

肝硬化肝肾阴虚病机理论及养阴一贯煎方证病理学基础^{*}

慕永平^{1,2}, 刘平^{1,2**}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院 上海 201203; 2. 上海中医药大学肝病研究所 上海 201203)

摘 要 :肝硬化属于中医学“癥积”的范畴,其病机之要在于阴精亏虚所致形质虚损,其病理学基础主要表现为肝实质细胞数量的减少、功能的衰退以及肝窦壁的损伤。滋补肝肾是促进精气恢复的根本治疗策略,一贯煎具有长期的临床应用历史及良好的实验研究基础,包括提高肝脏的生物转化功能、提高肝组织的抗氧化应激功能、改善肝脏缺氧状态、保护肝窦内皮细胞、抑制血管新生、调控肝脏干细胞分化取向等。本文就肝硬化肝肾阴虚病机理论形成及一贯煎方证病理学基础进行概述。

关键词 :肝硬化 肝肾阴虚 病机 病理基础 一贯煎

doi :10.11842/wst.2016.09.005 中图分类号 R256.4 文献标识码 :A

肝硬化是各种慢性肝病发展的晚期阶段,病理上以肝组织弥漫性纤维化、假小叶和再生结节形成特征。该病属于中医学“癥积”的范畴,有关“积”的病机论述最早见于《内经》,《素问·经脉别论》所记载的“怯者则著而为病”,提示了“正虚”在发病中的重要作用;而《灵枢·百病始生》说“温气不行,凝血蕴里而不散,津液涩渗,着而不去,而积皆成矣”,奠定了积证的“血瘀”病机理论。因此,早在《内经》时期就提出了积证“正虚血瘀”的病机理论,但关于肝硬化肝肾阴虚病机理论的形成及其病理学基础尚缺乏深入探讨。

1 肝硬化肝肾阴虚病机理论形成

肝硬化“正虚”与“形质虚损”密切相关。形质,是指机体可见的有形物质,包括皮毛、脉肉、筋骨、脏腑器官等形体结构以及精血津液等精微物质,这些

结构与物质的亏损或受伤,即谓之形质损伤;形质损伤的基本表现是形体、脏腑的枯萎与缺损。这也正是《难经》将皮毛、血脉、肌肉、筋、骨等形质损伤作为“五脏损”的代表性临床表现的实质旨意。而《金匱要略》对“干血劳”所述的“羸瘦,肌肤甲错,两目黯黑”亦当视为形质损伤的外在表现。肝硬化以肝脏组织结构的损伤、重构为基本特点,微观上表现为正常肝细胞的绝对衰减、大量纤维组织增生、结节的形成,宏观上则表现为肝脏体积萎缩变小、硬化或左叶代偿性增大以及脾脏肿大等。因此,肝硬化是以形质损伤为特点的癥积的典型代表。

关于“形质损伤”的内涵,张介宾基于“阳化气,阴成形”的理论,在《景岳全书·杂证谟》中对虚损、形质损伤做了精辟的论述:“凡虚损……或先伤其气,气伤必及于精;或先伤其精,精伤必及于气。但精气在人,无非谓之阴分。盖阴为天一之根,形质之祖,故凡损在形质者,总曰阴虚,此大旨也。”由此可见,机体形质损伤之根本在于阴精亏损。因此,虚损

收稿日期 2016-09-19

修回日期 2016-09-20

* 国家自然科学基金面上项目(81173223)“滋肾养肝方药调控胎肝干/祖细胞在硬化肝脏中的分化取向及其机制,负责人:慕永平;国家自然科学基金面上项目(81573948)“黄芩汤调控肝祖细胞 NUMB/NOTCH 信号通路抗胆汁性肝纤维化的机制研究,负责人:慕永平;国家自然科学基金面上项目(81273728)“基于 Smad7 蛋白表达调控解析黄芩总皂苷与甘草酸配伍抗肝纤维化的效应机制,负责人:刘平。

** 通讯作者:刘平,本刊编委,教授,主要研究方向:中医药防治肝纤维化、肝硬化的基础与临床研究。

的本质一方面体现在精气亏损导致机体组织结构的损伤,是其因;另一方面则体现在以瘀血为主的病理产物瘀结于受损部位及其脉络,是其果。最终形成以本虚标实,虚实夹杂为特点的“虚损生积”的病机演化。就肝硬化而言,虚损生积病机^[1]的内涵概括了肝脏形质损伤、肝脾肾精气亏虚不复,瘀血日结渐积成为癥积病证的本虚标实的因果关系。治疗当以补益精气为本,祛瘀通络为标。关于补益精气的治本之法,《素问·本神》说:“五脏主藏精者也,不可伤,伤则失守而阴虚,阴虚则无气,无气则死矣。”指出阴虚与气虚密切关联。张景岳则明确提出“善治精者,能使精中生气;善治气者能使气中生精”的观点,体现了气与精互生互用的密切关系。

关于“补益精气,祛瘀通络”的运用,早在《金匱要略》就有记载,如《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治篇》认为:“五劳虚极羸瘦,腹满不能饮食,食伤、忧伤、饮伤、房室伤、饥伤、劳伤、经络营卫气伤,内有干血,肌肤甲错,两目黯黑,缓中补虚,大黄蟅虫丸主之。”这里所说的“五劳”是指肺劳、肝劳、心劳、脾劳和肾劳。从“五劳虚极”和“内有干血”来看,五脏虚劳疾病在病机上总以各脏器的精气亏虚为本,经络营卫气伤为关键,故均有不同程度的血瘀,其基本病机特点是本虚标实,虚实夹杂。而关于干血劳的治法,则明确提出了“缓中补虚”;不但是《难经》“损其肝者,缓其中”的具体应用,也表明“干血劳”重在“肝脏虚损”(肝藏血)。从干血劳的证候表现分析,当属于癥积、臌胀类病证,大体相当于现代医学的晚期肝硬化、肝癌等疾病。如余无言《金匱要略新义》认为干血劳就是“血臌”;“推其症状,必然腹满坚硬,脐部突出,腹皮青筋暴露,若有蛛网,甚或少腹下,有郁血性肝紫之斑点”。程门雪《金匱篇解》也认为本病多属臌胀癥积范畴,并补充说临床上还“每兼少腹胀痛而硬,上有青紫盘文,指甲多灰白色”。大黄蟅虫丸以大黄荡下逐瘀为君;蟅虫破血通络为臣,配水蛭、虻虫、蛰蛰,以蠕动啖血之物行死血;合以干漆、桃仁增强活血祛瘀之功;佐以黄芩驱游热而坚肠胃;杏仁利气,芍药、地黄、白蜜滋阴润燥养血;芍药、甘草扶脾胃,解药毒,调和诸药。值得注意的是,此方祛瘀通络药味虽然较多,但干地黄(十两)、芍药(四两)的用量却最重,从中可窥见益阴养血的重要性。所以清代尤在泾《金匱要略心典》说:“此方润以濡其干,虫以动其瘀,通以去其闭,而仍以地黄、芍药、甘草和养

其虚”,乃标本兼治之法。

综上所述,通过对古代文献的梳理,可以认为肝硬化(癥积)形成的病机主要体现在机体阴精虚损所致的以肝脏体积缩小为主要特征的形质亏损,其治疗应以补益精气为主,兼顾活血化瘀,软坚散结。但关于肝硬化肝肾阴虚病机的病理学基础,目前尚缺乏准确论述,本课题组在“病证结合,方证相应”思路指导下,采用以方测证的思维模式,开展了不同功效中医古典方剂治疗不同致病因素所致同一疾病(肝硬化)动物模型的实验研究,本文主要围绕养阴一贯煎的方证病理学基础做一简单论述。

2 滋补肝肾一贯煎方证病理学基础

“病”和“证”是中西学两种医学模式的核心内容,体现采用不同思维方式认识生命、健康与疾病的特征,“病”与“证”结合实际上是两种医学思维方法的“交汇”;是将西医疾病病理概念体系与中医证的病机理论体系相结合研究疾病的发生发展规律。这既是以疾病为基础、凸现不同患病人群的整体病理状态的分类方式,也是运用中医思维方法研究现代疾病的发展规律,以期从中医的视角发现其病机特征以及相应治疗方法的新途径。方剂是中医学论治的主要手段,病、方、证三者的密切关联,是病机研究的重要科学问题;通过方剂的效应机制认识病机的科学内涵是病机病理学基础研究的科学思路。通过“病证结合”、“方证相应”对照比较研究,不仅可能为机体宏观病态表征与微观病理生物学物质变化之间建立联系,也将成为探索现代难治性疾病的有效治疗方法的可行途径^[2]。

籍此,针对肝硬化气阴虚损、湿热内蕴、瘀血阻络基本病机,选择具有代表性、可资比较的古典方剂:益气的黄芪汤、养阴的一贯煎、祛瘀的下瘀血汤及清热祛湿的茵陈蒿汤,采用多种经典肝硬化模型(四氯化碳、二甲基亚硝胺、总胆管结扎、猪血清免疫损伤)进行对照比较研究,基于干预效应及不同方剂相对特异的作用机制,反推其相应病机的病理学基础。本文重点阐述养阴一贯煎的部分方证病理学基础。

2.1 一贯煎显著抑制四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化

对于CCl₄造模12周制备的大鼠肝硬化模型,第9周开始予以不同功效方剂干预,并继续利用造模因素刺激至12周末。结果显示,模型对照组肝硬化

的形成率为 80%, 用药组分别为: 一贯煎组 11.1%、下瘀血汤组 22.9%、黄芪汤组 33.3%、茵陈蒿汤组 40%。肝功能、肝组织病理改善及肝组织羟脯氨酸 (Hydroxyproline, Hyp) 含量的下降均以下瘀血汤和一贯煎为显著, 下瘀血汤降低 Hyp 含量最佳, 一贯煎提高血清白蛋白 (Albumin, Alb) 含量尤著, 综合分析, 一贯煎的干预作用最佳^[3,4]。相同的研究结果在多批次大鼠及小鼠模型均得到重复, 提示 CCl₄ 诱导的大鼠肝硬化模型可能具有与肝肾阴虚病机相似的病理学基础。

2.2 一贯煎改善肝脏缺氧, 抑制血管新生, 提高肝细胞生物转化功能

为进一步探索一贯煎干预 CCl₄ 大鼠肝硬化形成的作用机制, 本课题组采用基因芯片技术探讨一贯煎对模型大鼠肝组织基因表达谱的影响。结果显示, 与正常大鼠比较, 12 周时模型大鼠 (Arginine Vasopressin Receptor 1A, AVPR1A)、CYP3A13、 β 球蛋白 (Beta globulin, Beta-glo) 等基因表达显著下调; 淋巴毒素 A (Lymphotoxin A, LTA)、MMP-23、RNA 结合基序蛋白 3 (Rna-Binding protein Motif, RBM3)、血小板反应蛋白 2 (Thrombospondin-2, TSP2)、AP1 γ 亚单位结合蛋白 1 (AP1 Gamma Subunit Binding Protein 1, AP1GBP1)、生长素释放激素受体 (Growth Hormone Releasing Hormone Receptor, GHRHR)、阿米洛利结合蛋白 1 (Amiloride Binding Protein 1, ABP1) 等基因表达显著上调, 一贯煎干预后 AVPR1A、CYP3A13、Beta-glo 等基因表达显著上调; LTA、MMP-23、RBM3、TSP2、AP1GBP1、GHRHR、ABP1 等基因表达显著下调。提示一贯煎可在基因水平上提高肝脏的生物转化功能、改善肝组织缺氧状态、抑制肝窦内皮损伤^[5]。

病理性血管新生在肝纤维化、肝硬化的发生发展过程中发挥重要作用, 抑制血管新生已成为抗肝纤维化研究的新热点^[6]。采用 CCl₄ 腹腔注射 6 周制备小鼠肝纤维化模型, 从第 4 周开始, 在 CCl₄ 持续造模的同时, 予以一贯煎干预 3 周, 结果显示, 一贯煎可显著抑制肝纤维化进展, 降低 CD31、血管内皮生长因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)、VEGF 受体 2 (VEGFR 2) 和缺氧诱导因子 (Hypoxia-Inducible Factor, HIF) -1 α 等的表达。证实一贯煎可改善肝组织缺氧状态, 抑制肝窦内皮损伤, 进而抑制血管新生, 其机制可能与抑制 HIF-1 α /

VEGF 信号通路有关^[7]。提示肝细胞生物转化功能降低、肝窦内皮损伤以及血管新生可能是肝硬化肝肾阴虚病机形质亏损的病理表现之一。

2.3 一贯煎提高肝组织的抗氧化应激能力

氧化应激在肝细胞损伤中发挥重要作用已成定论。抗氧化酶如过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione Peroxidase, GSH-Px) 作为自由基清除剂, 可以保护细胞免受氧化损伤^[8], 在肝损伤修复中发挥重要作用。采用差异蛋白质组学方法探讨一贯煎干预 CCl₄ 诱导肝硬化形成的部分效应机制。采用双向凝胶电泳 (2-Dimensional gel Electrophoresis, 2-DE) 分离肝组织总蛋白, 基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱及数据库查询鉴定差异表达蛋白质; 经质谱鉴定的 50 个差异蛋白质中, 与氧化应激相关的 5 个蛋白质分别是 Cu/ZnSOD、DJ-1、谷胱甘肽合成酶、谷胱甘肽 S-转移酶 Yb-1 亚基、醛酮还原酶 7A2。模型组肝组织 Cu/ZnSOD、DJ-1、谷胱甘肽 S-转移酶及醛酮还原酶 7A2 的表达均显著降低, 谷胱甘肽合成酶表达显著升高。一贯煎干预后 Cu/ZnSOD、DJ-1、谷胱甘肽 S-转移酶及醛酮还原酶 7A2 表达均明显增加, 谷胱甘肽合成酶表达显著降低。且采用蛋白印迹法及免疫组织化学法验证了 Cu/ZnSOD、DJ-1 的蛋白表达水平与蛋白质组学结果基本一致^[9]。提示氧化应激能力下降可能是肝硬化肝肾阴虚病机形质亏损的又一重要表现。尽管 2-DE 是常用的全蛋白组的分析方法, 但其存在分离能力有限、歧视效应、操作程序复杂、重复性差等缺陷, 对于分析动态范围大、低丰度以及疏水性蛋白质的研究往往很难得到满意的结果, 今后研究中需要更注重高灵敏度蛋白质组学技术的应用。

2.4 一贯煎调控干细胞的分化取向

由于肝细胞占肝脏总体积的 80%-90%, 在各种慢性肝损伤过程中, 肝细胞的增殖无疑受到抑制, 尽管肝细胞移植后可通过多次分裂实现有效增殖, 但也面临供体肝细胞的数量不足、排异反应、细胞活力低下、不能保持长时间体外增殖以及持续培养等实际问题^[10]。因此, 如何诱导肝脏干细胞向肝实质细胞的分化显得尤为重要。

围绕这一问题, 我们制备了 2-乙酰氨基苄 /CCl₄ (2-AAF/CCl₄) 大鼠肝纤维化模型 (2-AAF 抑制肝实

质细胞增殖,促进肝干细胞增殖与分化),探讨肝脏自体干细胞在肝纤维化形成过程中的分化取向及一贯煎对其影响。结果显示,在2-AAF/ CCl_4 诱导的大鼠肝硬化模型,肝脏干细胞主要向肌成纤维细胞分化,发挥促纤维化作用,非经典Wnt信号通路激活在这一过程中发挥关键作用^[11]。在2-AAF/ CCl_4 造模的同时予以一贯煎干预,可显著抑制非经典Wnt信号通路的活化,进而抑制肝干细胞向肌成纤维细胞分化,发挥抗肝纤维化作用。然而将分离的原代胎肝干细胞移植到2-AAF/ CCl_4 诱导肝纤维化模型大鼠后,却能够显著改善大鼠肝功能,抑制纤维化进展,移植后的胎肝干细胞主要向肝实质细胞分化,且与一贯煎联合应用后,其综合干预效果更为显著,其机制也与调节Wnt信号通路的活化有关,但主要表现为激活经典Wnt信号通路。另有研究还认为,一贯煎可抑制骨髓细胞向星状细胞及巨噬细胞的分化^[12]。提示养阴一贯煎具有良好的调控肝干细胞分化取向的作用。由于肝干细胞的分化受机体微环境及多种信号通路调控,本研究仅发现一贯煎对Wnt信号通路具有调控作用,但其具体调控机制、作用靶点及有效成分仍然不明,且缺乏对其他相关信号通路的观察,这些均是今后研究所要关注的方向。

3 讨论

“虚损生积”是肝硬化的基本病机,其中“虚损”主要表现在肝脾气虚和肝肾阴精虚损两个方面,气虚反映了机体功能的损伤与降低,而肝肾阴精虚损则直指肝脏形质损伤,是虚损更深层次的病机变化。即病邪致机体精气虚损,气血不行,凝血蕴里而不散,形质损伤,积乃成焉。

万凌峰等^[13]在“病-证-方-效”相统一的思路指导下,观察了具有滋补肝肾功效,且临床治疗肝硬化肝肾阴虚证使用频率最高的一贯煎干预实验性肝硬化的效应机制,结果表明,一贯煎仅对 CCl_4 诱导的肝硬化干预效果最佳。根据方证相应的思维模式以及一贯煎的作用机制,认为肝硬化肝肾阴虚的病理学基础可能主要体现在肝脏的生物转化功能降低、抗氧化应激能力下降、肝脏缺氧、肝窦内皮细胞损伤、血管新生以及肝干细胞异常分化等多个方面。

由于肝硬化的形成机制极其复杂,一贯煎的有效成分尚不明了,其作用靶点亦不明确,这些问题可能成为今后的主要研究方向。另外,尽管一贯煎广泛用于肝硬化的治疗,但至今尚无规范的临床疗效评价报道,为此,本课题组正在开展该项研究。

参考文献

- 慕永平,刘成海,刘平.肝硬化“虚损生积”论——刘平教授学术思想浅析.上海中医药大学学报,2013,27(2):1-4.
- 刘平,慕永平,刘成海.中医药治疗慢性肝病的临床与基础研究进展.临床肝胆病杂志,2011,27(5):451-457.
- 慕永平,刘平,龙爱华,等. CCl_4 大鼠肝硬化形成阶段中医方证病机的研究.中国中西医结合杂志,2006,26(4):344-347.
- Mu Y, Liu P, Du G, et al. Action mechanism of Yi Guan Jian Decoction on CCl_4 induced cirrhosis in rats. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121(1): 35-42.
- 慕永平,刘平,王磊,等.一贯煎影响 CCl_4 大鼠肝硬化形成期肝组织基因表达谱的效应机制研究.世界科学技术—中医药现代化,2007,9(3):43-54.
- Liu P. Inhibition of pathological angiogenesis of Chinese medicine against liver fibrosis. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(8):569-572.
- Zhou Y N, Mu Y P, Fu W W, et al. Yiguanjian decoction and its ingredients inhibit angiogenesis in carbon tetrachloride induced cirrhosis mice. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15:342.
- Ghanbari E, Nejati V, Khazaei M. Improvement in Serum Biochemical Alterations and Oxidative Stress of Liver and Pancreas following Use of Royal Jelly in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Cell J*, 2016, 18(3):362-370.
- 申定珠,陶庆,都金星,等.基于差异蛋白质组学解析一贯煎对大鼠肝硬化形成的影响.中西医结合学报,2010,8(2):158-167.
- Kisseleva T, Gigante E, Brenner D A. Recent advances in liver stem cell therapy. *Curr Opin Gastroenterol*, 2010, 26(4):395-402.
- Chen J, Zhang X, Xu Y, et al. Hepatic progenitor cells contribute to the progression of 2-acetylaminofluorene/carbon tetrachloride-induced cirrhosis via the non-canonical Wnt pathway. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0130310.
- Wang X L, Jia D W, Liu H Y, et al. Effect of Yiguanjiandecocton on cell differentiation and proliferation in CCl_4 -treated mice. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(25): 3235-3249.
- 万凌峰,赵红兵,邵铭,等.肝硬化肝肾阴虚证辨证论治规律研究.中医杂志,2012,53(15):1318-1320.

The Pathogenesis Theory of Liver- and Kidney-*yin* Deficiency in Cirrhosis and the Pathological Basis of the Prescription-Syndrome of *Yi Guan Jian*

Mu Yongping^{1,2}, Liu Ping^{1,2}

(1.Shuguang Hospital affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: Liver cirrhosis was equal to “*Zheng Ji*” disease in traditional Chinese medicine with the pathogenesis of quality deficiency caused by *yin* deficiency and its pathological basis involving the cell count’s reduction and the weakened function of hepatic parenchymal cells and the injury of liver sinusoidal wall. Nourishing the liver and kidney was the critical treatment strategy, of which *Yi Guan Jian* presented a favorable experimental research foundation with a long history of clinical application, including the improvement of liver biotransformation function, the antioxidant function and liver hypoxia, the protection of hepatic sinusoidal endothelial cells, inhibition of angiogenesis and the regulation of liver stem cell differentiation, etc. In this paper, the mechanism of liver- and kidney-*yin* deficiency, the pathogenesis theory of cirrhosis were summarized with the elucidation of pathological basis of the prescription-syndrome of *Yi Guan Jian*.

Keywords: Cirrhosis, liver- and kidney-*yin* deficiency, pathogenesis, pathological basis, *Yi Guan Jian*

(责任编辑 :马雅静, 责任译审 :朱黎婷)