

• 实验研究 •

中药活血化瘀片对于实验性肝损伤的效果研究*

北京友谊医院 查良镒

内容提要 应用活血化瘀片对大白鼠的实验性肝损伤进行了研究, 以死亡率、体重变化、肝/体重和脾/体重比值、 ^{14}C 氨基比林呼吸试验、肝脏蛋白结合羟脯氨酸和病理检查作为对比指标。实验结果显示: 活血化瘀片无毒性作用, 可使正常大白鼠肝脏蛋白结合羟脯氨酸减少, 在减少病死率和减轻肝硬变的形成上, 有一定的保护作用。

我国已有不少报道^(1,2) 说明活血化瘀片对于改善肝功能、改进患者的症状及降低病死率等方面有一定疗效。我们应用活血化瘀片(简称 QT, 北京友谊医院药厂产品), 观察其对四氯化碳致成的实验性肝损伤的影响。现将初步结果报告如下。

材料与方 法

用雌性大白鼠(Sprague-Dawley)分两批进行, 第一批42只, 第二批65只, 实验开始时体重100~150g, 第一、二批实验方法完全相同。

一、分组: 共分4组, A、B、C组各32只, D组11只。

A组每日按临床剂量的15~20倍即每100g体重给QT0.1g, QT成分为海藻、败酱草、车前子、当归、川芎、丹参、红花、香附、赤芍、桃仁等, 主要作用为活血、散瘀、消炎。每片剂量0.5g, 用时将QT溶于水稍加煮沸后冷却, 以QT液代替饮水, 为唯一之饮用水源。共给药8周(第二批实验给药10周)。

B组用0.5g/L的苯巴比妥钠为饮用水, 同时用McLean法以 CCl_4 造成肝损伤, 其法为将大白鼠置于21L容积的透明塑料盒中, 用压缩空气于室温20°C、以1L/min的速度, 通过盛有 CCl_4 的玻璃瓶, 将 CCl_4 蒸汽吹入塑料盒内, 至一定压力后, CCl_4 蒸汽由顶盖接缝处自然溢出。大白鼠第一次吸入 CCl_4 为4分钟(CCl_4 蒸汽吹入2分钟, 停止吹入 CCl_4 后, 大鼠继续留在塑料盒内2分钟), 第2、3次为6分钟, 第4次以后为10分钟(即 CCl_4 蒸汽吹入5分钟, 大白鼠继续在盒内停5分钟)。每周蒸汽2~3次, 共8周(第二批实验为10周)。

C组除接受苯巴比妥钠、四氯化碳蒸汽同B组外, 同时饲以QT, 剂量同A组。

D组11只大白鼠为正常空白对照组。

所有动物均于第8周末宰杀(第二批实验于第10周末宰杀)。

二、 ^{14}C 氨基比林呼吸试验: 全部大白鼠于宰杀前进行了 ^{14}C 标记的氨基比林呼吸试验, 其中第二批65只在试验开始前及宰杀前各测一次。本试验用Lauterberg和Bircher法⁽³⁾, 经Mitchell⁽⁴⁾加以改良。大白鼠于试验前禁食12小时, 腹腔内注射 $1\mu\text{Ci}^{14}\text{C}$ 氨基比林后, 置于密闭的特制塑料筒内, 全部呼出 CO_2 经负压吸引至10ml甲醛/乙醛ethanolamine(2:1)液中。由腹腔注药后45分钟开始, 每15分钟收集全部呼出 CO_2 通过的标本, 加入二甲醛后在闪烁计数器上测其放射性, 直至165分钟共8个标本, 再查表与标准放射性标本比较, 算出排除速度常数 K_{el} 。

三、体重、肝脾重量变化: 每周测大鼠体重一次, 宰杀时, 将肝脏及脾脏剥离干净, 称量并计算出肝/体重比及脾/体重比, 切片作病理检查。精确称量1g之肝脏, 置3ml双蒸水中, 立刻液氮降温, 再置于-70°C低温冰箱内, 以备测定蛋白结合的羟脯氨酸之用。

四、肝脏蛋白结合羟脯氨酸(Hepatic Protein-bound hydroxyproline)测定: 将存于3ml双蒸水内之肝组织, 用Potte-Elvehjezin搅拌器搅成肝脏匀浆, 加入9ml纯冷乙醇以沉淀蛋白, 沉淀后离心并用5%三氯醋酸清洗两次, 再用等量盐酸水解蛋白, 再于104°C 15磅/ M^2 压力下密闭放置14小时, 用酚酞为指示剂以NaOH中和至其颜色呈粉红色为终点。

蛋白结合羟脯氨酸测定用Rojkind和Gonzalez⁽⁵⁾法进行, 将羟脯氨酸分离, 用Waennek法测定^(6,7)。

本文系作者在美国约翰·霍普金斯大学医学院完成 参加者有 Hurlong HF, Mezey ES, Boitnott JK, Weinberg AB, Maddrey WC

结 果

一、各组大白鼠死亡情况: A组 (QT) 及D组 (正常对照) 的大白鼠皆存活。B组 32 只大白鼠中死亡 9 只 (28.13%), C组 32 只死亡 1 只 (3.13%), B组及C组死亡率相比有显著差异, $P < 0.01$ 。

二、 ^{14}C 氨基比林呼吸试验: 第一批 35 只大白鼠于宰杀前作 ^{14}C 氨基比林呼吸试验。结果: A组 12 只其 Kel 值为 11.14 ± 0.29 ($M \pm SE \times 10^{-3}$, 下同), B、C 组动物数各为 11、12 只, 其 Kel 值分别为 13.69 ± 0.47 和 12.46 ± 0.46 。第二批动物分别于试验前及宰杀前进行测定, 结果见表 1。

表 1 第二批各组 ^{14}C 氨基比林呼吸试验结果

组 别	测定时间	动物数 (只)	Kel 值 $M \pm SE (\times 10^{-3})$
A	试验前	20	10.93 ± 0.28
	宰杀前	19	8.25 ± 0.25
B	试验前	14	10.54 ± 0.54
	宰杀前	10	11.49 ± 0.48
C	试验前	20	10.53 ± 0.39
	宰杀前	19	11.11 ± 0.40
D	试验前	11	11.64 ± 0.27
	宰杀前	10	8.23 ± 0.44

第二批试验前, 大白鼠平均体重为 150g, 宰杀前平均体重为 250g, 试验前各组 ^{14}C 氨基比林呼吸试验结果皆无明显差异。A 组与 D 组相同, 随着动物体重的增长, Kel 值减低, 但 B 组及 C 组则无此变化, B 组 Kel 值较 C 组为高, 但无统计学差异。

三、关于每周体重的增长变化: A、C、D 组体重增长曲线大致相同, 开始时增长的速度快, 而 B 组开始时体重增加缓慢, 第 9 周后又剧增, 与部分大白鼠出现腹水有关, 表现出 CCl_4 及苯巴比妥钠的毒性作用, 而 C 组则无类似的体重大降大升现象, 可能与 QT 对于动物的保护作用有关。

四、肝脾与体重比: 结果见表 2。

五、肝脏蛋白结合羟脯氨酸测定与病理观察: 4 组动物随机各选择 8 只的肝脏, 进行肝脏蛋白结合羟脯氨酸测定, 结果见表 3。

病理检查见 A 组服用 QT 的大白鼠肝脏完全正常, 未发现任何病变。B 组与 C 组的动物肝脏皆有病灶, 包括局灶性坏死、纤维化、不同程度的脂肪变性与脱水和肝小叶中心变性。脂肪变与脱水变性的程度, B 组与 C 组未见明显差异。但 B 组 28 只中, 在组织学上构成肝

表 2 各组肝/体重、脾/体重比较

组别	动物数 (只)	肝/体重 $M \pm SE (\times 10^{-2})$	脾/体重 $M \pm SE (\times 10^{-2})$
A	32	$2.89 \pm 0.07^*$	$0.24 \pm 0.004^{***}$
B	30	$4.29 \pm 0.18^{**}$	$0.29 \pm 0.03^{**}$
C	31	3.73 ± 0.07	0.21 ± 0.004
D	11	2.74 ± 0.10	0.20 ± 0.01

* A 组与 B 组比较, $P < 0.01$

** B 组与 C 组比较, $P < 0.01$

*** A 组与 C 组比较, 无明显差别

表 3 肝脏蛋白结合羟脯氨酸测定结果 ($M \pm SE$)

组别	$\mu\text{moles/g}$ 肝脏	$\mu\text{moles/100g}$ 体重	$\mu\text{moles/全肝脏}$
A ⁰	0.55 ± 0.115	1.51 ± 0.31	3.47 ± 0.67
B	1.08 ± 0.13	4.21 ± 0.68	$9.58 \pm 1.54^{**}$
C	$1.40 \pm 0.13^*$	$5.50 \pm 0.52^{***}$	$13.04 \pm 1.89\Delta$
D	0.93 ± 0.11	2.51 ± 0.31	5.71 ± 0.70

* 与 A 组比, $P < 0.02$

** 与 A 组比, $P < 0.05$

*** 与 A 组比, $P < 0.01$

Δ 与 A 组比, $P < 0.001$

• A 组各项与 D 组比, P 值均 < 0.05

硬变者 9 只, C 组 30 只中仅 1 只, 经统计学处理, 应用 Chi 平方试验 (Chi Square Test), 两组间有显著差异, $P < 0.05$ 。

讨 论

本实验过程中, A 组和 D 组所有大白鼠皆健康活泼, 体重增长正常, 各项指标包括病理检查皆正常。B 组 32 只动物中, 先后有 9 只死亡, 第二批有 2 只于宰杀前垂危, 未计算在死亡数内。本组动物多数有神志萎靡, 倦卧少动, 披毛蓬乱耸立、腹胀、进食少, 死亡率为 28.13%。C 组除加用 QT 外, 其余条件与 B 组全同, 死亡 1 只 (3.13%), 一般情况也较 B 组好, 仅在吸入 CCl_4 当天及次日有抑制少动, 但很快即恢复。B、C 两组的总死亡率经过统计学处理有显著差异, 说明 QT 对 CCl_4 及苯巴比妥钠所致的实验性肝损伤有保护作用。

B 组与 C 组体重变化比较, 应用 QT 后可减轻由于 CCl_4 与苯巴比妥钠致成的肝损伤影响的体重下降。各组每周平均体重增长曲线显示, A、C、D 组的体重增长大致相同, 即随着鼠龄的增长体重增加渐减。B 组体重变化为大降大升, 可能是开始阶段因 CCl_4 中毒食欲下降, 以后体重增加与部分动物腹水增长有关, 而

C组则无此现象,说明QT对大白鼠有保护作用。

由肝/体重比值与脾/体重比值的结果可以看出,B组肝/体重比值增加,即肝脏重量增加。C组喂QT后其值减少,两组相比有显著差异。A、D组之比值接近,A组的平均比值虽稍高,但无统计差异。

脾/体重比值A、C、D组之结果近似,无明显差异。但B组结果明显增加,说明经过CCl₄与苯巴比妥钠作用后,大白鼠网织内皮系统增生增重。此外,肝硬变门脉高压致成脾大亦可能是脾脏增重的因素之一。C组的比值明显小于B组($P < 0.01$),说明QT有保护网织内皮系统的作用,使肝、脾的肿胀肿大得以减轻。

关于¹⁴C氨基比林呼吸试验,第一批动物宰杀前的检查结果以A组对氨基比林的清除率最慢,B组快而C组介于其间。第二批动物两次试验结果,表明B组与C组间无统计学差异,说明QT的作用机制与细胞色素P₄₅₀酶系统无关。

肝脏蛋白结合羟脯氨酸测定结果表明,A组与D组比较,在每克、每100克体重以及整个肝脏的蛋白结合羟脯氨酸含量,都有显著差异($P < 0.05$),QT对于正常动物降低其肝内蛋白结合羟脯氨酸的作用,可能与其抑制肝内纤维素的合成或增加其降解速度有关。但由B、C两组结果来看,QT并未能减低CCl₄所致成的肝内蛋白结合羟脯氨酸含量的增加。这可能与取样有关,虽然各组都是在存活动物宰杀时取样,但未包括已死亡的动物。而B、C两组死亡动物各为9、1只,其肝蛋白结合羟脯氨酸含量可能很高,影响其对比。此外可能与本试验用QT的疗程只稍多于2个月,尚未能将已增高的羟脯氨酸含量恢复至正常有关。

QT保护肝脏的作用机制如何目前尚不明确,从本文工作看,QT的主要作用机制可能是活血化瘀增加了肝内微循环,使肝内循环血量增加,肝内纤维素的降解作用有所加强,而使正常大白鼠肝内羟脯氨酸的含量减少,但还不能在短期内抵挡CCl₄及苯巴比妥钠的强有力的纤维化作用。QT降低羟脯氨酸含量作用

并不意味着QT含有纤溶酶,因为这种酶极易在消化道内破坏,可能是由于QT动员了肝脏的内生性纤溶酶系统的结果。

由病理检查结果来看,A组给予临床剂量15~20倍的QT,肝脏无任何病理变化,说明QT是无毒性的。在接受CCl₄与苯巴比妥钠的B、C组,肝脏皆有不同程度的病变,包括肝细胞的弥漫性损害。胞浆疏松、染色不均匀、脂肪变性与脱水等。

组织学上有明显肝硬变改变的动物数,B组第一批为6/14(43%),第二批为3/14(21%),而C组仅第一批1只出现上述改变。B、C组间有明显的统计学差异。

以上结果说明QT对于CCl₄及苯巴比妥钠所致大鼠的肝损伤有保护性作用,不只是在减低死亡率方面,对于肝硬变的形成上亦有保护作用。

参 考 文 献

1. 山西省中医研究所肝病研究组. 强肝汤(丸)治疗慢性肝炎的实验研究与临床观察. 新医药学杂志 1972; 1: 7.
2. 姚光弼, 等. 肝硬化研究的若干进展(二). 国外医学参考资料(内科学分册) 1976; 12: 529.
3. Lauterbergi B, et al. Expiratory measurement of maximal aminopyrine demethylation in vivo: effect of phenobarbital partial hepatectomy portacaval shunt and bile duct ligation in the rat. J Pharm Exp Ther 1976; 196: 501.
4. Mitchell M, et al. Chronic ethanol feeding in vivo and in vitro. In: Induction of cytochromes. Philadelphia: 1979: 448—450.
5. Rojkind J, et al. Collagen biosynthesis in cirrhotic rat liver slices (in vitro). J Clin Invest 1973; 52: 2451.
6. Rojkind J, et al. Collagen biosynthesis in cirrhotic rat liver slices. Anal Biochemistry 1974; 57: 1.
7. Perez-Tamayo, Rojkind, M. Molecular pathology volume 3 in the biochemistry of disease. Marcel Dekker Inc 1973.

征稿消息

中国中西医结合研究会第二届全国活血化瘀研究学术会议将于1986年11月间召开。会议主要内容为交流活血化瘀研究进展,讨论研究方法,修订血瘀证诊断标准。论文征集截稿时间为1986年5月底。凡未公

开发表及未在全国性学术会议上交流的有关活血化瘀学术论文(不包括综述),及一千字左右摘要,一式两份,均可于此期间投送各所在分会。由各分会集中选送到中国中西医结合研究会活血化瘀专业委员会,地址:北京西苑医院内。收稿人:翁维良。

(本刊讯)

Treatment of Experimental Liver Injury with Chinese Herbal Medicine Queen Tablet

Cha Liangyi (查良懿), *HF Herlong, *ES Mezey, et al

Beijing Friendship Hospital, Beijing, China; *Johns Hopkins Hospital, U.S.A

The effect of herbal mixture Queen Tablet (QT) on the liver injury by carbon tetrachloride in the rat was evaluated. Liver injury was induced in female Sprague Dawley rats (initial weight 120 ~ 140 g) by a combination of oral phenobarbital (0.5 g/L in the only drinking water provided) and CCl_4 inhalation. Animals received CCl_4 2 ~ 3 times a week for 8 weeks and a closed chamber for periods ranging between 2 and 10 minutes. The animals were divided into 4 groups. Group A: QT only, Group B: CCl_4 plus phenobarbital, Group C: CCl_4 plus phenobarbital plus QT, Group D: normal control. For a measure of demethylation by the P_{450} enzyme system, the Kel was measured initially and just before sacrificed. Protein bound hydroxyproline was measured in the livers at sacrifice by the method of Rojkind and Gonzalez.

The deaths of Group A, B, C and D: 0/32, 9/32, 1/32 and 0/11. The liver weight/body weight: 2.89%, 4.29%, 3.73% and 2.74%. The hepatic protein bound hydroxyproline: 3.47 ± 0.7 , 9.58 ± 1.5 , 13.0 ± 1.9 and 5.71 ± 0.7 (μmol). The aminopyrine Kel ($\times 10^{-3}$) initially: 10.93 ± 0.28 , 10.54 ± 0.54 , 10.53 ± 0.39 and 11.64 ± 0.27 ; finally: 8.25 ± 0.25 , 11.49 ± 0.48 , 11.11 ± 0.40 and 8.23 ± 0.44 . Histology % cirrhotic: 0, 9/28, 1/32 and 0.

These data suggest that QT is effective in reducing the liver injury by carbon tetrachloride and phenobarbital. There was a significant reduction in mortality and in the ratio of liver weight to body weight. Histologic cirrhosis was diminished in the Group receiving QT compared to those receiving only carbon tetrachloride and phenobarbital. The effect seems to be independent of the P_{450} enzyme system as QT did not appear to effect demethylation by this enzyme system in the presence of carbon tetrachloride and phenobarbital.

(Original article on page 36)

Experimental Studies on Mechanism of Anti-Platelet Aggregation Action of Motherwort

Chang Chenfu (张陈福), *Li Chengzhu (李承珠), et al

Department of Pathophysiology, Shanghai College of TCM; *Shanghai Medical University, Shanghai

Seventeen ICR mice of either sex weighing 22 ~ 28 g were used for investigating the effect of motherwort (MW) on cAMP and cGMP concentration of platelets. The animals received 0.05 ml/100 g body weight of MW preparation via tail vein (contains crude drug 2g/ml). Control animals received same dose of normal saline. Studies on cAMP and cGMP concentrations of platelets were done to PRP, obtained from blood drawn via internal carotid artery thirty minutes after drug administration. An experiment was also designed for detecting the effect of MW on PGI_2 level of vessel wall. 0.5 ml/100 g body weight of MW or normal saline were introduced into jugular vein of male Sprague-Dawley rats weighing 250 ~ 300 g under 3% sodium pentothal anesthesia. Five minutes later, a fragment of carotid artery 1 mm in length was resected and preserved in ice water after washing. Still 5 minutes later, platelet aggregation test induced by ADP was done to the PRP isolated from aortic blood to which MW or normal saline was then added.

Experimental data reveal that MW can cause a significant increase of platelet cAMP concentration ($P < 0.01$ as compared with controls) and also inhibit platelet aggregation but has no influence on the PGI_2 level of the vessel wall. The results suggest that MW may possess a β -adrenergic pharmacologic action that raises the cAMP concentration of platelets through the inhibitory action of phosphodiesterase.

(Original article on page 39)

Experimental Study of *Rheum Officinale* Baill in Treating Severe Hepatitis and Hepatic Coma

Hu Linhua (胡林华), et al

Shanghai Meisan Metallurgical Company Hospital, Nanjing

Experimental study of *Rheum officinale* Baill in treating 32 rabbits with toxic hepatitis showed that mortality of rabbits became lower and pathologic changes in the liver became less severe. In the period of 1983 ~ 1984, 11 patients with severe hepatitis were treated with *Rheum officinale* Baill enema combined with other methods. 4 of the patients died (36.3%). However, 17 of 22 severe cases treated with the same methods without using *Rheum officinale* Baill before 1982 were dead (77.3%). Moreover, 11 of 12 attacks of hepatic coma in 7 cases with advanced hepatic cirrhosis had been brought back to consciousness by using *Rheum officinale* Baill and other methods.

(Original article on page 41)