

# 刺络泻血疗法对四氯化碳诱导的 HF 大鼠 PCⅢ、CⅣ的影响

张 博<sup>1</sup> 赵慧玲<sup>1</sup> 谭 丽<sup>2</sup> 魏 珂<sup>3</sup> 魏丹蕾<sup>1</sup> 曾 蕊<sup>1</sup>

(1 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京, 100029; 2 广州中医药大学, 广州, 510405; 3 北京丰台中西医结合医院, 北京, 100071)

**摘要** 目的: 本实验采用四氯化碳( $\text{CCL}_4$ )诱导的 SD 大鼠 HF 模型, 在大鼠足三里、太冲、阳陵泉这 3 个穴位上进行刺络泻血治疗, 观察该疗法对 HF 模型大鼠肝脏组织形态、肝功能 AST、ALT 及肝纤维化指标 PCⅢ、CⅣ的影响, 从而探索刺络泻血疗法对于 HF 的疗效及其作用机制。方法: Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只, 雄性, 随机分为 4 组, 空白对照组(10 只)、模型对照组(10 只)、秋水仙碱组(10 只)以及刺血干预组(10 只)。除空白对照组外, 其余 3 组用 40%  $\text{CCL}_4$  (花生油稀释) 诱导 HF 模型, 为期 6 周。第 6 周至第 12 周, 对空白对照组的大鼠 0.9% 生理盐水皮下注射, 2 次/周, 至 12 周; 其余 3 组的大鼠持续注射 40%  $\text{CCL}_4$  (花生油稀释), 模型对照组的大鼠只抓取, 不做其他处理, 秋水仙碱组同时 220  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  标准给予秋水仙碱, 5 次/周; 刺络泻血组同时进行刺络泻血疗法干预, 2 次/周, 至 12 周。12 周后, 麻醉大鼠并行开腹术, 取大鼠肝左叶小块组织行石蜡包埋、切片, 以及 Masson 染色, 观察大鼠肝左叶的组织形态学改变; 采用 ELISA 法对肝纤维化指标 PCⅢ、CⅣ, 采用化学法对肝功能指标 AST、ALT 进行定量检测。结果: 1) 肝脏组织形态改变: 对切片分析后可见生理盐水对照组肝小叶结构完整, 汇管区周围存在少量染色; 模型组肝小叶消失, 纤维架桥出现, 形成肝纤维化; 秋水仙碱组和刺血干预组肝纤维化程度明显比造模组减轻, 但比空白对照组严重, 说明秋水仙碱组和刺血干预组干预均有效。2) 肝功能情况: 比较于模型对照组, 刺血干预组 AST、ALT 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 秋水仙碱组 AST 含量降低 ( $P > 0.05$ ), 而 ALT 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ); 提示刺血疗法可显著降低血清 AST、ALT 的含量。3) 对肝纤维化指标 PCⅢ、CⅣ的影响: 比较于模型对照组, 秋水仙碱组和刺血干预组 PCⅢ、CⅣ的含量下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 提示刺血疗法可以显著降低 PCⅢ、CⅣ的含量。

**关键词** 肝纤维化; 刺络泻血; Ⅲ型前胶原; Ⅳ型胶原

## Effects of Pricking Blood Therapy on PC III and C IV in HF Rats Induced by Carbon Tetrachloride

Zhang Bo<sup>1</sup>, Zhao Huiling<sup>1</sup>, Tan Li<sup>2</sup>, Wei Ke<sup>3</sup>, Wei Danlei<sup>1</sup>, Zeng Rui<sup>1</sup>

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3 Beijing Fengtai Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Beijing 100071, China)

**Abstract Objective:** To observed effect of the pathological change of the liver, liver function and apoptosis factor PCIII and PCIV in HF model rats induced by  $\text{CCL}_4$ , and with the treatment on or near Taichong, Zusanl and Yanglingquan of the rats by pricking blood therapy with a three-edged needle, so as to explore the mechanism of bloodletting in prevention and treatment of HF rats.

**Methods:** Forty male SD rats were randomly divided into normal control group, model group, colchicines-controlled group and bloodletting group with 10 cases in each group. Except the normal control group, the other three groups were induced into liver fibrosis model with 40%  $\text{CCL}_4$  diluted by peanut oil. After 6 weeks, the colchicines-controlled group was given colchicine 200  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  with 5 times a week; the blood-letting group had 0.15-0.2 mL hemorrhage on or near Taichong, Zusanl and Yanglingquan with 2 times a week. After 12 weeks, the general conditions of rats were observed; Small piece of liver tissue selected from left lobe of liver was embedded in paraffin, sliced and stained with Masson and its pathological changes were observed; The liver function AST, ALT were detected by ELISA method; PCⅢ and PCIV were detected by the expression by fluorescence semi quantitative PCR. **Results:** The morphological change of liver tissue; Masson staining showed structural integrity of hepatic lobule. There were only a little collagen fibers in portal area. Compared with normal group, masson staining result indicated significant liver fibrillation. The fibrillation of colchicines-controlled group and bloodletting group was lighter than that in model group, indicating the treatment was effective. Liver function; compared with the model group, AST, ALT levels of the pricking blood group decreased significantly ( $P < 0.05$ ), and AST content of colchicine control group decreased ( $P > 0.05$ ). And the content of ALT sig-

基金项目: 赵慧玲科技服务社会(中医针灸、泻血)(2030071720007)

作者简介: 张博(1989.09—), 男, 2015 级针灸推拿学专业硕士研究生, 研究方向: 刺络泻血疗法作用机理的实验研究, E-mail: zhangbo@bucm.edu.cn

通信作者: 赵慧玲(1957.07—), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 刺络泻血疗法作用机理的实验与临床研究, E-mail: zzydxzhao@163.com

nificantly reduced ( $P < 0.05$ ); Pricking blood therapy could significantly reduce the serum AST and ALT levels; PCIII, CIV expression; compared with the model group, PC III, C IV expression of colchicine group and thorn blood group decreased, and the difference had statistical significance ( $P < 0.05$ ). The pricking blood therapy can significantly down regulated the expression of PCIII and CIV. **Conclusion:** Firstly, bloodletting therapy can reduce the content of serum ALT and AST to a certain extent, and can protect liver function. Secondly, bloodletting therapy can significantly reduce the expression of PCIII and CIV. Thirdly, bloodletting therapy is effective in the treatment of liver fibrosis in rats, which can reduce the expression of apoptosis inhibiting gene PCIII and CIV, as well as change the ratio of PCIII/CIV.

**Key Words** Hepatic fibrosis; Blood pricking therapy; PCIII; CIV

中图分类号: R245.31+2 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.05.043

肝纤维化 (Hepatic Fibrosis) 是慢性肝病向肝硬化以及肝癌的发展必经阶段, 在肝纤维化发展的后期会严重影响患者的生命质量, 如果继续恶化, 甚至危及生命。我国长期以来都占据着肝病大国的位置, 根据 2008 年调查的数据显示, 全球大约有 3.5 亿乙肝病毒感染者, 中国大约有 1.2 亿, 占总数的 34.3%, 占我国人口总数的 9.8%<sup>[1]</sup>。慢性乙型肝炎发展为肝纤维化, 只需要 2~6 年的时间, 慢性乙型肝炎患者中约 10%~15% 的人可能会在 5~10 年内发展为肝纤维化, 从而导致肝硬化。此外, 急性丙肝的危害也较大, 2007 年世界卫生组织公布数据表明, 全球约有 1.7 亿人感染丙型肝炎病毒, 包括肝硬化或肝癌; 我国 HCV 的感染率约为 3.2%<sup>[2]</sup>。2009 年报告的发病人数在短短 6 年时间内竟然达到是 2003 年发病人数的 6 倍多。多项研究表明, 肝纤维化经过治疗后可以发生逆转化。因此, 提早预防和干预肝纤维化的形成, 对各种慢性肝病的治疗具有重要意义。现代医学治疗肝纤维化的手段, 主要从肝纤维化发生的各个途径抑制纤维化的发生和发展, 但是在治疗肝纤维化的过程中, 不仅需要长期服药, 而且会有较大经济负担, 因此, 有必要寻求一种更为安全有效、经济、无不良反应的治疗方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠 44 只, 体重 (200±20)g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2012-0001。在 2 级动物室 (北京中医药大学实验针灸动物室: 室温 22℃, 相对湿度 45%) 清洁条件下喂养。

1.1.2 药物 四氯化碳 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 生产批号: 20130326); 秋水仙碱 (国药集团化学试剂有限公司, 生产批号: 4415010150); 花生油 (鲁花集团有限公司, 生产批号: 691616861630)。

1.1.3 试剂与仪器 甲醛溶液 (分析纯, 北京鼎国

昌盛生物技术有限公司, 生产批号: 20130907); 磷酸氢二钠 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 生产批号: 20140310); 磷酸氢二钠 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 生产批号: 20140310); 10% 水合氯醛 (北京中医药大学生理教研室配制); 75% 酒精 (北京梦怡美商贸中心); 0.9% 氯化钠溶液 (江苏强生生物科技有限公司); 试剂盒: ALT、AST 生化试剂盒, 由北京中医药大学科研中心提供; 离心机 (3K18 Sigma); 全自动生化分析仪 (迈瑞 BS-220); Image-pro Plus 6 图像分析系统 (北京中医药大学科研中心提供); Anymicro DSSTM 图像采集系统 (北京中医药大学科研中心提供); 电子秤 (HOCKY AD05); 小号三棱针 (北京中研太和医药有限公司 2.0 mm×57 mm); 移液枪 (北京中医药大学针灸推拿机能实验室提供)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 分组与模型制备 采用随机数字表法将 44 只大鼠随机分为 2 组, 空白组 12 只, 模型组 32 只。参考王伟明<sup>[3]</sup>、周贤<sup>[4]</sup>的造模方法, 即在大鼠颈后皮下注射经过花生油稀释的 40% CCL<sub>4</sub>。使用该造模方法对 36 只大鼠造模。6 周后随机选取 2 只模型组大鼠, 2 只空白组大鼠进行肝脏病理切片观察, 以保证造模成功。最终纳入数据统计的是空白组 10 只, 模型组 30 只。然后将模型组大鼠随机分为模型对照组, 刺血干预组及秋水仙碱组, 每组 10 只。

1.2.2 干预方法 全部大鼠适应性喂养 1 周后, 空白组: 常规饲养, 0.9% 生理盐水皮下注射, 2 次/周, 至 12 周, 第 6 周后只抓取, 其他不做任何处理; 模型对照组: 皮下注射经过花生油稀释的 40% CCL<sub>4</sub> 6 周, 2 次/周, 第 6 周后只抓取, 不做其他处理, 至 12 周; 刺血干预组: 皮下注射经过花生油稀释的 40% CCL<sub>4</sub> 6 周, 2 次/周, 同时足三里、阳陵泉、太冲刺血, 出血量为 0.25~0.4 mL (换算公式为出血量 = 体重×7.4%×2%)<sup>[5-10]</sup>, 2 次/周, 至 12 周; 秋水仙碱组: 皮下注射经过花生油稀释的 40% CCL<sub>4</sub> 6 周, 2 次/周, 同时 220 μg/(kg·d) 标准给予秋水仙碱<sup>[11]</sup>, 5

次/周,至 12 周。

1.2.3 检测指标与方法 实验进行至第 12 周末,各组大鼠禁食不禁水 12 h,使用 10% 水合氯醛(3.5 mL/kg)进行腹腔注射麻醉后,固定于鼠板,开腹后于腹主动脉取血 5 mL,静置 2 h,在 4 ℃ 环境下,将离心机设置 3 000 r/min,离心 20 min,分离上层血清,移液枪转移血清至 EP 管,−80 ℃ 保存,待用于 ALT、AST、PCⅢ、CⅣ的检测;选取肝左叶距边缘约 0.5 cm 处取 1 cm×1 cm×0.5 cm 大小新鲜肝组织,投入 10% 中性甲醛溶液中固定,用石蜡包埋后切片,使用 MASSON 法染色。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计分析软件,数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组比较中,若各组方差齐且数据符合正态分布时用单因素方差分析检验,组间比较用 LSD 及 SNK 检验,方差不齐或非正态时用 Welch 检验或 Nemenyi 非参数检验;方差不齐时进行 2 组独立样本 *t* 检验,方差不齐时采用非参数检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠肝脏组织镜下形态学变化 Masson 染色可直接显示除各组大鼠肝组织的汇管区周围纤维增生的情况,可直观的判断除正常组之外的各组大鼠 HF 的程度和范围。根据以上 Masson 染色片可知,正常组大鼠的肝小叶结构完整,仅在汇管区周围有少许胶原纤维被染色;模型组大鼠肝小叶结构消失,汇管区周围纤维架桥形成,HF 明显,这就说明造模成功;与模型组比较,秋水仙碱对照组和刺血干预组大鼠的 HF 程度明显减轻,但比正常对照组的 HF 程度严重这说明 2 组的治疗均有效。见图 1。

2.2 刺络泻血疗法对各组大鼠肝功能 ALT、AST 的影响 造模结束后,与生理盐水对照组同时间比较,模型组的 AST、ALT 含量显著上升,差异有统计学意义(*P* < 0.05);与模型组同时间比较,刺血干预组 AST、ALT 含量显著降低(*P* < 0.05),秋水仙碱对照组 AST 含量降低(*P* > 0.05),而 ALT 含量显著降低(*P* < 0.05);刺血干预组与秋水仙碱对照组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

2.3 刺络泻血疗法对各组大鼠肝纤维化指标 PCⅢ、Ⅳ-C 的影响 造模结束后,与生理盐水对照组同时间比较,模型组的 PCⅢ、Ⅳ-C 含量显著上升,差异有统计学意义(*P* < 0.05);与模型组同时间比较,刺血干预组 PCⅢ、Ⅳ-C 含量显著降低(*P* < 0.05),秋水仙碱对照组 PCⅢ、Ⅳ-C 含量显著降低(*P* < 0.05)。但刺血干预组与秋水仙碱对照组比较,差异

无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 2。

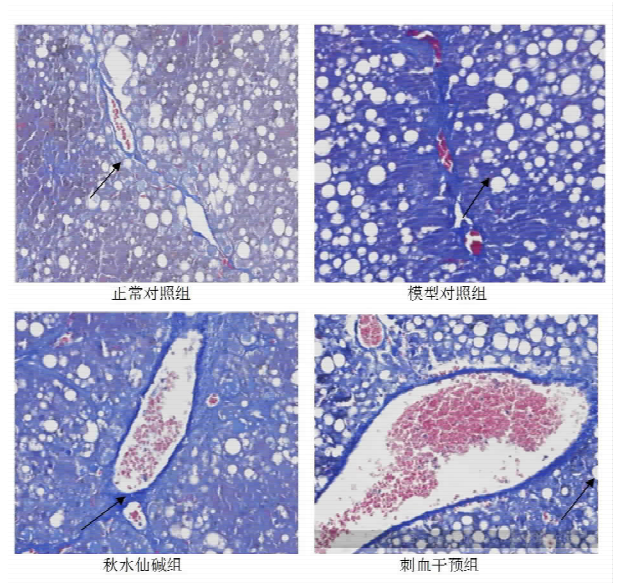


图 1 大鼠肝脏病理形态学改变 (Masson×400)

表 1 各组大鼠 AST、ALT 含量的比较( $\bar{x}\pm s$ ,U/mL,*n* = 10)

| 组别    | AST                     | ALT                     |
|-------|-------------------------|-------------------------|
| 空白对照组 | 16.15±3.38              | 20.59±6.08              |
| 模型对照组 | 29.92±5.42*             | 33.06±6.69*             |
| 刺血干预组 | 24.28±3.88 <sup>△</sup> | 27.35±5.3 <sup>△</sup>  |
| 秋水仙碱组 | 23.4±4.84               | 30.34±4.21 <sup>△</sup> |

注:与正常组同时时间点比较,\**P* < 0.05;与模型组同时时间点比较,<sup>△</sup>*P* < 0.05

表 2 各组大鼠 PCⅢ、Ⅳ-C 的比较( $\bar{x}\pm s$ ,U/mL,*n* = 10)

| 组别    | PCⅢ                      | PCⅣ                      |
|-------|--------------------------|--------------------------|
| 空白对照组 | 65.86±26.46              | 46.1±14.78               |
| 模型对照组 | 122.76±6.01*             | 97.15±25.15*             |
| 刺血干预组 | 82.67±28.57 <sup>△</sup> | 49.78±11.33 <sup>△</sup> |
| 秋水仙碱组 | 83.70±27.62 <sup>△</sup> | 48.46±15.74 <sup>△</sup> |

注:与正常组同时时间点比较,\**P* < 0.05;与模型组同时时间点比较,<sup>△</sup>*P* < 0.05

## 3 讨论

目前,国内外临床诊断 HF 的“金标准”是肝活检组织病理学检查,但是每次肝穿刺取出的肝组织体积仅占全部肝肝组织的 1/50 000,而肝纤维化在肝内发生的部位不同,因此一次肝穿刺具有偶然性不稳定性,并从而造成误诊因此强调肝活检时要有以下 2 个标准:首先,肝脏组织穿刺标本的直径至少要达到 15 mm;其次,肝脏组织穿刺取出的标本要包含 6 个以上的汇管区,且 Bedossa<sup>[12]</sup> 建议肝穿刺获得肝组织时要不应少于 25 mm。

本实验对不同组别的大鼠的 Masson 染色切片观察和分析得知,刺络泻血疗法有效地减轻了四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠模型的肝脏组织形态学改

变的程度。Masson 染色切片,模型对照组大鼠的肝脏组织学形态改变明显,已经形成了肝纤维化;模型对照组大鼠的肝小叶结构消失,并在汇管区周围形成纤维架桥。将刺络泻血组和秋水仙碱组与模型对照组的 Masson 染色切片比较可见,刺络泻血组和秋水仙碱组大鼠的肝脏病变程度明显减轻。秋水仙碱是目前治疗肝纤维化的有效药物之一,以此作为对照,可以间接证明刺络泻血疗法能够有效治疗肝纤维化。

**3.1 刺络泻血对 PCⅢ、CⅣ的影响** 本实验的研究结果表明,刺络泻血疗法可以有效降低 PCⅢ、CⅣ在肝脏组织中的表达,与模型组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。刺络泻血疗法能有效降低 CCL<sub>4</sub> 诱导肝纤维化大鼠 PCⅢ、CⅣ的含量,其效果与西药秋水仙碱作用相当,改善肝纤大鼠肝组织病理变化,减轻肝损伤。

**3.2 刺络泻血对肝功能指标 AST、ALT 的影响** AST、ALT 的血清活性是最常使用的反映肝细胞损伤的敏感指标。当肝细胞严重病变、坏死时,线粒体内释放出 AST;当肝细胞变性细胞膜变性、细胞膜通透性增加时,从细胞内逸出的主要是 ALT<sup>[13]</sup>;在本实验研究中,刺血干预组能够降低 AST、ALT 的含量,减轻肝损伤与秋水仙碱组比较虽无明显差异,但效果最优。

目前,肝纤维化的发病机制已经非常明确,即肝组织中大量沉积无法代谢的胶原纤维,导致肝细胞转变为纤维细胞。肝纤维化是各种慢性肝病以及病毒性肝炎和酒精性肝病等重大疾病向肝硬化甚至肝癌发展的必经阶段。目前,各种研究已经表明肝纤维化经过适当的治疗后是完全可以发生逆转。因此,抑制肝脏纤维化的发展,具有重大的现实意义。

近年来,西医的抗肝纤维化药物已达到细胞分子水平,也有的药物可以通过基因调控肝细胞内信息的表达,从而在一定程度上治疗肝纤维化。同时,中医药在抗纤维化的研究中发挥了重要的作用,大量的中药抗纤维化实验和临床研究为抗纤维化提供了宝贵的经验,显示出其独特的优越性。

现代医学研究表明刺络泻血疗法可调节血液循环,加快人体新陈代谢,可刺激骨髓的造血功能,增多循环血液中的红细胞数量,提升血液含氧量刺血疗法还可以通过神经体液调节,改善局部微循环,加快代谢排出血中毒害物质的能力,进而提高人体的免疫能力。现代研究表明<sup>[14]</sup>,刺络泻血疗法可以明显改善血管内血液的流变状态以及增强体内循环供

血的能力,可以调节人体的凝血系统和抗凝系统,进而起到调节人体内分泌系统的功能。国外研究发现<sup>[15]</sup>,在治疗遗传性血色沉着病时,运用刺络泻血疗法可以间接的改善患者的 HF 程度,因此,可以推断刺络泻血疗法可能是通过综合调整人体的供血功能以及内分泌功能从而达到有效治疗甚至逆转 HF 的功能。但是,根据目前的情况来看,我们仍旧需要加大对刺络泻血疗法的研究,以期进一步探明刺络泻血疗法治疗 HF 的内在机制以及对于 HF 不同程度的干预效果。只有更多的研究和更多的探索,才能进一步为临床治疗 HF 提供实验基础,为探索刺络泻血疗法对于 HF 的治疗机理具有重大意义。

#### 参考文献

- [1] 谷堂,任雪莲,逢凤坎,等. 抗己肝药物研究进展[C]. 第五届沈阳科学学术年会论文集,沈阳:沈阳市科协,2008,530.
- [2] 毛青. 抗丙型肝炎病毒新型药物研究进展[C]. 中华医学会病毒性肝炎慢性化重症化基础与临床研究进展学术会议论文集,重庆:中华医学会,2009,27.
- [3] 王伟明,畅洪昇,赵云,等. 肝纤维化大鼠模型病理变化与行为学相关研究[J]. 北京中医药大学学报,2012,35(12):814-815.
- [4] 周贤,刘翼,夏国栋,邵泽勇. 肝纤维化动物模型探讨[J]. 四川动物,2010,29(1):114.
- [5] 战慧敏. 刺络泻血对高脂血症模型大鼠血脂、脂代谢酶及 NO、ET-1 的影响[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [6] 谭丽. 刺络泻血对高尿酸血症模型大鼠血尿酸及相关酶活性的影响[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [7] 陈子晨. 刺络泻血对高脂血症大鼠动脉粥样硬化形成的干预作用[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [8] 谭丽,王宁,赵慧玲,等. 刺络泻血对高尿酸血症大鼠血尿酸及相关酶活性的影响[J]. 世界中医药,2017,12(3):631-635.
- [9] 战慧敏,赵慧玲,谭丽,等. 刺络泻血对高脂血症模型大鼠血脂、NO 及 ET-1 影响的研究[J]. 世界中医药,2017,12(5):1101-1104.
- [10] 陈子晨,赵慧玲,战慧敏,等. 刺络泻血疗法对高血黏度大鼠血清 ox-LDL 和 ox-LP(a) 的影响[J]. 中医药导报,2017,23(17):35-37,47.
- [11] 史萌萌,奚胜艳,王彦晖,等. 桃红四物汤对肝纤维化小鼠病理性血管生成相关因子 VEGF、KDR 与 Flt-1 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2016,31(2):487-491.
- [12] Bedossa P, Daregere D, Paradis V, Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis[J]. Hepatology, 2003, 38:1449-1457.
- [13] 王宝恩,张定凤. 现代肝脏病学[M]. 北京:科学出版社,2003:182-184.
- [14] Adams PC, Braton JC. How Itreathe mo chromatosi s[J]. Blood, 2010, 116(3):317-325.
- [15] Falize L, Guillygomare'h A. Reversibility of hepatic f ibrosis in treat ed genetich emochromatosi s: A study of 36 cases[J]. Hepatology, 2006, 44(2):472-477.