“以方测证”法探讨 CCl_4 慢性肝损伤中医病机的实验研究

Experiment observation of TCM pathogeneisis in treating CCl_4 chronic liver injury by *detecting disease by prescription* method

林 辉
（湖南中医药高等专科学校，湖南 株洲，412012）

中图分类号：R5752 文献标识码：A 文章编号：1674-7860（2011）21-0006-02 证型：IBD

【摘 要】 目的：探讨慢性肝损伤中医病机，为临床用药提供参考。方法：利用“以方测证”法，选取具有活血化瘀、补气、行气、清利湿热以及养阴作用的代表方剂对抗 CCl_4 对肝纤维化模型大鼠造成的慢性肝损伤，在第 8 周肝硬化形成以前检测血清 ALT、AST 以及肝组织 SOD、MDA 含量。结果：茵陈蒿汤、一贯煎及柴胡疏肝散显示出较好的抗慢性肝损伤作用。结论：肝硬化形成以前的慢性肝损伤中医病机可能为湿热、气滞以及阴虚为主。

【关键词】 慢性肝损伤；中医；研究

【Abstract】 Objective: Pathogenesis of chronic liver injury, as clinical drug reference. Methods: Using the "square test card" method, selection of blood circulation, qi, qi, clearing heat and nourishing yin and the role of the representatives of prescriptions against CCl4 rat model of liver fibrosis caused by chronic liver injury, in the first 8 weeks before liver cirrhosis serum ALT, AST and liver tissue SOD, MDA content. Results: tarragon soup, fried and CHSGS consistently show good resistance to chronic liver injury. Conclusion: liver cirrhosis, chronic liver injury before the TCM may be hot and humid, air stagnation and deficiency-based.

【Keywords】 Chronic liver injury; TCM; Research

慢性肝细损伤是诸多慢性肝病长期存在的共同病理表现，同时也是导致肝纤维化的重要始动因素。中医药在防治慢性肝病尤其肝纤维化方面具有较好疗效，为探讨慢性肝损伤引起的中医病机，为中医临床治疗提供证据，我们利用“以方测证”法，分别选取具有活血化瘀、补气、行气、清利湿热以及养阴作用的代表方剂对抗 CCl_4 对肝纤维化模型大鼠造成的慢性肝损伤，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 清洁级雄性大鼠 70 只，体重 220～240g，由湖南中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂

所有中药按照原方比例和制法由湖南中医药大学第一附属医院药剂科一次性制备干燥后冷藏。CCl_4 分析纯：淮南化学试剂总厂生产，批号：080304。门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒（批号 20100415）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）试剂盒（批号 20100410）、丙二醛（MDA）试剂盒（批号 20100309）、超氧化物歧化酶（SOD）（批号 20100322）试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 动物分组方法

大鼠随机分为七组，每组 10 只：①空白对照组；②血府逐瘀汤组；③茵陈蒿汤组；④一贯煎组；⑤黄芪汤组；⑥柴胡疏肝散组；⑦模型组。

1.4 肝纤维化慢性肝损伤模型制作方法

大鼠实验前适应性喂养 5d。参照文献[1]造模，空白对照组每只大鼠给予花生油 0.3 ml/100g 背部皮下注射。其余各组大鼠每只大鼠给予 CCl_4 混悬液（CCl_4:花生油= 1:1）0.3 ml/100g 背部皮下注射，首次 0.5 ml/100g 处理，每周 2 次，共 8 周。

1.5 给药方法

各组在实验开始第一天开始每只大鼠经体表面积换算后分别按正常人体剂量的 4 倍给予相应中药煎剂灌胃，空白对照组和模型组大鼠给与相同体积的蒸馏水灌胃。

1.6 样品的采集和处理检测方法

实验开始 8 周后处死大鼠并采集样品。大鼠用 2%戊巴比妥钠以 2ml/kg 体重剂量腹腔注射麻醉后，仰卧位固定，打开腹腔，经下腔静脉采血，所采血液 4℃静置 3h 后，3000rpm 离心 30min，分离血清，按照试剂盒的要求比色法检测血清门冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）的含量。取肝左叶固定，常规石蜡切片，HE 染色，普通光镜观察。将肝组织切碎，冰浴下匀浆，3600rpm 离心 5min，按试剂盒要求检测丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）的含量。

1.7 统计方法计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组之间的两两比较采用 t 检验，方差不齐采用 T 检验，应用 SPSS12.0 统计软件包进行统计学处理，以 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结 果

实验过程中，模型组、血府逐瘀汤组大鼠各死亡 2 只，黄芪汤组死亡 1 只，其余各组大鼠无死亡。

2.1 肝损伤血清指标结果

结果显示模型组及各中药组与空白组相比 AST、ALT 显著升高；各中药组中以茵陈蒿汤组效果最好，其次是一贯煎组与柴胡疏肝散组，一贯煎组与柴胡疏肝散组比较无差异；血府逐瘀汤与黄芪汤组与模型组相比无差异。见表 1。

表 1 肝损伤血清指标结果

组别	*n*	AST（U/L）	ALT（U/L）
空白组	10	28.2±1.4	36.6±2.6
血府逐瘀汤组	8	476.7±21.4#	511.4±22.1#
茵陈蒿汤组	10	184.8±17.6#△	310.5±24.7#△
一贯煎组	10	240.8±28.7#△※	387.5±33.2#△※
黄芪汤组	9	473.1±15.5	523.5±14.6
柴胡疏肝散组	10	259.3±23.9#△※	396.1±23.6#△※
模型组	8	486.3±13.5#	518.7±18.4#

注：#与空白组相比 $P<0.05$；△与模型组相比 $P<0.05$；※与茵陈蒿汤组相比 $P<0.05$。

2.2 肝组织丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）结果

结果显示模型组及各中药组与空白组相比 SOD 显著降低、MDA 显著升高；各中药组中以茵陈蒿汤组效果最好，其次是一贯煎组与柴胡疏肝散组，一贯煎组与柴胡疏肝散组比较无差异；血府逐瘀汤与黄芪汤组与模型组相比无差异。见表 2。

表 2 肝组织 MDA、SOD 结果

组别	*n*	MDA(μmol/g)	SOD(U/mg)
空白组	10	8.31±1.4	28.5±1.6
血府逐瘀汤组	8	29.5±2.8#	10.7±1.3#
茵陈蒿汤组	10	12.8±1.6#△	26.7±2.1#△
一贯煎组	10	15.3±2.7#△※	22.6±2.7#△※
黄芪汤组	9	27.3±1.8#	13.5±2.6#
柴胡疏肝散组	10	19.3±1.5#△※	22.1±1.7#△※
模型组	8	28.7±2.2#	11.3±1.1#

注：#与空白组相比 $P<0.05$；△与模型组相比 $P<0.05$；※与茵陈蒿汤组相比 $P<0.05$。

2.3 肝组织病理学检查结果

空白组肝细胞索排列整齐，肝细胞无水肿，间质无炎细胞浸润，无纤维组织增生。茵陈蒿汤组、一贯煎组、柴胡疏肝散组中央静脉窦周有少量、局限的纤维，汇管区扩大无隔，纤维间隔细；模型组、黄芪汤组及血府逐瘀汤组中央静脉窦周纤维大量弥漫分布，汇管区扩大有隔，纤维间隔疏松，较宽。

3 讨 论

CCl_4 肝纤维化模型被广泛应用于各种抗肝纤维化药物的筛选和评价。研究表明 CCl_4 被肝细胞吸收后，在肝细胞内经微粒体细胞色素氧化酶 P450 代谢生成大量的自由基，攻击肝细胞，使肝细胞发生凋亡或坏死，坏死的细胞碎片吸引炎症细胞浸润。这些炎性细胞释放各种细胞因子（如 $TGF\beta_1$、PDGF 等）使肝血窦内的储脂细胞肝星状细胞（HSC）增殖活化，分泌大量的胶原纤维，细胞外基质（ECM）的合成大于降解，形成肝纤维化。[2]本研究采用经典的 CCl_4 肝纤维化模型，一般全程造模 12 周，可以形成典型的肝硬化，主要病理标志为假小叶的形成。在造模第 8 周，模型组已经出现纤维化，同时出现了肝损伤的标志物 ALT 和 AST 的升高，SOD 的下降与 MDA 的升高，说明造模引起的慢性肝损伤是成功的。其他中药组结果表明茵陈蒿汤、一贯煎与柴胡疏肝散在第 8 周前能够对抗 CCl_4 引起的肝损伤，其机制可能与提高 SOD 活性，清除自由基，抑制自由基引发的脂质过氧化反应有关，而黄芪汤与血府逐瘀汤未表现出明显的的抗 CCl_4 肝损伤作用。

长期以来在筛选和评价抗肝纤维化中医药研究中，多注重对肝纤维化全程的干预结果。临床上肝纤维化是一个相当漫长的过程，在此过程中，肝细胞的凋亡、坏死与 HSC 的活化、ECM 的合成增多三者并存是慢性肝损伤向肝纤维化发展的主要病理因素。以上三大病理机制虽然长时间并存，但在不同时期的作用有所侧重，进入肝硬化阶段后，假小叶的形成，肝内正常结构的改变，肝脏微循环的瘀血，肝细胞的缺血缺氧等亦成为促进肝纤维化进展的重要因素，作用于以上任何一个环节都可能具有减轻肝纤维化的作用[3]。目前还未发现有能够应用于肝纤维化全过程的抗肝纤维化方剂与药物，提醒我们中医辨证在抗肝纤维化治疗中仍是值得重视的。

肝纤维化、肝硬化在发展的不同阶段根据其临床表现通常被认为属于中医“黄疸”、“胁痛”、“积聚”、“癥瘕”以及“鼓胀”的范畴，进入肝硬化阶段后治疗上多从瘀血入手，具有活血化瘀作用的鳖甲煎丸被认为是有效的治疗方剂。对于肝硬化形成以前的中医病机由于症状的不明显或多样化在认识上分歧较大。本研究显示的茵陈蒿汤、一贯煎以及柴胡疏肝散的有效抗 CCl_4 肝损伤作用，从“以方测证”的角度提示在肝硬化假小叶形成以前，可能存在的中医病机为湿热、气滞以及阴虚，而黄芪汤与血府逐瘀汤未显示出明显的抗肝损伤作用，提示气虚与瘀血的病机可能性较小。以上结果为肝纤维化过程中“无证可辨”阶段的中医临床用药提供了一定参考。

参考文献：

[1]陈刚,李宏波,邱少敏.CCl_4 皮下注射制备大鼠肝纤维化模型的研究[J].现代医学,2010,38(3):225-229

[2]Issa R, Zhou XY, Christothea M. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking[J].Gastroenterology,2004,126(7):1795-1808

[3]程明亮,杨长青.肝纤维化的基础研究及临床[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,2002:20

编号：EA-11080317（修回：2011-10-26）