

改良高脂及乙醇加情绪刺激诱导大鼠肝硬化 肝郁脾虚证模型的建立

石亮^{1,2}, 孙晓倩², 李晓宇¹, 孙蓉^{1*}

(1. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:**构建能与肝硬化肝郁脾虚证临床证候表现密切相关的、并适宜于中药活性发现和药效评价的稳定可靠的大鼠肝硬化肝郁脾虚证证候结合模型。**方法:**70只大鼠按体重随机分为正常组;模型I组、水飞蓟宾葡甲胺片I组:采用79.5%单纯玉米粉加20%猪油,0.5%胆固醇制成的高脂低蛋白饲料饲养;30%乙醇复合因素造模连续4周;改良模型II组、水飞蓟宾葡甲胺片II组:采用由79.5%单纯玉米粉加20%猪油,0.5%胆固醇制成的高脂低蛋白饲料饲养,10%乙醇灌胃1周,5%乙醇灌胃3周的方法造模;改良模型III组、水飞蓟宾葡甲胺片III组:采用由89.5%单纯玉米粉加10%猪油,0.5%胆固醇制成的高脂低蛋白饲料饲养,乙醇灌胃方法同模型II组;水飞蓟宾葡甲胺片I, II, III组均按 $0.108\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃水飞蓟宾葡甲胺片治疗。实验期间除正常组外其余各组大鼠均给予相同程度、不可预知的情绪刺激,每日观察各组大鼠一般状态,模拟临床肝硬化肝郁脾虚证临床证候表现,分析并提出适宜于大鼠的证候表现,并每日按积分标准进行赋分,记录大鼠的体重、日食日水量,实验结束眼球取血检测大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT),天门冬氨酸转氨酶(AST),透明质酸(HA),III型前胶原(PC-III),IV型胶原(IV-C),腺苷脱氨酶(ADA),单胺氧化酶(MAO)和A/G等与肝硬化密切相关指标的水平,苏木素-伊红(HE)染色观察各组肝组织病理学变化。**结果:**正常组无大鼠死亡,营养状况良好;模型组大鼠饮食饮水量降低,体重增加缓慢,毛质粗糙,精神萎靡,个别老鼠趾甲易出血;其中模型I组死亡4只,模型II组死亡3只,模型III组无死亡情况。与正常组比较,模型组大鼠血清ALT,AST,HA,PC-III,IV-C,ADA,MAO水平显著升高,A/G显著降低,脏脑比例及证候积分显著升高($P < 0.01$);各给药组大鼠血清ALT,AST,HA,PC-III,IV-C,ADA,MAO水平与模型I组相比明显降低,A/G明显升高,脏脑比例及证候积分明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),模型组肝组织形态学检查发现有假小叶形成,且汇管区出现典型的病变,阳性药组上述病变可呈现不同程度改善。**结论:**改良后的大鼠肝硬化肝郁脾虚证模型建立方法可提高造模成功率,降低造模导致大鼠的死亡率,具有成模时间短,与临床肝硬化肝郁脾虚证的证候吻合度高、可行性好,证候表现稳定的特点,以适宜于肝硬化肝郁脾虚证临床方证相关基础性研究和中药复方活性发现、药效评价与机制探讨。

[关键词] 改良高脂;肝硬化;水飞蓟宾葡甲胺片;乙醇加情绪;肝郁脾虚证

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0106-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017140106

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1132.044.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 11:32

Establishment of Hepatic Cirrhosis Models with Syndrome of Liver Depression and Spleen Deficiency in Rats by Modified High Fat and Alcohol Stimulation and Emotional Stimuli

SHI Liang^{1,2}, SUN Xiao-qian², LI Xiao-yu¹, SUN Rong^{1*}

(1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To establish stable and reliable rat models of hepatic cirrhosis with syndrome of

[收稿日期] 20170307(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81374059);山东省自主创新和成果转化项目(2014ZZCX02104);山东省自然科学基金重点项目(2011ZRB14333);泰山学者工程专项经费项目(Ns201511107);山东省重点研发计划(重大关键技术)项目(2016ZDJS07A21)

[第一作者] 石亮,在读硕士,从事中药药理与毒理研究,Tel:0531-82949843,E-mail:shiliangbest@163.com

[通讯作者] *孙蓉,博士,研究员,从事中药药理与毒理研究,Tel:0531-82949843,E-mail:sunrong107@163.com

liver depression and spleen deficiency, closely related to clinical disease and suitable for Chinese medicine active discovery and efficacy evaluation. **Method:** The 70 rats were randomly assigned to normal control group; model group I (79.5% simple corn flour plus 20% lard, high fat and low protein feed composed of 0.5% cholesterol; 30% alcohol compound factors for four weeks of modeling), silybin meglumine tablets group I; modified model group II (79.5% simple corn flour plus 20% lard, high fat and low protein feed composed of 0.5% cholesterol; 10% alcohol gavage for 1 week, and 5% alcohol gavage for 3 weeks for modeling), silybin meglumine tablets group II; modified model group III (89.5% simple corn flour plus 10% lard, high fat and low protein feed composed of 0.5% cholesterol; 10% alcohol gavage for 1 week, and 5% alcohol gavage for 3 weeks for modeling), and silybin meglumine slice group III according to their body weight, $n = 10$ in each group. The rats in Silibin meglumine tablets group I, group II and group III received the treatment of silibin meglumine tablets at the dose of $0.108 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ by gavage administration. During the experimental period, rats in all the other groups except the normal control group received unexpected emotional stimuli. Their general state was observed daily in every group; the clinical syndrome of liver cirrhosis (liver stagnation and spleen deficiency syndrome) was simulated; the syndrome performance suitable for the rats were analyzed and put forward; and the scores were given according to the standard every day. In addition, the body weight of the rats, daily food intake and daily water intake were recorded. The contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), hyaluronic acid (HA), procollagen III (PC III), type collagenase IV (IV-C), adenosine deaminase (ADA), monoamine oxidase (MAO) and A/G in serum were detected in eyeball blood at the end of experiment; and histopathological changes of the liver tissues were observed with htoxylin-easin (HE) staining. **Result:** No rats died in the normal group, and the nutrition status was good. Water intake and food intake were decreased in model group, with slow weight gain, rough hair, apathetic, and toenail bleeding in individual mice. Four mice died in model group I; three mice died in model group II, and no death in model group III. As compared with the normal group, the serum ALT, AST, HA, PC-III, IV-C, ADA and MAO levels were significantly higher; A/G was significantly lower; and visceral brain ratio and syndrome scores were increased significantly in model group ($P < 0.01$). As compared with the model group I, serum ALT, AST, HA, PC-III, IV-C, ADA and MAO levels were significantly lower; A/G was significantly higher; and visceral brain ratio and syndrome scores were decreased significantly in various treatment groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The morphological examination of the liver tissues showed false lobule formation in model group, with typical periportal lesions, but the lesions showed different degrees of improvement in the positive drug group. **Conclusion:** The modified cirrhosis rat models with a low mortality can be induced in a short time and animal status was similar to clinical syndrome performance of patients. Therefore, the rat models were suitable for the activity discovery, efficacy evaluation and mechanism investigation for cirrhosis, and also can be used in the research of correlation between the prescription and syndrome.

[**Key words**] modified high fat; hepatic cirrhosis; silybin meglumine tablets; alcohol and mood; liver stagnation and spleen deficiency

肝硬化是由各种原因引起的肝脏慢性、进行性的弥漫性炎性改变或坏死,一直是威胁人类健康的严重疾病之一,目前尚无理想的治愈方式^[1]。当前,肝硬化模型(cirrhosis model, CM)制备存在着成模时间较长,死亡率较高以及成模表现与临床吻合度不高等缺陷^[2]。肝硬化属于中医的癥瘕、积聚、臌胀等范畴^[3],肝郁脾虚型是肝硬化中医较常见证型,其病机转变主要为“乙醇刺激”、“饮食不当”、“情志抑郁”等导致肝脏出现问题,而肝病既

久,必传脾胃,肝郁失于疏泄,脾虚不能制水,脘腹膨大,纳谷难化,溲少便溏,丹溪所谓“单腹臌乃脾虚之虚”^[4]。

对此,在既往造模方法基础上,结合实验室大鼠脂肪肝(肝郁脾虚证)模型的复制方法^[5],并增加情绪刺激,借鉴“从症辨证”的中医辨证思维,将中医辨证与西医辨病相结合,在病证结合、以病统证的基础上模拟临床发病过程中“乙醇刺激”、“饮食不当”、“情志抑郁”等造成的体内多维度、多层级的病

理损伤过程,通过对“乙醇刺激”、“饮食不当”、“情志抑郁”造模条件的优选,结合中医证候指标评价、肝硬化相关血指标变化和病理组织学观察,以期建立一个适宜于临床方证相关性研究和中药复方活性发现、药效评价及机制探讨的肝硬化(肝郁脾虚证)动物模型,为肝硬化的中医药现代研究提供研究工具。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,全雄,体重 180~220 g,适龄、健康,购于山东大学动物中心,合格证号 SCXK(鲁)2013-0009,动物使用许可证号 SYXK(鲁)2013-0001。实验均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则,实验动物饲料(鼠),合格证号 SCXK(鲁)2013-0014。

1.2 物及试剂 食用乙醇为市售红星二锅头(52°),本实验用 10% 和 5% 乙醇由食用乙醇与蒸馏水稀释成;胆固醇购自上海源聚生物科技有限公司;猪油为市售;猪血清(上海忆欣生物科技有限公司,批号 20131214);水飞蓟宾葡甲胺片(湖南千金协力药业有限公司,批号 20140201,成人日用量最高为 600 g,大鼠给药量按以等效剂量折算系数折算后的两倍量给药,为 0.108 g·kg⁻¹);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),血清透明质酸(HA),Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ),IV 型胶原(IV-C),腺苷脱氨酶(ADA),单胺氧化酶(MAO)等检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20141231,20141231,20141231,20141231,20141231,20141231)。

1.3 仪器 UV-2600 型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];Multiskan Go-1510 型全波长酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];AL104 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];TDZ5-WS 型台式低速离心机,DZKM-S-6 型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂)。

2 方法

2.1 实验准备 实验前制作含有 79.5% 单纯玉米粉加 20% 猪油,0.5% 胆固醇和含有 89.5% 单纯玉米粉加 10% 猪油,0.5% 胆固醇的 2 种高脂低蛋白饲料备用;准备经过滤、灭菌处理的新鲜猪血清备用;大鼠购回后在新环境中适应性饲养 3 d,充足供应食物和饮水,每笼饲养 5 只。

2.2 动物分组、给药及处理 70 只大鼠按体重随机分为正常组、模型 I 组、水飞蓟宾葡甲胺片 I 组、改良模型 II 组、水飞蓟宾葡甲胺片 II 组、改良模型 III

组、水飞蓟宾葡甲胺片 III 组,共 7 组,每组 10 只,除正常组外各组大鼠腹腔注射(ip)经过滤、灭菌处理的新鲜猪血清 0.5 mL,每周 2 次。模型 I 组、水飞蓟宾葡甲胺片 I 组以由 79.5% 单纯玉米粉加 20% 猪油,0.5% 胆固醇制成的高脂低蛋白饲料饲养,30% 乙醇灌胃;模型 II 组、水飞蓟宾葡甲胺片 II 组以由 79.5% 单纯玉米粉加 20% 猪油,0.5% 胆固醇制成的高脂低蛋白饲料饲养,10% 乙醇灌胃 1 周,5% 乙醇灌胃 3 周;模型 III 组、水飞蓟宾葡甲胺片 III 组以由 89.5% 单纯玉米粉加 10% 猪油,0.5% 胆固醇制成的高脂低蛋白饲料饲养,10% 乙醇灌胃 1 周,5% 乙醇灌胃 3 周;正常组以正常饲料饲养,灌胃蒸馏水;水飞蓟宾葡甲胺片各组给予水飞蓟宾葡甲胺片。实验期间除正常组外其余各组采用昼夜颠倒、夹尾、束缚、倾斜鼠笼和水平振荡对其进行情绪刺激,每天随机选取一种刺激,且相邻 2 d 不重复,使大鼠不能预料刺激的发生。连续造模 4 周,观察 0,1,7,14,21,28 d 动物一般情况,包括精神状态、活动情况、皮毛光泽度、体重、食水量等,依据中医肝硬化证型特点,结合肝硬化(肝郁脾虚证)临床表现与实验过程中大鼠表现而制备人体-肝硬化(肝郁脾虚证)诊疗对照表(表 1),并制备适用于肝郁脾虚证特点的肝硬化模型大鼠证候积分评价量表(表 2),对大鼠进行证候积分并进行体重、日食日水量的记录,第 28 天摘眼球取血,解剖取肝、脾、胸腺,分别称量各脏器湿重,另取部分肝组织 10% 甲醛溶液固定,苏木素-伊红(HE)染色制作病理切片,观察病理结构的改变。把鼠头放在冰盘上,用组织剪刀剪掉大鼠枕骨与顶骨,从小脑处将脑组织向上推起,取出整个脑组织,称量脑组织湿重。

2.3 观察指标 ①大鼠体重,肝脏、脾脏和胸腺脏

表 1 人体-大鼠肝硬化(肝郁脾虚证)诊疗标准与对应证候表现
Table 1 Human liver cirrhosis rats (liver stagnation and spleen deficiency) and syndrome diagnosis standard performance

证候	人体证候标准	大鼠证候表现
1	上腹肿块胀闷不适,进食后胀甚	腹部肿胀
2	消瘦乏力,倦怠短气,腹胀纳少	日食水量下降,身型消瘦,体重增长缓慢,精神倦怠
3	大便溏数,小便黄短	粪便稀溏不成形,小便色黄
4	腹水、黄疸	肝部腹水,皮毛枯黄,毛发脱落
5	下肢浮肿	尾巴出现瘀斑
6	舌质胖、舌苔白	眼睛无神,眼睛呈现暗红乃至深红色

表 2 适用于肝郁脾虚证特点的肝硬化模型大鼠证候积分评价量

Table 2 Rat model of cirrhosis syndrome integral evaluation for liver stagnation and spleen deficiency syndrome characteristics scale

证候项目	正常(0分)	轻度异常(1分)	中度异常(2分)	明显异常(3分)
精神状态	活动迅速,眼光有神	懒动,自发活动减少	精神倦怠	逃避,攻击行为明显减少
呼吸	无明显变化	轻微急促	急促	减少
眼睛	红亮有神	淡红	深红	暗红
尾部瘀斑	无瘀斑	轻度瘀斑	中度瘀斑	重度瘀斑
腹部	无变化	稍肿胀	中度肿胀	明显肿胀
毛	白色柔顺,细密有光泽	部分变黄色,稍乱,显干燥	大部分黄色,杂乱,干燥	枯黄,有脱毛现象
食水	无变化	略有减少	明显减少	不进食水
粪便	大便成形,粪质柔软	略有稀溏,少部分不成形	明显稀溏,部分不成形	稀溏,完全不成形

器系数。②检测血中 AST, ALT, HA, PC III, IV-C, ADA, MAO 水平。③肝组织形态学观察。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料先进行正态检验,正态分布资料采用单因素方差分析,非正态分布资料先转换成正态分布再用单因素方差分析,进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠体重变化情况 实验期间,正常组大鼠动度、反应、毛色、饮食进水、二便及体重变化未见明显异常且无一死亡。各模型组大鼠行为慵懶、体

重增长缓慢、毛质粗糙、精神萎靡、食欲减退、个别老鼠有急躁攻击行为,模型 I 组、改良模型 II 组、改良模型 III 组死亡数分别为 4, 3, 0 只;体重变化模型 I 组、改良模型 II 组、改良模型 III 组与正常组比较分别

在第 7, 14, 21, 28 天经统计学处理有不同程度的显著降低($P < 0.01$)。见表 3。
3.2 各组大鼠日食、日水量变化情况 实验结果表明,在造模过程中,正常组的大鼠日食量、日水量增长正常,各模型组与正常组比较日食、日水量分别

表 3 各组大鼠体重变化情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Changes of body weight of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	第 0 天	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
正常	188.6 ± 8.5	198.3 ± 8.4	237.4 ± 8.5	287.7 ± 8.5	328.1 ± 8.5	371.9 ± 8.5
模型 I	186.8 ± 9.1	193.3 ± 9.1	214.0 ± 9.1 ²⁾	232.3 ± 9.1 ²⁾	247.7 ± 9.1 ²⁾	262.3 ± 9.1 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 I	182.2 ± 14.9	187.5 ± 14.9	217.9 ± 14.9	246.1 ± 14.9 ³⁾	270.8 ± 14.9 ⁴⁾	293.5 ± 14.9 ⁴⁾
改良模型 II	200.6 ± 10.9	207.7 ± 10.9	231.8 ± 11.0 ^{1,3)}	254.2 ± 11.0 ^{2,4)}	271.3 ± 11.0 ^{2,4)}	287.7 ± 11.0 ^{2,4)}
水飞蓟宾葡甲胺片 II	192.2 ± 12.2	202.6 ± 18.0	235.6 ± 18.0 ³⁾	266.2 ± 18.0 ⁴⁾	292.3 ± 18.0 ⁴⁾	316.9 ± 18.0 ⁴⁾
改良模型 III	200.5 ± 11.0	212.7 ± 14.3	239.0 ± 15.0 ^{1,3)}	265.7 ± 15.0 ^{2,4)}	286.1 ± 15.0 ^{2,4)}	309.5 ± 23.0 ^{2,4)}
水飞蓟宾葡甲胺片 III	194.4 ± 18.0	201.1 ± 12.0	238.7 ± 12.2 ³⁾	274.2 ± 12.2 ⁴⁾	304.4 ± 12.2 ⁴⁾	333.5 ± 12.2 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,与模型 I 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4 ~ 9 同)。

表 4 各组大鼠日食量变化情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Changes of daily food intake of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	第 0 天	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
正常	22.4 ± 0.3	24.0 ± 0.1	25.0 ± 0.2	24.5 ± 0.3	26.0 ± 0.3	27.8 ± 0.3
模型 I	22.4 ± 0.5	23.2 ± 0.2	20.3 ± 0.3 ²⁾	17.6 ± 0.1 ²⁾	18.6 ± 0.2 ²⁾	19.1 ± 0.1 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 I	22.3 ± 0.3	22.4 ± 0.3	21.0 ± 0.4 ²⁾	18.9 ± 0.3 ²⁾	20.4 ± 0.4 ^{2,3)}	21.4 ± 0.2 ^{2,3)}
改良模型 II	22.5 ± 0.4	23.1 ± 0.4	20.4 ± 0.2 ²⁾	18.0 ± 0.2 ²⁾	19.2 ± 0.1 ²⁾	19.4 ± 0.2 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 II	23.0 ± 0.3	23.0 ± 0.1	21.7 ± 0.2 ²⁾	19.6 ± 0.1 ^{2,3)}	21.1 ± 0.3 ^{2,3)}	22.0 ± 0.2 ^{2,3)}
改良模型 III	22.8 ± 0.8	23.6 ± 0.1	21.0 ± 0.1 ²⁾	18.6 ± 0.1 ²⁾	20.0 ± 0.2 ²⁾	20.8 ± 0.1 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 III	22.6 ± 0.1	23.7 ± 0.3	22.6 ± 0.2 ^{1,3)}	20.9 ± 0.2 ^{2,3)}	22.5 ± 0.1 ^{2,4)}	23.5 ± 0.3 ^{2,4)}

表 5 各组大鼠日水量变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Daily water changes of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	第 0 天	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
正常	31.7 ± 0.6	35.0 ± 0.4	36.1 ± 0.4	37.4 ± 0.7	42.0 ± 0.8	44.8 ± 0.2
模型 I	32.6 ± 0.2	34.2 ± 0.1	28.4 ± 0.1 ²⁾	26.6 ± 0.1 ²⁾	28.6 ± 0.2 ²⁾	31.5 ± 0.4 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 I	32.4 ± 0.4	33.3 ± 0.3	29.8 ± 0.2 ²⁾	27.7 ± 0.2 ²⁾	31.3 ± 0.3 ²⁾	33.3 ± 0.1 ²⁾
改良模型 II	32.4 ± 0.3	33.8 ± 0.8	28.8 ± 0.4 ²⁾	27.2 ± 0.2 ²⁾	29.3 ± 0.0 ²⁾	32.3 ± 0.6 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 II	31.7 ± 0.9	33.6 ± 0.1	30.4 ± 0.6 ²⁾	28.4 ± 0.2 ²⁾	31.7 ± 0.7 ^{2,3)}	34.1 ± 0.2 ^{2,3)}
改良模型 III	31.7 ± 0.8	33.3 ± 0.2	29.6 ± 0.2 ²⁾	27.8 ± 0.4 ²⁾	30.3 ± 0.7 ²⁾	33.2 ± 0.3 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 III	31.9 ± 0.1	33.8 ± 0.5	31.4 ± 0.5 ¹⁾	29.4 ± 0.5 ^{2,3)}	32.9 ± 0.3 ^{2,4)}	35.9 ± 0.3 ^{2,4)}

3.3 各组大鼠证候积分变化情况 在 28 d 实验期内,正常组大鼠活动正常,毛色光亮、眼睛有神,未见粪尿的异常改变。各模型组大鼠呈现不同程度的行为倦殆、欠活泼,毛色无光、稀松、掉毛,腹部肿胀、眼睛暗淡、尾部瘀斑等,且可见到不同程度的尿液浑浊、粪便稀溏情况。使用适用于肝郁脾虚证特点的肝硬化模型大鼠证候积分评价量表对大鼠进行积分,结果显示各模型组与正常组比较自第 7 天开始

出现显著性升高 ($P < 0.01$)。见表 6。

3.4 各组大鼠脏脑比值情况 正常组大鼠脏脑比值均在正常范围内;各模型组与正常组比较均有显著性升高 ($P < 0.01$),说明各模型组造模均成功;与模型 I 组比较,各阳性药组均有不同程度的改善;水飞蓟宾葡甲胺片 III 组与正常组比较各脏脑比值均无显著性差异,提示改良模型 III 组较稳定可靠,能较好的模拟临床肝硬化的证候表现。见表 7。

表 6 各组大鼠证候积分变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Changes of syndrome integral in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
正常	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.3	0
模型 I	0.4 ± 0.2	1.0 ± 0.7 ²⁾	2.0 ± 0.7 ²⁾	3.2 ± 0.6 ²⁾	4.5 ± 0.7 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 I	0.3 ± 0.5	0.6 ± 0.5 ^{2,3)}	1.7 ± 0.5 ^{2,3)}	2.2 ± 0.6 ^{2,4)}	2.6 ± 0.5 ^{2,4)}
改良模型 II	0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.5 ²⁾	1.8 ± 0.6 ²⁾	3.1 ± 0.6 ²⁾	4.0 ± 0.7 ^{2,3)}
水飞蓟宾葡甲胺片 II	0.4 ± 0.4	0.5 ± 0.5 ^{2,3)}	1.5 ± 0.5 ²⁾	1.8 ± 0.8 ^{2,4)}	1.8 ± 0.6 ^{2,4)}
改良模型 III	0.3 ± 0.5	0.7 ± 0.5 ²⁾	1.5 ± 0.5 ^{2,3)}	2.7 ± 0.7 ^{2,3)}	3.6 ± 0.5 ^{2,3)}
水飞蓟宾葡甲胺片 III	0.3 ± 0.3	0.6 ± 0.5 ^{2,3)}	1.3 ± 0.5 ^{2,4)}	1.5 ± 0.5 ^{2,4)}	1.4 ± 0.5 ^{2,4)}

注:第 0 天均为 0 分。

表 7 各组大鼠脏脑比值的情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Visceral brain ratio of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	肝/脑	脾/脑	胸腺/脑
正常	608.2 ± 47.7	46.09 ± 3.47	30.17 ± 2.47
模型 I	798.3 ± 24.8 ²⁾	63.05 ± 4.51 ²⁾	39.85 ± 4.32 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 I	674.9 ± 33.4 ^{2,4)}	48.90 ± 6.46 ^{1,4)}	31.59 ± 2.82 ^{1,4)}
改良模型 II	756.8 ± 83.3 ^{2,3)}	61.11 ± 4.37 ²⁾	38.45 ± 3.76 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 II	636.2 ± 75.5 ^{2,4)}	47.05 ± 4.98 ^{1,4)}	29.03 ± 3.94 ^{1,4)}
改良模型 III	736.5 ± 46.3 ^{2,3)}	52.78 ± 2.75 ²⁾	36.59 ± 3.89 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 III	608.1 ± 101.9 ⁴⁾	45.02 ± 3.19 ⁴⁾	28.30 ± 1.64 ⁴⁾

3.5 实验各组大鼠血中指标变化情况 正常组各指标均在正常范围内;与正常组比较,实验各组

ALT, AST, HA, PC III, IV-C, ADA, MAO, A/G 水平均有极显著性差异;各模型组与正常组相比均有显著

性升高 ($P < 0.01$), 说明各模型组造模均成功; 水飞蓟宾葡甲胺片 III 组与模型 I 组相比各指标均有显著性降低 ($P < 0.01$), 提示阳性药水飞蓟宾葡甲胺片

能够显著改善肝硬化模型大鼠的生化指标水平, 改良模型 III 组符合预期要求, 贴近中医临床, 模型可靠。见表 8, 9。

表 8 各组大鼠 ALT, AST, HA 和 PC III 变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 8 Changes of ALT, AST, HA and PC III in different groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$	HA/ $\mu g \cdot L^{-1}$	PC III/ $\mu g \cdot L^{-1}$
正常	24.86 ± 10.07	104.31 ± 38.53	30.46 ± 2.01	2.31 ± 0.41
模型 I	131.55 ± 19.04 ²⁾	219.41 ± 35.78 ²⁾	43.11 ± 5.68 ²⁾	4.05 ± 0.62 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 I	75.58 ± 18.40 ^{2,4)}	163.63 ± 40.92 ^{2,4)}	36.39 ± 4.05 ^{2,3)}	3.11 ± 0.80 ^{1,3)}
改良模型 II	110.47 ± 11.87 ^{2,3)}	202.68 ± 51.05 ²⁾	40.58 ± 5.72 ²⁾	3.81 ± 0.68 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 II	66.10 ± 7.41 ^{2,4)}	147.58 ± 26.25 ^{2,4)}	34.64 ± 5.07 ^{1,4)}	2.75 ± 0.35 ^{1,4)}
改良模型 III	97.20 ± 26.13 ^{2,3)}	180.69 ± 41.61 ^{2,3)}	39.86 ± 3.33 ²⁾	3.65 ± 0.76 ^{2,3)}
水飞蓟宾葡甲胺片 III	59.14 ± 13.20 ^{2,4)}	128.27 ± 28.35 ^{2,4)}	31.80 ± 2.59 ^{2,4)}	2.55 ± 0.39 ^{2,4)}

表 9 各组大鼠 IV-C, ADA, MAO 和 A/G 变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 9 Changes of IV-C, ADA, MAO and A/G in different groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	IV-C/ $\mu g \cdot L^{-1}$	ADA/ $U \cdot mL^{-1}$	MAO/ $U \cdot mL^{-1}$	A/G
正常	5.32 ± 0.72	24.57 ± 3.56	18.07 ± 0.72	1.48 ± 0.54
模型 I	8.50 ± 0.89 ²⁾	41.55 ± 4.06 ²⁾	42.11 ± 2.88 ²⁾	0.94 ± 0.25 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 I	6.25 ± 1.16 ¹⁾	31.80 ± 4.62 ¹⁾	27.24 ± 2.54 ^{2,4)}	1.08 ± 0.22 ¹⁾
改良模型 II	8.15 ± 1.40 ²⁾	38.44 ± 5.02 ²⁾	37.64 ± 3.45 ²⁾	1.02 ± 0.20 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 II	5.91 ± 1.68 ^{1,3)}	29.68 ± 2.47 ^{1,4)}	24.26 ± 2.29 ^{2,4)}	1.18 ± 0.25 ^{1,3)}
改良模型 III	7.97 ± 2.13 ²⁾	37.52 ± 3.71 ²⁾	33.90 ± 4.04 ²⁾	1.11 ± 0.31 ²⁾
水飞蓟宾葡甲胺片 III	5.79 ± 1.09 ⁴⁾	28.07 ± 3.96 ⁴⁾	21.24 ± 2.37 ⁴⁾	1.25 ± 0.33 ⁴⁾

3.6 各组大鼠肝组织形态学观察 观察各组大鼠肝脏病理组织变化图发现, 正常组大鼠肝小叶结构清晰完整, 肝细胞条索状以肝小叶中央静脉为中心向周围呈放射状排列, 肝窦明显, 肝细胞体积较大, 核圆居中, 可见核仁, 胞浆丰富, 汇管区清晰可辨, 无明显的炎细胞浸润。模型 I 组、改良模型 II 组、改良模型 III 组肝组织内可见纤维增粗紊乱, 肝小叶结构破坏, 肝细胞索排列紊乱, 胶原纤维明显增生, 破坏的肝小叶和部分增生的肝细胞团被呈较宽条索状的纤维分割包绕, 有假小叶形成, 且汇管区出现典型的病变, 证明肝硬化造模成功。水飞蓟宾葡甲胺片 I 组、水飞蓟宾葡甲胺片 II 组、水飞蓟宾葡甲胺片 III 组肝组织内肝小叶结构基本完整, 肝索排列相对整齐, 胶原纤维增生较少, 未见假小叶结构。见图 1。

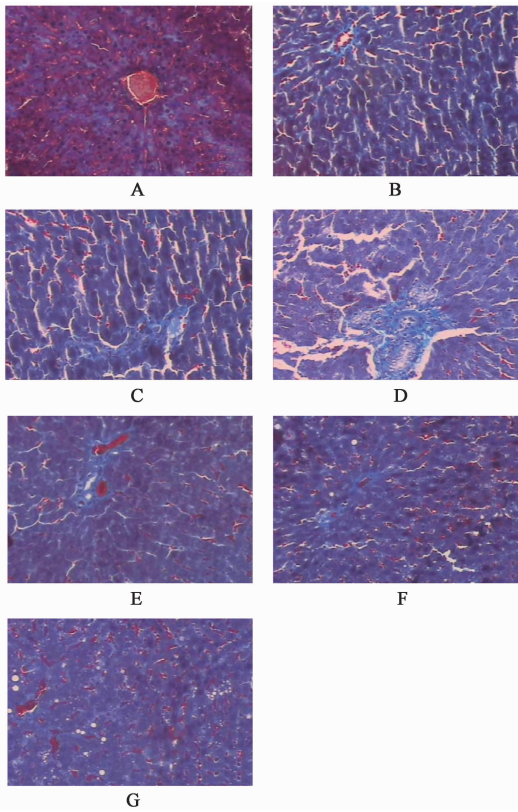
4 讨论

肝硬化为现代医学病名, 据其临床表现及病理特点, 一般将其归属于中医的“癥瘕”、“积聚”、“臌胀”等范畴。坚硬不移动, 痛有定处为“癥”, 聚散无常, 痛无定处为“瘕”, 多因脏腑失调, 气血阻滞, 瘀

血内结引起。“积聚”是腹内结块, 或痛或胀的病证。“臌胀”是指腹部胀大如鼓的一类病证, 临床以腹大胀满, 绷急如鼓, 皮色苍黄, 脉络显露为特征。《灵枢·水胀》篇记载“腹胀, 身皆大……色苍黄, 腹筋起, 此其候也”, 《医门法律·胀病论》说:“癥瘕、痞块, 即是胀病之根, 日积月累, 腹大如箕斗, 腹大如瓮是名单腹胀”^[6]。

中医将肝硬化划为肝郁脾虚证、肝胆湿热证、肝热血瘀证、脾虚湿困证和肝肾阴虚证 5 个证型, 肝郁脾虚型为临床常见证型, 主要表现为上腹肿块胀闷不适, 消瘦乏力, 倦怠短气, 腹胀纳少, 甚则出现腹水、黄疸、下肢浮肿等症状, 传统中医学认为其基本病机是正衰邪盛, 湿热未尽兼血瘀, 肝郁脾肾气血虚^[7]。病因主要为情志抑郁, 肝气不舒, 导致脉络受阻, 血行不畅, 气滞血瘀; 或酒食不节、恣食肥甘厚味, 导致脾胃受损, 脏腑失和而湿浊内停, 壅阻气机。治法应采用固本扶正, 后行祛邪, 攻补兼施, 行健脾益气, 活血柔肝, 化瘀利水之法^[8]。

HA 由间质细胞产生, 主要由肝内皮细胞摄取



A. 正常组; B. 模型 I 组; C. 改良模型 II 组; D. 改良模型 III 组; E. 水飞蓟宾葡甲胺片 I 组; F. 水飞蓟宾葡甲胺片 II 组; G. 水飞蓟宾葡甲胺片 III 组

图1 实验各组肝脏病理组织变化(HE, ×400)
Fig.1 Pathological changes of liver tissue in experimental group (HE, ×400)

并分解代谢,可评价肝脏损伤程度^[9-10],PCⅢ是诊断早期肝硬化的重要指标,具有重要临床意义^[11]。ADA是核苷酸代谢关键酶,在肝胆类疾病中,病人血清中ADA活性会升高^[12]。IV-C在肝纤维化发生时明显升高^[13]。MAO广泛存在于肝脏、肾、胃等器官组织的线粒体膜外,MAO活性检测可反映肝细胞损伤、坏死、纤维化等有和无程度^[14]。

为了更好地开展现代中医药研究,在现有CM基础上,模拟临床发病过程中“乙醇刺激”、“饮食不当”、“情志抑郁”等造成的体内多维度、多层级的病理损伤过程,通过改良高脂饲料比例、适当调整乙醇浓度和灌胃方式,采用水飞蓟宾葡甲胺片对动物模型进行药物治疗反证,并结合中医证候指标及选择与肝硬化发生、发展及预后密切相关的HA,PCⅢ,ADA,IV-C,MAO进行评价和反向验证;以确认造模成功。

符合中医病证特点、与临床病证特征基本一致的中医证候动物模型不仅是研究中医病证本质的工具和前提,也是研发创新中药的有力手段。因此,本模型旨在中医理论指导下、以临床表现为背景,结合中医病因病机,通过一般情况、中医证候指标、实验指标及中药反证等方面评价,以较好地模拟临床肝硬化(肝郁脾虚证)的临床特征,为进一步开展肝硬化(肝郁脾虚证)的“证”本质研究和具有中药特色的创新药发现提供实验模型。

[参考文献]

[1] 徐安书. 肝硬化实验动物模型的研究现状[J]. 医学综述, 2010, 16(7): 1046-1048.
 [2] 陈学新, 潘华, 郑月梅, 等. 肝硬化动物模型的研究进展[J]. 宁夏医科大学学报, 2009, 31(5): 696-698.
 [3] 余晓珂, 冀爱英. 肝炎肝硬化中医证型与相关指标的研究进展[J]. 中医学报, 2008, 23(6): 95-97.
 [4] 王超. 不同时期肝硬化形态学改变与中医证候分布的关系[D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
 [5] 孙晓倩, 孙蓉. 大鼠脂肪肝肝郁脾虚证模型的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10): 92-98.
 [6] 祝海娟, 王学智. 肝硬化的中医辨证论治研究进展[J]. 青海医药杂志, 2013, 43(12): 77-80.
 [7] 陈超, 王希君. 复合因素构建大鼠肝硬化模型与益舒软肝丸的干预[J]. 中国组织工程研究, 2007, 11(47): 9491-9494.
 [8] 石亮, 孙蓉. 肝硬化动物模型的研究进展与中药药效评价思考[J]. 中国药物警戒, 2016, 13(1): 32-35.
 [9] 龙爱华, 王树槐, 陈瑾, 等. 抑肝健脾复方对肝纤维化大鼠HA、PCⅢ、IV-C、HyP的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(6): 30-31.
 [10] 赵勇, 赵武民, 黄宗海, 等. 血清透明质酸、层粘连蛋白及IV型胶原在肝纤维化及肝癌中的变化分析[J]. 西北国防医学杂志, 2001, 22(1): 60-62.
 [11] 童叶华, 叶振斌, 曲春生, 等. 血清透明质酸、Ⅲ型前胶原、IV型胶原和层粘连蛋白检测对肝病的诊断价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(11): 1666.
 [12] 高玲, 孙艳虹, 吴杰. 血清ADA和IV-C检测在肝脏疾病中的诊断意义[J]. 中国医师杂志, 2005, 7(5): 689-690.
 [13] 谢勇. 甲状腺肿块的超声诊断与病理对照分析[J]. 湖北医药学院学报, 2003, 22(3): 170-171.
 [14] 王彩凤, 齐发梅, 袁秀梅. 血清单胺氧化酶测定在肝脏疾病诊断中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(6): 1617-1618.

[责任编辑 周冰冰]