

软肝饮对免疫性肝纤维化大鼠细胞因子及肝细胞超微结构的影响

张国梁¹ 戴敏² 许钊² 汪电雷² 方朝晖¹ 查安生¹ 胡闻³

摘要 目的:观察中药复方软肝饮对免疫性肝纤维化模型大鼠细胞因子及肝细胞超微结构的影响。方法:对人血白蛋白(HSA)诱导的免疫性肝纤维化大鼠模型予软肝饮小剂量(1g/kg)、大剂量(2g/kg)灌胃给药,连续8周,以鳖甲软肝片和秋水仙碱为阳性对照药;测定模型大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1(IL-1)、转化生长因子 β (TGF- β)含量的变化;用电镜观察肝细胞超微结构的变化。结果:软肝饮显著降低模型大鼠血清TNF- α 、IL-1、TGF- β 含量,并可保护模型大鼠肝细胞超微结构。结论:软肝饮可能通过恢复肝细胞形态及降低炎症细胞因子含量而起到抗肝纤维化的作用。

主题词 肝纤维化/中医药疗法 肝细胞/超微结构 @ 软肝饮

Effects of Ruangan Yin on Cytokines and Ultrastructure of Hepatocytes in Immunol Hepatic Fibrosis Rats

Zhang Guoliang¹, Dai Min², Xu Fan², et al.

(1. The First Affiliated Hospital of Anhui College of TCM, Hefei 230031; 2. Anhui College of TCM)

Objective: To observe effects of Ruan Gan Yin on cytokines and ultrastructure of hepatocytes in the rat of immunol hepatic fibrosis. **Methods:** Immunol hepatic fibrosis model rats induced by human serum albumin were given small dose (1g/kg), large dose (2g/kg) of Ruangan Yin by intragastrical perfusion for 8 consecutive weeks, with Biejia Ruangan Tablets and colchicine used as positive control medicine. Changes of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor β (TGF- β) contents and ultrastructure were investigated in the model rats. **Results:** Ruangan Yin could significantly decrease serum TNF- α , IL-1 and TGF- β contents and protect ultrastructure of hepatocytes in model rats. **Conclusion:** Ruangan Yin exerts functions of anti-hepatic fibrosis possibly through restoring appearance of cell organs with secreting functions and decreasing contents of inflammatory cytokines.

Key Words Hepatic fibrosis/TCM therapy; Hepatocytes/ultrastructure; @ Ruangan Yin

软肝饮由丹参、川芎、莪术、鳖甲、黄芪、柴胡等药物组成,具有活血益气散结的功能,我们以往的临床研究发现,其对慢性乙型肝炎患者有较好的抗氧化、降低血清肝纤维化标志物、改善肝脏功能、抗肝纤维化等作用^[1,2]。本课题在以往临床研究的基础上,采用免疫性肝纤维化大鼠模型观察软肝饮对肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1(IL-1)、转化生长因子 β (TGF- β)等细胞因子与肝脏超微结构变化,探讨其抗肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物与分组:SD大鼠58只,体质量116~167g,平均(139.90 $\pm$ 10.54)g,雄性,由安徽医科大学实验动物中心提供。随机将动物分为空白对照组(简称空白组)7只,模型组8只,软肝饮大剂量组9只,软肝饮小剂量组10只,秋水仙碱组13只,复方鳖甲软肝片组11只。

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(010431004)

1 安徽中医学院第一附属医院感染科,合肥市梅山路117号(230031)

2 安徽中医学院 2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 安徽省立医院

收稿日期:2005-02-25;修回日期:2005-08-15

1.2 主要仪器与设备:SHA-C水浴恒温振荡器(浙江余姚检测仪表厂),EL301型酶标仪(美国BIO-TEK公司),Sartorius BS110S电子天平(北京赛多丽斯股份有限公司),800型离心沉淀器(上海手术器械二厂),GC-911Y放射免疫计数器(中国科技大学科技实业总公司),JEOL-1230型电镜(日本产)。

1.3 主要药物与试剂:软肝饮由丹参1250g,川芎850g,莪术850g,鳖甲1250g,黄芪1250g,柴胡625g组成(方中药材饮片均购自南京医药合肥天润医药有限公司,并经安徽中医学院中药教研室鉴定为正品,经水提醇沉后浓缩至一定浓度备用);复方鳖甲软肝片(内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司生产)、秋水仙碱(西双版纳景洪制药厂出品),临用前均用0.5% CMC-Na配成所需浓度;人血白蛋白(成都蓉生药业有限责任公司);TNF- α 、IL-1放免试剂购自解放军总医院科技开发中心放免所,TGF- β 酶联免疫试剂盒(美国GIBCO公司进口分装)。

2 方法

2.1 模型复制方法,按王宝恩等^[3]报道的文献方法复制模型。人血清白蛋白(HSA)用生理盐水稀释,与等量的不完全弗氏佐剂完全乳化。除空白组外,每只大鼠

腹部皮下注射,每次4个点,共注射0.5ml(含HSA 4mg)。注射4次,前两次间隔14天,第3、4次间隔10天,共计34天。空白组同时皮下多点注射等容量液体石蜡。

2.2 模型处理方法:造模第34天,将动物(除正常组外)随机分为模型组、软肝饮大剂量组、软肝饮小剂量组、鳖甲软肝片组、秋水仙碱组,尾静脉注射HSA,每周两次,第1周每只2.5mg,共注射0.5ml,以后每次攻击增加0.5mg,至4.5mg时维持此量,共16次。空白组同时尾静脉注射等容量生理盐水。造模第33天起(在尾静脉攻击前1天),各组动物灌胃给药:软肝饮大剂量(2g/kg体重,按生药量计算)、软肝饮小剂量(1g/kg体重,按生药量计算)、鳖甲软肝片(0.6g/kg体重)、秋水仙碱组(0.1mg/kg体重),每日1次,空白组、模型组给予等容量0.5%CMC-Na,共计8周。各组动物每周称重1次,根据体重变化调整给药。

2.3 检测指标及方法:末次给药禁食不禁水24小时后,各大鼠麻醉,腹主动脉采集血液样本,3000转/分钟离心10分钟,收集血清。采用放射性免疫实验方法按试剂盒说明书要求在放射免疫计数器上测定各组大鼠血清TNF- α 、IL-1;在酶标仪450nm处读取OD值,并通过标准曲线求出TGF- β 浓度。取肝脏右叶少许组织,用戊二醛锇酸固定,乙醇脱水,环氧树脂包埋,染色后在透射电镜下观察肝脏细胞超微结构的变化。

2.4 统计学方法:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异用单因素方差分析,组间两两比较用 q 检验。

3 结果

3.1 软肝饮对免疫性肝纤维化大鼠各项指标的影响:附表示,与模型组比较,软肝饮对TNF- α 有明显的降低作用($P < 0.01$),软肝饮大剂量组的作用与鳖甲软肝片组相似,但弱于秋水仙碱组;软肝饮对IL-1、TGF- β 有明显的降低作用,与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而与鳖甲软肝片组比较,差异均无显著性。

3.2 软肝饮对免疫性肝纤维化大鼠肝细胞超微结构的影响:空白组肝细胞周边圆滑,核膜清晰,常染色质呈絮状,核仁可见,胞质分布均匀;线粒体呈圆形或椭圆形,较均匀分布于胞质内,数量较多,嵴突入线粒体内与表面垂直;粗面内质网(RER)较丰富,网腔较狭窄。模型组肝细胞质膜或胞质均有不同程度的损伤性超微结构变化。胞质内脂滴增多,胞浆水肿,线粒体肿胀,局部膜断裂或变为单层膜,嵴减少;细胞核染色质溶解并向核膜靠近;RER扩张呈不规则泡状,脱颗粒。软肝饮大剂量组、鳖甲软肝片组和秋水仙碱组肝细胞

附表 软肝饮对免疫性肝纤维化大鼠各项指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α (g/L)	IL-1 (g/L)	TGF- β (pg/ml)
空白组	7	1.88 $\pm$ 0.69	0.110 $\pm$ 0.040	67.08 $\pm$ 16.18
模型组	8	2.43 $\pm$ 0.55**	0.195 $\pm$ 0.104*	95.30 $\pm$ 33.84*
软肝饮大剂量组	9	1.18 $\pm$ 0.37 $\Delta\Delta$	0.144 $\pm$ 0.222 Δ	60.74 $\pm$ 22.35 $\Delta\Delta$
软肝饮小剂量组	10	1.19 $\pm$ 0.48 $\Delta\Delta$ #	0.051 $\pm$ 0.038 $\Delta\Delta$	63.58 $\pm$ 18.32 Δ
秋水仙碱组	13	0.715 $\pm$ 0.36 $\Delta\Delta\Delta\nabla$	0.058 $\pm$ 0.110 $\Delta\Delta$	69.20 $\pm$ 27.97 $\Delta\Delta$
鳖甲软肝片组	11	1.003 $\pm$ 0.55 $\Delta\Delta$	0.066 $\pm$ 0.079 $\Delta\Delta$	70.67 $\pm$ 23.59 Δ

与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与秋水仙碱组比较,# $P < 0.01$;与鳖甲软肝片组比较, $\nabla P < 0.05$

核变形很少,未见核质溶解,细胞质内溶酶体相对增多,线粒体膜未见损伤,RER和滑面内质网及核糖体基本与空白组类同。软肝饮小剂量组的作用较空白组明显减弱,但细胞器的损伤较模型组轻。

4 讨论

肝纤维化是肝脏纤维结缔组织异常增生的一种病理状态,是慢性肝病发展的必经阶段。肝脏在各种致病因子的作用下造成肝细胞损伤,引起库弗细胞激活,分泌多种细胞因子;其随同血小板、肝窦内皮细胞和肝细胞分泌的多种细胞因子,与某些化学介质共同作用于肝星状细胞(HSC),使其激活并转化为肝成纤维细胞,通过旁分泌与自分泌作用,使HSC增殖、合成并分泌大量的细胞外间质;在肝内大量沉积,以致肝纤维化逐渐形成。轻者称为纤维化,重者使肝小叶结构改变、假小叶及结节形成,称为肝硬化^[4]。其中细胞因子起到了非常重要的作用。

TNF- α 与肝纤维化有关的作用包括诱发急性炎症过程,加强HSC的趋化性,刺激间质细胞有丝分裂及诱发蛋白多糖的合成。TNF- α 可促进纤维母细胞及肝内HSC增殖并促进HSC向肝成纤维细胞转化^[5];在慢性炎症病变时,局部浸润的单核细胞和淋巴细胞可释放大量的IL-1,刺激成纤维细胞产生胶原,通过刺激肝脏炎症的产生而启动或加速肝纤维化的发生和发展^[6,7]。IL-1还可刺激HSC增殖,诱导另一种促炎因子GM-CSF的合成,抑制金属蛋白酶的合成,在多环节上参与肝纤维化过程^[5]。TGF- β 是一个重要的生长因子家族^[8],与肝纤维化发生的关系主要包括:(1)以自分泌、旁分泌方式参与HSC的活化,同时也是人类HSC强烈的促分裂因子;(2)促进细胞外基质(ECM)的合成;ECM在Disse间隙聚集是肝纤维化形成的主要病理基础,TGF- β 为产生胶原的主要刺激因子;(3)抑制基质降解:TGF- β 不仅能促进基质的合成,而且

能抑制基质的降解,可通过抑制胶原酶和蛋白酶的产生促进组织抑制因子如组织金属蛋白酶抑制剂 (TIMP)、 α -巨球蛋白等的分泌来减少胶原降解^[9]。

肝细胞内的高尔基体主要参与细胞的分泌活动,线粒体则为细胞代谢提供能量,RER 具有分泌蛋白质的功能。本研究通过对肝细胞的分泌、代谢功能细胞器的观察,发现以空白组为对照,模型大鼠肝细胞的代谢活性及分泌功能均有所亢进,各用药组肝细胞的高尔基体、线粒体、RER 等结构均有改善,同时测定的 TNF- α IL-1 和 TGF- β 含量亦明显降低,表明软肝饮可抑制亢进的肝细胞功能,减少炎性细胞因子的释放,保护肝细胞结构,从而起到抗肝纤维化的治疗作用。

参考文献

1 张国梁,季红燕,高健,等.“软肝饮”治疗慢性肝病肝纤维化 48 例疗

效观察·安徽中医学院学报,1995,14(1):24~25.

2 张国梁,高复安,李明,等.软肝饮对肝硬化患者红细胞 SOD、血浆 LPO 与血清 LN、HA 的影响·中西医结合肝病杂志,1996,6(2):8~10.

3 王宝恩,王志富,殷蔚英.实验性免疫性肝纤维化模型的研究·中华医学杂志,1989,69(9):503~505.

4 程明亮,杨长青.肝纤维化的基础研究与临床·第 2 版.北京:人民卫生出版社,2002:9.

5 王吉耀.现代肝病治疗理论与进展·上海:上海医科大学出版社,2000:110~111.

6 吴裕焯.细胞因子与肝脏·中华消化杂志,1998,18(3):166~170.

7 王新,许才拔,赵国宁,等.TNF- α IL-6 和 IL-8 与慢性肝病的关系·中华医学杂志,1997,15(2):85~88.

8 Lewindon PJ, Pereira TN, Hoskins AC, et al. The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor- β in cystic fibrosis liver disease·Am J Pathol, 2002, 160(5):1705~1715.

9 陈霞.转化生长因子 β 与肝纤维化的关系·临床肝胆病杂志,2004,20(12):379~381.

当归饮子治疗慢性荨麻疹 84 例

游晓意* 刘宪鸣* 指导:蔡光斗*

当归饮子一方首见于《证治准绳》,专治疮疥、风癣、湿毒痒痒等症。我们在泉州市第一医院蔡光斗主任应用此方经验基础上,根据该方具有益气养血,祛风润燥等作用,临床治疗慢性荨麻疹 84 例,收效甚佳,现总结如下。

1 临床资料

1.1 一般资料:84 例中男 32 例,女 52 例,均为门诊患者。年龄 2.6~75 岁,以 20~35 岁为多;病程 3 个月~11 年。

1.2 临床表现:基本损害是风团,呈扁平浮肿性斑块,颜色淡红,边缘可有红晕。水肿较重的呈白色,其边缘向周围扩展,凹凸不齐,如云片状。急性荨麻疹发病数天至数周,发生易消散的风团,单个损害很少持续 12 小时以上,荨麻疹在发生 6 周内完全消失。但如果荨麻疹和(或)血管性水肿每天发作并持续 6 周以上称为慢性荨麻疹。中医认为,慢性荨麻疹可分为偏风寒型及偏风热型。风寒型症见:荨麻疹遇风受冷即发,风团可色淡白,遇冷加剧,晚间更甚,得温则减,舌质淡红、苔薄白,脉迟缓。风热型症见:风团多,色红,遇热加重,夏重冬轻,舌质红、苔薄黄,脉浮数。84 例中偏风寒者 48 例,偏风热者 36 例。

2 治疗方法

基本方为当归饮子,组成:黄芪、当归、白芍、熟地黄、川芎、何首乌、白蒺藜、防风、荆芥、甘草等。偏风寒者加附子、桂枝;偏风热者熟地黄易生地黄,白芍易赤芍,加牡丹皮、紫草;瘙痒剧者加地肤子、蝉蜕。每日 1 剂,水煎服,7 天为 1 个疗程。

3 治疗结果

3.1 疗效标准:所有病例均为治疗两个疗程以上。(1)治愈:观察半年以上荨麻疹未再发作者。(2)好转:治疗后半年内偶有发作,发作时程度范围明显减少。(3)无效:发作未停止者。

3.2 治疗结果:风寒型 48 例,治愈 36 例,好转 11 例,无效 1 例,总有效率为 97.9%;风热型 36 例,治愈 22 例,好转 10 例,无效 4 例,总有效率为 88.9%。风寒型疗效优于风热型($P > 0.05$)。

4 典型病例

王某某,女,16 岁。2004 年 7 月 4 日就诊。患者 1 年前上体育课烈日出汗后全身出现风团,每遇日晒或食燥热之物、或夜间暖被后即发作,虽经治疗,荨麻疹仍反复发作而求诊。症见:全身蚕虫样风团,色红,压之不退,胸背为多,瘙痒不堪,伴口干舌燥,大便干结,舌质红,苔黄腻,脉细数。此乃气血不调,卫气不固,腠理开疏,风热挟湿,侵袭肌肤所致,治宜调理气血,清热化湿,祛风止痒。投当归饮子加味:黄芪 15g,当归 10g,生地黄 10g,赤芍 10g,川芎 10g,白蒺藜 10g,防风 10g,荆芥 10g,蝉蜕 6g,牡丹皮 10g,紫草 15g,薏苡仁 15g,甘草 3g。3 剂,水煎服。7 月 8 日二诊:药后风团渐退,瘙痒停止。原方黄芪加重至 30g,续服两个疗程后,经随访未见复发。

5 讨论

慢性荨麻疹中医学称“风瘙隐疹”、“隐疹”等。其病因多为外因通过内因而发病。虽然外因很多,但不外风寒热燥湿有关。内因之七情变异及人体营卫失常为致病的主因。因此,治疗时宜益气养血,调和营卫,使人体代谢旺盛,血脉相传,气血通畅,营卫协调,身体健康,令外邪无容留之处。临证时选用当归饮子。根据该方具有益气养血,祛风润燥之功效,对于慢性荨麻疹属风寒或风热型而加减应用疗效显著。方中黄芪为君药,生用偏于走表,能固表止汗、托里排脓、敛疮收口,临证时取用生黄芪往往收效甚佳。慢性荨麻疹临床分为风寒型与风热型,但其内因在于气血于虚,血脉流传壅塞,失于协调。其外因或感风挟热,或感风挟寒。风寒者宜表散风寒,调和营卫,养血消风;风热者宜益气养血,凉血祛风。前者用当归饮子加肉桂、附子;后者用当归饮子加牡丹皮、紫草等。