

• 药理 •

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

都广礼, 刘平*, 王磊, 王春树, 龙爱华, 慕永平
(上海中医药大学肝病研究所, 上海 201203)

[摘要] 目的: 研究下瘀血汤抗大鼠猪血清肝纤维化方-证相关的药效学机制。方法: 猪血清腹腔注射复制肝纤维化模型, 造模8周后继续造模的同时以下瘀血汤、茵陈蒿汤、黄芪汤、二至丸和小柴胡汤进行干预治疗。测定大鼠血清ALT、AST、ALP和GGT活性, Alb、TP和TBil含量; Jamall法测定肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠血清ALT和AST活性增高, Alb和TP含量显著下降($P < 0.05$), ALP和GGT活性及TBil含量虽有升高但无显著性差异($P > 0.05$); 与模型组比较, 下瘀血汤、茵陈蒿汤和小柴胡汤组大鼠血清肝功能有一定的改善, 以下瘀血汤组为最佳; 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织Hyp含量显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 下瘀血汤组大鼠肝组织Hyp含量显著降低($P < 0.05$), 其它各药物组无改善作用($P > 0.05$)。结论: 下瘀血汤可有效的抑制大鼠猪血清免疫性肝纤维化, 提示本模型病理阶段的证候为瘀血阻络。

[关键词] 方-证相关; 下瘀血汤; 肝纤维化; 猪血清

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)06-0030-04

Relationship Between Traditional Medical Formulae and Syndrome Based Pharmacological Study of Xiayuxue Decoction against Porcine Serum Induced Liver Fibrosis in Rats

DU Guang-li, LIU Ping*, WANG Lei, WANG Chun-shu, LONG Ai-hua, MU Yong-ping
(Institute of Liver Diseases, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study relationship between traditional medical formulae and syndrome of Xiayuxue Decoction against liver fibrosis in rats induced by porcine serum. **Methods:** Liver fibrosis in rats was induced by intraperitoneal injection of porcine serum. 10 rats (4 in normal group and 6 in model group) were sacrificed after 8 w of modelling. The rest rats were then divided into normal group, model group, Xiayuxue Decoction group, Yinchenhao Decoction group, Huangqi Decoction group, Erzhi Pill Group and Xiaochaihu Decoction Group. Porcine serum was continuous given at the same time of administration. Rats were sacrificed and sample was obtained at the end of 12 w of modeling. ALT, AST, ALP and GGT activity, and Alb, TP and TBil content in rats were determined. Hyp content in rat liver tissue was assayed with hydrochloric acid hydrolyzing method, and histological changes with HE staining and collagen deposition with sirius red staining. **Results:** ALT and AST levels increased significantly ($P < 0.05$), Alb and TP content decrease markedly ($P < 0.05$). For the increased ALP, GGT and TBil levels there are no. Compared with model rats the improved liver function of rats in treatment groups is found especially in Xiayuxue Decoction. Compared with normal group, Hyp content of liver tissue in modeling rats increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, liver tissue Hyp content in rats of Xiayuxue Decoction group decreases significantly ($P < 0.05$), Hyp content in Yinchenhao

[收稿日期] 2006-09-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30400579); 上海市科委基础研究项目(02JC14024)

[通讯作者] * 刘平, Tel: (021) 51322059; E-mail: liuping@shutcm.com

Decoction group also decreases to some extent without statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion:** Xiayuxue Decoction effectively inhibits liver fibrosis in rats induced by porcine serum, which indicated that liver fibrosis induced by porcine serum in rats might be *blood stasis congesting vessels*.

[**Key words**] relationship between traditional medical formulae and syndrome; Xiayuxue Decoction; liver fibrosis; porcine serum

“方证相关”是方剂学的重要命题之一。病是证的载体,因此,方证相关更多的表现为“病-方-证”的相关性。由于目前抽象的证候模型的缺乏和不确定性,本文采用具体的方剂(体现肝硬化基本治法的经典方剂)对承载证的确定的病(猪血清免疫性大鼠肝纤维化模型)进行干预治疗,以药效学研究结果判别方-证的相关性,力图揭示方-证相关性的科学性以及建立病证结合动物模型的可行性。

1 材料

1.1 实验动物与药物 Wistar 大鼠,雄性,90 只,清洁级,体重 120 ± 10 g,购自中国科学院上海实验动物中心,动物合格证号为:SCXK(沪)2003-0005。上海中医药大学实验动物中心清洁区动物房饲养、造模和观察,自由饮食。

1.2 药物来源 所有药物购自于上海华宇药业有限公司。其中茵陈蒿(安徽)、栀子(浙江)、女贞子(上海)、旱莲草(上海)、桃仁(浙江)、地鳖虫(上海)产地明确,保存样品备查,统一由上海中医药大学曙光医院国家中医药管理局中药制备中心(国家中医药管理局三级实验室)一次制备后冷藏。各方中药物量均为 60 kg 成人的一日量,制备方法和药量尽可能接近原书所载。小柴胡汤《伤寒论》:日本ツムテ株式会社颗粒剂产品(成人每日 7.5 g)。

1.3 主要试剂 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清白蛋白(Alb)测定试剂盒,血清总蛋白(T.P)和血清总胆红素(Tbil)测定试剂盒均购自卫生部上海生物制品研究所。血清碱性磷酸酶(ALP)和血清 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)购自南京建成生物工程研究所。猪血清为奥地利 PAA 公司生产,批号:A07222-382。

2 方法

2.1 造模方法 腹腔注射猪血清 0.5 mL/只,每周 2 次,共 12 周,复制大鼠肝纤维化模型^[1]。

2.2 药物制备

2.2.1 茵陈蒿汤《伤寒论》:茵陈蒿 18 g(1.8 kg)、栀子 10 g(1 kg)、大黄 6 g(0.6 kg)。将栀子与大黄制成

粗粉末,与茵陈蒿一起水煎 2 次,药汁浓缩成浸膏。制备:茵陈蒿 3.6 kg、栀子 2.0 kg、制大黄 1.2 kg;先取茵陈,加水 10 倍量,浸泡 1 h;煎煮 40 min,加入栀子(捣碎)、大黄,煎煮 15 min,滤过取汁;药渣加水 7 倍量,煎煮 20 min,滤过取汁;合并 2 次药汁,浓缩至适宜体积。生药总重量为 6.8 kg 煎煮浓缩后为:1.083 相对密度,90 °C 5.4 kg 真空干燥后重量为 1.13 kg,每克含生药 6.018 g。

2.2.2 下瘀血汤《金匮要略》:大黄 10 g(1 kg)、桃仁 10 g(1 kg)、地鳖虫 6 g(0.6 kg)。制成粗粉末后以 75% 乙醇提取 2 次,提取液浓缩成浸膏。制备:大黄 2.0 kg、桃仁 2.0 kg、地鳖虫 1.2 kg,制成粗粉末;加 20% 乙醇 8 倍量,浸泡 1 h,(原方用黄酒,其乙醇含量为 16.5%)回流提取 2 次,第 1 次加 20% 乙醇回流提取 30 min,滤过取汁;药渣再加 6 倍量 20% 乙醇回流提取 1 h,滤过取汁,合并 2 次提取液。回收乙醇,流浸膏备用。生药总重量为 5.2 kg,煎煮浓缩后为:1.017 相对密度,65 °C 10 kg 真空干燥后重量为 0.585 kg,每克含生药 8.889 g。

2.2.3 黄芪六一汤《和剂局方》:黄芪 30 g(3 kg)、炙甘草 5 g(0.5 kg)、大枣 5 g(0.5 kg)制成粗粉末,水煎,浓缩煎出液制成流浸膏。制备:黄芪 6 kg,炙甘草 1 kg,大枣 1 kg;制法:加水 10 倍量,浸泡 2 h;煎煮 30 min,滤过取汁;药渣加水 8 倍量,煎煮 1 h,滤过取汁;合并 2 次药汁,浓缩至适宜体积。生药总重量为 8.0 kg,煎煮浓缩后为:1.115 相对密度,90 °C 5.8 kg 真空干燥后重量为 1.52 kg,每克含生药 5.263 g。

2.2.4 二至丸《柳州医话》:女贞子 1 kg,墨旱莲 1 kg 将二者粉碎,制成粗粉末,制法:加水 10 倍量,浸泡 2 h;煎煮 30 min,滤过取汁;药渣加水 8 倍量,煎煮 1 h,滤过取汁;合并 2 次药汁,浓缩至适宜体积。生药总重量为 5 kg,煎煮浓缩后为:1.2 相对密度,80 °C 5.8 kg 真空干燥后重量为 0.9 kg,每克含生药 5.556 g。

2.3 分组与给药 造模 8 周后将造模大鼠随机分为模型对照组和药物干预组,干预组经口灌胃给予

不同功效的经典方剂(茵陈蒿汤、下瘀血汤、黄芪汤、二至丸和小柴胡汤)的流浸膏,模型对照组给予等量生理盐水。将上面的药物稀释为溶液,给药剂量相当于 60 kg 成人每公斤体重剂量的 10 倍,每天 1 次,共 28 d,4 周末杀鼠取材。

2.4 样品的采集 用药 4 周结束后,处死大鼠,获取血清和肝脏标本。

2.5 指标检测 参照说明书生化法检测血清肝功能,肝组织羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)含量测定采用 Jamall 氏法^[2];HE 染色观察肝脏病理变化;天狼星红染色观察肝脏胶原增生变化。

2.6 统计方法 结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 血清肝功能的变化 结果见表 1~ 2。

表 1 血清肝功能的研究($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	Alb(g/L)	TP(g/L)
正常组	8	40.44 ± 4.06 ¹⁾	97.55 ± 4.45 ²⁾	30.30 ± 1.51 ²⁾	59.76 ± 4.45
模型组	12	46.55 ± 4.55	192.90 ± 16.93	27.82 ± 1.29	56.59 ± 3.10
下瘀血汤组	12	40.59 ± 7.29 ¹⁾	163.08 ± 12.92 ²⁾	28.69 ± 1.02 ¹⁾	56.90 ± 2.06
茵陈蒿汤组	12	38.79 ± 4.58 ¹⁾	189.46 ± 18.24	29.53 ± 1.32 ²⁾	54.79 ± 7.91
黄芪汤组	11	40.80 ± 7.30	197.97 ± 15.63	27.94 ± 0.88	54.70 ± 3.54
二至丸组	12	41.70 ± 8.08	196.09 ± 13.97	28.41 ± 1.99	56.51 ± 3.18
小柴胡汤组	12	38.54 ± 6.17 ¹⁾	196.98 ± 15.39	28.88 ± 1.34	56.63 ± 1.62

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$,以下同。

表 2 血清 ALP、GGT 活性和血清 Tbil 含量变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALP(U/L)	GGT(U/L)	Tbil(μmol/L)
正常组	8	17.61 ± 1.71	5.55 ± 1.42	6.16 ± 0.68
模型组	12	19.66 ± 3.63	5.78 ± 1.20	6.33 ± 1.54
下瘀血汤组	12	18.51 ± 4.45	5.25 ± 1.24	6.48 ± 1.54
茵陈蒿汤组	12	17.75 ± 2.21	5.57 ± 1.28	5.82 ± 1.20
黄芪汤组	11	17.57 ± 2.21	5.40 ± 1.16	5.64 ± 0.68
二至丸组	12	17.52 ± 2.84	5.40 ± 1.92	5.81 ± 1.03
小柴胡汤组	12	17.11 ± 1.18	5.48 ± 1.80	6.16 ± 1.88

3.2 肝组织 Hyp 含量的变化 结果见表 3。

表 3 肝组织 Hyp 含量的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hyp(μg/g 湿肝)
正常组	8	115.30 ± 17.96 ²⁾
模型组	12	309.58 ± 27.71
下瘀血汤组	12	260.77 ± 22.88 ¹⁾
茵陈蒿汤组	12	288.65 ± 46.93
黄芪汤组	11	338.66 ± 55.03
二至丸组	12	329.47 ± 66.74
小柴胡汤组	11	318.03 ± 28.87

3.3 肝组织 HE 染色变化 模型大鼠肝组织汇管区

扩张,轻度炎症,坏死,少量的炎性细胞聚集,汇管区有小胆管样上皮细胞增生,肝细胞形态基本正常,肝窦扩张,药物组中除下瘀血汤组大鼠肝脏病理有一定的改善外,其他各组无明显变化。

3.4 肝组织天狼猩红染色(胶原纤维沉积)变化

正常组大鼠肝组织可见血管壁、胆管壁染色。模型组大鼠肝组织可见胶原纤维从汇管区向小叶内伸展,呈放射状分割肝组织,形成大小不一的完整纤维间隔。与模型组比较,下瘀血汤组大鼠肝组织可见纤维间隔较菲薄。其他各组除二至丸组大鼠肝组织纤维间隔较模型组增厚外,无明显变化。

4 讨论

方从法出,法随证立,因此方药与病证呈现直接的对应关系,柯韵伯在《伤寒来苏集》中称之为“合是证便用是方”,即“方证相对”。但在临床实践中,除了“方证相对”之外,还存在着“同证异方”的现象。因此,方剂是否适应某一病证,不应当简单的归结为“方证相对”,而应该科学的归纳为“方证相关”^[3]。

以方测证是中医的思维方式之一,用不同治法的方剂治疗同一疾病,可以根据方剂的功效和疗效判断方证相关性,进而推断疾病的证候。本实验提示下瘀血汤可明显改善肝功能、降低肝组织 Hyp 含量,改善肝脏病理变化,疗效明显优于其他药物。因此,根据方证相关理论,下瘀血汤与本阶段猪血清免疫性大鼠肝纤维化的证候呈现出很高的相关性,提示本模型此病理阶段的证候可能为瘀血阻络。

小柴胡汤是国际上公认的抗肝损伤和肝纤维化的有效方剂^[4-8],但是本实验结果表明,小柴胡汤对本模型并未体现出良好的干预作用,分析可能主要与给药时间点不同有关,目前国外报道小柴胡汤抗猪血清免疫性大鼠肝纤维化模型均在造模前或造模成功停止猪血清刺激后给药^[9],而我们的实验是在造模成功后再予猪血清持续刺激的同时给予小柴胡汤干预治疗,这可能是产生不同结论的重要原因;也从另一侧面提示,同一方剂(小柴胡汤)对同一模型(猪血清免疫性大鼠肝纤维化)的不同病理阶段(证)的治疗作用呈现出的差别,可能正是中医方证相关及证候动态性的重要实验证据之一。

[参考文献]

[1] 于世瀛, 贾长恩, 王德福. 活血化瘀方药抗大鼠肝纤维化的形态学和血清定量研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 6(2): 21.

- [2] Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem*, 1981, 112: 70-75.
- [3] 谢鸣. “方证相关”逻辑命题及其意义. *北京中医药大学学报*, 2003, 26(2) : 11-12.
- [4] Ono M, Miyamura M, Kyotani S, *et al.* Effects of Sho-saikō-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.
- [5] 溝口靖紘. 小柴胡汤の免疫賦活, ホルモン及び抗炎症作用. *消化器科*, 1990, (12) : 143-151.
- [6] Kayano K, Sakaida I, Uchida K, *et al.* Inhibitory effects of the herbal medicine Sho-saikō-to (TJ-9) on cell proliferation and procollagen gene expressions in cultured rat hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 1998, 29(4) : 642-649.
- [7] Sakaida I, Matsumura Y, Kiyama S, *et al.* Herbal medicine Sho-saikō-to (TJ-9) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J Hepatol*, 1998, 28(2) : 298-306.
- [8] Miyamura M, Ono M, Kyotani S, *et al.* Effects of sho-saikō-to extract on fibrosis and regeneration of the liver in rats. *J Pharm Pharmacol*, 1998, 50(1) : 97-105.
- [9] Shimizu I, Ma YR, Mizobuchi Y, *et al.* Effect of Sho-saikō-to, a Japanese medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatol*, 1999, 21(1) : 149-160.