

## ● 实验研究 ●

解毒化瘀颗粒对 D - 半乳糖胺/脂多糖诱导  
急性肝衰竭大鼠的保护作用及机制研究覃艳新<sup>1</sup>, 马玉珍<sup>1</sup>, 蒋 琴<sup>1</sup>, 周玲瑶<sup>1</sup>, 龙富立<sup>2</sup>

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁, 530001;

2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁, 530023)

**[摘要]** 目的:探讨解毒化瘀颗粒对 D - 半乳糖胺/脂多糖诱导急性肝衰竭大鼠的保护作用及机制。方法:将 30 只 SPF 级雄性 wistar 大鼠随机分为治疗组、模型组、空白组,每组各 10 只。治疗组按 10ml/kg 体质量予解毒化瘀颗粒灌胃给药,每天 2 次,共 7d;空白组及模型组给予等体积 0.9% 氯化钠注射液灌胃。于给药第 6 天,模型组与治疗组大鼠予腹腔注射 D - 半乳糖胺(600mg/kg)和脂多糖(20μg/kg)进行造模。24h 后进行静脉取血,采用全自动生化仪检测血清中总胆红素(TBIL)、谷丙转氨酶(ALT)及谷草转氨酶(AST)水平,血栓止血分析仪检测血清中凝血酶原时间(PT)、血浆纤维蛋白(FIB)、活化部分凝血活酶时间(APTT)及凝血酶时间(TT)。处死大鼠取肝组织制备肝组织切片,光镜下观察肝组织结构。结果:与模型组比较,治疗组血清中的 ALT、AST、TBIL 水平明显降低,PT、TT 时间缩短,FIB 水平升高,2 组 ALT、TBIL、FIB 水平及 PT 时间差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。模型组大鼠肝细胞正常结构被破坏程度显著高于治疗组大鼠。结论:解毒化瘀颗粒可以通过改善肝功能、纠正凝血功能异常及减轻病理损伤而保护急性肝衰竭模型大鼠,其作用机制可能为通过 CD4 T 下调 OX40 表达,抑制 CD4 T 活化及向 Th1 细胞分化,从而延缓急性肝衰竭的进一步恶化。

**[关键词]** 急性肝衰竭;大鼠;解毒化瘀颗粒;D - 半乳糖胺/脂多糖;实验研究

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.12.049

**Protective effect of detoxicating and stasis - resolving granules against D - galactosamine/  
lipopolysaccharide - induced acute liver failure in rats and its mechanism of action**

QIN Yanxin<sup>1</sup>, MA Yuzhen<sup>1</sup>, JIANG Qin<sup>1</sup>, ZHOU Lingyao<sup>1</sup>, LONG Fuli<sup>2</sup>

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the protective effect of detoxicating and stasis - resolving granules against D - galactosamine/lipopolysaccharide - induced acute liver failure in rats and its mechanism of action. Methods: A total of 30 specific pathogen - free male Wistar rats were randomly divided into treatment group, model group, and blank group, with 10 rats in each group. The treatment group was intragastrically given detoxicating and stasis - resolving granules by 10ml/kg body weight, twice a day, for 7 days; the blank group and model group were intragastrically given an equal volume of 0.9% sodium chloride injection. D - galactosamine(600mg/kg) and lipopolysaccharide(20μg/kg) were intraperitoneally administered to the model group and treatment group for modeling on the 6th day of administration. Intravenous blood samples were collected at 24 hours after modeling, and tested by an automatic biochemical analyzer for serum levels of total bilirubin(TBIL), alanine aminotransferase(ALT), and aspartate aminotransferase(AST); the samples were also tested by a hemostasis analyzer for prothrombin time(PT), plasma fibrin(FIB), activated partial thromboplastin time(APTT), and thrombin time(TT). The rats were then sacrificed to collect their liver tissue which was prepared into sections; the liver tissue structure was observed under an optical microscope. Results: Compared with the model group, the

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81760844,81503520);广西自然科学基金项目(编号:2015GXNSFAA139208);广西中医药大学校级一般硕士研究生创新项目(编号:YCSY2018026)

第一作者:覃艳新,女,2017 级硕士研究生,研究方向:中医药防治肝病

通讯作者:龙富立,男,医学硕士,副主任医师,研究方向:中西医结合防治肝病, E-mail:longfuli005@163.com

treatment group had lower serum levels of ALT, AST, and TBIL, shorter PT and TT, and elevated FIB level; there were significant differences between the two groups in the levels of ALT, TBIL, and FIB, and PT ( $P < 0.05$ ). The degree of damage of normal structure of liver cells was significantly higher for rats in the model group than in the treatment group. Conclusion: Detoxicating and stasis-resolving granules may exert a protective effect on the rat model of acute liver failure by improving liver function, correcting coagulation abnormality, and alleviating pathological damage; the mechanism of the above process may involve down-regulation of OX40 expression by CD4 T cells, inhibition of activation of CD4 T cells and their differentiation into Th1 cells, thereby delaying further deterioration of acute liver failure.

**[Key words]** acute liver failure; rat; detoxicating and stasis-resolving granule; D-galactosamine/lipopolysaccharide; experimental study

急性肝衰竭为各种肝病终末期的归宿,表现为肝脏的严重损伤,具有发病急、病死率高等特点,虽然目前西医的生物人工肝及肝移植、肝细胞移植等治疗方法取得较大的突破,但其病死率仍在 50% 以上<sup>[1]</sup>。近年来,中医药在防治肝病方面取得显著疗效,探讨中医药治疗肝衰竭具有重要的临床意义。解毒化瘀颗粒源于张仲景《伤寒论》中的茵陈蒿汤,是广西中医药大学第一附属医院毛德文教授根据急性肝衰竭“毒瘀胶结”的病因病理化裁、精炼而成,临床治疗效果证实,其能截断肝衰竭的发展进程,减少并发症,改善预后,提高存活率<sup>[2]</sup>。本研究拟通过实验观察解毒化瘀颗粒对 D-半乳糖胺/脂多糖诱导急性肝衰竭大鼠的生化指标及肝脏组织的影响,并探讨其可能的保护作用机制,为揭示肝衰竭的发病机制提供新的思维方式并为解毒化瘀颗粒临床的推广应用提供理论依据。

## 1 实验材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 30 只,雄性,体质量 ( $250 \pm 30$ ) g,均由广西医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(桂)2009-0002。实验前将动物置于室内温度 ( $20 \sim 25$ ) °C,相对湿度 55% ~ 70% 且通风的环境中,自由进食和饮水。

1.2 药物 解毒化瘀颗粒由茵陈 30g、白花蛇舌草 30g、赤芍 50g、大黄 15g、郁金 15g、石菖蒲 15g 组成;茵陈选用菊科茵陈蒿 *Artemisia capillaris* Thumb. 的干燥幼苗,白花蛇舌草选用茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd 的全草,赤芍选用毛茛科植物芍药 *Paeonialactiflora* Pall 的干燥根,大黄选用蓼科植物正品掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根及根茎,郁金选用姜科广郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥块根,石菖蒲选用天南星科石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎。由广西中医药大学第一附属医院药剂科统一购入,药材鉴别完成后配方,武火急煎 30min 后取药液,浓缩制成煎膏剂,保存。配制成 100g/ml 的药液,每只大鼠灌胃 3ml 左右,按照体质量和给药浓度再稀释到适宜浓度灌胃。D-半乳糖胺、脂多糖均购自于美国 Sigma 公司

1.3 试剂与仪器 苏木素 (Sigma)、伊红 Y (水溶性)、无水乙醇、二甲苯、盐酸、包埋石蜡、中性树胶 (国药集团)。病理切片机 (德国 Leica RM 2016 轮转式切片机);切片刀 (日本

羽毛 R35 一次性刀片);组织摊烤片机 (武汉俊杰 JK-6 生物组织摊烤片机);载玻片及盖玻片 (江苏世泰实验器材有限公司);显微镜 (奥林巴斯 BX53 型生物显微镜)。

## 2 实验方法

2.1 急性肝衰竭大鼠模型制备 大鼠急性肝衰竭造模参考文献<sup>[3]</sup>中所提出的方法,以腹腔注射给予 600mg/kg D-半乳糖胺和 20μg/kg 脂多糖为构建急性肝衰竭大鼠的最佳剂量组合。

2.2 分组与给药 将 30 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、治疗组各 10 只。治疗组:解毒化瘀颗粒药液 (灌胃) + 造模药物 (注射);模型组:0.9% 氯化钠注射液 (灌胃) + 造模药物 (注射);正常组:0.9% 氯化钠注射液 (灌胃) + 0.9% 氯化钠注射液 (注射)。中药给药浓度为 57.55g/kg,给药体积 10ml/kg,灌胃时间:每天 8:00、20:00 各 1 次,总疗程为 7d。第 6 天治疗组及模型组给予造模药物腹腔注射、正常组给予等体积 0.9% 氯化钠注射液腹腔注射。

2.3 指标采集与检测 (1)血清标本采集。在成模后 24h,每组各取 3 只大鼠,经 1% 戊巴比妥钠麻醉后,腹主动脉采血,离心收集血清。采用全自动生化仪检测肝功能总胆红素 (TBiL)、谷丙转氨酶 (ALT) 及谷草转氨酶 (AST);血栓止血分析仪检测凝血酶原时间 (PT)、血浆纤维蛋白 (FIB)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 及凝血酶时间 (TT)。(2)肝脏标本。采血后剖取大鼠肝脏, PBS 洗净肝组织,严格按照组织脱水、组织透明、浸蜡、包埋、切片和烤片、切片脱蜡等 HE 染色实验步骤进行染色,最后在显微镜下观察肝脏组织结构。

2.4 统计学方法 所有实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件包进行相关统计学分析,数据分析采用单因素方差分析及组间 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 实验结果

3.1 各组肝功能指标的比较 治疗组血清中的 ALT、AST、TBIL 水平较模型组明显降低,2 组 ALT、TBIL 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。(见图 1)

3.2 各组凝血功能指标的比较 与模型组比较,治疗组可显著缩短 PT、TT 时间,提高 FIB 水平,PT 时间与 FIB 水平差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。(见图 2)

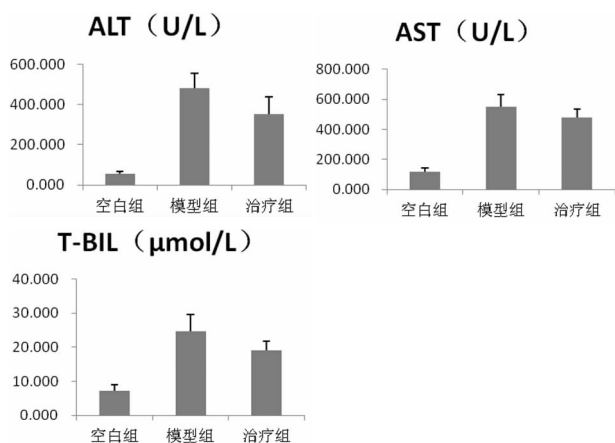


图 1 各组肝功能指标的比较

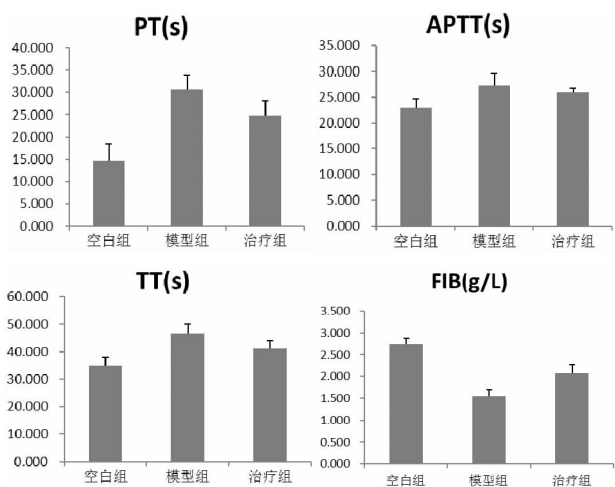


图 2 各组凝血功能指标的比较

3.3 各组肝脏病理损伤情况 模型组大鼠肝细胞正常结构被破坏,肝小叶排列紊乱,肝细胞大片变性、坏死,汇管区大量淋巴细胞浸润且有大量胶原纤维增生,组织增生明显。治疗组大鼠部分肝细胞正常结构被破坏且发生变性,汇管区有淋巴细胞浸润,未见大面积坏死特征,部分区域肝小叶排列整齐。正常组大鼠肝小叶结构正常,肝索肝细胞排列规整,肝细胞无肿胀,无胆管增生,无瘀胆及淋巴细胞浸润,未见肝纤维化及肝细胞坏死。(见图 3)

#### 4 讨 论

肝衰竭是多种因素引起的严重肝脏损害,导致其合成、解毒、排泄和生物转化等功能发生严重障碍或失代偿,出现以凝血功能、黄疸、肝性脑病、腹水等为主要表现的一组临床症候群<sup>[4]</sup>。早期受医疗条件的限制,患者病死率高达 80% 左右<sup>[5]</sup>,随着近年来医疗技术的发展及人工肝支持系统的开发和普及应用,内科综合治疗肝衰竭的水平得到较大的提高,但本病的病死率仍维持在 50% 以上<sup>[1]</sup>。治疗陷入了瓶颈期,归根到底是对该病的发病机制未能明确掌握,因此,深入探索肝衰竭发病机制,扫除在有效防治策略建立上的障碍迫在眉睫。

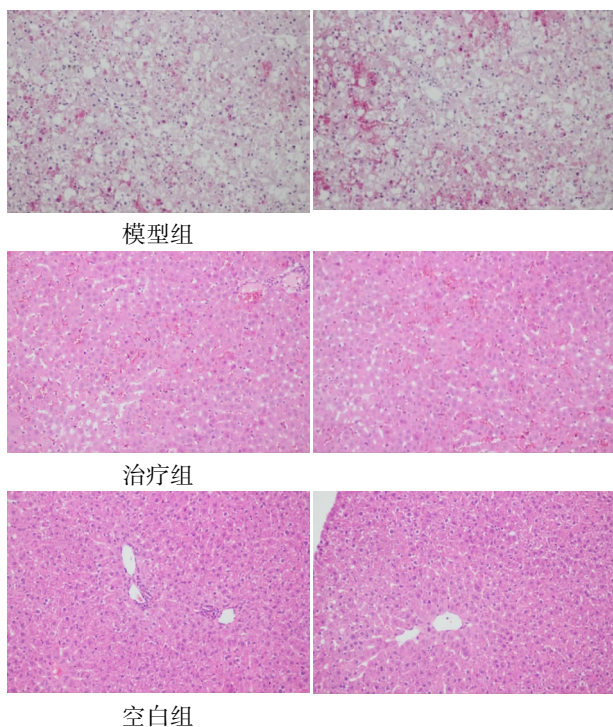


图 3 各组肝脏组织病理检查结果

目前对于急性肝衰竭的发病机制建立了不少假说,如“病毒致病的免疫复合物学说”“内毒素致病学说”、以  $\text{TNF}-\alpha$  为核心的“细胞因子学说”“脂质过氧化学说”“细胞凋亡学说”“三重打击”学说等<sup>[6]</sup>。不难发现,这些学说均只是倾向于急性肝衰竭某一方面的发病机制,因此临床上针对发病机制中的某些方面所采取的相应治疗措施,其疗效与我们企望的相距甚远,甚至出现无效现象。这给我们以启示与反思:急性肝衰竭的发病机制很可能是一个复杂的系统,我们只有从整体的、系统的层面进行研究才有可能认识其全貌,并最终攻克该疾病。

解毒化瘀颗粒源于张仲景《伤寒论》中的茵陈蒿汤,由毛德文教授根据急性肝衰竭“毒瘀胶结”的病因病理化裁、精炼而成,方中茵陈、白花蛇舌草、大黄、赤芍、石菖蒲、郁金,具有清热解毒、活血化瘀、豁痰醒神的功效。王娜等<sup>[7]</sup>研究发现该药对乙型慢加急性肝衰竭具有改善肝功能、凝血功能,提高患者存活率的效用。临床基础研究证实其可以通过调节  $\text{IL}-2$ 、 $\text{TLR4}$  和  $\text{PCNA}$  的表达水平,降低肿瘤坏死因子- $\alpha$  ( $\text{TNF}-\alpha$ )、白细胞介素-6 ( $\text{IL}-6$ ) 促炎因子的水平,提高  $\text{IL}-10$  抗炎因子的水平,从而减轻大鼠的肝损伤<sup>[8-9]</sup>。同时,研究显示,该药通过提高肝细胞在 S 期 DNA 复制,从而促进其增殖与分裂,调节  $\text{NR1}$  和  $\text{iNOSmRNA}$  表达,上调  $\text{NOc GMP}$  信号转导通路,促进肝细胞再生,下调内毒素肝损伤肝细胞  $\text{Caspase}-3$  表达并抑制其凋亡效应,从而降低肝衰竭小鼠病死率<sup>[10-12]</sup>;通过降低 ACLF 患者外周血  $\text{CD4}^+$  细胞中  $\text{IL}-17$  细胞的细胞数量,从而降低  $\text{Th17}$  细胞的频率,干预  $\text{Th17}$  细胞介导的免疫应答,达到改善 ACLF 患者预后的目的<sup>[13]</sup>。

解毒化瘀颗粒具有中药方剂多成分、多靶点、多系统性的共性特点,虽然目前其在治疗肝衰竭方面取得显著的效果,但其疗效机制与肝衰竭的发病机制关系尚未能完全证实,有待我们进一步深入挖掘。张春盼等<sup>[14]</sup>在探索共刺激分子 OX40 在 D-半乳糖胺/脂多糖诱导的急性肝衰竭中的作用及其相关机制中发现,肝组织内 CD4 T 细胞表达 OX40 分子明显增高,而 CD8 和 NK 细胞表达没有明显变化;OX40 敲除后,可显著降低外周血中 CD4 T 细胞比率并减少其活化,同时也可降低肝组织内 CD4 T 细胞的活化,减少肝内 CD4 T 细胞分泌 IFN- $\gamma$ ,从而减轻其肝脏损伤。在急性肝衰竭中,CD4 T 上调 OX40 表达,促进 CD4 T 活化及向 Th1 细胞分化,从而加重急性肝衰竭发生、发展。故认为 OX40 可以作为急性肝衰竭中适应性免疫活化的重要标志,也可以作为急性肝衰竭的潜在治疗靶点。本次实验研究亦以 D-半乳糖胺/脂多糖诱导急性肝衰竭大鼠模型探讨解毒化瘀颗粒的疗效,结果显示其能显著改善生化指标及肝脏病理损伤。前期的研究证实其确实有降低 ACLF 患者外周血 CD4<sup>+</sup>细胞的作用,但其作用机制是否也是通过 CD4 T 下调 OX40 表达,抑制 CD4 T 活化及向 Th1 细胞分化,从而延缓急性肝衰竭的发生、发展,相关研究尚未见报道,这值得我们进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Bernal W, Jalan R, Quaglia A, et al. Acute-on-chronic liver failure[J]. Lancet, 2015, 386(10003): 1576-1587.
- [2] 邱华,毛德文,黄彬,等. 解毒化瘀颗粒对慢性重型肝炎患者预后的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2007, 17(5): 259-260.
- [3] Liu S, Zheng M, Li Zhuoliang. The protective effects of thalidomide on acute liver failure[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 1999, 38(10): 688-690.
- [4] 中国医学学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2012 年版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2012, 5(6): 321-327.
- [5] Wlodzimierz KA, Eslami S, Abu-Hanna A, et al. Systematic review: acute liver failure-one disease, more than 40 definitions[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 35(11): 1245-56.
- [6] Ye YL, Gao ZL. Three attacks in the development of HBV-related liver failure[J]. Infect DisInfo, 2009(22): 276-279.
- [7] 王娜,王沙,唐农,等. 以解毒化瘀颗粒为主导中西医结合治疗乙型慢急性肝衰竭的临床研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2014, 24(4): 207-209.
- [8] Minggang Wang, Qinglan Shi, Rongzhen Zhang, et al. Herbal compound "Jiedu Huayu" reduces liver injury in rats via regulation of IL-2, TLR4, and PCNA expression levels[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017(8): 1-9.
- [9] 龙富立,陈小明,谢丽,等. 解毒化瘀颗粒对急性肝衰竭大鼠细胞因子及肝组织的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(20): 101-105.
- [10] 毛德文,陈月桥,余晶,等. 解毒化瘀颗粒对急性肝衰竭小鼠肝细胞 Caspase-3 mRNA 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2251-2254.
- [11] 石清兰,王明刚,毛德文,等. 解毒化瘀颗粒影响急性肝衰竭大鼠肝细胞周期的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(7): 1511-1513.
- [12] 石清兰,毛德文,龙富立,等. 解毒化瘀颗粒调控肝细胞再生 NO/cGMP 信号转导通路的分子机制研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 1016-1018.
- [13] 龙富立,陈小明,王娜,等. 基于 IL-17 在 CD4<sup>+</sup>-T 细胞表达比例观察解毒化瘀颗粒对慢急性肝衰竭预后干预的研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(4): 796-798.
- [14] 张春盼,金华,孙广永,等. OX40 在 D-半乳糖胺/脂多糖诱导的急性肝衰竭中的作用及机制研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(7): 673-677. (收稿日期: 2018-07-13)
- [15] 膝关节功能康复[J]. 江西中医药, 2005(9): 37-38.
- [12] 吴丽梅,陈小凤. CPM 加中药熏洗在膝部手术后关节功能康复的效果观察与护理[J]. 吉林医学, 2006(4): 356-357.
- [13] 崔快. 中药熏洗配合 CPM 机治疗胫骨平台骨折术后关节功能障碍的临床观察[C]//2014 年河南省中医、中西医结合护理学术交流会论文集. 河南: 河南省护理学会, 2014: 31-33.
- [14] 蔡金秀,陈潇,韩廷成,等. 加味海桐皮汤熏蒸联合 CPM 机在膝关节术后功能康复中的应用[J]. 齐鲁护理杂志, 2017, 23(2): 66-68.
- [15] 高宏. 膝关节僵直原因及治疗[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2010, 16(4): 510-513.
- [16] 冯峰,秦克枫. 自由基清除剂防治肢体缺血/再灌注损伤的临床应用[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2002, 10(1): 21-23.
- [17] Bellamy N, Buchanan W. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinical important patient relevant outcomes to Antirheumatic drug therapy in patient with OA of the hip/knee[J]. Rheumatol, 1988, 15(12): 1833-1840. (收稿日期: 2018-01-18)

(上接第 112 页)

- [5] 郭丽君. 中药熏洗配合 CPM 机功能锻炼治疗膝关节功能障碍的疗效观察[J]. 光明中医, 2017, 32(1): 62-63.
- [6] 王雷,李无阴,付晓芳,等. 中药熏洗联合 CPM 机对全膝关节置换术后功能恢复的影响[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(15): 105-107.
- [7] 王顺志,黎意丰,罗定标,等. 中药熏洗合 CPM 机锻炼对胫骨平台骨折术后膝关节功能的影响[J]. 中医药导报, 2012, 18(2): 58-60.
- [8] 姜海华,郑金英,刘日才,等. 中药熏洗结合康复治疗术后膝关节活动障碍 50 例[J]. 浙江中西医结合杂志, 2011, 21(3): 176-177.
- [9] 王小军,曹岐新,沈新云. 中药熏洗结合 CPM 机训练对膝关节术后患膝功能恢复的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(5): 403-404.
- [10] 张征敏. 中药熏洗配合 CPM 改善胫骨平台骨折术后膝关节功能的临床观察[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.
- [11] 周建宏,陈优民,吴守群. CPM 配合中药熏洗促进骨折术后