

祛瘀和养阴不同功效中医经典方剂抑制 CCl₄ 诱导大鼠肝硬化的作用机制*

慕永平¹ 刘平^{1**} 都广礼² 王磊¹ 龙爱华¹ 刘莺³ 李风华¹

上海中医药大学 1. 肝病研究所, 上海市高校中医内科 E-研究院; 2. 中药学院; 3. 科技实验中心; 上海 201203

摘要 探讨了祛瘀的下瘀血汤和养阴的一贯煎抑制 CCl₄ 诱导的大鼠肝硬化形成的不同作用机制。采用方法为给大鼠先皮下注射 CCl₄ 3 mL/kg, 然后注射 50% CCl₄ 橄榄油溶液 2 mL/kg, 每周 2 次, 第 9 周开始随机将大鼠分为模型对照组、下瘀血汤组及一贯煎组, 药物干预的同时继续 CCl₄ 诱导建立大鼠肝硬化模型, 至 12 周末取材。检测指标为: 肝组织病理学; 肝组织羟脯氨酸含量; 肝组织 α -SMA, CD68, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2 蛋白表达; MMP-2, MMP-9 的活性; 肝细胞凋亡指数及 Caspase-12, HGF₁ 蛋白表达。结果显示: (1) 与正常大鼠比较, 模型大鼠 8 周时 α -SMA, CD68, TIMP-1 蛋白表达显著增加, 12 周时显著高于 8 周模型对照组; MMP-13, HGF₁, TIMP-2 蛋白表达逐渐降低, 各时间点相互比较具有显著性差异; MMP-2, MMP-9 活性 4 周时显著升高, 8 周时较 4 周略有升高, 12 周时显著高于 8 周模型对照组; 肝细胞凋亡指数, Caspase-12 蛋白表达量逐渐增加, 且各时间点比较均具有显著性差异。(2) 与同期模型对照组比较, 干预组 MMP-9 活性及 MMP-13, TIMP-2, HGF₁ 蛋白表达量均显著增加, 其中下瘀血汤组 MMP-9, MMP-13 显著高于一贯煎组, 一贯煎组 TIMP-2, HGF₁ 显著高于下瘀血汤组; 干预组 MMP-2 活性, TIMP-1 蛋白表达显著降低, 且一贯煎组显著低于下瘀血汤组; 一贯煎组肝细胞凋亡指数, Caspase-12 蛋白表达量显著减少。由此得出结论: 祛瘀的下瘀血汤和养阴的一贯煎均可有效地抑制 CCl₄ 诱导的大鼠向肝硬化发展, 下瘀血汤的主要作用在于提高 MMP-9 的活性及 MMP-13 的蛋白表达, 其祛瘀作用的主要机制是促进胶原纤维的降解; 而抑制肝细胞凋亡和肝星状细胞的活化是一贯煎养阴的主要作用途径。

关键词 肝硬化 MMPs TIMPs HGF₁ 肝细胞凋亡 下瘀血汤 一贯煎

肝硬化是一难治性病变, 目前西医学仍无有效的对策, 而传统中医药却显示出明显的治疗优势。我们基于中医临床实践对肝炎后肝硬化基本证候病机“血瘀阻络、气阴两虚、湿热内蕴”的共识, 针对基本证候病机, 选择代表性的经典方剂, 包括活血祛瘀的下瘀血汤、养阴的一贯煎、益气的黄芪汤、清热利湿的茵陈蒿汤以及小柴胡汤(和解少阳方剂为对照)对 CCl₄ 诱导的大鼠肝硬化形成期进行

了干预治疗的对照研究, 药效学显示只有下瘀血汤和一贯煎可显著改善肝功能(数据另发)。本文试图进一步从促进增生纤维结缔组织的降解及保护肝细胞、抑制肝细胞凋亡的不同角度, 探讨下瘀血汤、一贯煎抑制成型期大鼠肝硬化的祛邪与扶正的作用特征, 为祛瘀与养阴治法干预大鼠肝硬化形成提供科学证据, 现将研究结果报告如下。

2005-12-02 收稿, 2006-02-22 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 90409020)、上海市自然科学基金(批准号: 02JC14024)、上海市教育委员会 E-研究院建设计划项目(批准号: E03008)和上海市重点学科建设项目(批准号: Y0302)资助

** 通讯作者, E-mail: liuping@shutcm.com

1 材料与方 法

1.1 动物

Wistar 雄性大鼠 65 只, 清洁级, 体重 130—150 g, 购自中国科学院上海实验动物中心. 大鼠在上海中医药大学实验动物中心饲养、造模和观察, 自由饮食.

1.2 药物与试剂

下瘀血汤(桃仁、制大黄、地鳖虫的配伍比例为 1:1:0.6)和一贯煎(北沙参、麦冬、生地、枸杞子、当归、川楝子的配伍比例为 1:1:1:1.8:1.2:0.45)所含的生药购自上海华宇药业有限公司, 有明确的原产地, 经生药学专家鉴定, 按照原方比例和制法由上海中医药大学附属曙光医院国家中医药管理局中药制剂中心一次制备干燥后冷藏备用. CCl_4 (分析纯)和橄榄油为中国医药集团上海化学试剂公司产品; 羟脯氨酸(Hyp)标准品购自日本ナカテイツク株式会社; 小鼠抗 α -SMA 单克隆抗体购自 BIODSIGN 公司; 小鼠抗 CD68 单克隆抗体购自 Serotec 公司; 山羊抗大鼠 MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, Caspase-12 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 兔抗大鼠 HGF 多克隆抗体购自 Assay Designs Inc 公司; 小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体购自 KangChen 公司; 肝细胞凋亡原位检测试剂盒购自 CHEMICON 公司.

1.3 模型制备

首次以 CCl_4 3 mL/kg 剂量皮下注射给大鼠, 以后以 50% CCl_4 橄榄油溶液 2 mL/kg 皮下注射, 每周 2 次, 共 12 周.

1.4 分组与给药

于 4 周、8 周末随机抽取正常与模型大鼠各 6 只, 处死作动态观察. 其余 28 只模型大鼠于造模 8 周末, 随机分为模型对照组(10)、下瘀血汤组(9)、一贯煎组(9)干预治疗; 自第 9 周开始, 于继续造模的同时, 药物干预组按成人(65 kg)kg 体重日用量的 8 倍, 即下瘀血汤 0.36 g/kg(相当于生药 3.2 g/kg), 一贯煎 2.628 g/kg(相当于生药 7.938 g/kg), 分别用蒸馏水 10 mL 稀释灌胃, 每日 1 次, 共计 4 周. 同期正常对照组大鼠(8 只)皮下注射等量的橄榄油溶液, 并与模型对照组大鼠以

同体积生理盐水灌胃.

1.5 样品的采集和处理

造模 12 周结束, 大鼠以 2% 戊巴比妥钠 2 mL/kg 剂量腹腔注射麻醉后, 仰卧位固定, 打开腹腔, 经下腔静脉采血, 从肝右叶切取 1.0 cm \times 0.8 cm \times 0.3 cm 大小肝组织 1 块, 10% 中性福尔马林固定, 脱水, 包埋, 切片, HE 及胶原染色, 观察组织学变化; 其余肝组织 -70°C 保存, 进行蛋白印迹及胶原酶活性测定.

1.6 观测指标与方法

肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量测定参照 Jamall 等的方法进行^[1].

肝组织 α -SMA, CD68, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, Caspase-12, HGF 蛋白表达采用 Western blot 方法检测, 具体为每组取 4 个样本, 提取总蛋白, 经 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜后加入一抗稀释液(α -SMA, CD68, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, Caspase-12, HGF. 抗体均为 1:100 稀释)4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 经洗涤后与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗室温孵育 1 h, 再洗涤, ECL 显影、曝光. 同一张膜封闭, 加入 GAPDH 抗体稀释液(1:100)作为内参照, 余法同前. 应用复日 FR-980 生物电泳图像分析系统分析底片中的目的条带, 计算机自动读取并记录每条带的积分值, 以样品积分值/内参照积分值比值进行统计学分析.

MMP-2 和 MMP-9 的活性检测: 采用明胶酶法, 每组取 4 个样本, 提取总蛋白, 在非变性条件下 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶(含 0.1% 的明胶)中电泳, 洗脱、孵育、染色及脱色, 采用复日 FR-980 生物电泳图像分析系统在灰阶模式下扫描电泳凝胶, 并分析 MMPs 活性条带积分值, 以样品积分值进行统计学分析.

肝细胞原位凋亡检测: 参考 CHEMICON 公司肝细胞凋亡原位检测试剂盒说明书方法进行. 凋亡肝细胞形态学识别参考 Shi 等的方法^[2], 即对于模型组及药物干预组, 在脂肪变性肝细胞中凡满足下列条件之一者即确定为肝细胞凋亡: (1) 核呈新月牙状; (2) 核浓缩; (3) 核碎裂; (4) 出现凋亡小体. 凋亡细胞的计数采用每组取 5 个样本, 每个样本计数 5 个不同视野凋亡肝细胞的总数.

计量资料用统计分析软件 SPSS11.5 中的 ANO-

VA 程序进行单因素方差分析, q 检验, 并用 LSD 进行两两比较.

2 结果

2.1 肝组织病理学变化

HE 染色显示正常大鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列. 与正常大鼠比较, 4 周后模型大鼠可见以中央静脉为中心的肝

细胞脂肪变性, 已有极非薄的胶原纤维在脂肪变区域伸展; 8 周后, 模型大鼠肝细胞脂肪变性累及整个肝小叶, 可见较细的胶原纤维形成不完全包绕; 12 周后, 正常肝小叶结构消失, 大量的纤维结缔组织增生, 形成大小不一的典型假小叶结构, 间隔内可见大量的成纤维细胞和炎性细胞浸润. 与 12 周模型比较, 下瘀血汤组、一贯煎组大鼠肝细胞脂肪变性程度较轻, 少见完整的假小叶结构(图 1).

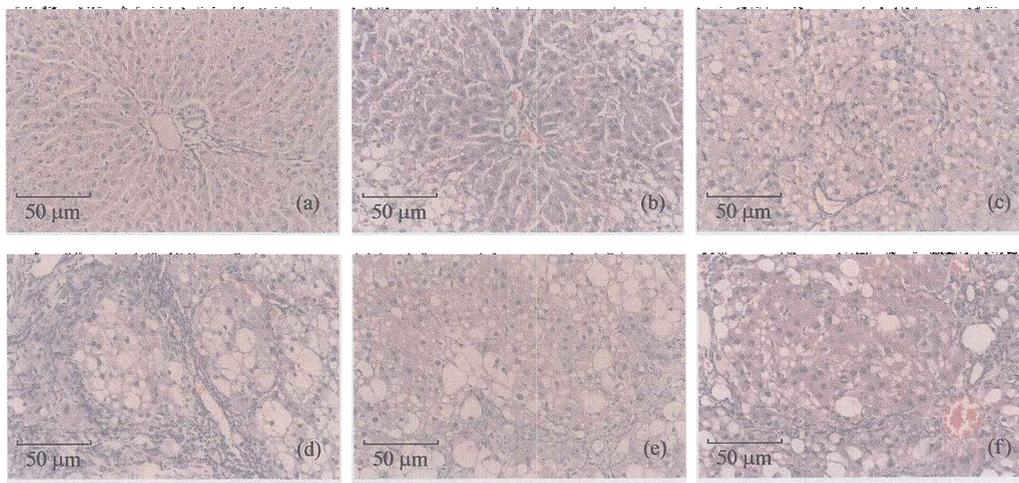


图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色

(a) 正常组; (b) 4 周模型对照组; (c) 8 周模型对照组; (d) 12 周模型对照组; (e) 下瘀血汤组; (f) 一贯煎组

天狼星红胶原染色显示正常大鼠仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维. 4 周模型大鼠胶原纤维呈星芒状在脂肪变区域伸展, 中央静脉管壁明显增厚; 8 周模型大鼠纤维间隔增厚, 少数向小叶内延伸, 极少部分形成较疏松的纤维包绕肝细胞; 12

周模型大鼠纤维间隔增宽致密, 形成大小不一的完整假小叶结构. 与 12 周模型组比较, 下瘀血汤组、一贯煎组纤维间隔明显减少, 少见完整包绕的假小叶结构(图 2).

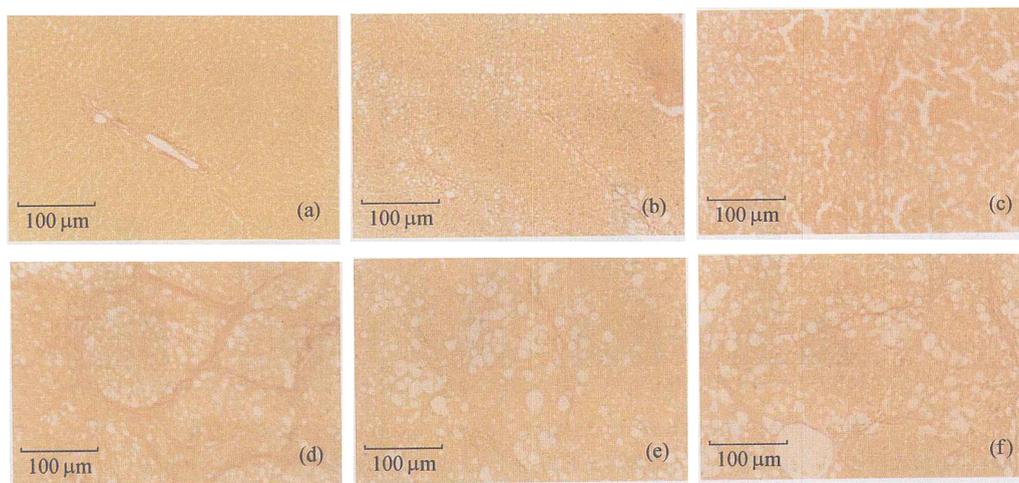


图 2 各组大鼠肝组织天狼星红染色

(a) 正常组; (b) 4 周模型对照组; (c) 8 周模型对照组; (d) 12 周模型对照组; (e) 下瘀血汤组; (f) 一贯煎组

2.2 肝组织 Hyp 含量变化

与正常大鼠比较, 4, 8, 12周时模型大鼠肝组织 Hyp 含量均显著升高($p < 0.01$), 且12周显著高于4, 8周模型对照组($p < 0.01$). 与12周模型对照组比较, 下瘀血汤组、一贯煎组 Hyp 含量显著降低($p < 0.05$ 或 0.01)(表1).

表1 各组大鼠肝组织 Hyp 含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Hyp($\mu\text{g/g}$ 湿肝)
正常组	8	195.83 \pm 7.16*
4周模型对照组	6	312.85 \pm 70.83***
8周模型对照组	6	461.33 \pm 51.74***
12周模型对照组	10	818.42 \pm 67.95
下瘀血汤组	9	626.60 \pm 105.05***
一贯煎组	9	665.8 \pm 157.73**

与4, 8, 12周模型对照组比较, * $p < 0.01$; 与12周模型对照组比较, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

2.3 CD68, α -SMA, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2 蛋白表达的变化

正常大鼠有少量 CD68 和 TIMP-1 蛋白表达; 模型大鼠4周时无明显变化, 8周时两者表达量均显著增加($p < 0.01$); α -SMA 在正常组、4周模型对照组无明显表达, 造模8周时有少量表达; 12周时 CD68, α -SMA, TIMP-1 表达量均显著高于8周模型对照组($p < 0.01$); MMP-13 和 TIMP-2 在正常大鼠有明显表达, 模型大鼠随着肝脏病变的进展而逐渐下降, 且比较各时间点均具有显著性差异($p < 0.01$). 与12周模型对照组比较, 下瘀血汤组、一贯煎组 CD68, MMP-13, TIMP-2 蛋白表达量均显著增加($p < 0.01$), 且下瘀血汤组 MMP-13 显著高于一贯煎组($p < 0.01$), 一贯煎组 TIMP-2 显著高于下瘀血汤组($p < 0.01$); 两组 α -SMA、TIMP-1 蛋白表达量显著降低($p < 0.01$), 且一贯煎组显著低于下瘀血汤组($p < 0.01$)(图3).

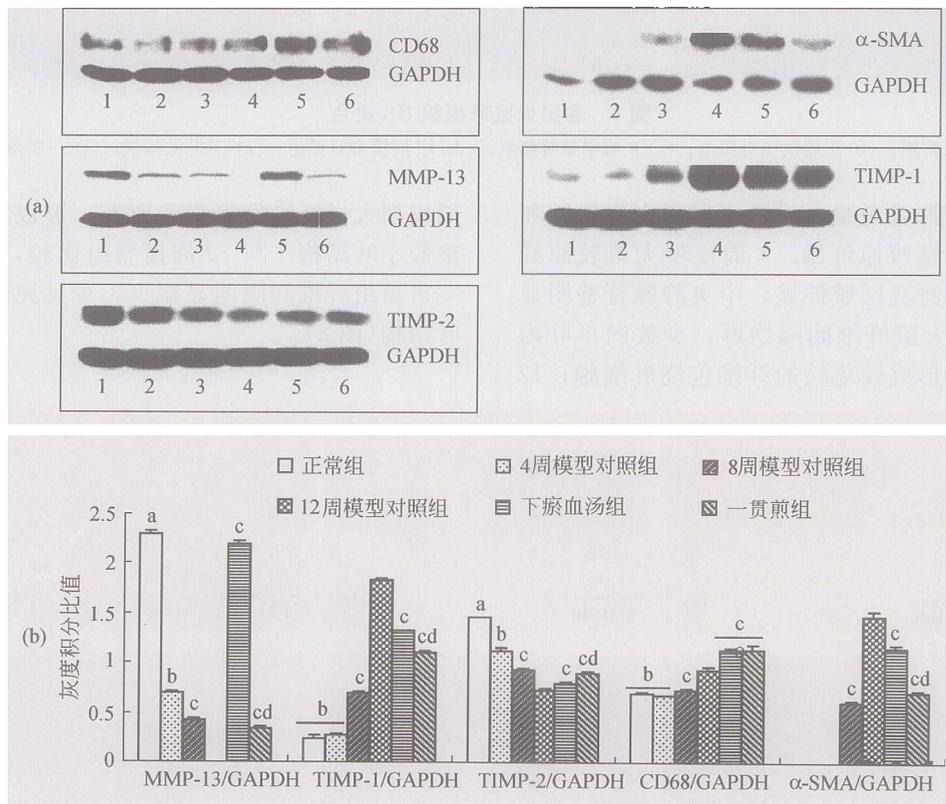


图3 MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, CD68, α -SMA 蛋白的表达变化

(a) 蛋白免疫印迹. 1, 正常组; 2, 4周模型对照组; 3, 8周模型对照组; 4, 12周模型对照组; 5, 下瘀血汤组; 6, 一贯煎组. (b) 灰度积分比值. a, 与各时间点模型组比较 $p < 0.01$; b, 与8周、12周模型组比较 $p < 0.01$; c, 与12周模型组比较 $p < 0.01$; d, 与下瘀血汤组模型组比较 $p < 0.01$

2.4 MMP-2, MMP-9 活性的变化

正常组 MMP-2, MMP-9 活性较低; 与正常组比较, 造模 4 周时 MMP-2, MMP-9 活性显著升高 ($p < 0.01$), 8 周时较 4 周略有升高, 12 周时两者均显著升高, 尤以 MMP-2 为著, 与 8 周模型对照

组比较均具有显著性差异 ($p < 0.01$). 与 12 周模型对照组比较, 下瘀血汤组和一贯煎组 MMP-2 活性显著降低 ($p < 0.01$), 且一贯煎组显著低于下瘀血汤组 ($p < 0.01$); MMP-9 活性显著升高 ($p < 0.01$), 且下瘀血汤组显著高于一贯煎组 ($p < 0.01$) (图 4).

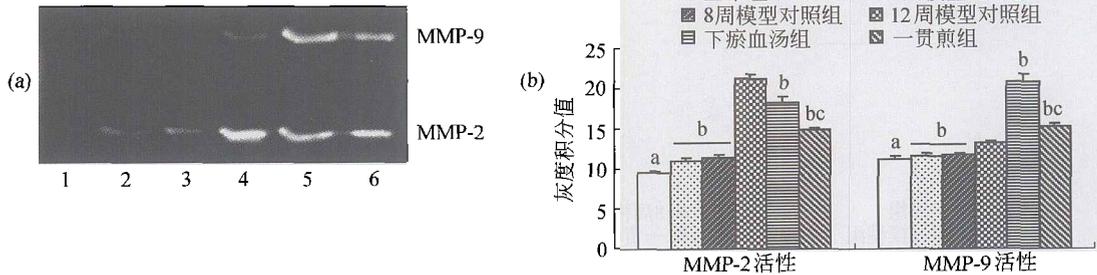


图 4 MMP-2 和 MMP-9 活性的变化

(a) 明胶酶图. 1, 正常组; 2, 4 周模型对照组; 3, 8 周模型对照组; 4, 12 周模型对照组; 5, 下瘀血汤组; 6, 一贯煎组. (b) 灰度积分比值. a, 与 4 周、8 周、12 周模型组比较, $p < 0.01$; b, 与 12 周模型组比较, $p < 0.01$; c, 与下瘀血汤组比较, $p < 0.01$

2.5 MMP-2/TIMP-2 和 MMP-9/TIMP-1 比值变化

与正常大鼠比较, 模型大鼠 MMP-2/TIMP-2 比值逐渐升高, 比较各时间点均具有显著性差异 ($p < 0.01$); MMP-9/TIMP-1 比值 4 周时开始下降, 但无显著性差异 ($p > 0.05$), 8 周时显著降低 ($p < 0.01$), 12 周时进一步降低且显著低于 8 周模型对照组 ($p < 0.01$). 与 12 周模型对照组比较, 下瘀血汤组、一贯煎组 MMP-2/TIMP-2 比值显著降低, 且一贯煎组显著低于下瘀血汤组 ($p < 0.01$); MMP-9/TIMP-1 比值显著升高 ($p < 0.01$), 且下瘀血汤组显著高于一贯煎组 ($p < 0.05$) (图 5).

2.6 肝细胞凋亡指数, Caspase-12 和 HGF α 的变化

正常大鼠有少量肝细胞凋亡和微量 Caspase-12 蛋白表达, 随着造模时间的延长, 肝细胞凋亡指数和 Caspase-12 蛋白表达量逐渐增加, 且不同时间点 (4, 8, 12 周) 之间比较均具有显著性差异 ($p < 0.05$ 或 0.01); 与 12 周模型对照组比较, 一贯煎组肝细胞凋亡指数和 Caspase-12 蛋白表达量显著减少 ($p < 0.001$), 下瘀血汤组无显著性差异 ($p > 0.05$). HGF α 表达量在正常大鼠最高, 随着肝脏病变的进展而逐渐减少, 12 周时最低, 与 4 周、8 周模型组比均具有显著性差异 ($p < 0.01$); 与 12 周模型对照组比较, 下瘀血汤组、一贯煎组 HGF α 蛋白表达量显著增加 ($p < 0.01$), 且一贯煎组显著高于下瘀血汤组 ($p < 0.05$) (图 6).

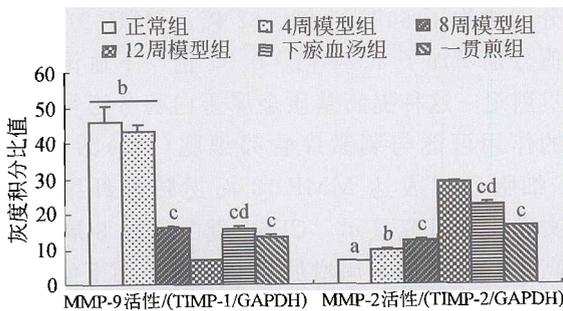


图 5 MMP-9/TIMP-1 和 MMP-2/TIMP-2 比值的变化

a, 与 4 周、8 周、12 周模型组比较, $p < 0.01$; b, 与 8 周、12 周模型组比较, $p < 0.01$; c, 与 12 周模型对照组比较, $p < 0.01$; d, 与一贯煎组比较, $p < 0.05$

3 讨论

根据肝组织病理及 Hyp 含量变化, CCl $_4$ 诱导的大鼠肝硬化模型在 4 周至 8 周为肝纤维化进展期, 胶原纤维逐渐增加, Hyp 含量分别增加了 0.598 倍和 1.36 倍; 8 周至 12 周为肝硬化形成期, 逐渐形成完整的假小叶结构, Hyp 含量增加了 3.18 倍. 本文结合临床实际, 以肝硬化形成阶段为药物的干

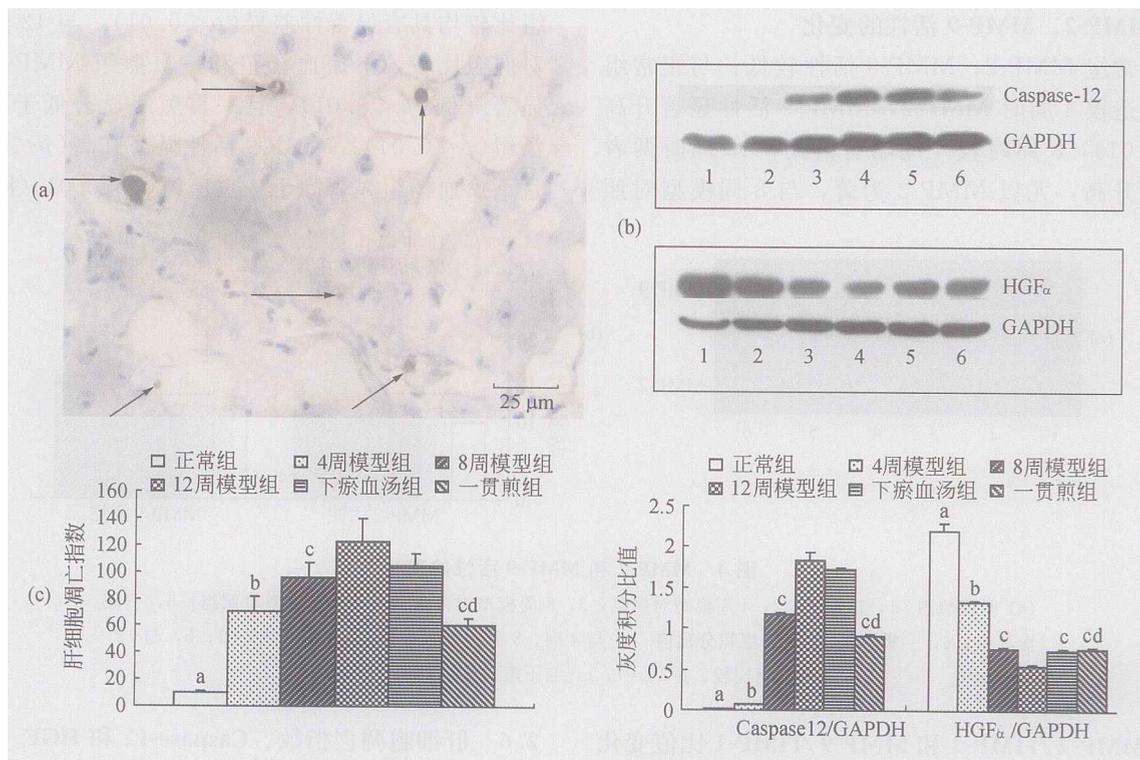


图6 肝细胞凋亡指数及Caspase-12, HGF α 蛋白表达的变化

(a) 肝细胞凋亡照片, 箭头示凋亡肝细胞; (b) Caspase-12, HGF α 蛋白印迹. 1, 正常组; 2, 4周模型对照组; 3, 8周模型对照组; 4, 12周模型对照组; 5, 下瘀血汤组; 6, 一贯煎组; (c) 肝细胞凋亡指数, Caspase-12, HGF α 蛋白印迹灰度积分比值. a, 与各时间点模型组比较, $p < 0.01$; b, 与8周模型组比较 $p < 0.01$; c, 与12周模型组比较, $p < 0.05$ 或 0.01 ; d, 与下瘀血汤组比较, $p < 0.05$ 或 0.01

预点, 探讨不同功效中医经典方剂抑制肝硬化形成的作用机制. 结果显示, 12周时模型大鼠 MMP-2/TIMP-2 比值较正常大鼠增加了 3.42 倍, MMP-13 蛋白表达量和 MMP-9/TIMP-1 比值分别较正常大鼠降低了 99.8% 和 84.3%; 肝细胞凋亡指数和 Caspase-12 蛋白表达量分别较正常组增加了 11.79 倍和 130.43 倍; HGF α 蛋白表达量较正常大鼠降低了 75.1%. 表明在 CCl $_4$ 诱导的大鼠肝硬化形成阶段有其综合的病理特征, 即促进胶原合成的因素增加、胶原降解代谢减少、肝细胞凋亡增加、以及肝细胞增殖障碍等病理因素同时并存, 复杂的病理变化可能构成不同功效方剂作用的病理基础.

3.1 提高基质金属蛋白酶的分泌量及其活性是下瘀血汤的主要作用途径

基质金属蛋白酶(MMPs)与组织金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)在正常情况下处于动态平衡, 调节肝内细胞外基质(ECM)的合成和降解, 维持肝内

ECM 质和量的稳定. 病理状态下 MMPs, TIMPs 失衡与肝炎、肝纤维化、肝硬化的发生发展有密切关系^[3].

在肝硬化形成期(9—12周)予以下瘀血汤和一贯煎干预防治后, MMP-13 蛋白表达量较同期模型组分别增加了 548.25 倍、82 倍; MMP-9/TIMP-1 比值分别增加了 1.21 倍、0.91 倍, 下瘀血汤组优于一贯煎组. 这种提高基质金属蛋白酶分泌量及其活性的作用可能与刺激库普弗细胞(KC)活化有关, KC 细胞通过表达 MMP-13 而逆转肝纤维化^[4,5]. 本文进一步研究显示, CD68 蛋白表达 8 周时开始升高, 12 周时较 8 周增加了 29.6%, 而下瘀血汤和一贯煎干预防治后较同期模型对照组分别增加了 21.8% 和 22.2%, 表明 KC 在肝硬化的发生、发展和恢复过程中可能发挥着“双刃剑”样作用^[6], 即持续毒物刺激可能使其分泌大量致纤维化因子而促进胶原的沉积和组织结构的改建. 而下瘀血汤和一

贯煎可能具有“改邪归正”之作用,即通过诱导 KC 活化并表达 MMP-9 和 MMP-13 进而促进间质性胶原的降解可能是两首方剂尤其是下瘀血汤抑制肝硬化形成的重要途径。

以往临床观察中成药大黄蛰虫丸对慢性乙型肝炎血清金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)有突出影响^[7],桃仁提取物具有促进肝内间质型胶原酶(人体为 MMP-1,大鼠为 MMP-13)活性的作用^[8],结合下瘀血汤突出地降低肝组织 Hyp 含量的作用,表明下瘀血汤的“祛瘀”作用机制可能与提高胶原酶活性进而降解过度沉积的细胞外基质有关。

3.2 抑制肝细胞凋亡和肝星状细胞(HSCs)的活化是一贯煎的重要作用环节

肝细胞凋亡是肝损伤的特征性表现之一^[9],已有的研究显示 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化进展期存在大量的肝细胞凋亡^[2]。在有害刺激条件下发生的“病理性”凋亡可导致趋化性/炎症性因子的释放,因而可加重肝损伤并激活 HSCs^[10]。因此,抑制肝细胞凋亡也许是抗肝纤维化的重要策略^[11]。

另外,CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠肝脏蛋白质组差异表达研究显示造模 12 周后模型大鼠有 Caspase-12 蛋白表达^[12]。Caspase-12 是内质网凋亡通路的关键酶,各种损伤都会导致内质网应激诱导 Caspase-12 表达,同时也诱导胞质中的 Caspase-7 向内质网表面迁移,Caspase-7 与 Caspase-12 相结合并打开 Caspase-12 的前域使其活化,最终加速了细胞死亡^[13]。

一贯煎组肝细胞凋亡指数和 Caspase-12 蛋白表达分别较同期模型组降低了 51.0% 和 50.8%,而下瘀血汤组无显著改善,结合一贯煎可显著提高模型大鼠血清白蛋白(Alb)含量的特点,表明抑制肝细胞凋亡可能是一贯煎抑制肝硬化形成的重要机制之一,且这一机制与抑制内质网凋亡通路有关。

MMP-2 主要来源于活化的 HSCs,在肝纤维化早期参与了基底膜胶原的降解,与肝纤维化的发生密切相关^[14],而 TIMP-2 和 MMP-2 的关系较为复杂,研究表明 TIMP-2 具有调节 MMP-2 活性的作用^[15]。TIMP-1 在肝脏由 KC 细胞、HSCs 及肌纤维母细胞(MFB)产生,以活化的 HSCs 表达 TIMP-1 最强^[16,17]。本研究亦显示伴随着肝组织 α -SMA

蛋白表达量的增加,MMP-2/TIMP-2 比值、TIMP-1 蛋白表达量亦同步增加。下瘀血汤和一贯煎干预治疗后 α -SMA 蛋白表达量分别下降了 21.6% 和 51.8%,同时 MMP-2/TIMP-2 比值分别降低了 22.4% 和 43.5%,TIMP-1 蛋白表达量分别下降了 28.3% 和 39.7%,一贯煎均显著优于下瘀血汤。结果提示通过抑制 HSCs 的活化可能是一贯煎抑制肝硬化形成的又一重要途径。

下瘀血汤和一贯煎干预治疗后肝组织 HGF_a 较 12 周模型对照组分别增加了 35.8% 和 40.0%,提示通过提高肝组织 HGF_a 的蛋白表达,进而促进肝细胞的有丝分裂、激发肝脏胶原酶的活性和促进活化的肝星状细胞凋亡^[18,19],可能是一贯煎和下瘀血汤抑制肝硬化形成的共同作用途径之一。

中医方剂是在中医理论指导下针对证候病机的中药组合配伍形式,是一复杂系统,也是研究中医理论复杂体系的主要载体。本文立足于中医临床实践对肝炎后肝硬化基本证候病机的共识,进行不同功效经典方剂的比较对照研究,不仅部分揭示了下瘀血汤和一贯煎抑制肝硬化形成的不同作用机制,显示出中医药“同病异治”理论的科学内涵;同时也为“祛邪与扶正”治法理论获得部分生物学作用基础的诠释,下瘀血汤的“祛瘀”作用主要表现为提高肝组织胶原降解活性,促进异常沉积的纤维结缔组织的降解与清除;而一贯煎的“养阴扶正”作用主要在于抑制肝细胞凋亡和 HSCs 的活化,保护患病机体的“正气”。

参 考 文 献

- 1 Jamall I S, Finelli V N, Que Hee S S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem*, 1981, 112(1): 70—75
- 2 Shi J, Aisaki K, Ikawa Y, et al. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol*, 1998, 153(2): 515—525
- 3 Iredale J P. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(1): 43—54
- 4 Hironaka K, Sakaida I, Matsumura Y, et al. Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of Kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig serum-induced rat liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267(1): 290—295
- 5 Sakaida I, Hironaka K, Terai S, et al. Gadolinium chloride re-

- verses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci*, 2003, 72(8): 943—959
- 6 Friedman S. Mac the knife? Macrophages—the double-edged sword of hepatic fibrosis. *J Clin Invest*, 2005, 115(1): 29—32
- 7 刘平, 刘成, 陈高朝, 等. 扶正化瘀319方治疗慢性乙型肝炎及其对纤维化血清学指标的影响. *中国中西医结合杂志*, 1996, 16(10): 588—592
- 8 徐列明, 刘平, 刘成, 等. 桃仁提取物抗实验性肝纤维化的作用观察. *中国中药杂志*, 1994, 19(8): 491—494
- 9 Canbay A, Feldstein A, Baskin-Bey E, et al. The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308(3): 1191—1196
- 10 Canbay A, Friedman S, Gores G J. Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology*, 2004, 39(2): 273—278
- 11 Higuchi H, Gores G J. Mechanisms of liver injury: An overview. *Curr Mol Med*, 2003, 3(6): 483—490
- 12 刘莺, 刘平, 刘成海, 等. 细胞增殖与凋亡相关蛋白质在大鼠肝纤维化形成与消减中的动态变化. *中华肝脏病杂志*, 2005, 18(8): 563—566
- 13 Rao R V, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*, 2001, 276(36): 33869—33874
- 14 Takahara T, Furui K, Funaki J, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology*, 1995, 21(3): 787—795
- 15 Bernardo M M, Fridman R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J*, 2003, 374(3): 739—745
- 16 Murphy F R, Issa R, Zhou X, et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem*. 2002, 277(13): 11069—11076
- 17 Trim J E, Samra S K, Arthur M J, et al. Upstream tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) element-1, a novel and essential regulatory DNA motif in the human TIMP-1 gene promoter, directly interacts with a 30-kDa nuclear protein. *J Biol Chem*, 2000, 275(9): 6657—6663
- 18 Matsuda Y, Matsumoto K, Ichida T, et al. Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal hepatic dysfunction in rats. *J Bio Chem (Tokyo)*, 1995, 118(3): 643—649
- 19 Kim W H, Matsumoto K, Bessho K, et al. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol*, 2005, 166: 1017—1028