

益气活血合剂抗牛血清白蛋白免疫性肝纤维化作用的实验研究

湖北中医学附属医院(武汉 430061)

方步武 朱起贵 竺稽能 吴贺算 傅其黎

内容提要 44只Wistar雌性大白鼠随机分为正常对照、病理对照、益气活血、养阴活血4组,于攻击注射4次后,益气活血和养阴活血组各以300%的益气活血和养阴活血合剂灌胃40天。结果益气活血合剂有改善肝组织病理、降低肝胶原蛋白含量、提高红细胞清除免疫复合物功能及调整体液免疫反应作用。

关键词 牛血清白蛋白 肝纤维变性 益气活血

肝纤维化贯穿于慢性肝病的发病过程中,结局是肝硬化。迄今为止防治肝纤维化药物的实验研究多用化学药品中毒所致慢性肝损伤模型,这与大多数慢性肝病肝纤维化的发生机制不同,临床难以重复其效果。本实验在首创用牛血清白蛋白复制免疫性肝纤维化模型上,主要观察了益气活血中药合剂抗肝纤维化效果,从肝组织胶原蛋白含量测定和肝组织病理形态学改变来评定肝纤维化的形成及中药防治效果,并探讨了其作用机理,试图为临床防治有免疫复合物病理机制参与的慢性肝病(如乙型肝炎、丙型肝炎)的肝纤维化的立法用药提供参考依据。

材料与方法

一、材料

1.动物 Wistar雌性大白鼠44只,年龄80天,每只体重130g左右,购于湖北省医学科学院。提供补体的昆明种小鼠年龄70天,购于湖北省医药工业研究所。

2.饲料 大鼠标准块料,湖北省医药工业研究所提供。

3.主要试剂 (1)牛血清白蛋白(BSA):电泳纯,中国科学院新疆物理化学研究所生化试剂厂,批号890412。(2)弗氏不完全佐剂:羊毛脂50g(化学纯)、液体石蜡100ml(化学纯),加热至70℃混匀即得,高压灭菌,4℃保存备用。(3)酵母菌:普通食用酵母菌,同济医科大学微生物教研室提供,批号910321。(4)L-羟脯氨酸:生化试剂,介于2~3级之间,中国科学院上海生物化学研究所,批号800631。

4.药物 300%(即3g生药/ml)的中药合剂,湖北中医学院附属医院中药剂型改革研究室生产,批号

为910312。各组成药由中药房提供,分两类治法方药如下:(1)益气活血行气解毒合剂(简称益气活血):黄芪15g 党参10g 当归10g 川芎10g 玄胡10g 白花蛇舌草20g等。(2)养阴活血、凉血解毒合剂(简称养阴活血):生地10g 枸杞15g 赤芍10g 丹参15g 丹皮10g 虎杖10g等。

二、方法

1.分组方法 44只大鼠随机取6只为正常对照组(简称正常组),其余以18mg/ml BSA生理盐水溶液的不同浓度稀释液攻击注射2周后剩余32只,按体重随机分为3组:病理对照组(病理组)、益气活血组、养阴活血组各11、10、11只,于后3组中随机处死5只检查,益气活血及养阴活血组各1只大鼠因灌胃导致死亡,病理组1只大鼠中途取肝组织过多致肝出血死亡。实验结束时按正常、病理、益气活血、养阴活血4组顺序各有大鼠6、9、6、9只。

2.模型复制 除外正常对照大鼠,余均以9mg/ml BSA弗氏不完全佐剂混悬液每次0.5ml/只,小剂量多部位皮下注射5次以致敏动物。第1、2次间隔2周,其余间隔1周。末次致敏注射后1周,球后静脉丛采血测大鼠血清中抗BSA抗体。取抗体阳性者尾静脉攻击注射18mg/ml BSA生理盐水溶液的不同浓度的稀释液,每周2次,剂量每次2mg(0.4ml)/只递增至每次3mg(0.4ml)/只,第12次3.4mg(0.4ml)/只,以后每次增0.2mg至最大量4mg(0.4ml)/只,共15次。末次攻击注射后第3天处死全部动物,观察期95天。正常大鼠以等量生理盐水代替BSA注射。

3.各组处理方法 (1)中药治疗组:益气活血、养阴活血组各以300%的益气活血和养阴活血中药合剂,每日每次2ml/200g体重,于攻击注射4次后开始

灌胃给药至实验结束。(2)病理组与正常组,均与中药组同时以洁净水灌胃。

上述各组均饲以足量大鼠块料,自由进自来水。

3. 检测方法 (1)血清中抗BSA抗体:于第5次致敏注射后1周检测,用琼脂双向扩散法。(2)红细胞C_{3b}受体(RBC-C_{3b}-R)花环率及红细胞免疫复合物(RBC-IC)花环率测定:于攻击注射15次后1天进行,按郭峰方法^[1]。(3)肝胶原蛋白定量分析:于实验结束时进行,参照Bergman法^[2]。(4)肝脾重量:处死动物取材后立即称取。(5)光镜观察:取新鲜肝组织,10%甲醛固定,石蜡包埋切片,HE及Masson

结缔组织三合染色,普通光镜观察肝细胞、组织结构纤维组织增生情况、炎症反应。

结 果

一、大鼠死亡情况 病理组11只中死亡2只,其余3组均无自然死亡。

二、大鼠血清抗BSA抗体测定结果 扩散10h,经BSA免疫大鼠各抗原浓度均出现沉淀线,正常组均无沉淀线出现。

三、大鼠脾重量、红细胞免疫功能及肝胶原蛋白含量测定结果 见表1。

表1 中药对肝纤维化大鼠脾重、红细胞免疫功能和肝胶原蛋白含量影响 ($\bar{x} \pm S$)

组 别	鼠数	脾 重 量 (g)	鼠数	红 细 胞 免 疫		鼠数	肝胶原蛋白 (mg/g肝)
				RBC-C _{3b} -R 花率环 (%)	RBC-IC 花环率 (%)		
正 常	6	0.78±0.12	6	10.33±3.50	1.83±1.17	6	6.43±1.11
病 理	8	1.34±0.16*	8	2.50±1.07**	8.63±3.89**	9	23.38±15.31*
益气活血	6	1.10±0.21	6	8.00±5.40△	4.50±3.32△	6	10.10±6.06△
养阴活血	9	1.57±0.44**	8	7.75±5.39△	6.13±3.30△	9	16.06±7.47

注:与正常组比* $P<0.05$,** $P<0.05$;与病理组比△ $P<0.05$

四、肝组织病理学观察 见表2。

表2 中药抗大鼠肝纤维化光镜观察结果

组 别	动物数 (只)	肝纤维化程度(例)				积 分 ($\bar{x} \pm S$)
		0分	1分	2分	3分	
正 常	6	6	0	0	0	0
病 理	9	1	5	1	2	1.4±1.01*
益气活血	6	4	1	1	0	0.5±0.83△
养阴活血	9	2	5	2	0	1.0±0.71

*与正常组比较 $P<0.01$;△与病理组比较 $P<0.01$

肝纤维化程度的观察指标按全美肝硬化分类和命名法^[3],分成-、+、++、+++4级,分别给予0、1、2、3分。“-”汇管区无明显纤维组织;“+”汇管区有较多纤维组织增生,局限性;“++”汇管区有大量纤维组织增生,呈窄带状,并向肝小叶周围伸展;“+++”汇管区有大量纤维组织增生,呈宽带状,并伸展包绕肝小叶,且见中央静脉偏位现象。

病理组:光镜下大多数鼠肝汇管区及小叶间结缔组织增生,进一步伸入并分割肝小叶,肝小叶结构紊乱,形成假小叶,可见残存肝细胞团,增生的纤维组织中有许多炎性细胞浸润,肝细胞不同程度增生。于增生的纤维组织附近,可见界板肝细胞核固缩、碎裂、溶解,炎性细胞侵入血窦,窦隙增宽,肝窦淤血,附近肝细胞坏死。养阴活血组:部分鼠肝汇管区纤维组

织增生,向小叶内伸展,但较病理组纤维隔薄,向小叶内伸展浅,增生的纤维组织内有较多炎性细胞浸润,增生的纤维组织附近,肝细胞核固缩,炎性细胞侵入血窦,较病理组轻,肝细胞轻度增生,可见养阴活血法可减轻肝纤维化的程度。益气活血组:大多数鼠肝汇管区仅有少量胶原纤维,接近正常,小叶间未见胶原纤维增生,肝细胞索放射状排列,汇管区纤维组织内仅少许炎性细胞浸润,部分鼠肝细胞胞浆疏松化,肝细胞无明显增生,益气活血法有效地防治了肝纤维化。正常组:鼠汇管区纤维组织少,肝细胞索放射状整齐排列,肝细胞结构正常。

讨 论

一、BSA致免疫性肝纤维化形成及中药防治效果 病理组大鼠肝纤维化发生率为8/9(88.8%),其中肝硬化形成率2/9(22.2%)。益气活血组大鼠肝纤维化发生率为2/6(33.3%),无肝硬化形成。肝纤维化程度与肝胶原蛋白含量经直线相关检验,病理、益气活血及养阴活血组分别 $r=0.959$ 、 0.902 、 0.905 , P 值 <0.01 、 0.02 、 0.01 ,表明BSA有较好和可靠致免疫性肝纤维化作用,益气活血中药合剂有效防治了肝纤维化发生。BSA生理盐水攻击注射4次后大鼠肝胶原蛋白含量与正常组间无统计学区别,亦无明显肝纤维化产生,提示肝纤维化发生于多次BSA攻击注射后,

中药主要是防止肝纤维化发生。

二、抗免疫性肝纤维化作用机理

1. 提高红细胞清除IC功能 红细胞在清除IC方面起重要作用⁽⁴⁾。本实验结果表明病理组红细胞清除复合物(IC)功能降低, 益气活血及养阴活血中药合剂均可提高红细胞清除IC的功能, 于是IC在肝内沉积减少, 介导的变态反应性炎症减轻, 减少了肝纤维化的发生。

2. 调整体液免疫反应 脾脏是合成和分泌抗体的重要场所, 有清除异物和自身衰老细胞的作用。经BSA造模而肝纤维化程度为“+”的大鼠较正常大鼠脾重增加($P < 0.05$), 病理组较正常组脾重明显增加, 而益气活血组则脾重与正常组比较, 差异不明显。提示益气活血法对体液免疫反应有调整作用。益气药如黄芪、党参等有促进抗体生成作用, 抗体增多, 形成较大IC, 易为单核巨噬细胞所吞噬; IC减少, 进入脾脏的IC亦少, 减轻脾脏吞噬IC的反应; 微循环改善, 肝纤维化产生程度轻, 脾淤血减轻, 这样脾重减轻。

3. 提高单核巨噬细胞系统(MPS)的吞噬功能 单核细胞、巨噬细胞均可通过其膜表面Fc、C₃b受体作用将IC吞噬并清除。方中黄芪、党参、当归、白花蛇舌草等^(5~7)可增强MPS的吞噬功能, 如是CIC、肝内IC沉积减少。

4. 改善微循环 方中玄胡、川芎、当归等活血化瘀药可改善肝脏微循环^(8, 9), 增加肝组织血流量, 因此可增强或增加Kupffer细胞的吞噬功能及RBC清除IC的能力和机会, 减少IC在肝脏的沉积; 缺O₂、淤胆减轻。

炎症反应减弱, 刺激纤维母细胞增殖作用减弱; 改善血氧供给, 减轻或防止了肝细胞变性坏死, 刺激纤维组织增生作用减弱, 减轻肝纤维化发生。

参 考 文 献

1. 郭峰, 等。红细胞免疫功能的初步研究。中华医学杂志 1982; 62(12):715.
2. Bergman, et al. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. Anal Chem 1963; 35(12):1961.
3. Report of the board of classification and nomenclature of cirrhosis of liver proc 5th pan american congress of gastroenterology havana cuba. Gastroenterology 1956; 31:213.
4. Siegel L, et al. The red-cell immune system. The Lancet 1981; 2(8246):556.
5. 宋秀琴, 等。当归补血汤及其单味药对小鼠巨噬细胞受体及淋巴细胞PFC和ANAE的影响。北京中医学院学报 1989; (2):43.
6. 胡祖光, 等。四君子汤及其配伍对小白鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响。中西医结合杂志 1984; 4(6):363.
7. 徐理纳, 等。当归及其成分阿魏酸钠对小鼠吞噬功能的影响。药学学报 1981; 16(6):411.
8. 翁维良。20种活血化瘀药对实验性微循环障碍的观察。中西医结合杂志 1984; 4(9):555.
9. 薛全福, 等。川芎、黄芪对金黄地鼠中微循环的作用。中华医学杂志 1986; 7:409.

孔最、尺泽穴位注射普鲁卡因治疗大咯血11例

江西新余市中医院(江西 336500) 傅 健

1988年6月~1990年4月, 我们用普鲁卡因孔最、尺泽穴穴位注射治疗大咯血11例, 现报道如下。

临床资料 11例患者均为我院急诊科观察患者, 男6例, 女5例, 年龄15~76岁。其中支气管扩张7例, 肺结核1例, 肺结核3例。1日咯血量300~500ml 6例, 500~800ml 3例, 800ml以上2例; 初次咯血者4例, 既往有大咯血病史者7例; 咯血后0.5~24h入院者8例, 24h以上者3例。

治疗方法 11例患者入院后均曾先静脉注射或静脉点滴脑垂体后叶素、止血芳酸, 口服中药汤剂加童便、田七粉、云南白药等, 因疗效欠佳而改用普鲁卡因孔最、尺泽穴穴位注射。普鲁卡因皮试阴性者, 取其两上肢肘中横纹上尺泽穴和去腕七寸处孔最穴, 经常规消毒后, 用4¹/₂~5号针垂直快速刺入0.5~1寸左右, 待有酸、麻、胀针感后, 每个穴位注射0.5%

普鲁卡因1ml; 每日1次, 连续3天为1个疗程。同时予以镇静、镇咳、抗生素及维持水、电解质平衡等治疗。

结果 11例患者全部有效。一般穴位注射后0.5h咯血开始减少, 咯血停止时间最短的12h, 最长72h。11例患者均只应用1个疗程就达到了止咯血的效果, 应用过程中未发现副作用及不良反应。

体会 孔最穴是手太阴肺经之郄穴, 乃经气聚集汇合的空隙; 尺泽穴是手太阴肺经之合穴, 为五输穴之一。两穴均有止咳、平喘、化痰、止血等作用, 为肺经最常用的急救穴位。用普鲁卡因孔最、尺泽穴注射, 既有镇静、止咳之功效, 又可以达到治疗大咯血的目的。治疗过程中观察到, 先取孔最穴, 后取尺泽穴效果比较好, 这可能是与郄穴对本经循行部位所属脏腑的急性病症有特殊的治疗效果有关。

in B lymphocyte transformation ($P < 0.05$ & $P < 0.01$). The discussion indicated that Liu Wei *Rehmannia* Oral Liquid is effective in protecting the functions of hematopoiesis, immunity, heart, liver and kidney during chemotherapy, which provides an objective data for the clinical application.

Key words Liu Wei *Rehmannia* Oral Liquid, side-effect of drugs of anti-tumor chemotherapy
(Original article on page 734)

Application of Mixture of Reinforcing Qi and Promoting Blood Circulation to Prevent Hepatic Fibrosis due to BSA Immunologic Injury

Fang Bu-wu(方步武), Zhu Qi-gui(朱起贵), Zhu Ji-neng(竺稽能), et al
Affiliated Hospital of Hubei College of TCM, Wuhan(430061)

44 Wistar female rats were divided randomly into 4 groups—normal control(I), case control(II), reinforcing Qi and promoting blood circulation(III) and nourishing Yin and promoting blood circulation(IV). After 4 times of bovine serum albumin(BSA) shock injection, the group III and the group IV were medicated through gastric intubation for 40 days respectively with 300% mixture of reinforcing Qi and promoting blood circulation and 300% mixture of nourishing Yin and promoting blood circulation. The results suggest the mixture of reinforcing Qi and promoting blood circulation has the function of alleviating pathological changes of liver, reducing the content of liver collagen, improving erythrocytic function of clearing away immune complexes and regulating humoral immune response.

Key words bovine serum albumin, liver fibrosis, reinforcing Qi, promoting Blood circulation.
(Original article on page 738)

Effects of Crude Extract of Earthworm on Promoting Blood Circulation to Removing Stasis

Zhang Zu-xun(张祖珣), Wang Feng-feng(王峰峰), et al
Shanxi Medical College, Taiyuan(030001)

The crude extract of earthworm which has a thrombolytic effect could significantly decrease the plasma fibrinogen content and euglobulin lysis time ($P < 0.01$). An enzymatic preparation, containing many fibrinolytic enzymes, was prepared from the crude extract by ammonium sulphate precipitation and DEAE-cellulose chromatography. When administered in rabbits, the enzymatic preparation had an effect in hemorheology improvement. The experiment shows the enzymatic preparation could obviously lower the aggregation of platelets, decrease the viscosity of whole blood and plasma as well as the index of erythrocyte rigidity significantly ($P < 0.001$). All these effects demonstrated its ability in promoting blood circulation to remove stasis.

Key words earthworm, fibrinolytic enzyme, hemorheology.
(Original article on page 741)