

# 下瘀血汤全药与组分处方抗猪血清肝纤维化的比较研究

陈少丽, 都广礼, 丁娜, 金慧茜, 陈德兴\*  
(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

**[摘要]** **目的:**比较下瘀血汤全药与组分处方抗肝纤维化的作用差异。**方法:**Wistar 大鼠随机分为正常组、造模组。造模组大鼠 ip 猪血清复制肝纤维化模型,每次 0.5 mL/只,每周 2 次,共 12 周。造模成功后造模组大鼠随机分为模型组、下瘀血汤组、组分处方组,第 8 周开始下瘀血汤组、组分处方组大鼠造模同时 ig 给药,按 10 mL·kg<sup>-1</sup> 容积,下瘀血汤组每日 2.34 g·kg<sup>-1</sup>,组分处方组每日 0.648 g·kg<sup>-1</sup>。连续 4 周。正常组、模型组大鼠 ig 同体积生理盐水。12 周末,处死动物,获取标本,检测血清肝功能、肝脏病理。**结果:**与模型组相比,下瘀血汤组、组分处方组大鼠肝质量明显减少( $P < 0.05$ );肝体比、脾质量、脾体比均有下降趋势;总蛋白(TP),球蛋白(Glb)含量明显减少( $P < 0.05$ ),A/G 比值倒置情况明显改善( $P < 0.05$ );白蛋白(Alb)含量均有升高趋势。下瘀血汤组与组分处方组相比较,大鼠肝质量、肝体比、脾质量、脾体比均有好转趋势;Alb 含量有升高趋势,TP, Glb 含量有下降趋势,A/G 比值倒置情况有改善趋势。与正常组相比,模型组、下瘀血汤组、组分处方组纤维化分级差异有显著性( $P < 0.05$ );与模型组相比,下瘀血汤组、组分处方组纤维化分级差异有显著性( $P < 0.05$ )。提示二者均有一定改善肝功能、改善肝脏病理作用,且下瘀血汤组有优于组分处方组的趋势。**结论:**降低免疫反应和保护肝细胞是下瘀血汤全药和组分处方抗肝纤维化的主要作用机制,且下瘀血汤全药处方作用优于组分处方。

**[关键词]** 下瘀血汤; 肝纤维化; 组分处方

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0154-04

## Comparative Study of Xiayuxue Decoction and Its Ingredients Recipe Against Porcine Serum Induced Liver Fibrosis in Rats

CHEN Shao-li, DU Guang-li, DING Na, JIN Hui-xi, CHEN De-xing\*  
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare differences between Xiayuxue decoction and its ingredients recipe in inhibiting hepatic fibrosis. **Method:** Rat liver fibrosis model was duplicated with intraperitoneal injection of porcine serum. After 8 weeks of modeling, Xiayuxue decoction and its ingredients were administrated for 4 weeks, and at the end of 12 weeks, rats were sacrificed to obtain samples for determination of liver function and examination of liver histology. **Result:** Compared with model group, improvement in liver function and liver pathology were found in Xiayuxue diction group; Liver function and histology in Xiayuxue dection group was superior to that in its ingredients recipe group. **Conclusion:** The main action mechanism of Xiayuxue decoction and its ingredients recipe against liver fibrosis is in inhibiting immune response and protecting liver cells, and Xiayuxue decoction is superior to its ingredient recipe.

**[Key words]** Xiayuxue decoction; hepatic fibrosis; ingredients recipe

肝纤维化是多种慢性肝病的共同结局,是向肝硬化转变的关键病理阶段。其主要特征是细胞外基

质(extracelluar matrix, ECM)的合成与降解失衡,导致 ECM 在窦周间隙的大量沉积<sup>[1-2]</sup>。近年来,中医

**[收稿日期]** 20110523(005)

**[基金项目]** 上海市教委方剂学学科建设项目子课题(Z09011);上海市教委计划内项目(09JW09)

**[第一作者]** 陈少丽, 硕士, 讲师, 在职博士生, 从事中药复方抗实验性肝纤维化研究, Tel: 021-51322206, E-mail: sharpren@163.com

**[通讯作者]** \* 陈德兴, 硕士, 教授, 从事方剂的配伍规律及作用机制研究, Tel: 021-51322206, E-mail: cdx419@163.com

药在阻断和逆转肝纤维化方面取得了较大进展,我们的前期工作表明下瘀血汤具有良好的抗肝纤维化作用,为了进一步深入进行开发研究,结合近年来组分处方研究的新进展,本项目拟对下瘀血汤全药和组分处方进行初步药效学比较研究,为抗肝纤维化组分处方研究作有益的探索。

## 1 材料

**1.1 动物** Wistar 大鼠,雄性,体重 150 g 左右,由上海中医药大学实验动物中心提供[SCXK(沪)2007-0005]。

**1.2 药品与试剂** 下瘀血汤组:由上海中医药大学附属曙光医院制剂中心制作,大黄(青海)2 kg,桃仁(山西)2 kg,蜚(江苏)1.2 kg 均购于上海华宇药业公司。制成粗粉末后以 75% 乙醇提取 2 次,提取液浓缩成浸膏,真空干燥后冷藏保存。生药总质量为 5.2 kg,煎煮浓缩后为:相对密度 1.017,65 ℃,质量为 10 kg,真空干燥后质量为 0.585 kg,每克含生药 8.889 g。下瘀血汤方中大黄、桃仁的抗肝纤维化的有效组分目前基本明确,笔者分别选用具有抗纤维化作用的大黄素<sup>[3-4]</sup>、苦杏仁苷<sup>[5-6]</sup> 2 种有效组分替代大黄、桃仁,二者与蜚虫提取物配伍组成组分处方。大黄素(纯度 >90%)、苦杏仁苷(纯度 >90%)均购自上海沪峰生物科技有限公司;蜚虫提取物参照文献方法由上海中医药大学化学教研室制备,蜚虫粉碎成粗末后以 20%~40% 乙醇回流提取 2 次,合并 2 次提取液。3 者比例按原方计算:10:10:6。猪血清购自广州蕊特生物科技有限公司,批号 100620,-20 ℃ 冰箱保存备用。总蛋白(TP),批号 20101110、白蛋白(Alb)试剂盒,批号 20101104,均购自南京建成生物科技有限公司。

**1.3 主要仪器** UV754N 型紫外-可见分光光度计,上海安亭仪器有限公司;超低温冰箱(-70 ℃),美国 FORMA SCIENTIFIC 公司产品;ASP300 型自动脱水机,EG1160 型石蜡包埋机,RM2035 轮转切片,HI1220 型烤片机,HI1210 型捞片机,均为德国 LEICA 公司产品;HPIAS-1000 高清晰彩色病理图文分析系统,同济大学千屏影像公司。

## 2 方法

**2.1 造模与给药** 大鼠随机分为正常组、造模组。造模组大鼠 ip 猪血清复制肝纤维化模型,每次 0.5 mL/只,每周 2 次,共 12 周。6 周末正常组、造模组大鼠随机各取 3 只,腹主动脉放血处死,取血清待测,取肝组织用 10% 福尔马林固定,常规组织切片,光镜观察组织学改变、模型的发展情况。造模成功

后造模组大鼠随机分为模型组、下瘀血汤组、组分处方组,第 8 周开始下瘀血汤组、组分处方组大鼠造模同时 ig 给药,按 10 mL·kg<sup>-1</sup> 容积,下瘀血汤组每日 2.34 g·kg<sup>-1</sup>,组分处方组每日 0.648 g·kg<sup>-1</sup>。连续 4 周。正常组、模型组大鼠 ig 同体积生理盐水。

**2.2 取材** 12 周末所有实验动物腹主动脉取血后处死,取肝脏、脾脏称重,离心血清放低温冰箱冻存;取部分肝组织于 10% 中性福尔马林液中固定作病理检测,其余肝组织于 -70 ℃ 冰箱冻存。并计算肝/体重比值、脾/体重比值。

$$\text{肝体比} = (\text{肝质量}/\text{体重}) \times 100\%$$

$$\text{脾体比} = (\text{脾质量}/\text{体重}) \times 1000\%$$

**2.3 肝组织病理检测** 10% 中性福尔马林固定的肝组织常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片,常规 HE 染色和天狼星红染色,观察大鼠肝脏病理学及纤维增生变化。参照文献标准将肝纤维化分为 0~IV 级<sup>[7]</sup>。0 级:无肝纤维化;I 级:纤维结缔组织仅局限于汇管区或汇管区扩大,有向小叶发展倾向;II 级:纤维结缔组织增生进入肝小叶 2/3 及有 I 级同样的改变;III 级:纤维化结缔组织进入肝小叶中央静脉周围;IV 级:纤维化结缔组织在全小叶呈多处弥漫性增生,有假小叶形成,并有 III 级同样改变。

**2.4 血清蛋白检测** 按试剂盒说明书检测血清中 TP,Alb,并通过检测的 TP,Alb 的含量计算出球蛋白(Glb)的变化及白/球(A/G)比值。

**2.5 统计学处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.5 软件进行分析,行单因素方差分析,SNK(*q* 检验)进行两两比较, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。肝纤维化程度分级结果比较采用 Ridit 分析。

## 3 结果

**3.1 大鼠一般情况、肝脏与脾脏质量、肝/体重比值、脾/体重比值的变化** 正常组大鼠一般状态良好,进食较多,体重增加较快,皮毛光滑,肝脏表面光滑,颜色红润。模型组大鼠一般状态与正常组相比较无明显改变,但肝脏表面不光滑,颜色偏暗,体积增大。给药组大鼠一般状态亦无明显改变,肝脏外观稍好于模型组。

与正常组相比,12 周末模型组大鼠肝重、脾重、脾体比均明显增加( $P < 0.05$ )。与模型组相比,下瘀血汤组与组分处方组大鼠肝重明显减少( $P < 0.05$ );肝体比、脾重、脾体比均有下降趋势,但统计学上无显著性差异。下瘀血汤组与组分处方组相比较,大鼠肝重、肝体比、脾重、脾体比均有好转趋势,但统计学上无显著性差异。结果见表 1。

表 1 各组大鼠肝重、肝体比、脾重和脾体比的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | 肝重/g                         | 肝体比/%         | 脾重/g                        | 脾体比/mg·g <sup>-1</sup>      |
|------|---|-----------------------|------------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常   | 9 | -                     | 9.830 ± 0.670                | 2.307 ± 0.119 | 2.363 ± 0.150               | 1.704 ± 0.026               |
| 模型   | 8 | -                     | 11.220 ± 0.161 <sup>1)</sup> | 2.499 ± 0.244 | 2.520 ± 0.276 <sup>1)</sup> | 2.248 ± 0.109 <sup>1)</sup> |
| 下瘀血汤 | 7 | 2.34                  | 10.045 ± 0.075 <sup>2)</sup> | 2.337 ± 0.676 | 2.248 ± 0.125               | 1.885 ± 0.227               |
| 组分处方 | 7 | 0.648                 | 10.458 ± 0.501 <sup>2)</sup> | 2.347 ± 0.059 | 2.350 ± 0.210               | 2.035 ± 0.246               |

注:与正常组相比<sup>1)</sup>P < 0.05;与模型组相比<sup>2)</sup>P < 0.05(表 2~3 同)。

3.2 各组大鼠血清 Alb, TP, Glb, A/G 的变化 与正常组相比,12 周末模型组大鼠血清 Alb 含量显著下降(P < 0.05),TP, Glb 含量明显增加(P < 0.05), A/G 比值明显倒置(P < 0.05)。与模型组相比,下瘀血汤组、组分处方组 TP, Glb 含量明显减少(P <

0.05), A/G 比值倒置情况明显改善(P < 0.05); Alb 含量均有升高趋势,但统计学上无显著性差异。下瘀血汤组与组分处方组相比,Alb 含量有升高趋势,TP, Glb 含量有下降趋势, A/G 比值倒置情况有改善趋势,但统计学上无显著性差异。见表 2。

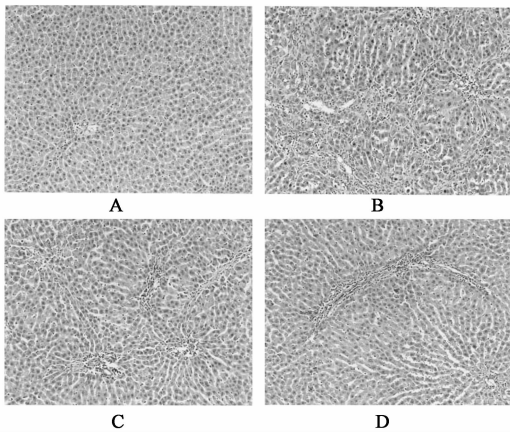
表 2 各组大鼠血清 Alb, TP, Glb, A/G 的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n | 剂量/g·kg <sup>-1</sup> | Alb/g·L <sup>-1</sup>        | TP/g·L <sup>-1</sup>           | Glb/g·L <sup>-1</sup>          | A/G                           |
|------|---|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 正常   | 9 | -                     | 32.324 ± 1.279               | 47.881 ± 1.255                 | 15.557 ± 0.491                 | 2.080 ± 0.116                 |
| 模型   | 8 | -                     | 27.575 ± 0.923 <sup>1)</sup> | 56.918 ± 2.806 <sup>1)</sup>   | 29.343 ± 2.032 <sup>1)</sup>   | 0.942 ± 0.043 <sup>1)</sup>   |
| 下瘀血汤 | 7 | 2.34                  | 29.783 ± 1.868 <sup>1)</sup> | 51.081 ± 0.639 <sup>1,2)</sup> | 21.299 ± 1.335 <sup>1,2)</sup> | 1.406 ± 0.167 <sup>1,2)</sup> |
| 组分处方 | 7 | 0.648                 | 29.678 ± 1.626 <sup>1)</sup> | 51.830 ± 1.224 <sup>1,2)</sup> | 22.152 ± 0.672 <sup>1,2)</sup> | 1.342 ± 0.105 <sup>1,2)</sup> |

### 3.3 肝脏病理变化

3.3.1 HE 染色 正常组大鼠肝组织肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周排列整齐;模型组大鼠肝组织汇管区炎性细胞增多,纤维细胞有所增多,胆管上皮细胞增生,形成管腔样结构,纤维间隔向小叶内伸展形成大小不一纤维包绕,细胞索排列紊乱,纤维间隔增厚;下瘀血汤组大鼠肝组织汇管区炎性细胞增多,纤维细胞有所增多;组分处方组大鼠肝组织汇管区炎性细胞增多,纤维细胞有所增多,纤维包绕、细胞索排列紊乱,情况较模型组轻。结果见图 1。

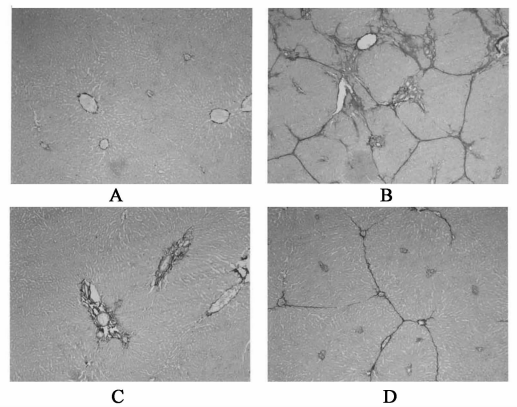
纤维间隔较厚,形成大小不等的紧密的肝小叶样包绕;下瘀血汤组大鼠肝组织胶原纤维增生局限于汇管区或汇管区有扩大,有向小叶发展的倾向;组分处方组大鼠肝组织胶原纤维增生较明显,纤维间隔菲薄,有大小不等的假小叶形成,但尚未包绕完全。结果见图 2。



A. 正常组;B. 模型组;C. 下瘀血汤组(2.34 g·kg<sup>-1</sup>);  
D. 组分处方组(0.648 g·kg<sup>-1</sup>)

图 1 下瘀血汤及组分处方组对大鼠肝纤维化病理组织学的影响(HE 染色, ×200)

3.3.2 天狼星红染色 正常组大鼠肝组织血管壁、胆管壁染色;模型组大鼠肝组织胶原纤维增生明显,



A. 正常组;B. 模型组;C. 下瘀血汤组(2.34 g·kg<sup>-1</sup>)  
D. 组分处方组(0.648 g·kg<sup>-1</sup>)

图 2 下瘀血汤及组分处方组对大鼠肝纤维化病理组织学的影响(天狼星红染色, ×100)

3.3.3 各组大鼠肝纤维化分级情况 与正常组相比,模型组、下瘀血汤组、组分处方组纤维化分级差异有显著性(P < 0.05);与模型组相比,下瘀血汤组、组分处方组纤维化分级差异有显著性(P < 0.05);下瘀血汤组与组分处方组相比,两组纤维化分级差异无显著性。见表 3。

## 4 讨论

下瘀血汤具有活血破瘀之功,近年来研究表明

表3 各组大鼠肝纤维化程度的分级情况

| 组别                    | n | 剂量    |   |    |     |    |
|-----------------------|---|-------|---|----|-----|----|
|                       |   | 0     | I | II | III | IV |
| 正常组                   | 9 | -     | 9 |    |     |    |
| 模型组 <sup>1)</sup>     | 8 | -     |   |    | 1   | 7  |
| 下瘀血汤组 <sup>1,2)</sup> | 7 | 2.34  | 2 | 3  | 2   |    |
| 组分处方组 <sup>1,2)</sup> | 7 | 0.648 | 1 | 2  | 3   | 1  |

其具有较好的抗肝硬化、肝纤维化作用<sup>[8-9]</sup>。我们前期研究工作中,也发现下瘀血汤可明显降低猪血清肝纤维化大鼠肝脏羟脯氨酸含量,改善肝功能,改善肝脏病理;调节基质金属蛋白酶/组织金属蛋白酶抑制剂(MMPs/TIMPs)的表达等抗肝纤维化作用<sup>[10-13]</sup>。

目前,方剂配伍研究出现了从传统的复方全药配伍研究转向复方的有效组分配伍及其与机体内在联系的研究趋势。方剂的组分处方是指利用中药组分明确,药理作用清楚的生物活性物质,结合中医药理论进行的方剂配伍模式。那么,组分处方是否能够代替全药处方?是否为中医方剂发展的可行方向?这方面的研究还缺乏大量的基础研究来支持。

由于下瘀血汤方中大黄、桃仁的抗肝纤维化的有效组分目前基本明确,笔者分别选用具有抗纤维化作用的大黄素、苦杏仁苷2种有效组分替代大黄、桃仁,二者与蜜虫提取物配伍组成组分处方,并与全药处方进行抗猪血清免疫性肝纤维化的药效比较,结果发现2种处方均具有一定改善肝功能、改善肝脏病理的作用,从整体作用趋势上看,下瘀血汤全药疗效优于组分处方。下瘀血汤、组分处方均能抑制肝纤维化时Alb减少、Glb增高、A/G降低(倒置),提示二者均具有一定保护肝细胞的作用。

免疫性肝纤维化的原理是异源血清进入体内,刺激抗体产生,继而形成免疫复合物激活补体,长期的抗原刺激形成免疫复合物沉积于肝汇管区和血管壁,引起Ⅲ型变态反应造成血管炎、血管周围炎等局部炎症反应,进一步刺激胶原增生而形成肝纤维化<sup>[14]</sup>。因此,模型大鼠的肝脏质量、脾脏质量比正常组显著增加,肝脏病理纤维增生显著。下瘀血汤全药和组分处方均可减轻肝重和脾重,改善肝脏病理,且下瘀血汤全药优于组分处方,提示降低免疫反应可能是下瘀血汤全药与组分处方抗免疫性肝纤维化的机制之一。

综上,下瘀血汤全药处方的作用总体优于组分处方,因此组分处方还不能完全代替全药处方,原因可能是全药处方成分的多样性及在此基础上的作用多层次性、多靶点性,进一步说明中药复方治疗具有

针对多个因素、采用多个活性成分、具有多个靶点、进行多个环节动态整体治疗的特征<sup>[15]</sup>。

## [参考文献]

- [1] Dai W J, Jiang H C. Advances in gene therapy of liver cirrhosis: A review [J]. World J Gastroenterol, 2001, 7 (1):1.
- [2] Friedman S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (4):2247.
- [3] 李元,郭顺根,吴宇泽,等. 大黄素抗肝纤维化作用机制研究进展 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16 (3):378.
- [4] 展玉涛,李定国,沈礼勇,等. 大黄素抗肝纤维化的细胞学机制 [J]. 临床肝胆病杂志, 2006, 22 (1):43.
- [5] 刘成海,刘成,刘平,等. 扶正化瘀方对肝星状细胞胶原生成的抑制作用 [J]. 中华肝脏病杂志, 1998, 6 (11):4.
- [6] 郭君其,盛明雄,谭建明,等. 苦杏仁甙抑制大鼠肾脏纤维化的实验研究 [J]. 实用医学杂志, 2007, 23 (17):2628.
- [7] 瞿为溶,王泰龄,周小军,等. 慢性肝炎的诊断、分级和分期. 中华消化杂志, 1996, 16:277.
- [8] 董昌将,陈向荣. 加味下瘀血汤治疗早中期肝硬化120例 [J]. 浙江中医杂志, 2001, 36 (8):339.
- [9] 慕永平,刘平,刘莺,等. 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 [J]. 中医杂志, 2006, 47 (3):215.
- [10] 都广礼,刘平,王磊. 下瘀血汤抗猪血清免疫性肝纤维化方证相关的药效学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13 (6):30.
- [11] MU Yongping, LIU Ping, DU Guangli, et al. Action mechanism of Yi Guan Jian decoction of CCl<sub>4</sub> induced cirrhosis in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 121 (1):35.
- [12] 都广礼,陈德兴,张艳. 猪血清肝纤维化大鼠肝组织基质金属蛋白酶-9/13和基质金属蛋白酶抑制因子-1/2表达的动态变化及下瘀血汤对其影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (11):48.
- [13] 都广礼,陈德兴,张艳. 肝纤维化大鼠肝组织基质金属蛋白酶9及其抑制因子1基因表达的动态变化及下瘀血汤对其影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2010, 18 (1):1.
- [14] 吴丽,魏伟. 肝纤维化的动物模型及治疗药物研究 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20 (5):481.
- [15] 艾铁民. 中药现代化与多样性的药学思想 [J]. 世界科学技术-中药现代化, 1999, 1 (3):38.

[责任编辑 聂淑琴]