

甲萆饮治疗大鼠肝硬化腹水的试验研究

郝建梅^{1?}, 李幸仓¹, 孙守才², 王显著¹, 孔莹¹, 陈香妮¹

(1. 陕西西安市中医医院, 西安 710001; 2. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的: 观察中药甲萆饮治疗肝硬化腹水的药效, 并探讨其作用机制。方法: 采用 50% CCl₄ 植物油溶液加 10% 乙醇造模, 制作大鼠肝硬化腹水模型, 观察甲萆饮 ig 对模型大鼠一般表现、尿量、尿钠、肝功能、肝纤维化血清学指标、凝血酶原时间及肝组织病理学等方面的影响。结果: 甲萆饮可以较好的改善肝硬化腹水模型大鼠的行为表现、可增加尿量、降低血钠和增加尿钠含量, 有较好的改善肝功能、降低肝纤维化血清学指标、缩短凝血酶原时间及减轻肝组织病理损害的作用。结论: 甲萆饮对肝硬化腹水模型大鼠有较好的改善症状、利尿、保肝、抗肝纤维化及改善凝血等治疗作用。

[关键词] 甲萆饮; 肝硬化腹水; 实验研究

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0138-03

肝硬化腹水为临床难治性疾病, 中药甲萆饮是我院杨震教授临床治疗肝病之系列经验方之一, 用于治疗肝硬化阴虚型腹水。方由生龟板、炙鳖甲、生牡蛎、阿胶、猪苓、生黄芪等组成, 具有滋阴利水、散瘀清热之功效, 经临床观察, 疗效显著^[1]。本研究进一步验证其药效, 探究其作用机制。

1 材料

1.1 动物 一级 SD 大鼠 70 只, 雌雄各半, 体重 (200 ± 20) g, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供(合格证号 08-005 号)。

1.2 药物与试剂 甲萆饮药液(浓缩生药 3 g·mL⁻¹), 处方由龟甲 84 g, 鳖甲 84 g, 地黄 84 g, 猪苓 112 g, 茯苓 112 g, 黄芪 168 g, 泽兰叶 168 g, 阿胶 56 g 等组成, 经水提醇沉精制后配制而成的合剂, 经对组方中药味成分的薄层分析研究及初步稳定性实验研究, 其质量稳定。由西安市中医医院药剂科提供; 50% CCl₄ 植物油溶液, 由天津敖然精细化工研究所提供(批号 20070720); 75% 乙醇: 由宝鸡酒精厂提供(批号 20070605); 水林佳胶囊: 天津天士力药业(批号 20061201)。

1.3 仪器 药物天平; 低温冰箱; 显微镜; 日立 7600-020 型全自动生化分析仪; AFT-5000 型电解质分析仪; TE_{co}. M4 型半自动凝血分析仪; MEDGONIC-CA530 血液分析仪等。

2 方法

2.1 建模分组及给药 全部大鼠普通饲料, 自由饮水。实验大鼠在适应性喂养 1 周后, 随机抽取 10 只作为正常对照组, 其余大鼠实验第 1 天每只动物 sc 50% CCl₄ 植物油溶液 5 mL·kg⁻¹, 第 3 天改为 sc 50% CCl₄ 植物油溶液 3 mL·kg⁻¹ 造模, 每周 3 次。从造模当日起用 10% 乙醇给大鼠自由饮用, 第 10 周起, 每周末从造模动物中随机处死 2 只大鼠作肝病理学检查, 直到有肝硬化形成, 再随机抓取 2 只抽腹水。如有腹水抽出, 即确定肝硬化腹水模型复制成功, 造模共用时 11 周。肝硬化腹水形成后, 将存活造模大鼠随机分为: 甲萆饮高剂量组、中剂量组、低剂量组, 阳性对照组, 病理模型组各 10 只, 从造模第 13 周开始进行治疗观察。正常对照组、模型组用等体积生理盐水 ig; 甲萆饮组以甲萆饮药液 ig, 剂量分别为: 19.74, 9.87, 4.94 g·kg⁻¹; 阳性对照组以水林佳胶囊 ig, 剂量为 0.02 g·kg⁻¹, 均 1 次/d, 连续 8 周。

2.2 观测项目

2.2.1 一般表现 观察治疗前后大鼠精神、活动、饮食、皮毛、粪便、体重等。

2.2.2 尿量及尿钠的测定 从试验第 13 周起(即治疗第 1 周)以代谢笼收集 24 h 尿量, -70℃ 低温保存, 并用离子选择电极法测尿中钠含量, 共测 1 周。

2.2.3 肝功能 ALT, AST, TBIL, TP, ALB 及凝血酶原时间(凝固法、底物显色法)测定 在试验结束后取血检测。

2.2.4 肝纤维化系列血清指标检测 (用酶联免疫

[收稿日期] 2009-12-07

[基金项目] 陕西省中医药管理局立项(1999019)

[通讯作者] [?] 郝建梅, Tel: 029-87482380, E-mail: hjmyzp@

163.com

检测法 8,透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅰ型前胶原(PCⅠ)、Ⅲ型胶原(CⅢ)在试验结束后取血检测。

2.2.5 肝组织病理学检查 采取肝组织病理学检验方法,按照 2000 年西安会议《病毒性肝炎防治方案》^[2]肝硬化病理学标准判断。

2.3 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,数据采用 SPSS11.0 软件处理, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠的症状表现 试验期间正常对照组大鼠饮食、活动及二便无明显变化,精神状态佳,皮毛光亮润泽。造模动物在造模期间均逐渐出现饮食及活动减少,时有稀溏便,腹部膨隆,精神不振,反应迟钝、皮毛凌乱缺乏光泽,大多数腹部明显胀大,大鼠经随机抽取腹水阳性。甲萆饮高、中、低剂量组自用药起,随着时间的延长,总体来说,大便逐渐正常,进食量、摄水量有不同程度的增加,精神状态亦随之好转。膨隆的腹部有不同程度的变小,以目测腹型改变为主,并在治疗结束前随机抽取腹水(难以抽到)的方法,反映治疗组大鼠腹水减少。阳性对照组自用药起,饮食及二便,活动,精神状态等略有好转,腹部隆起略变小,治疗结束后,随机抽取腹水,试验结果显示大鼠腹水有所减少。

3.2 对大鼠体重的影响 治疗 8 周后,甲萆饮高、中、低剂量能显著降低大鼠体重,提示甲萆饮有利水作用,见表 1。

3.3 对大鼠尿量和尿钠的影响 甲萆饮高、中、低剂量能明显增加尿量和尿钠,提示甲萆饮有利水作用,见表 2。

3.4 对大鼠血清肝纤维化指标的影响 甲萆饮高、

中、低剂量对肝硬化大鼠升高的肝纤维化血清学指标(HA, LN, PCⅠ, CⅢ)有明显的降低作用,说明其具有抗肝纤维化作用,见表 3。

表 1 甲萆饮对大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	体重 /g
正常对照	-	403.00 ±23.79
模型	-	503.40 ±9.31
阳性对照	2 ×10 ⁻²	394.19 ±12.40
甲萆饮	19.74	305.93 ±19.53 ^{2,4)}
	9.87	317.52 ±12.14 ^{2,4)}
	4.94	374.55 ±10.58 ^{2,4)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与阳性对照组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 甲萆饮对大鼠尿量和尿钠的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	尿量 /mL·24 h ⁻¹	尿钠 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹
正常对照	3.29 ±0.34 ²⁾	94.33 ±4.21
模型	1.80 ±0.81	89.48 ±5.56
阳性对照	3.01 ±0.39	90.61 ±4.36
甲萆饮	3.35 ±0.40 ²⁾	96.25 ±4.81 ^{1,3)}
	3.66 ±0.43 ^{2,4)}	97.52 ±4.37 ^{2,4)}
	3.04 ±0.32 ²⁾	95.37 ±3.92 ^{1,3)}

表 3 甲萆饮对大鼠血清肝纤维化指标的影响

组别	($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
	HA	LN	PCⅢ	C
正常对照	188.33 ±5.62 ²⁾	33.71 ±3.83 ²⁾	38.12 ±8.75 ²⁾	50.49 ±6.42 ²⁾
模型	411.58 ±20.10	188.00 ±6.20	88.08 ±6.77	108.41 ±25.70
阳性对照	393.42 ±23.19	137.61 ±4.05 ²⁾	80.19 ±6.24 ¹⁾	86.81 ±6.91 ¹⁾
甲萆饮	349.35 ±24.31 ^{2,4)}	90.58 ±4.88 ^{2,4)}	75.15 ±7.53 ²⁾	72.38 ±7.34 ^{2,3)}
	313.59 ±31.97 ^{2,4)}	81.62 ±6.43 ^{2,4)}	72.11 ±9.32 ^{2,3)}	69.81 ±5.40 ^{2,4)}
	377.61 ±42.59 ¹⁾	110.71 ±9.89 ^{2,4)}	76.58 ±9.21 ²⁾	77.96 ±8.21 ²⁾

3.5 对大鼠肝功能指标的影响 甲萆饮高、中、低剂量能明显降低 ALT, AST, TBIL, 虽白蛋白及总蛋白无明显改变,但治疗组较好于模型组,见表 4。

表 4 甲萆饮对大鼠肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	TBIL/mg·L ⁻¹
正常对照	60.71 ±4.81 ²⁾	160.76 ±78.43 ²⁾	80.15 ±7.59 ¹⁾	35.83 ±4.17 ¹⁾	8.4 ±5.9 ²⁾
模型	175.27 ±13.10	413.10 ±152.1	72.85 ±5.09	32.42 ±2.43	20.1 ±8.0
阳性对照	130.68 ±13.10 ²⁾	360.00 ±81.10	71.34 ±5.91	33.81 ±3.92	13.1 ±5.3 ¹⁾
甲萆饮	112.64 ±11.36 ^{2,4)}	280.98 ±31.2 ^{2,3)}	74.74 ±6.15	35.78 ±4.65	6.3 ±4.0 ^{2,4)}
	100.79 ±13.94 ^{2,4)}	226.29 ±43.18 ^{2,4)}	74.48 ±6.51	35.67 ±5.16	4.3 ±3.3 ^{2,4)}
	135.68 ±16.45 ²⁾	345.95 ±35.68	74.38 ±5.17	34.08 ±5.04	11.8 ±6.4 ^{2,3)}

3.6 对大鼠凝血酶原时间的影响 甲萆饮高、中、低剂量组与模型组相比,均能明显缩短凝血酶原时

间,见表 5。

3.7 对大鼠肝组织病理学的影响(图 1) 正常组

表 5 甲苓饮对大鼠凝血酶原时间的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	PT/s
正常对照	-	20.14 \pm 0.87 ²⁾
模型	-	25.41 \pm 2.40
阳性对照	2 $\times 10^{-2}$	23.61 \pm 4.36
甲苓饮	19.74	22.18 \pm 1.05 ²⁾
	9.87	21.57 \pm 1.46 ²⁾
	4.94	22.45 \pm 1.35 ²⁾

大鼠肝脏表面色泽鲜红、边缘锐利,镜下肝组织结构清晰正常。模型组大鼠肝脏色泽偏暗,表面有结节,肝脏边缘明显变钝、触之硬、韧,多与大网膜黏连;镜下见肝组织结构破坏,肝索排列紊乱,纤维组织增生明显,小叶结构破坏甚至消失,假小叶形成,肝细胞出现广泛气球样变及脂肪变、坏死,汇管区及中央静脉周围可见大量炎性细胞浸润和纤维组织沉积。甲苓饮中剂量组大鼠肝脏表面色泽较红,边缘略钝,质地中等。镜下肝组织结构相对清晰,肝细胞大小基本均匀,变性坏死不明显,小叶结构基本修复。甲苓饮高、低剂量组大鼠肝组织虽有上述病理改变,但程度均比中剂量组略差,总体甲苓饮组大鼠状况较模型组有明显减轻及好转。阳性对照组大鼠肝脏色泽偏暗,表面凹凸不平,边缘变钝、触之偏硬。镜下肝组织病变改善不如甲苓饮组。

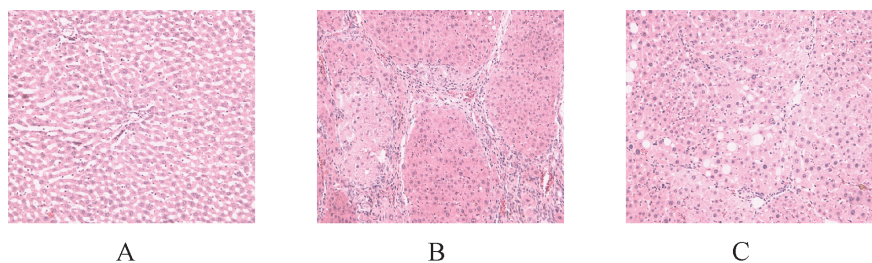


图 1 肝组织病理切片(HE 染色)

A. 正常组,组织结构清晰; B. 模型组假小小叶形成;
C. 甲苓饮 9.87 $g \cdot kg^{-1}$ 组肝组织结构基本恢复

结果显示甲苓饮能改善及减轻肝硬化大鼠肝组织病理损害,具有一定的恢复肝细胞损伤及促进肝小叶结构复常的作用。

4 讨论

“肝硬化腹水”可归属于祖国医学“臌胀”范畴。疾病日久,耗气伤阴,加之大量放腹水、利尿太过、长

期腹泻、呕血便血等,伤阴损液进而出现动风、动血,临床可诱发肝性脑病、上消化道出血等变证。肝为刚脏,体阴而用阳,阳常有余,阴常不足,因此,肝肾阴亏虚常常为肝病晚期一个病理发展趋势,也是变生他证的中心环节。西安市中医医院全国名老中医专家杨震教授认为肝硬化阴虚型腹水患者临床治疗棘手,预后多不佳,利水加重伤阴,滋阴有碍利水,治疗宜缓图,不可急取。他创新性地运用“三甲复脉汤”合“猪苓汤”加减而成“甲苓饮”,用于治疗肝硬化阴虚型腹水,此方具有滋阴利水、散瘀清热之功效,经临床疗效显著。现代药理研究表明:龟板、鳖甲、牡蛎为血肉有情之品,可滋阴潜阳,软坚散结,现代医学认为具有抗肝纤维化,改善肝脏微循环作用;黄芪具有增强与调节免疫、抗衰老、保肝、利尿等作用;阿胶其主要由胶原蛋白组成,具有补血、抗疲劳、提高免疫、抗休克等作用。茯苓、猪苓及泽泻,三者皆有利尿作用,能促进 Na^+ , K^+ , Cl^- 的排泄功能,尤以猪苓、泽泻为甚,且有增加免疫功能,增强单核吞噬系统吞噬功能,具有保肝、抗炎作用^[3]。泽兰等可扩张血管,疏通肝脏微循环,增加血流量,降低门脉压及增加对肝脏的营养供应。

试验研究表明,甲苓饮可以较好的改善肝硬化腹水模型大鼠的行为表现,服药后模型大鼠的摄食、摄水有所增加,排尿量增多,体重逐渐减少,精神活动有明显好转。同时能利尿,有效地消除腹水,利胆降酶改善肝功能,能明显降低肝硬化腹水模型大鼠血清肝纤维化异常指标,改善凝血,并能减轻肝组织病理损害。

[参考文献]

[1] 郝建梅,陈香妮. 甲苓饮治疗阴虚型肝硬化腹水的临床研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2008, 18(2): 68.
[2] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学会. 肝硬化病理学标准[J]. 中西医结合肝病杂志, 2001, 11(1): 60.
[3] 康永. 中药药理学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 79.

[责任编辑 何伟]