

虎杞合剂防治 α -异硫氰酸萘酯致大鼠急性肝损伤的实验研究

朱青艳¹ 彭文娟² 王竞春² 冯 亭²

(1 湖北中医学院,湖北省武汉市洪山区黄家湖西路 1 号,430061; 2 武汉市妇女儿童医疗保健中心中西医结合科)

摘要 目的:探讨虎杞合剂(Hu Zhi Mixture, HZM)防治 α -异硫氰酸萘酯(α -naphthyl Isothiocyanate, ANIT)致大鼠急性肝损伤的效应及机制。方法:将大鼠随机分为 4 组:正常对照组、造模对照组、虎杞合剂治疗组、泼尼松对照组。检测大鼠在造模 48h 后,血清中肝功能、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、肝组织中的丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的含量,光镜下观察肝脏组织学改变。结果:HZM 能明显改善造模引起的肝组织学及肝功能变化,降低 TNF- α 、MDA 水平,而 SOD 含量显著增高。泼尼松对照组能部分改变各项指标。结论:HZM 防治 ANIT 致大鼠急性肝损伤切实有效。其作用机制可能与其拮抗作用,减少 TNF- α 、MDA 的产生,提高 SOD 活性有关。

关键词 肝损伤,肝炎综合征/中医药疗法; @ 虎杞合剂

Lab Report of Hu Zhi Mixture on Rat with Acute Liver Injury Induced by 1-Naphthyl iso-thiocyanate

Zhu Qingyan¹, Peng Wenjuan², Wang Jingchun², Feng Ting²

(1. Hubei College of Chinese Medicine, Add.: No. 1, Huangjia Lake West Road, Hongshan District, Wuhan City, Hubei Province, Postal code: 430061; 2. Dept. of Integrative Chinese and Western Medicine, Maternal and Child Health Center of Wuhan)

Abstract Objective: To study the therapeutic effects and mechanism of Hu Zhi Mixture (HZM) on rat model of acute liver injury induced by α -Naphthyl iso-thiocyanate (ANIT). **Methods:** The rats were randomly divided into four groups: normal group, ANIT group, HZM group and Prednisone group. The rat model was established by ANIT. 48 hours later, we determined the levels of tumor factor- α (TNF- α), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), examined liver functions and liver tissues under the microscope. **Results:** Compared with ANIT group, the levels of TNF- α , MDA were markedly lowered in HZM group while the level of SOD markedly increased. Besides, HZM can significantly offset the changes in liver tissue and function induced by ANIT. Prednisone can improve the above values to a certain degree. **Conclusion:** HZM has good preventive and therapeutic effect against acute liver injury of rats which may be linked with inhibition of TNF- α and MDA, activation of SOD activity.

Key Words Hu Zhi Mixture, 1-Naphthyl iso-thiocyanate, Hepatitis Syndrome, Liver Injury

婴儿肝炎综合征(Infancy Hepatitis Syndrome, IHS)是指起病于婴儿时期的一组临床证候群,以黄疸、肝脾肿大及肝功能异常为特点^[1],属中医的“黄疸”“胎黄”范畴。本病因复杂,大多由病毒、细菌、霉菌或其他病原体感染引起,少数由胆管畸形及先天性代谢障碍

引起,其中以病毒感染最为常见^[2]。婴儿病毒性肝炎的临床表现与成人不同,多表现为瘀胆型肝炎,胆汁淤积为其主要的病理改变^[3]。HZM 是由彭兆麟教授在长期临床实践基础上,结合中西医理论研制的中药复方制剂,临床治疗婴儿肝炎综合征疗效肯定^[4]。本实

血管生成、创伤修复及组织再生中起重要作用,并且对多种中胚层及外胚层来源的细胞具有促有丝分裂的作用,并能促进胶原的生成及纤溶酶原的激活^[3]。研究表明,细胞因子在肝硬化的形成发展中起着重要作用^[4],BFGF 作为重要的细胞因子,随着纤维化进程的加重,大鼠 BFGF 含量逐渐增强,这表明 BFGF 与纤维化的发展是一致的,是促纤维化因子。

本研究表明,经治疗后,BFGF 含量明显下降,说明消臌软坚丸可明显降低肝硬化大鼠模型肝组织 BFGF 含量,从而抑制肝星状细胞的活化、胶原生成、纤维组织增生,阻止肝硬化进展,对腹水的产生与消退也产

生积极的影响。

参考文献

- [1] 戚忠玺,耿兰书,贡桂英,等.消臌软坚丸治疗肝炎肝硬化腹水 88 例的临床观察.中医杂志,2004,45(5):347-349.
- [2] 韩德五,马学慧,赵元昌.肝硬化动物模型的研究.山西医药杂志,1979,(4):1-5.
- [3] Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, et al. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. Clin Invest, 1989, 84:1786-1793.
- [4] 杨牧祥,王少贤,张一昕,等.柔肝消臌饮对肝硬化大鼠血清和肝组织 IL-1 β 和 IL-6 含量的影响.中西医结合肝病杂志,2007,17(2):100-101,104.

(2008-03-24 收稿)

验采取与 IHS 病变极为相似的 ANIT 引起的大鼠急性肝损伤模型作为研究对象,探讨 HZM 的作用及机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 1)实验动物:SD 雄性大鼠 40 只,鼠龄 20 天左右,体重 57.52 ± 1.76 g,由同济医科大学动物实验中心提供。2)主要试剂:虎标合剂,儿童医院药剂科提供; α -异硫氰酸萘酯,美国 SIGMA 公司提供,临用前用麻油配成 2% 浓度的溶液;TNF 试剂盒,北京东亚免疫研究所提供;MDA 试剂盒、SOD 试剂盒、双缩脲试剂盒均由南京建成生物工程所提供。3)主要仪器设备:高速冷冻离心机(上海东亨离心机厂);AU-600 全自动生化分析仪;SN-695 智能 r 计数器(上海日环一厂);Olympus B×50 研究摄影显微镜;Leitz 1516 石蜡切片机。

1.2 实验方法 取大鼠 40 只,随机分成 4 组:正常对照组(A, N=10);造模对照组(B, N=10);HZM 治疗组(C, N=10);泼尼松对照组(D, N=10)。各组均于每日 8:00、16:00 灌胃,共 4 天。A 组给予生理盐水 0.5mL/次灌胃。B 组除第 3 天 8:00 停服生理盐水,改用 ANIT(70mg/kg 鼠重)灌胃 1 次,其余方法同 A 组。C 组给予 HZM(20g/kg 鼠重)灌胃,第 3 天早上停服 HZM,而改用 ANIT(70mg/kg 鼠重)灌胃 1 次。D 组给予泼尼松混悬液 2mg/kg 灌胃,第 3 天早上停服泼尼松混悬液,而改用 ANIT(70mg/kg 鼠重)灌胃 1 次。于服用 ANIT 48h 后,即第 4 天早上 8 点,断头取血,立即分离血清,在全自动生化分析仪上测定 ALT、TBILI、DBILI、TBA、ALP 含量,其余血清 -70℃ 冻存,2 个月内测定 TNF- α 、SOD 含量,并于采血后,切取肝右叶的新鲜肝组织一块,常规福尔马林固定,石蜡包埋切片,HE 染色,供光镜下观察。其余肝脏 -70℃ 冻存,2 个月内制备组织匀浆,测肝组织 MDA 含量。

血清 TNF- α 采用放免法,由武汉市儿童医院核医学室测定。血清 SOD 测定采用黄嘌呤氧化酶法,按试剂盒说明书要求逐步完成操作。肝组织 MDA 测定采用硫代巴比妥酸比色法,按试剂盒说明书要求逐步完成操作。

1.3 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料用方差分析,方差不齐用 H 检验,两两比较用 Q 检验。各变量之间的关系采用直线相关分析。以 $P < 0.05$ 为显著性判断界值。

2 实验结果

2.1 造模后大鼠一般情况 造模组在造模后 24h 即开始出现食欲减退,进食减少,食量只有造模前的 1/2

~1/3,活动减少,巩膜、耳部、尾巴皮肤发黄,小便次数增多,尿色明显变黄,大鼠排泄器官周围被尿液浸湿,至造模后 48h 表现最为明显。治疗组各种症状均较轻。

2.2 各组 ALT、TBA、TBILI、DBILI、ALP 的组间比较

ANIT 造模后 48h,造模组、HZM 治疗组、泼尼松对照组血清 ALT、TBA、TBILI、DBILI、ALP 均较正常组明显升高(P 值均 < 0.01),但 HZM 治疗组 TBILI、DBILI、ALT、TBA 的升高幅度较造模组明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。与造模组相比,泼尼松对照组 TBILI、DBILI 亦有显著降低($P < 0.05$, $P < 0.05$),但对 ALT、TBA 无明显改变($P > 0.05$)。3 组 ALP 无明显差异($P > 0.05$)。

2.3 各组 TNF、MDA、SOD 的组间比较

ANIT 造模后 48h,造模组血清 TNF($P < 0.01$)、MDA($P < 0.05$)均较正常组升高,而血清 SOD 活性($P < 0.01$)减低。HZM 治疗组与造模组相比,能显著降低血清 TNF($P < 0.05$)、肝 MDA($P < 0.01$)水平,增高血清 SOD 活性($P < 0.01$)。泼尼松对照组与造模组相比,亦能降低血清 TNF($P < 0.05$)、MDA($P < 0.05$)水平,但对 SOD 活性($P > 0.05$)无影响。

2.4 直线相关分析 相关分析表明,TNF 与 MDA($r = 0.478$, $P < 0.05$)呈正相关。

2.5 肝组织病理学观察 光镜下显示,造模组在造模后 48h 可见肝小叶结构破坏,大的分支处的汇管区及周围病变较为严重,较小的汇管区及周围病变相对较轻。汇管区炎性细胞浸润明显,肝细胞肿胀、胞浆疏松,肝细胞核大小不一,可见气球样变和颗粒样变性,及灶状坏死,肝窦内可见活化的枯否细胞。肝血窦受肿胀的肝细胞挤压明显变窄。小叶间胆管管壁结构不清,排列不规则,上皮细胞肿胀,有的胆管上皮细胞出现嗜酸性变,坏死、脱落进入管腔,致使管腔狭窄,甚至堵塞不通。汇管区胆小管增生,胆管数量增多,新生的上皮细胞有的已形成小管腔,有的尚未形成。有的胆管上皮形成双层、多层上皮,管壁变厚,管腔狭窄。HZM 治疗组较造模组肝组织受损明显减轻,肝小叶结构基本正常,汇管区炎症细胞浸润减少,小叶间胆管阻塞有所改善,胆管上皮细胞有修复迹象,肝细胞增生活跃,可见核分裂相。肝细胞肿胀减轻,未见坏死,肝窦狭窄明显缓解。泼尼松对照组汇管区炎症较造模组明显减轻,小叶间胆管阻塞明显改善,但仍可见肝细胞肿胀、变性及灶状坏死。

3 讨论

ANIT 是一种间接的肝毒剂,它对肝脏的损害,主

要是引起毛细胆管增生及小叶间胆管周围产生炎症,从而造成胆管阻塞,形成明显的胆汁瘀积,并伴随以点状坏死为主的肝实质细胞损害。由于 ANIT 诱发的肝内胆管瘀积模型在实验动物中重现性好,结果稳定,方法简单易掌握,而被广泛使用^[5]。TNF- α 是一种重要的前炎症因子,适量时可发挥免疫调节功能,分泌过多或调节失控时则引起免疫病理损伤。TNF- α 与肝损伤密切相关。TNF- α 的大量释放可激活中性粒细胞并黏附于肝窦内皮细胞,产生和释放自由基,使肝细胞膜和细胞器发生脂质过氧化而损伤肝细胞^[6]。另一方面可通过灭活肝组织纤溶酶原激活物而抑制纤溶反应,通过增强组织因子表达,下调血栓调节素表达而激活凝血系统,导致毛细血管微血栓及 DIC 形成,引起血液流变学和动力学改变,使各脏器产生缺血性改变^[7],并能刺激激活多型核粒细胞,使之释放多种损伤物质,如各种氧化剂、蛋白酶等,这些都是强力破坏肝组织的物质,释放入血可造成肝脏的损害^[8]。TNF- α 还能诱导 IL-1、IL-6 等基因的表达,活化磷脂酶 A2 (ALA2),致使花生四烯酸分解,产生 PAF、LT3、PGE2、TXA2 等炎症介质,从而加剧肝组织损伤及微循环障碍^[9]。MDA 是体内氧自由基代谢的终末产物之一,其增多意味着氧自由基的大量释放,而 SOD 能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤。ANIT 造模后 48h,造模组血清 TNF、MDA 均较正常组升高,而血清 SOD 活性减低。通过相关分析表明,TNF 与 MDA 呈正相关。考虑二者之间有协同作用,共同引发肝脏的损害。而 HZM 能显著性降低 TNF、MDA 水平,提高 SOD 活性,提示 HZM 的作用机理可能与调节免疫功能,降低 TNF 的生成和释放,减少脂质过氧化物的生成,提高机体抗氧化能力有关。

本模型大鼠造模后出现身黄、目黄、小便黄,排泄器官秽浊,纳食减少,活动减少,符合中医学对于阳黄湿热黄疸的描述,各种致肝损伤的炎症因子及介质、代谢产物的产生可概括为中医的内生毒邪,且组织学上有小叶间胆管狭窄、堵塞,肝窦瘀血表现,从微观角度体现了气滞血瘀的病机。HZM 由虎杖、栀子、金樱子 3 味药组成。虎杖清热除湿,活血化瘀,疏肝利胆为君药;栀子清热解毒、利胆退黄,为臣药;金樱子酸甘以养肝阴,防止苦寒伤肝为佐药。其处方紧扣湿、毒、瘀的病机,施以清热解毒利湿、活血化瘀的治则,可谓证治相合。从实验结果分析,HZM 的作用非局限于某一环节或某一递质,而是具有多靶点、多效应的作用特点,体现了中医用药的整体观念,亦是其较西药的优势所在。

参考文献

- [1] 鄢裕光. 全国小儿病毒性肝炎防治座谈会纪要. 中华儿科杂志, 1982, (20): 120.
- [2] 闰军, 陈星涛, 胡兰. 婴儿肝炎综合征 90 例临床分析. 儿科药理学杂志, 2005, 11(6): 25-26.
- [3] 方峰. 婴儿不同类型巨细胞感染对肝脏的影响. 中国实用儿科杂志, 1995, (6): 347-348.
- [4] 彭兆麟. 虎杖茵陈剂治疗婴儿肝炎综合征的临床观察. 中西医结合肝病杂志, 1999, (3): 53-54.
- [5] 李仪奎. 中药药理实验方法学. 上海: 上海科技出版社, 1991.
- [6] 韩德五. 肠源性内毒素血症是肝炎、肝病的危险因素. 山西医科大学学报, 2006, 37(1): 1-4.
- [7] Klar S. Role of arachidonic acid metabolites in acute renal failure and sepsis. Nephrol Dial Transplant, 1994, 9 suppl 4: 52-6.
- [8] Calloway sw, Formella L, kingsnorth AN. Human pancreas specific protein an early marker of severity in acute pancreatitis. Gut, 1994, 35: A574.
- [9] Camussi G, Albano E, Tetta C, et al. The molecular Action of tumor necrosis factor-alpha. Eur J Biochem, 1991, 202(1): 3-14.

(2008-02-29 收稿)

《世界中医药》杂志第一届理事会名单

名誉理事长: 余靖、朱庆生、张凤楼

理事长: 李振吉(常务)、房书亭、于文明

副理事长(按姓氏笔划排列): 于生龙、于淑芳、马西姆(意大利)、王志勇、王振邦、王忠和、王超群(加拿大)、王炳岐、方明金、乌兰、韦波、龙致贤、田景福、孙塑伦、孙庆涪(南非)、邓良月、邓小川、申长虹、田小明(美国)、任德权、吕玉波、朱征明、安迪(奥地利)、沈志祥、沈堂彪、李怀荣、李俊德、李维衡、阮诗玮、苏荣彪、吴坤平、孟长征、严朝君、里根(比利时)、张洪魁、张奇、杨殿兴、周然、邱德亮、阿尔甫、杨鸿生、陈抗生、陈可冀、林日初、林子强(澳大利亚)、拉蒙(西班牙)、赵英杰(新加坡)、罗伯逊(巴西)、姜再增、姜在阳、贺兴东、郑守曾、施杞、钟清(阿根廷)、诸国本、高思华、徐志伟、索天仁、夏祖昌、袁长津、高鹤亭(日本)、曹洪欣、黄立成、梅万方(英国)、屠英(美国)、程四林、喜乐、谢阳谷、彭炜、程兆盛、董德刚、董明培、董志林(荷兰)、蔡宝德(葡萄牙)、塔基娅娜·波塔波娃(俄罗斯)、鄢卫东、戴维(美国)

常务理事(按姓氏笔划排列): 于连云、马其江、王奎、文渊、丛丹江、朱岷、冷荣久、季伟平、刘金生、刘品、刘希伟、林秀明、张重刚、罗建、赵勇、曹礼忠、黄更荣、黄维忠、韩同彪、彭跃刚、靳万庆、廖利平、戴伟杰

秘书长: 姜再增(兼)

副秘书长: 王炳岐(兼)