

肝苏颗粒对四氯化碳致肝纤维化大鼠 肝功能和病理损伤的影响

谢君¹, 谢晓芳^{1,2,3*}, 代良萍^{1,2}, 董艳红^{1,2}, 胡婷婷^{1,2},
李梦婷^{1,2}, 张大永⁴, 覃俊媛¹, 彭成^{1,2,3*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 中药资源系统研究与开发利用省部共建
国家重点实验室培育基地, 成都 611137; 3. 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137;
4. 四川新荷花中药饮片股份有限公司, 成都 425700)

[摘要] 目的:探讨肝苏颗粒对四氯化碳(CCl₄)诱导的大鼠肝纤维化的防治作用及作用机制。方法:将72只大鼠随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组(0.1 mg·kg⁻¹)和肝苏颗粒高、中、低剂量组(16.7, 8.4, 4.2 g·kg⁻¹),每组12只,CCl₄建立大鼠肝纤维化模型,同时灌胃给药10周。末次给药后,取血检测大鼠肝功能和重要脏器指数,酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定肝组织中透明质酸(HA),层连蛋白(LN),基质金属蛋白酶1(MMP-1)和金属蛋白酶抑制因子1(TIMP-1)含量;另取肝组织行一般病理学检查和马松(Masson)染色纤维化观察,并免疫组化法测定肝组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠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(TBIL),血清碱性磷酸酶(ALP)明显升高,总蛋白(TP)明显下降($P < 0.01$),肝组织HA, LN, TIMP-1水平明显升高($P < 0.01$),肝,脾系数显著升高而胸腺系数降低($P < 0.01$),肝脏质地变硬,病理学检测见典型假小叶形成,免疫组化检测显示肝组织TGF- β_1 , α -SMA表达明显增强。秋水仙碱组和肝苏颗粒各组大鼠血清ALT, AST, ALP, TBIL水平均显著下降,球蛋白明显增加($P < 0.01$),肝苏颗粒低剂量组的白蛋白(ALB)含量明显增加($P < 0.05$);各给药组肝组织中HA, TIMP-1水平明显降低($P < 0.01$),纤维化程度有不同程度改善,肝组织TGF- β_1 , α -SMA表达减弱。结论:肝苏颗粒对CCl₄致大鼠肝纤维化有显著治疗作用,能明显改善肝功能,减轻肝脏纤维化病变,机制与减轻肝细胞损伤和抑制纤维病变发展有关。

[关键词] 肝苏颗粒, 肝纤维化, 四氯化碳; 肝功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0117-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080117

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170210.0839.004.html>

[网络出版时间] 2017-02-10 8:39

Effect of Gansu Granule on Liver Function and Liver Damage for Perchlormethane-induced Hepatic Fibrosis of Rats

XIE Jun¹, XIE Xiao-fang^{1,2,3*}, DAI Liang-ping^{1,2}, DONG Yan-hong^{1,2}, HU Ting-ting^{1,2},
LI Meng-ting^{1,2}, ZHANG Da-yong⁴, QIN Jun-yuan¹, PENG Cheng^{1,2,3*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. State Key Laboratory of Systematic Research and Exploitation of Traditional Chinese Medicine Co-sponsored by Province and Ministry, Chengdu 611137, China; 3. Key Laboratory for Standardization of Traditional Chinese Medicine under Ministry of Education, Chengdu 611137, China; 4. Sichuan New Lotus Chinese Herbal Pieces Co. Ltd., Chengdu 425700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the preventive effect and action mechanism of Gansu granule on

[收稿日期] 20161212(007)

[基金项目] 国家自然科学基金人才培养项目(NJ1310034);四川省科技支撑计划项目(2014SZ0134);中药药理四川省青年科技创新研究团队项目(2014TD0007)

[第一作者] 谢君, 硕士, 从事疾病动物模型与中药复方药理毒理研究, Tel: 15198126839, E-mail: 875905968@qq.com

[通讯作者] * 谢晓芳, 博士, 副研究员, 从事中药药理与毒理研究, E-mail: 55091620@qq.com;

* 彭成, 教授, 博士生导师, 研究员, 从事中药药理与毒理研究, E-mail: pengchengchengdu@126.com

hepatic fibrosis rats induced by perchlormethane (CCl_4). **Method:** The liver fibrosis model of rats was established by CCl_4 . Totally 72 male rats were randomly divided into 6 groups, namely normal control group ($n = 12$), model control group ($n = 12$), colchicine group ($n = 12, 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and high, medium and low-dose Gansu granule groups ($n = 12, 16.7, 8.4, 4.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Ten weeks later after drug administration, all of the rats were put to death. Blood was collected to detect liver indexes, such as alanine transaminase (AST), aspartate aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL), total protein (TP), ALB, and alkaline phosphatase (ALP). Besides, the liver, spleen and thymus gland were dissected and weighed. Liver hyaluronic acid (HA), layer even protein (LN), Matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were determined by enzyme-linked immunoassay assay (ELISA). Pathological histology observation by HE staining and Masson staining were performed for other liver tissues. Alpha-smooth muscle actin ($\alpha\text{-SMA}$) and transforming growth factor β (TGF- β) expression in the hepatic tissue were measured by immunohistochemical method. **Result:** Compared with normal control group, model control group's rats serum ALT, AST, TBIL and ALP contents were significantly increased, PT significantly decreased ($P < 0.01$), liver tissue HA, LN, TIMP-1 levels were increased significantly ($P < 0.01$), with remarkable increase in liver, spleen coefficients ($P < 0.01$) and decrease of thymus gland coefficient. The liver texture of model rats was harden, with formation of pseudolobule and increase in expressions of TGF- β , and $\alpha\text{-SMA}$ in the liver. Compared with model control group, serum ALT, AST, ALP, TBIL levels were significantly declined and globulin increased significantly in both colchicine group and Gansu granule groups ($P < 0.01$), and albumin level in low-dose Gansu granule group was obviously increased ($P < 0.05$). For all of drug treating groups, the contents of HA and TIMP-1 in liver tissues were significantly decreased ($P < 0.01$), the degree of fibrosis were alleviated, and TGF- β_1 , $\alpha\text{-SMA}$ expressions in liver reduced. **Conclusion:** Gansu granule has an obvious anti-hepatic fibrosis effect, and can significantly improve the liver function and reduce the liver fibrosis for model rats. The action mechanism is correlated with reduction of liver cell damage and prevention of fibrosis.

[**Key words**] Gansu granule; liver fibrosis; carbon tetrachloride; liver function

肝纤维化既是病名,也是组织病理学概念,是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段,由于多种损伤因素长期慢性刺激肝脏,使肝窦内肝星状细胞活化,导致胶原等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)代谢失衡而沉积和肝组织重构所致^[1]。在适当阶段干预可阻断或逆转肝纤维化,从而延缓向肝硬化发展的进程^[2]。肝纤维化的诊断和治疗愈后评价主要依靠组织病理学检查、影像学检查、血清纤维化标志物检查等。当前用于肝纤维化的药物中部分药物可促进肝纤维化逆转,尤其是中医药具有较好的综合疗效^[1]。赶黄草为虎耳草科植物扯根菜的干燥地上部分,始载于《救荒本草》,是古蔺县道地药材,主治黄疸、水肿等^[3]。肝苏颗粒是由苗族药赶黄草制备而来的单方制剂,具有降酶、保肝、退黄、健脾的功效。研究报道显示,肝苏颗粒能够较好地改善慢性乙型肝炎肝纤维化患者临床症状^[4]。升高慢性乙型肝炎患者白细胞介素-21(IL-21)水平,对阻断及逆转肝纤维化进程有一定疗效^[5],体外实验显示肝苏颗粒可促进人肝细胞增殖,保护肝细胞和肝星状细胞(HSC)免受氧化应激损伤^[6]。

然而,本品的说明书适应症未包括肝纤维化。故本实验拟采用四氯化碳(CCl_4)致大鼠肝纤维化模型,从肝功能、病理组织学和血清纤维化标志物等指标的变化探讨肝苏颗粒对肝纤维化的防治作用,为扩大其临床适应症和临床科学应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,由四川省中医药科学院实验动物中心提供,动物生合格证号 SCXK(川)2013-0019。本研究所涉及的动物相关操作均在成都中医药大学动物伦理委员会的批准下进行[成中实医(2016)16号]。

1.2 药物及试剂 肝苏颗粒浸膏,由四川古蔺肝苏药业有限公司提供,批号 20141020,含生药 5 g · mL⁻¹,用蒸馏水配成 1.67,0.84,0.42 g · mL⁻¹;秋水仙碱片(云南植物药业有限公司,批号 20141103,使用前用生理盐水配成 0.01 g · mL⁻¹); CCl_4 ,橄榄油(分析纯,成都市科龙化工试剂厂,批号分别为 20130706,20130513,实验时将二者以 2:3 的体积比混合,配成 40% CCl_4 橄榄油溶剂使用);水合氯醛(分析纯,成都市科龙化工试剂厂,批号 20111123);

丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司, 批号分别为 120521, 130471); 总胆红素 (TBIL), 总蛋白 (TP), 白蛋白 (ALB), 碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒 (四川迈克生物科技股份有限公司提供, 批号分别为 0313011, 0313071, 0813051, 0813071); 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司提供, 批号分别为 BA0290, BM0002); 透明质酸 (HA), 层连蛋白 (LN), 基质金属蛋白酶 1 (MMP-1), 金属蛋白酶抑制因子 1 (TIMP-1) 试剂盒 (伊莱瑞特生物科技有限公司提供, 批号分别为 AK0016MAY11011, AK0016MAY11012, AK0016AUG005014, AK0016AUG005015)。

1.3 仪器 AU5400 型全自动生化分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司), TDZ5-WS 型低速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), VARIOSKAN FLASH 型多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 造模及给药 造模方法根据文献 [7] 报道及预实验确定。取成年, 健康 SD 大鼠, 雄性, 将大鼠按体重随机分为正常组 ($n = 12$) 和造模组。除正常组外, 从实验第 1 天开始, 各组均以 40% CCl_4 橄榄油混合液 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (首剂加倍) 灌胃, 每周 2 次, 连续 10 周。正常组灌胃等体积橄榄油; 且从实验第 2 周起各造模组给予喂饲高脂低蛋白饲料 (90% 玉米粉 + 1% 胆固醇 + 7% 猪油 + 2% 蛋黄粉), 至造模结束。同时, 从第 2 周开始, 将造模组大鼠按体重随机分为 5 组, 即模型组 ($n = 18$), 秋水仙碱组 ($n = 12$) 和肝苏颗粒高、中、低剂量组 ($n = 12$), 每日下午灌胃给药, 肝苏颗粒高、中、低剂量组分别灌胃 1.67, 0.84, 0.42 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 秋水仙碱组灌胃 0.01 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙碱水溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 正常组和模型组均灌胃生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每日 1 次, 至实验结束。于实验第 8 周开始, 每周随机取模型组 2 只大鼠进行肝功能和肝组织病理学检查。当肝组织出现明显肝纤维化表现时终止实验, 总时间不

超过 10 周。

2.2 指标检测及方法 实验期间, 各组大鼠每周称体重 1 次。末次给药后, 禁食不禁水 24 h, 然后以 10% 水合氯醛 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉, 经股动脉采血, 制备血清, 用全自动生化分析仪测定 ALT, AST, TBIL, ALP, TP, ALB。取血后, 每只大鼠剖取肝脏、脾脏、胸腺, 称湿重, 计算脏器系数 (脏器系数 = 脏器湿重/体重 $\times 100$), 在同一肝叶位置切取小块肝组织置入 10% 甲醛缓冲液固定, 苏木素-伊红 (HE) 染色行病理组织学检查, 免疫组化法测定 TGF- β_1 , α -SMA 表达; 另取部分肝组织匀浆后采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定 HA, LN, MMP-1, TIMP-1 含量。具体步骤均按照说明书内容进行操作。按肝纤维化的程度分级进行评分, 具体评分标准如下, 0 分为无肝纤维化; 1 分为极少肝纤维化, 无间隔或少量小隔可见汇管区扩大或轻度窦周围纤维化; 2 分为轻度纤维化, 偶见分隔可有汇管区扩大或轻度窦周纤维化; 3 分为中度纤维化, 有中等度细隔形成及不完全纤维化; 4 分为轻度肝硬化, 明显间隔形成, 伴有明显结节形成, 但大部分间隔偏细。5 分为中度肝硬化, 两个以上宽间隔形成, 镜下可见大小不等结节; 6 分为重度肝硬化, 大多数粗大纤维间隔形成包绕假小叶。且胶原纤维, 弹力纤维与假小叶成平行排列, 血管改建完成。

2.3 统计学分析 所有数据均采用 SPSS 22.0 软件包建立数据库, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肝纤维化大鼠一般情况的影响 实验期间, 正常组大鼠一般状态良好; 模型组大鼠易激怒, 自造模第 3 周精神明显萎靡, 皮毛光泽度欠佳, 体重增长较慢; 与模型组比较, 各给药组大鼠精神状态和被毛光泽度均有改善, 且肝苏颗粒中、低剂量组大鼠体重增加较模型组快, 优于秋水仙碱 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 肝苏颗粒对 CCl_4 致肝纤维化大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of Gansu granule on weight of CCl_4 -induced hepatic fibrosis in rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药前	第 1 周	第 3 周	第 6 周	第 9 周
正常	-	210.83 \pm 22.61	244.50 \pm 19.31	352.42 \pm 26.33	377.58 \pm 32.65	418.75 \pm 43.03
模型	-	202.00 \pm 17.99	213.83 \pm 13.63 ²⁾	268.92 \pm 16.60 ²⁾	296.00 \pm 21.18 ²⁾	338.58 \pm 58.56 ⁴⁾
秋水仙碱	1×10^{-4}	213.08 \pm 0.92	206.42 \pm 10.72 ²⁾	255.08 \pm 16.46 ²⁾	299.67 \pm 18.12 ²⁾	332.08 \pm 25.02
肝苏颗粒	16.7	200.83 \pm 13.63	204.25 \pm 13.20 ²⁾	259.58 \pm 21.28 ²⁾	298.67 \pm 28.55 ²⁾	347.17 \pm 34.48 ⁴⁾
	8.4	200.58 \pm 10.84	209.08 \pm 15.73 ²⁾	272.25 \pm 20.83 ²⁾	315.25 \pm 20.31 ²⁾	360.58 \pm 39.53 ⁴⁾
	4.2	205.00 \pm 9.40	212.08 \pm 9.77 ²⁾	273.75 \pm 14.67 ²⁾	322.58 \pm 25.35 ³⁾	365.58 \pm 25.07 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 6 同)。

3.2 对肝纤维化大鼠肝功能的影响 根据模型组大鼠变化,于第 10 周末结束试验。与正常组大鼠比较,模型组大鼠血清 ALT,AST,ALP,ALB,TBIL 水平明显升高,TP,ALB 及球蛋白含量均明显下降($P <$

$0.05, P < 0.01$);与模型组比较,各给药组血清 ALT,AST,TBIL,ALP 均明显下降,球蛋白含量显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),肝苏颗粒低剂量组的白蛋白亦明显增加($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 肝苏颗粒对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of Gansu granule on liver function of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹
正常	-	17.50 ± 4.50	136.00 ± 30.35	158.25 ± 46.39	0.63 ± 0.43
模型	-	649.17 ± 162.38 ²⁾	614.92 ± 175.05 ²⁾	516.61 ± 174.57 ²⁾	3.34 ± 1.25 ²⁾
秋水仙碱	1 × 10 ⁻⁴	88.75 ± 35.31 ⁴⁾	181.67 ± 26.11 ⁴⁾	316.71 ± 112.16 ⁴⁾	1.21 ± 0.96 ⁴⁾
肝苏颗粒	16.7	66.17 ± 27.78 ⁴⁾	201.75 ± 87.02 ⁴⁾	207.50 ± 87.46 ⁴⁾	0.68 ± 0.55 ⁴⁾
	8.4	50.33 ± 26.40 ⁴⁾	166.92 ± 25.79 ⁴⁾	212.29 ± 100.06 ⁴⁾	0.79 ± 0.42 ⁴⁾
	4.2	48.42 ± 13.94 ⁴⁾	176.08 ± 28.60 ⁴⁾	147.77 ± 32.52 ⁴⁾	0.54 ± 0.40 ⁴⁾

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	球蛋白/g·L ⁻¹	白血球/球蛋白
正常	-	36.20 ± 0.96	67.91 ± 2.27	31.71 ± 1.87	1.15 ± 0.72
模型	-	31.34 ± 2.80 ²⁾	60.03 ± 6.50 ¹⁾	27.03 ± 3.27 ²⁾	1.18 ± 0.19
秋水仙碱	1 × 10 ⁻⁴	33.63 ± 0.93	66.04 ± 2.37	32.42 ± 2.37 ⁴⁾	1.04 ± 0.76
肝苏颗粒	16.7	32.88 ± 2.51	64.25 ± 4.61	31.37 ± 2.71 ⁴⁾	1.05 ± 0.80
	8.4	33.69 ± 1.66	63.95 ± 3.16	30.26 ± 1.78 ⁴⁾	1.12 ± 0.50
	4.2	34.08 ± 1.60 ³⁾	65.32 ± 3.06	30.94 ± 1.75 ⁴⁾	1.10 ± 0.51

3.3 对肝纤维化大鼠肝脏、脾脏和胸腺脏器系数的影响 与正常组比较,模型组大鼠的肝脏和脾脏系数均显著升高,胸腺系数显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,肝苏颗粒各剂量组可明显降低肝脏系数,

同时低剂量组可降低脾脏系数,肝苏颗粒高剂量和秋水仙碱有使胸腺系数恢复,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),秋水仙碱对肝脏、脾脏系数无明显作用。见表 3。

表 3 肝苏颗粒对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

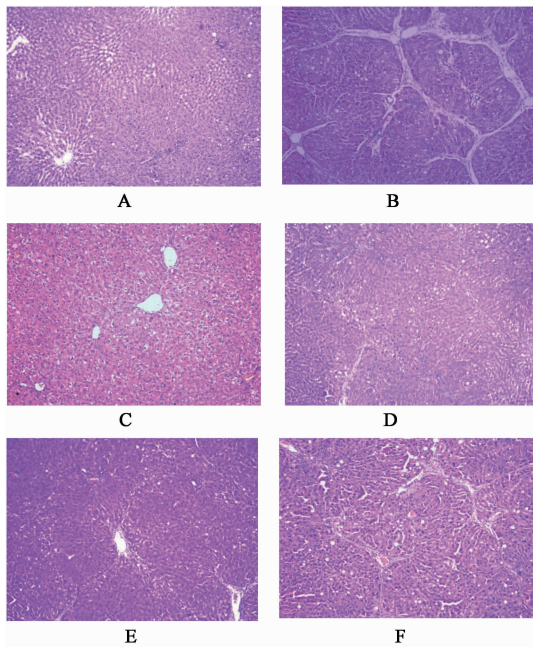
Table 3 Effect of Gansu granule on organ coefficient of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝脏	脾脏	胸腺	%
正常	-	2.74 ± 0.67	0.17 ± 0.03	0.09 ± 0.02	
模型	-	3.61 ± 0.55 ²⁾	0.24 ± 0.05 ²⁾	0.07 ± 0.02 ²⁾	
秋水仙碱	1 × 10 ⁻⁴	3.59 ± 0.63	0.23 ± 0.04	0.09 ± 0.02 ⁴⁾	
肝苏颗粒	16.7	2.96 ± 0.26 ⁴⁾	0.23 ± 0.05	0.10 ± 0.01 ⁴⁾	
	8.4	3.18 ± 0.44 ³⁾	0.22 ± 0.02	0.09 ± 0.02 ³⁾	
	4.2	3.03 ± 0.38 ⁴⁾	0.21 ± 0.03 ³⁾	0.08 ± 0.01	

3.4 对肝纤维化大鼠肝组织形态学的影响 大体解剖可见,正常组大鼠肝脏为暗红色,表面光滑并有光泽,质软,边缘锐利;模型组大鼠肝脏为浅黄色,表面粗糙并失去正常光泽,质地变硬,边缘钝圆,部分大鼠肝脏明显肿大;各给药组大鼠肝脏表面淡红色,与模型组相比表面光滑,色泽得到一定恢复,质地变软,边缘变薄,部分恢复到正常大鼠肝脏的状态。经病理切片,HE 染色观察发现,正常组大鼠肝脏小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排

列,中央静脉,汇管区动,静脉和胆管结构正常,肝窦不扩张,肝窦内,汇管区周围可见少量的间质细胞;模型组大鼠肝细胞脂肪变性已累及整个肝小叶,部分肝细胞可见气球样变,正常肝小叶结构被破坏,正常肝细胞减少,大量的纤维结缔组织增生,形成大小不一的典型的假小叶结构,假小叶内以充斥着脂肪变的肝细胞,肝窦扩张,窦内和汇管区可见较多的间质细胞,以活化的星状细胞为主,大量炎性细胞浸润,损害明显;秋水仙碱组及肝苏颗粒各给药组大鼠

肝细胞脂肪变性程度明显减轻,纤维增生程度明显减轻,少见完整假小叶结构。经 Masson 染色后显示模型组大鼠肝组织纤维化严重,秋水仙碱和肝苏颗粒各剂量组肝组织纤维化得到改善病理学检查见下图 1, 2。与正常组比较,模型组评分明显升高,差异有显著性意义($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组评分都降低,肝苏颗粒中、低剂量和秋水仙碱可显著降低肝纤维化评分($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。



A. 正常组; B. 模型组; C. 秋水仙碱组; D. 肝苏颗粒 16.7 g·kg⁻¹组; E. 肝苏颗粒 8.4 g·kg⁻¹组; F. 肝苏颗粒 4.2 g·kg⁻¹组(图 2~4)
图 1 肝苏颗粒对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织形态学的影响 (HE, ×100)

Fig.1 Effect of Gansu granule on liver histomorphology of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats(HE, ×100)

表 4 肝苏颗粒对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝脏纤维化变的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of Gansu granule on liver fibrosis change of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝纤维化数/只	评分/分
正常	-	12(-)	0
模型	-	12(+)	5.58 ± 0.67 ²⁾
秋水仙碱	1 × 10 ⁻⁴	12(+)	4.08 ± 0.90 ⁴⁾
肝苏颗粒	16.7	12(+)	3.92 ± 1.51 ³⁾
	8.4	12(+)	3.92 ± 1.24 ³⁾
	4.2	12(+)	2.00 ± 1.21 ⁴⁾

注:评分标准(-)为无肝纤维化表现,(+)为有肝纤维化表现。评分数据依照肝硬化诊断标准评分表评出。

3.5 对肝纤维化大鼠肝组织纤维化相关成分的影响 与正常组比较,模型组 HA, LN 和 TIMP-1 水平

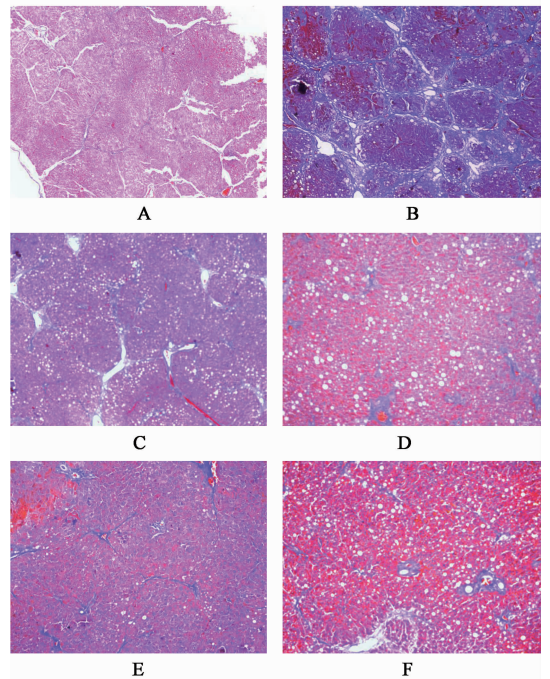


图 2 肝苏颗粒对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组形态学的影响 (Masson, ×100)

Fig.2 Effect of Gansu granule on liver histomorphology of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats(Masson, ×100)

明显升高,有显著性差异($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组 HA 和 TIMP-1 水平明显降低($P < 0.01$)。各组间 MMP-1 含量无明显差别。见表 5。

3.6 对肝纤维化大鼠肝组织表达 α -SMA, TGF- β_1 的影响 正常组大鼠 α -SMA 阳性表达仅存在于汇管区动静脉血管壁上,肝窦散在分布;模型组大鼠 α -SMA 呈强阳性表达,密布于汇管区,炎症浸润区及胶原纤维增生处;肝苏颗粒各剂量组和秋水仙碱组 α -SMA 阳性表达主要存在于汇管区血管壁,肝窦处亦有分布,阳性表达量较模型组明显减少,以低剂量组效果最好,稍微强于秋水仙碱组,肝苏颗粒高、中剂量组的表达强于低剂量组。见图 3。在 TGF- β_1 的表达方面,正常组大鼠肝组织在中央静脉和汇管区有少量表达;模型组 TGF- β_1 阳性表达明显增强,广泛分布于变性的肝细胞,纤维化区,肝窦区,汇管区,血管壁及部分胆管细胞;肝苏颗粒各剂量组和秋水仙碱组 TGF- β_1 阳性表达量明显减少,以低剂量组效果最好,高、中剂量组表达稍强($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 4。采用 image pro plus 6.0 进行两个因子表达的灰度值测定,见表 6。

4 讨论

当前观点认为肝纤维化进程可逆,预防和治疗肝纤维化是肝病防治的重要环节^[8]。肝纤维化的

表 5 肝苏颗粒对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织纤维化成分含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effect of Gansu granule on component content of liver tissue fibrosis of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HA	LN	TIMP-1	MMP-1
正常	-	79.03 ± 5.24	65.89 ± 9.55	47.13 ± 12.60	45.86 ± 3.46
模型	-	105.92 ± 2.16 ²⁾	112.62 ± 9.40 ²⁾	139.07 ± 25.46 ²⁾	45.56 ± 3.00
秋水仙碱	1 × 10 ⁻⁴	88.96 ± 3.16 ⁴⁾	79.28 ± 1.84 ⁴⁾	91.17 ± 22.83 ⁴⁾	44.39 ± 2.59
肝苏颗粒	16.7	94.03 ± 1.03 ⁴⁾	99.93 ± 3.52 ⁴⁾	99.36 ± 16.97 ⁴⁾	45.88 ± 2.62
	8.4	96.47 ± 2.19 ⁴⁾	92.78 ± 1.59 ⁴⁾	96.59 ± 12.27 ⁴⁾	46.85 ± 2.64
	4.2	99.76 ± 1.91 ⁴⁾	85.91 ± 2.73 ⁴⁾	81.34 ± 19.00 ⁴⁾	47.09 ± 2.20

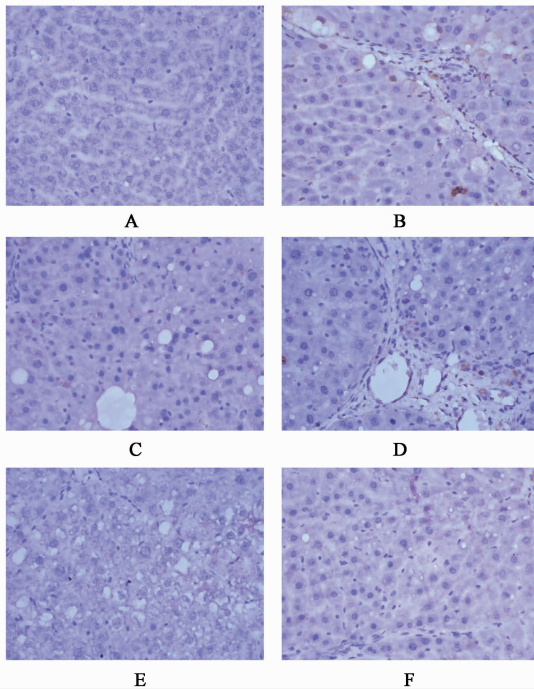


图 3 肝苏颗粒对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Gansu granule on protein expression of liver tissue of α -SMA of CCl₄-induced hepatic fibrosis of rats (IHC, ×400)

表 6 肝苏颗粒对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA, TGF- β ₁ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 6 Effect of Gansu granule on protein expression of liver tissue of α -SMA, TGF- β ₁ of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	α -SMA	TGF- β ₁
正常	-	0.31 ± 0.26	0.39 ± 0.13
模型	-	1.81 ± 0.39 ²⁾	2.03 ± 0.30 ²⁾
秋水仙碱	1 × 10 ⁻⁴	1.08 ± 0.49 ⁴⁾	1.08 ± 0.15 ⁴⁾
肝苏颗粒	16.7	1.14 ± 0.52 ³⁾	1.28 ± 0.40 ⁴⁾
	8.4	1.19 ± 0.50 ³⁾	1.31 ± 0.36 ⁴⁾
	4.2	1.11 ± 0.16 ⁴⁾	1.17 ± 0.17 ⁴⁾

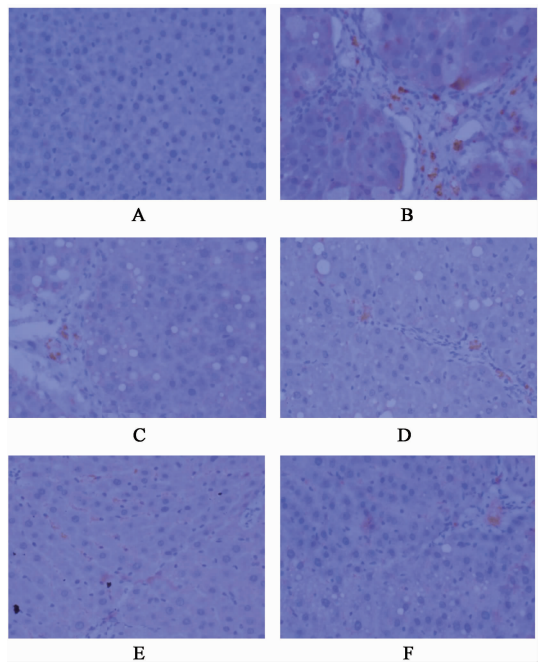


图 4 肝苏颗粒对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织 TGF- β ₁ 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of Gansu granule on protein expression of liver tissue of TGF- β ₁ of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats (IHC, ×400)

实质是 ECM 过度沉积^[9], 发生的关键是 HSC 的激活^[10]。当病毒、酗酒、药物损伤等病因损伤肝实质, 均可继发性激活 HSC, 进而产生大量的 ECM^[11]。CCl₄ 诱发的肝纤维化动物模型是应用最早最广泛的肝纤维化模型。此方法能用于肝纤维化的信号通路及分子调控机制, 组织病理改变以及抗纤维化药物筛选的相关体内研究^[12]。肝纤维化时可表现为肝功能损伤, 肝组织纤维样变等典型病变。本研究显示, 模型组大鼠 ALT, AST, TBIL, ALP 等明显升高而 ALB, TP 和球蛋白含量下降, 证明此时大鼠的肝功能已经严重受损, 给药后上述各指标得到不同程度显著恢复, 其中肝苏颗粒高、中剂量组大鼠部分指标已恢复到正常值, 表明肝苏颗粒具有改善本模型

大鼠肝功能的作用。

目前比较公认的能够反映 ECM 降解情况的适用型血清标志物主要有 HA, LN 等^[13]。ECM 的合成和降解主要由 MMPs 和 TIMPs 共同调节。MMPs 可促进 ECM 的降解,而 TIMPs 可通过抑制 MMPs 的活性来阻止 ECM 降解。各种慢性病因作用于肝脏后,打破了原有的 MMPs/TIMPs 平衡,从而导致 ECM 的过度沉积,最终导致肝脏纤维化^[14]。研究显示,肝纤维化发展的过程中 TIMP-1 含量会不断增加,引起 ECM 中胶原的沉积,最终促进肝纤维化的发生发展^[15]。因此,肝组织 HA, LN, TIMP-1, MMP-1 等常作为反映肝组织纤维化程度及药物抗肝纤维效果的指标。本研究实验结果显示,模型大鼠肝组织出现明显肝纤维变,肝组织中 HA, LN, TIMP-1 含量显著增加;灌胃肝苏颗粒后,可使使肝功能明显改善;同时降低肝组织中 TIMP-1, HA 和 LN 含量,表示药物可抑制 ECM 堆积,这与病理组织学检测结果一致。

TGF- β_1 不仅能够促进 HSC 激活转化为成纤维细胞,而且能增强 ECM 的合成,抑制其降解,故能作为检测肝纤维化的标志^[16]; α -SMA 的表达水平也是 HSC 激活增殖情况的重要标志^[17]。本实验中,造模大鼠肝组织中 TGF- β_1 , α -SMA 均呈高表达。与之比较,各给药组肝组织的 TGF- β_1 , α -SMA 阳性表达量显著减少,提示肝苏颗粒可通过抑制肝组织炎症介质 TGF- β_1 的分泌以抑制其激活 HSC 的作用,从而进一步减少 HSC 分泌 α -SMA,减轻纤维化病变。

综上所述,肝苏颗粒具有治疗实验性肝纤维化的作用,能明显改善肝功能和肝组织病理损伤,机制与抑制 ECM 堆积和抑制 HSC 被激活有关;从本实验结果看,以 $0.42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组效果最好,而非典型的量-效正相关。今后有待进一步明确其抗纤维化的分子机制和量效相关性,为促进产品的市场应用和二次开发提供依据。

[参考文献]

[1] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南[J]. 中国肝脏病杂志: 电子版, 2010, 2(4): 54-59.
[2] 孔维涵. 单味中药抗肝纤维化作用研究进展[J]. 天津药学, 2011, 23(2): 65-68
[3] 肖丽萍, 宋洋洋, 周彦希, 等. 赶黄草抗非酒精性脂肪肝的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20

(10): 125-129.

[4] 贺劲松, 郑颖俊, 陈亮, 等. 肝苏颗粒治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2007, 17(3): 136-138.
[5] 莫菁莲, 王政. 肝苏颗粒对慢性乙型肝炎患者 IL-21 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 284-286.
[6] 曲颖, 宗蕾, 沈镭, 等. 肝苏对 CCl₄ 肝纤维化大鼠氧化应激和胶原表达的影响[J]. 胃肠病学, 2011, 16(4): 196-201.
[7] 郭来, 王再谟. 肝心宁胶囊对大鼠肝纤维化超微结构的影响[J]. 中国中医急症, 2010, 19(4): 638-654.
[8] Povero D, Busletta C, Novo E, et al. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process [J]. *Histol Histopathol*, 2010, 25(8): 1075-1091.
[9] 王付, 尚立芝, 苗小玲, 等. 四逆散加味对肝纤维化大鼠肝功能, 肝纤维化指标及病理变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 177-180.
[10] 谌辉, 张景辉, 刘文琪. 姜黄素抗血吸虫病肝纤维化及其机制的实验研究[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1274-1277.
[11] 卢秉久, 姜冬冬. 健脾疏肝方对 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化抑制作用的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(10): 2134-2136.
[12] Knockaert L, Berson A, Ribault C, et al. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver[J]. *Lab Invest*, 2012, 92(3): 396-410
[13] 邵祥强, 肖华胜. 肝纤维化发病机制与临床诊断的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(3): 268-274.
[14] 任俊杰, 刘立新. MMPs/TIMPs 介导的纤维消融平衡与肝纤维化的研究新进展[J]. 中华消化病与影像杂志: 电子版, 2016, 6(4): 175-179.
[15] Rave-Frenk M, Malik I A, Christiansen H, et al. Rat model of fractionated (2Gy/day) 60 Gy irradiation of the liver; long-term effects [J]. *Radiat Environ Biophys*, 2013, 52(3): 321-338.
[16] 景晶, 赵金英, 华冰, 等. 甘草总黄酮抑制硫代乙酰胺诱导肝纤维化大鼠肝组织中 TGF- β_1 及 Caspase-3 的表达[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(15): 3034-3040.
[17] 袁发浒, 冯金梅, 刘锴, 等. EGCG 对日本血吸虫感染小鼠 TIMP-1 及 MMP-1 表达和肝纤维化的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(5): 428-433.

[责任编辑 周冰冰]