

血府逐瘀汤抗血吸虫致小鼠肝纤维化的实验研究

张晓平* 陈建明* 强世平*

摘要 目的:观察血府逐瘀汤对早期血吸虫性肝纤维化病理过程的阻断及逆转作用。方法:采用日本血吸虫感染小鼠造成病理性肝纤维化模型,应用血府逐瘀汤 45 日后,分别检测小鼠血清 I 型、Ⅲ 型前胶原(PC-I、PC-Ⅲ)、肿瘤坏死因子(TNF- α)及白细胞介素 6(IL-6)、肝组织中羟脯氨酸(HYP),并对肝虫卵肉芽肿的周长、最大径、最小径及肝内病灶中网状纤维等进行图像分析。最后与实验对照组、秋水仙碱组及空白对照组比较。结果:血府逐瘀汤组与实验对照组比较,小鼠血清中 PC-I、PC-Ⅲ、TNF- α 、IL-6 及肝组织中 HYP 含量显著减少($P<0.01$),肝内虫卵肉芽肿的周长、最大径、最小径显著缩短,肝内病灶中增生纤维组织所占面积显著缩小($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肝病灶炎性细胞浸润明显减轻。效果不低于秋水仙碱组。结论:血府逐瘀汤能有效阻断及逆转早期血吸虫性肝纤维化病理过程,是取代秋水仙碱等抗肝纤维化药物的良方。

主题词 肝纤维化/中医药疗法 血吸虫病,日本/中医药疗法 血府逐瘀汤/治疗应用

目前,阻断和降解肝纤维化研究已发展到了细胞、分子水平^[1]。为了明确《医林改错》中活血祛瘀、行气止痛之血府逐瘀汤在治疗胁痛日久的肝纤维化、肝硬化时是否具有阻断和降解肝纤维化作用,本课题采用日本血吸虫感染小鼠造成病理性肝纤维化模型,应用血府逐瘀汤 45 日后,分别检测小鼠血清 I 型、Ⅲ 型前胶原(PC-I、PC-Ⅲ)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)及肝组织中羟脯氨酸(HYP),并对肝虫卵肉芽肿的周长、最大径、最小径及肝内病灶中网状纤维等进行了图像分析。通过观察血府逐瘀汤在治疗肝纤维化模型小鼠过程中小鼠体内细胞、细胞外基质和细胞因子的改变,分析其抗肝纤维化的机理。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物:选择 6~8 周龄昆明种小鼠 80 只,体重 $20\pm 2\text{g}$,雌雄各半(由湖北省医学科学院实验动物中心提供)。将小鼠随机分为血府逐瘀汤组、秋水仙碱组、实验对照组及空白对照组,每组 20 只,雌雄各半,分笼饲养。血府逐瘀汤组、秋水仙碱组、实验对照组小鼠共 60 只,将湖北钉螺新逸出的湖北省汉川县中国大陆株日本血吸虫尾蚴(湖北省血吸虫病防治研究所提供),以盖玻法经小鼠腹部皮肤攻击感染,每只小鼠感

染 50 条血吸虫尾蚴,雌雄分笼,置 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 恒温房中,全价饲料喂养。45 日后,可造成肝纤维化小鼠模型。空白对照组不感染血吸虫尾蚴。

1.2 用药制备:根据 45 日体重 25g 的 60 只小鼠用药总量(小鼠每克体重单位用药量约按成人 20 倍比例计算),取桃仁 13g,红花 10g,当归 10g,生地黄 10g,川芎 6g,赤芍 6.5g,牛膝 10g,桔梗 6g,柴胡 3.5g,枳壳 6.5g,甘草 3.5g,粉碎为粗末(直径 2mm),加水 1 000ml,浸泡 30 分钟,武火煮沸,改文火煎 30 分钟,冷却 30 分钟后,滤渣取汁。将滤渣如上法再煎煮 2 次,再将 3 次煎煮所得药汁混合,文火浓缩至 1 100ml,备用。所制血府逐瘀汤浓度为 77.27mg/ml。

1.3 分组用药方法:小鼠感染血吸虫尾蚴 45 日后体重为 $25\pm 2\text{g}$,按每只 25g 体重用药。血府逐瘀汤组:以血府逐瘀汤灌胃,每只 0.4ml(相当于给生药 1.24g/kg 体重),每日 1 次。秋水仙碱组:以秋水仙碱(巴黎 Hond's 实验室提供)溶液(0.0625mg/ml)灌胃,每只 0.4ml(相当于给药 0.01g/kg 体重),每日 1 次。实验对照组:以生理盐水灌胃,每只 0.4ml,每日 1 次。空白对照组不用药。小鼠在 45 日给药期间每 5 日平均体重增长 0.2g,45 日中每只体重平均增长 1.8g,对小鼠日用药量影响不大,故实验过程中各组用药量保持每日 0.4ml 不变。

1.4 观察方法:4 组小鼠在给药、饲养 45 日后,以断头法采血,离心分离血清, -40°C 保存待分析。实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两均数之间的比较采用 t 检验。

4 组小鼠每组随机抽样 10 只,应用由重庆市肿瘤研究所中心研究室提供的人 I 型前胶原放射免疫试剂盒(P I, C-RIA)、人 Ⅲ 型前胶原放射免疫试剂盒(P Ⅲ, C-RIA),操作严格按说明书进行,测定 4 组血清标本中 PC-I、PC-Ⅲ 含量^[2,3]。

4 组小鼠每组随机抽样 10 只,应用北京东亚免疫研究所提供的 TNF- α 及 IL-6 放射免疫试剂盒,检测采用双抗体夹心 ELISA 法,操作严格按说明书进行,测定 4 组血清标本中 TNF- α 及 IL-6 含量^[4,5]。

4 组小鼠每组随机抽样 10 只,取肝组织匀浆,用乙醇、丙酮脱水脱脂,经盐酸高压水解,再经水浴冷却后,在 562nm 波长处比色。按公式: HYP 含量 = 样品

* 武汉科技大学医学院临床医学部,湖北省武汉市武昌区徐家棚团结路 16 号(430062)

收稿日期:2002-04-10;修回日期:2002-05-21

表1 各组小鼠血清 PC-I、PC-III、IL-6、TNF- α 及肝组织内 HYP 含量检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PC-I ($\mu\text{g/L}$)	PC-III ($\mu\text{g/L}$)	IL-6 ($\mu\text{g/L}$)	TNF- α ($\mu\text{g/L}$)	HYP ($\mu\text{g/mg}$)
空白对照组	10	61.24 $\pm$ 27.15	5.20 $\pm$ 2.01	0.35 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.23	1.02 $\pm$ 0.27
血府逐瘀汤组	10	69.87 $\pm$ 29.66 $\blacktriangle$	5.83 $\pm$ 2.77 $\blacktriangle$	0.39 $\pm$ 0.07 $\blacktriangle$	1.18 $\pm$ 0.19 $\blacktriangle$	1.65 $\pm$ 0.32 $\blacktriangle\Delta$
秋水仙碱组	10	76.83 $\pm$ 26.36 $\blacktriangle$	6.47 $\pm$ 6.75 $\blacktriangle$	0.41 $\pm$ 0.05 $\blacktriangle$	1.21 $\pm$ 0.17 $\blacktriangle$	2.34 $\pm$ 0.45 $\blacktriangle$
实验对照组	10	128.05 $\pm$ 38.76*	19.58 $\pm$ 2.95*	0.51 $\pm$ 0.08*	1.74 $\pm$ 0.27*	3.19 $\pm$ 0.48*

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与实验对照组比较, $\blacktriangle P < 0.01$; 与秋水仙碱组比较, $\Delta P < 0.01$

表2 各组小鼠肝内虫卵肉芽肿的周长、最大径、最小径及网状纤维面积所占百分比比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	周长 (μm)	最大径 (μm)	最小径 (μm)	面积百分比 (%)
实验对照组	10	1159.10 $\pm$ 140.47	169.97 $\pm$ 40.39	144.98 $\pm$ 37.64	59.19 $\pm$ 10.41
血府逐瘀汤组	10	732.70 $\pm$ 156.37**	122.04 $\pm$ 33.41**	91.12 $\pm$ 16.43**	31.63 $\pm$ 6.32**
秋水仙碱组	10	812.50 $\pm$ 151.76**	132.70 $\pm$ 31.11*	93.87 $\pm$ 17.23**	32.36 $\pm$ 5.46**

与实验对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

管 OD/标准管 OD $\times 10 \times$ 稀释倍数/样品质量, 求得 4 组肝组织标本 HYP 含量^[6]。

血府逐瘀汤组、秋水仙碱组、实验对照组小鼠每组随机抽样 10 只, 解剖肝脏右叶膈面, 以 10% 甲醛固定 72h, 石蜡包埋, 切片, 厚度 6 μm , 每隔 5 张抽取 1 张做 Gordon-Sweet 染色。应用 FJ-TY-300 型细胞图像分析处理系统计算, 比较 3 组小鼠肝内虫卵肉芽肿的周长 (PC)、最大径 (D_{max})、最小径 (D_{min}) 及虫卵肉芽肿中的网状纤维面积占虫卵肉芽肿面积的百分比 (%)。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 PC-I、PC-III、IL-6、TNF- α 及肝组织内 HYP 含量检测结果比较: 表 1 示, 血府逐瘀汤组、秋水仙碱组与空白对照组比较, 小鼠血清中 PC-I、PC-III、IL-6、TNF- α 含量差异无显著性 ($P > 0.05$), 肝组织中 HYP 含量显著增加 ($P < 0.01$); 血府逐瘀汤组、秋水仙碱组及空白对照组与实验对照组比较, 小鼠血清中 PC-I、PC-III、IL-6、TNF- α 及肝组织中 HYP 含量均显著减少 ($P < 0.01$); 血府逐瘀汤组与秋水仙碱组比较, 小鼠血清中 PC-I、PC-III、IL-6、TNF- α 差异无显著性 ($P > 0.05$), 肝组织中 HYP 含量显著减少 ($P < 0.01$),。

2.2 各组小鼠肝内虫卵肉芽肿的周长、最大径、最小径及网状纤维面积所占百分比比较: 表 2 示, 血府逐瘀汤组、秋水仙碱组与实验对照组比较, 肝内虫卵肉芽肿的周长、最大径、最小径及肝内病灶中增生纤维组织所占面积均显著缩小 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 血府逐瘀汤组与秋水仙碱组比较, 肝内虫卵肉芽肿的周长、最大径、最小径及肝内病灶中增生纤维组织所占面积差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

肝纤维化是各种因素导致的、肝细胞发生坏死及炎症刺激时肝脏内纤维结缔组织异常增生的病理过

程。临床上常常表现出肋肋疼痛, 日久不愈, 痛如针刺而有定处, 或急躁易怒, 入夜潮热等肝郁血瘀诸证。血府逐瘀汤为清任《医林改错》中主治瘀血诸证的基础方剂, 具活血化瘀而不伤血, 疏肝解郁而不耗气的特点。方中桃红四物汤活血化瘀而养血, 四逆散行气和血而疏肝, 更加桔梗、枳壳、牛膝宽气通脉, 全方诸药配合, 可使血活气行, 瘀化郁解, 上开下行, 痛止热消。本课题检测小鼠血清 PC-I、PC-III^[7]、TNF- α 及 IL-6^[8]、肝组织中 HYP^[9], 并对肝虫卵肉芽肿的周长、最大径、最小径及肝内病灶中网状纤维等进行图像分析, 诸结果亦反映了血府逐瘀汤对小鼠早期血吸虫性肝纤维化病理过程的阻断及逆转作用。可以推断, 血府逐瘀汤在治疗肝纤维化过程中可能阻断及逆转患者肝纤维化病理过程, 是取代秋水仙碱等抗肝纤维化药物的良方。

参考文献

- Masayohi Y, Hisato N. Detection of fibronectin receptor in sera: Its clinical significance as a parameter of hepatic fibrosis. Hepatology, 1991, 14(2): 244-246.
- 刘兴明, 李伟道, 林丁, 等. 血清 I 型前胶原放免法的建立和诊断肝纤维化的初步应用. 中华肝脏病杂志, 1998, 6(4): 198-200.
- 李伟道, 刘兴明, 林丁, 等. ¹²⁵I 标记人 I 型前胶原建立放免法诊断肝纤维化. 临床肝胆病杂志, 1993, 9(3): 143-146.
- 张国安, 刘小鹏, 陈紫榕, 等. ELISA 法测定白介素-6. 标记免疫分析与临床, 1994, 1(1): 30-32.
- 黄传书, 金伯泉, 汪美先, 等. 肿瘤坏死因子- α 的产生和检测方法的研究进展. 解放军医学情报, 1991, 5(2): 82-84.
- 许志勤, 高兰兴. 组织羧基测定方法的改进. 解放军预防医学杂志, 1990, 8(1): 40-41.
- 叶红军, 刘建萍, 张丽杰, 等. I 型前胶原和可溶性 IL-2 受体在肝纤维化治疗的动态观察. 临床肝胆病杂志, 1997, 13(1): 25-27.
- 张光金, 潘雷达. 手术前后检测 IL-6 的临床意义. 上海免疫学杂志, 1997, 17(2): 177-178.
- Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. N Engl J Med. 1993, 328(25): 1828-1835.