

逍遥散及其功效拆方对慢性铁过载诱导的肝纤维化的影响*

周 慧, 葛冰景, 肖铁刚, 曹红燕, 戴彦成, 阙任焱[△]

(上海中医药大学附属上海市中西医结合医院脾胃病科, 上海 200082)

摘要: **目的** 通过制作慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化模型, 观察逍遥散对肝纤维化的改善作用及对体内铁代谢过程的影响, 并通过功效拆方研究, 探索逍遥散中疏肝药、健脾药、养血药在整方疗效中的作用及地位。**方法** 通过腹腔注射右旋糖酐铁 50 mg/kg/d, 连续 7 周制作慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化模型, 药物干预在造模同时每日通过灌胃的方式给予逍遥散全方、逍遥散去疏肝药、逍遥散去健脾药、逍遥散去养血药、去铁胺(DFO)。使用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清铁(SI)、铁蛋白(SF)水平; 肝组织进行病理组织学检测, 包括 HE 染色、Masson 染色、苦味酸-天狼星红染色等; 免疫组化检测肝组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I 型胶原蛋白(COL-1)的表达水平; 采用火焰原子吸收光谱法检测大鼠肝组织铁含量。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠肝功能 ALT、AST 明显升高, 病理切片 HE 染色符合肝纤维化镜下表现, Ishak 纤维化评分显著升高, Masson 染色、苦味酸-天狼星红染色可见胶原纤维沉积明显, 免疫组化结果提示肝组织内 α -SMA、COL-1 表达显著上升, 血清铁、铁蛋白、肝脏总铁含量均显著升高。与模型组比较, 逍遥散全方及各功效拆方组可明显降低大鼠肝功能 ALT、AST, 改善病理过程如 Ishak 评分及胶原染色半定量等均显著下降, 肝组织 α -SMA、COL-1 表达显著降低, 血清铁、铁蛋白、肝脏总铁含量亦明显下降, 阳性对照药物去铁胺结果与逍遥散全方相仿。与逍遥散全方相比, 逍遥散各功效拆方组均较整方疗效有显著降低。**结论** 逍遥散可显著改善慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化, 其方中疏肝药、健脾药、养血药均对改善铁过载及纤维化有一定作用。推测逍遥散抑制铁过载维持铁稳态的作用可能是其疏肝、健脾、养血功效的核心机制。

关键词: 逍遥散; 肝纤维化; 铁过载; 功效拆方; 右旋糖酐铁

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2021)01-0017-07

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.01.002

Effects of Xiaoyao Powder and Its Efficacy Decomposed Recipes on Hepatic Fibrosis Induced by Chronic Iron Overload

ZHOU Yi, GE Bingjing, XIAO Tiegang, CAO Hongyan, DAI Yancheng, QUE Renye

(Department of Gastroenterology, Shanghai TCM-integrated Hospital Affiliated Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the effect of Xiaoyao Powder on the improvement of liver fibrosis and iron metabolism in rats induced by chronic iron overload, and to explore the role and status of liver soothing, spleen strengthening and blood nourishing drugs in Xiaoyao Powder. **Methods** Rat liver fibrosis model induced by chronic iron overload was established by intraperitoneal injection of iron dextran (50 mg/kg/d) for 7 weeks. At the same time, the whole prescription of Xiaoyao Powder, or removing Liver Soothing drugs, spleen strengthening drugs, blood nourishing drugs and deferoxamine (DFO) were given daily by gavage. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate

收稿日期: 2020-12-06

* 基金项目: 上海市青年科技英才扬帆计划(19YF1445200), 上海市卫健委中发办青年基金(2018LQ016), 上海中医药大学预算内项目(18LK074); 上海虹口区卫健委临床重点扶持专科建设项目(HKZK2020A01)

第一作者简介: 周慧(1984-), 女, 主治医师, 硕士, 研究方向: 消化系统疾病的临床与基础研究。

[△]通信作者: 阙任焱, E-mail: 824492@qq.com

aminotransferase (AST), serum iron (SI) and ferritin (SF) were detected by automatic biochemical analyzer; liver tissues were detected by histopathology, including HE staining, Masson staining, picric acid Sirius red staining, etc.; immunohistochemistry was used to detect α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen protein (COL-1) expression. The content of liver iron in rat was detected by flame atomic absorption spectrometry. **Results** Compared with the control group, ALT and AST of liver function in the model group were significantly higher than those in the control group. The HE staining of pathological sections was consistent with the microscopic manifestations of liver fibrosis. The Ishak fibrosis score was significantly increased. Masson staining and picric acid Sirius red staining showed obvious collagen fiber deposition. Immunohistochemical results showed that the expression of α -SMA and COL-1 in liver tissue was significantly increased. Serum iron, ferritin and total liver iron were also significantly increased. Compared with the model group, the whole Xiaoyao powder recipe and its efficacy decomposed recipes could significantly reduce the ALT and AST of liver function, improve the pathological process, such as Ishak score and semi quantitative staining of collagen. The expressions of α -SMA and COL-1 in liver tissue were significantly decreased, and the contents of serum iron, ferritin and total liver iron were also significantly decreased. The results of positive control drug deferoxamine were similar to those of Xiaoyao Powder. Compared with the whole Xiaoyao Powder prescription, efficacy decomposed recipes in each group was significantly lower than that in the whole formula. **Conclusion** Xiaoyao Powder can significantly improve liver fibrosis induced by chronic iron overload in rats, and the drugs of soothing liver, strengthening spleen and nourishing blood have certain effects on improving iron overload and fibrosis. It is speculated that the effect of Xiaoyao Powder on inhibiting iron overload and maintaining iron homeostasis may be the core mechanism of its functions of soothing liver, strengthening spleen and nourishing blood.

KEY WORDS: Xiaoyao Powder; liver fibrosis; iron overload; efficacy decomposed recipes; iron dextran

肝纤维化是一种动态可逆性的病理过程,若未采取有效措施进行干预,甚至可进展为肝硬化,严重危害人类的健康。肝脏铁过载在肝纤维化发生机制中具有重要作用,它能够诱发或加重疾病的发展,随着铁过载的持续,最终可导致肝硬化,甚至肝癌发生^[1-2]。临床上使用铁螯合剂也显示出明显的改善肝纤维化指标作用^[3]。中医学认为铁是体内的精微物质之一,而精微物质的转运离不开脾之运化功能和肝之疏泄功能的正常发挥。因此,铁代谢紊乱反映的是肝失疏泄,脾运失常。临床上肝纤维化或肝硬化患者常常存在肝失疏泄,脾运无权等情况,以致不能将铁转运至血液循环中为造血器官所利用,引起贫血,并沉积于肝脏等器官,引起纤维化的发生。故肝纤维化的治疗应着眼于疏肝健脾。逍遥散是中医学疏肝健脾的经典名方,由四逆散及当归芍药散化裁而成。有多项临床与实验研究表明逍遥散具有抗肝纤维化的作用^[4-6],但其机制尚不明确。本课题组前期通过对逍遥散联合恩替卡韦治疗肝郁脾虚型乙肝后肝硬化代偿期患者的随机对照研究中发现,逍遥散具有显著的改善纤维化作用,并能够改善患者机体的铁过载水平。因此,本研究拟通过右旋糖酐铁诱导铁过载所致大鼠肝纤维化模型,观察逍遥散的抗肝纤维化作用是否与调节体内铁代谢平衡有关。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 成年大鼠,56 只,体质量 180~220g,购自上海市实验动物中心,动物合格证号 SCXK(沪)2013-0016,饲养于上海市中医医院无特异病原体(SPF)级动物房,恒温(25±2)℃恒湿,人工光照 12 h,黑暗 12 h,自由进食饮水,本研究中的动物实验规程遵循“实验动物关爱和使用指南”。

1.1.2 试剂 COL-1、 α -SMA 免疫组化试剂盒购于北京中杉金桥生物科技有限公司,苏木素-伊红染色液(P0311H)购于湖南艾佳生物科技股份有限公司,Masson 染色液(G1340)购于北京索莱宝科技有限公司,天狼星红染色液(DC0041)购于北京雷根生物技术有限公司,铁标准溶液 1 000 μ g/mL 由国家标准物质中心提供。

1.1.3 药物配制 逍遥散准确称取柴胡 15 g,当归 15 g,白芍 15 g,白术 15 g,茯苓 15 g,甘草 7.5 g,粉碎成粗粉,加水 1 500 mL 煮沸,保持沸腾 20 min,加入 5 g 煨姜和 5 g 薄荷,再保持沸腾煎煮 10 min,煎煮液过 5 层纱布,滤液浓缩至 2 g/mL(按生药量计),经冷冻干燥制成粉末,用前以蒸馏水配制成混悬液。去铁胺配置成浓度为 0.45 g/kg 的去铁胺溶液,逍遥散各拆方组按逍遥散去疏肝药组(去柴胡、薄荷)、逍

逍遥散去健脾药组(去茯苓、白术、甘草)、逍遥散去养血药组(去当归、白芍)制作药物混悬液,方法同上。

1.1.4 仪器 快速研磨仪 JXFSTPRP-48 (上海净信实业发展有限公司), 多功能酶标仪 Varioscan Flash (上海百基生物科技有限公司), RM2016 切片机 (莱卡公司), 生物组织摊烤片机 YT-6C (亚光医用电子技术有限公司), 防脱载玻片 P031IH (湖南艾佳生物科技股份有限公司), 鼓风干燥箱 DHC-9070A (天津津立仪器设备科技发展有限公司), 光学显微镜 AE41 (麦克奥迪实业集团有限公司), AU400 型全自动生化分析仪 (日本奥林巴斯公司), JENA AA400 型原子吸收分光光度计 (德国 JENA 仪器公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 分组及模型建立 将 56 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、逍遥散全方组、逍遥散去疏肝药组、逍遥散去健脾药组、逍遥散去养血药组、去铁胺组, 模型制作方法参照文献[7] 进行, 每日予腹腔注射 50 mg/kg 右旋糖酐铁, 连续 7 周, 对照组予腹腔注射同等剂量的生理盐水。各药物干预组在造模同时给予灌胃各组对应的治疗药物 10 mL/(kg·d⁻¹)灌胃, 对照组及模型组按体质量给予灌胃等量生理盐水。所有组大鼠 7 周后处死, 取血清、肝组织标本。血清标本用蛋白酶抑制剂处理, -20℃中保存备用; 用全自动生化分析仪检测血清 ALT、AST、SI、SF。肝组织标本用含 0.01% DEPC 的生理盐水清洗后保存于 -80℃中, 部分标本用中性福尔马林固定 12 h 后经石蜡包埋, 3~5 μm 厚连续切片备检。

1.2.2 肝脏病理组织检查 病理组织学采用 HE 染色、Masson 染色、苦味酸-天狼星染色 3 种染色方法, 取备检石蜡切片经脱蜡、水化、染色、分化、透明、封片、镜检, 分别观察病变与纤维化程度, 使用 Ishak 评分对 HE 染色切片进行量化比较, ImagePro Plus 软件进行半定量分析 Masson 染色、苦味酸-天狼星染色结果。

1.2.3 免疫组化检测 α-SMA 及 COL-1 表达 石蜡切片经脱蜡、水化, 抗原修复冷却后, 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶的活性, 血清封闭, 孵育一抗、孵育二抗, DAB 显色, 苏木素复染、脱水、透明后封片、镜检, 观察 α-SMA 及 COL-1 表达, 并使用 ImagePro Plus 软件进行半定量分析。

1.2.4 大鼠肝脏总铁含量检测 按照文献 [8] 报道,

采用火焰原子吸收光谱法测定。

1.3 统计学分析 本实验结果采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析, 实验所涉及数据中符合正态分布的计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 不符合正态分布的计量资料或计数资料采用中位数(M)、四分位数(Q)表示; 对于计量资料, 符合正态分布且方差齐者, 采用 One-way ANOVA LSD 统计方法处理数据, 对于计数资料, 采用卡方检验统计分析, 最终结果以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血清肝损伤指标检测 与对照组比较, 模型组大鼠血清 ALT、AST 水平显著升高 ($P < 0.05$), 逍遥散全方及各功效拆方组均可显著抑制慢性铁过载诱导的肝细胞损害, 阳性对照药与逍遥散全方组结果相仿 ($P < 0.05$)。逍遥散去疏肝药组、逍遥散去健脾药组、逍遥散去养血药组与逍遥散全方组相比, 疗效均显著降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 逍遥散及各功效拆方对慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化肝功能的影响

组别	<i>n</i>	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
正常对照组	8	25.5±3.3	100.6±11.6
模型对照组	8	146.5±17.2*	273.3±15.2*
逍遥散全方组	8	45.8±10.9 [#]	130.4±11.3 [#]
逍遥散去疏肝药组	8	81.9±13.6 ^{#Δ}	185.3±17.7 ^{#Δ}
逍遥散去健脾药组	8	76.5±13.2 ^{#Δ}	196.3±17.2 ^{#Δ}
逍遥散去养血药组	8	69.9±9.5 ^{#Δ}	180.6±12.4 ^{#Δ}
去铁胺组	8	57.5±9.9 [#]	140.3±11.6 [#]

注: 采用方差分析进行统计比较。与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$; 与逍遥散全方组比较, ^Δ $P < 0.05$ 。

2.2 大鼠肝脏病理组织学检测 HE 染色显示对照组无炎症细胞浸润, 肝细胞多, 胆管少, 肝小叶结构完整, 无明显脂肪浸润。模型组可见汇管区大量炎细胞浸润, 中央静脉与肝血窦扩张淤血, 汇管区纤维组织增生, 肝小叶间胆管明显增生, 部分分割包绕形成假小叶, Ishak 评分较对照组显著升高 ($P < 0.05$)。逍遥散全方及各功效拆方组与模型组比较均有不同程度的改善作用, Ishak 评分均有不同程度的降低 ($P < 0.05$)。阳性对照药与逍遥散全方组结果相仿 ($P < 0.05$)。逍遥

散去疏肝药组、逍遥散去健脾药组、逍遥散去养血药组与逍遥散全方组相比,疗效均显著降低($P<0.05$)。见图 1、表 2。

Masson 染色及苦味酸-天狼星红染色可见对照组仅在中央静脉壁和汇管区间有极少量胶原纤维沉积,模型组可见胶原纤维沉积显著增加,增生的小胆管及其周围的胶原纤维形成间隔,部分与临近的增生

间隔相互连接、包绕、分割,形成假小叶($P<0.05$)。逍遥散全方及各功效拆方组对胶原纤维增生均有不同程度的明显减轻,纤维间隔变窄,假小叶形成减少($P<0.05$)。阳性对照药与逍遥散全方组结果相仿($P<0.05$)。逍遥散去疏肝药组、逍遥散去健脾药组、逍遥散去养血药组与逍遥散全方组相比,疗效均显著降低($P<0.05$)。见图 2、图 3、表 2。

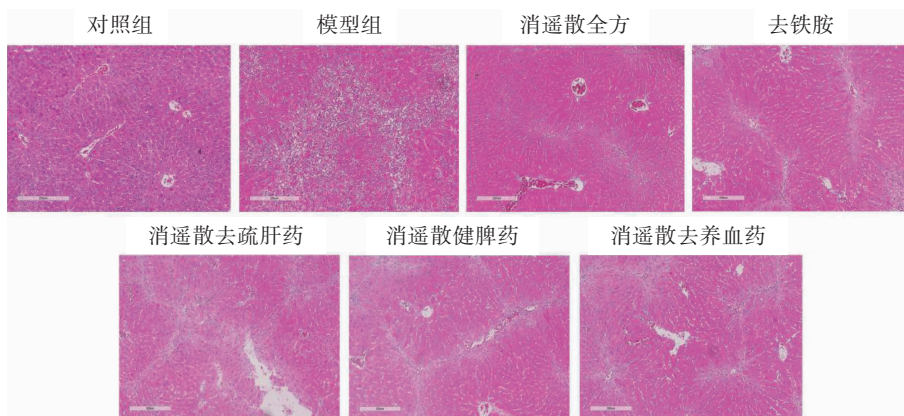


图 1 逍遥散及各功效拆方对慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化病理组织学 HE 染色的影响($\times 100$)

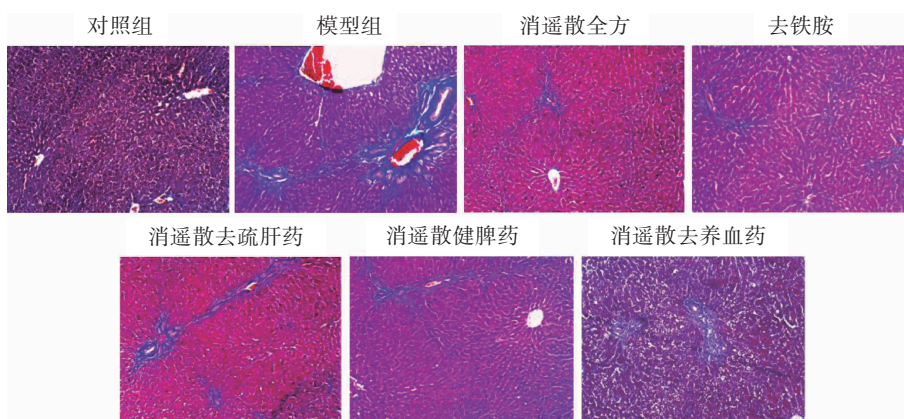


图 2 逍遥散及各功效拆方对慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化病理组织学 Masson 染色的影响($\times 100$)

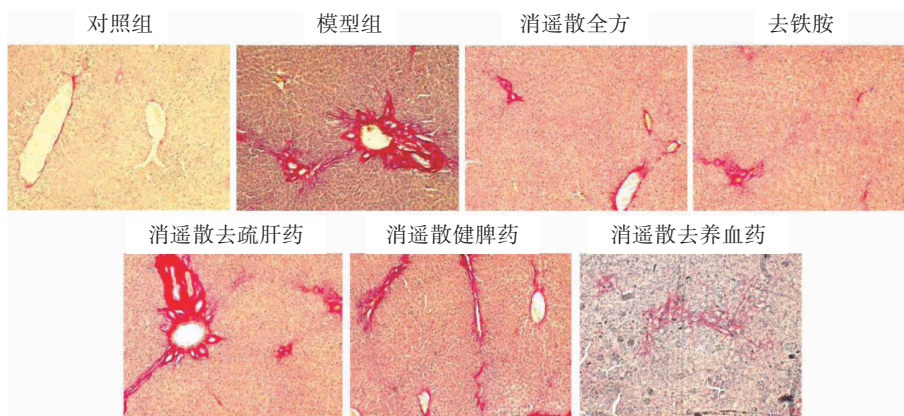


图 3 逍遥散及各功效拆方对慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化病理组织学苦味酸-天狼星红的影响($\times 100$)

表 2 逍遥散及各功效拆方对慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化病理组织学的影响

组别	<i>n</i>	α -SMA 半定量/%	COL-1 半定量/%
正常对照组	8	4.0±0.6	6.7±0.8
模型对照组	8	30.7±2.7*	25.3±2.6*
逍遥散全方组	8	10.8±1.4 [#]	12.3±1.3 [#]
逍遥散去疏肝药组	8	18.3±1.6 ^{#△}	18.8±2.0 ^{#△}
逍遥散去健脾药组	8	16.0±1.6 ^{#△}	17.3±1.6 ^{#△}
逍遥散去养血药组	8	18.1±2.1 ^{#△}	18.0±1.9 ^{#△}
去铁胺组	8	14.2±1.5 [#]	14.7±1.5 [#]

注:Ishak 评分采用方差分析进行统计比较,Masson 半定量及 Sirius Red 半定量采用卡方检验进行统计比较。与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与逍遥散全方组比较,[△] $P<0.05$ 。

2.3 大鼠肝脏免疫组织化学检测 对照组仅见极少量 α -SMA 和 COL-1 表达,模型组可见在汇管区、纤维间隔区 α -SMA 和 COL-1 明显表达($P<0.05$)。逍遥散全方及各功效拆方组 α -SMA 和 COL-1 表达均有不同程度的明显降低($P<0.05$)。阳性对照药与逍遥散全方组结果相仿($P<0.05$)。逍遥散去疏肝药组、逍遥散去健脾药组、逍遥散去养血药组与逍遥散全方组相比,疗效均显著降低($P<0.05$)。见图 4、图 5、表 3。

2.4 大鼠铁代谢相关指标检测 与对照组相比,模型组血清铁、铁蛋白及肝脏总铁含量均显著升高($P<0.05$)。逍遥散全方及各功效拆方组血清铁、铁蛋白及肝脏总铁含量均有不同程度的明显降低($P<0.05$)。阳性对照药与逍遥散全方组结果相仿($P<0.05$)。逍遥散去疏肝药组、逍遥散去健脾药组、逍遥散去养血药组与逍遥散全方组相比,疗效均显著降低($P<0.05$)。见表 4。

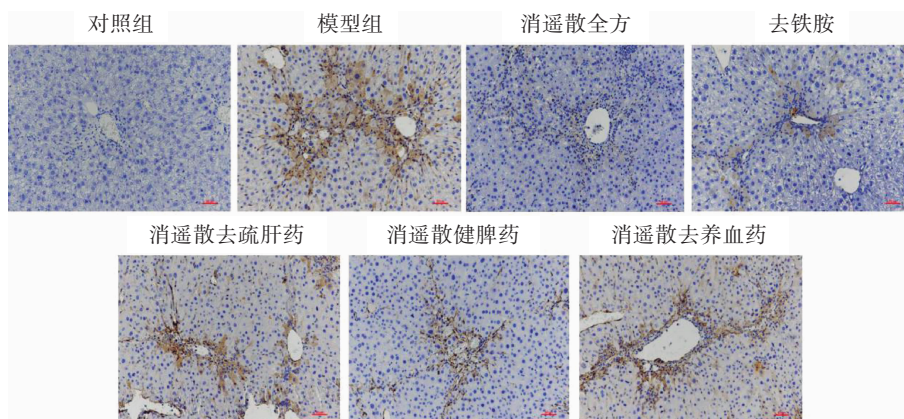


图 4 逍遥散及各功效拆方对慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化免疫组化 α -SMA 表达的影响($\times 100$)

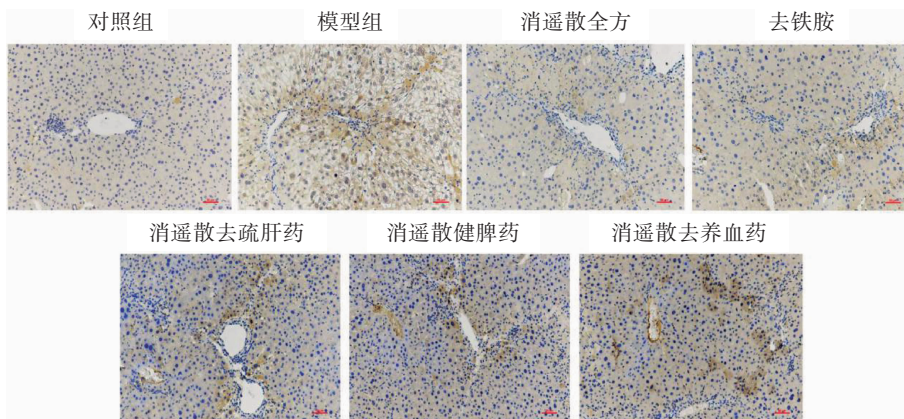


图 5 逍遥散及各功效拆方对慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化免疫组化 COL-1 表达的影响($\times 100$)

表 3 逍遥散及各功效拆方对慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化免疫组化的影响

组别	<i>n</i>	Ishak 评分	Masson 半定量/%	Sirius Red 半定量/%
正常对照组	8	0.0±0.0	0.4±0.0	0.2±0.0
模型对照组	8	15.4±2.7*	11.5±1.8*	12.4±1.7*
逍遥散全方组	8	7.1±1.6 [#]	3.8±0.5 [#]	4.4±0.6 [#]
逍遥散去疏肝药组	8	10.5±1.2 ^{#△}	7.2±0.8 ^{#△}	8.2±0.8 ^{#△}
逍遥散去健脾药组	8	11.3±1.5 ^{#△}	6.2±1.3 ^{#△}	6.7±0.8 ^{#△}
逍遥散去养血药组	8	9.5±1.2 ^{#△}	6.4±0.6 ^{#△}	7.0±0.6 ^{#△}
去铁胺组	8	8.4±1.5 [#]	5.3±0.9 [#]	5.4±0.7 [#]

注:免疫组化半定量分析采用卡方检验统计比较。与对照组比较,**P*<0.05;与模型组比较,[#]*P*<0.05;与逍遥散全方组比较,[△]*P*<0.05。

表 4 逍遥散及各功效拆方对慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化铁代谢指标的影响

组别	<i>n</i>	血清铁 /(μmol·L ⁻¹)	铁蛋白 /(ng·mL ⁻¹)	肝脏总铁 /(μg·g ⁻¹)
正常对照组	8	34.2±6.4	55.0±7.9	346.1±29.3
模型对照组	8	62.7±5.9*	312.3±30.1*	940.8±114.1*
逍遥散全方组	8	36.2±5.4 [#]	93.2±13.8 [#]	440.4±50.4 [#]
逍遥散去疏肝药组	8	43.1±4.7 ^{#△}	152.7±15.9 ^{#△}	551.0±65.5 ^{#△}
逍遥散去健脾药组	8	48.9±6.8 ^{#△}	203.2±21.4 ^{#△}	658.7±103.1 ^{#△}
逍遥散去养血药组	8	46.0±5.5 ^{#△}	188.7±18.4 ^{#△}	628.8±96.9 ^{#△}
去铁胺组	8	32.0±6.1 [#]	47.9±9.1 [#]	417.2±51.6 [#]

注:采用方差分析进行统计比较。与对照组比较,**P*<0.05;与模型组比较,[#]*P*<0.05;与逍遥散全方组比较,[△]*P*<0.05。

3 讨论

肝纤维化是一种动态可逆性的病理过程,若未采取有效措施进行干预,甚至可进展为肝硬化,严重危害人类的健康。因此,在肝纤维化阶段及早采用药物进行有效干预,是防治肝硬化的重要治疗策略。西医学对肝纤维化、肝硬化迄今没有满意的治疗方法。所以,寻找有效的治疗手段仍是防治肝硬化研究领域的难点及热点。中医学认为肝硬化发病早期病位常常在肝,随着病情的不断恶化与进展,最终使脾肾受累。肝硬化其病理因素一般为气滞、血瘀、水湿,这三者往往

互为因果,相互为病,致使疾病错综复杂,因此肝硬化一旦到晚期则殊难治疗,预后较差。综上所述,临床上肝郁脾虚证在乙肝后肝硬化代偿期时较为多见,而针对这一时期进行有效的规范化治疗能够取得较好的效果。

肝脏是体内主要的铁贮存部位,在对机体铁稳态的调节中起着中心和枢纽的作用。铁过载引起的肝损伤在多种急慢性肝损伤疾病或动物模型引起的肝纤维化中均可能出现,如酒精性肝病,非酒精性脂肪性肝炎,CCL4、DMN 等毒性药物引起肝纤维化,遗传性血色病,丙型肝炎等^[9-14]。有研究发现,乙型肝炎、乙肝后肝硬化患者血清中铁含量、总铁结合力、铁蛋白等指标均较健康人显著升高,且与疾病的严重程度成正相关^[15-16]。因此,有理由相信,铁代谢紊乱在肝纤维化、肝硬化发生发展中起着十分重要的作用。

中医学未有对铁的直接描述,而可以认为铁是体内的水谷精微物质之一,而精微物质的转运离不开脾之运化功能及肝之疏泄功能的正常发挥。正如罗梅宏等^[17-18]发现脾运无力在缺铁性贫血的发病过程中的具有重要作用,通过临床与实验皆证实了通过运脾法能够显著调节机体的铁代谢平衡。因此可以理解为中焦脾胃在精微物质铁的吸收转运及最终参与生成血液的过程中有着十分重要的作用,故而有“脾胃是气血生化之源”之说。而肝脏主疏泄而藏血,在血液形成过程中亦有举足轻重的作用。水谷精微源于脾胃,脾胃纳化水谷,输布精微,赖肝气为之疏泄。故《血证论》说:“食气入胃,全赖肝木之气以疏泄之而水谷乃化。”因此,铁代谢紊乱反映的是肝失疏泄和脾运失常。临床上肝纤维化或肝硬化患者常常存在肝失疏泄和脾运无权等情况,以致不能将铁转运至血液循环中为造血器官所利用,引起贫血,并沉积于肝脏等器官,引起纤维化的发生,故在治疗上应着眼于疏肝健脾。

逍遥散是中医学疏肝健脾的经典名方,在临床上广泛应用于慢性肝炎、肝硬化、胆石症、胃及十二指肠溃疡、慢性胃炎、胃肠神经官能症、经前期紧张症、乳腺小叶增生。课题组前期通过对逍遥散联合恩替卡韦治疗肝郁脾虚型乙肝后肝硬化代偿期患者的随机对照研究中发现,逍遥散具有显著的改善纤维化作用,并能够改善患者机体的铁过载水平^[19]。基于此我们提

出了指导进一步研究的假说:逍遥散通过疏肝健脾之法调节机体铁转运,又通过其养血之能,促进铁利用。总而言之,其疏肝、健脾、养血之功效均参与了对机体铁稳态的调节进而发挥抗肝纤维化的作用。为此我们开展了实验验证工作,结果表明,逍遥散能显著改善慢性铁过载诱导的大鼠肝纤维化,主要表现在降低血清 ALT、AST 水平,改善纤维化病理表现及抑制肝星状细胞活化指标如 α -SMA 和 COL-1 表达。而逍遥散的这些作用也已在其他肝纤维化模型中所证实^[20-21]。而我们进一步检测了各组大鼠血清中铁及铁蛋白含量及肝脏总铁含量的变化,发现逍遥散可显著减小鼠体内铁过载水平。随后我们又通过功效拆方,将逍遥散全方中疏肝药(柴胡、薄荷)、健脾药(茯苓、白术、甘草、生姜)、养血药(当归、白芍)进行拆解研究,结果表明逍遥散去疏肝药组、逍遥散去健脾药组、逍遥散去养血药组与逍遥散全方组在改善肝细胞损伤、纤维化及铁过载方面均有显著差异,提示整方无论去除疏肝药、健脾药或养血药均对整方疗效有显著影响,换言之,逍遥散中疏肝、健脾、养血之功效都参与了机体铁稳态的调节进而发挥了抗肝纤维化的作用。

综上所述,中药复方逍遥散是临床上疏肝健脾的代表方剂,其疏肝、健脾、养血功效均与维持机体铁稳态相关,因此有理由相信,其能够重塑肝脏铁稳态进而发挥其抗纤维化作用,但具体调控铁代谢的机制仍需进一步研究。本课题的设计完成,不仅对完善中医学铁代谢的理论认知起到促进作用,更关键的是对传统方药逍遥散的组方功效进行了创新性的解释,为逍遥散调节机体铁稳态提供了理论及实验基础,为中药复方研究的快速发展提供了新的思路。

参考文献:

- [1] AREZZINI B, LUNGI B, LUNGARELLA G, et al. Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(4): 486-495.
- [2] MUELLER S, AFDHAL N H, SCHUPPAN D. Iron, HCV, and liver cancer: hard metal setting the pace? [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(7): 2229-2234.
- [3] ALEXANDER J, TUNG B Y, CROGHAN A, et al. Effect of iron depletion on serum markers of fibrogenesis, oxidative stress and serum liver enzymes in chronic hepatitis C: results of a pilot study[J]. *Liver Int*, 2007, 27(2): 268-273.
- [4] 王庆生, 李绍民, 冯澜. 恩替卡韦联合逍遥散对肝纤维化肿瘤坏死因子 TNF- α 的影响[J]. *黑龙江医药科学*, 2016, 39(1): 84-86.
- [5] 陈曦, 牟璐璐, 陈丹丹, 等. 逍遥散对肝纤维化大鼠模型抗纤维化作用及其机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2014, 25(3): 241-244.
- [6] 李绍民, 代立娟, 冯澜, 等. 逍遥散含药血清对人肝星形细胞分泌 MMP-1 和 TIMP-1 的影响[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(9): 2134-2136.
- [7] ZHANG Y, ZHANG Y Y, XIE Y, et al. Multitargeted inhibition of hepatic fibrosis in chronic iron-overloaded mice by *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(2): 671-681.
- [8] 刘明家, 周志强, 祖元刚, 等. 湿法消解-火焰原子吸收法测定动物样品中六种金属元素[J]. *光谱学与光谱分析*, 2012, 32(7): 1961-1964.
- [9] TAN T C, CRAWFORD D H, JASKOWSKI L A, et al. A corn oil-based diet protects against combined ethanol and iron-induced liver injury in a mouse model of hemochromatosis[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2013, 37(10): 1619-1631.
- [10] 陆美婷, 张立威, 习文韬, 等. 大鼠非酒精性脂肪性肝炎模型的铁状态[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2016, 26(4): 277-282.
- [11] 赵卫华, 王燕红, 丛敏, 等. 铁和铁调素在四氯化碳肝纤维化小鼠模型中的表达[J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(4): 313-316.
- [12] 江远, 张玲, 何金洋, 等. 在二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化时铁超载和脂肪堆积的作用[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2009, 19(2): 100-102.
- [13] BRIDLE K R, CRAWFORD D H, FLETCHER L M, et al. Evidence for a sub-morphological inflammatory process in the liver in haemochromatosis[J]. *J Hepatol*, 2003, 38(4): 426-433.
- [14] BOMFIM E A, PEREIRADE DE OLIVEIRA A C, PARANÁR, et al. A study on hepatic iron overload in chronic hepatitis C patients[J]. *Acta Gastroenterol Latinoam*, 2013, 43(3): 212-217.
- [15] 李强, 陈明, 汪莉萍, 等. 乙型肝炎肝硬化(下转第 41 页)