

臌胀片抗大鼠肝纤维化作用的实验研究*

赵玉瑶 刘方洲 杨小平 侯留法 陈宝玲 毛重山 张关亭 R28 A

摘要 目的:观察臌胀片抗大鼠肝纤维化的作用,并探讨其机制。**方法:**将 200~220g 雌性大鼠 50 只,随机分为:正常空白对照组(简称对照组,10 只),病理模型对照组(简称模型组,10 只),臌胀片小剂量治疗组(简称小剂量组,10 只),臌胀片大剂量治疗组(简称大剂量组,10 只),鳖甲煎丸阳性对照组(简称鳖甲组,10 只)。观察治疗 8 周后大鼠的相关血清酶类、肝纤维化标志物、氧自由基及肝组织病理学等变化。**结果:**(1)与模型组比较,大、小剂量组治疗后血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)、碱性磷酸酶(AKP)均有改善,大剂量组效果更为显著;(2)与对照组比较,大、小剂量组对血清总蛋白(TP)作用无明显差异,对白蛋白(ALB)有升高作用;(3)与对照组比较,大、小剂量组对血清透明质酸(HA)、层粘蛋白(LN)、IV 型胶原(IV-C)、III 型前胶原(PCⅢ)均有降低的作用,大剂量组尤为显著;(4)大、小剂量组可以减少丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和一氧化氮(NO)含量,然而在增加超氧化物歧化酶(SOD)水平方面,与鳖甲组比较,差异无显著性;(5)大、小剂量组具有明显抗纤维化的作用,并优于鳖甲组。**结论:**臌胀片在对抗大鼠肝纤维化的发生、发展过程中,能够保护肝细胞,抑制胶原蛋白的合成并促进其降解,其作用机制与对抗氧化损伤作用有关。

关键词 肝纤维化 臌胀片 实验研究

Experimental Study on the Anti-Liver Fibrosis Effect of Guzhang Tablet in Rats ZHAO Yu-yao, LIU Fang-zhou, YANG Xiao-ping, et al *Henan Provincial Academy of TCM, Zhengzhou (450004)*

Objective: To observe the anti-liver-fibrosis effect of Guzhang Tablet (GZT) and to explore its mechanism. **Methods:** Fifty female rats, weighing 200~220g were randomly divided into the blank control group, the model group, the small dosage GZT group, the large dosage GZT group and the Biejiajian Pill (BJJP) group, 10 rats in each group. The changes of related serum enzymes, liver-fibrosis marker, oxygen free radical and liver tissue pathology were observed after 8 weeks of treatment. **Results:** (1) Compared with the model group, the serum levels of alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutamyltranspetidase (GGT), alkaline phosphatase (AKP) were improved in the GZT groups, better effect was got in the large dosage GZT group. (2) Compared with the blank control group, GZT showed no effect on serum total protein (TP) but with raising albumin (ALB) effect. (3) Compared with blank control group, the levels of hyaluronidase (HA), laminin (LN), collagen type IV (IV-C) and procollagen type III (PCⅢ) in both GZT groups were lower, especially in the large dosage GZT group. (4) Small and large dosage of GZT showed effect in reducing malonyldialdehyde (MDA), Glutathione-peroxidase(GSH-Px) and nitric oxide (NO) content, but the effect on increasing superoxide dismutase (SOD) similar to that of BJJP with no significant different. (5) GZT, both small and large dosage, had obvious anti-liver fibrosis action, which was superior to that of BJJP. **Conclusion:** In the genetic and developing processes of liver fibrosis in rats, GZT could protect the liver cells, inhibit the synthesis and reduce the content of collagens, the mechanism might be related with its action in antagonizing peroxidation injury, indicating that GZT could effectively prevent liver fibrosis formation.

Key words liver fibrosis, Guzhang Tablet, experimental study

肝纤维化是各类慢性肝病的中间基本环节。药物治疗可使增多的胶原纤维逐渐被吸收,使肝脏结构恢

复正常^[1],故阻断肝纤维化的进程是治疗许多难愈性肝病的关键所在。笔者根据中医理气活血、健脾利湿的法则,以柴胡、三七、青皮、葫芦巴等为主要药物,组成臌胀片应用于临床,取得了较好的疗效。在此基础上,我们进行了臌胀片抗肝纤维化的实验研究,进一

* 国家中医药管理局科技攻关项目(No. 89B061)

河南省中医药研究院(郑州 450004)

通讯作者:赵玉瑶, Tel: 0371-6322735

步验证其疗效并探讨其作用机制。

材料与方法

1 动物 雌性 Wistar 大鼠 50 只, 体重 200 ~ 220g, 由河南省中医药研究院实验动物中心提供。

2 药物 治疗药物臌胀片(由柴胡、青皮、三七、赤芍、山楂、党参、鳖甲、葫芦巴、黄芪、青蒿组成, 按照 1:1:1:1:1:1:1.5:2:2 比例配制, 提取后制成片剂, 每片 0.5g, 每克成药含原生药 5g。由河南省奥林特制药厂生产, 生产批号: 980312。实验时研为粉末, 用 1% 羧甲基纤维素钠配制成 30% (含原生药 1.5g/ml) 和 15% (含原生药 0.75g/ml) 的混悬液供灌胃用。对照药物鳖甲煎丸(武汉中药厂生产), 实验时用 1% 羧甲基纤维素钠配制成 20% 的混悬液供灌胃用。

3 试剂及仪器 四氯化碳(CCl_4)分析纯, 北京市化工厂生产, 批号: 990107, 用棉子油配制成 40% 油剂。日立 7020 全自动生化分析仪, SN695B 型智能放免 γ -测量仪(上海原子核研究所日环仪器一厂生产)。

4 实验方法

4.1 模型制作 参照文献^[2]方法, 实验第 1 天除正常空白对照组(简称对照组)外, 其余动物皮下注射 CCl_4 分析纯 0.5ml/100g 体重, 以后每隔 3 天注射 40% CCl_4 油剂 0.3ml/100g 体重, 连续 6 周。实验前 2 周饲喂高脂玉米粉饲料(79.5% 玉米粉 + 20% 猪油 + 0.5% 胆固醇), 第 3 ~ 6 周饲喂 100% 玉米粉和 30% 乙醇饮料。

4.2 分组及给药方法 将 50 只大鼠随机分为 5 组, 第 1 组对照组(10 只), 饲喂正常饮食; 第 2 组病理模型对照组(简称模型组, 10 只), 按上述造模方法给予饮食; 第 3 组臌胀片小剂量治疗组(简称小剂量组, 10 只), 于造模第 2 天开始, 给予 15% 臌胀片药液灌胃, 每日 1ml/100g; 第 4 组臌胀片大剂量治疗组(简称大剂量组, 10 只), 于造模第 2 天开始给予 30% 臌胀片药液, 每日 1ml/100g; 第 5 组鳖甲煎丸阳性对照组(简称鳖甲组, 10 只), 于造模第 2 天开始给予鳖甲煎丸 20% 混悬液灌胃, 每日 1ml/100g。

4.3 观察指标及检测方法

4.3.1 生化指标 于实验第 8 周末, 眼眶取血, 离心。血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定: 采用赖氏法; 门冬氨酸氨基转移酶(AST)测定: 采用赖氏法; 碱性磷酸酶(AKP)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)测定: 采用速率法; 总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)和球蛋白(GLO)测定: 采用溴甲酚绿法。

4.3.2 肝纤维化标志物 血清透明质酸(HA)、

层粘蛋白(LN)、IV 型胶原(IV-C)、III 型前胶原(PCIII)测定, 试剂盒由上海海洋医学生物技术中心提供, 均采用放免法, 按说明书操作。

4.3.3 氧自由基测定 于实验第 8 周末, 将各组大鼠处死, 取 0.5g 肝左叶组织, 以冰冷生理盐水冲洗, 待血液清洗干净后, 置于容器中, 加入 5ml 冰冷生理盐水, 研成 10% 组织匀浆, 按相应的检测项目进行不同方法的处理和检测。进行一氧化氮(NO)测定(荧光光度法)、丙二醛(MDA)测定(硫代巴比妥酸法 TBA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定(荧光光度法), 并测超氧化物歧化酶(SOD)活性(黄嘌呤氧化酶法)。试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。用 722 型分光光度计 540nm 测吸光度, 由上海第三分析仪器厂生产。

4.3.4 组织病理学观察 各组大鼠取肝左叶, 10% 福尔马林液固定 72h 后, 脱水石蜡包埋、切片, 约厚 4 μm , 作 HE 染色, 光镜观察肝损伤程度及肝纤维化程度并摄取照片。

4.4 统计学方法 计数数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均采用 t 检验。计量资料用 $Ridit$ 统计学处理。

结 果

1 各组大鼠血清酶类含量的变化比较 见表 1。从表 1 可以看出, 臌胀片大、小剂量组对血清中酶类含量均有一定的改善作用。在对 ALT 的改善方面, 大、小剂量组接近正常水平, 与对照组比较, 差异无显著性($P > 0.05$); 大剂量组疗效明显优于鳖甲组($P < 0.05$); 小剂量组疗效与鳖甲组相近, 差异无显著性($P > 0.05$)。在对 AST、GGT、AKP 等改善方面, 大、小剂量组与模型组和鳖甲组比较, 差异均有显著性($P < 0.01$), 其中大剂量组又优于小剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2 各组大鼠血清蛋白含量的变化比较 见表 2。实验大鼠血清 TP 的水平各组间差异无显著性(均 $P > 0.05$)。模型组的 ALB 和 A/G 含量相对降低, 与其他各组比较差异有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$); 大、小剂量组对 ALB 均有升高作用, 大剂量组这种作用明显优于鳖甲组, 与其比较差异有显著性($P < 0.01$), 而小剂量组则与鳖甲组疗效相近, 差异无显著性($P > 0.05$)。说明臌胀片大、小剂量组对血清 TP 影响不大, 但对 ALB、GLO 和 A/G 调节平衡方面有作用。

3 各组大鼠血清肝纤维化标志物含量的变化比较 见表 3。试验大鼠血清中 HA、LN、PCIII、IV-C 含量的影响方面, 大、小剂量组和鳖甲组比较差异有显著

表 1 各组大鼠血清酶类含量的变化比较 (U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT	AST	GGT	AKP
对照	10	29.1 ± 3.8	37.4 ± 3.7	47.4 ± 4.7	119.3 ± 19.2
模型	10	48.3 ± 5.2*	150.2 ± 12.0*	166.5 ± 16.4*	254.2 ± 29.2*
小剂量	10	36.8 ± 6.0 [△]	86.0 ± 14.6* [△]	103.9 ± 12.9* [△]	185.6 ± 19.3* [△]
大剂量	10	33.4 ± 4.2 ^{△○}	63.0 ± 13.8* ^{△△○○}	75.1 ± 13.7* ^{△△○○}	149.5 ± 14.8 ^{△△○○}
鳖甲	10	42.8 ± 4.7*	97.3 ± 9.2* [△]	100.1 ± 15.2* [△]	204.7 ± 34.2* [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$;与小剂量组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与鳖甲组比较,[○] $P < 0.05$,^{○○} $P < 0.01$

表 2 各组大鼠血清中蛋白含量的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TP(g/L)	ALB(g/L)	GLO(g/L)	A/G
对照	10	69.48 ± 3.09	41.78 ± 2.01	27.70 ± 1.13	1.51 ± 0.03
模型	10	66.69 ± 2.19	32.84 ± 1.24*	33.85 ± 1.55*	0.97 ± 0.05*
小剂量	10	71.13 ± 4.85	37.34 ± 1.45* ^{△△}	33.79 ± 4.25*	1.12 ± 0.13* [△]
大剂量	10	68.52 ± 1.44	38.92 ± 1.22* ^{△△○○}	29.60 ± 1.50 ^{△△○○}	1.32 ± 0.10* ^{△△△○○○}
鳖甲	10	66.65 ± 2.92	33.51 ± 1.47*	33.15 ± 2.66*	1.02 ± 0.10*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与小剂量组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与鳖甲组比较,[○] $P < 0.05$,^{○○} $P < 0.01$

表 3 各组大鼠血清 HA、LN、PCⅢ、IV-C 含量变化比较 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	HA	LN	PCⅢ	IV-C
对照	10	59.60 ± 11.54	115.80 ± 14.94	113.50 ± 6.06	52.40 ± 8.68
模型	10	328.80 ± 45.33*	250.10 ± 21.74*	296.20 ± 32.68*	186.50 ± 19.67*
小剂量	10	202.50 ± 29.04* [△]	164.20 ± 29.25* [△]	205.80 ± 27.86* [△]	134.00 ± 24.64* [△]
大剂量	10	144.80 ± 30.12* ^{△△○○}	157.50 ± 26.93* [△]	164.70 ± 26.65* ^{△△○○}	104.20 ± 20.76* ^{△△○○}
鳖甲	10	188.90 ± 29.57* [△]	183.90 ± 24.12* [△]	226.90 ± 34.16* [△]	144.80 ± 22.09* [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$;与小剂量组比较,[△] $P < 0.05$;与鳖甲组比较,[○] $P < 0.05$,^{○○} $P < 0.01$

表 4 各组大鼠肝组织 MDA、GSH-Px、SOD、NO 的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA(nmol/mg)	GSH-Px($\mu\text{g/mg}$)	SOD(NU/mg)	NO(nmol/mg)
对照	10	57.2 ± 4.1	0.93 ± 0.13	121.2 ± 20.7	1.96 ± 0.39
模型	10	164.3 ± 19.2*	1.59 ± 0.17*	80.2 ± 20.3	4.84 ± 0.44*
小剂量	10	121.4 ± 18.0* ^{△△○}	1.29 ± 0.05* [△]	102.6 ± 29.5	2.14 ± 0.43 ^{△△○○}
大剂量	10	131.2 ± 16.3* ^{△○}	1.34 ± 0.20* [△]	123.9 ± 25.1 [△]	2.50 ± 0.51 ^{△△○}
鳖甲	10	158.0 ± 17.2* [△]	1.50 ± 0.16*	91.3 ± 23.2	3.21 ± 0.48* ^{△△}

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与小剂量组比较,[△] $P < 0.05$;与鳖甲组比较,[○] $P < 0.05$,^{○○} $P < 0.01$

性,虽然未恢复到正常水平,但与模型组比较差异有显著性($P < 0.01$)。而在 HA、PCⅢ、IV-C 方面大剂量组疗效更为突出,与小剂量组和鳖甲组比较差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明大剂量组比小剂量组和鳖甲组更有优势。

4 各组大鼠肝组织 MDA、GSH-Px、SOD、NO 的变化比较 见表 4。大、小剂量组均可以减少 MDA、GSH-Px 和 NO 含量,与模型组和鳖甲组比较,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。而小剂量组疗效更为突出,优于大剂量组。对 SOD 的影响方面,大、小剂量组和鳖甲组均有一定的促进作用,组间比较差异无显著性($P > 0.05$),而大剂量组效果略显为好,与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$)。说明大、小剂量组在抗肝纤维化的同时,有对抗氧自由基的作用,并可提高超氧化物歧化酶活性,阻止肝纤维化的进一步发展。

5 各组大鼠肝组织细胞脂肪变性及肝纤维化程度的比较 见表 5。

5.1 肝细胞脂肪变性 根据肝细胞脂肪变性不

表 5 各组大鼠肝细胞脂肪变性及肝纤维化程度比较

组别	n	肝细胞脂肪变性(例)				肝纤维增生(例)				积分值 (分, $\bar{x} \pm s$)
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	
对照	10	10	0	0	0	10	0	0	0	0
模型	10	0	0	2	8	0	0	2	8	2.56 ± 0.44
小剂量	10	2	4	4	0	2	5	3	0	1.28 ± 0.57* ^{△△○}
大剂量	10	1	3	6	0	1	4	5	0	1.46 ± 0.53* ^{△△}
鳖甲	10	0	4	5	1	0	3	6	1	1.92 ± 0.51* [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与鳖甲组比较,[○] $P < 0.05$

同程度分为 4 级(-、+、++、+++)。-:肝小叶中的肝细胞索排列呈放射状,肝细胞索之间有明显的肝窦、肝细胞均正常,无异常改变。+:肝小叶的中央静脉周围肝细胞出现不同程度的变性和脂肪变。++肝小叶中央静脉周围及周边肝细胞胞浆内出现不同程度大小不一的脂滴,少部分肝细胞核被积到一边,+++肝小叶中的大部分肝细胞出现较大的脂滴,肝细胞核被积到一边。

5.2 肝纤维增生程度 根据肝纤维化程度的不同分为 4 级(-、+、++、+++),并分别记 0、1、2、3 分。-:肝小叶中未出现纤维组织增生;+在肝小叶的肝细胞坏死区和汇管区可见少量的纤维组织增生;++在肝细胞坏死区和汇管区可见明显的纤维组织增生

并破坏了肝组织结构;+++;在肝细胞坏死区和汇管区可见明显纤维组织增生并相互联接成网。

从表 5 可以看出,对大鼠肝细胞脂肪变性的影响,经 *Ridit* 分析可知,以小剂量组变性程度为最轻,大剂量组变性程度次之,鳖甲组变性程度较重,模型组有严重变性。因此小剂量组在抗肝组织细胞脂肪变性方面效果显著。

肝病理组织学观察可见,对照组大鼠肝脏表面有薄被膜,其下面肝组织有无数小叶组成,以中央静脉为中心,肝细胞索呈放射状排列,细胞索之间为肝血窦、肝细胞边界清晰,汇管区无炎细胞浸润。模型组大鼠肝内有大量纤维增生,相互连接或汇管区扩大,呈现不同程度的纤维增生破坏了正常的肝小叶,大部分肝细胞出现脂肪变性、坏死,是促使肝纤维化形成的一个重要因素,肝纤维化形成率 100%。小剂量组大鼠肝小叶中未见纤维增生。偶见肝小叶内有点状坏死,汇管区有少量纤维组织增生,肝细胞脂肪变有不同程度的改善。大剂量组大鼠肝小叶结构基本正常,偶见有不同程度的细小的纤维束从汇管区延伸,但未形成纤维连接,但肝细胞脂肪变性明显。鳖甲组大鼠肝小叶被增生的纤维分隔,使肝小叶结构受到破坏,肝细胞出现不同程度的肝脂肪变。

讨 论

肝纤维化的主要发生机制是以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成增多,而降解相对减少,两者失去动态平衡,致使过多 ECM 沉积于肝内而引起。多年来进行的中药抗肝纤维化研究已显示出较好的前景,从单味药逐渐转向复方的研究在不断深入,细胞水平和分子水平的研究进一步证实了辨证论治的疗效^[3]。我们在此基础上,根据中医学认为该病始于肝郁气滞,终于气滞血瘀及脾虚湿聚的特点,组方选药研制成臙胀片,方中柴胡、青皮等疏肝解郁;三七、山楂、鳖甲、赤芍活血化瘀,黄芪、党参、青蒿、葫芦巴等健脾利湿,针对病机理气活血,健脾利湿,经临床初步观察显示出较好疗效^[4]。

相关研究表明,肝实质损害时血清中 ALT 等许多酶及相应物质含量发生改变^[5]。本实验研究其模型组的各种酶指标明显高于正常对照组,臙胀片大、小剂量组在观察后可使其降为接近正常,且优于鳖甲组,表现有良好的肝细胞保护作用。

有关研究显示,血清 HA、LN、IV-C、PCIII 水平可反

映肝纤维化的程度,并与病变程度呈正相关^[6]。主要是因为肝纤维化时细胞外基质过度增生和沉积,其主要成分是胶原蛋白,HA 是糖胺多糖,由间质细胞合成;LN 和 IV-C 都是构成基底膜的主要成分;PCIII 在肝纤维化早期即可反映其胶原蛋白合成活性^[7]。本实验研究结果证实,臙胀片大、小剂量组能显著降低 HA、LN、IV-C 和 PCIII 水平,表明有较好的抑制胶原蛋白合成,以及促进其降解的作用,而随剂量增大疗效更为显著。

脂质过氧化可介导肝细胞损伤^[8,9],四氯化碳经肝细胞微粒体内细胞色素 P₄₅₀ 代谢裂解成的三氯甲基自由基而致脂质过氧化,并介导肝细胞损伤,如肝细胞脂肪变及坏死^[10]。同时脂质过氧化又可激活贮脂细胞,导致胶原分泌增加,从而形成肝纤维化^[10]。脂质过氧化是联系肝损伤与肝纤维化之间的桥梁^[11]。臙胀片治疗大、小剂量组均能降低大鼠肝组织 MDA 及 NO 含量,提高 SOD 水平,说明臙胀片由其对抗氧化损伤的作用,抑制或减轻肝纤维化的形成。其作用机制与对抗氧化损伤的作用有关。

参 考 文 献

- 1 姜慧卿,张晓岚.肝纤维化发生机制.世界华人消化杂志 2000;8(6):687—689.
- 2 于世瀛,贾长恩,杨美娟,等.免疫性和化学性损伤肝纤维化动物模型的比较.实验动物科学与管理 1995;12(4):5—6.
- 3 刘新生,刘友章,陈 群.中药复方抗肝纤维化研究进展.广州中医药大学学报 1998;15(4):305—308.
- 4 张金楠,赵玉瑶,陈宝玲,等.臙胀片抗肝纤维化作用的临床观察.中国中西医结合脾胃杂志 1995;3(3):156.
- 5 韩德伍.肝脏病理生理学.太原:山西高校联合出版社,1992:12.
- 6 张春兰,石亚玲,易俊卿.血清肝纤维化指标与临床及病理的关系.临床内科杂志 2000;17(2):97—98.
- 7 崔东来,姚希贤.肝纤维化的血清学检测.世界华人消化杂志 2000;8(6):683—684.
- 8 方建珍,高洁生,吴 袁,等.实验性大鼠肝纤维化一氧化氮动态变化及意义.免疫学杂志 1997;13(1):26—28.
- 9 范建高,曾民德,李继强,等.肝内脂肪和脂质过氧化与肝纤维化关系的实验研究.中华内科杂志 1997;36(12):808—811.
- 10 Parola M, Leonarduzzi G, Biasi F, et al. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. Hepatology 1992;16(4):1014—1021.
- 11 刘绍能,王勤瀚,段绍谨,等.莪术颗粒预防肝纤维化作用的实验研究.中国中医药科技 2000;7(5):303—304.

(收稿:2003-02-15 修回:2003-06-21)