

实 验 研 究

当归补血汤加味对氢化可的松所致
大鼠肝损伤保护作用的研究

北京中医学院组织胚胎教研室 牛建昭

导师: 贾长恩 王德福

氢化可的松是肾上腺皮质激素之一。近年来,国内为探讨中医基本理论——“虚证”的实质,曾用氢化可的松造成动物“虚证”病理模型,并用电镜观察到助阳药对氢化可的松所致小鼠肝脏损伤有一定保护作用^{〔1,2〕}。此外,观察到益气健脾的“补中益气丸”同样具有保护作用,并能调整肝脏的组织化学成分^{〔3〕}。

当归补血汤是补益气血的代表方剂,为加强其补气生血功效,我们在原方基础上再加一味人参,制成“气血注射液”。实验结果已证明“气血注射液”能减轻血虚动物模型的贫血程度,并使脾脏红髓的RNA含量及酸性磷酸酶等多种酶活性增强^{〔4〕}。为进一步了解补气生血药物对虚损动物的影响,本文应用透射电镜研究了“气血注射液”对氢化可的松所致肝损伤的保护作用,以便探讨“气血注射液”的保护作用机理,为其临床应用提供实验形态学依据。

材 料 和 方 法

实验动物为健康雄性大白鼠74只,体重170~210克,自由进食和饮水。每批实验分三组进行:(1)肝损组(或称氢可组)25只鼠,每日肌肉注射醋酸氢化可的松* (以下简称氢化可的松)5毫克/100克体重,连续6日;(2)治疗组35只鼠,在注射氢化可的松前2天开始,每日灌胃“气血注射液”**1毫升/100克体重,连续8日,氢化可的松给药法同氢可组;(3)正常对照组(以下简称正常组)14只鼠,以生理盐水代替氢化可的松,以自来水代替“气血注射液”,方法同治疗组。为了避免动物源性肾上腺皮质激素分泌昼夜节律性对实验的影响,保持动物自身应激状态的相对稳定,采取了以下措施:实验动物分笼饲养;动物室只饲养大鼠;给药及处死取材时间全部在上午8~9时进行;动物室温度17~20℃。

上述动物均于实验第8日断头处死取材,取材前

16小时禁食,自由饮水。

一、肝重、体重及肝重/体重百分比测定

大白鼠24只,正常组6只,氢可组7只,治疗组11只。实验分3批进行。从实验开始第1天起,每日记录体重,动物断头处死后,取出整个肝脏。以滤纸吸干其表面血液,称取肝重,计算出肝重/体重百分比,并进行统计学处理。

二、光学显微镜的标本制备

大白鼠50只,正常组8只,氢可组18只,治疗组24只。实验分8批进行,于连续注射氢化可的松3次、6次后取材。在肝左叶距肝尖5毫米处取小块肝组织,经10%福尔马林固定,常规石蜡切片,H.E染色。部分切片以铁苏木精染线粒体。

三、电子显微镜的标本制备

动物数量、分组情况及取材部位同二。迅速取小条肝组织,立即浸泡于0~4℃的2.5%戊二醛磷酸缓冲液,切成1×1×2毫米³小块,分别在2.5%戊二醛及1%四氧化锇中固定2小时,系列丙酮脱水,Epon 812环氧树脂包埋。先用LKB IV型切片机切成1微米厚的半薄切片,以2%次甲基蓝液染色,在光学显微镜下确定肝小叶中央带及周围带,于中央静脉或汇管区周围6层细胞区域内,在解剖镜下细修出“小台”,而后再做超薄切片。经醋酸双氧铀、柠檬酸铅双重染色后,用日立H 600型电镜观察。

四、肝细胞线粒体基质颗粒计数

本实验将中央带和周围带肝细胞线粒体基质颗粒分别计数,每只动物拍摄来自五个不同细胞的五张电镜照片(均为×10,000倍)作为计数资料。计数的线粒体必须清晰、完整。

* 醋酸氢化可的松系上海第九制药厂生产,批号78024。 ** 气血注射液系我院制剂教研室生产,成分为黄芪、当归、人参。

结 果

一、动物的一般体征

正常大鼠活泼矫健, 体肌丰满, 腰背平直, 被毛紧贴体、浓密而有光泽。氢可组动物从实验第四天开始, 随着注射次数增加, 出现行动迟缓、体毛枯疏、弓背塌腰, 并喜叠挤取暖, 伴有体重下降; 停止注射9日后仍未完全恢复正常。治疗组动物与正常组比较变化不大, 但仍有20%的动物体毛稀疏。

二、肝脏外观、肝重、体重及肝重/体重百分比

正常组动物肝脏呈紫红色, 表面光滑而有光泽, 肝缘锐薄, 氢可组动物于注射氢化可的松3次后肝脏即有改变; 注射6次后肝脏肿大, 肝缘较钝, 颜色发黄, 表面光滑但无光泽, 透过肝被膜, 肝小叶清晰可见。实验期间体重逐日下降, 取材时体重平均为147克, 较实验前(209克)降低29.7%, 肝重/体重百分比与正常组比较有非常显著性差异($P < 0.01$)。治疗组动物, 肝脏外观大致同正常组, 实验前后体重变化不明显, 其肝重/体重比与氢可组比较 $P < 0.01$ (附表)。

附表 各组大鼠体重、肝重、肝重/体重(%)的变化

组 别	动物数	实验前 体重均值 (克)	实 验 第 8 天		
			体重均值 (克)	肝重均值 (克)	肝重/体重(%) 均值±标准差
正常组	6	177	184	9.09	4.94 ± 0.42
氢可组	7	209	147	9.84	$6.69 \pm 0.52^*$
治疗组	11	197	196	9.39	$4.79 \pm 0.19^{\Delta}$

* 与正常组比较 $P < 0.01$; Δ 与肝损组比较 $P < 0.01$

三、组织学观察

氢可组注射氢化可的松3次后, 肝组织结构即有明显改变; 注射6次后, 肝小叶轮廓不清, 肝细胞索排列紊乱, 细胞核变小, 甚至固缩。胞质中嗜硷性及嗜酸性物质大量减少, 残留的物质呈粗大颗粒状集结成堆, 贴附于胞膜下及核膜外周, 胞质中出现明亮的空隙。大部分动物的肝细胞中存在有较大的脂滴。治疗组基本恢复正常, 但约有20%的动物肝组织结构并未完全恢复, 近汇管区的1~3层肝细胞内尚可见有小脂滴。

线粒体在正常动物肝细胞内分布均匀, 中央带线粒体细小而分散, 周围带则较粗大而成群分布, 中间带介于其中。氢可组肝细胞线粒体粗大, 深染, 分布不均, 集结于核膜周及胞膜内侧。治疗组线粒体大小

四、肝细胞超微结构观察

1. 核: 正常组动物肝细胞核大而圆, 核膜光滑, 由双层平行的单位膜构成, 外膜上附有核蛋白体; 常染色质电子密度低, 异染色质电子密度较大, 中央带肝细胞异染色质较多, 分布于近核膜部位, 而周围带肝细胞染色质少, 分布比较均匀。氢可组肝细胞核变小, 部分肝细胞核核膜向内凹陷, 严重者核膜皱折, 表面附着的核蛋白体消失, 核周隙增宽, 核形不规则; 异染色质增加, 集聚固缩, 趋向于沿核的周缘分布(插图1。插图在封三, 下同)。治疗组核的形态及染色质分布, 已基本上恢复到正常水平, 核仁增大, 非常与核膜相贴呈“边集”现象(插图2); 核周隙局部扩大, 外核膜向外呈袋状凸出, 表面有核蛋白体附着, 并与胞质中粗面内质网相连。

2. 线粒体: 正常组动物线粒体多呈圆形或杆形; 线粒体嵴(由内膜向腔内伸展折迭而成)长的可达线粒体中央部; 由内膜围成的内室充满均匀的基质, 其间可见电子密度很高的基质颗粒, 散在分布, 大小不均。氢可组线粒体肿胀, 数量减少, 基质电子密度减低, 基质颗粒明显减少, 只有正常组的1/2; 但线粒体嵴的分布、数量及长度基本正常, 因而在中心部出现一个相对无嵴的“中空区”, 以上变化以在周围带比较明显; 此外, 尚可见到线粒体“融合”现象, 即线粒体互相靠近, 外膜紧密相贴, 合为一个大的线粒体(插图3)。与氢可组相比, 治疗组线粒体数量增多, 体积缩小, 截面呈椭圆形或杆形; 线粒体嵴增长, 数量增多, 排列密集; 基质电子密度正常, 基质颗粒增加; 线粒体包膜完整(插图4), 毛细胆管两侧的线粒体长径增大现象尤为明显, 并与肝细胞膜平行排列。

3. 内质网: 正常组动物内质网呈扁平囊状、泡状或管状; 粗面内质网(RER)表面有密集的核蛋白体附着, 腔比较窄, 电子密度比较低, 呈均质状, 以核周、肝细胞血管面较为多见, RER常密集在一起, 呈平行、同心或弯曲排列达20~40层, 多者达50层以上; 滑面内质网(SER)表面无颗粒, 表面积大, 成堆集结, 并与糖元颗粒相伴随。氢可组动物RER减少, 膜表面附着的核蛋白体颗粒增多, 排列密集, 胞质中游离的多聚核蛋白体增多, 由5~30个单核蛋白体组成, 呈环形或旋涡形排列, 小部分RER扩张成囊泡状或结节状, 表面附着的核蛋白体呈节段性脱落(插图5); 中央带SER扩张, 呈大小不等的泡状结构。治疗组RER增加, 膜表面附着的核蛋白体颗粒排列规整, 内腔不扩张, 呈平行密集排列, 有的多达50层以上(插图6); 部分RER环绕于线粒体周围。

4. 微体、溶酶体、高尔基复合体、糖元：正常组动物微体（由一层单位膜围成的小体，常成群分布）内有电子密度相当大的核样体；溶酶体为电子密度较高的近圆球形小体，周围带肝细胞中溶酶体较多，常散布于高尔基复合体周围；高尔基复合体由3~8个层板状扁平囊及大泡、小泡组成，常分布在细胞核周围，特别是核与毛细胆管之间的胞质中，周围带高尔基复合体的体积较中央带大；糖元是肝细胞内的主要包涵物，无界膜包裹，游离分布于胞质中，有分散存在的颗粒型（ β 型）和由 β 型颗粒堆积成花簇状的集结型（ α 型）两种，正常肝细胞内以 α 型为主；一般肝细胞内很少看到脂滴、氢可组微体、溶酶体、高尔基复合体均未见明显变化；肝细胞内糖元颗粒明显增多，以 α 型为主，在胞质的某一局部可见糖元颗粒密集成堆，形成“糖元湖”；脂滴也增多，大小不等，散在分布。并部分或全部被线粒体所包绕。治疗组溶酶体体积增大，糖元较肝损伤组减少，未见大脂滴。

五、线粒体内基质颗粒计数

为了精确比较三组动物线粒体内基质颗粒数的变化，进而推测这种改变的生理意义，本实验还计数了每线粒体截面内基质颗粒数目的变化。共计测定线粒体5726个，其中正常组1604个，氢可组1364个，治疗组2758个。结果表明，基质颗粒数目也随肝小叶的部位而异。正常组周围带每线粒体截面内基质颗粒数平均为3.78个，氢可组周围带为1.91个，比正常组减少49.5%，说明氢化可的松干扰了基质颗粒在肝细胞内的正常分布。治疗组为4.67个，比氢可组增加144.5%。三组间中央带肝细胞线粒体内基质颗粒数变化不明显。

讨 论

本实验用大剂量氢化可的松造成大鼠肝损伤，给药6天后，动物外观、体重、肝重及肝脏组织学及超微结构改变，与文献报道基本一致^(6~7)。本实验的结果表明，中药复方当归补血汤加味（“气血注射液”）对氢化可的松所致动物肝损伤具有一定的保护作用。

一、对线粒体的保护作用

线粒体是肝细胞内重要的细胞器，细胞各种生理活动的能量，主要来源于ATP，而80%以上的ATP是在线粒体中完成的。线粒体还参与细胞内钙离子的调节。现已证实在线粒体内存在有 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ 交换， Ca^{++} 的减少会引起 Na^+ 和水分的积累，进而引起线粒体肿胀⁽⁸⁾，使线粒体功能下降。

肝细胞线粒体内放射性活性最高，可达核的5倍。另据报道⁽¹⁰⁾，氢化可的松可使肝细胞线粒体P/O比值（磷、氧比值）下降，呼吸控制率降低。我们曾将9只大白鼠分为三组，采用Clark氏氧电极法，对分离出的肝细胞线粒体分别进行耗氧量测定，结果氢可组的线粒体耗氧量平均值较正常组下降57.08%（ $P<0.05$ ），而加用“气血注射液”的治疗组，其线粒体耗氧量平均值与正常组者相近⁽¹¹⁾。

本实验观察到，氢可组动物肝细胞线粒体肿胀、融合，数量减少，特别是基质颗粒（主要由钙等二价离子与磷酸盐等沉积而成）明显减少，只有正常组的1/2，与文献报道⁽¹⁰⁾基本一致，可以认为是线粒体功能下降的早期表现。经用“气血注射液”治疗后，线粒体数量增加，肿胀减轻，基质颗粒增加，线粒体形态趋于正常。以上结果表明，“气血注射液”对受氢化可的松损伤的动物肝细胞线粒体有修复组织和恢复功能的作用。

二、对肝细胞核及RER的保护作用

本实验氢可组动物见有肝细胞核膜内陷、核周隙增宽、异染色质集聚固缩、胞质内RER减少、内质网及核膜表面附着的核蛋白体脱落消失等现象；而治疗组动物，在加用“气血注射液”后，肝细胞内不但看不到核膜内陷和异染色质集聚，相反可见核及核仁都增大、核仁“边集”增多以及RER密集平排，多者达50层以上。一般认为核仁“边集”现象在蛋白质合成旺盛的细胞比较明显，有利于核仁合成的RNA向肝细胞输送。显示“气血注射液”似可对抗氢化可的松对核酸和蛋白质代谢的干扰作用，促进蛋白质合成⁽¹²⁾。“气血注射液”所表现的这种提高机体细胞活性、增进蛋白质合成的效应，正是它取得临床显效的原因所在。

综上所述，氢化可的松对肝脏的损伤，主要表现为干扰肝细胞内正常的蛋白质代谢，使核和粗面内质网受到损害，而线粒体“肿胀”、“融合”的共同结果，则导致了线粒体结构异常和功能下降，同时基质颗粒减少，细胞内正常钙代谢调节发生障碍，最后导致肝脏的超微结构发生变化。加用“气血注射液”后，能减轻肝脏的损伤程度，从而表现出一定程度的保护作用。从补气生血的“气血注射液”对氢化可的松所致肝损伤的保护作用分析，我们认为该方可能系通过调节蛋白质代谢和能量代谢，促进机体代谢功能的增强，使机体恢复抗病能力，达到扶助正气、驱除病邪、治愈疾病的目的，这可能就是所有补益类中药方剂的共同作用原理。

本实验得到叶百宽老师的热情指导，杨美娟同志在技术

笔 谈

对胆道残余结石的综合治疗研究

贺瑞麟副教授(辽宁省中医研究院):

胆道残余结石是指手术中遗留或术中难以全部取净的胆石。至于术后再形成的复发结石,是否包括在残余结石中,意见不一致,但目前在治疗原则上,两者基本一致。

胆道残余结石是胆石病治疗中的一个难题。以往该病绝大多数需再次手术,而再手术不仅技术有困难,且死亡率也高,效果往往不能令人满意。鉴于临床上残余结石的发生率有逐渐增高的趋势(据对1983年胆道残余结石会议所提供的9692例胆石手术病例统计,残石发生率为41%),并直接影响着胆石病的治疗效果,因此有必要认真找出残石发生率增高的各种因素,并提出切实可行的预防及治疗措施。

考虑我国胆石病特点,可以认为肝内泥砂样结石,特别是伴有肝内胆管炎性狭窄的泥砂样结石,手术难以取净而导致遗留,是术后残余结石发生的主要原因。但是,对病情认识不足而未能认真细致进行检查,急症手术时难以对胆道内做全面探查,忽视术中造影、测压及胆道镜等辅助方法的应用,术式选择不合理,手术方案不周密以及胆道器械陈旧等等,也是造成残余结石发生率增加的因素。因此,重视上述诸方面因素并加以改进,就有可能在短期内使残余结石发生率降低至理想水平。

中医中药治疗胆道残余结石,各地均有丰富经验,应该继续推广应用。为了提高疗效,要不断地总结中医中药治疗残石的经验,包括控制炎症、摸索排石和溶石规律,发掘各种有效方法,以及探索残石综合疗法的最佳方案等。残石治疗中的手术方案及术式的改

进,包括胆道器械的改进,也是当前较为迫切的任务。

胆道蛔虫合并感染与肝内结石有密切关系。降低肝胆管结石的发生率,并减少胆道反复感染所致的胆管狭窄,对预防胆道残石发生有重要意义。治疗前后长期地间断服用舒肝利胆中药,对消除胆道痉挛及控制炎症有一定作用,有助于促进小结石的排出,对巩固治疗效果、减少残石复发实有裨益。

王丽华副主任医师(湖南省人民医院):

对残余结石的治疗,应严格掌握适应证。根据病情选择不同的有效治疗方法。

总攻排石是综合治疗胆石病的主要方法。凡是带T管或未带T管的胆道残余结石小于1厘米,或肝胆管泥砂状残余结石,以及肝内外胆管无器质性病变和狭窄的残石,均可先给予总攻排石治疗。对并发严重胆道感染患者,应先选用抗菌素,纠正水、电解质与酸碱平衡,然后选择有利时机进行总攻或小总攻,常可以收到较好的疗效。带胆道T管的残石可选用溶石、振荡、纤维胆道镜等治疗方法。溶石疗法用于手术后病人一般情况好、无肝肾功能损害、胆管炎症被控制、无肝内外胆管狭窄者。有人认为溶石与电子胆道振荡仪同时治疗胆道残余结石效果更好。胆道纤维镜在术中使用可发现遗留结石并能取出结石,对残余结石的治疗有重要作用。胆道纤维镜亦可用于术后经逆行造影发现有结石或胆道蛔虫,又无胆道感染与肝胆管狭窄者。对T管窦道细小的可预先扩张窦道后再使用窥镜。

经上述非手术疗法治疗,效果不满意,肝内胆管有广泛性结石或有胆管狭窄的病人,应选择手术治疗。可根据不同病情,作肝部分切除、狭窄胆管的整形与

(接上页)

参 考 文 献

- (1) 施玉华等:上海中医药杂志(2):6,1980。
- (2) 施玉华等:右归丸对小白鼠氢考模型的作用——肝细胞亚微结构的变化。内部资料,1982。
- (3) 施玉华等:中医杂志,24(5):62,1983。
- (4) 张颖等:中医杂志24(4):71,1983。
- (5) 黄长恩:解剖学报6(3):209,1963。
- (6) 黄长恩:解剖学报7(4):374,1964。

- (7) Wiener J, et al: J. Cell. Biol. 37:47, 1968.
- (8) Ghadially FN: Mitochondria, In "Ultrastructural Pathology of the Cell" 1st ed, Butter Worths, London and Boston, 1975.
- (9) Litwack G, et al: Endocrinology 80:774, 1967.
- (10) Kimberly DV, et al: J. Cell. Biol. 37:63, 1968.
- (11) 朱建昭等:“气血注射液”对氢化可的松所致大鼠肝损伤保护作用的研究——线粒体超微结构与耗氧量的关系。待发表资料,1984。
- (12) Oura H, et al: Chem. Pharm. Bull. 19(8):1598, 1971.

当归补血汤加味对氢化考的松所致大鼠肝损伤保护作用的研究——肝细胞超微结构改变

(正文见第 72 ~ 75 页)

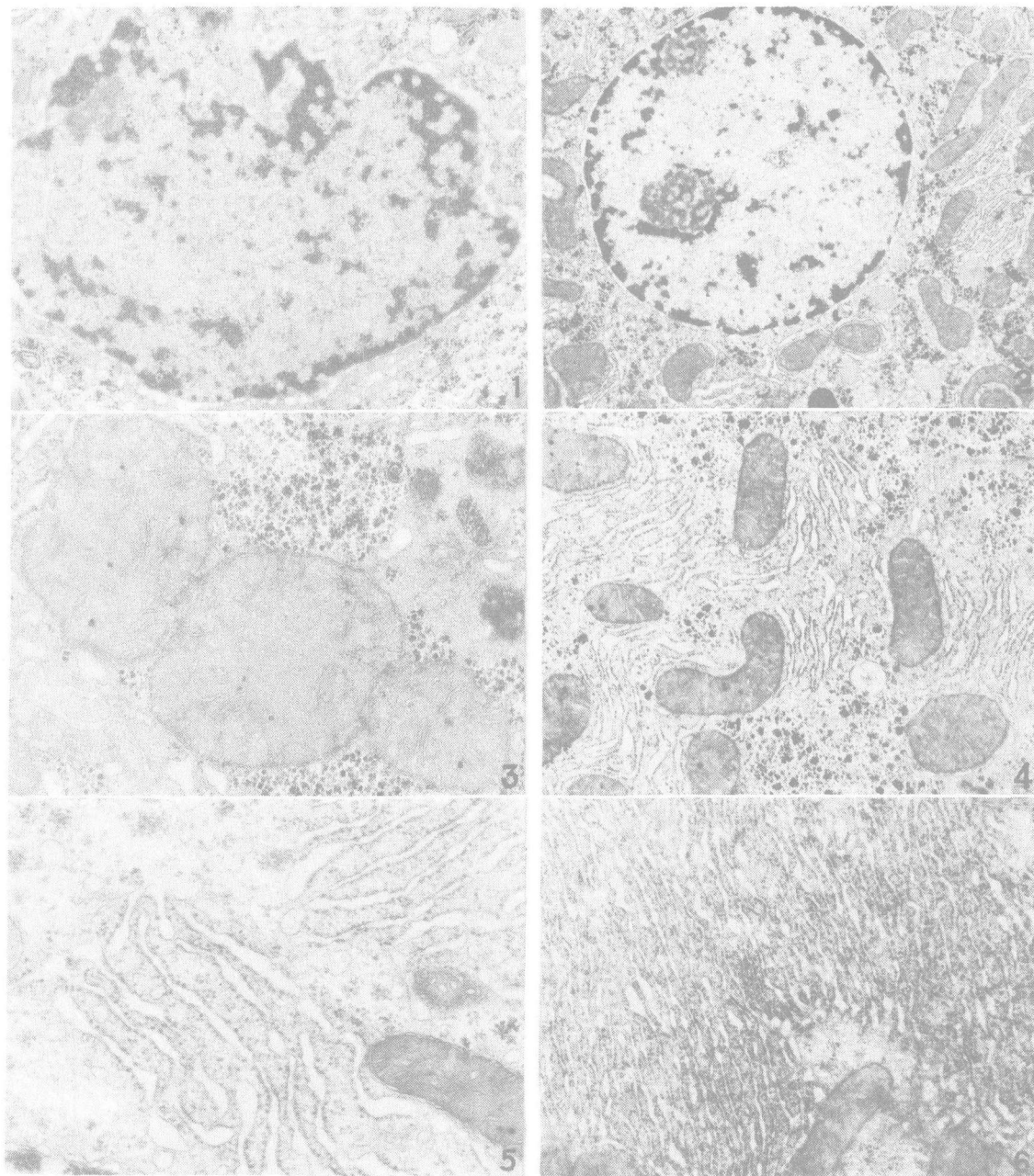


图 1 氢可组,周围带。肝细胞核核膜内陷、皱折、核形不规则,核周隙增宽,核外膜表面核蛋白体脱落、消失,异染色质增多、趋边。(×20000) 图 2 治疗组,核基本恢复正常,核仁边集。(×20000) 图 3 氢可组,周围带。线粒体融合、肿胀。(×40000) 图 4 治疗组,周围带。线粒体大小形态、构造基本恢复正常。(×20000) 图 5 氢可组,周围带。粗面内质网(RER)轻度扩张,表面核蛋白体节段脱落。(×40000) 图 6 治疗组,周围带。RER体积增多,密集平排。(×20000)