

# 和合疏养方治疗实验性大鼠肝纤维化的疗效评价

萧焕明<sup>1</sup>, 吴惠君<sup>2</sup>, 谢玉宝<sup>1</sup>, 池晓玲<sup>1\*</sup>

(1. 广东省中医院, 广州 510120; 2. 广州中医药大学 研究生院, 广州 510405)

**[摘要]** **目的:**探讨临床验方和合疏养方治疗四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)致肝损伤大鼠模型肝纤维化的疗效,为临床治疗肝纤维化提供实验依据。**方法:**采用正交实验,SD大鼠40只,随机分为4个组,分别为正常组,模型组,阳性药物组(联苯双酯,50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),合疏养方组(HHSYF,83 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。正常组采用慢性束缚应激+过度运动+饮食失节的方法造模4周后,予蒸馏水ig至8周。模型组及联苯双酯组,HHSYF组采用慢性束缚应激+过度运动+饮食失节的方法同时予ip 30% CCl<sub>4</sub>花生油溶液造模4周后,模型组予蒸馏水ig至8周;阳性药物组予联苯双酯ig治疗至8周;HHSYF组ig治疗至8周。检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),γ-谷氨酰转移酶(GGT)活性及肝组织中丙二醛(MDA),羟脯氨酸(HyP)的含量,并采用苏木素-伊红(HE)进行病理组织学观察。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠ALT,AST,GGT活性明显升高,肝组织中MDA,HyP含量明显升高(P<0.01),病理学结果显示模型组肝组织损伤较为明显;与模型组比较,HHSYF组明显降低大鼠ALT,AST,GGT活性,明显降低肝组织中MDA,HyP含量(P<0.01),肝组织损伤明显改善。**结论:**和合疏养方对于改善肝功能、逆转肝纤维化具有较好的功效。

**[关键词]** 和合疏养方; 四氯化碳; 治疗; 肝纤维化; 疗效

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0132-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180132

## Effect of Hehe Shuyang Formula in Treatment of Experimental Hepatic Fibrosis In Rats

XIAO Huan-ming<sup>1</sup>, WU Hui-jun<sup>2</sup>, XIE Yu-bao<sup>1</sup>, CHI Xiao-ling<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Provincial Hospital of Chinese Traditional Medicine (TCM), Guangzhou 510120, China;

2. Graduate School, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the clinical effect of Hehe Shuyang formula (HHSYF) in treatment of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) induced hepatic injury and liver fibrosis in rats, and provide experimental basis for the clinical treatment of liver fibrosis. **Method:** By orthogonal test, 40 SD rats were randomly divided into four groups: normal group, model group, positive drug group (bifendate, 50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and HHSYF group (83 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). Chronic restraint stress + excessive exercise + improper diet were used in the normal group for modeling for 4 weeks, and then ig administration of distilled water to week 8. In the positive drug group, bifendate was given by ig administration till week 8; and ig administration was given in HHSYF group till week 8. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), γ-glutamyltransferase (GGT) levels in serum and malondialdehyde (MDA) levels in liver tissues, as well as the level of hydroxyproline (HyP) were detected; histopathological observation was done by HE staining. **Result:** As compared with the normal group, the levels of ALT, AST and GGT in serum were significantly increased, and the levels of MDA and HyP in liver tissues were significantly increased in rats of model group (P<0.01); pathological results showed that the liver tissue injury was more obvious in model group. As compared with the model group, the levels of ALT, AST and GGT in serum were significantly decreased, and the levels of MDA and HyP in liver tissues were significantly decreased in rats of

**[收稿日期]** 20150925(012)

**[基金项目]** 国家“十二五”重大传染病专项(2013ZX10005002002,2012ZX10004902-005);广东省中医药局课题项目(20121207)

**[第一作者]** 萧焕明, 硕士, 副主任医师, 从事中医、中西医结合肝病临床与科研工作, Tel:020-39318398, E-mail: xiaohuanming@163.com

**[通讯作者]** \* 池晓玲, 主任医师, 从事多维立体系列疗法体系防治肝胆疾病研究, Tel:020-39318398, E-mail: chixiaolingqh@163.com

HHSYF group ( $P < 0.01$ ), and the liver tissue injury was significantly improved. **Conclusion:** HHSYF has better effect on improving liver function and reversing hepatic fibrosis.

**[Key words]** Hehe Shuyang formula; carbon tetrachloride; treatment; hepatic fibrosis; effect

肝纤维化可由病毒感染、酒精、化学毒物损伤、寄生虫感染等多种因素引起,我国肝纤维化最常见的原因是慢性乙型肝炎。中医认为肝纤维化属于“积聚”、“胁痛”、“黄疸”等范畴,由于感染湿热疫毒,正邪相争,日久疫毒胶结于肝脏,逐渐形成的本虚标实、虚实夹杂之证。肝郁脾虚是肝纤维化最重要的证候特征,贯穿肝纤维化疾病发生发展的全过程;肝郁脾虚也是乙型肝炎相关肝纤维化最常见的中医证型。肝纤维化是肝脏对各种急慢性刺激损伤的修复反应,是慢性肝病向肝硬化发展过程中共同的必经途径<sup>[1]</sup>,其特征性改变是肝内细胞外基质(ECM)的过多沉积<sup>[2]</sup>。研究表明肝纤维化是可逆的<sup>[3-4]</sup>。近年来,中医药防治肝纤维化取得了较大进展,显示了较好的临床疗效与良好的应用前景<sup>[5-6]</sup>。

和合疏养方是广东省中医院肝病科用于治疗慢性乙型肝炎、乙型肝炎纤维化的协定方,由柴胡、白芍、党参等药物组成,临床实践证明,本方具有较好的恢复肝功能、治疗肝纤维化、调节 T 细胞及细胞因子白细胞介素-10(IL-10),IL-18 等功效。前期研究表明和合疏养方不但能够有效地改善乏力、纳差、胁痛等症状,还能够促进肝功能恢复、改善肝纤维化、提高核苷类药物抗病毒疗效等作用<sup>[7-8]</sup>。本实验通过和合疏养方治疗实验性大鼠肝纤维化的疗效,进一步验证其临床疗效。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重(240 ± 10) g,级别 SPF/VAF,由广州中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号 SYXK(粤)2013-0094。

**1.2 药物及试剂** 和合疏养方主要由柴胡、白芍、党参、茯苓等组成,饮片由广东康美药业有限公司提供,批号 20130218,以上药材按“饮片标准汤剂”的制备方法煎煮提取 2 次,第 1 次加 6 倍量水,浸泡 20 min,煮沸后改用文火慢煎,煎煮 30 min,第 2 次加 4 倍量水,煎法同上,滤过。滤液合并浓缩,冰箱保存备用,用时以蒸馏水配成所需浓度;联苯双酯滴丸(北京协和药厂,批号 10120101),每丸含联苯双酯 1.5 mg,实验时以 30 g·L<sup>-1</sup>的二甲基亚砜 1~2 mL 溶解,再用蒸馏水稀释至所需浓度。丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST), $\gamma$ -谷氨酰转移酶(GGT),丙二醛(MDA),羟脯氨酸(HyP)检

测试剂盒(广州威佳科技有限公司,批号分别为 612380,611697,612062,854237,976481)。水合氯醛(国产分析纯,批号 080110)。30% 四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)花生油:用鲁花 5S 压榨一级花生油(山东鲁花集团,批号 440602011124),CCl<sub>4</sub>(国产分析纯,批号 20040723),按体积比 3:10,配成 30% 油剂。

**1.3 仪器** 722 型紫外分光光度计和 KA-1000 型台式低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂),TGL-16 型台式高速冷冻离心机(湘仪集团),Trilogy 型动物专用多功能全自动生化分析仪(英国 Drew 公司),Model680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 造模

**2.1.1 动物分组与肝郁脾虚模型造模** 按照正交设计的方法,将 40 只大鼠随机分成 4 组,分别为正常组、模型组、联苯双酯阳性药组、和合疏养方组,每组 10 只,雌雄各半。综合运用慢性束缚应激、过度运动和饮食失节 3 种方法。分组前 1 d,所有大鼠进行游泳,排除游泳时间超过 20 min,或短于 10 min 的大鼠。将符合条件的大鼠分组编号后于每天上午 8 点放入束缚筒中限制 3 h,下午 2 点再将大鼠从束缚筒中放出,放入盛有温水(22 ± 1) °C 的大塑料桶中游泳 10 min。隔日禁食,隔日足量给食,不固定给食,连续 4 周<sup>[9]</sup>。

**2.1.2 慢性肝损伤造模** 模型组、联苯双酯阳性药组和和合疏养方治疗组予 30% CCl<sub>4</sub> 花生油 ip,每次为 0.2 mL·kg<sup>-1</sup>,正常组给予 ip 同等体积的生理盐水,均每隔 3 d 注射 1 次,连续 4 周<sup>[10]</sup>。第 4 周取 2 只模型鼠确定是否造膜成功,余大鼠眼球采血,检测肝功能等指标。

**2.2 干预措施** 造模成功后,肝郁脾虚肝损伤模型组予等量蒸馏水 ig 至 8 周。阳性药物组予联苯双酯(50 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) ig 治疗至 8 周。参考前期中药毒理实验结果及中药等效剂量折算表,和合疏养方组予和合疏养方 83 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig 治疗至 8 周。正常组不加任何刺激,自然饲养,在第 4 周至 8 周予等量蒸馏水 ig。

**2.3 观察指标** 每周末观察并记录各组大鼠的行为状态、活跃程度、情绪反应、皮肤毛发、饮食状态、睡眠状态、大便状态等方面的变化。每隔 3~4 d 称

重 1 次,观察大鼠体重的动态变化。同时,检测血清 ALT,AST,GGT 活性。取新鲜肝组织制成肝组织匀浆,按照试剂盒说明书应用比色法进行肝组织 MDA,HyP 含量检测,并进行病理组织学观察。根据肝组织和肝细胞等病变轻重程度不同,依次标记为“- , + , ++ , +++”,分别表示无明显改变、轻度的病理改变、中度的病理改变、重度的病理改变。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,方差齐者采用单因素方差分析处理,组间两两比较采用 LSD 法,方差

不齐者,采用多个独立样本秩和检验和非参数多重比较法检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对肝纤维化大鼠 ALT,AST,GGT 的影响** 模型组大鼠的 ALT,AST,GGT 活性较正常组明显升高( $P < 0.01$ );经过药物干预,联苯双酯组和和合疏养方治疗组大鼠的 ALT,AST,GGT 活性均明显低于模型组( $P < 0.01$ );和合疏养方组与联苯双酯组比较,在改善 ALT,AST 活性方面更具有优势,通过 4 周干预,使肝损伤大鼠肝功能接近正常( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 和合疏养方对肝纤维化大鼠血清 ALT,AST,GGT 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	ALT	AST	GGT
正常	-	7	51.6 ± 4.5	150.9 ± 5.2	10.8 ± 1.1
模型	-	9	166.9 ± 8.7 <sup>1)</sup>	356.2 ± 29.1 <sup>1)</sup>	20.5 ± 1.3 <sup>1)</sup>
联苯双酯	0.05	10	71.7 ± 3.2 <sup>2)</sup>	173.8 ± 11.1 <sup>2)</sup>	11.7 ± 1.5 <sup>2)</sup>
和合疏养方	83	10	65.3 ± 4.0 <sup>3)</sup>	159.6 ± 20.7 <sup>3)</sup>	11.4 ± 0.7

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与联苯双酯组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2 对肝纤维化大鼠肝组织 MDA,HyP 的影响** 模型组大鼠肝组织 MDA,HyP 的含量较正常组明显升高( $P < 0.05$ );治疗后和合疏养方组和联苯双酯组大鼠肝组织 MDA,HyP 的含量均明显降低( $P < 0.01$ )。在改善肝组织 MDA 和 HyP 方面,和合疏养方组疗效优于联苯双酯组。见表 2。

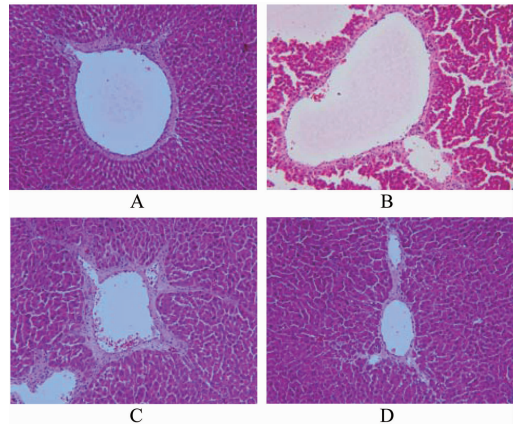
表 2 和合疏养方对肝纤维化大鼠肝组织 MDA,HyP 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	MDA/ $\mu mol \cdot g^{-1}$	HyP/ $mg \cdot g^{-1}$
正常	-	7	2.9 ± 0.08	0.4 ± 0.05
模型	-	9	5.2 ± 0.54 <sup>1)</sup>	1.1 ± 0.06 <sup>1)</sup>
联苯双酯	0.05	10	3.1 ± 0.27 <sup>2)</sup>	0.6 ± 0.05 <sup>2)</sup>
和合疏养方	83	10	3.0 ± 0.14 <sup>2)</sup>	0.5 ± 0.05 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

### 3.3 和合疏养方改善肝脏病理的疗效

**3.3.1 对肝纤维化大鼠肝组织病理学的影响** 正常组肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐,无明显炎症及纤维化改变。模型组肝组织可见不同程度的纤维组织增生,假小叶形成,可见肝细胞及汇管区、肝窦及中央静脉周围炎性细胞浸润及纤维组织增生。联苯双酯组肝小叶存在,纤维组织增生较轻,肝细胞排列稍紊乱,见少许肝细胞点状坏死,伴少量炎症细胞浸润和纤维沉积。和合疏养方组肝小叶结构正常,纤维组织增生不明显,偶见肝细胞点状坏死,伴少量炎症细胞浸润;汇管区无明显纤维组织增生和炎症细胞浸润。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 联苯双酯组;D. 和合疏养方组

图 1 和合疏养方对肝纤维化大鼠肝组织病理学的影响(HE, ×400)  
Fig.1 Effects of Hehe Shuyang formula on liver histopathology of liver fibrosis rats(HE, ×400)

**3.3.2 对肝组织病理疗效的影响** 模型组较正常组肝细胞炎症及纤维化均明显加重。联苯双酯组干预后,CCl<sub>4</sub> 肝损伤大鼠在肝细胞炎症及纤维化的方面有改善。而和合疏养方组无论在肝脏炎症、纤维化改善、假小叶形成方面明显优于联苯双酯组,尤其在改善肝纤维化、假小叶形成的方面,疗效更具有优势。和合疏养方在改善实验性肝损伤大鼠的细胞变性、纤维化增生及假小叶形成方面随着剂量浓度的增加,其疗效也呈正性关性。见表 3 ~ 5。

### 4 讨论

目前认为氧化应激及氧自由基触发的脂质过氧化是导致肝细胞损伤及激发肝星状细胞(HSC)活

表 3 和合疏养方对肝纤维化大鼠肝组织炎症的影响

Table 3 Effects of Hehe Shuyang formula on liver inflammation in liver fibrosis rats

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	肝细胞变性			
			-	+	++	+++
正常	-	7	7	0	0	0
模型	-	9	0	0	3	6
联苯双酯	0.05	10	0	5	3	2
和合疏养方	83	10	4	4	2	0

表 4 和合疏养方对纤维化大鼠肝组织纤维化的影响

Table 4 Effects of Hehe Shuyang formula on liver fibrosis in liver fibrosis rats

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	纤维组织增生			
			-	+	++	+++
正常	-	7	7	0	0	0
模型	-	9	0	4	4	1
联苯双酯	0.05	10	4	3	2	1
和合疏养方	83	10	6	4	0	0

表 5 和合疏养方对肝纤维化大鼠肝组织假小叶形成的疗效评价

Table 5 Effects of Hehe Shuyang formula on liver pseudo leaflet in liver fibrosis rats

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	假小叶形成			
			-	+	++	+++
正常	-	7	7	0	0	0
模型	-	9	5	3	1	0
联苯双酯	0.05	10	5	3	2	0
和合疏养方	83	10	10	0	0	0

化、胶原基因表达的重要机制<sup>[11]</sup>。抑制脂质过氧化是抗肝纤维化的重要环节<sup>[12]</sup>。本研究结果发现,与正常组比较,模型组动物血清 ALT, AST, GGT 水平显著升高,肝组织 MDA 含量显著升高,运用和合疏养方干预后,发现治疗组能够明显降低 CCl<sub>4</sub> 肝损伤所引起的 ALT, AST, GGT 及 MDA 升高,表明和合疏养方能够明显改善模型动物的肝损伤,其减轻肝损伤的作用机制可能是由于其能够提高肝组织抗过氧化、清除氧自由基的能力,减轻脂质过氧化损伤从而保护肝细胞质膜,减轻肝细胞变性,降低细胞坏死,促进组织修复。

肝 HyP 含量检测可作为评价肝胶原含量和肝纤维化程度的可靠方法,是肝纤维化检测的重要指标,也是动物实验中检测肝纤维化程度最为常用的指标<sup>[13]</sup>。本研究表明可见和合疏养方具有较好的治疗 CCl<sub>4</sub> 致肝损伤大鼠肝纤维化的作用。

综上所述,肝纤维化是多种慢性肝病发展到肝硬化的中间途径,现代医学已经证实,肝纤维化是可

逆。长期临床实践证明,中医药防治肝纤维化已取得了确切疗效,其多层次、多途径、多环节、多靶点的作用越来越得到国际医学界的认可与肯定<sup>[14]</sup>,展现了中医药抗肝纤维化的广阔前景。和合疏养方在临床应用过程中能够明显改善患者的临床症状、改善肝功能并能够改善肝纤维化。本研究通过应用和合疏养方干预实验性肝损伤大鼠,验证了和合疏养方具有恢复肝功能、逆转肝纤维化的功效。

[参考文献]

[1] Ahmad A, Ahmad R. Understanding the mechanism of hepatic fibrosis and potential therapeutic approaches[J]. Saudi J Gastroenterol, 2012, 18(3): 155-167.

[2] Frierman S L. Liver fibrosis-from bench to bedside[J]. Hepatol, 2003, 38(1): 38-53.

[3] Friedman S L. Hepatic fibrosis-iverview [J]. Toxicology, 2008, 254(3): 120-129.

[4] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis [J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 2009-2018.

[5] 高鹏飞,李凤贤,李辉,等. 近期国内外应用天然药物防治肝纤维化的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 158-164.

[6] 王宪波,孙乐. 肝纤维化的中西医结合诊治[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(1): 38-41.

[7] 池晓玲,吴黎明,蒋俊民,等. 柴芍六君汤干预慢性乙型肝炎患者 YMDD 变异的临床研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(6): 440-442.

[8] 田广俊,池晓玲,陈培琼,等. 柴芍六君子汤联合拉米夫定治疗肝郁脾虚型慢乙肝 40 例[J]. 新中医, 2006, 38(5): 64-65.

[9] 李艳彦,谢鸣,陈禹,等. 一种运用复合病因造模法复制大鼠肝郁脾虚证模型的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(6): 439-442.

[10] 葛文漪,黄建春,陈兆霓,等. 六月青皂苷对四氯化碳诱导大鼠肝损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 203-206.

[11] Mann D A, Smart D E. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation[J]. Ght, 2002, 50(6): 891-896.

[12] 王晓萍,周语平. 复肝宁对免疫性肝纤维化大鼠 HYP, SOD, MDA 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(11): 2492-2494.

[13] 李映菊,汪煜华,刘玉美,等. 白屈菜红碱对肝纤维化大鼠肝脏病理学和肝脏羟脯氨酸含量的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(3): 167-170.

[14] Zhang L J, Detlef S. Traditional Chinese medicine (TCM) for fibrotic liver disease: hope and hype[J]. J Hepatol, 2014, 61(1): 166-168.

[责任编辑 周冰冰]