

含药血清药理学观察扶正化癥方抗肝纤维化的配伍作用*

王晓玲¹, 刘平², 刘成海², 刘成², 顾宏图²

(1 上海中医药大学生物化学教研室, 2 上海中医药大学肝病研究所, 上海 200032)

摘要: 将扶正化癥方分为扶正组、化癥组、虫草组、丹参组及丹参加虫草组, 灌胃给药分离药物血清, 观察各药物血清对大鼠肝星状细胞增殖、活化、I 型胶原和 TGF β 蛋白及其 mRNA 表达的影响。各组药物血清均可抑制星状细胞的增殖和活化, 其中化癥组效果最明显; 各组药物血清均可抑制星状细胞 I 型胶原 mRNA 及其蛋白的生成, 以扶正组效果最佳; 各组药物血清星状细胞 TGF β mRNA 及其蛋白生成均有明显的降低, 以虫草组作用最强。

关键词: 扶正化癥方; 药物血清; 星状细胞; I 型胶原; TGF β

中图分类号: 285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(1999)06-0022-04

Investigation of Fuzheng Huayu Decoction on Coordination Effect of Anti-fibrosis of Liver with Serum Pharmacology

WANG Xiao-ling¹, LIU Ping², LIU cheng-hai², LIU cheng², GU Hong-tu²

(1 Biological Department of Shanghai University of Chinese Medicine;

2 Hepatopathy Institute of Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200032)

Abstract: Fuzheng Huayu(FZHY) decoction was divided into five subgroups: Fuzheng group, Huayu group, Cordyceps group, Salvia Mitiorihizae group and Cordyceps plus Salvia Mitiorihizae group. Five types of serum containing correspondent drugs were collected from rats, respectively. The results showed that the five types of serum could inhibit hepatic stellate cells(HSC) and the effect of the serum containing Huayu was the best. The five types of serum could also inhibit mRNA expression and protein synthesis of type I collagen in HSC, and the effect of the serum containing Fuzheng was the best. The five types of serum could also inhibit mRNA expression and protein synthesis of transforming growth factor β in HSC, and the effect of the serum containing Cordyceps was the best.

Key words: Fuzhenghuayu decoction; drug serum; hepatic stellate cells; type I collagen; transforming growth factor β

肝纤维化的主要病理特征是肝脏细胞外基质的大量增生、沉积, 其主要来源于肝星状细胞(Hepatic stellate cells, HSC)^[1]; 对肝星状细胞的抑制是抗肝纤维化的重要环节。扶正化癥方是我所研制的抗肝纤维化中药复方, 临床观察和实验研究均有良好的抗肝纤维化作用^[2-3]。在以往研究工作基础上, 本文

将扶正化癥方初步拆方, 并将含药血清作用于培养的大鼠肝星状细胞, 研究该方抗肝纤维化作用的药物配伍特点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Wistar 雄性大鼠, SPE 级, 由上海中医药大学动物实验中心提供。

* 基金项目: 国家中医药管理局青年基金课题(97Y007)

1.1.2 药物 扶正化癥方及其拆方成分,由上海中华制药厂中心实验室协助制成流浸膏。扶正化癥方由虫草菌丝、松黄、丹参、桃仁等组成,扶正组由虫草菌丝、松黄等组成,化癥组由丹参、桃仁等组成,丹参组,虫草菌丝组,丹参加虫草菌丝组,各拆方组中的药物用量与全方组中单味药用量一致。方中所用丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge 的干燥根及根茎,桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica*(L) Batsch 的干燥成熟种子。以上药材均经上海中医药大学中药学院周秀佳教授鉴定。

1.1.3 主要试剂 [^3H]-胸腺嘧啶核苷酸 ($^3\text{H-TdR}$, 1148GBq/mmol), 购自中国科学院上海原子能研究所;单克隆小鼠抗人 α -平滑肌 actin (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体,购自 Dako 公司;多克隆兔抗人转化生长因子 β (Transforming growth factor β , TGF β) 抗体, Santa Cruz 公司产品;六聚体随机引物 (random primer), PCR Markers, Promega 公司产品, moloney 鼠白血病病毒逆转录酶 (moloney murine leukemia virus reverse transcription, MMLV-RT), GIBCO 公司产品;其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.4 引物: GAPDH 引物(甘油醛-3-磷酸脱氢酶 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 长度为 299bp)、小鼠 α (I) 胶原引物(长度为 254bp)、TGF β 引物(长度为 298bp), 由中国科学院上海植物生理研究所植物分子遗传国家重点实验室合成。

1.2 方法

1.2.1 含药血清制备 按本所建立的方法进行^[3]。

1.2.2 肝星状细胞分离培养 按本所常规方法进行^[4]。

1.2.3 细胞增殖测定 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法^[5]。

1.2.4 α -SMA 检测 免疫细胞化学 PAP 法^[6], HSC 经药物血清温育 48h, 中性缓冲福尔马林固定, 分别与小鼠抗人 α -SMA 抗体

或兔抗人 TGF β 抗体孵育, PAP 法显色, MPIAS-500 病理图文分析系统分析计算。

1.2.5 I 型胶原含量测定(ELISA 法)^[7] 包被样品及不同浓度的标准品, 加入 I 型胶原抗血清孵育, 经邻苯二胺显色, 酶标仪波长 492nm 测定结果。

1.2.6 I 型胶原与 TGF β mRNA 水平检测 RT-PCR 法^[8]。AGPC 法提取细胞总 RNA, MMLV-RT (200U) 逆转录, 分别加入特异引物, 进行 PCR 扩增循环, 2% 琼脂糖电泳、拍照, 照片经 UMAX S-12 扫描仪录入计算机, 图象分析软件分析电泳条带的面积和光密度, GAPDH 校正结果。

1.2.7 统计方法 q 检验或双侧 t 检验。

2 结果

2.1 扶正化癥方及其拆方各组药物血清对 HSC 增殖和活化的影响 与对照组相比, 全方组及其拆方各组 HSC 内 $^3\text{H-TdR}$ 的掺入量和 actin 阳性光密度均显著降低, 化癥组最低。(表 1)。

表 1 扶正化癥方及其拆方药物血清对 HSC 增殖和活化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	$^3\text{H-TdR}$ 掺入 (cpm/well)	Actin 阳性光密度
对照组	10024.63 \pm 1975.2	119.35 \pm 10.37
全方组	5329.23 \pm 737.14 ^{##}	82.67 \pm 7.04 ^{##}
扶正组	6381.07 \pm 1367.0 [#]	65.32 \pm 3.64 ^{##}
化癥组	2796.00 \pm 910.67 ^{##}	41.01 \pm 9.16 ^{##}
虫草组	4605.65 \pm 964.58 ^{##}	68.20 \pm 8.19 ^{##}
丹参组	4265.20 \pm 1092.9 ^{##}	47.49 \pm 6.44 ^{##}
丹参加虫草	4642.55 \pm 917.15 ^{##}	77.99 \pm 9.93 ^{##}

注: 与对照组比较[#] $P < 0.05$; ^{##} $P < 0.01$, 以下同

2.2 扶正化癥方及其拆方各组药物血清对 HSC I 型胶原(I 型胶原 α 链 COL1A2) 的影响 全方组及其拆方各组 I 型胶原含量及其 mRNA 表达均显著低于对照血清组, 扶正组最低。(表 2、图 1)。

2.3 扶正化癥方及其拆方药物血清对 HSC TGF β 的影响 扶正化癥方及其拆方药物

糖尿病在祖国医学中属“消渴证”。消渴，乃消谷善饥、口渴多饮。消者，亦消耗也；渴者，里有热也，津液为热所耗，且阴阳气血津液均为所消耗，故有消渴一证。临床以多饮、多尿、多食善饥为主要特征，并常伴有心、肾、眼、神经等慢性并发症。中医认为本病多因阴津亏损，燥热内生而引起，即人体内分泌失调，导致血糖升高，所以对该病的治疗主要应从降低血糖入手。中医多以清热生津、益气养阴方药为主。根据我们以往的实验^[1,2]及近年临床报告^[3,4]，黄连及其主要成分小檗碱具有确切的降血糖作用，因此本实验以黄连为基础，进行不同配伍。本文先选择了7种常用的治疗消渴证的古方与黄连进行配伍，发现这些古方与黄连在对高血糖小鼠的降血糖方面没有明显的协同作用。然后我们又比较分析了治疗糖尿病不同阶段的燥热伤津方、气阴两伤方、阴阳两虚方等60余种古方^[5,6]，从中选出使用频率较高的黄芪、麦冬、女贞子、丹参、石膏等与黄连进行不同的配伍，试图使新的组方既有较强的降血糖作用，又有消渴复方益气、滋阴、清热等整体调节作用，同时又增强机体对刚果红的廓清能力，提高机体的免疫力，以期预防糖尿病慢性并发症的发生和发展。本文仅总结了我们的初步实验结果。

1 材料

1.1 动物 昆明小鼠，雄性，体重20~24g，购自中国医学科学院实验动物繁育场，动物合格证号为医动字第01-3001。四氧嘧啶(Alloxan)高血糖小鼠为正常昆明小鼠尾静脉注射四氧嘧啶100mg/kg，72h后测血糖，选出血糖值大于200mg/dl的动物，并根据血糖值分组，组间均值之差不大于10mg/dl。

1.2 试剂及药材 实验所用试剂均为分析纯化学试剂。各种药材，黄连(*Coptis chinensis*)，黄芪(*Astragalus membranaceus*)，麦冬(*Ophiopogon japonicus*)，女贞子(*Ligustrum lucidum*)，人参(*Radix ginseng*)，天花粉(*Radix trichosanthis*)，地骨皮(*Cortex*

lycii radidis)，石膏(*Gyosum fibrosum*)，甘草(*Radix glycyrrhizac*)，生地(*Radix rehmanniae*)，枸杞子(*Fructus lycii*)，五味子(*Fructus schisandrae*)，淡竹叶(*Herba lophatheri*)，栀子(*Fructus gardeniae*)，黄芩(*Radix scutellariae*)，均购自同仁堂药店，由本所生物合成实验室鉴定。

2 方法

2.1 血糖用葡萄糖氧化酶法测定。

2.2 刚果红廓清实验 正常小鼠连续给药5d后，尾静脉注射0.5%刚果红生理盐水溶液0.05g/kg，5min后眼眶取血，分离血清，并用pH10的生理盐水稀释100倍，于520nm处比色，OD值越低，说明其血清中残留的刚果红越少。计算与对照组比较血清中刚果红的剩余百分数($OD_{\text{给药组}}/OD_{\text{对照组}}$)。

2.3 各种方剂均由本实验室制成。黄连直接粉碎，过120目筛制成粉末。为实验方便，组方中的其它成分按实验设计将药材混合后加7倍水，煎煮2次，每次煮沸1~2h，将2次滤液合并，于82~86℃干燥成浸膏粉。实验时将一定量的方剂水提浸膏粉和黄连粉末一起加蒸馏水研磨成所需浓度的混悬液，给动物以0.1ml/10g体重灌胃，每天1次。

3 结果

3.1 黄连与几种消渴古方配伍后对高血糖小鼠血糖的影响 选择7个治疗消渴证的常用古方，其所含组分和实验剂量见表1，单纯古方的降血糖作用不明显，将其煎制成浸膏粉，与一定量的黄连粉研磨成混悬液，给Alloxan高血糖小鼠灌胃，每组8~10只动物(以下同)。5d后，测定血糖，并计算与对照组比较各组血糖下降百分数。结果显示(见表2)，黄连对Alloxan高血糖小鼠有较强的降血糖作用，与玉壶丸、地骨皮散、黄连丸、黄芪六一汤等配伍后，其降血糖作用未见明显加强，而与黄芪汤、人参竹叶汤、生脉饮等配伍后，其降血糖作用基本被抵销了。说明这些古方与黄连配伍对Alloxan高血糖小鼠在降血

参考文献:

- [1] Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis[J]. N Eng J Med, 1993, 24: 1828~ 1835
- [2] 刘平, 刘成, 胡义杨, 等. 扶正化痰 319 方治疗肝炎后肝硬化的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(8): 459~ 462
- [3] 刘成海, 刘成, 刘平, 等. 扶正化痰复方药物血清对大鼠肝贮脂细胞增值及胶原生成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 1996, 2(2): 16~ 19
- [4] 徐列明, 刘成, 刘平, 等. 一种稳定和高产的星状细胞分离法[J]. 细胞生物学杂志, 1995, 117(3): 14~ 16
- [5] 叶维新, 陈恺, 孝延龄. 实验核医学[M]. 长春: 吉林科技出版社, 1990. 38
- [6] 龚志锦, 詹溶洲. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海: 上海科技出版社, 1994. 335
- [7] S. L. Rennard, R. Berg, G. R. Martin, et al. Enzyme-linked Immunoassay (ELESA) for connective Tissue components[J]. Analytical Biochemistry, 1980, 104: 205~ 214
- [8] Chomcznski-P, Sacchi-N. Single-step method of RNA isolation by acidguanidinium thiocyanate-phenol-chorformextraction [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 162: 156
- [9] Joan Massagen, Liliana Attisano, Jeffreg L, et al. The TGTB family and its composite receptors[J]. Trends in cellular Biology, 1994, 85: 1833~ 1834

(收稿日期: 1999-01-29)

自拟面瘫汤治疗面神经麻痹 42 例疗效观察

邹秋贤

(深圳市龙岗区坪地医院, 深圳, 518117)

1979 年来, 笔者应用自拟面瘫汤, 治疗周围面神经麻痹, 疗效满意, 总结如下。

1 临床资料

全部病例均为门诊治疗病人, 共 42 例, 其中男 25 例, 女 17 例。最小年龄 14 岁, 最大 55 岁, 平均 33.6 岁; 病程在 30 天以内 33 例, 2~ 6 个月 9 例。

2 诊断标准疗效判定

全部患者根据国家中医药管理局颁发的《中医内科病证诊断疗效标准》作标准, 主要临床表现为突发性一侧面部麻木、疼痛、言语不利, 口角流涎, 口眼歪斜, 不能鼓颊, 皱眉, 额纹消失, 闭目露睛等, 一侧面部肌功能完全丧失或不完全丧失。疗效判定: 以治疗后症状、体征全部消失, 面部肌功能活动正常, 随访 1 年未复发者为痊愈; 症状体征缓解或消失, 功能活动基本恢复正常为有效; 症状体征, 功能活动无改变者为无效。

3 治疗方法

基本方: 白附子 10g、僵蚕 10g、全蝎 5g、炒山甲 10g、秦艽 10g、羌活 12g、牛蒡子 15g、防风 12g、葛根 15g、当归 10g、白芍 15g、川芎 12g、甘草 6g。

本方具有祛风通络, 养血和营之功。辨证加减: 风热者去当归加石膏、黄芩; 风痰偏重加胆南星、姜夏; 气血虚弱加黄芪、枸杞子。

用法: 每日 1 剂, 水煎 2 次分服, 10 天为 1 疗程。

4 治疗结果

42 例面神经麻痹病例中, 痊愈 39 例, 有效 3 例, 治愈率 92.8%, 总有效率 100%。疗程最短 1 个疗程, 最长 3 个疗程。

5 体会

面瘫, 即周围性面神经麻痹, 中医学称为“口眼喎斜”, 认为正气不足, 脉络空虚, 风寒之邪乘虚入中脉络, 气血痹阻, 经脉失养所致, 故本方拟以牵正散, 大秦艽汤加减而成, 旨在祛风通络、养血和营为治则, 经多年运用, 疗效甚佳。牵正散祛风化痰通络, 尤善治头面部风痰阻络, 已为历代医家所肯定, 大秦艽汤祛风清热、养血活血, 专为风邪初中经络而设, 只要根据临床辨证无化热之象, 减去清热之品, 完全符合治疗本病原则。

本方治疗 42 例中, 初期治疗极其重要, 越早治疗, 治愈率越高; 年龄因素也相关密切, 年青病例恢复较快。相反, 病邪入侵日久或年老体弱者, 疗程较长, 功能改善较慢, 本病 3 例有效病例中, 正如所云。

(收稿日期: 1999-07-26)