

二十五味松石丸对家兔内毒素性肝损伤的影响及形态学观察

张洁, 熊万里, 刘沂, 袁东亚, 孙芳云*

(西藏民族大学医学院生命科学基础研究实验室, 藏药筛选实验室, 陕西 咸阳 712082)

[摘要] **目的:**以内毒素攻击肝组织,造成肝损伤家兔模型,探讨二十五味松石丸对家兔内毒素性肝损伤的影响,并观察家兔肝脏组织形态学变化。**方法:**将30只家兔随机分为5组,分别为模型组,二十五味松石丸高、中、低剂量组(0.5, 0.167, 0.06 g·kg⁻¹),地塞米松组(0.005 g·kg⁻¹),每组6只,每日*ig*给药1次,连续5 d,模型组和地塞米松组分别以等量生理盐水*ig*,在第5天灌药前分别用内毒素攻击预先*ig*的家兔,比较各组家兔于造模12 h内的死亡情况,检测各组家兔体温、血常规以及肝功能情况,并采用苏木素-伊红(HE)观察各组家兔肝脏组织病理学变化。**结果:**二十五味松石丸高剂量能降低内毒素血症家兔血清总胆红素及丙氨酸氨基转移酶,肝脏病理损伤明显减轻,二十五味松石丸低剂量能降低内毒素血症家兔血清天门冬氨酸氨基转移酶以及血液白细胞总数,与模型组比较均具有明显的统计学差异($P < 0.05$)。**结论:**二十五味松石丸对家兔内毒素性肝损伤具有一定的保护作用。

[关键词] 二十五味松石丸; 内毒素性肝损伤; 病理评分; 血常规; 肝功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0116-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016190116

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1055.036.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 10:55

Effect of Ershiwuwei Songshi Pills on Liver Injury of Rabbits with Endotoxemia

ZHANG Jie, XIONG Wan-li, LIU Yi, YUAN Dong-ya, SUN Fang-yun*

(Life Science Laboratory, Medical College, Tibetan Medicine Screening Laboratory,
Xizang Minzu University, Xianyang 712082, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Ershiwuwei Songshi pills on liver injury in rabbits with endotoxemia, and observe the morphological changes in liver tissues of rabbits. **Method:** Thirty rabbits were randomly divided into five groups: model group, Ershiwuwei Songshi pills high dose, middle dose and low dose groups (0.5, 0.167, 0.06 g·kg⁻¹, $n = 6$), and dexamethasone group (0.005 g·kg⁻¹), $n = 6$ in each group. The rabbits were treated with corresponding drugs once a day for continuous 5 days by *ig* administration; the rats in model group and dexamethasone group received the same volume of normal saline by *ig* administration. Endotoxemia was used to attack the rabbits before drug administration on day 5, and the death of rabbits in each group was compared in 12 h; body temperature, blood routine and liver function were examined, and pathological changes of liver tissues were also observed by htoxylin eosin (HE) staining in each group. **Result:** the content of total bilirubin an alanine aminotransferase (ALT) in serum can be reduced by high dose Ershiwuwei Songshi pills and liver pathological damage was significantly reduced; the content of aspartate aminotransferase (AST) in serum and numbers of WBC can be reduced by low dose of Ershiwuwei Songshi pills, with significant difference as

[收稿日期] 20151128(010)

[基金项目] 西藏自治区科技厅自然科学基金项目(2015ZR-14-13)

[第一作者] 张洁, 硕士, 讲师, 从事细胞生长分化研究, Tel:18629397882, E-mail:yanyanqing 2014@163.com

[通讯作者] * 孙芳云, 硕士生导师, 从事细胞生长分化研究, Tel:13521660464

compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ershiwuwei Songshi pills has a protective effect on liver injury of rabbits induced by endotoxin.

[**Key words**] Ershiwuwei Songshi pills; liver injury with endotoxin; pathological score; routine blood test; liver function

二十五味松石丸是经典的藏族药品种,由松石、檀香、珊瑚、绿绒蒿、牛黄、丁香、船形乌头、伞梗虎耳草、肉豆蔻、毛诃子(去核)、麝香、西红花等二十五味药物组成。历年来被《中国药典》所收载,具有疏肝利胆、清热解毒,活血化瘀等功效^[1]。我国藏区用药很多,但尚无现代药理学研究相关资料。临床对照实验表明,该药物能促使丙氨酸氨基转移酶和血清胆红素恢复正常^[2],对病毒性肝炎及肝硬化效果明显^[3]。孙芳云等^[4]研究发现该药可通过降低血清内毒素含量、保护肝脏功能。为了进一步探索该药对肝脏的影响,本实验采用预防性 *ig* 给药,以内毒素攻击家兔,通过测定血清丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、总胆红素、直接胆红素以及间接胆红素水平来检测肝脏功能。同时光镜观察各组家兔肝组织病理结构变化情况并进行病理评分,主要研究药物对各组家兔肝脏形态学的影响,并结合组织病理结构改变综合分析该药的护肝机制,为进一步探明其抗内毒素血症机制提供依据和参考。

1 材料

1.1 动物 SPF 级家兔,30 只,雌雄兼用,体重 2.16 ~ 2.46 kg,由西安交通大学医学部动物实验中心提供,动物合格证号 SCXK(陕)2010-0004。

1.2 药物及试剂 二十五味松石丸(西藏昌都光宇利民药业有限责任公司,批号 20140701),内毒素对照品(湛江博康海洋生物有限公司,批号 1408170),注射用地塞米松磷酸钠(马鞍山丰原制药有限公司,批号 140606-1)

1.3 仪器 BL-420A 型机能实验系统(成都泰盟科技有限公司),SHZ-A 型水恒温振荡器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),G2X-9079MBE 型数显鼓风干燥箱,TDL-50C 型普通台式离心机及 HHS 型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂),ZDQ-2121 微型旋涡混合仪(金坛市盛蓝仪器制造有限公司),

2 方法

2.1 药物处理 取 11 颗药丸溶于 130 mL 生理盐水中,待充分溶解后,此剂量便为高剂量。从中取出 30 mL 于另一烧杯中,加入 60 mL 生理盐水,此剂量便为中剂量。再从高剂量中取出 10 mL 于另一烧杯

中,加入 80 mL 生理盐水,此剂量便为低剂量。

2.2 动物分组与给药 将 30 只家兔按体重随机分为 5 组,分别为模型组、地塞米松组、二十五味松石丸高、中、低剂量组(0.5, 0.167, 0.06 $g \cdot kg^{-1}$),每日 *ig* 给药 1 次,每只家兔均给药 15 mL 连续 5 d,模型组和地塞米松组分别以等量生理盐水 *ig*,所有家兔在第 4 天 *ig* 后禁食,但自由饮水。第 5 天,最后一次 *ig*,高、中、低剂量组的家兔灌以与前述等量药物,模型组灌以与前述等量生理盐水,阳性药组采用耳缘静脉注射地塞米松(0.005 $g \cdot kg^{-1}$,每只家兔给药 4 mL)。并于第 5 次给药前 1 h 以内毒素(0.000 1 $g \cdot kg^{-1}$,每只家兔给药 1 mL)攻击大鼠,于注射内毒素之前测家兔直肠温度 1 次,注射内毒素后 2, 4, 6 h 再各测家兔直肠温度^[4]。并于耳缘中央动脉取血,全自动生化仪测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆红素,直接胆红素和间接胆红素。血细胞分析仪测定血液总的白细胞、红细胞、血小板含量。最后将家兔处死,取适当肝组织 10% 中性甲醛固定,苏木素-伊红(HE)石蜡切片,光镜观察。

2.3 肝组织病理学观察及病理评分标准 通过耳缘静脉注射空气处死家兔,立刻取肝脏组织(1 cm × 1 cm × 1 cm),用 10% 中性甲醛固定,逐级乙醇脱水,二甲苯透明、浸蜡,石蜡包埋,常规切片,42 °C 水浴中捞片,88 °C 烤箱烤片后放入二甲苯浸泡,5 ~ 10 min/次,3 次;无水乙醇浸泡,1 min/次,2 次,95% 乙醇浸泡,1 ~ 2 min/次,2 次,80% 乙醇浸泡 1 min,自来水漂洗 4 ~ 5 次;苏木素染色(染细胞核)5 ~ 6 min,自来水漂洗 4 ~ 5 次;浸于 1% 盐酸,染色 5 s,自来水冲洗返蓝;1% 的伊红染色(染细胞浆)30 s;95% 的乙醇脱水,1 ~ 2 min/次,2 次;无水乙醇脱水,1 ~ 2 min,2 次;二甲苯脱水透明,2 min/次,3 次;中性树胶封片,光镜检测。HE 染色后采用双盲法,光镜观察肝组织病理学改变并按照 Camargo 等^[5]提出的分级标准进行评估:0 级,微小损伤;I 级,轻度损伤,包括局灶性细胞核固缩和胞质空泡形成;II 级,中度损伤,包括广泛胞核固缩、胞质嗜酸小体增多以及细胞边界不清;III 级,严重损伤,包括肝索出血、肝细胞坏死以及中性粒细胞浸润。每张切片随机抽取

10 个高倍视野镜检, 每张切片分值为 10 个高倍视野评分均值。

2.4 肝功能及血常规检测 采用全自动生化仪检测血清总胆红素、直接胆红素以及间接胆红素, ALT 及 AST 含量。血细胞分析仪测定血液白细胞、红细胞及血小板含量。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件, 各組间差异比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 检验, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 肝病理学评分采用非参数检验 Kruskal-Wallis 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

3 结果

3.1 家兔死亡情况 二十五味松石丸高剂量组家兔死亡数为 1 只, 中剂量组家兔死亡 2 只, 低剂量组死亡数 2 只, 模型组死亡数为 1 只, 地塞米松组死亡为 0 只。

3.2 对内毒素血症家兔体温的影响 与模型组比较, 二十五味松石丸高剂量组和地塞米松组具有降低内毒素血症家兔体温的趋势, 但无统计学差异。见表 1。

表 1 二十五味松石丸对内毒素血症家兔体温的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Ershiwuwei Songshi pills on body temperature of rabbits with endotoxin ($\bar{x} \pm s$) °C

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	给药后 2 h	给药后 4 h	给药后 6 h	正常
模型	-	5	39.18 ± 0.21	39.07 ± 0.78	39.38 ± 1.21	39.28 ± 0.21
二十五味松石丸	0.5	5	38.98 ± 0.21	38.58 ± 0.16	39.02 ± 0.68	38.93 ± 0.54
	0.167	4	39.18 ± 0.55	38.18 ± 1.92	38.28 ± 1.94	39.07 ± 0.36
	0.06	4	39.23 ± 0.36	38.75 ± 0.57	39.10 ± 0.51	39.13 ± 0.49
地塞米松	0.005	6	38.42 ± 1.62	38.20 ± 1.62	39.20 ± 0.62	38.78 ± 0.89

3.3 对内毒素血症家兔肝功能的影响 与模型组比较, 二十五味松石丸高剂量组能明显降低血清 ALT,

总胆红素含量, 低剂量组能明显降低血清 AST 水平, 地塞米松组间接胆红素降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 二十五味松石丸对内毒素血症家兔肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Ershiwuwei Songshi pills on liver function of rabbits with endotoxin ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	胆红素/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
					总胆红素	直接胆红素	间接胆红素
模型	-	5	62.40 ± 17.90	30.00 ± 9.40	0.41 ± 0.09	0.04 ± 0.17	0.33 ± 0.21
二十五味松石丸	0.5	5	54.80 ± 6.37 ¹⁾	29.20 ± 16.10	0.33 ± 0.01 ¹⁾	0.13 ± 0.24	0.17 ± 0.22
	0.167	4	73.00 ± 8.04	29.75 ± 10.87	0.37 ± 0.17	0.38 ± 0.34	-0.04 ± 0.41
	0.06	4	46.50 ± 15.67	20.25 ± 4.50 ¹⁾	0.41 ± 0.17	0.05 ± 0.25	0.31 ± 0.09
地塞米松	0.005	6	55.70 ± 15.87	29.80 ± 12.90	0.13 ± 0.27	0.44 ± 0.46	-0.32 ± 0.58 ¹⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 3, 4 同)。

3.4 对内毒素血症家兔血常规的影响 与模型组比较, 地塞米松组能增加血液中白细胞总数以及降低血小板总数, 二十五味松石丸高、低剂量具有降低血液白细胞总数的趋势, 其中二十五味松石丸低剂

量组能明显降低血液白细胞总数 ($P < 0.05$), 二十五味松石丸中、低剂量组具有增加红细胞比容的趋势, 但对红细胞总数和血小板总数无明显影响。见表 3。

表 3 二十五味松石丸对内毒素血症家兔血常规的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Ershiwuwei Songshi pills on blood routine examination of rabbits with endotoxin ($\bar{x} \pm s$)

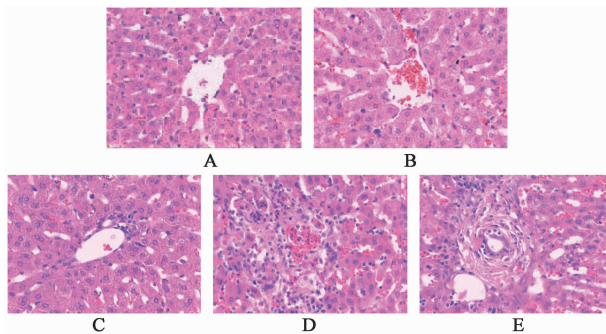
组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	红细胞 ($\times 10^9$)/L	白细胞 ($\times 10^9$)/L	血小板 ($\times 10^9$)/L	红细胞比容
模型	-	5	5.53 ± 0.28	13.78 ± 0.83	151.40 ± 33.20	0.18 ± 0.02
二十五味松石丸	0.5	5	5.85 ± 0.79	12.23 ± 1.21	89.33 ± 8.08	-0.08 ± 10.49
	0.167	4	6.08 ± 0.59	14.86 ± 2.44	298.60 ± 75.28	0.37 ± 10.04
	0.06	4	6.27 ± 0.76	9.18 ± 0.69 ¹⁾	241.75 ± 42.63	0.44 ± 0.05
地塞米松	0.005	6	6.08 ± 0.87	19.25 ± 1.11	83.67 ± 13.05 ¹⁾	0.18 ± 0.41

3.5 家兔肝组织病理学观察及病理分级

3.5.1 对内毒素血症家兔肝组织病理损伤的保护

作用 二十五味松石丸高剂量组家兔肝脏肉眼观颜色较浅, 光镜下见中央静脉及周围肝血窦淤血明显

减轻,少量肝细胞胞浆疏松化,可见部分肝细胞发生脂肪变性,汇管区炎细胞浸润明显减少,点状坏死较少,肝细胞结构基本正常,肝小叶结构完整。二十五味松石丸中剂量组肝小叶中央静脉及周围肝血窦淤血程度大、低剂量组明显,部分肝细胞胞浆发生颗粒样变,胞浆疏松化明显,坏死区有大量炎细胞浸润,汇管区炎细胞浸润增多。二十五味松石丸低剂量组中央静脉及周围血窦有淤血,肝细胞胞浆发生颗粒样变性较高剂量组明显,肝板排列较整齐,肝脏轮廓较清晰,汇管区炎细胞浸润有所减少。模型组肉眼见肝组织颜色变深,肝组织充血、出血及坏死,光镜下,肝小叶中央静脉及周围肝血都内广泛充血,中央静脉周围肝细胞胞浆疏松化,颗粒样变,甚至是气球样变,汇管区有大量炎细胞浸润,其周围肝细胞胞浆可见大小不等的空跑,小的空跑可融合成大空跑,并将肝细胞核挤压到一侧,发生脂肪变性,部分肝细胞不清晰,细胞核固缩、碎裂甚至溶解,坏死范围广泛,坏死区有大量炎细胞浸润。地塞米松组中肝小叶中央静脉及周围肝血窦淤血,汇管区炎细胞浸润明显,部分中央静脉周围肝细胞发生脂肪变性,肝细胞水肿不明显,小叶周边区可见部分肝细胞点状坏死,坏死区有炎细胞浸润。部分胆管周围出现纤维化。肝小叶结构完整。与地塞米松组比较,药物组汇管区纤维化程度明显降低。见图 1。



A. 二十五味松石丸 0.5 g·kg⁻¹组; B. 二十五味松石丸 0.167 g·kg⁻¹组; C. 二十五味松石丸 0.06 g·kg⁻¹组; D. 模型组; E. 地塞米松组
图 1 二十五味松石丸对内毒素血症家兔肝组织病理损伤的保护作用(HE, ×400)

Fig. 1 Protective effect of Ershiwuwei Songshi pills on liver pathological damage of rabbits with endotoxin (HE, ×400)

3.5.2 对内毒素血症家兔肝脏病理分级的影响 模型组病理学分级大部分为Ⅲ级,高剂量组病理学分级大部分表现为 0 级,明显低于模型组($P < 0.05$),地塞米松组病理学评分与模型组比较差异无统计学意义。见表 4。

表 4 各组家兔肝脏病理学分级比较

Table 4 Comparison of pathological grading in rabbits' livers between each groups

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	分级/级				平均秩
			0	I	II	III	
模型	-	5	0	0	1	4	19.60
二十五味松石丸	0.5	5	3	2	0	0	4.00 ^[1]
	0.167	4	0	1	2	1	14.00
	0.06	4	0	2	2	0	10.50
地塞米松	0.005	6	0	2	2	2	14.00

4 讨论

细菌内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 即脂多糖,能诱导的炎性肝损害,是多种肝病发生发展的基础^[5-6]。其作用机制主要包括 2 方面:一方面导致线粒体损伤,阻碍生物氧化过程并诱导肝细胞凋亡;另一方面与自由基 (NO),细胞因子 [肿瘤坏死因子 (TNF),白细胞介素-8 (IL-8) 等] 和特异性受体 [Toll 样受体 (TLRs), 清道夫受体 (SR), LPS 结合蛋白 (LBP) 等] 的致炎作用有关^[7-8]。张伟等^[9]研究表明, LPS 致急性肝损伤的机制与其上调 TLR4-NF-κB 炎症信号通路中 TLR4 蛋白及 NF-κBp65 亚基的磷酸化水平、增加致炎因子 IL-6 的表达有关。龚平等^[10]发现 LPS 致 kuffer 细胞活化后产生 TNF 和 IL-1,后者诱导肝细胞和肝窦内皮细胞表达 ICAM-1,进而促进细胞毒性 T 细胞攻击肝细胞,致大量肝细胞坏死。最终病理组织学上表现为白细胞浸润明显,肝窦壁上的血小板和白细胞数增加,阻塞血管,引发严重的急性微血管反应,引发严重肝损伤^[11-12]。

二十五味松石丸具有疏肝利胆、清热解毒、活血化瘀等功效,是经典的藏族药品种。我国藏区用药很多,但至今仍无现代药理学研究相关资料。课题组前期研究发现,二十五味松石丸可能通过降低血清内毒素含量、保护肝脏功能并具有对抗大鼠内毒素血症作用,但具体作用机制还不清楚。本研究在此基础上,采取家兔胃预防性灌药,发现二十五味松石丸高剂量组能降低内毒素血症家兔血清总胆红素和谷丙转氨酶,二十五味松石丸低剂量组能降低内毒素血症家兔血清天门冬氨酸氨基转移酶含量及血液白细胞总数。进一步进行肝组织病理学观察发现,二十五味松石丸高剂量组家兔肝小叶中央静脉及周围肝血窦扩张淤血不明显,肝细胞变性和坏死都较正常组明显减少,汇管区炎细胞浸润也明显较少。说明二十五味松石丸具有减轻内毒素引起的肝

淤血以及炎细胞浸润,减少肝细胞损伤。笔者推测,该药物可能具有降低血管通透性、抑制炎性渗出的作用。通过观察藏族药组肝细胞的形态,发现该药物能减轻肝细胞的不可逆性损伤,包括细胞水肿,脂肪变性等,避免或减少内毒素引起的肝细胞不可逆性损伤(主要是肝细胞坏死),但这些表象背后隐藏分子机制是什么,还有待进一步研究。且二十五味松石丸组与地塞米松比较,汇管区纤维化程度明显降低,说明该药物具有减少或抑制肝组织纤维化的作用,防止急性肝损伤转变为慢性肝损伤,从而起到护肝作用。在本实验中,亦可观察到藏族药组部分区域肝细胞再生,那么这是肝脏损伤后机体的代偿性增生,还是与致炎因子的作用有关^[8],亦或与二十五味松石丸的护肝作用有关,都值得深入探究。本实验所用动物例数有限,且在灌药过程中造成动物死亡,这对实验结果有一定的影响,在后续实验中应加大样本例数。并多做几个药物剂量组和观察时间点,找到该药物发挥作用的剂量范围。且今后研究中应进一步在分子水平上深入探究二十五味松石丸的确切护肝机制,为深入研究该药物的护肝机制提供依据,也为临床应用提供可靠参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:215.
[2] 马永祥,朵德祥. 二十五味松石丸治疗病毒性肝炎的随机对照临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2010,26(11):807-809.
[3] 泽仁杰,泽仁措. 藏医治疗肝硬化 38 例[J]. 中国民族医药杂志,2013,19(10):20-21.

[4] 孙芳云,徐世林,张召腾,等. 藏药二十五味松石丸对大鼠内毒素血症的保护作用[J]. 中药药理与临床,2015,31(1):190-192.
[5] Camargo C A, Madden J F, Gao W, et al. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent[J]. Hepatology,1997,26(6):1513-1520.
[6] Nolan J P. The role of intestinal endotoxin in liver injury: a long and evolving history [J]. Hepatology, 2010,52(5):1829-1835.
[7] Sewnath M E, vander Poll T, van Noorden C J, et al. Cholestatic interleukin-6-deficient mice succumb to endotoxin-induced liver injury and pulmonary inflammation [J]. Am J Respir Crit Care Med,2004,169(3):B413-B420.
[8] 齐海宇,肖红丽,阴赫宏. 内毒素血症急性肝损伤的特点及致病机制[J]. 中国中西医结合急救杂志,2014,21(2):144-146.
[9] 张祎,孟宪丽,张毅. 内毒素致大鼠急性肝损伤的机制研究[J]. 中药药理与临床,2014,30(5):54-58.
[10] 龚平,李春盛. 脓毒症和线粒体功能障碍[J]. 中华危重病急救医学,2013,25(4):254-256.
[11] Han M, Li Y, Liu M, et al. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat [J]. BMC Nephrol,2012,13(8):25-34.
[12] Saeed N M, El-Demerdash E, Abdel-Rahman H M, et al. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models [J]. Toxicol Appl Pharmacol,2012,264(1):84-93.

[责任编辑 周冰冰]