

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.17.005

金虎退黄汤干预大鼠急性胆汁淤积肝损伤实验研究^{*}

何瑾瑜, 董璐[△], 杨跃青, 薛敬东

(陕西省中医医院, 陕西 西安 710003)

摘要:目的 探讨金虎退黄汤对 α -萘异硫氰酸酯(ANIT)诱导的大鼠急性肝内胆淤积的干预作用及作用机制。方法 将21只SD大鼠随机分为空白组、模型组、实验组,每组7只,按规定时间点进行造模、给药。末次造模后48h,检测大鼠血清中总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBil)、总胆汁酸(TBA)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰转氨酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)含量。取血后,处死大鼠,摘取心、肝、脾、肺、肾,称定质量,计算脏器指数;肝组织做组织切片HE染色,光镜观察肝组织病理变化。结果 各组大鼠体质量虽缓慢增加,但变化无明显差异($P>0.05$);实验组血液生化指标TBil,DBil,TBA,AST,ALP下降明显($P<0.05$),病理组织切片改善较显著,但ALT和GGT下降不明显($P>0.05$)。结论 金虎退黄汤对胆汁淤积性肝损伤大鼠具有显著的退黄、降酶、修复肝细胞损伤作用,可能通过抑制炎症反应及肝细胞坏死发挥作用。

关键词: α -萘异硫氰酸酯;胆汁淤积性肝损伤;金虎退黄汤;黄疸;大鼠

中图分类号:R285.5;R256.41

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)17-0018-03

Effect of Jinhu Tuihuang Decoction on Liver Injury Induced by Acute Cholestasis in Rats

He Jinyu, Dong Lu, Yang Yueqing, Xue Jingdong

(Shaanxi Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 710003)

Abstract: Objective To investigate the intervention effect of Jinhu Tuihuang Decoction on acute intrahepatic cholestasis induced by α -Naphthylisothiocyanate(ANIT) in rats and its mechanism. **Methods** Totally 21 SD rats were randomly divided into the blank group, model group and experimental group, 7 rats in each group, the rats were modeled and administrated according to the prescribed time points. 48 h after the last modeling, the levels of serum TBil, DBil, TBA, ALT, AST, GGT, ALP were detected. After taking blood, the rats were sacrificed, and the heart, liver, spleen, lung and kidney were taken out and weighed, the visceral indexes were measured, the liver tissue was stained by HE and the pathological changes of liver tissues were observed by light microscope. **Results** The body weight of rats in each group increased slowly but there was no significant difference($P>0.05$). The decrease of blood biochemical indexes (TBil, DBil, TBA, AST and ALP) and the improvement of pathological section in the experimental group were obvious($P<0.05$), while the decrease of ALT and GGT in the experimental group was not obvious($P>0.05$). **Conclusion** Jinhu Tuihuang Decoction has significant effects on removing jaundice, reducing enzyme and repairing hepatocyte injury in rats with cholestatic liver injury induced by acute cholestasis, which may play a role by inhibiting inflammatory reaction and hepatocyte necrosis.

Key words: α -Naphthylisothiocyanate; liver injury induced by cholestasis; Jinhu Tuihuang Decoction; jaundice; rats

胆汁淤积性肝病是指各种原因引起的胆汁形成、分泌和(或)胆汁排泄异常所致肝脏病变,最常见的临床表现及体征为黄疸,同时常伴有一定程度的皮肤瘙痒、乏力等症状^[1-2],生化异常主要是碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转氨酶(GGT)及血总胆红素(TBil)升高^[3]。按照病因可分为肝细胞性胆汁淤积、胆管性胆汁淤积及混合性胆汁淤积^[4]。目前,推荐只需符合生化指标ALP高于1.5倍正常上限值(ULN),且GGT高于3倍ULN,便可确诊^[5]。中医学对胆汁淤积性肝病并无认识,中医典籍里也无专门记载,很难将其归于某证,专家多认为应归属“黄疸病”范畴^[6]。金虎退黄汤是陕西省名中医薛敬东主任根据多年治疗胆汁淤积性肝病的临床经验方,以整体观念

为指导,并运用中医辨证论治的思想总结而得。湿邪阻滞、瘀血内结是导致该病最基本的中医病因病机,病位可涉及肝、脾、肾、胆、胃等,病性多属虚实夹杂,临床表现为“湿-瘀-虚”的演变过程,但以湿邪、瘀血贯穿疾病始终。应以利湿退黄、活血化瘀为基本治疗原则,自拟方以此选择特异性中药遣药组方,临床疗效显著。本研究探讨了自拟方金虎退黄汤对 α -萘异硫氰酸酯(ANIT)诱导的急性肝内胆淤积性肝损伤大鼠的干预作用及作用机制。现报道如下。

1 仪器、试剂与动物

1.1 仪器

7170型全自动生化分析仪(日立公司);BP61型电

^{*}基金项目:2017年度陕西省重点研发计划项目[2017SF-339]。

第一作者:何瑾瑜,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为中医内科学,(电子信箱)cs25010@126.com。

[△]通信作者:董璐,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为中医内科学,(电子信箱)1053577321@qq.com。

子分析天平(万分之一,德国赛多利斯公司);Axioskop 40 型光学显微镜(我院病理科提供);NU-6832E 型低温冰箱(天肯贸易有限公司)。

1.2 试药

ANIT(纯度 98%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);橄榄油(上海佳格食品有限公司);桃仁 *Prunus persica* L. Batsch,红花 *Carthamus tinctorius* L.,金钱草 *Lysimachia christinae* Hance,桂枝 *Cinnamomum cassia* Presl,虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc,栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 购自北京同仁堂西大街店,盘龙七 *Hemsleya panlongqi* 购自西安市药材市场,均由张瑞霞主任医师鉴定为正品;生理盐水(西安京西双鹤药业有限公司,批号为 051005122);10% 水合氯醛(陕西中医学院附属医院制剂中心,批号为 20040420);金虎退黄汤组方由薛敬东主任医师提供,药物由陕西省中医医院制剂室制备。

1.3 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,4~5 周龄,体质量 130~180 g,共 21 只。由西安交通大学医学院实验动物中心提供,生产许可证号为 SCXK(陕)2013-003。

2 方法与结果

2.1 方法

药液制备:将 ANIT 溶于橄榄油中,配成质量分数为 1.6% 的 ANIT 橄榄油溶液。按照 1/2 处方量称取药材,分别按照 8 倍、6 倍、4 倍量加水煎煮 3 次,合并水煎液,浓缩,得质量浓度为 1 g/mL 的处方提取液。因实验周期较长,处方提取液每周制备 1 次,于 4℃ 冷藏保存,用前自然晾至室温,备用。

实验方法:将 21 只健康 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、实验组,各 7 只,ANIT 橄榄油量造模剂量为 80 mg/kg。处方提取液成人给药剂量为 110 g/d,按体表面积折合成的大鼠给药量为 9.9 g/kg。造模前,大鼠禁食过夜,造模后 2 h 给药。于 0,7,14,21 d 时空白组给予橄榄油(5 mL/kg),模型组给予 ANIT 橄榄油(剂量为 80 mg/kg),实验组给予 ANIT 橄榄油(80 mg/kg)造模+处方提取液(9.9 g/kg)。期间,每天称体质量,实验组每天给药 1 次;23 d 时,空白组和模型组取血+摘取各脏器称质量,实验组给药 2 h 后取血+摘取各器官称质量。实验期间,每天观察各组大鼠的一般状况,包括毛色、活动、饮水等,每天称体质量,记录其变化。末次造模后 48 h,以 10% 水合氯醛(每 100 g 体质量 0.33 mL)腹腔麻醉,腹主动脉采血 4~5 mL,离心分离血清,采用全自动生化分析仪检测血清相关生化指标,即丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、GGT、ALP、TBil、直接胆红素(DBil)、总胆汁酸(TBA)。取血后处死大鼠,摘取所有大鼠肝脏,每块肝脏取 1 cm 大小肝

组织 3 块,10% 甲醛固定,包埋切片,常规 HE 染色,光镜观察病理变化。

2.2 结果

一般状况:实验中大鼠的造模、给药全过程均顺利进行,未发生大鼠死亡等不良情况。实验前,所有大鼠呼吸、行为活动、腺体分泌、粪便均正常,实验期间未见显著变化;除空白组外,其余大鼠造模后均出现毛色偏黄、无光泽。

体质量:每天称体质量,记录其变化,详见表 1。可见,各组大鼠体质量均缓慢增加,经方差齐性检验,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠体质量变化比较($\bar{X} \pm s, g$)

时间(d)	空白组	模型组	实验组
1	125.6 ± 26.9	169.6 ± 8.8	158.1 ± 13.2
2	127.1 ± 26.0	180.0 ± 9.0	174.6 ± 19.7
3	126.5 ± 24.5	159.3 ± 7.2	172.9 ± 14.1
4	124.8 ± 23.9	179.3 ± 9.3	173.1 ± 18.5
5	128.4 ± 25.4	179.3 ± 9.3	171.0 ± 13.3
6	128.5 ± 25.6	171.9 ± 11.4	170.4 ± 15.4
7	152.1 ± 25.9	171.6 ± 10.6	168.4 ± 16.1
8	156.6 ± 25.7	195.9 ± 15.1	170.4 ± 20.1
9	154.6 ± 27.5	183.7 ± 12.9	187.4 ± 18.4
10	154.1 ± 25.1	176.9 ± 13.6	179.1 ± 16.3
11	153.8 ± 25.1	167.4 ± 15.0	172.1 ± 17.6
12	157.4 ± 23.7	173.0 ± 15.7	165.0 ± 14.6
13	166.8 ± 26.1	172.9 ± 15.3	169.4 ± 16.3
14	174.0 ± 29.5	184.4 ± 15.9	168.4 ± 16.5
15	169.4 ± 26.6	207.0 ± 20.2	185.3 ± 12.5
16	183.8 ± 29.2	204.3 ± 16.9	196.6 ± 17.6
17	169.3 ± 24.9	193.9 ± 17.5	187.4 ± 14.9
18	185.5 ± 29.3	186.1 ± 19.8	191.4 ± 18.4
19	184.1 ± 28.4	186.0 ± 17.2	184.3 ± 20.1
20	181.9 ± 27.6	188.6 ± 18.9	186.4 ± 18.8
21	203.3 ± 33.4	211.3 ± 21.4	191.3 ± 20.7
22	190.0 ± 29.3	201.6 ± 20.9	202.9 ± 20.9
23	207.6 ± 31.4	216.7 ± 23.7	205.7 ± 20.2

血清学指标:结果见表 2。模型组与空白组生化指标相比,经方差齐性检验,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明造模成功。与模型组相比,经方差齐性检验,实验组 TBil, DBil, TBA, AST, ALP 均显著降低($P < 0.05$),但 ALT 与 GGT 无显著差异($P > 0.05$)。

肝组织病理变化光镜观察:由图 1 可知,空白组大鼠肝脏组织病理未见异常,小叶及细胞形态未见异常,汇管区未见炎性细胞浸润,未见肝窦扩张,毛细胆管未见胆汁淤积。模型组大鼠肝脏组织病理存在明显异常,小叶坏死灶较多,细胞存在明显的变性,且排列紊乱,汇管区可见大量炎性细胞浸润,毛细胆管可见明显的胆汁

表2 大鼠血液生化指标变化比较($\bar{X} \pm s$)

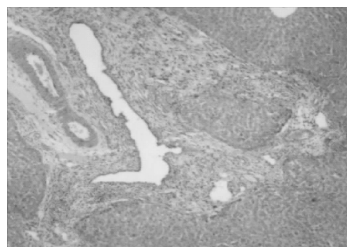
指标	空白组	模型组	实验组
TBil($\mu\text{mol/L}$)	1.06 $\pm$ 0.14	111.7 $\pm$ 11.2 [▲]	97.8 $\pm$ 8.3 [*]
DBil($\mu\text{mol/L}$)	0.44 $\pm$ 0.19	98.8 $\pm$ 9.4 [▲]	85.8 $\pm$ 6.1 [*]
TBA($\mu\text{mol/L}$)	16.6 $\pm$ 6.5	368.2 $\pm$ 42.9 [▲]	239.8 $\pm$ 68.6 [#]
ALT(mmol/L)	57.3 $\pm$ 5.5	820.8 $\pm$ 73.5 [▲]	695.2 $\pm$ 226.3
AST(mmol/L)	102.8 $\pm$ 11.4	801.8 $\pm$ 115.5 [▲]	582.2 $\pm$ 135.4 [#]
ALP(mmol/L)	378.2 $\pm$ 70.5	772.0 $\pm$ 96.0 [▲]	459.4 $\pm$ 217.7 [*]
GGT(mmol/L)	4.2 $\pm$ 1.2	22.8 $\pm$ 2.1 [▲]	21.0 $\pm$ 6.6

注:与空白组相比,[▲] $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$ 。

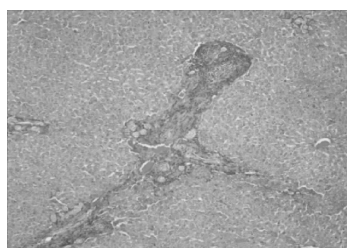
淤积,且存在胆管增生。实验组大鼠肝脏组织病理存在异常,小叶可见少量坏死灶,胆管增生,毛细胆管胆汁淤积明显,汇管区有少量炎性细胞浸润。



A



B



C

A. 空白组 B. 模型组 C. 实验组

图1 各组大鼠肝组织形态学切片(HE染色,10 $\times$ 10)

3 讨论

ANIT是一种肝毒性物质,主要影响胆管上皮细胞和肝细胞,导致肝内胆管淤积性肝损伤,表现为血液中胆红素和转氨酶的显著增高^[7],符合临床患者胆汁淤积表现。本研究结果表明,金虎退黄汤能有效改善ANIT诱导的急性胆汁淤积肝损伤,包括减少AST与ALP活性,降低血清中DBil,TBil,TBA的含量,减轻肝脏的病理性改变。

方中虎杖性微寒,味微苦,归肝、胆经,利湿退黄,活

血化瘀,是治胆退黄的专药,为君药^[8]。金钱草性微寒,归肝、胆经,清热利湿,活血退黄,临床多用于各型黄疸病及肝病的治疗^[9];栀子性寒,味苦,具有泻火除烦、清热利湿、凉血散瘀的功效,与君药配伍,可加强利湿、退黄、散瘀;桃仁与红花,均入肝经,均具有活血祛瘀之功效。四者为臣药,有助君药利湿退黄、活血化瘀之功效。盘龙七^[10]是陕西民间用药,性平,味涩、微苦,入肝经,活血除湿,补脾健胃,为佐药,一可取其活血利水之功效,以增强疗效,二是因肝病常易犯脾胃,故应注重补脾健胃,收治肝之病,当先实脾之功^[10]。桂枝性温,味辛,行血脉,消瘀血,助气化而行津液的作用,为使药^[9,11]。方中7味中药配伍运用,可获良效。

本研究结果显示,与空白组相比,模型组大鼠胆红素升高以DBil为主,伴ALP,GGT,TBA的升高,具有胆汁淤积的特征;肝脏组织病理切片可见模型组大鼠肝脏组织病理存在明显异常,表明胆汁淤积模型造模成功。与模型组比较,实验组能有效降低胆汁淤积大鼠AST,ALP,TBil,DBil等相关生化指标水平;同时,肝脏组织病理显示,实验组大鼠肝小叶可见少量坏死灶,汇管区有少量炎性细胞浸润,表明金虎退黄汤能有效减少大鼠炎性细胞浸润,并有抑制肝细胞坏死的作用。

综上所述,金虎退黄汤可能通过抑制炎症反应及肝细胞坏死达到退黄、降酶、修复肝细胞损伤的作用。但具体是何种炎症因子参与调节作用,以及其分子生物学机制,仍有待后续研究进一步探索。

参考文献:

- [1] Gossard AA. Care of the cholestatic patient[J]. Clin Liver Dis, 2013,17(2):331-344.
- [2] 曲颖,陆伦根. 重视胆汁淤积性肝病的基础和临床应用研究[J]. 中国医学前沿杂志(电子版),2015,7(4):258.
- [3] 黄志寅,唐承薇. 胆汁淤积性肝病的诊断[J]. 内科理论与实践, 2014,9(5):345.
- [4] 赵红,谢雯. 2013胆汁淤积性肝病诊断治疗专家共识解读[J]. 中国医学前沿杂志(电子版),2013,5(7):29-33.
- [5] Paumgartner G, Pusch T. Medical treatment of cholestatic liver disease[J]. Clin Liver Dis, 2008,12(1):53-80.
- [6] 朱云. 汪承柏教授重用行气破血药治疗重症瘀胆肝病的经验[J]. 中西医结合肝病杂志,2011,21(2):105-107.
- [7] 陈新瑜,李小清,况炯,等. 退黄合剂对ANIT致胆汁淤积性肝损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国中医急症,2014,23(9):1614-1616.
- [8] 赵克森. 白藜芦醇的生物学特性和效应[J]. 中国病理生理学杂志,2012,24(9):456-466.
- [9] 钟赣生. 中药学[M]. 北京:中国中医药出版社,2012:208-209.
- [10] 李世全. 秦岭巴山天然药物志[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1987:262-263.
- [11] 项立明,王彩莹,黄莺. 浅析《伤寒论》对桂枝的应用[J]. 河南中医,2017,37(1):10-12.

(收稿日期:2018-01-10;修回日期:2018-03-29)