

实验研究

益气软肝方与肝刺激因子对大鼠免疫性肝纤维化保护作用的对照研究

段志军¹ 李吉彦² 谭晨¹ 周仕壮² 王冬梅³ 马晓凯³ 杨洪涛⁴ 白长川² 胡祥¹

摘要 目的:通过与肝刺激因子(HSS)保肝作用的比较,评估益气软肝方(PGSL)对肝纤维化的保护作用。方法:大鼠肝纤维化模型由人血清白蛋白制备。PGSL保护组予PGSL中药汤剂每日两次灌胃,HSS保护组同时予HSS每周两次腹腔内注射,共8周。结果:PGSL及HSS均可以降低肝纤维化大鼠的死亡率;肝组织羟脯氨酸测定、大体标本、HE染色、嗜银及VG染色,提示二者均可以降低大鼠肝纤维化的增生程度。上述两个保护组比较均无统计学差异。结论:益气软肝方预防肝纤维化的作用与肝刺激因子相似。

主题词 肝纤维化/中医药疗法 免疫活性/药物作用 益气软肝方

中药在抗肝纤维化治疗中具有一定优势,多种复方及单药、单体的研究证明,可有效抑制肝纤维化^[1]。我们以往实验也证实益气软肝方(PGSL)对肝纤维化有保护和治疗作用。本文将该中药在保护肝纤维化方面的作用与肝刺激因子(HSS)做一比较,旨在进一步对其作用效果做一评估。

1 材料与方法

1.1 动物分组:雌性SD大鼠,50只,体重120~150g,由大连医科大学实验动物中心提供,随机分成4组。A组:正常对照组8只;B组:肝纤维化模型组15只;C组:PGSL保护组15只;D组:HSS保护组12只。

1.2 药物的制备

1.2.1 益气软肝方:由黄芪50g,白术20g,丹参25g,川芎10g,桃仁15g,鳖甲30g,生牡蛎50g,炙甘草10g组成。中药制剂由大连市中医医院标准制剂室制备成中药汤剂,按人鼠用药比例换算(以65kg成人等体重10倍量,计算每千克体重大鼠对应的药量),并结合大鼠胃的承受容量调节浓度为50%。

1.2.2 初生牛HSS:大连医药科学研究所提供。中国普通奶牛,出生后禁食水,24小时内取肝,分子筛方法提取HSS,分子量约8.0KD;HSS含量为2mg/ml;活性测定(体内法):可使肝细胞DNA合成提高4.8倍。

1.3 动物模型的制备及给药:B组:肝纤维化模型制备按Blackwell方法^[2]稍加改进。

致敏阶段:20%人血清白蛋白(HSA)用生理盐水稀释,与等量不完全福氏佐剂乳化,每只大鼠皮下多点注射,每次0.5ml(含HSA4mg),共4次,前2次间隔14天,第3、4次间隔10天,末次致敏后第10天进行攻击阶段。

攻击阶段:尾静脉攻击注射HSA,每次2.5~4mg(剂量逐渐增加),每周2次,共8周。

A组:正常对照组予相应量的生理盐水注射。

C组:即PGSL保护组。在制备模型同时,与攻击阶段同时予PGSL灌胃,每次2ml/只,2分钟内灌完,每日2次。

D组:即HSS保护组,在制备模型同时,与攻击阶段同时予每只大鼠8mgHSS腹腔内注射,每周2次。

在攻击注射8周末,全部大鼠眼球取血,做血清学检查,再去头取肝,一部分迅速投入液氮,之后转入-70℃保存。再用生理盐水按10%(w/v)浓度制备肝匀浆,-20℃保存。另一部分置入10%中性甲醛中固定,留制备病理切片。

1.4 检测指标和方法

1.4.1 大鼠血清转氨酶(ALT)、白蛋白(Alb)、球蛋白(Glb)测定:生化全自动分析仪测定。

1.4.2 肝组织羟脯氨酸(HYP)的测定:参照郑少雄方法^[3]。

1.5 病理学检查方法

1.5.1 大体标本观察肝脏的变化。

1.5.2 光镜检查:(1)HE染色:观察肝纤维组织增生与分布情况并观察成纤维细胞增生程度,“-”无成纤维细胞增生,“+”仅汇管区少量成纤维细胞增生。“++”汇管区成纤维细胞增生并向小叶内延伸,呈较窄较短的纤维条索。“+++”汇管区成纤维细胞大量增生

1 大连医科大学附属第一医院消化内科,大连市西岗区中山路222号(116011)

2 大连市中医医院

3 大连医科大学

4 大连友谊医院

收稿日期:2002-01-11;修回日期:2002-05-30

并向小叶内大量延伸。(2)嗜银染色:观察Ⅲ型胶原增生程度。“-”无网状纤维增生。“+”少数小叶的汇管区网状纤维呈细索状向肝小叶内延伸。“++”较多小叶的汇管区网状纤维呈细网状向肝小叶内延伸。“+++”多数小叶的汇管区网状纤维呈细网状向肝小叶内延伸且形成假小叶。(3)VG染色:观察Ⅰ型胶原增生程度:根据汇管区血管周围绿染区厚度,“-”: $<5\mu\text{m}$;“+” $5\sim 10\mu\text{m}$;“++” $11\sim 15\mu\text{m}$;“+++” $>15\mu\text{m}$ 。(4)HE染色:观察除汇管区、纤维间隔以外肝细胞间梭形细胞数目的变化:40倍物镜下,各随机取不同鼠肝20个视野,计数肝细胞间(汇管区、纤维间隔以外)梭形细胞数目。(5)HE染色:观察肝细胞、炎细胞的变化。

1.6 统计学方法:死亡率的比较用四格表的确切概率法,病理学判断中的等级资料应用秩和检验,计量资料用方差分析。

2 结果

2.1 对肝纤维化大鼠死亡率影响的比较:免疫性肝纤维化大鼠的死亡率为46.67%,给予PGSL与HSS均可以降低免疫性大鼠的死亡率,分别为13.33%($P<0.01$)、25.00%($P<0.05$)。PGSL组较HSS组死亡率有减低趋势,但二者比较无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 对肝纤维化大鼠ALT、Alb、Glb影响的比较:附表结果显示,PGSL及HSS均可抑制肝纤维化大鼠ALT的升高,二者之间比较差异无显著性($P>0.05$)。肝纤维化大鼠血清Alb、Glb水平没有变化,PGSL及HSS也没有引起它们的变化(P 均 >0.05)。

附表 PGSL与HSS对肝纤维化大鼠血清
ALT、Alb、Glb影响的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Alb(g/L)	Glb(g/L)	ALT(U/L)
A组	8	4.0 ± 0.4	3.6 ± 1.2	$19.2\pm 9.3^*$
B组	8	3.8 ± 0.5	3.1 ± 0.5	80.5 ± 10.4
C组	13	4.1 ± 0.2	3.8 ± 0.3	$46.5\pm 14.1^*$
D组	10	3.8 ± 0.2	3.6 ± 0.6	$43.4\pm 9.5^*$

与B组比较,* $P<0.01$

2.3 对肝纤维化大鼠肝组织HYP含量的影响:肝组织HYP含量分别为:A组: $30.2\pm 9.8\mu\text{g/g}$ 肝湿重,B组: $91.1\pm 34.5\mu\text{g/g}$ 肝湿重,C组: $35.9\pm 12.2\mu\text{g/g}$ 肝湿重,D组: $34.9\pm 13.0\mu\text{g/g}$ 肝湿重,无论PGSL还是HSS,均可以降低肝纤维化大鼠升高的肝组织HYP含量($P<0.01$),二者之间无统计学差异($P>0.05$)。

2.4 PGSL与HSS对肝纤维化大鼠肝脏病理学的影响

2.4.1 大体标本:B组大鼠与A组正常大鼠比较,肝

组织表面光亮度明显下降,颜色变暗且边缘稍微不规整,肝表面粗糙,布满针尖大小的颗粒,分布均匀紧密,触之质较硬,易切割,不易碎。C组和D组大鼠肝脏大多数基本接近正常,表面有一定光亮度,颜色暗红,边缘规整,肝表面光滑,触之质软,切割易碎。

2.4.2 光镜检查结果:(1)PGSL与HSS对肝纤维化大鼠肝脏纤维组织增生的影响:对增生与分布的影响:从HE染色切片上可以看到,纤维化大鼠肝脏纤维分隔完整,纤维带粗细均匀,PGSL与HSS均可使纤维组织增生明显减轻,纤维带减少而且变细,主要分布在汇管区。对增生程度的影响:分别通过3种染色及相应3种分级方法比较各组的纤维组织增生程度,结果显示,PGSL及HSS均可使大鼠肝脏成纤维细胞、Ⅰ型及Ⅲ型胶原增生程度降低($P<0.01$),二者之间无统计学差异($P>0.05$)。(2)PGSL与HSS对肝纤维化大鼠除汇管区、纤维间隔以外肝细胞间的梭形细胞数目影响的比较:梭形细胞数目分别为:A组: 32.5 ± 4.1 ,B组: 58.6 ± 4.5 ,C组: 36.1 ± 3.1 ,D组: 35.0 ± 4.0 ,结果显示,PGSL及HSS均可以减少肝纤维化大鼠增多的梭形细胞(P 均 <0.01),二者之间无统计学差异($P>0.05$)。(3)PGSL与HSS对肝纤维化大鼠肝细胞影响的比较:肝纤维化大鼠肝细胞大小均一,大多数肝细胞肿胀、少部分脂肪变性,少数细胞核浓染,溶解并可见小双核细胞。C组及D组上述表现明显改善,少量肝细胞可见肿胀,未见细胞变性,大多数肝细胞基本正常,显示PGSL及HSS均可以保护免疫损伤的肝细胞。(4)PGSL及HSS对肝纤维化大鼠肝脏炎细胞浸润影响的比较:肝纤维化组大鼠肝脏汇管区及中央静脉周围可见到大量炎细胞浸润,以淋巴细胞为主,少量为中性粒细胞,C组及D组只见少量炎细胞存在,说明PGSL及HSS均可以抑制炎细胞浸润。

3 讨论

中药治疗肝纤维化已经成为现代抗肝纤维化治疗手段之一,益气软肝方作为经验方剂已挽救很多肝病病者。从中医角度来说,肝纤维化是在气虚基础上出现了气滞血瘀及痰浊等,益气软肝方就是采用中医益气化痰,软肝散结治疗原则,治疗肝纤维化患者。众所周知,HSS对肝纤维化有保护作用,我们曾对初生小牛HSS对肝纤维化保护作用进行探讨,得出相同的结论^[4]。

本文通过免疫性肝纤维化模型对二者在肝纤维化保护作用方面做一比较。结果显示,益气软肝方和HSS均可以降低免疫性肝纤维化大鼠的死亡率,提高生存率。从肝组织羟脯氨酸测定及病理切片上我们更

能清楚地看到,不管是益气软肝方还是 HSS,均能使肝纤维化增生程度降低。3 种染色方法显示了二者对成纤维细胞、I 型胶原、Ⅲ 型胶原增生的抑制,统计学分析提示二者的抗肝纤维化作用无显著差异。我们还观察了除汇管区、纤维间隔以外肝细胞间的梭形细胞,我们以往的实验曾通过电镜观察到这些梭形细胞大多是激活状态的星状细胞,少数为肿胀的内皮细胞^[4],益气软肝方及 HSS 给予均可以减少这些细胞的数目。星状细胞是肝纤维化形成的中心环节,激活状态的星状细胞能够分泌胶原并能调节胶原合成和降解。推测益气软肝方及 HSS 均可能有抑制星状细胞激活的作用,从而减少了细胞外基质的分泌。本研究还证实了益气软肝方的保护肝细胞作用与 HSS 相似,血清学检查提示降低 ALT,病理切片看到肝细胞损伤减轻,均证实

了这一点。另外,我们还观察了炎细胞的变化,两种保护方法均能使肝组织内炎细胞减少,提示益气软肝方和 HSS 一样可以对免疫损伤起到抑制作用。

本研究结果显示,益气软肝方有预防肝纤维化的作用,而且其作用效果与 HSS 的保护效果相似,再次显示了传统中药对慢性肝病的治疗前景。

参考文献

- 1 贾一韬,曾民德.肝纤维化的防治进展.国外医学消化系统疾病分册,2000,20(4):221-225.
- 2 Blackwell JB. Cirrhosis resulting from repeated injection of antigen. J Pathol Bacteriol, 1965, 90(1): 245-257.
- 3 郑少雄,蔡文仪,邱明才,等.血尿羟脯氨酸测定方法的改进.中华医学杂志,1983,6(3):133-134.
- 4 段志军,吕申,李山日,等.肝刺激因子对实验性免疫性肝纤维的保护作用.中华消化杂志,1997,17(3):138-140.

辨证治疗发作性睡病 3 则

夏 如 宁

1 温肾助阳,健脾醒脑

苗某某,男,39 岁。因突发性嗜睡反复发作 1 年余于 1996 年 5 月 12 日就诊。患者于 1 年前无明显原因出现嗜睡,常在进食时突然入睡,10 余分钟后可醒来,呼之亦可醒,醒后如常人。一天一般发作 1 次,近半月来有加重趋势。于 5 天前在某医院神经内科做脑 CT 等各种检查均未发现异常,诊断为发作性睡病。因患者不愿服用西药,故来我科就诊。伴有身沉乏力,腕闷纳差,口淡不渴,二便通调。舌质淡,苔白腻,脉沉细。辨证为脾虚湿盛,清阳不升。处方:黄芪 20g,党参 15g,白术 15g,苍术 12g,茯苓 15g,石菖蒲 12g,陈皮 10g,佛手 12g,佩兰 12g,甘草 6g,5 剂,水煎服。再诊时乏力纳差略有改善,嗜睡如故。追溯病史,有肢冷畏寒之症,遂于原方加入炮附子 12g,桂枝 10g,菟丝子 15g,鹿角胶 12g(烊化),继服 5 剂。药后来诊,诉已两天未发作嗜睡,余症亦减轻,续进 10 剂停药观察,随访 1 年未见复发。

按:初诊时似以脾虚为主,方用黄芪、党参、苍术、白术、茯苓健脾益气;陈皮、佛手理气化痰;石菖蒲、佩兰醒脑开窍;甘草协助健脾,并调和诸药。后仔细追问病史,患者有畏寒肢冷、加之脉沉细,当为合并少阴虚寒,故加入益肾壮阳散寒之附子、桂枝、菟丝子、鹿角胶,肾阳得补,寒湿得除,则效果立见。

2 健脾祛湿,化痰开窍

郭某某,女,42 岁。发作性嗜睡半年,于 1999 年 2 月 29 日就诊。患者半年以来感困倦、嗜睡,常在午饭后有不可遏止的入睡,10 余分钟后醒来感头脑清醒,昨天在逛商场时入睡,被人叫醒。患者形体肥胖,伴有身沉疲倦,微咳多痰,晨起恶心,纳差,大便略溏,白带增多,舌胖苔腻,脉弦滑。给以二陈汤加味以健脾胜湿,化痰开窍。处方:半夏 12g,陈皮 12g,茯苓 20g,白豆蔻

12g,佩兰 12g,石菖蒲 12g,苍术 12g,白术 15g,厚朴 10g,生黄芪 20g,炙甘草 6g。服 5 剂后症状减轻。原方加桂枝 12g 继服 5 剂,嗜睡进一步减轻;原方继服 10 剂症状消失,嘱继服补中益气丸以巩固疗效,随访 1 年无复发。

按:方中半夏、陈皮燥湿化痰,黄芪、白术、茯苓健脾益气;苍术、白豆蔻、厚朴理气祛湿;石菖蒲、佩兰化湿醒脑开窍;“饮为阴邪,非温不化”,痰饮同源,二诊加入桂枝以温阳化痰,全方共奏健脾益气、祛湿开窍之功。

3 活血化痰,通络开窍

王某某,男,36 岁。于 2000 年 11 月 4 日因发作性嗜睡 1 年余就诊。患者于 1999 年 1 月有过脑外伤史,其后便有发作性睡眠,经常在坐车、吃饭、甚至正说话间突然入睡,10 余分钟后醒来,平时有轻度头晕健忘,夜寐多梦,鼻不闻香臭,饮食二便正常。曾诊为脑外伤后遗症,服用过脑震宁、脑复康等药无效。查见舌质略暗,舌下静脉瘀血明显,舌苔白薄,脉沉涩。给予通窍活血汤加减。处方:川芎 15g,当归 15g,桃仁 12g,红花 12g,赤芍 12g,冰片 0.5g(化),石菖蒲 15g,酸枣仁 15g,辛夷 10g,远志 10g,龙齿 30g,生姜 3 片,老葱白 3 寸,黄酒与水各半煎服,10 剂。再诊时嗜睡略有改善,余症同前。原方加入麝香 0.2g(绢包另煎兑入),按前法煎服 10 剂。三诊时嗜睡基本消失,嗅觉亦有恢复,效不更方,继进 10 剂后嗜睡未再发作,余症明显改善,遂减少活血药用量,加入枸杞子、菟丝子、核桃等补肾健脑之品,再服 10 剂以巩固疗效,随访 1 年无复发。

按:本例患者为外伤致瘀,脑络阻塞,血气不通,神明失养而导致的嗜睡,其病机重在一个“瘀”字。方用川芎、当归、赤芍、桃仁、红花活血通络;石菖蒲、冰片、麝香醒脑开窍;远志、酸枣仁、龙齿养心益脑;细辛开通鼻窍;葱姜之性温通,以助活血通窍之力。诸药合用共奏活血化痰、通络开窍之功。

* 山东省威海市立医院中医科(264200)

收稿日期:2002-03-13

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Clinical Study on Needling Method of Regulating the Mind and Supplementing Kidney for Treatment of 35 Cases of Climacteric Syndrome

Shen Xiaoming, Du Yuanhao, Yan Li, et al.

Objective: To observe therapeutic effect of needling method of regulating the mind and supplementing kidney on climacteric syndrome. **Methods:** 65 cases of climacteric syndrome were randomly divided into acupuncture group and western medicine group. Statistical analysis of therapeutic effects, symptom scoring of climacteric syndrome and radioimmunoassay were adopted. **Results:** Of the 35 cases treated by acupuncture, 12 cases were cured, 16 cases markedly effective and 6 cases effective, total effective rate being 97.14%. In clinical therapeutic effect and improvement of symptom score, especially, the effects on serum hormones, acupuncture treatment was superior to the treatment of western medicine. **Conclusion:** Needling method of regulating the mind and supplementing kidney is of good therapeutic action on climacteric syndrome.

Author's address: The Second Department of Clinical Medicine, Anhui College of TCM, Hefei 230038

Key words: Climacteric syndrome/acup-mox therapy Regulating the mind and supplementing kidney

(Original article on page 347)

Observation on Long-Term Therapeutic Effect of 30 Cases of Abdominal Malignant Tumor Treated by Chinese Drugs Combined with Radiotherapy

Jin Hong, Wu Xiangwei, Zhou Zhimin

Objective: To observe long-term therapeutic effect of Chinese drugs combined with radiotherapy on abdominal malignant tumor. **Methods:** 60 cases were randomly divided into combined treatment group (Chinese drugs plus radiotherapy) and control group (simple radiotherapy), 30 cases in each group. TCM syndromes were divided into hyperactivity of fire due to Yin deficiency and deficiency of both Qi and blood, and QOL and survival time were investigated. **Results:** Total scores of QOL, score of physical state and score of psychological quality were 41.40 ± 11.22 , 23.17 ± 7.18 and 21.23 ± 4.53 in combined treatment group respectively, which was superior to those in control group ($P < 0.01$). There was no significant difference in survival curve between the two groups, but the 3-year survival rate of 67.55% in combined treatment group was superior to that in control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** TCM treatment based on differentiation of syndromes has a certain value in radiotherapy of abdominal malignant tumor, improving QOL and possibly prolonging survival period.

Author's address: Medical College of Hunan Teacher Training University, Changsha 410006

Key words: Abdominal tumor/integrated Chinese medicine and western medicine Radiotherapy

(Original article on page 354)

Effect of Huayu Paishi Decoction on β_2 -Microglobulin Content in the Patient of Kidney Stone after Extrasomatic Lithotripsy

Zhen Hongliang, Wang Jiaan, Lin Qiang

Objective: To investigate therapeutic effects of Huayu Paishi Decoction on kidney stone and relieving and its repairing actions on renal injury. **Methods:** 60 cases of kidney stone patients were randomly divided into treatment group (treated with internal administration of Chinese herbs and extrasomatic lithotripsy method) and control group (treated with simple extrasomatic lithotripsy method), 30 cases in each group. The clinical therapeutic effects, β_2 -microglobulin (β_2 -MG) contents in blood and urine 24h before lithotripsy and 24h, 72h, 120h after treatment were investigated. **Results:** Total effective rate in treatment group was significantly higher than that in control group. There was no significant difference in β_2 -MG content before and after treatment in treatment group. **Conclusion:** Huayu Paishi Decoction has a definite therapeutic effect on kidney stone with actions of relieving and repairing renal injury.

Author's address: Department of TCM, Rizhao Municipal People's Hospital, Rizhao 276800, Shandong Province

Key Words: Kidney stone/treatment @Huayu Paishi Decoction

(Original article on page 356)

Control Study on Protective Actions of Yiqi Ruangan Decoction and Hepatic Stimulating Factor on Immune Hepatic Fibrosis in Rats

Duan Zhijun, Li Jiyan, Tan Chen, et al.

Objective: To assess the action of Yiqi Ruangan Decoction on hepatic fibrosis. **Methods:** The hepatic fibrosis rat model was prepared by human serum albumin. The protective group was administrated intragastrically with Yiqi Ruangan Decoction twice daily, and the control group received intraperitoneal injection of hepatic stimulating factor twice daily, for 8 weeks. **Results:** Death rate for hepatic fibrosis rat decreased in both groups. Determination of hydroxyproline, HE staining, argentaffin and VG staining of the hepatic tissue indicated that hyperplastic degrees of hepatic fibrosis decreased in both groups, and there was no significant difference between groups. **Conclusion:** Yiqi Ruangan Decoction and hepatic stimulating factor have a similar action in prevention of hepatic fibrosis.

Author's address: The First Hospital Affiliated to Dalian Medical University, Dalian 116011

Key Words: Hepatic fibrosis/TCM therapy @ Yiqi Ruangan Decoction

(Original article on page 374)