

虎金丸对肝纤维化大鼠血清Ⅲ型前胶原、透明质酸及层粘蛋白作用的动态观察*

黄兆胜¹ 黎俏梅² 王宗伟¹ 刘明平¹ 荣向路¹ 吴庆光¹

内容提要 目的:观察虎金丸对肝纤维化大鼠血清Ⅲ型前胶原(procollagen Ⅲ, PCⅢ)、透明质酸(hyaluronic acid, HA)及层粘蛋白(laminin, LN)的动态影响。方法:采用 CCl₄ 所致肝纤维化动物模型,用放免法检测血清 PCⅢ、HA、LN。结果:虎金丸能显著降低各期模型大鼠血清中 HA、LN 的含量,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。长期疗效优于秋水仙碱组。能维持血清中 PCⅢ 的血清含量在肝纤维化期(9、12 周)基本正常,与正常对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。结论:虎金丸能延缓肝纤维化的形成,有较好的预防和治疗效果。

关键词 虎金丸 肝纤维化 Ⅲ型前胶原 透明质酸 层粘蛋白

Observation on Dynamic Changes of Serum Procollagen Ⅲ, Hyaluronic Acid and Laminin in Rats with Hepatic Fibrosis Treated with Hujin Pill HUANG Zhaosheng, LI Qiaomei, WANG Zongwei, et al College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510405)

Objective: To study the dynamic changes of serum procollagen Ⅲ (PCⅢ), hyaluronic acid (HA) and laminin (LN) in rats with hepatic fibrosis treated with Hujin pill (HJP). **Methods:** The classic model of hepatic fibrosis induced by CCl₄ were used in the observation. The serum PCⅢ, HA and LN were determined by radioimmunoassay (RIA). **Results:** HJP could reduce the serum HA, LN content significantly, as compared with the control group, the difference was significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Its long-term therapeutic effect was better than that of colchicine. It could maintain the serum PCⅢ stable in hepato-fibrotic stage (9~12 weeks), as compared with the normal control group, the difference was insignificant ($P > 0.05$). **Conclusion:** HJP could retard the liver fibrosis, and has good preventive and therapeutic effect on liver fibrosis in rats.

Key words Hujin pill, liver fibrosis, procollagen Ⅲ, hyaluronic acid, laminin

虎金丸由虎杖、郁金、田七、灵芝等 6 味药物组成。既往研究表明该方有抗 CCl₄ 所致小鼠肝损伤的保护作用,对 CCl₄ 所致大鼠肝细胞急性损伤也有保护作用。本研究用 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化,观察虎金丸的防治肝纤维化的动态效应。

材料和方法

1 动物及分组 SD 雄性大鼠 180 只,体重(200 ± 20)g,由广州中医药大学动物中心提供。随机分为 5 组,分别为正常对照组、模型对照组、虎金丸高剂量(7.50g/kg)组、虎金丸低剂量(3.75g/kg)组、秋水仙碱对照组。

2 药物 虎金丸供试液系按处方(虎杖、郁金、田七、灵芝等)比例将各药材加水煎煮 3 次,过滤,浓缩为含生药 1.5g/ml,临用时稀释使用,由本校中药教研室

提供;阳性对照药:秋水仙碱,分析纯,Serva 公司出品,进口分装,批号为 00352。

3 试剂与仪器 CCl₄,分析纯,广州化学试剂厂,批号:96707-2;橄榄油,化学纯,上海化学试剂站分装厂,批号:860806;Ⅲ型前胶原(procollagen Ⅲ, PCⅢ)、透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘蛋白(laminin, LN)放免试剂盒由上海海军医学研究所提供;测量仪器为美国 BECKMAN DP 5500 型 γ 计数仪。

4 造模及给药方法 参照文献^[1]加以改进。正常对照组用纯橄榄油后腿皮下注射,每 100g 体重 0.1ml,每周 2 次;其余 4 组用质量分数 50% CCl₄ 与橄榄油等量混合液后腿皮下注射,剂量为每 100g 体重 0.1ml,每周 2 次。正常对照组和造模组每日依次灌胃蒸馏水,每 100g 体重 0.1ml;秋水仙碱组用药量为每日每 100g 体重 0.001g,虎金丸高、低剂量组药用量分别为每 100g 体重 0.750g 和 0.375g。造模同时给药,共 12 周。分别于灌胃后第 3、6、9、12 周,分 4 批分组眼球取血,分离所得血清于 -20℃ 保存。血清标本采

* 国家中医药管理局重点资助课题(No. 97A06)

1. 广州中医药大学中药学院(广州 510405);2. 暨南大学医学院中医系

取完成后用放免试剂盒,依照说明书操作,一次性检测。所得结果用 t 检验检测。每次处死大鼠,取肝脏组织左叶用中性甲醛固定,供病理切片用。

结 果

1 大鼠一般状况 正常对照组大鼠在第 9 周死亡 1 只,体重持续增加;模型组整个造模过程死亡 3 只,体重自第 7 周起不增加,秋水仙碱组大鼠全程死亡 5 只,体重自 9 周起增加不明显;虎金丸高、低剂量组大鼠无死亡,体重亦持续上升。

2 大鼠肝脏大体比较 模型组从第 3 周起出现肝脏整体肿大,色黄润,质软,肝重增加明显。6 周起肝韧度增加,边缘开始变钝;9~12 周有 3 只大鼠出现腹水,第 12 周有 1 只大鼠出现肝脏缩小,肝表面结节形成。大鼠体重减轻明显;虎金丸高、低剂量组大鼠肝脏 3~6 周肿大不明显,质地一直较软,边缘较锐利,色暗红;9~12 周肝脏出现肿大,程度较轻。秋水仙碱组大鼠肝脏一直无明显肿大,但 9~10 周后肝质地较硬,边缘也变钝;无 1 只出现腹水。

3 大鼠肝脏病理变化 HE 染色显示正常对照组 3~12 周肝小叶结构均完整,肝细胞排列整齐,间或有少量炎症细胞浸润,无纤维组织增生。模型组在 3 周已呈

现小泡与大泡样脂肪变性坏死同时共存,汇管区有淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞浸润,肝细胞排列紊乱;6 周起在肝细胞坏死塌陷处出现胶原纤维沉积,开始分割肝小叶,肝细胞再生活跃,可见分裂的肝细胞。汇管区有大量慢性炎细胞浸润;9 周胶原沉积分割肝小叶程度加重;12 周胶原沉积分隔各个肝小叶,假小叶开始形成,进入肝硬化前期,达到肝纤维化高峰期。

虎金丸高剂量组大鼠肝脏 HE 染色显示 3~9 周一直呈小泡样脂肪变性,仅在 12 周起变性坏死加重,开始有少量胶原沉积,分割肝小叶;秋水仙碱组亦是如此。小剂量组则胶原沉积不明显,肝细胞有大泡样变形坏死。

4 血清 LN、HA、PCⅢ的变化 见表 1~3。模型组大鼠血清 LN 与 HA 自 3 周起即升高,与正常对照组比较有显著性差异($P < 0.05$)。以后各期持续升高,与正常对照组比较有显著性差异($P < 0.01$)。HA 在第 9 周达到峰值,LN 则在 12 周时达到最高值,PCⅢ在 3、6 周与正常对照组比较无显著性差异($P \geq 0.05$),但在第 9、12 周有明显升高,与正常对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。这与报道 CCl_4 致肝纤维化大鼠血清细胞外间质(extracellular matrix, ECM)成分水平变化一致^[1]。虎金丸高、低剂量组都可以显著

表 1 各组大鼠血清 LN 含量变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LN($\mu\text{g/L}$)			
	3	6	9	12(w)
正常对照	25.30 $\pm$ 7.07	26.94 $\pm$ 5.99	25.09 $\pm$ 4.18	25.08 $\pm$ 8.17
模型	32.78 $\pm$ 3.92*	32.51 $\pm$ 5.68*	33.89 $\pm$ 6.78*	43.60 $\pm$ 8.14**
虎金丸(高)	26.94 $\pm$ 5.71 Δ	23.68 $\pm$ 6.04 $\Delta\Delta$	29.38 $\pm$ 5.97 Δ	31.20 $\pm$ 5.66 $\Delta\Delta$
虎金丸(低)	26.23 $\pm$ 6.85 Δ	28.55 $\pm$ 7.40	30.21 $\pm$ 8.89	28.49 $\pm$ 7.02 $\Delta\Delta$
秋水仙碱	29.14 $\pm$ 5.59	23.74 $\pm$ 6.22 Δ	27.44 $\pm$ 4.37 $\Delta\Delta$	37.47 $\pm$ 8.20

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;每组鼠数为 8;下表同

表 2 各组大鼠血清 HA 含量变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HA($\mu\text{g/L}$)			
	3	6	9	12(w)
正常对照	314.86 $\pm$ 52.98	242.16 $\pm$ 53.81	306.94 $\pm$ 82.20	325.66 $\pm$ 47.01
模型	369.44 $\pm$ 57.37*	412.91 $\pm$ 77.82**	480.75 $\pm$ 49.01**	415.55 $\pm$ 87.14**
虎金丸(高)	257.34 $\pm$ 80.35 Δ	279.80 $\pm$ 91.07 $\Delta\Delta$	363.59 $\pm$ 42.45 $\Delta\Delta$	320.23 $\pm$ 67.41 Δ
虎金丸(低)	236.33 $\pm$ 56.63 $\Delta\Delta$	279.66 $\pm$ 64.22 $\Delta\Delta$	324.22 $\pm$ 38.19 $\Delta\Delta$	439.85 $\pm$ 74.13
秋水仙碱	366.02 $\pm$ 98.47	383.51 $\pm$ 89.36	414.34 $\pm$ 104.35	509.64 $\pm$ 106.74

表 3 各组大鼠血清 PCⅢ含量变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PCⅢ($\mu\text{g/L}$)			
	3	6	9	12(w)
正常对照	44.13 $\pm$ 3.77	37.94 $\pm$ 4.25	41.80 $\pm$ 3.80	47.03 $\pm$ 3.78
模型	42.82 $\pm$ 6.47	43.23 $\pm$ 1.70	45.75 $\pm$ 6.09*	55.03 $\pm$ 9.15*
虎金丸(高)	39.47 $\pm$ 3.00	36.70 $\pm$ 3.17	40.62 $\pm$ 1.31 Δ	43.57 $\pm$ 4.61 Δ
虎金丸(低)	49.82 $\pm$ 4.42	44.85 $\pm$ 4.40	43.47 $\pm$ 6.67	51.27 $\pm$ 8.10
秋水仙碱	40.11 $\pm$ 4.18	41.73 $\pm$ 5.12	41.73 $\pm$ 2.50	52.82 $\pm$ 5.67

降低大鼠血清中 LN、HA 的含量,与模型组比较差异显著,尤以高剂量组效果显著($P < 0.01$),并可抑制大鼠第 9、12 周的 PCⅢ 的升高,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$),与正常对照组比较无显著性差异。

讨 论

CCl_4 是经典肝脏毒物,其长期慢性中毒所致大鼠肝纤维化为经典动物模型。 CCl_4 可直接损伤肝脏,引起中央静脉周围肝细胞的坏死,纤维增生小叶内以窦隙为主。从 HE 染色病理切片看,动物肝纤维化的动态模型是成功的,模型组的肝脏经历了从肝中央周围肝细胞坏死,局部炎症细胞浸润,到沿坏死区沉积 ECM,进而开始间隔肝小叶,达到肝硬化的前期。血清 HA、LN、PCⅢ 的含量与肝脏内三种成分在 6、9、12 周有显著正相关,能较好的反应肝匀浆内三者的变化^[1],这三者是 ECM 成分的代表,反映了肝纤维化的进展程度。

本结果显示,虎金丸高、低剂量组均能明显降低模型大鼠血清 HA、LN 及 PCⅢ 的含量,尤以高剂量组作用显著,与模型组比较有显著性差异,与秋水仙碱组在后期也有差异,说明虎金丸抗肝纤维化的长期疗效优于秋水仙碱;这可能是秋水仙碱降低 PCⅢ 能力较弱,反映出的降解胶原的作用较低所致。肝纤维化证的本质在于血瘀^[2],虎金丸以活血化瘀,益气行滞为其立

法,有较明显的抑制 ECM 沉积的作用。此外,既往研究表明,该方具有明显抑制肝脏脂质过氧化和护肝的作用^[3]。Bedossa 等在 CCl_4 致小鼠肝损害模型中观察到,在相同部位的组织中,胶原 $\alpha(I)$ 基因的 mRNA 的含量随着脂质的过氧化反应而增加^[4]。虎金丸抗肝纤维化的机理可能有二:(1)其可能通过降低了肝的脂质过氧化,保护了肝细胞,降低了肝细胞的损伤程度,降低了 IL-1、TNF、IL-6 等介质的启动肝纤维化机制的作用;(2)调控了胶原 $\alpha(I)$ 基因的 mRNA 的含量,从而抑制了贮脂细胞的胶原 $\alpha(I)$ 基因的表达,从而减少了胶原的分泌量。

参 考 文 献

1. 陈东风,冷恩仁,刘为纹,等.大鼠实验性肝纤维化过程中血清和肝组织 HA、LN、PCⅢ 水平的动态变化.第三军医大学学报 1996;18(2):234—236.
2. 唐智敏,茹清静,张振鄂,等.肝血瘀阻与肝纤维化关系的临床研究.中国中西医结合杂志 1997;17(2):81.
3. 黄兆胜,黎俏梅,王宗伟,等.虎金丸对 CCl_4 所致实验性肝损伤的保护作用.中国实验方剂学杂志 1999;(2):21—23.
4. Bedossa P, Houglum K, Trautwein C, et al. Stimulation of collagen alpha (I) gene. Expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? Hepatology 1994;19(5):1262.

(收稿:1999-01-26 修回:1999-10-28)

中国中医研究院培训中心 2000 年招生通知

中国中医研究院是中国中医药研究机构和医疗教学的重要基地。培训中心依托中国中医研究院科研、医疗、教学的优势,集国内大批中医药界名老中医药专家教授雄厚的师资力量和他们丰富的临床技能、理论知识和办学经验,为国内外广大医务工作者提供一个学习交流的机会,更好地造福于众多的就医患者。真诚欢迎中医药界同行朋友来中心学习进修。2000 年招生如下。

(1)任志远中国传统刀(即小针刀)疗法;薛立功古长圆针疗法现代临床应用专题讲修班,办班时间(下简称时间)为 2 月 21~27 日、4 月 17~24 日、6 月 13~19 日、8 月 1~7 日。(2)中医美容培训班:用中医药、针灸等疗法治疗面部皮肤病,包括美白祛皱、黄褐斑、痤疮等。时间为 2 月 29 日~3 月 2 日、6 月 21~23 日、8 月 9~11 日。(3)全国高级中医进修班:时间为 3 月 8~19 日、8 月 17~28 日。(4)中西医结合肾病糖尿病诊疗经验专题进修班,时间为 3 月 29 日~4 月 4 日、8 月 30 日~9 月 5 日。(5)高级中西医结合临床应用讲座班:时间为 4 月 6~15 日、9 月 15~24 日。(6)继承名老中医经验专题研修班:时间为 4 月 26 日~5 月 7 日、9 月 25 日~10 月 8 日(1,2 日休)。(7)高级中医肛肠病诊疗技术进修班:时间为 4 月 6~15 日、6 月 2~11 日、10 月 10~19 日、12 月 16~25 日。(8)高级针灸临床应用进修班:时间为 5 月 9~20 日、10 月 20 日~11 月 1 日。(9)高级推拿按摩进修班:时间为 5 月 9~20 日、10 月 20 日~11 月 1 日。(10)高级中西医结合治疗骨折与肢体畸形矫正经验进修班:时间为 5 月 22~31 日、11 月 3~12 日。(11)中西医结合疼痛疗法专题进修班:时间为 6 月 29 日~7 月 5 日、11 月 14~20 日。(12)高级中西医结合血液病诊疗经验专题进修班:时间为 5 月 22~28 日、11 月 3~9 日。(13)中西医结合肿瘤病综合疗法专题进修班:时间为 4 月 17~24 日、11 月 30 日~12 月 6 日。(14)中西医结合(外科)皮肤病、性病诊疗技术进修班:时间为 3 月 21~27 日、12 月 8~14 日。(15)中西医结合风湿病(痹症)临床诊疗进修班:时间为 7 月 7~15 日。

以上各班于开班前一日报名。报名上课地址:中国中医研究院培训中心第一、第二教室(内设冷暖空调)。高级中医肛肠病诊疗技术进修班,学费 800 元,其他各班学费 680 元,报名费 10 元。学习结业颁发中英文对照钢印结业证书和继续教育学分证明。食宿统一安排,费用自理。请备 2 寸免冠照片两张。请于开学前一周电话联系。

联系地址:北京市东直门内北新仓 18 号 中国中医研究院培训中心;邮政编码:100700;联系人:狄福金 沙 力。

电 话:010-64062096, 010-64028399, 010-64014411-3174; 传 真:010-64062096。