Sigma 公司;高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、丙酮酸钠均购自美国 Gibco 公司;新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)。

1.3 仪器 SW-CJ-1FD 单人单面净化工作台(苏州市金燕净化设备工程有限公司);ECLIPSE-TS100 倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);1510 全波长酶标仪、Step One Plus 荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司);普通 PCR 仪(杭州博日科技有限公司);NanoDrop One 超微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)。

## 2 方法

### 2.1 川芎质量研究及受试物制备

2.1.1 质量研究 按照 2015 版《中国药典》规定,对川芎进行定性鉴别、阿魏酸含有量测定,GC 法测定部分有机氯、有机磷、拟除虫菊酯类农药含有量,原子吸收分光光度法测定铅、镉、砷、

汞、铜等重金属含有量,以排除农药、重金属等有毒有害物质对实验结果的干扰。

2.1.2 水煎液制备 取一定量川芎饮片置于容器中,加水(超过药面)浸泡 30 min 后煎煮 3 次,每次 60 min,合并水煎液,过滤,浓缩至含生药量 1 g/mL,即得,HPLC 法测定阿魏酸含有量,-80℃下保存备用<sup>[3]</sup>。

2.1.3 受试物制备 取 1 g/mL 水煎液 50 mL,12 000 r/min 离心 10 min,上清液过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜,得无菌川芎水煎液,将水煎液与完全培养基混合,配制成不同质量浓度(0.1、1.25、2.5、6.25、10、12.5、31.25 mg/mL)的受试物,均为均一稳定棕色澄清液体。

### 2.2 胚胎干细胞实验模型建立

2.2.1 MEF 细胞铺制 从液氮中取出 1 支 MEF ( $3 \times 10^6$ /mL),置于 37℃水浴中迅速融化,将细胞悬液转移至含 MEF 完全培养液(DMEM 高糖培养基、10%胎牛血清、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、1%青霉素-链霉素)的离心管中,吹打混匀,1 000 r/min 离心 5 min,吸除上清,另加入新鲜 MEF 完全培养液,重悬后平均加入到预先包被 0.2%明胶的 T25 培养瓶中,轻轻摇匀,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中内培养。

2.2.2 D3 细胞培养 MEF 铺制 24 h 后,导入 D3。从液氮中取出 1 支 D3,复苏至预先铺好饲养层细胞的 T25 培养瓶中,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养,每天更换培养液(DMEM 高糖培养基、15%胎牛血清、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、0.25% $\beta$ -巯基乙醇、1 000 U/mL 白血病抑制因子、1%青霉素-链霉素),D3 增殖 2~3 d,形成大小均一的球形克隆团,当细胞融合度达 60%~70%时传代,于倒置显微镜下观察 D3 细胞的生长行为及形态特征。

2.2.3 3T3 细胞培养 从液氮中取出 1 支 3T3,复苏至 T25 培养瓶中,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养,每 2 d 更换 1 次培养液(DMEM 高糖培养基、10%新生牛血清、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸、1%丙酮酸钠、1%青霉素-链霉素),细胞呈长梭形,当细胞融合度达 60%~70%时传代,于倒置显微镜下观察 D3 细胞的生长行为及形态特征。

2.2.4 受试物对 3T3、D3 细胞毒性作用检测 在 96 孔细胞培养板中,每孔接种密度  $2.5 \times 10^3$ /mL 的 3T3、D3 细胞,青霉素 G 质量浓度为 200 ~

1 400 mg/L, 共 7 个梯度; 苯妥英钠质量浓度为 20 ~ 160 mg/L, 共 8 个梯度; 5-氟尿嘧啶质量浓度为 0.01 ~ 0.12 mg/L, 共 11 个梯度, 每个质量浓度设 5 个复孔, 并设阴性对照组。第 3、5 天更换培养基, 第 10 天用 MTT 法检测细胞活性, 于 570 nm 波长处测定吸光度, 计算受试物  $IC_{50}3T3$  和  $IC_{50}D3$ 。

**2.2.5 受试物对 D3 细胞分化抑制作用检测** 差速贴壁法除去 MEF 滋养层细胞, 培养液撤除白血病抑制因子, 将细胞调整密度至  $3.75 \times 10^4/L$ , 悬滴培养于 10 cm 细菌培养皿盖上, 每滴加 20  $\mu L$  时加入适量 PBS, 悬滴 3 d 后, 倒置显微镜下可见每个悬滴中有 1 个拟胚体, 将其小心转移至 60 cm 悬浮培养皿中, 加入 10 mL 无白血病抑制因子完全培养液, 置于 37  $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  细胞培养箱中悬浮培养 2 d 后, 将拟胚体接种至 1% 明胶包被的 6 孔板中, 每孔内 1 个, 分别加入含青霉素 G、苯妥英钠、5-氟尿嘧啶的分化培养基, 继续置于 37  $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  细胞培养箱中培养 5 d。于分化第 10 天, 检测分化心肌细胞中所含  $\beta$ -MHC 的表达水平, 然后在 6 孔板中加入 PBS (-) 洗涤 2 次, Trizol 提取 RNA, 测定其浓度和纯度后于 -80  $^{\circ}C$  下保存。取 1  $\mu g$  进行去 gDNA 反应和逆转录反应, cDNA 量是原始浓度稀释 100 倍, 具体操作步骤按照 SYBR<sup>®</sup> Premix DimerEraser<sup>TM</sup> 试剂盒说明进行, 反应体系为 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 12.5  $\mu L$ , 样品溶液 2.5  $\mu L$ , 引物各 1.0  $\mu L$ , 加双蒸水至总体积 25  $\mu L$ , 所有 PCR 引物 (Primer Premier 5.0 软件设计) 均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 需要扩增的目的基因引物序列  $\beta$ -肌球蛋白重链 ( $\beta$ -MHC) 正向 5'-GCCCTCCTCACATCT-TCTCC-3', 反向 5'-CAGGGTTGGCTTGGATGATTT-3'; 内参 GAPDH 引物序列正向 5'-CCTTCCGT-GTTCCTACCC-3', 反向 5'-CAACCTGGTCTCAGT-GTAG-3', 扩增条件为 95  $^{\circ}C$ , 5 s, 1 个循环; 95  $^{\circ}C$ , 5 s; 55  $^{\circ}C$ , 30 s; 72  $^{\circ}C$ , 30 s; 40 个循环。每个样品设 3 个平行孔。目的基因 ( $\beta$ -MHC) 和内参基因 ( $\beta$ -actin) 均采用相对定量, 其相对表达水平以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示 ( $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{处理组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ ), 计算 50% D3 细胞分化受抑制的浓度, 即  $ID_{50}D3$ 。

**2.2.6 发育毒性判定<sup>[7]</sup>** I:  $5.9157lg(IC_{50}3T3) + 3.500lg(IC_{50}D3) - 5.307(IC_{50}3T3-ID_{50}D3)/IC_{50}3T3 - 15.72$

II:  $3.6511lg(IC_{50}3T3) + 2.3941lg(IC_{50}D3) - 2.033(IC_{50}3T3-ID_{50}D3)/IC_{50}3T3 - 6.85$

III:  $-0.125lg(IC_{50}3T3) + 1.917lg(IC_{50}D3) + 1.500(IC_{50}3T3-ID_{50}D3)/IC_{50}3T3 - 2.67$

发育毒性的判定标准: I > II, I > III, 则受试物发育毒性为 1 级, 无胚胎毒性; II > I, II > III, 则受试物发育毒性为 2 级, 弱胚胎毒性; III > I, III > II, 则受试物发育毒性为 3 级, 强胚胎毒性。

**2.3 胚胎毒性评价** 以 0.1、1.25、2.5、6.25、10、12.5、31.25 mg/mL 水煎液作用于 3T3、D3 细胞<sup>[3]</sup>, MTT 法检测受试物细胞毒性。再以含川芎 1.25、6.25、10、12.5、31.25 mg/mL 的分化培养基处理 D3 细胞, 检测对其分化能力的抑制作用, 并按“2.2.6”项下方法评价其发育毒性。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 软件进行处理, 数据均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 质量研究** 经广州中医药大学中药鉴定教研室李薇教授鉴定, 川芎外观性状及显微鉴别均符合 2015 版《中国药典》要求。生川芎中阿魏酸含有量为  $(0.149 \pm 0.031)\%$ , 符合药典要求 (按干燥品计算, 阿魏酸不得少于 0.1%); 未检出农药, 并且铅、镉、砷、汞、铜等重金属含有量均符合相关标准, 可排除它们对实验结果的干扰; 川芎水煎液中阿魏酸含有量为  $(0.0917 \pm 0.009)\%$ , -80  $^{\circ}C$  下保存, 3 个月后测定其含有量, 发现所得结果稳定。

**3.2 胚胎干细胞培养** 在倒置显微镜下, 小鼠胚胎干细胞排列紧密, 呈集落状生长, 克隆团似鸟巢状, 形态均一, 细胞表面有折光较强的脂状小滴, 细胞克隆与滋养层界限清晰, 无分化迹象。见图 1。

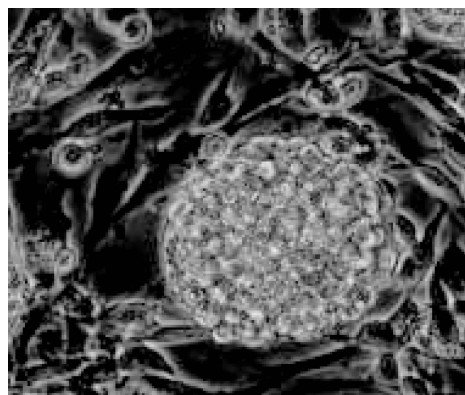


图 1 小鼠胚胎干细胞

Fig. 1 Mouse embryonic stem cells

3.3 胚胎干细胞实验模型验证 表1、图2~4显示，5-氟尿嘧啶为强胚胎毒性。示，青霉素G无胚胎毒性，苯妥英钠为弱胚胎毒

表1 受试物终点浓度  
Tab.1 Endpoint concentrations of test substances

| 受试物    | IC <sub>50</sub> 3T3/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | IC <sub>50</sub> D3/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | ID <sub>50</sub> D3/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 函数Ⅰ    | 函数Ⅱ    | 函数Ⅲ   | 判定结果     | 等级 |
|--------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|--------|--------|-------|----------|----|
| 青霉素G   | 1 115.74                                    | 1 057.73                                   | 1 390.03                                   | 12.62  | 12.02  | 2.38  | Ⅰ>Ⅱ, Ⅰ>Ⅲ | 1  |
| 苯妥英钠   | 75.94                                       | 52.38                                      | 38.05                                      | -0.23  | 3.12   | 1.14  | Ⅱ>Ⅰ, Ⅱ>Ⅲ | 2  |
| 5-氟尿嘧啶 | 0.053                                       | 0.030                                      | 0.016                                      | -30.90 | -16.57 | -4.38 | Ⅲ>Ⅰ, Ⅲ>Ⅱ | 3  |

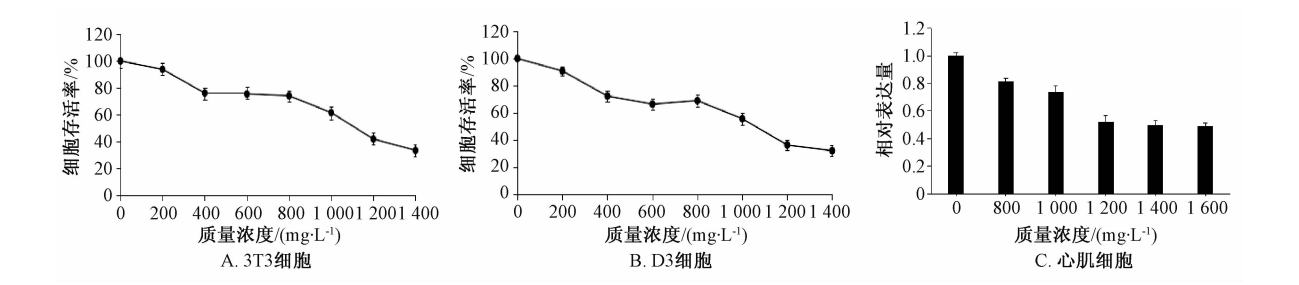


图2 青霉素G对3T3细胞、D3细胞、心肌细胞的影响  
Fig.2 Effects of penicillin G on 3T3 cells, D3 cells and myocardial cells

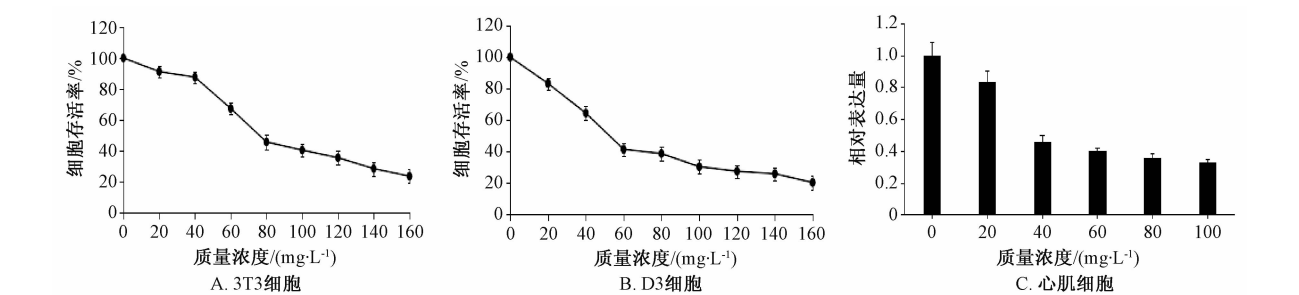


图3 苯妥英钠对3T3细胞、D3细胞、心肌细胞的影响  
Fig.3 Effects of phenytoin sodium on 3T3 cells, D3 cells and myocardial cells

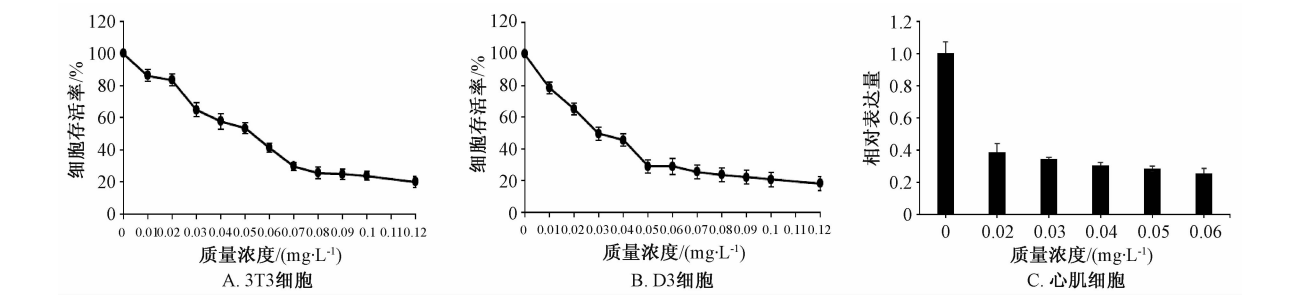


图4 5-氟尿嘧啶对3T3细胞、D3细胞、心肌细胞的影响  
Fig.4 Effects of 5-fluorouracil on 3T3 cells, D3 cells and myocardial cells

3.4 胚胎毒性评价 图5显示，川芎水煎液的IC<sub>50</sub>3T3、IC<sub>50</sub>D3、ID<sub>50</sub>D3分别为9.39、18.78、10.20 mg/mL。将上述结果代入线性判别公式，得出函数Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分别为-0.20、-0.07、-0.48，即函数Ⅱ>函数Ⅰ，函数Ⅱ>函数Ⅲ，表明川芎水煎液呈弱胚胎毒性。

4 讨论

目前，胚胎毒性检测的体内实验大多采用胚胎-胎仔毒性和致畸性试验（SegmentⅡ试验），但需要使用大量动物，费用较高，试验周期长，难以迅速对大量物质进行毒性评价。近年来，已建立多种胚胎毒性体外测试体系，其中胚胎干细胞实验是国际上公认的发育毒性评价体外替代方法之一<sup>[8]</sup>。小鼠胚胎干细胞是从着床前胚胎的内细胞团中分离

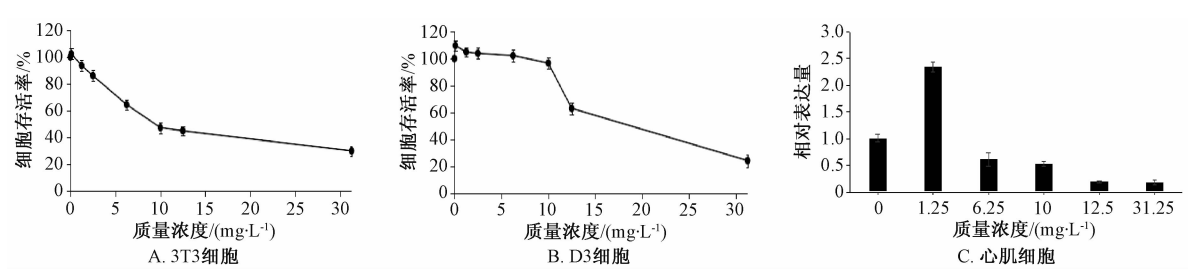


图 5 川芎水煎液对 3T3 细胞、D3 细胞、心肌细胞的影响

Fig. 5 Effects of *Chuanxiong Rhizoma* decoction on 3T3 cells, D3 cells and myocardial cells

得到的具有分化潜能的细胞系，具有体外可增殖性、全能性、多能性、可操作性，从受试物对其细胞毒性及心肌细胞的分化抑制作用来评价其发育毒性。由于胚胎干细胞较成体组织对受试物更敏感<sup>[9]</sup>，故可通过 MTT 法测定受试物对 D3 细胞 (D3)、纤维母细胞 (3T3) 毒性作用，得到 IC<sub>50</sub> 3T3、IC<sub>50</sub> D3；它还具有体外分化潜能，在特定条件下可自发分化为心肌细胞，采用 qPCR 检测心肌细胞中所含的特异性  $\beta$ -MHC 基因，可得到对 D3 细胞半数分化抑制浓度 (ID<sub>50</sub>)，将 3 个毒性浓度作为检测终点来判断受试物发育毒性。经 ECVAM 验证，该方法下发育毒性测定结果与体内动物实验结果的符合率高达 82%，能正确划分大多数化学物质的胚胎毒性等级，而且对强胚胎毒性物质可达到 100% 的正确率<sup>[10]</sup>，并且还可应用于单味中药及中药复方的胚胎毒性评价<sup>[11-13]</sup>。

本实验发现，川芎水煎液具有弱胚胎毒性，但同时也观察到低质量浓度下对胚胎干细胞的增殖和心肌细胞的分化反而有一定促进作用，并且随着质量浓度增大逐渐转变为抑制作用。前期动物实验发现，低剂量 (2 g/kg，相当于临床正常剂量) 川芎水煎液未表现出明显胚胎毒性，但高剂量 (32 g/kg，相当与临床正常剂量的 16 倍) 下可导致小鼠胎鼠死胎和吸收胎增加，胸骨及四肢骨骼发育畸形，显示出一定胚胎毒性，表明川芎在临床应用中安胎、堕胎界限不明的现象可能与使用剂量有关。FDA 根据妊娠期用药的安全性情况将药物分为 5 级，有些药物有 2 个不同的危险度等级，1 个是常用剂量等级，另 1 个是超常剂量等级，该方法被很多国家借鉴。目前，我国对妊娠期用药尚无如此分类评定，故有必要通过生殖毒性评价对妊娠期中药进行安全性分级，对一些药物标示危险度等级，从而给临床用药提供科学依据。

另外，川芎水煎液中主要含有水溶性成分，包括酚类、有机酸类等<sup>[14-15]</sup>，但具体是何种成分引

发的胚胎毒性及其毒理机制尚不明确，需要进一步研究。

### 参考文献:

[1] 宋殿荣, 郭洁, 张 巍, 等. 关于构建妊娠期应用中药安全性评价体系的思考[J]. 中医杂志, 2012, 53(5): 368-372.

[2] 万红平, 梁礼珍, 黄红坤, 等. 青蒿素对大鼠致畸作用的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(1): 25-28.

[3] Xiao T T, Xu M, Yang X H, *et al.* The evaluation on embryotoxicity of *Dipsaci Radix* with mice and embryonic stem cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 114-122.

[4] 张 巍, 宋殿荣, 王雅楠, 等. 基于妊娠期应用中药安全性评价体系探讨黄芩的胚胎毒性[J]. 天津中医药, 2013, 30(7): 431-435.

[5] Li L Y, Cao F F, Su Z J, *et al.* Assessment of the embryotoxicity of four Chinese herbal extracts using the embryonic stem cell test[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2): 2348-2354.

[6] Spielmann H, Seiler A, Bremer S, *et al.* The practical application of three validated *in vitro* embryotoxicity tests. The report and recommendations of an ECVAM/ZEBET workshop (ECVAM workshop 57) [J]. *Altern Lab Anim*, 2006, 34(5): 527-538.

[7] Rolletschek A, Blyszczuk P, Wobus A M. Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects[J]. *Toxicol Lett*, 2004, 149(1-3): 361-369.

[8] 赵增明, 方海琴, 何 俊, 等. 胚胎干细胞毒性评价模型的建立及其在药物安全性评价中的应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 487-488.

[9] Genschow E, Scholz G, Brown N, *et al.* Development of prediction models for three *in vitro* embryotoxicity tests in an ECVAM validation study[J]. *In Vitro Mol Toxicol*, 2000, 13(1): 51-66.

[10] Peters A K, Steemans M, Hansen E, *et al.* Evaluation of the embryotoxic potency of compounds in a newly revised high throughput embryonic stem cell test[J]. *Toxicol Sci*, 2008, 105(2): 342-350.

[11] 方海琴, 于 洲, 杨 嵘, 等. 胚胎干细胞试验模型用于白藜芦醇胚胎发育毒性的评价[J]. 毒理学杂志, 2013, 27(2): 89-94.

[12] 安红梅, 胡 兵, 史云峰, 等. 补肾阳中药对小鼠胚胎干细胞活动及相关基因表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(9): 774-776.

[13] 宋殿荣, 王雅楠, 张 崑, 等. 小半夏加茯苓汤含药血清对小鼠胚胎干细胞体外增殖及分化的影响[J]. 天津中医药, 2011, 28(6): 486-488.

[14] 李秋怡, 干国平, 刘焱文. 川芎的化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1298-1299.

[15] 靳春斌. 川芎的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国社区医师, 2017, 33(16): 8, 13.

# 肝清宁合剂对四氯化碳致肝硬化大鼠的影响

赵凯丽<sup>1</sup>, 许立拔<sup>1</sup>, 邓佳欣<sup>1</sup>, 梁 飞<sup>1</sup>, 黄增琼<sup>1\*</sup>, 曾凡艳<sup>2\*</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院, 广西 南宁 530021)

**摘要:** **目的** 研究肝清宁合剂对四氯化碳致大鼠肝硬化的影响。**方法** 造模大鼠灌胃给予肝清宁合剂(5.4、10.8、21.5 g/kg)或复方鳖甲软肝片(0.8 g/kg)连续4周后, HE、Masson 染色检查肝组织病理变化, 全自动生化分析仪检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、总胆红素(TBIL)水平, ELISA法测定血清透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原肽(PⅢNP)、Ⅳ型胶原(CⅣ)水平, 酶标法和紫外分光光度法测定肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、羟脯氨酸(HYP)水平。**结果** 与模型组比较, 肝清宁合剂组 ALT、AST、TBIL、HA、LN、PⅢNP、CⅣ水平显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), ALB、TP 水平显著升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), HYP、MDA 水平显著降低( $P<0.01$ ), SOD 水平显著升高( $P<0.05$ )。同时, 肝组织病理损伤减轻, 肝纤维化间隔变薄或减少。**结论** 肝清宁合剂对四氯化碳致肝硬化大鼠具有良好的治疗作用, 可能与改善肝脏功能和纤维化指标、促进肝组织自愈、增强机体抗氧化能力有关。

**关键词:** 肝清宁合剂; 肝硬化; 四氯化碳

**中图分类号:** R285.5                      **文献标志码:** A                      **文章编号:** 1001-1528(2018)09-1915-05

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.004

## Effects of Ganqingning Mixture on rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis

ZHAO Kai-li<sup>1</sup>, XU Li-ba<sup>1</sup>, DENG Jia-xin<sup>1</sup>, LIANG Fei<sup>1</sup>, HUANG Zeng-qiong<sup>1\*</sup>, ZENG Fan-yan<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Tumor Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To study the effects of Ganqingning Mixture on rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. **METHODS** Rat models intragastrically administered with four-week Ganqingning Mixture (5.4, 10.8, 21.5 g/kg) or four-week Compound Biejia Ruangan Tablets (0.8 g/kg) had their pathological changes of liver tissue checked by HE staining and Masson staining, their serum levels of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), albumin (ALB), total protein (TP) and total bilirubin (TBIL) determined by automatic biochemistry analyzer, their serum levels of hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type Ⅲ procollagen (PⅢ

收稿日期: 2017-12-26

基金项目: 广西医科大学青年科学基金项目(GXMUYSF201626); 广西医科大学大学生创新创业训练计划项目(201610598028)

作者简介: 赵凯丽(1993—), 女, 硕士生, 从事中药民族药研究与开发工作。Tel: 13878137625, E-mail: 942242054@qq.com

\* 通信作者: 黄增琼(1979—), 男(壮族), 博士, 副教授, 从事中药民族药研究与开发工作。Tel: 13617719503, E-mail: huang-zengqiong@163.com

曾凡艳(1986—), 女, 硕士, 主治医师, 从事肝癌、鼻咽癌的防治研究工作。Tel: 15878752197, E-mail: 362084581@qq.com