

齐墩果酸防止实验性肝硬变发生的研究

山西医学院肝病研究组 韩德五 马学忠 赵元昌 尹 镭

由于当前尚无治疗肝硬变的有效药物, 因而抑制慢性活动性肝炎向肝硬变的过渡, 即防止肝硬变发生的药物研究, 则显得相当重要。据报道, 青霉胺、秋水仙碱等有抑制肝纤维增生的一定作用, 但在临床上尚无确切之疗效, 而且副作用大^(1,2), 近年我们研究的葫芦素 B (甜瓜蒂的有效成分), 它虽可明显抑制肝纤维增生, 但也有一定毒性⁽³⁾。齐墩果酸 (Oleanolic acid) 是青叶胆的有效成分, 而且广泛存在于许多中草药之中, 如连翘、女贞子等。北京、上海等地用齐墩果酸治疗黄疸型病毒性肝炎及迁延性和慢性肝炎均获良好效果^(4,5)。因而, 有必要进一步研究齐墩果酸对实验性肝损伤的作用及其机理。

实验材料

实验动物为大白鼠。急性实验选用体重在 150~200 克之间; 慢性实验选用 200~250 克之间。雌雄兼用。实验药物为齐墩果酸, 从龙胆科獐牙菜属植物青叶胆中分离而得, 由湖南医药工业研究所提供。将齐墩果酸用吐温-80 配制成混悬液, 急性和慢性实验所用之剂量均为 20 毫克/只。急性实验每日皮下给药 1 次, 慢性实验隔日皮下给药 1 次。

方法与结果

(一) 齐墩果酸对实验性肝硬变发生率的影响

实验用大白鼠 39 只, 分两大组进行。I 组内有正常动物组、肝硬变对照组与给药(1)组; II 组内有正常动物组、肝硬变对照组、给药(2)组和给药(3)组。除正常动物组外, 各组均饲单纯玉米面(前两周加猪油 20%), 混以 0.5% 胆固醇、30% 乙醇为饮料。于实验第 1 天每只动物皮下注射四氯化碳 0.5 毫升/百克体重, 以后每隔 3 天皮下注射油剂四氯化碳 (40% 橄榄油溶液) 0.3 毫升/百克体重。I 组中给药(1)组于实验第 2 天给药, 直到实验第 6 周末处死动物; II 组中给药(2)组于实验第 2 天开始给药, 给药(3)组于实验第 43 天给药, 以上两组均给药至实验第 9 周末, 处死动物。取肝脏左叶固定于 10% 福尔马林溶液, 作苏木素-伊红染色 (HE) 及胶原纤维染色 (VG), 其余肝脏作羟脯

氨酸之测定, 以求胶原蛋白含量。取大白鼠血清进行谷丙转氨酶 (SGPT) 活力测定。

实验结果见表 1。结果表明, 通过组织学观察, 在实验第 6 周末, I 组中给药(1)组仅 1 只大鼠有纤维增生, 而肝硬变对照组已有 3 只大鼠形成肝硬变。通过

表 1 各组动物肝硬变发生率的比较

组别		动物数	纤维增生严重度*					胶原蛋白含量 毫克/克肝重 (均值±标准误)
			-	+	++	+++	平均	
I	正常动物	6	6	0	0	0	0 ⁺	13.2±1.5
	肝硬变对照	6	0	2	1	3	2.17 ⁺	31.6±5.4
	给药(1)	6	5	1	0	0	0.17 ⁺	28.6±4.3
II	正常动物	5	5	0	0	0	0 ⁺	15.3±0.2
	肝硬变对照	6	0	0	0	6	3.0 ⁺	39.9±3.8
	给药(2)	5	5	0	0	0	0 ⁺	22.6±1.5**
	给药(3)	5	0	0	1	4	2.8 ⁺	43.1±5.0

* 观察标准见参考文献(6); ** 实验动物数为 4 只, 测定结果与肝硬变对照组者相比, $P < 0.01 (t = 3.54)$

肝脏胶原蛋白含量之测定, 给药(1)组虽较肝硬变对照组含量减少, 但统计学处理无显著差异。在 II 组中, 实验第 9 周末肝硬变对照组均形成肝硬变, 而给药(2)组的动物肝脏均未见纤维增生或硬变 (见插图 1、2, 插图在封三, 下同), 其胶原蛋白含量亦较肝硬变对照组明显减少 ($P < 0.01$), 提示经齐墩果酸长期治疗, 可抑制肝纤维的增生; 给药(3)组动物的肝组织病理学与胶原蛋白含量测定结果均与肝硬变对照组无明显差异, 说明齐墩果酸似无促进胶原纤维重吸收的作用。

(二) 齐墩果酸对急、慢性肝损伤病理组织学的影响

急性肝炎实验分三组进行。一组为正常动物组, 其他两组为急性肝炎对照组与给药组。于实验第 1 天和第 5 天, 急性肝炎对照组与给药组每只动物皮下注射四氯化碳 0.5 毫升/百克体重, 给药组自实验第 2 天起皮下给药。实验第 8 天断头处死动物, 取肝脏固定于 10% 福尔马林溶液中, HE 染色。取血清进行 SGPT

表 2 急性和慢性肝损伤对照组与给药组的病理组织学比较

组 别	动物数	坏 死				脂 变				疏 松				气 球 样 变				间 质 炎 症 反 应				纤 维 增 生			
		-	+	++	+++	平均	-	+	++	平均	-	+	++	+++	平均	-	+	++	+++	平均	-	+	++	+++	平均
急性肝炎对照	6	2	2	2	0	1.0 ⁺	1	4	1	2.0 ⁺						1	2	2	1	1.5 ⁺	0	1	4	1	2.0 ⁺
	给 药	6	3	3	0	0.5 ⁺	3	2	1	1.7 ⁺						0	0	0	0	0 ⁺	1	5	0	0	0.83 ⁺
脂肪肝对照	9						1	2	6	2.6 ⁺															
	给 药	6					5	0	1	1.3 ⁺															
慢性肝炎对照	6	0	2	3	1	1.8 ⁺	2	2	2	2.0 ⁺	0	1	2	3	2.3 ⁺	0	1	4	1	2.0 ⁺	0	2	2	2	2.0 ⁺
	给 药	6	5	1	0	0.2 ⁺	3	3	0	1.5 ⁺	1	5	0	0	0.8 ⁺	3	3	0	0	0.5 ⁺	3	3	0	0	0.5 ⁺
肝硬变对照	6	0	1	1	4	2.5 ⁺	1	3	2	2.2 ⁺						1	2	2	1	1.5 ⁺	1	2	3	0	1.3 ⁺
	给 药	6	4	2	0	0.4 ⁺	2	1	3	2.2 ⁺						1	5	0	0	0.8 ⁺	2	4	0	0	0.7 ⁺

注：观察指标见参考文献(7、8)

测定。

脂肪肝实验分两组，即脂肪肝对照组与给药组。各组均饲高脂肪低蛋白食物(80%玉米面，20%猪肉与0.5%胆固醇)，30%乙醇为唯一饮料。于实验第1天每只动物皮下注射四氯化碳0.5毫升/百克体重，以后每隔3天皮下注射油剂四氯化碳0.3毫升/百克体重。给药组于实验第2天开始给药。于实验第2周末处死动物，取肝脏左叶固定于10%福尔马林溶液，HE染色及苏丹Ⅲ染色。

慢性肝炎实验分三组进行。一组为正常动物组，其他两组分别为慢性肝炎对照组与给药组，实验方法与实验(一)I组相同，但于实验第4周末断头处死动物。取肝脏左叶固定于10%福尔马林溶液，HE染色及VG染色。肝硬变实验即实验(一)I组。

实验结果见表2，显示齐墩果酸可使急性和慢性肝损伤的肝细胞气球样变和坏死明显减轻，间质炎症反应减轻。在慢性肝炎实验中，给药组肝纤维增生较对照组明显为轻(见插图3、4)。齐墩果酸尚有抑制脂肪肝发生的作用(见插图5、6)。

(三) 齐墩果酸对各种肝损伤SGPT活力的影响
对实验(二)急性肝炎、慢性肝炎及肝硬变实验各组动物进行SGPT活力测定，其结果见表3，表明齐墩果酸对急、慢性肝炎及肝硬变动物均有明显降酶作用。此种降酶作用与病理组织学的改善相一致。

(四) 齐墩果酸对慢性肝损伤动物血清γ球蛋白影响

对实验(二)慢性肝炎及肝硬变实验各组进行血清蛋白电泳分析，其γ球蛋白的平均百分比列于表4。血清蛋白电泳分析结果表明，经齐墩果酸治疗的慢性肝炎动物的血清γ球蛋白较对照组有所下降，但统计

表 3 齐墩果酸对急性肝炎、慢性肝炎、肝硬变SGPT活力的影响

组 别	急性肝炎实验 [△] (均值±标准误)	慢性肝炎实验 [△] (均值±标准误)	肝硬变实验 [△] (均值±标准误)
正常动物	60.7±9.7	77.8±12.6	56.8±14.0
肝损伤对照	359.8±95.2	241.7±59.0	121.8±18.2
给 药	91.3±14.0*	79.7±10.4*	53.0±14.4*

[△] 表内每项测定值均为6只动物的平均测定值；
* 与肝损伤对照组相比，P<0.05。

表 4 齐墩果酸对慢性肝损伤动物血清γ球蛋白(%)的影响

组 别	慢性肝炎实验 [△] (均值±标准误)	肝硬变实验 [△] (均值±标准误)
正常动物	14.8±1.4(6)	14.1±1.5(6)
肝损伤对照	17.1±2.6(6)	16.1±1.3(6)
给 药	11.1±0.7(6)	10.0±0.5*(5)

[△] 表中()内数字为实验动物数；
* 与肝硬变对照组相比，P<0.01(t=4.04)

学处理未见明显差异。经齐墩果酸治疗的肝硬变动物与其对照组相比有明显差异(P<0.01)。此结果与组织学观察所见之肝脏间质炎症反应减轻相一致。

(五) 齐墩果酸对肝细胞再生的影响

在乙醚麻醉下，将大白鼠肝脏的中叶与左叶切除，约切除肝脏之70%。术后分两组，即肝切除对照组与给药组。给药组于当日下午(术后4小时)及次日9时给药两次，肝切除对照组给予等量生理盐水。术后

48小时将动物断头处死。处死前4小时腹腔注射秋水仙碱1毫升/只(0.2毫克秋水仙碱)。称肝脏重量,求其再生度^(注)。将肝脏左叶置于10%福尔马林溶液中固定,进行HE染色。在光镜下计算10个高倍镜视野的核分裂相数,同时取血清,应用反向血凝法检测胎甲球(AFP)。

表5所示,齐墩果酸可促使大白鼠残留肝脏的核分裂相数明显增多(见插图7~8),再生度高于对照组。正常动物组与肝切除对照组动物血清的胎甲球均未检出,而给药组动物血清均检出了胎甲球,与核分裂相的增多相关。结果提示齐墩果酸具有促进肝细胞再生的作用。

表5 部分肝切除后对照组与给药组之间的肝再生比较

组别	动物数	核分裂相(个) (均值±标准误)	再生度(%) (均值±标准误)	AFP(1:10)		
				-	+	++
正常动物	5			5	0	0
肝切除对照	6	55.2±13.2	45.1±3.5	6	0	0
给药	6	129.3±15.2*	55.9±2.9**	0	5	1

* 与肝切除对照组相比, $P<0.01(t=3.66)$;

** 与肝切除对照组相比, $P<0.05(t=2.49)$

在慢性肝炎及肝硬变的实验中,给药组的胎甲球检出率亦高于各自的对照组,详见表6。由于动物数较少,统计学处理尚未达到显著界限。

表6 慢性肝损伤时动物血清胎甲球(AFP)的检出情况

组别	慢性肝炎实验*				肝硬变实验*			
	1:10				1:100			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常动物	6	0	0	0	6	0	5	0
肝损伤对照	4	0	2	0	5	1	2	2
给药	0	0	6	0	1	5	0	1

* 各组每次实验动物均为6只大白鼠

(六) 齐墩果酸对肝硬变大白鼠脑组织及血浆游离酪氨酸含量的影响。

酪氨酸测定是在实验(一)Ⅱ组大白鼠进行的。实验第9周末断头处死动物后,取血浆和脑组织制成匀浆,测其游离酪氨酸含量⁽¹⁰⁾。从表7结果可看出:肝硬变大白鼠的脑匀浆内,游离酪氨酸含量较正常大

表7 齐墩果酸对肝硬变大白鼠脑匀浆与血浆酪氨酸含量之影响

组别	动物数	脑匀浆酪氨酸 微克/克脑 (均值±标准误)	血浆酪氨酸 微克/毫升 (均值±标准误)
正常动物	5	63.4±6.7	15.9±1.8
肝硬变对照	6	85.3±8.7	15.9±1.5
给药(3)	5	72.0±7.4	34.0±0.8**
给药(2)	4	52.7±3.3*	31.0±4.9***

* 与肝硬变对照组相比, $t=2.92$, $P<0.02$;

** 与肝硬变对照组相比, $t=10.0$, $P<0.001$;

*** 与肝硬变对照组相比, $t=3.51$, $P<0.01$ 。

鼠增多,而血浆的酪氨酸量未见增高。给药(2)组与肝硬变对照组相比,脑匀浆内酪氨酸的含量明显下降($t=2.92$, $P<0.02$);而血浆酪氨酸水平却明显升高($t=3.51$, $P<0.01$)。给药(3)组与肝硬变对照组相比,血浆酪氨酸水平明显升高($t=10$, $P<0.001$);脑组织酪氨酸水平虽下降,但经统计学处理无明显差异。

讨 论

根据当前的观点⁽¹¹⁾,决定和影响肝硬变发生的基本因素有:(1)坏死:肝细胞坏死几乎是各型肝硬变形成的基本因素;(2)再生缺陷:单个或少量肝细胞坏死后只要健存的肝细胞能通过细胞分裂进行再生修复,则不会导致肝纤维化发生;(3)纤维增生:在肝细胞坏死而剩余的肝细胞又无力再生的情况下,便发生纤维增生反应。由此可见,抑制肝细胞变性、坏死,消除炎症反应,促进其再生即能中止纤维化。齐墩果酸防止肝硬变发生可能与上述因素有关。

齐墩果酸可使肝组织变性、坏死明显减轻,SGPT活力下降,其次是肝组织间质炎症反应减弱,血清γ球蛋白下降;还可促进肝细胞再生,坏死区迅速修复,从而抑制胶原纤维的增生,以致肝硬变难以形成。因此,可推测齐墩果酸主要作用乃是抑制肝细胞变性、坏死和非特异性消炎作用,而抑制纤维增生的作用很可能是一种继发现象。在肝硬变形成后,齐墩果酸并未使肝硬变形成率下降,这一事实提示齐墩果酸似无促进胶原降解和胶原纤维量吸收的作用。

据报道⁽¹²⁾,D青霉素治疗慢性活动性肝炎有相当疗效,对应用皮质激素和免疫抑制剂无效的病例尤值得应用,但对已形成的肝硬变一般无效。D青霉素对

注:再生度=[再生的肝总重-(切除的两肝叶之重+0.684-切除的两肝叶之重)]÷切除的两肝叶之重。公式中的0.684表示切除肝脏重与原肝重之比。

改善患者的临床症状,降低SGPT活力较为明显,尚有一定程度的降血清 γ 球蛋白的作用。在病理组织学方面,D青霉胺有较明显的消除炎症作用及去纤维化作用,这与我们所观察的齐墩果酸作用极为相似。然而,青霉胺的副作用颇多,有些且相当严重,如造血系统障碍(严重者可发生再障),诱发肾病综合征、视神经炎等。北京、上海、广州、重庆等地临床应用齐墩果酸治疗慢性肝炎均取得满意之疗效,但未见有何明显的副作用⁽³⁾。

近年来,认为肝性脑病的发生与血浆氨基酸失衡有关。苯丙氨酸与酪氨酸在脑内含量增多,均可通过抑制酪氨酸羟化酶的活性,使真性神经介质合成减少,假性神经介质增多,以致脑组织功能发生紊乱⁽¹⁸⁾。因此,降低脑内酪氨酸水平对防治肝性脑病可能具有一定作用。在我们实验中发现,肝硬变大鼠脑匀浆的酪氨酸水平明显高于正常动物组,而经长期齐墩果酸治疗的动物,脑匀浆的酪氨酸水平较肝硬化对照组明显降低,与正常动物水平相近,但血浆的酪氨酸水平却较二者明显升高。这就提示,齐墩果酸是否对血脑屏障功能有影响,以致血浆酪氨酸逸入脑组织减少。关于这一点有待今后研究中证实。

小 结

齐墩果酸可防止实验性肝硬变的发生。实验表明

齐墩果酸能抑制或减轻肝细胞变性与坏死,促进肝细胞再生,加速坏死组织的修复;有非特异性抑制炎症反应的作用;抑制胶原纤维的增生。经齐墩果酸长期治疗后与肝硬变对照动物相比,脑匀浆的酪氨酸含量明显降低。

齐墩果酸的上述作用,和近年研制的青霉胺相比很为相似。因此,齐墩果酸可能是治疗慢性活动性肝炎与防止肝硬变发生的一种有希望的新药。

参 考 文 献

- (1) Popper H: Am J Path 87:228, 1977.
- (2) Popper H, et al: Clin Gastroent 4:315, 1975.
- (3) 韩德五等:中华医学杂志 59:206, 1979.
- (4) 湖南医药工业研究所:中草药通讯 (4):32, 1977.
- (5) 齐墩果酸治疗慢性病毒性肝炎鉴定会交流资料(长沙), 1980.
- (6) 韩德五等:山西医药杂志 (10):58, 1976.
- (7) 韩德五等:中草药通讯 (8):23, 1976.
- (8) 韩德五等:新医药学杂志 (2):5, 1977.
- (9) Kovách A: A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei, III kötet, p 453, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1957.
- (10) 韩德五, SZ Horváth: 生理学报 26:271, 1963.
- (11) Schinella RA, et al: Cirrhosis. In Becker FF (eds): The liver: Normal and abnormal functions. Part B, p 711, Marcel Dekker. New York, 1975.
- (12) 沈稚舟:国外医学参考资料流传学分册 (3):119, 1977.
- (13) Cascino A, et al: Gastroenterology 23:591, 1978.

温 针 治 疗 60 例 颜 面 神 经 麻 痹

河南省安阳市人民医院 张 学 贤

从1965年至1978年4月,对60例颜面神经麻痹进行温针治疗,效果良好。60例中,男31例,女29例;20岁以下5例,21~40岁35例,41~60岁16例,61~80岁4例;最小14岁,最大80岁;发病30天以内者37例,31~60天者6例,2~6月者5例,6~1年者2例,1年以上者10例;病程最短1天,最长8年;左侧33例,右侧27例。60例表现不同程度一侧面部肌无力外,伴耳鸣耳痛者12例,面部肿胀9例,面肌痉挛15例,味觉失常14例。

治疗方法:取穴同一般针刺。眼闭合不全、不能抬眉、额纹消失者取丝竹空、攒竹、睛明配太阳、合谷。口、颊肌力弱取翳风、下关、地仓配承浆、曲池。捻

转进针,得气后可根据病人体质给以适当刺激,然后留针温灸。

将艾段剪成1或2厘米长,根据穴位深浅选用,进针1寸者可选用2厘米段,进针5分者选用1厘米段,进针更浅者,可将艾段剪成0.25厘米。将选好艾段套于针上,距皮肤20毫米,从艾段下端点燃,至自灭为止。为避免烫伤,可取适当硬纸片,先套于针身以覆盖局部皮肤。

治疗结果:痊愈33例(55%),显效14例(23.4%),有效9例(15%),无效4例(6.6%)。

根据临床经验,温针下关穴对面肌痉挛有较好疗效。但每次温灸必在3段以上,才能收到理想效果。

齐墩果酸防止实验性肝硬变发生的研究

(正文见 57 ~ 60 页)

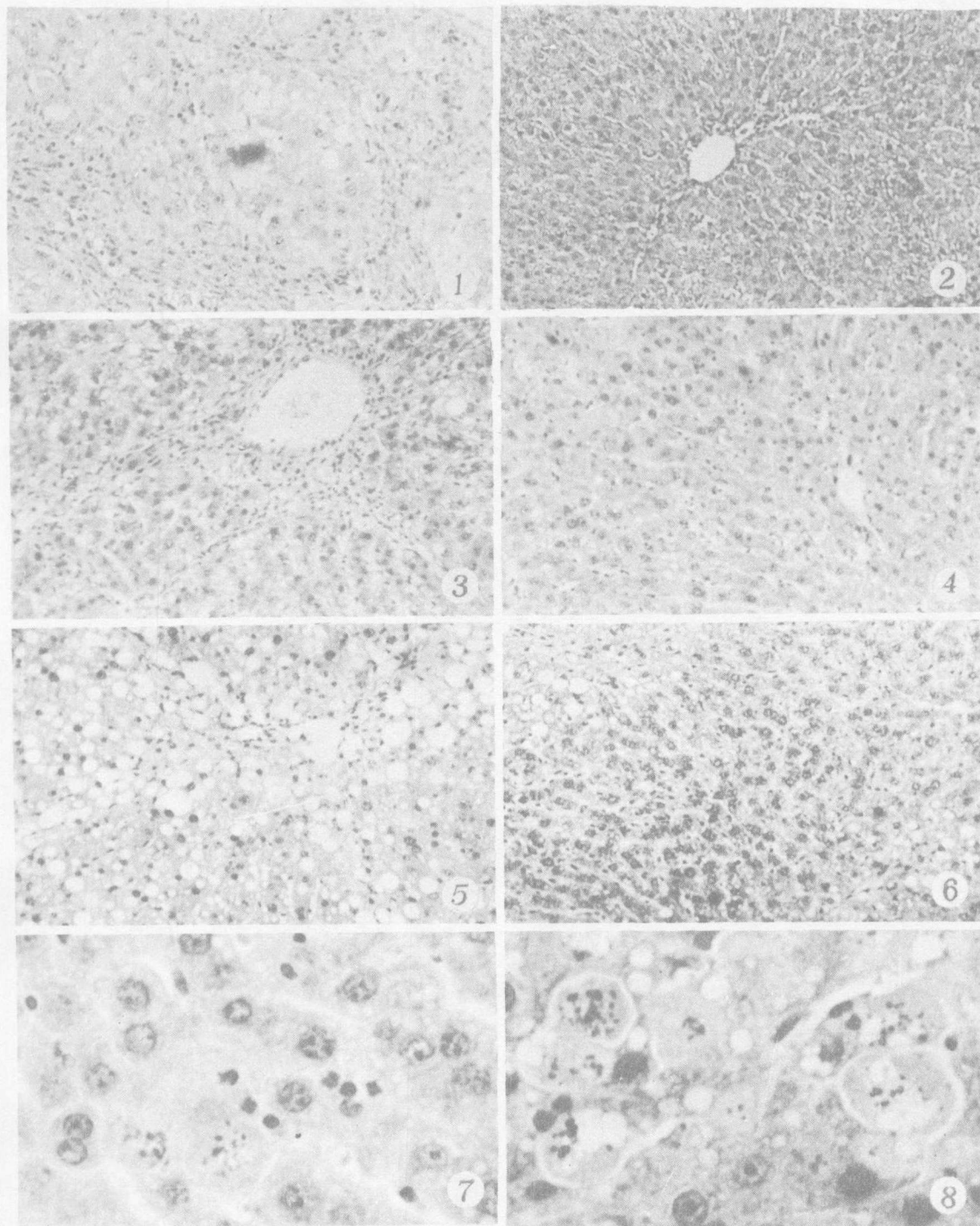


图 1 肝硬变实验对照组动物,在实验第 9 周末形成肝硬变。(HE $\times 100$) 图 2 肝硬变实验给药(2)组动物,在实验第 9 周末,肝脏未见明显纤维增生或硬变。(HE $\times 100$) 图 3 慢性肝炎实验对照组动物,肝脏中央静脉周围有胶原纤维增生,并向四周呈星芒状伸展。(HE $\times 100$) 图 4 慢性肝炎实验给药组动物,肝脏未见纤维增生,肝细胞变性也较轻微。(HE $\times 100$) 图 5 脂肪肝实验对照组动物,在实验第 2 周末,肝脏发生严重脂肪变性。(HE $\times 100$) 图 6 脂肪肝实验给药组动物,肝脏的脂肪变性明显减轻。(HE $\times 100$) 图 7 部分肝切除实验对照组动物,残留肝组织核分裂相较少。(HE $\times 400$) 图 8 部分肝切除实验给药组动物,残留肝组织核分裂数目增加。(HE $\times 400$)