

证的研究

肝郁致瘀机理探讨

吕志平* 刘承才*

摘要 采用捆绑式限制大鼠活动,复现肝郁大鼠模型,观察了肝郁大鼠血浆血栓素 B_2 (TXB_2)、6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$)、红细胞膜流动性变化,并以逍遥散治疗作反证。结果提示,造模大鼠的动态反应与乔明琦观察的结果一致。肝郁可致:血浆 TXB_2 升高,6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 降低, TXB_2 /6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 失衡,红细胞膜流动性降低。认为各项观察指标的病理改变存在着复杂的内在联系,其协同导致血瘀的病理改变。逍遥散可降低肝郁大鼠血浆 TXB_2 浓度,提高 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 水平,提高肝郁大鼠红细胞膜流动性。结果表明,逍遥散对肝郁导致或诱发的血瘀倾向有防治作用。其反证了肝郁致瘀的理论。

主题词 肝气郁结/中医病机

肝郁,指肝疏泄不及,肝气郁结及其产生的证候。肝郁与血瘀是郁证中两个紧密相关的病理过程。“肝郁”、“瘀血”的形成是多方面病理生理改变的综合作用,涉及到多系统疾病。“肝郁致瘀”的研究日益引起人们的关注。为深入揭示肝郁致瘀的机理,有必要复制与临床观察尽可能接近的“肝郁证动物”模型进行分析。目前研究多局限于药物造模,难于排除药物中毒性反应。本研究采用捆绑式限制大鼠活动,复现“肝郁”大鼠模型,并从肝郁大鼠血浆血栓素 B_2 (TXB_2)、6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$)、红细胞膜流动性变化等的动物实验观察,以逍遥散治疗作反证,探讨“肝郁致瘀”的机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:实验动物用 Wistar 大鼠,均为雄性,体重为 $240 \pm 28g$,由本院动物室提供。肝郁模型制作:参照乔明琦大鼠肝气郁模型制作方法进行复制^[1]。将 30 只大白鼠随机分 3 组,分别装入饲养笼内,将造模大鼠用绷带细条束四肢,使之行走困难、活动受限,然后定时观察并记录大鼠状态,时间 1 周。空白对照组:不作任何刺激,等量生理盐水灌胃,每日 2 次,连续 7 天。肝郁造模组:束缚四肢,等量生理盐水灌胃,每日 2 次,连续 7 天。肝郁服药组:束缚四肢,逍遥散水煎液 $1ml/100g$,每日 2 次,连续 7 天。

1.2 主要试剂(药品)及仪器:逍遥散(《太平惠民和剂

局方》)按原方比例:柴胡 10g,当归 10g,白芍 10g,白术 10g,茯苓 10g,甘草 5g,生姜 2 片,薄荷 3g。药物浸 30 分钟后水煎,在 $80^\circ C$ 恒温水浴中浓缩成含生药量 $1g/ml$,存冰箱备用。

血浆 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 及 TXB_2 测定的主要试剂及仪器:6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 、 TXB_2 、 ^{125}I 测定试剂盒(由北京解放军总医院提供),FJ2008Y 免疫计数仪(国产)。

红细胞膜流动性测定的主要试剂及仪器:DPH 标记液(美国 Sigma 公司);PBS 缓冲液($pH=7.4$);RF-540 荧光分光光度计(日本岛津公司)。

1.3 观察项目及方法: TXB_2 、6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 测定采用放射免疫分析法,按试剂盒说明书操作。

红细胞膜流动性测定采用荧光法。取受检鼠血,离心分离红细胞,用生理盐水洗 2 次后,用适量 PBS 将红细胞悬起,配成 4×10^7 细胞/ml 浓度的红细胞悬液。取制备的红细胞悬液 2ml,与 2ml DPH 标记液混匀,于 $25^\circ C$ 水浴下保温 30 分钟。保温毕离心分离红细胞,去掉残留标记液,再用 PBS 洗 2 次,最后用 PBS 液 4ml 将细胞悬起,进行荧光测量,以非标记的细胞样品作为空白对照。用恒温水浴($25^\circ C$)控制测试温度(激光波长 364nm,发射波长 457nm)。

2 观察结果

2.1 受检大鼠血浆 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 及 TXB_2 测定结果:肝郁造模组与空白对照组比较,血浆 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 明显降低($P < 0.01$), TXB_2 明显升高($P < 0.01$),6-keto-PGF $_{1\alpha}/TXB_2$ 比值明显下降($P < 0.01$)。肝郁服药组与肝郁造模组比较,血浆 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 明显升高($P < 0.05$), TXB_2 明显降低($P < 0.01$);6-keto-PGF $_{1\alpha}/TXB_2$ 比值明显升高($P < 0.01$)。肝郁服药组与空白对照组比较, TXB_2 两组间无统计学意义,6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 明显降低($P < 0.05$),6-keto-PGF $_{1\alpha}/TXB_2$ 比值较空白对照组低($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 受检大鼠红细胞膜流动性测定结果:肝郁造模组与空白对照组比较,荧光偏振度(P)明显升高($P < 0.01$),脂区微粘度(η)明显升高($P < 0.05$)。肝郁服药组较肝郁造模组荧光偏振度降低($P < 0.01$), η 明显降低($P < 0.01$),与空白对照组比较无统计学意义(P

* 中国人民解放军第一军医大学中医系,广州市同和(510515)

收稿日期:1999-04-28;修回日期:1999-09-20

表1 各组血浆 6-keto-PGF_{1α}、TXB₂、6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	6-keto-PGF _{1α} (pg/ml)	TXB ₂ (pg/ml)	6-keto-PGF _{1α} /TXB ₂
空白对照组	10	66.34 ± 4.97	185.29 ± 6.97	0.3640 ± 0.029
肝郁造模组	10	48.02 ± 7.37**	286.32 ± 9.68**	0.1711 ± 0.036**
肝郁服药组	10	53.19 ± 3.20*△	177.36 ± 9.08△△	0.3008 ± 0.026*△△

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与肝郁造模组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

表2 各组红细胞膜流动性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	P	η
空白对照组	10	0.256 ± 0.021	2.556 ± 0.041
肝郁造模组	10	0.298 ± 0.015**	3.384 ± 1.146*
肝郁服药组	10	0.259 ± 0.021△△	2.569 ± 0.442△

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与肝郁造模组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

> 0.05)。见表2。

3 讨论

有研究表明:肝主疏泄,与神经系统调节、物质代谢、核酸代谢、内分泌激素的代谢、激素的灭活作用、抗病解毒功能、血液的贮藏和血量的调节等有关^[2]。肝在生理上的特性和功能,决定了其在病理上对瘀血产生的必然联系和影响。本研究结果表明,肝郁大鼠模型出现 TXB₂ 升高,6-keto-PGF_{1α} 降低;TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 比值升高,红细胞膜流动性降低,这些病理改变存在复杂的内在联系,其协同导致瘀血病理改变。

TXB₂ 是迄今所发现的最强的血小板聚集物和促血管收缩物质,其作用机理是抑制腺苷酸环化酶的活性,使细胞 cAMP 水平降低,进而促进血小板聚集,血管收缩。与 TXB₂ 相反,前列环素(PGI₂)是目前所知的最有效的抑制血小板聚集的物质和血管扩张物质,作用机理是通过刺激细胞腺苷酸环化酶,升高 cAMP 水平,对血小板聚集,血管张力及血栓形成起重要调节作用^[3]。我们前已报道,肝郁大鼠模型肝内、血中脂质过氧化反应增强^[4]。LOP 的升高,可抑制前列腺素合成,血栓素升高,血栓素 A₂(TXA₂)增多,可导致血管痉挛加重,血栓形成加速^[5]。可见血瘀证与血浆 TXA₂-PGI₂ 的平衡失调密切相关。本研究观察 PGI₂ 和 TXA₂ 的稳定代谢产物 6-keto-PGF_{1α} 和 TXB₂ 的变化,以反映 TXA₂-PGI₂ 的水平^[6]。结果提示:肝郁大鼠模型 TXB₂ 的升高,6-keto-PGF_{1α} 的降低,TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 平衡的失调是导致瘀血机制的重要环节。

细胞通过细胞膜来调节细胞内部与周围环境以及细胞与细胞之间的相互关系。红细胞膜的结构为脂质双分子层(磷脂、胆固醇、糖脂),红细胞由于其细胞膜中含有大量的不饱和脂肪酸,又直接暴露在高氧分压下,很容易发生脂质过氧化反应。本研究结果表明:肝

郁大鼠模型红细胞膜流动性明显下降。可能与脂质过氧化作用增强有关,肝郁大鼠模型脂质过氧化作用增强^[4]。其中间产物自由基和最终产物丙二醛严重损伤膜结构而影响膜的流动性,使膜脆性增加,造成膜的功能障碍^[7]。红细胞膜的流动性和红细胞的变形能力有关。它是影响血液流动性的重要因素。红细胞膜流动性降低还可能与 TXA₂-PGI₂ 失调有关。PGI₂ 分泌减少,TXA₂ 增多,后者又继发性激活血小板,引起血小板与内皮细胞内 cAMP 减少和 cGMP 的增加,cAMP-cGMP 调节系统失衡。根据近年的“移动受体”假说认为:cAMP 行使第二信息传递作用与细胞膜的流动性有关^[8]。血瘀证患者红细胞流动性减少可使红细胞的变形性降低,从而导致微循环障碍,容易形成微血栓^[9]。血瘀证其细胞膜微粘度升高,流动性降低,无论是血瘀模型动物还是临床血瘀证患者变化非常一致^[9]。可见红细胞膜流动性与血瘀证密切相关。红细胞膜流动性降低是肝郁致瘀的病理机制之一。

本研究提示逍遥散具有降低肝郁大鼠血浆 TXB₂ 浓度,提高 6-keto-PGF_{1α} 水平,从而调节 TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 平衡;并有提高肝郁大鼠红细胞膜流动性作用。说明其对肝郁导致或诱发的血瘀倾向有防治作用。反证了肝郁致瘀的理论;并为血瘀证从肝论治,治瘀采用疏肝解郁方剂提供了依据。

参考资料

- 1 乔明琦.肝气逆、肝气郁两证客观指标实验研究.山东中医学院学报,1992,(3):23-25.
- 2 张同贵.祖国医学“肝本质”初探.福建中医药,1989,(6):18-20.
- 3 周永昌,翁心植.TXA₂-PGI₂ 的平衡与临床.中华内科杂志,1987,(1):49-52.
- 4 吕志平,刘承才.“肝郁”大鼠的脂质过氧化反应及逍遥散的保护作用.山东中医学院学报,1995,19(3):199-201.
- 5 李凤文,须惠仁,张问渠.肝郁气滞血瘀的临床和实验研究.中医杂志,1991,32(10):46-48.
- 6 王蕾,刘承才.肝调节血量理论和实验研究.山东中医学院学报,1994,18(2):91-93.
- 7 舒守琴,余美娟,李祝.27 种中药及 SOD 对体外大白鼠匀浆过氧化脂质生成的影响.山东中医学院学报,1991,(3):72-73.
- 8 石林.用荧光偏振法研究丹参素对血小板膜脂质流动性的影响.中药药理与临床,1985,创刊号:101.
- 9 谭毓治,谢金生.细胞膜流动性与中医药研究.中国中西医结合杂志,1992,12(11):699-701.