

# 扶正化癥 319 方抗大鼠肝纤维化的研究

刘 平 胡义杨 徐列明 李风华 顾宏图 刘 成

(上海市中医药研究院肝病研究所 200032)

**摘 要** 扶正化癥 319 方可阻止肝纤维化的进展。对已形成的肝纤维化,319 方能有效地促使其组织结构及功能的回复,与秋水仙碱、大黄廬虫丸比较,319 方显示出较明显的优势。

**关键词** 肝纤维化 实验治疗 扶正化癥方

## Studying Anti-Fibrosis of Liver with Fuzheng Huayu 319 Recipe

Liu Ping, Hu Yiyang, Xu Lieming, Li Fenghua, Gu Hongtu, Liu Cheng

(Institute of Liver Diseases, Shanghai Academy of TCM, 200032)

**Abstract:** The inhibitory effect of Fuzheng Huayu 319 Recipe (319 Recipe) on hepatic fibrogenesis was observed. 319 Recipe was found to reverse hepatic fibrosis. The results indicated that 319 Recipe was more potent than colchicine and Dahuang Zhechong pill not only in inhibiting hepatic fibrogenesis and promoting reversion of hepatic fibrosis, but also in protecting and recovering hepatic functions.

**Key Words:** hepatic fibrosis, experimental therapy, Fuzheng Huayu recipe

扶正化癥 319 方治疗肝炎后肝硬化及慢性乙型肝炎均取得良好的效果<sup>[1,2]</sup>。本文进一步应用该方进行了抗大鼠四氯化碳实验性肝纤维化的研究,与西药秋水仙碱、中药大黄廬虫丸进行药效学对照,探讨其抗肝纤维化作用,以期为临床广泛应用取得可靠的实验依据。

### 1 材料

**1.1 动物** Wistar 大鼠,♂,180~205g,中国科学院上海实验动物中心提供。

**1.2 主要试剂** 四氯化碳(CCl<sub>4</sub>),宜兴市化学试剂三厂出品;橄榄油,上海化学试剂采购供应站进口分装;胆固醇,广州化学试剂分公

司进口分装;血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)测定试剂盒,上海生物制品研究所生产;血清门冬氨酸氨基转移酶(AST)测定试剂盒购自宁波市慈城生化试剂厂;血清白蛋白(Alb)测定试剂盒为宁波市慈城生化试剂厂生产。

**1.3 药物** 319 方(丹参、桃仁、虫草菌丝、松花粉及七叶胆,比例为 4:1:2:1:3)由上海中华制药厂协助制成干浸膏,每 g 含生药 8.16g,用蒸馏水稀释成三种浓度,每 10ml 中分别含浸膏 0.23g、0.46g 及 1.38g。大黄廬虫丸为上海中药一厂产品,批号 911221A1;取大黄廬虫丸细粉末 10g 加入蒸

馏水至 100ml 制成混悬液。秋水仙碱为上海化学试剂站进口分装,批号 87-05-18。取秋水仙碱 1mg 溶于 100ml 蒸馏水中。

## 2 方法

**2.1 造模** 150 只大鼠,首次给  $\text{CCl}_4$  0.5ml/100g 体重,以后 40% $\text{CCl}_4$ -橄榄油溶液 0.3ml/100g 体重,皮下注射,每周 2 次,共 6 周;第 1~2 周饲以高脂玉米粉饲料(79.5%玉米粉+20%猪油+0.5%胆固醇),3~6 周饲以纯玉米粉。饮料为自来水。

## 2.2 分组及治疗方法

**2.2.1 预防实验** 84 只大鼠自造模之日起,随机分为 6 组,每组 14 只。①模型对照组,生理盐水 10ml/kg 体重,②秋水仙碱组,秋水仙碱 0.1mg/kg 体重;③大黄廬虫丸组,大黄廬虫丸 1g/kg 体重;④319 方 0.23g 组,319 方 0.23g/kg 体重;⑤319 方 0.46g 组,319 方 0.46g/kg 体重;⑥319 方 1.38g 组,319 方 1.38g/kg 体重(分别相当于临床 60kg 成人体重剂量的 5、10、30 倍)。各组均在造模的同时开始灌胃给药,每日 1 次,至第 6 周末与正常大鼠一起,在乙醚麻醉下,断头处死,采血和肝组织标本。

**2.2.2 治疗实验** 66 只大鼠经 6 周造模后,停止模型处理因素,随机分为 6 组,每组 11 只。分组及治疗方法同预防实验,灌胃给药 5 周。即至第 11 周末与同期喂养的 10 只正常大鼠一起,在乙醚麻醉下,断头处死,采血和肝组织标本。

**2.3 观测项目与方法** 血清 ALT、AST 活性测定均采用赖(Riman-Frankel)氏法。血清 Alb 含量测定用溴甲酚绿(BGG)法。肝组织羟脯氨酸(Hydroxyproline;Hyp)含量测定采用 Jamall 氏法<sup>[3]</sup>。肝组织间质型胶原酶活性的测定采用以 $^3\text{H}$ -I、III 型胶原为底物的凝胶法<sup>[4]</sup>。病理学观察 标本取自肝左叶,用中性缓冲福尔马林液固定,石蜡包埋。分别作 HE 染色和胶原纤维染色(武兆发改良的 Mallory 氏法)光镜下观察肝脏组织、细胞的病理变化。参照有关文献<sup>[5]</sup>制定胶原纤维增生程度积分标准。统计方法 方差分析,q 检验。

## 3 结果

### 3.1 预防实验结果

**3.1.1 血清 ALT 及 AST 活性、Alb 及肝组织 Hyp 含量的变化** 大鼠造模 6 周后,其血清 ALT 及 AST 活性显著增高,血清 Alb 含量明显降低;肝 Hyp 含量为正常大鼠的 2.1 倍。与模型对照组比较,319 方 0.46g、1.38g 组 ALT 及 AST 活性均显著降低;319 方 3 个组的 Alb 含量均显著升高,肝组织 Hyp 含量均显著降低,其中以 0.46g 组的改变最为显著。与大黄廬虫丸组相比,319 方 0.46g 组的肝组织 Hyp 含量显著降低,大黄廬虫丸虽可显著降低血清 ALT 活性,但对增高的 AST 活性并无显著性作用。319 方 1.38g、0.46g、0.23g 3 个剂量组的 ALT、AST 呈剂量依赖性变化,以 1.38g 组最低。详见表 1。

表 1 预防实验各组血清 ALT 及 AST 活性、白蛋白及肝组织 Hyp 含量的变化( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	Alb(mg/ml)	ALT(u)	AST(u)	Hyp( $\mu\text{g/g}$ 湿肝)
正常对照组	10	3.01 $\pm$ 0.10**	17.20 $\pm$ 5.43**	68.70 $\pm$ 12.70**	134.55 $\pm$ 41.61** $\Delta$
模型对照组	13	2.62 $\pm$ 0.28	164.65 $\pm$ 68.15	184.97 $\pm$ 50.06	280.80 $\pm$ 84.86
秋水仙碱组	13	2.84 $\pm$ 0.15*	141.48 $\pm$ 48.10	176.95 $\pm$ 35.95	213.56 $\pm$ 67.71*
大黄廬虫丸组	13	2.88 $\pm$ 0.21**	112.90 $\pm$ 68.30*	160.48 $\pm$ 43.32	245.87 $\pm$ 54.84
319 方 1.38g 组	13	2.92 $\pm$ 0.22**	111.77 $\pm$ 64.79*	147.12 $\pm$ 50.49*	201.65 $\pm$ 58.53** $\Delta$
319 方 0.46g 组	13	2.95 $\pm$ 0.19**	121.78 $\pm$ 46.14*	153.01 $\pm$ 42.71*	188.97 $\pm$ 66.07** $\Delta$
319 方 0.23g 组	12	2.89 $\pm$ 0.21**	153.42 $\pm$ 59.45	180.87 $\pm$ 45.34	220.30 $\pm$ 62.13*

与模型组比较: \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001;与大黄廬虫组比较: $\Delta P$ <0.05, $\Delta\Delta P$ <0.01, $\Delta\Delta\Delta P$ <0.001(下同)。

**3.1.2 肝组织胶原酶活性的变化** 与正常大鼠(31.95±5.83μg 胶原/mg 蛋白)相比,模型对照组肝组织胶原酶活性显著增高(40.72±11.33,  $P < 0.05$ );秋水仙碱组(41.69±15.05)与模型组基本相等,而319方0.46g组(27.86±7.18)较模型对照组及秋水仙碱组均显著下降( $P < 0.01, 0.05$ )。

**3.1.3 病理组织学观察** HE染色标本观察:模型组肝小叶失去正常结构,肝板排列紊乱,肝细胞普遍变性,多数表现为胞质内有大量脂滴积聚(脂肪变),少数为细胞质疏松或肿胀(水样变),甚至如气球状(气球样变)。各例均可见到程度不等、范围不一的肝细胞坏死区,坏死区中央或周边有中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞或浆细胞浸润。肝细胞再生活跃,核分裂相多见。肝窦多受压变窄、闭塞,少数代偿性扩张,枯否氏细胞多肥大增生;门脉区有大量成纤维细胞、纤维细胞和增生的胶原纤维,伴同炎症细胞和增生的小血管,组成纤维间隔向小叶内伸展。与模型组比较,319方0.23g组变性肝细胞数量略减轻。0.46g组变性肝细胞数量减轻,部分肝细胞水样变轻,为颗粒变性。1.38g组各标本中肝细胞脂肪变程度轻,脂滴小,有半数标本的部分肝细胞为颗粒变性。大黄廬虫丸组和319方0.23g组变化相似,秋水仙碱组除纤维组织

增生较轻外,其余变化与模型组相似。各组肝脏脂肪变性程度的比较见表2。

胶原纤维染色观察:模型组肝内主要由胶原纤维组成的纤维间隔正在形成或已形成,其破坏界板,分割、包绕肝小叶,部分已有假小叶。余各组胶原纤维增生均减轻,319方1.38g、0.46g组明显。见表2。

表2 各预防组肝脂肪变性及胶原纤维增生程度的比较

组别	n	脂肪变性	胶原纤维增生
模型对照组	13	2.54±0.88	2.62±1.04
秋水仙碱组	13	2.84±0.80	1.85±0.80*
大黄廬虫丸组	13	2.46±0.77	2.15±0.69
319方1.38g组	13	2.23±0.60	1.54±0.78**
319方0.46g组	13	2.31±0.75	1.46±0.63***
319方0.23g组	12	2.67±0.65	1.83±0.94

**3.2 治疗实验结果**

**3.2.1 血清 Alb 含量、ALT 活性及肝组织 Hyp 含量的变化** 模型动物在终止病因刺激5周后,Alb含量仍显著低下,ALT活性显著高于正常动物,为正常组的2倍,肝组织Hyp含量为正常组的1.85倍。在5个用药组中只有319方1.38g和0.46g组的Alb含量较模型对照组显著上升,基本回复正常。各组ALT活性变化趋势与Alb含量变化相似。与模型组相比,Hyp含量用药各组均显著下降,其中319方0.23g组和秋水仙碱组下降最显著,降至模型组含量的63%。详见表3。

表3 各实验治疗组血清 Alb 含量、ALT 活性及肝组织 Hyp 含量的变化(̄x±s)

组别	Alb(mg/ml)	ALT(u)	Hyp(μg/g 湿肝)
正常组	3.74±0.47**	28.01±7.20***	160.97±26.94Δ**
模型组	3.12±0.40	55.82±8.65	298.70±41.94
秋水仙碱	3.35±0.34	56.82±8.55	188.14±50.5***
大黄廬虫	3.45±0.60	58.39±8.71	243.14±71.54*
319方1.38	3.76±0.44**	48.41±7.13ΔΔ	228.82±60.22**
319方0.46	4.02±0.77**	42.47±7.20ΔΔΔΔ++	209.45±27.32***
319方0.23	3.23±0.36	52.64±8.58	188.15±20.40Δ***

注:与秋水仙碱比较,+ $P < 0.05$ ,+++ $P < 0.001$

正常组 n=10 余组 n=11

**3.2.2 肝组织间质型胶原酶活性的变化** 模型动物在终止造模因素5周后,其肝组织间质型胶原酶活性(28.92±11.26μg 胶原/mg 蛋白)较正常组(31.95±5.83)有所降

低;与模型对照组相比,秋水仙碱组(39.75±10.04)和319方0.46g组(42.32±10.04)均显著增高( $P < 0.05$ )。

**3.2.3 肝病理组织学变化** 模型动物在终

止病因刺激 5 周后,仍呈典型的肝纤维化病理改变。模型组大鼠肝组织 HE 染色光镜下见到结构紊乱,多数切片的大部分肝细胞胞质疏松,甚至气球样变;肝细胞再生活跃;门脉区增多、增宽,纤维组织大量增生并向小叶内伸展;枯否氏细胞肥大,部分切片的肝组织中还有少量炎性细胞。胶原染色见到肝组织内胶原纤维大量增生,在小叶内形成较窄的纤维间隔,有 3 例见到少量假小叶。用药各组的肝组织结构大都恢复正常,肝板排列规则,新生肝细胞较多,无炎性细胞浸润;变性的肝细胞均较模型组少,程度轻,319 方 0.23g 组、0.46g 组最为明显,且伴有枯否氏细胞的显著肥大、增殖;各组肝组织中门脉区数量和面积较模型组有不同程度的减少、减小,纤维组织明显减少。胶原染色见到各治疗组胶原纤维明显减少,纤维间隔窄而短,无假小叶形成,有相当例数已见不到纤维间隔。见表 4。

表 4 各治疗组肝脏胶原纤维增生程度比较

组别	n	胶原纤维增生
模型对照组	11	2.27±0.79
秋水仙碱组	11	1.09±0.83***
大黄廬虫组	11	1.55±1.13
319 方 1.38g 组	11	1.18±0.75***
319 方 0.46g 组	11	1.36±1.13*
319 方 0.23g 组	11	1.00±1.00***

#### 4 讨论

319 方是针对肝纤维化血瘀正虚的基本病机,由活血化瘀和益精补虚类药物组成。长期毒性试验结果表明,大鼠连续 6 个月给予该方大于临床成人用量 50 倍的剂量仍能很好耐受,长期使用安全,无明显毒性反应。而本文结果表明,该方确具有良好的抗肝纤维化作用。

**4.1 抑制肝纤维化的形成、促进已成型的大鼠肝纤维化的逆转** 与对照组相比,于造模同时开始给予 319 方预防组动物的肝细胞变性范围小,纤维化程度明显减轻;生化学检测和组织学观察结果呈一致改变,充分表明 319 方有明确的抑制肝纤维化形成的作用。

秋水仙碱为目前唯一试用于临床的抗肝纤维化药物,但因副作用大而难以推广<sup>[6]</sup>。扶

正祛瘀的大黄廬虫丸具有抗实验性肝损伤的作用<sup>[7]</sup>;而 319 方抑制肝脏胶原增生的效果明显优于大黄廬虫丸;保护肝细胞、抗肝损伤的作用显著优于秋水仙碱。提示 319 方抑制肝纤维化形成作用有一定的优势。319 方可显著促进胶原的重吸收及肝功能的复常,明显优于大黄廬虫丸;而促进肝功能复常的作用也是秋水仙碱所不及的。

#### 4.2 319 方对肝组织胶原酶活性的影响

肝纤维化炎症活动期与相对稳定期肝内胶原代谢变化是不同的,前者是胶原合成与分解均亢进,促进纤维化发展;后者则是胶原分解代谢相对低下<sup>[7]</sup>。319 方可抑制炎症活动期肝纤维化显著增高的肝组织胶原酶活性,可能主要与其抑制炎症反应有关;对相对稳定期肝纤维化,可显著提高其肝组织胶原酶活性,提示促进肝内胶原的降解可能是 319 方逆转肝纤维化的主要作用机制之一。

#### 4.3 319 方抗肝纤维化作用的量效关系

319 方 3 种剂量的预防实验表明,无论抑制纤维结缔组织增生,还是保护肝细胞、抗肝细胞变性,0.46g、1.38g 均优于 0.23g;治疗实验与其不同,促进胶原重吸收的作用 0.23g 最好;但该剂量对 ALT 活性及 Alb 含量并无明显影响,而 0.46g、1.38g/kg 体重剂量则呈现出明显的促进损伤肝细胞功能恢复的作用。影响胶原代谢是 319 方抗肝纤维化的主要作用环节。预防和治疗实验结果均显示,0.23g 对肝细胞损伤无明显保护作用,但可显著抑制肝内胶原增生,与秋水仙碱作用几乎是一致的。上述结果与该方药物组成的比例(活血化瘀药用量大于扶正药物)及肝纤维化的不同病理变化有关。既提示若进一步调整活血药与扶正药的比例可能有利于疗效的提高,也从一个侧面为临床准确的把握病情,灵活调整药物用量提供了参考。

#### 参考文献

- 1 刘平,刘成,胡义杨,等. 中国中西医结合杂志, 1996,16(8):459
- 2 刘平,刘成,陈高潮,等. 中国中西医结合杂志,

- 1996, 16(10): 572
- 3 Jamal IS, et al. *Analytical Biochemistry*, 1981, 112: 70
- 4 刘平, 蒋冰冰, 张礼邦, 等. *中国病理生理杂志*, 1989, 5: 566
- 5 山西医学院肝病研究组. *新医药学杂志*, 1974 (2): 28
- 6 王宝恩. *肝脏病杂志*, 1993, 1: 67
- 7 邱培伦, 袁素芬, 舒昌杰, 等. *中西医结合杂志*, 1988, 8: 668
- 8 村胁义和, 孝田雅彦, 川崎宽中. *Molecular Medicine*, 1994, 31: 190

(收稿: 1996-04-19)