

急性肝衰竭模型中医证型探讨

张金良^{1,2} 曾 辉¹ 王宪波¹

摘要 目的 应用小鼠急性肝衰竭模型,筛选有效方剂,以方测证探讨该模型的中医证型。方法 采用腹腔注射脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)/D-氨基半乳糖胺(D-galactosamine, D-GalN)建立小鼠急性肝衰竭模型,给予茵陈蒿汤、黄连解毒汤、补中益气汤、犀角地黄汤灌胃干预。观察动物的行为及生存率,检测肝功能,评价肝组织病理损伤。结果 所测经典方剂中,犀角地黄汤可使小鼠急性肝衰竭模型的生存率由10%提高到60%。造模5 h后,犀角地黄汤组ALT为(183.95±52.00) U/L、AST为(235.70±34.03) U/L,低于模型对照组[ALT:(213.32±71.93) U/L; AST:(299.48±70.56) U/L],但差异无统计学意义($P>0.05$);犀角地黄汤可以明显改善肝脏的损伤。结论 犀角地黄汤是治疗LPS/D-GalN急性肝衰竭模型的有效方剂,按照以方测证原则,LPS/D-GalN小鼠急性肝衰竭模型以热毒血瘀证为主。

关键词 急性肝衰竭;脂多糖;D-氨基半乳糖胺;犀角地黄汤;热毒血瘀证

Discussion of Chinese Syndrome Typing in Acute Hepatic Failure Model ZHANG Jin-liang, ZENG Hui, and WANG Xian-bo *Beijing Ditan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing (100015)*

ABSTRACT **Objective** To study Chinese syndrome typing of acute hepatic failure (AHF) mice model by screening effective formulae. **Methods** Lipopolysaccharides (LPS)/D-galactosamine (D-GalN) was intraperitoneally injected to mice to establish the AHF mice model. Yinchenhao Decoction, Huanglian Jiedu Decoction, Buzhong Yiqi Decoction, and Xijiao Dihuang Decoction were administered to model mice respectively by gastro-gavage. The behavior and the survival rate were monitored. The liver function and pathological changes of liver tissues were detected. **Results** In all the tested classic recipes, the survival rate was elevated from 10% to 60% by administration of Xijiao Dihuang Decoction. Five h after modeling, the serum alanine aminotransferase (ALT) level was (183.95±52.00) U/L, and aspartate aminotransferase (AST) (235.70±34.03) U/L in Xijiao Dihuang Decoction Group, lower than those of the model control group, but with insignificant difference (ALT: 213.32±71.93 U/L; AST: 299.48±70.56 U/L, both $P>0.05$). Xijiao Dihuang Decoction could obviously alleviate the liver injury. **Conclusions** Xijiao Dihuang Decoction was an effective formula for LPS/D-GalN induced AHF model. According to syndrome typing through formula effect, heat toxin and blood stasis syndrome dominated in the LPS/D-GalN induced AHF mice model.

KEYWORDS acute hepatic failure; lipopolysaccharide; D-galactosamine; Xijiao Dihuang Decoction; heat toxin and blood stasis syndrome

急性肝衰竭(acute hepatic failure, AHF)是由病毒、缺血、药物、毒物及酒精等多种原因引起的大量肝细胞坏死及(或)严重的肝功能障碍,患者短期内进展至肝性脑病的一种综合征^[1]。国内外多应用脂多糖(LPS)/D-氨基半乳糖胺(D-GalN)腹腔注射建立AHF

动物模型。应用经典动物模型进行中医药研究是现代中医药发展的必然趋势,而中医药治疗疾病的核心理念是在疾病分类基础上的“辨证论治”,因而对动物模型证的研究具有重要的理论和应用价值。

综合多数医家观点,湿热交蒸乃急性肝衰竭的始动因素,基本病机可概括为湿、热、毒、瘀、虚,邪毒内蕴、瘀热相搏则是病情发生发展的主要病理机制。比较趋同的认识,重型肝炎的最主要的病机是热毒炽盛和瘀血阻络^[2-4]。多数学者认为重型肝炎早期以热毒炽盛为主,邪在气分,……中期邪入营血,正邪交争^[4]。有鉴于此,我们选用清解湿热的茵陈蒿汤,清热解

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81072766);北京市自然科学基金资助项目(No. 7112066)

作者单位:1. 首都医科大学附属北京地坛医院(北京 100015);
2. 武警内蒙古总队医院(呼和浩特 010040)

通讯作者:王宪波, Tel: 010-84322301, E-mail: wangxianbo638@163.com

黄连解毒汤,清热解毒、凉血活血的犀角地黄汤,补益中气的补中益气汤针对湿、热、毒、瘀、虚的基本证型进行模型中医证型的判断。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 C57BL/6J 小鼠,雄性,6~8 周,(21±1)g,由中国医学科学院实验动物中心提供,动物许可证编号:SCXI(京)2009-0007。

1.2 主要试剂 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)货号:L2630,菌株:0111:B4,美国 Sigma 公司;D-氨基半乳糖胺(D-galactosamine, D-GalN)货号:G0500,美国 Sigma 公司。方药的标准剂量源于上海科学技术出版社的全国统编第 6 版《方剂学》教材。犀角地黄汤:水牛角 60 g(先煎 45 min) 生地黄 48 g 赤芍药 24 g 丹皮 18 g,水煎浓缩至 300 mL,浓度为 0.5 mg/mL。补中益气汤:炙黄芪 18 g 炙甘草 9 g 党参 6 g 炒白术 9 g 当归 3 g 陈皮 6 g 升麻 6 g 柴胡 6 g,水煎浓缩至 150 mL,浓度为 0.42 g/mL。黄连解毒汤:黄连 27 g 黄芩 18 g 黄柏 18 g 栀子 27 g,水煎浓缩至 450 mL,浓度为 0.2 g/mL。茵陈蒿汤:茵陈 36 g(先煎 30 min) 栀子 18 g 大黄 12 g,水煎浓缩至 300 mL,浓度为 0.22 g/mL。所有中药购自北京同仁堂前门总店,按传统方法将中药浸泡,武火煮沸,文火煎 2 次,去渣合并浓缩,用离心机 4 000 r/min,10 min,取上清,4℃保存备用。以上诸药每次实验前都重新制备。

2 方法

2.1 观察小鼠 AHF 生存率 小鼠随机分为模型对照组、犀角地黄汤组、补中益气汤组、黄连解毒汤组、茵陈蒿汤组,每组 10 只。用 D-GalN(400 mg/kg)/LPS(0.5 mg/kg)剂量造模,D-GalN/LPS 混合液 25 mL/kg 腹腔注射。腹腔注射后即进行 1 次灌胃治疗:(1)模型对照组用双蒸水灌胃;(2)犀角地黄汤组为 12.5 g/kg;(3)补中益气汤组为 10.5 g/kg;(4)黄连解毒汤组为 5 g/kg;(5)茵陈蒿汤组为 5.5 g/kg。灌胃体积为 25 mL/kg。从每只模型小鼠灌胃后开始计时,至每只小鼠死亡时计时结束,连续观察 24 h,造模后 24 h 未死亡的小鼠计为生存。记录动物生存时间,独立进行 2 次实验,汇总两次实验的数据。

2.2 观察 AHF 小鼠 5 h 肝功能及肝组织病理学情况 将小鼠随机分为 3 组:正常对照组、模型 5 h 组、犀角地黄汤 5 h 组,每组 5 只。正常对照组不做处理,其余两组造模及处理同上。灌胃后 5 h 摘眼球取外周血,4 000 r/min 离心,8 min,留取血浆,检测肝功

能。取小鼠肝脏,留取 5 mm×5 mm 大小,用 10% 中性缓冲福尔马林液固定,经脱水、透明浸蜡、包埋、切片、摊片、染色后观察。

2.3 统计学方法 采用 SAS 8.0 软件进行统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。各组之间比较,采用秩和 Kruskal-Wallis 检验。

结果

1 小鼠的一般情况 造模组在 0.5 h 开始活动减少,发热,并见发抖,竖毛,蜷缩,出汗,呼吸加快,拒进食水。2 h 后发抖、发热加重,呼吸急促,眼结膜充血明显。动物死亡时舌质紫暗乏津,神志不清,大部分动物出现肢体抽搐。

2 肝、肺、脑大体形态变化 死亡时肝脏肿大、紫绀明显、有出血点。肺、脑、肾等组织充血、水肿不明,无出血点。

3 各组小鼠 AHF 生存率比较 小鼠集中死亡时间是 5.5~7.5 h,动物在 24 h 之后很少死亡,观察 24 h。模型对照组 24 h 时生存 2 只,生存率为 10%,茵陈蒿汤组生存 4 只,生存率为 20%;黄连解毒汤组生存 6 只,生存率为 30%;补中益气汤组生存 7 只,生存率为 35%;犀角地黄汤组生存 12 只,生存率为 60%。提示犀角地黄汤是治疗本 AHF 模型的最有效方剂。

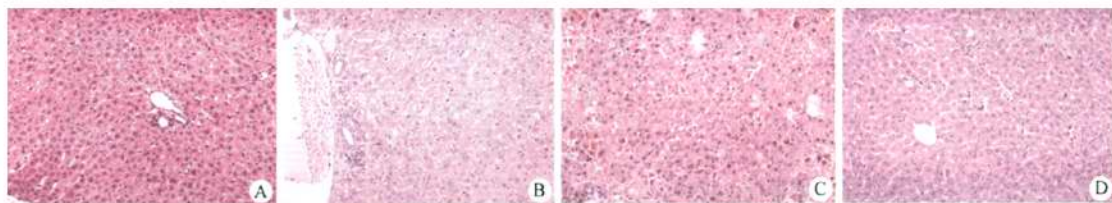
4 各组小鼠血清 ALT、AST、TBIL 变化(表 1) 模型 5 h 组和犀角地黄汤 5 h 组血清 ALT、AST 活性较正常对照组显著升高($P < 0.05$);犀角地黄汤 5 h 组 ALT、AST 活性较模型 5 h 组低,但两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$);各组小鼠血清 TBIL 含量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠血清 ALT、AST 活性和 TBIL 含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)
正常对照	5	28.92±5.89	80.36±18.42	33.35±3.63
模型 5 h	5	213.32±71.93*	299.48±70.56*	64.30±19.41
犀角地黄汤 5 h	5	183.95±52.00*	235.70±34.03*	45.32±17.07

注:与正常组对照组比较,* $P < 0.05$

5 各组小鼠肝脏 HE 染色的病理观察结果 正常对照组小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索呈放射状排列,肝血窦清晰(图 1A)。模型小鼠 5 h 时,肝组织炎性细胞广泛浸润,中央静脉及肝血窦充血明显(图 1B)。部分肝组织细胞崩解,大片的肝细胞坏死,肝小叶结构紊乱,肝窦消失,肝门萎缩,有出血性的坏死(图 1C)。犀角地黄汤 5 h 时肝小叶结构大致正常,肝窦存在,肝细胞广泛变性、坏死较少见,无明显炎细胞浸润(图 1D)。



注:A 为正常对照组,B、C 均为模型 5 h 组,D 为犀角地黄汤 5 h 组

图 1 各组小鼠肝脏病理观察结果(HE 染色, $\times 200$)

讨 论

LPS 是 G⁻ 细菌最重要的致病物质,属病原相关分子模式,免疫刺激作用强,其激活单核-巨噬细胞系统,引起 TNF- α 等大量炎症介质释放,导致全身过度炎症反应及脑、心、肝、肾等要害器官的衰竭^[6]。LPS 虽然可造成肝衰竭,但啮齿类动物大多对 LPS 存在抵抗^[7],因而采用大剂量 LPS 注射的方法,造成肝脏在内的多脏器衰竭,不适宜 AHF 模型的建立。所以目前多采用 D-GalN 致敏/小剂量 LPS 制备急性肝衰竭的模型。D-GalN 是肝细胞磷酸尿嘧啶核苷(UTP)的干扰剂,可造成肝脏弥漫性坏死和炎症,与病毒性肝炎的病理变化相似,类同于 AHF 的第一次打击。D-GalN 可促使肥大细胞脱颗粒释放组胺,造成结肠水肿,使肠源性内毒素吸收增加^[8],同时肝细胞弥漫性的损伤导致对 LPS 的解毒能力大大降低,从而增强了 LPS 的肝毒性。应用 D-GalN 能使 LPS 的动物致死效应增加 2 500 倍以上^[8]。这种特性与 AHF 时“二次打击学说”的机制相似。模型 5 h 组肝脏病理显示:肝组织出现出血性的坏死,肝细胞崩解,大片状的细胞坏死,肝小叶结构紊乱,肝窦消失,肝门萎缩,出现典型的肝衰竭的病理表现。由此可见,D-GalN(400 mg/kg)/LPS(0.5 mg/kg)可以造成典型的小鼠 AHF 的模型。

既往文献已明确注射 LPS 造成温病热毒血瘀证的动物模型,同时清热解毒,活血化瘀的药物治疗内毒素血症往往取得较好疗效^[9-13]。但 D-GalN/LPS AHF 模型的具体证型还未有明确报道。本研究发现:D-GalN/LPS 造模后小鼠出现发热,眼结膜充血,舌质绛暗乏津,神志不清,大部分动物死亡时出现肢体抽搐;小鼠肝脏肿大、紫绀明显、有出血点。肝脏病理:模型对照组小鼠肝细胞中央静脉明显扩张,中央静脉及肝窦充血明显,部分肝组织有出血性坏死。从宏观的症状、体征,肝脏大体形态到微观的病理表现,模型符合临床“血分证”——“高热夜甚,谵语神昏,斑疹透露,吐血便血或有抽搐,舌质绛

紫^[14]”的证型表现。

犀角地黄汤可以将小鼠 AHF 模型生存率由 10% 提高到 60%。并且显著地改善小鼠肝脏病理损伤,是治疗小鼠 AHF 的有效方剂。中医学理论认为犀角地黄汤是治疗温病“血分证”的代表方剂,以方测证可知 D-GalN(400 mg/kg)/LPS(0.5 mg/kg)小鼠 AHF 模型符合肝脏热毒血瘀证。我们认为,其中 D-GalN 是“靶向的造模药物”发挥“引经报使”的作用,而小剂量 LPS 则是造成肝脏热毒血瘀证的特异性药物。

参 考 文 献

- [1] 梁扩寰,李绍白主编. 肝脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:583-593.
- [2] 刘平主编. 现代中医肝脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:239.
- [3] 陈卫平,刘涛. 热瘀相搏是重型肝炎病理变化的关键探析[J]. 中医药学刊,2003,21(8):1240-1241.
- [4] 钱英. 中医药治疗重型肝炎的现状与思考[J]. 中西医结合杂志,2002,12(3):129.
- [5] Mignon A, Rouquet N, Fabre M, et al. LPS challenge in D-galactosamine-sensitized mice accounts for caspase-dependent fulminant hepatitis, not for septic shock[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999,159(3):1308-1315.
- [6] Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979,76(11):5939-5943.
- [7] 周光炎主编. 免疫学原理[M]. 上海:上海科技出版社,

- 2007;117.
- Zhou GY, editor. Immunological principle[M]. Shanghai: Shanghai Science & Technology Press, 2007;117.
- [8] Yan Liu X, Robinson D, Veach RA, et al. Peptide-directed suppression of a pro-inflammatory cytokine response[J]. J Biol Chem, 2000,275(22):16774-16778.
- [9] 杨进,陆平成. 家兔“热毒血瘀证”系列动物模型的试制[J]. 南京中医药大学学报, 1995,11(2):70-72.
- Yang J, Lu PC. Preparation of animal models of heat-toxin and blood-stasis syndrome in rabbits[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 1995,11(2):70-72.
- [10] 杨超,周岩,孙晓红,等. 具有中医“热毒血瘀证”表征的大鼠血液成分和流变学变化[J]. 中国比较医学杂志, 2007,17(10):607.
- Yang C, Zhou Y, Sun XH, et al. The blood components and rheological changes in rats with superficial signs of heat-toxin and blood-stasis syndrome[J]. Chin J Comp Med, 2007,17(10):607.
- [11] 卜慧敏,樊海,杨进. 清热解毒等治则对家兔内毒素性热毒血瘀证模型血液流变性的影响[J]. 中医研究, 1995, 8(2):15-18.
- Bian HM, Fan H, Yang J. Effect of heat clearing and detoxicating principles on blood rheology of rabbits of endotoxic heat-toxin and blood-stasis syndrome[J]. Res Tradit Chin Med, 1995, 8(2):15-18.
- [12] 江欢,周岩,孙晓红,等. 中医“热毒血瘀证”模型大鼠血管内皮损伤及血小板功能障碍研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009,7(4):425-427.
- Jiang H, Zhou Y, Sun XH, et al. Study on vascular endothelial injury and platelet dysfunction of model rats of heat-toxin and blood-stasis syndrome[J]. Chin J Integr Tradit West Med Cardio-/Cerebrovasc Dis, 2009,7(4):425-427.
- [13] 许长照,曹一鸣,杨进,等. “热毒血瘀证”动物模型的病理形态学基础[J]. 江苏中医,1989,79(2):31-33.
- Xu CZ, Cao YM, Yang J, et al. The pathomorphological basis of animal models of heat-toxin and blood-stasis syndrome[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 1989,79(2):31-33.
- [14] 彭胜权. 温病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009;1089.
- Peng SQ. Study of febrile disease[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009;1089.
- (收稿:2010-07-02 修回:2010-12-27)

欢迎订阅 2011 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的、中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖;2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”,列入中国期刊方阵;2002-2009 年连续 8 年被评为“百种中国杰出学术期刊”;3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助;4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”。并被多种国内外知名检索系统收录,如:中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引(MEDLINE)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)等;为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被编入《中文核心期刊要目总览》,每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本,月刊,144 页;铜版纸印刷,彩色插图。国内定价:20.00 元/期。全年定价:240.00 元。国际标准刊号:ISSN 1003-5370,国内统一刊号:CN 11-2787/R,国内邮发代号:2-52,国外代号:M640。国内外公开发售,在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京市海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010-62886827,62876547,62876548;传真:010-62874291;E-mail:cjim@cjim.cn;网址:http://www.cjim.cn