

• 论著 •

3 种中药复方干预鼠急性肝功能衰竭效应 及纤维介素表达的比较研究

黄加权¹, 黄铁军¹, 张建军², 黄海燕¹, 余海静¹, 肖 非¹, 宁 琴¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科, 湖北 武汉 430030; 2. 湖北省中山医院感染科)

【摘要】 目的:探讨不同中药复方干预急性肝功能衰竭小鼠的效应及其对鼠纤维介素(mfgl2)基因表达的影响。**方法:**应用 3 型鼠肝炎病毒(MHV-3)感染 Balb/cJ 小鼠制备急性肝功能衰竭模型。将 96 只小鼠均分为模型组、抗肝衰复方组、赤芍复方组、急黄汤组 4 组。于实验前 3 d 每日灌胃相应药物,并于病毒感染后 1、2 和 3 d,每组各取 3 只小鼠摘眼球取外周血检测丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL),活杀动物取肝组织进行病理组织学观察;各组余 15 只小鼠记录一般情况及生存时间,描绘各组的生存曲线;用免疫组化方法检测肝组织 mfgl2 的表达状况。**结果:**与模型组比较,3 个中药复方组小鼠生存时间、ALT、TBIL 改变及 mfgl2 的表达差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);且抗肝衰复方组较其他中药复方组的生存率明显提高,肝脏组织损伤明显减轻,肝组织 mfgl2 表达明显减少,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**抗肝衰复方干预鼠急性肝功能衰竭效果显著,降低 mfgl2 的表达是其作用机制之一。

【关键词】 中药复方;肝功能衰竭,急性;干预效应;纤维介素

中图分类号: R285.5; R256.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-9691(2007)01-0039-05

Comparative study of therapeutic effects of three complex prescriptions of traditional Chinese medicine on mice with acute hepatic failure and on their fibrinogen like protein 2 expression HUANG Jia-quan¹, HUANG Tie-jun¹, ZHANG Jian-jun², HUANG Hai-yan¹, YU Hai-jing¹, XIAO Fei¹, NING Qin¹. 1. Department of Infectious Diseases, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China; 2. Department of Infectious Diseases, Zhongshan Hospital, Wuhan 430033, Hubei, China

【Abstract】 Objective: To compare the curative effects of three complex prescriptions of traditional Chinese medicine (TCM) for treatment of mice with acute hepatic failure, and the effects on mouse fibrinogen like protein 2 (mfgl2) expression. **Methods:** Balb/cJ mice were infected by murine hepatitis virus - 3 (MHV-3) to establish the model of acute hepatic failure. Ninety-six mice were divided into four groups evenly: model group, anti-hepatic failure complex group, Chishao (赤芍) complex group, Jihuang decoction (急黄汤) complex group. Drugs were infused into stomach 3 days before the experiment. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and total bilirubin (TBIL) in peripheral blood were detected in 3 mice of each group on the time points of 1, 2 and 3 days after the infection. Then the liver specimens were collected to observe the pathohistological changes. The general condition and survival time were described, and the survival curves were drawn in various groups. Expression of mfgl2 in the liver tissues was detected by using immunohistochemistry method. **Results:** ALT, TBIL of serum and the level of mfgl2 expression in the three complex prescriptions of TCM groups were significantly lower, and the survival times were longer than those in model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The survival rate of anti-hepatic failure complex group was elevated, the injuries were alleviated and the expression of mfgl2 in liver tissues was less compared with other complex prescriptions of TCM groups, the differences being significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Anti-hepatic failure complex has good therapeutic effect on acute hepatic failure of mice by decreasing the expression of mfgl2.

【Key words】 complex prescription of traditional Chinese medicine; acute hepatic failure; intervention effect; fibrinogen like protein

急性重型肝炎病死率高,其发病机制复杂,中药

复方具有多靶点整体调节机体的特点,用于治疗急性重型肝炎有一定优势^[1,2]。抗肝衰复方、赤芍复方、急黄汤治疗急性重型肝炎及干预实验性肝功能衰竭

作者简介:黄加权(1967-),男(土家族),湖北省人,医学硕士,副教授,副主任医师,研究方向为重症肝炎、肝硬化的机制和防治。

(肝衰)取得了一定的效果^[3,4]。3 型鼠肝炎病毒(MHV-3)感染 Balb/cJ 小鼠造成急性肝衰是较好的实验研究模型^[5],为此我们利用此模型比较不同中药复方对 MHV-3 感染小鼠急性肝衰模型的效应,研究不同中药复方对急性肝衰病理发展过程中关键机制纤维介素(fgl2)基因表达的影响,初步探讨其干预机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物:Balb/cJ 小鼠 96 只,体重 16~20 g,6~8 周龄,雌雄兼用,购于武汉市动物中心,饲养于华中科技大学同济医学院附属同济医院感染免疫室动物房内。模型制备前 1 周将动物置于本实验净化间独立通气室(IVC)中饲养,控制笼内温度在 25℃ 左右,常规供给饲料与水。

1.1.2 病毒:MHV-3 购自美国模式培养物保存所(ATCC),经 DBT 细胞系空斑纯化后于 17Cl 细胞系繁殖培养,分装液氮低温保存,使用前用生理盐水稀释病毒含量为 10^6 pfu/ml,病毒的量以空斑形成单位(pfu)表示。

1.1.3 药物及试剂:抗肝衰复方(茵陈、栀子、生大黄、土茯苓、车前子),赤芍复方(赤芍、茵陈、虎杖),急黄汤(茵陈、大黄、金钱草、牡丹皮、丹参)均为本院中药部统一提供制药,经消毒后用软包装袋真空包装含生药 0.01~0.33 g/ml,由华中科技大学同济医学院附属同济医院制剂室协助制备。免疫组化用兔来源抗 fgl2 多克隆抗体由本实验室自制。

1.2 模型制备及分组:按宁琴等^[6]介绍的方法:利用 MHV-3 腹腔感染近交系 Balb/cJ 小鼠建立毒株依赖性急性肝衰模型。96 只小鼠按数字表法随机分为模型组(模型基础上灌服与抗肝衰复方等量的生理盐水 500 ml)、抗肝衰复方组、急黄汤组和赤芍复方组 4 组,每组 24 只。实验前 3 d 每日给小鼠灌胃相应药物,剂量约为 500 μ l,含生药量 0.01 g,每日 2 次。第 4 日上午,各组动物腹腔注射 100 pfu 的 MHV-3 病毒。于病毒感染后 1、2 和 3 d 各取 3 只小鼠,用乙醚麻醉后摘取眼球采集外周血,离心收集血清于 -80℃ 短期保存待测。并于采血后断颈处死小鼠,取出肝脏组织待检。每组剩余的 15 只小鼠观察生存情况。

1.3 观察指标

1.3.1 观察一般状况、生存情况及描绘生存曲线。

1.3.2 血生化指标:总胆红素(TBIL)、丙氨酸转氨酶(ALT)采用日立 7170 自动生化仪检测。

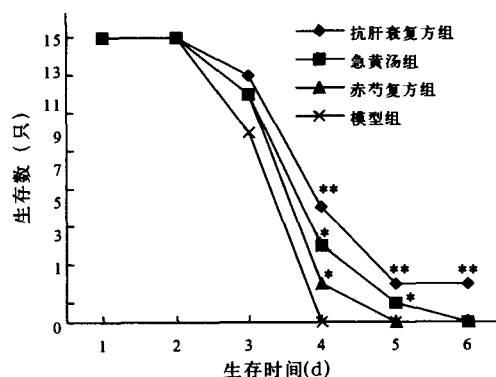
1.3.3 组织病理学检查:取肝组织,用体积分数为 10% 的甲醛固定,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,固定后统一阅片。同时对肝组织病变程度进行半定量分析。肝组织病变按程度不同记分:“-”为组织结构正常,记 0 分;“±”为可见肝细胞变性,记 1 分;“+”为可见肝细胞点状坏死,记 2 分;“++”为肝细胞坏死范围 $<1/3$,记 3 分;“+++”为肝细胞坏死范围占肝小叶 $1/3 \sim 2/3$,记 4 分;肝细胞坏死范围 $>2/3$,记 5 分。

1.3.4 鼠纤维介素(mfgl2)免疫组化结果:取肝组织,用 4% 的甲醛固定,石蜡包埋、切片。将石蜡切片脱蜡至水,滴加一抗 mfgl2(1:300)60 μ l,孵育后加二抗[链霉卵白素过氧化物酶(SP),购于北京中山公司]。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,固定。对免疫组化涂片($\times 100$)采用 CMIAS 真彩色病理图像分析,每张涂片随机选取 5 个视野,测定每张涂片的阳性细胞率(%)和阳性单位,测定视野中阳性细胞面积占所有细胞面积的百分比及阳性信号平均灰度,进行半定量分析。

1.4 统计学方法:计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用独立样本 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验。使用 SPSS 软件进行统计学处理,应用 Sigma Plot 9.0 软件包进行生存曲线的绘制。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组生存曲线的变化(图 1):MHV-3 感染小鼠后 3 d 和 4 d,模型组全部死亡,而抗肝衰复方组、赤芍复方组、急黄汤组比模型组多存活 1 d 的比例分别为 6.7%、13.3% 和 13.3%,赤芍复方组 1 d 存活率最低,而抗肝衰复方组 1 d 存活率最高,与模型组比较差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注:与模型组同时时间点比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 1 MHV-3 感染 Balb/cJ 小鼠生存曲线

Figure 1 Survival curves of Balb/cJ mice infected by MHV-3

2.2 中药复方对急性肝衰小鼠血生化指标的影响(表 1):与模型组比较,抗肝衰复方组、急黄汤组、赤芍复方组第 3 日 ALT、TBIL 均显著降低,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而中药复方各组间比较,差异均无显著性(P 均 > 0.05)。

表 1 各组小鼠感染后第 3 日血生化指标及病变积分比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Comparison of blood biochemical indexes and pathological change scores of mice 3 days after infection in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ALT(U/L)	TBIL(μ mol/L)	病变积分(分)
模型组	1 698.35 $\pm$ 374.36	37.10 $\pm$ 11.57	4.89 $\pm$ 0.48
抗肝衰复方组	782.28 $\pm$ 162.89**	12.93 $\pm$ 3.54**	2.17 $\pm$ 1.21**
赤芍复方组	1 167.20 $\pm$ 235.41*	17.21 $\pm$ 7.43*	3.27 $\pm$ 1.28**
急黄汤组	925.43 $\pm$ 326.50**	20.21 $\pm$ 6.54*	2.91 $\pm$ 1.03**

注:与模型组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与抗肝衰复方组比较:† $P < 0.05$

2.3 不同中药复方对急性肝衰小鼠肝组织形态学变化的影响(表 1,彩色插页图 2):模型组小鼠感染 MHV-3 后肝脏正常结构被破坏,呈现大面积的肝细胞坏死,可见大量肝细胞碎片,并有少量炎性细胞浸润,肝细胞无明显再生。各中药复方组干预后小鼠肝脏组织变性、坏死程度要明显降低;肝细胞索以中央静脉为中心向四周呈放射排列,肝小叶欠清晰,可见肝细胞核、核仁,胞质欠均匀;汇管区炎性细胞浸润,结构尚完整。此病理改变在整个实验过程中存在并有所波动。3 d 时各中药复方组病理组织学改变较模型组最为显著,且抗肝衰复方组较赤芍复方组病理组织学改变较为显著。

2.4 中药复方对急性肝衰小鼠 mfgl2 的表达(彩色插页图 3):免疫组化结果显示,mfgl2 阳性细胞表达主要在肝细胞坏死区域,为棕黄色胞浆着色。模型组肝组织中 mfgl2 阳性细胞表达明显;而抗肝衰复方组表达较其他中药复方组少。

3 讨论

急性肝衰以迅速出现意识障碍、出血倾向、黄疸、腹水及肝脏进行性缩小为主要特点,其发病原因可有感染、毒物、化学因子、药物以及肝脏缺血、缺氧和代谢异常。因此,对治疗手段的探索目前已引起国内外学者的高度重视^[7]。茵陈蒿汤为治疗湿热黄疸之主方,《伤寒论》用治瘀热发黄,《金匱要略》用治谷疸,具有利胆保肝、解热、抗炎、镇痛、抗菌、抗病毒等作用。有研究显示,茵陈蒿汤可降低 D-氨基半乳糖(D-GalN)加脂多糖(LPS)诱导肝损伤小鼠脂质过氧化物(LPO)含量和谷胱甘肽硫转移酶(GST)活

性;提高卡介苗(BCG)+LPS 免疫性肝损伤小鼠肝组织匀浆还原型谷胱甘肽(GSH)含量,保肝作用与其提高机体抗氧化能力、抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的产生有关^[8,9]。抗肝衰复方是茵陈蒿汤加车前子、土茯苓组成。车前子助主药清利湿热,土茯苓清热、解毒、利湿,诸药合用共奏清热利湿退黄、行气化瘀止痛之功。研究证明,抗肝衰复方通过免疫调节,改善微循环,抗病毒作用,提高对急性重症肝炎肝损伤的保护效果^[4]。我们前期的研究表明,急黄汤能降低 D-GalN 所致急性肝衰大鼠 ALT、凝血酶原时间(PT)、TBIL 水平,改善肝组织病理变化,同时降低血浆 TNF- α 和血清 F 蛋白(FP)水平^[3]。赤芍复方在临床上治疗病毒性肝炎具有退黄、护肝作用^[1]。本研究结果显示,用 3 种中药复方干预 MHV-3 感染 Balb/cJ 小鼠所致急性肝衰模型,抗肝衰复方可明显提高动物的生存率及生存时间,其保护肝功能、减轻病理组织损伤等方面较其他各中药复方组差异有显著性。

MHV-3 的核心蛋白可以诱发 fgl2 的表达,人纤维介素(hfgl2)基因亦被克隆,其编码的 hfgl2 蛋白分子具促凝活性。对鼠急性重型肝炎和人类重型肝炎的研究发现,肝内枯否细胞及内皮细胞激活高表达 hfgl2,激活凝血酶,催化纤维蛋白原转化为纤维蛋白,形成血栓,导致局部微循环障碍,最终致肝细胞大面积坏死,这种凝血酶原在鼠急性重型肝炎的发病中起着重要的作用^[10-12]。我们采用免疫组化方法检测各种中药复方干预小鼠肝脏组织 mfgl2 含量,结果显示,3 个中药复方均较模型组有不同程度降低,且以抗肝衰复方组改变最为明显,说明抗肝衰复方组可明显抑制 mfgl2 表达而达到保护急性肝衰中肝功能损伤的效果,可作为抗急性肝衰的有效中药复方之一,值得进一步研究。

参考文献:

- [1]刘三都,杨庄坤,林开颜,等.赤丹汤配合血浆置换治疗重型肝炎临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(4):227-229.
- [2]杨兰生.中西医结合治疗亚急性肝坏死 11 例[J].中国中西医结合急救杂志,2005,12(4):23-26.
- [3]张建军,袁敏,盛国光,等.急黄汤抗大鼠急性肝衰竭的动态观察[J].中国中医药信息杂志,2003,10(5):24-25.
- [4]黄加权,张建军,黄铁军,等.抗肝衰复方结合西医疗重型肝炎临床疗效[J].中西医结合肝病杂志,2006,16(6):329-332.
- [5]Haring J,Perlman S. Mouse hepatitis virus[J]. Curr Opin Microbiol,2001,4(4):462-466.
- [6]宁琴,杨东亮,罗小平,等.暴发型病毒性肝炎小鼠模型的研究及应用[J].中华肝脏病杂志,2002,10(3):224-226.
- [7]薛毅珑,赵世峰.加强我国生物型人工肝系统治疗急性肝衰竭的研究[J].中国危重病急救医学,2000,12(2):67-68.

- [8]洪敏,朱荃,孙小玉,等.茵陈蒿汤保肝作用的机理——对小鼠腹腔巨噬细胞释放 TNF- α 的影响[J].中药药理与临床,1999,15(1):3-6.
- [9]董自波,朱荃,孙小玉,等.茵陈蒿汤醇提物保肝作用分析[J].中国中医药科技,2002,9(2):91-94.
- [10]朱帆,宁琴,陈悦,等.重型乙型肝炎患者肝组织中纤维介素基因的检测及其与临床转归关系的探讨[J].中华肝脏病杂志,2004,12(7):385-388.
- [11]Levy G A, Liu M, Ding J, et al. Molecular and functional analy-

sis of the human prothrombinase gene (HFGL2) and its role in viral hepatitis[J]. Am J Pathol, 2000, 156(4):1217-1225.

- [12]Marsden P A, Ning Q, Fung L S, et al. The Fgl2/fibroleukin prothrombinase contributes to immunologically mediated thrombosis in experimental and human viral hepatitis[J]. J Clin Invest, 2003, 112(1):58-66.

(收稿日期:2006-11-26 修回日期:2007-01-07)

(本文编辑:李银平)

• 经验交流 •

清开灵联用甘露醇治疗急性脑出血的临床观察

黄素梅, 沈 琳

(河南驻马店市第二中医院, 河南 驻马店 463000)

【关键词】 脑出血, 急性; 清开灵注射液; 甘露醇注射液

中图分类号: R255.2; R242 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2007)01-0042-01

2003 年 6—8 月, 我科使用清开灵注射液联用甘露醇注射液静脉滴注(静滴)治疗 30 例急性脑出血患者, 取得较好的疗效, 报告如下。

1 临床资料

1.1 病例: 58 例急性脑出血住院患者均符合全国第一次脑血管会议制定的脑出血诊断标准^[1], 并经头颅 CT 确诊; 均为首次发病, 病程 < 48 h, 伴有明显中枢神经系统功能缺损症状和体征。按随机原则分为两组。治疗组 30 例中男 18 例, 女 12 例; 平均年龄 (62.20 ± 9.25) 岁; 病程 (21.16 ± 16.42) h; 按多田公式计算颅内血肿出血量 (21.16 ± 7.85) ml; 出血部位: 右基底节 18 例, 左基底节 5 例, 丘脑 4 例, 脑叶 2 例, 脑干 1 例。对照组 28 例中男 20 例, 女 8 例; 平均年龄 (58.86 ± 9.04) 岁; 病程 (22.14 ± 12.38) h; 出血量 (20.36 ± 7.68) ml; 出血部位: 右基底节 11 例, 左基底节 10 例, 丘脑 4 例, 脑叶 3 例。

1.2 治疗方法: 两组患者均予一般综合治疗, 如维持水和电解质平衡、抗感染以及对症治疗等, 必要时进行气管插管或气管切开。治疗组给予清开灵注射液 30 ml 加质量分数为 10% 的葡萄糖注射液 500 ml 静滴, 每日 1 次, 连用 7 d; 予质量分数为 20% 的甘露醇 250 ml 脱水降颅压, 6~8 h 1 次, 加压静滴, 3 d 后视

表 1 两组治疗前后出血量及血肿吸收情况比较

组别	例数 (例)	出血量 ($\bar{x} \pm s$, ml)		完全吸收 [例(%)]	部分吸收 [例(%)]
		治疗前	治疗后		
治疗组	30	21.16 ± 7.85	4.78 ± 2.74 ^{**} △	20(66.67) [△]	10(33.33)
对照组	28	20.36 ± 7.68	7.23 ± 3.04	11(39.29)	17(60.71)

注: 与本组治疗前比较: ^{**} $P < 0.01$; 与对照组比较: [△] $P < 0.05$

病情减量或逐渐停用。对照组予 20% 的甘露醇 250 ml 脱水降颅压, 6~8 h 1 次静滴, 3 d 后逐渐减量并停用。

1.3 统计学处理: 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 Ridit 分析, χ^2 检验和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血肿吸收情况比较(表 1): 治疗后 7 d, 头颅 CT 示, 治疗组血肿完全吸收 20 例, 部分吸收 10 例, 血肿周围水肿明显缩小, 有的甚至未见水肿; 对照组完全吸收 11 例, 部分吸收 17 例, 大部分血肿周围水肿明显。说明治疗组脑出血血肿吸收情况明显优于对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 不良反应: 治疗组有 2 例患者出现恶心、呕吐, 减慢输液速度后症状消失。

3 讨论

脑出血属中医“中风”范畴, 本虚标实证, 急性期以标实为主, 多由风、火、痰、瘀之毒雍阻脑络, 脑窍闭塞, 气机失调, 阴阳气血逆乱而为病^[2-4]。清开灵注射液有清热解毒、化痰通络、醒脑开窍之功效, 还有止血作用, 并可促进脑水肿的吸收, 解除脑组织受压, 利于神经功能恢复和昏迷患者苏醒^[5]; 配合甘露醇脱

水降颅压, 患者的临床症状很快缓解。由于甘露醇可通过血脑屏障, 其利尿作用可于静滴后 1 h 内出现, 维持 3~8 h; 并且两药合用可很快降低颅内压, 凉血、止血, 控制症状, 改善人体新陈代谢, 排除毒素, 醒脑开窍, 调节植物神经功能紊乱, 降低机体应激状态, 改善微循环^[3]。

参考文献:

- [1] 中华神经科学会, 中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 379-380.
- [2] 宗武三. 解毒活血法治疗急性脑出血 32 例疗效观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13(4): 218-221.
- [3] 黄炳峰. 醒脑静注射液辅助微创清除术治疗颅内血肿 29 例[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(4): 253-254.
- [4] 杨劲松, 罗治华, 钟妙文. 醒脑开窍活血法治疗高血压性脑出血的临床研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(1): 34-36.
- [5] 高利. 从清开灵注射液的不不良反应谈辩证使用中药注射剂[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(4): 116.

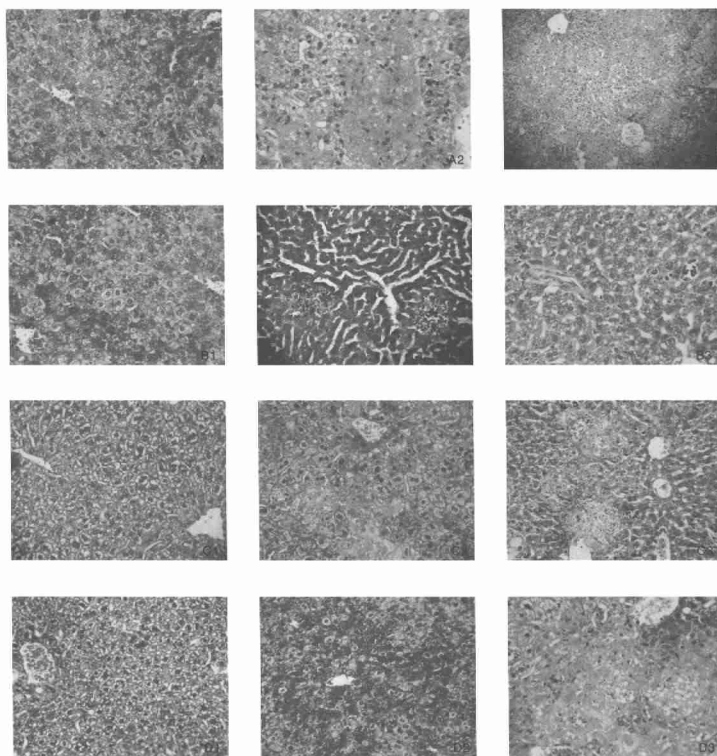
(收稿日期: 2006-11-28)

(本文编辑: 李银平)

作者简介: 黄素梅 (1956-), 女 (汉族), 河南省人, 副主任医师。

3种中药复方干预鼠急性肝功能衰竭效应 及纤维介素表达的比较研究

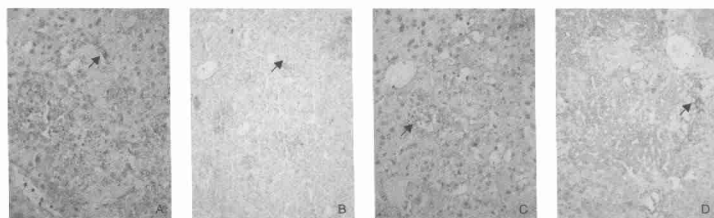
(正文共39页)



A:模型组;B:抗肝衰复方组;C:赤芍复方组;D:急黄汤组;1:1 d;2:2 d;3:3 d

图2 中药复方干预急性肝衰小鼠肝组织形态学变化(HE, x200)

Figure 2 Change of liver tissues histomorphology of acute hepatic failure mice intervened by complex prescriptions of traditional Chinese medicine(HE, x200)



A:模型组;B:抗肝衰复方组;C:赤芍复方组;D:急黄汤组;箭头所示mlg12阳性细胞

图3 中药复方干预对急性肝衰小鼠mlg12的表达(免疫组化, x100)

Figure 3 Expression of mlg12 of acute hepatic failure mice intervened by complex prescriptions of traditional Chinese medicine(immunohistochemistry, x100)