

大黄素对大鼠肝纤维化形成的影响*

展玉涛 李定国 魏红山 王志荣 黄 新 李兆东 徐芹芳 陆汉明

内容提要 目的:研究大黄素对肝纤维化的影响。方法:采用 40% 的四氯化碳(CCl_4)给予大鼠皮下注射诱导肝纤维化,并以小、中和大剂量大黄素(20、40 和 80mg/kg 体重)干预,测定血清透明质酸、层粘连蛋白及肝组织羟脯氨酸,并通过光镜和电镜观察肝组织病理变化。结果:大黄素组较模型组:(1)血清透明质酸及层粘连蛋白显著降低;(2)肝组织胶原蛋白含量明显减少;(3)肝组织纤维化程度明显改善;(4)肝细胞损伤减轻。结论:大黄素对大鼠肝纤维化具有治疗作用。

关键词 大黄素 肝纤维化 胶原 透明质酸 层粘连蛋白

Effect of Emodin on Development of Hepatic Fibrosis in Rats ZHAN Yutao, LI Dingguo, WEI Hongshan, et al Affiliated Xinhua Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai (200092)

Objective: To investigate the effect of emodin on the development of hepatic fibrosis in rats. **Methods:** Forty percent of carbon tetrachloride (CCl_4) dissolved in olive oil was injected subcutaneously to rats twice a week, for 6 weeks to produce hepatic fibrosis model, the rats of treated group were simultaneously injected with CCl_4 , treated with emodin in low, medium and high dose (20, 40 and 80 mg/kg body weight respectively) once a day for 42 days, which was dissolved in 0.5% sodium carboxymethylcellulose (CMC), while for rats of the control group, they only received CCl_4 and CMC. Changes of serum hyaluronic acid, laminin and liver hydroxyproline were determined and histopathologic changes of liver was examined by optical microscopy and electron-microscopy. **Results:** Compared with the model group, in the emodin treated group: (1) Serum hyaluronic acid and laminin were markedly reduced ($P < 0.05$ or 0.01); (2) liver hydroxyproline was significantly decreased ($P < 0.05$ or 0.01); (3) degree of fibrosis was reduced ($P < 0.05$ or 0.01); (4) hepatocyte injury was ameliorated. **Conclusion:** Emodin has therapeutic effect on the development of hepatic fibrosis in rats. The effect might be related to slowing hepatocyte injury.

Key words emodin, liver fibrosis, collagen, hyaluronic acid, laminin

大黄素(emodin)属单蒽核类 1,6,8-三羟基蒽醌衍生物,是大黄、虎杖、何首乌、望江南、砂仁及百合等多种中药的有效成分之一。大黄素具有抗病毒、抑菌、抑制肿瘤生长、扩张血管及利尿等多种作用^[1],但是否抑制肝纤维化形成尚未见报道。本实验拟观察大黄素对实验性肝纤维化形成的影响。

材料和方法

1 材料 (1)实验动物及分组:纯系、雄性 SD 大鼠 48 只(中国科学院上海实验动物中心提供),体重(185 ± 23)g,随机分为 5 组:正常组 8 只,模型组 10 只,大黄素小剂量组(20mg/kg 体重)10 只,大黄素中

剂量组(40mg/kg 体重)10 只,大黄素大剂量组(80mg/kg 体重)10 只。(2)药物及主要试剂:大黄素由中国药科大学植化室提供。透明质酸放射免疫试剂盒及层粘连蛋白放射免疫试剂盒购自海军上海医学研究所。羟脯氨酸标准品购自中国科学院上海生物化学研究所。(3)主要仪器:UV-Vis7530 型分光光度计。FMJ-182 型放射免疫计数仪。

2 方法

2.1 肝纤维化动物模型制作 用橄榄油将 CCl_4 稀释成 40% 的溶液,首次以 0.5ml/100g 体重皮下注射,以后以 0.3ml/100g 体重皮下注射,3 天 1 次,共 42 天。

2.2 药物干预 以 0.5% 羧甲基纤维素钠配制不同浓度的大黄素混悬液,治疗组按模型组法制备肝纤维化模型,并同时给不同剂量大黄素混悬液灌胃,每天 1 次,共 42 天。

*上海市高等学校科学技术发展基金项目(No. 97B09)

上海第二医科大学附属新华医院(上海 200092)

2.3 观察项目及检测方法 (1)血清透明质酸及层粘连蛋白:以放射免疫法测定血清透明质酸和层粘连蛋白。(2)肝组织羟脯氨酸:按郑少雄法⁽²⁾测定肝组织羟脯氨酸。(3)组织病理学检查:肝组织标本以 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,4 μ m 连续切片,行 VG 和 HE 染色。光镜下观察 HE 及 VG 染色肝组织切片,将纤维增生程度分为 0~4 级⁽³⁾。0 级:无纤维化;1 级:纤维结缔组织只局限于汇管区或有汇管区扩大,有向小叶发展倾向;2 级:纤维结缔组织增生进入肝小叶 2/3 及有 1 级同样的改变;3 级:纤维结缔组织增生进入小叶达中央静脉周围;4 级:纤维结缔组织在全小叶多处弥漫性增生,假小叶形成,并有 3 级同样的改变。(4)电镜观察:用 2.5% 戊二醛固定标本,经 1% 锇酸固定 2h,丙酮乙醇逐级脱水,环氧树脂包埋,醋酸铀和柠檬酸铅染色,超薄切片,透射电镜观察。(5)统计学处理:计量资料用 *t* 检验,计数资料用 Ridit 检验。

结 果

1 大黄素对血清透明质酸及层粘连蛋白影响见表 1。与正常组比较,模型组血清透明质酸及层粘连蛋白显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,大黄素组血清透明质酸及层粘连蛋白降低,并有统计学差异,均以大剂量组最明显($P < 0.01$)。

表 1 大黄素对血清透明质酸、层粘连蛋白及肝羟脯氨酸的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	透明质酸含量 (μ g/L)	层粘连蛋白 (μ g/L)	羟脯氨酸 (μ g/g 肝组织)
正常	8	52.9 $\pm$ 22.9	28.6 $\pm$ 9.4	4.68 $\pm$ 2.59
模型	8	154.9 $\pm$ 58.0 [△]	70.0 $\pm$ 21.2 [△]	18.17 $\pm$ 5.84 [△]
大黄素小剂量	8	99.3 $\pm$ 43.0*	46.8 $\pm$ 17.8*	11.75 $\pm$ 2.50*
中剂量	7	88.6 $\pm$ 44.7*	39.7 $\pm$ 15.5*	8.31 $\pm$ 2.64**
大剂量	7	73.3 $\pm$ 35.6**	37.0 $\pm$ 14.7**	7.97 $\pm$ 2.83**

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与正常组比较,[△] $P < 0.001$

2 大黄素对肝组织羟脯氨酸的影响 见表 1。模型组羟脯氨酸显著高于正常组($P < 0.001$);而大黄素组显著低于模型组,其中小剂量组与模型组比较,有显著性差异($P < 0.05$),中、大剂量组与模型组比较,亦有显著性差异($P < 0.01$)。

3 大黄素对肝组织病理学的影响 正常组肝脏肝板以中央静脉为中心呈条索状向四周放射样排列,板间有不规则肝窦,肝小叶内网状纤维支架完整,分布规律,无胶原纤维存在。模型组肝细胞变性坏死,肝小叶结构破坏,纤维结缔增生,假小叶形成。大黄素组肝细胞变性坏死明显减轻,纤维结缔明显减少,未见明显的假小叶形成。各组肝纤维化情况:见表 2。与模型

组比较,大黄素小剂量组 $U = 2.03$, $P < 0.05$;中剂量及大剂量组分别 $U = 2.87, 2.93$, $P < 0.01$,提示大黄素能明显改善肝纤维化程度。

表 2 大黄素对肝组织病理学的影响 (只)

组别	<i>n</i>	纤维化分级					<i>U</i>
		0	I	II	III	IV	
正常	8	8	0	0	0	0	
模型	8	0	0	1	3	4	
大黄素小剂量	8	0	1	4	2	1	2.03*
中剂量	7	0	3	2	2	0	2.87**
大剂量	7	0	4	2	1	0	2.93**

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$

4 电镜观察 正常肝细胞呈多面体,细胞核为圆形或椭圆形,核膜清晰,胞浆内有散布的核糖体,有分布规律的内质网,线粒体呈圆形或椭圆形。模型组肝细胞核固缩、变形,核膜模糊不清,线粒体肿胀、结构模糊、嵴减少,内质网溶解,胞浆内有大量脂滴,核糖体脱失。大黄素组肝细胞损害减轻,无明显的脂滴,线粒体膜性结构可见,内质网存在,但不如正常组规律。

讨 论

肝纤维化的主要病理特征是大量细胞外基质在肝脏过度积聚和沉积,细胞外基质主要包括:(1)胶原:I、III、IV、V 型;(2)蛋白多糖:硫酸软骨素、硫酸皮肤素、透明质酸等;(3)糖蛋白:层粘连蛋白、纤维连接蛋白、副层粘连蛋白、副纤维连接蛋白、粗纤维调节素。研究表明,血清透明质酸及层粘连蛋白水平能反映肝纤维化的程度⁽⁴⁾,是肝纤维化较理想的血清学指标。肝组织羟脯氨酸是反映肝脏胶原含量的指标,而胶原是肝纤维化细胞外基质的主要成分。肝组织病理学检查是诊断肝纤维化的金标准。本实验结果发现,大黄素能使肝纤维化大鼠血清透明质酸及层粘连蛋白降低、减少肝组织羟脯氨酸含量,并能降低肝纤维化分级评分,提示大黄素对实验性肝纤维化形成具有治疗作用。

电镜观察结果表明,大黄素组肝细胞结构基本正常,细胞器无明显损害,提示大黄素具有护肝作用,具体机制尚不明了。研究发现⁽⁵⁾,大黄素可清除氧自由基,减轻脂质过氧化反应,可能因此发挥保肝作用。目前认为肝细胞损伤是肝纤维化形成的启动因素,大黄素的保肝作用可能是其抑制肝纤维化形成的作用机制之一。

参与肝纤维化形成的细胞有肝星状细胞、肝细胞、枯否细胞及内皮细胞等,其中肝星状细胞起主要作用。肝纤维化时肝星状细胞活化表现为增殖、合成大量细

胞外基质等。研究发现^[6-9], 大黄素能抑制血管平滑肌细胞、肾小球系膜细胞、角朊细胞及肿瘤细胞的增殖, 大黄素也可能通过抑制肝星状细胞增殖等从而阻止肝纤维化的形成。

参 考 文 献

1. 黄兆胜, 王宗伟. 大黄素基原及药理作用研究. 国外医学中医中药分册 1997;19(5):9—12.
2. 郑少雄, 蔡文仪, 邱明才, 等. 血尿酸脯氨酸测定方法改进. 中华医学检验杂志 1983;6(3):133—136.
3. Schvartz R, Glanmann H, Weiland O, et al. Survival and histological resolution of fibrosis in patients with autoimmune chronic active hepatitis. J Hepatol 1993;4(9):277—280.
4. Hayasaka A and Saisho H. Serum markers as tools to monitor liver fibrosis. Digestion 1998;59(1):381—384.
5. 邹 洪, 袁倬斌. 大黄素的极谱行为及应用研究. 药学学报 1997;32(4):310—313.
6. 刘彦株, 罗国安. 大黄素、大黄酸对平滑肌细胞增殖抑制作用研究. 生物物理学报 1998;14(2):240—244.
7. 魏志平, 殷金珠, 沈 力. 大黄素对角朊细胞体外增殖分化影响的研究. 中国药理学通报 1998;14(2):157—160.
8. 刘志红, 黎磊石, 胡伟新, 等. 大黄素对肾小球系膜细胞 C-myc 原癌基因表达的影响. 中国药理学报 1996;17(1):61—63.
9. Zhang L, Chang CJ, Bacuss SS, et al. Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin. Cancer Res 1995;55(17):3890—3896.

(收稿:1999-07-10 修回:2000-01-03)

川芎嗪治疗肺心病急性加重期肺动脉高压 48 例

周义乾 李金兰 张素荣

为探讨能有效降低肺动脉压而又无明显副作用的药物, 我们对 48 例肺心病急性加重期肺动脉高压的患者采用川芎嗪静脉用药, 同时在给药前后不同时间用微导管监测肺动脉压及测量血压, 以观察该药对肺动脉压及血压的影响。

临床资料 48 例肺动脉高压患者均为我院呼吸、结核、心血管内科住院患者, 男 34 例, 女 14 例; 年龄 54~79 岁, 平均 (68±13) 岁; 慢支肺气肿 32 例 [诊断符合 1977 年全国第二次肺心病会议制定标准], 重症 (IV 型) 肺结核 14 例, 严重胸廓畸形 2 例。所有患者均经心电图、超声心动图、X 线及动脉血气分析等检查。

方 法 所有患者除常规治疗外不用任何影响肺动脉压的药物。采用无锡市第七制药厂生产的盐酸川芎嗪注射液 (每支 2ml 含川芎嗪 40mg, 批号: 9802271) 80mg 用生理盐水 20ml 稀释后缓慢静脉注射, 分别于用药前及用药后 30min, 60min 测量肺动脉压及血压, 之后以川芎嗪 320~400mg, 加生理盐水 250ml 每天静脉滴注 1 次, 连用 1 周后再测量肺动脉压及血压。肺动脉压测量采用天津塑料研究所生产的微型心导管及美国多功能系列监护仪 (Serles-7010 monitor)。统计学方法: 采用 *t* 检验。

结 果 48 例患者用药前后不同时间肺动脉压及血压测定值比较, 见表 1。用药前所有患者均有不同程度的肺动脉高压, 用药后 30min, 60min 及 1 周后肺动脉收缩压、舒张压及平均压与用药前比较均显著降低 ($P<0.01$), 尤其见于用药后 1 周。用药前后体动脉压变化无明显差异 ($P>0.05$)。随着肺动脉压的降低, 患者呼吸困难症状减轻。无心率增快及其他副作用。

表 1 48 例患者用药前后肺动脉压及血压比较 (kPa, $\bar{x} \pm s$)

	用药前	用药后 30min	60min	1 周
肺动脉压				
收缩压	5.64±0.48	4.68±0.45*	4.12±0.46*	3.82±0.41*
舒张压	2.83±0.81	2.13±0.48*	1.86±0.44*	1.59±0.25*
平均压	4.32±0.72	3.44±0.42*	3.12±0.28*	2.67±0.27*
血 压				
收缩压	15.22±2.16	15.01±2.24	14.86±2.38	14.93±1.90
舒张压	10.84±1.72	10.63±1.68	10.59±1.28	10.62±1.84

注: 与用药前比较, * $P<0.01$

讨 论 各种病因所致的肺动脉高压, 其基本形成机制是由于慢性炎症、缺氧、血粘度增加、缩血管物质增多及与扩血管物质比例失调等因素, 引起肺小血管痉挛, 血流阻力增加所致。川芎嗪注射液是从中药川芎中分离提纯出的一种生物碱, 具有兴奋延髓呼吸及血管运动中枢, 直接扩张周围血管, 抑制血小板聚集, 降低血粘度, 改善微循环之功能。黄瑞健等报道, 川芎嗪是一种血栓素 A_2 合成酶抑制剂, 能有效的减少血栓素 A_2 的产生, 使缩血管物质生成减少, 产生扩血管效应 [中国中西医结合杂志 1998; 18 (6): 333—335]。本组资料显示, 应用川芎嗪后患者肺动脉压较用药前明显降低, 尤见于用药后 1 周。且原肺动脉压越高, 用药后降低越明显, 临床症状改善亦越显著。而血压变化不大, 这可能是由于肺动脉压的降低, 减轻了右心射血阻抗, 使左心回心血量增多, 心搏量增加, 抵消了川芎嗪对周围小动脉的扩张所致的血压下降。综上所述, 川芎嗪能有效地降低肺心病急性加重期的肺动脉高压, 改善缺氧症状, 且无明显副作用, 是治疗肺动脉高压的有效药物。

(收稿:1998-10-14 修回:2000-01-10)