

方药研究

下瘀血汤对进展期大鼠肝纤维化的抑制作用及其方证探讨

慕永平¹ 刘平¹ 刘莺² 李风华¹ 陈高峰¹
顾宏图³ 都广礼¹ 王磊¹ 王春树¹

摘要 目的:探讨下瘀血汤对进展期四氯化碳(CCl₄)大鼠肝纤维化的干预作用。方法:采用50%CCl₄2ml/kg体重皮下注射,每周2次;第9周开始随机分为模型对照组、下瘀血汤组及小柴胡汤组(灌胃给药);用药的同时继续CCl₄造模至12周末杀鼠取材。观测肝功能、肝组织病理学、肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量变化。结果:8周末模型大鼠肝功能显著异常,肝组织Hyp含量显著增加,肝纤维化明显;12周末模型对照组天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、γ-L-谷氨酰转肽酶(GGT)、总胆红素(TBil)、Hyp进一步增高,且ALP、GGT、TBil显著高于8周模型对照组($P<0.05$)。与12周模型对照组比较,下瘀血汤组丙氨酸氨基转移酶(ALT)、AST、ALP、GGT、TBil、Hyp显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:下瘀血汤能显著抑制造模因素持续刺激条件下进展期肝纤维化的发展,疗效优于小柴胡汤,方证相关有其病理学基础。

主题词 肝纤维化/中医药疗法 @ 下瘀血汤

Inhibiting Action of Xiayuxue Decoction on Hepatic Fibrosis at Progressive Stage in Rats and Study on the Prescription and Syndrome

Mu Yongping¹, Liu Ping¹, Liu Ying², et al.

(1. Institute of Hepatic Diseases, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203; 2. Science and Technology Experimental Center, Shanghai University of TCM)

Objective: To probe the interfering action of Xiayuxue Decoction on hepatic fibrosis at progressive stage in rats. **Methods:** The rats were given subcutaneous injection of 2 ml of 50% carbon tetrachloride (CCl₄), twice each week. At the 9th week they were randomly assigned to a model control group, a Xiayuxue Decoction group and a Xiaochaihu Decoction group (administration by intragastrical perfusion). At the same time, CCl₄ was continuously given till the end of the 12th week, and the rats were killed for taking samples. Changes of hepatic functions, hepatic histopathology, and hydroxyproline (Hyp) content in the liver were investigated. **Results:** At the end of 8th week, model rats showed abnormal hepatic function, Hyp content of the hepatic tissue increased significantly with obvious hepatic fibrosis; at the end of 12th week, aspartic aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), γ-L-glutamyl transpeptidase (GGT), total bilirubin (TBil), and Hyp increased further in the model control group, ALP, GGT, TBil being significantly higher than those at the 8th week ($P<0.05$). Compared with the model control group at the 12th week, alanine aminotransferase (ALT), AST, ALP, GGT, TBil, Hyp decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$).

Conclusion: Xiayuxue Decoction can significantly inhibit the development of hepatic fibrosis at the progressive stage under the continuous stimulation of the modeling factors, and its therapeutic effect is superior to that of Xiaochaihu Decoction. The correlativity of prescription with syndrome has pathological basis.

Key Words Hepatic fibrosis/TCM therapy @ Xiayuxue Decoction

下瘀血汤载于《金匮要略》,由大黄、桃仁、土鳖虫3味药物组成。已故名医姜春华教授认为“肝硬化以瘀

血为先”^[1],临床以该方为主治疗肝硬化具有较好的疗效^[2]。为了进一步明确该方的药效学作用,我们观察了下瘀血汤对进展期大鼠肝纤维化的干预治疗作用,现将研究结果报告如下。

1 材料

1.1 实验动物:Wistar 雄性大鼠 56 只,清洁级,体重180~220g,购自中国科学院上海实验动物中心,许可证号:SCXK(沪)2003-00003。上海中医药大学实验动物中心饲养、造模和观察,自由饮食。

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划重点项目(90409020);上海市自然科学基金重点项目(02JC14024);上海市高校E-研究院基金

1 上海中医药大学肝病研究所,上海市蔡伦路1200号(201203)

2 上海中医药大学科技实验中心

3 上海中医药大学附属曙光医院肝硬化科

收稿日期:2005-03-09;修回日期:2005-06-20

1.2 药物与试剂:下瘀血汤所含的大黄、桃仁、土鳖虫均购自上海华宇药业有限公司,有明确的原产地,经生药学专家鉴定;按照《金匱要略》原方比例(大黄 10g, 桃仁 10g, 土鳖虫 6g)制成粗粉末后以 75%乙醇提取两次,提取液浓缩成流浸膏,每克流浸膏相当于生药 5.11g,由上海中医药大学附属曙光医院国家中医药管理局中药制备中心一次制备后冷藏。小柴胡汤(《伤寒论》)购自日本ツムラ株式会社(TJ-9 颗粒剂,成人每日用量 7.5g),为对照药物。分析纯四氯化碳(CCl_4)和化学纯橄榄油购自中国医药集团上海化学试剂公司,批号分别为:20021219, 20020819;肝功能测定试剂盒分别购自卫生部上海生物制品研究所及南京建成生物工程研究所;羟脯氨酸标准品购自日本ナカテイトスク株式会社,批号:MIR8282。

2 方法

2.1 模型制备:以 50%的 CCl_4 橄榄油溶液, 2ml/kg 体重皮下注射,每周两次,共 12 周。

2.2 分组与给药:造模第 8 周后,随机抽取正常大鼠 4 只及模型大鼠 6 只处死,作药物干预前对照。其余模型大鼠随机分为模型对照组 14 只、下瘀血汤组 12 只、小柴胡汤组 12 只。第 9 周开始,于继续造模的同时,药物干预组按 65kg 成人临床用量等体重的 8 倍量,即下瘀血汤浸膏 0.626g/kg 体重(相当于生药 3.2g/kg 体重)、小柴胡汤颗粒 0.923g/kg 体重,分别用蒸馏水 10ml 稀释灌胃,每日 1 次,共计 4 周。正常组 8 只与模型对照组以同体积生理盐水灌胃。

2.3 样品的采集和处理:造模 12 周结束,大鼠用 2%戊巴比妥钠以 2ml/kg 体重剂量腹腔注射麻醉后,打开腹腔,肉眼观察肝、脾的色、质、形态、体积。经下腔静脉采血,摘取肝、脾,称重,从肝右叶切取 1.0cm × 0.8cm × 0.3cm 肝组织 1 块,10%中性甲醛固定,脱水,包埋,切片,作 HE 及天狼星红胶原染色,观察组织学变化。所采血液 4℃ 静置 3 小时后,3000 转/分钟离心 30 分钟,分离血清,检测各项血清学指标。

2.4 观测指标及方法:一般情况:包括大鼠死亡情况、体重、肝脏大体形态、肝脏及脾脏重量等。肝组织切片 HE 及胶原染色:观察肝脏组织学变化。胶原纤维增生

程度分期:0 期,正常肝脏,无明显胶原纤维增生;Ⅰ期,胶原纤维增生,中央静脉和门脉区有少量星状胶原纤维束放散,但无间隔形成;Ⅱ期,胶原纤维增生,中央静脉和门脉区结缔组织变厚,由此向四周伸出纤维素,形成不完全间隔;Ⅲ期,胶原纤维大量增生,有个别菲薄的完全间隔形成,或较厚的不完全间隔即将形成假小叶;Ⅳ期,完全纤维间隔,假小叶形成。肝功能:血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性,赖氏法;白蛋白(Alb)含量,溴甲酚绿法;血清总胆红素(TBil),重氮法;血清碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转肽酶(GGT),按试剂盒说明方法测定。肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量测定:参照 Jamall 等的方法^[3]。

2.5 统计学方法:计量资料用 SPSS 11.5 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析, q 检验,并用 LSD 进行两两比较;等级资料采用 *Ridit* 分析。

3 结果

3.1 大鼠一般情况变化:表 1 示,整个实验过程中下瘀血汤组大鼠死亡 1 只,死亡原因为药物误入气管,其余各组大鼠均无死亡。与正常组比较,12 周模型组大鼠体重、脾重显著减轻($P < 0.01$),肝重、肝指数显著增加($P < 0.01$);与 12 周模型组比较,下瘀血汤组脾重显著增加($P < 0.05$),其余指标与模型组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

3.2 大鼠肝功能变化:表 2 示,与正常组比较,8 周模型对照组大鼠的血清 ALT、AST、ALP 活性及 TBil 含量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),GGT 活性亦升高,但差异无显著性($P > 0.05$),血清 Alb 含量显著降低($P < 0.05$);12 周时模型大鼠血清 ALP、GGT 活性、TBil 含量显著高于 8 周模型大鼠($P < 0.05$)。与 8 周模型对照组比较,下瘀血汤组血清 ALT、AST 活性显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),小柴胡汤组 ALT 活性显著降低($P < 0.05$);与 12 周模型对照组比较,下瘀血汤组血清 ALT、AST、ALP、GGT 活性及 TBil 含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),小柴胡汤组 ALT、AST 活性显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),两药物组 Alb 含量均无显著变化($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠一般情况变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	肝重(g)	脾重(g)	肝重/体重(%)	脾重/体重(%)
正常对照组	8	386.20 ± 15.76 **	10.99 ± 0.72 **	0.73 ± 0.115 **	2.8 ± 0.11 **	0.19 ± 0.022
12 周模型对照组	14	261.40 ± 24.61	14.29 ± 1.99	0.55 ± 0.057	5.4 ± 0.34	0.21 ± 0.031
下瘀血汤组	11	274.09 ± 20.71	15.30 ± 1.48	0.60 ± 0.064 *	5.6 ± 0.33	0.22 ± 0.027
小柴胡汤组	12	271.67 ± 22.70	14.68 ± 1.75	0.55 ± 0.060	5.4 ± 0.33	0.20 ± 0.021

与 12 周模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 进展期 CCl₄ 肝纤维化大鼠肝功能变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBil(μ mol/L)	ALP (K-AU/100ml)	GGT(U/L)	Alb(g/L)
正常对照组	8	30.65 $\pm$ 12.96 ^{**$\Delta\Delta$}	156.69 $\pm$ 21.80 ^{**$\Delta\Delta$}	3.06 $\pm$ 0.68 ^{**Δ}	15.97 $\pm$ 5.2 ^{**Δ}	3.30 $\pm$ 0.79 ^{**}	32.03 $\pm$ 1.36 ^{**Δ}
8 周模型对照组	6	237.44 $\pm$ 41.60	292.60 $\pm$ 25.62	4.33 $\pm$ 0.43 [*]	31.37 $\pm$ 5.25 [*]	6.60 $\pm$ 3.04 [*]	30.30 $\pm$ 1.99
12 周模型对照组	14	230.36 $\pm$ 24.73	305.65 $\pm$ 24.54	5.77 $\pm$ 1.87	40.46 $\pm$ 9.00	14.49 $\pm$ 6.65	27.28 $\pm$ 1.49
下瘀血汤组	11	195.77 $\pm$ 34.17 ^{*Δ}	254.22 $\pm$ 31.96 ^{**$\Delta\Delta$}	3.94 $\pm$ 0.79 ^{**}	33.22 $\pm$ 9.63 [*]	10.15 $\pm$ 3.44 [*]	27.31 $\pm$ 1.45
小柴胡汤组	12	200.79 $\pm$ 37.67 ^{*Δ}	265.44 $\pm$ 30.62 ^{**}	4.67 $\pm$ 1.43	39.73 $\pm$ 7.51	14.10 $\pm$ 4.74	27.59 $\pm$ 2.14

与 12 周模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与 8 周模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

3.3 肝组织羟脯氨酸含量及肝脏胶原沉积量的变化: 表 3 示, 与正常组大鼠比较, 8 周模型对照组大鼠肝组织 Hyp 含量显著升高($P<0.05$), 12 周时进一步增加($P<0.01$)。与 12 周模型对照组比较, 下瘀血汤组肝组织 Hyp 含量显著降低($P<0.05$), 小柴胡汤组也有一定的降低趋势, 但差异无显著性($P<0.05$)。8 周模型大鼠肝纤维化分期Ⅱ期占 83.3%; 12 周模型对照组大鼠肝纤维化Ⅲ期占 78.6%; 与 12 周模型对照组比较, 下瘀血汤组肝纤维化Ⅱ期占 81.8%($P<0.05$); 小柴胡汤组肝纤维化Ⅱ期占 66.7%($P>0.05$)。

表 3 各组大鼠肝组织羟脯氨酸含量及
肝脏胶原沉积量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Hyp(μ g/g 湿肝)	胶原增生程度分期(例)				
			0	I	II	III	IV
正常对照组	8	188.11 $\pm$ 30.62 ^{**Δ}	8	0	0	0	0
8 周模型对照组	6	243.52 $\pm$ 73.39	0	1	5	0	0
12 周模型对照组	14	262.08 $\pm$ 68.57	0	0	3	11	0
下瘀血汤组	11	213.41 $\pm$ 43.90 [*]	0	0	9	2	0
小柴胡汤组	12	248.11 $\pm$ 39.70	0	0	8	4	0

与 12 周模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与 8 周模型组比较, $\Delta P<0.05$

3.4 肝组织大体形态及病理学变化: 正常组大鼠肝脏表面光滑, 红润柔软; 与正常组大鼠比较, 模型组大鼠肝脏肿大, 表面油腻, 呈淡黄色, 质韧; 与模型对照组大鼠比较, 下瘀血汤组肝脏质地较柔软, 颜色较红润, 小柴胡汤组无明显变化。肝组织 HE 染色观察: 正常大鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列, 可见少许窦旁细胞; 模型大鼠 8 周时表现为汇管区和中央静脉周区肝细胞大面积脂肪变性和点片状坏死, 以中央静脉区最为明显, 汇管区伴有大量炎性细胞浸润, 正常肝小叶结构破坏, 大胆管损害变形, 小胆管增生; 12 周时肝细胞损害面积进一步扩大, 大胆管扩张变形且伴有胆管内皮细胞坏死脱落, 中央静脉周区有少量胆汁淤积; 与 12 周模型对照比较, 下瘀血汤组受损肝细胞较少, 炎性细胞浸润少, 大胆管无明显扩张且胆管内皮细胞亦无明显坏死脱落, 小胆管增生程度低; 小柴胡汤组受损肝细胞面积虽有所减小, 但不及

下瘀血汤组明显。肝组织天狼星红染色观察: 正常组仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维; 8 周模型大鼠见有明显的纤维间隔从肝小叶内向汇管区延伸, 尚未形成完整的纤维包绕; 12 周时纤维间隔增宽致密, 部分包绕形成假小叶, 小叶间静脉及胆管周围胶原沉积明显; 与 12 周模型组比较, 下瘀血汤组纤维间隔、小叶间静脉及胆管周围胶原沉积明显减少; 小柴胡汤组病理也有一定程度的改善, 但不及下瘀血汤组明显。

4 讨论

在我国, 由慢性乙型肝炎发展为肝硬化者占相当比例。在目前尚缺乏针对病因治疗药物的情况下, 阻抑或延缓纤维化的进展是治疗的主要策略。本研究紧密结合临床实际, 在肝纤维化形成以后, 于致病因素持续刺激的同时, 予以具有活血破瘀作用的下瘀血汤进行干预治疗, 探讨其对进展期肝纤维化的抑制作用及其方证相关性。

8 周模型大鼠病理学特征为肝功能显著受损, 肝组织 Hyp 含量显著增加, 有明显的纤维间隔形成, 表明这个时期肝纤维化已经形成; 12 周时模型大鼠肝功能损伤和纤维化程度进一步加重。在肝纤维化形成的 8 周后, 于 CCl₄ 继续刺激的同时, 即在肝纤维化进展期, 予以下瘀血汤灌胃干预治疗(4 周) 至 12 周末, 与 12 周模型对照组大鼠比较, 肝组织学病理改变明显减轻, 胶原纤维沉积显著减少, 肝组织 Hyp 含量显著下降, 肝功能显著改善, 且 ALT、AST 活性显著低于 8 周模型对照组。显示该方可在病理刺激因素持续存在的条件下减轻肝损伤, 抑制肝纤维化的进展。

小柴胡汤具有抗肝损伤、防治肝纤维化的作用^[4~6], 而我们的研究表明, 对于进展期 CCl₄ 大鼠肝纤维化, 小柴胡汤具有显著降低血清 ALT、AST 活性的作用, 虽然对肝组织纤维化也有一定程度的改善, 但与同期模型对照组比较差异均无显著性, 分析原因, 可能与给药时间段不同有关。本实验是在肝纤维化形成后的进展期给药, 而不是在造模前给药^[7], 提示结合临床实际、设计合理的干预用药时间, 不但对判断中医方剂的疗效特点并指导临床用药具有实际价值, 同

时对基于方剂的功效、从“以方测证”的中医思维方法探讨方剂取效的病态基础,而由此研究“方证相关”、“病证结合”的实验模型具有重要的理论意义。根据本实验结果可以认为,肝组织呈现明显慢性炎症反应的进展期肝纤维化可能是活血破瘀的下瘀血汤取效的病态基础(瘀血为主的病理状态),对此作进一步探索也将为疾病中医病机理论的实验研究开拓新思路。另外,从下瘀血汤对该模型血清 Alb 含量低下无明显改善作用的实验结果可以推论,单纯的活血破瘀尚不能完全针对该模型此阶段的病理状态,即此期除了瘀血这一主要病理因素之外,尚可能存在正气虚损的一面,若在活血破瘀的下瘀血汤基础上再加入扶正(益气养阴)药物^[8],可能有助于治疗效果的进一步提高。

参考文献

1 陈泽霖,宋祖敬.名医特色经验精华.上海:上海中医学院出版社,1987:71.

2 中医研究院中医研究生班整理.中医专题讲座选.北京:人民卫生出版社,1983:40.

3 Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. Anal Biochem, 1981, 112(1) : 70~75.

4 Kusunose M, Qiu B, Cui T, et al. Effect of Sho-saikou-to extract on hepatic inflammation and fibrosis in dimethylnitrosamine induced liver injury rats. Biol Pharm Bull, 2002, 25(11) : 1417~1421.

5 Ono M, Miyamura M, Kyotani S, et al. Effects of Sho-saikou-to extract on liver fibrosis in relation to the changes in hydroxyproline and retinoid levels of the liver in rats. J Pharm Pharmacol, 1999, 51(9) : 1079~1084.

6 Shimizu I, Ma YR, Mizobuchi Y, et al. Effects of Sho-saikou-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. Hepatology, 1999, 29(1) : 149~160.

7 Eybl V, Caisova D, Koutensky J, et al. Protective effect of sho-saikou-to (TJ 9) in experimental liver injury. Cesk Farm, 1992, 41(7~8) : 243~245.

8 胡义扬,沈松法,徐列明,等.乌鸡白凤丸防治肝炎后肝硬化作用的实验研究.浙江中医杂志,1991,26(5) : 231~232.

中华中医药学会 中医杂志社 北京东方中医药培训中心

第五届全国名老中医治疗疑难病经验专修班

招 生 通 知

1. 2006 年 5 月 9 日~13 日“中西医结合治疗肛肠疾病专修班”。主讲内容:(1) 国内外治疗肛肠疾病新进展;(2) 肛周皮肤疾病与肛周性病的鉴别诊断与治疗;(3) 临床常见病如内痔、外痔、混合痔、肛门失禁、直肠肛管肿瘤、肛痿、肛裂、脱肛等疾病的诊断与治疗。2. 2006 年 5 月 25 日~29 日中西医结合治疗肝病高级专修班”。主讲内容:(1) 国内外治疗肝病新进展;(2) 中医治疗重症肝炎;(3) 肝外胆管疾病、病毒性肝炎、黄疸、肝硬化、脂肪肝等疾病的中西医结合诊断与治疗。3. 2006 年 6 月 6 日~10 日“全国中医治疗消化系统疾病高级培训班”。主讲内容:(1) 国内外治疗消化系疾病的新进展;(2) 食管炎、急慢性肠胃炎、消化道溃疡等疾病的诊断与治疗;(3) 肝硬化、急慢性胆囊炎、胰腺炎、胆石症的诊断与治疗;(4) 消化道肿瘤的诊断与治疗。4. 2006 年 8 月 25 日~29 日“全国中西医结合治疗神经精神系统疾病高级专修班”。主讲内容:(1) 神经系统疾病,如面神经炎、三叉神经痛、坐骨神经痛、头痛、脑血管意外、癫痫、震颤麻痹等疾病的诊断与治疗(包括针灸治疗);(2) 精神疾病:躁狂忧郁症、神经官能症、更年期忧郁症、神经衰弱、老年性痴呆等疾病的诊断与治疗。5. 2006 年 9 月 22 日~26 日“全国中医治疗不孕不育症高级专修班”。主讲内容:(1) 国内外治疗不孕不育症新进展;(2) 急慢性前列腺炎、少精与精液不液化、男性内分泌失调、男性功能障碍的诊断与治疗;(3) 月经不调、痛经、盆腔炎、女性内分泌失调与生殖系等疾病的诊断与治疗。6. 2006 年 10 月 12~17 日“全国手穴诊疗培训班”。主讲内容:以望诊、触诊、压诊的手穴诊病方法,数分钟可概知家族遗传性疾病及自身健康状况,方法独特,直观明了,易学易用。主讲人:刘浩兴教授。7. 2006 年 11 月 7 日~11 日“全国中西医结合治疗呼吸系统疾病高级专修班”主讲内容:(1) 国内外治疗呼吸道疾病的新进展;(2) 急、慢性支气管炎,支气管哮喘的诊断与治疗;(3) 肺炎、肺气肿、胸膜炎、气胸等疾病的诊断与治疗;(4) 呼吸系统肿瘤的诊断与治疗。以上各中医临床专修班全部聘请中国中医研究院、北京中医药大学、解放军第三〇二医院、北京中日友好医院、北京中医医院等三甲医院具有丰富临床经验的著名专家、主任医师授课,确保教学质量。

以上各班第 1 天为报到时间,报到时需交 3 张 1 寸免冠照片。每班学费 780 元。欲参加学习者请先交报名费 10 元(请注明班别),并附个人简况(从事职业、联系地址、邮政编码、联系电话等),我中心收到报名费及信函后即做排名安排,在开班前 1 个月内发入学通知书;(请务必收到入学通知或电话联系后再来报到)学习结业后颁发中英文对照结业证书(盖钢印)和中华中医药学会继续教育学分证书。凡参加学习班学员的优秀论文,符合标准者,《中医杂志》将优先发表或在当年增刊中发表。

联系地址:北京东城区东直门内南小街 16 号旁门中国中医科学院内中医杂志社北京东方中医药培训中心。邮政编码:100700,联系电话:(010) 64013009,传真(010) 64050201,联系人:梅丽。办学地点:中国中医科学院内

第五届名老中医治疗疑难病经验专修班回执(此表可复制)

姓 名		性别		年龄		技术职称	
工作单位						联系电话	
通讯地址						邮政编码	
参加学习班别							