

狼毒大戟配伍大枣对诱导肝硬化大鼠的抵抗作用及机制

李文静¹, 兴桂华¹, 刘军¹, 徐天娇¹, 范松婕¹, 王玉春¹, 马春梅², 洪博^{1*}

(1. 齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江农垦职业学院, 哈尔滨 150025)

[摘要] **目的:**研究狼毒大戟配伍大枣对肝硬化腹水大鼠模型的抵抗作用。**方法:**采用苯巴比妥联合四氯化碳(CCl₄)法建立肝硬化腹水大鼠模型,将大鼠随机分为正常组、肝硬化腹水模型组、狼毒大戟组、狼毒大戟配伍大枣组,每组各10只。观测大鼠水代谢及苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理变化,用免疫组织化学法测定I型胶原(Collagen I),III型胶原(Collagen III),纤维粘连蛋白(Fibronectin, FN),层粘连蛋白(Laminin, LN),结蛋白(Desmin)在肝组织中的表达。**结果:**与模型组比较,狼毒大戟组及狼毒大戟配伍大枣组大鼠24 h尿量明显增多($P < 0.01$),腹腔积液显著减少($P < 0.01$)。给狼毒大戟配伍大枣组大鼠肝脏纤维间隔及变性程度较模型组有明显改善。免疫组化结果显示,肝硬化模型组及狼毒大戟治疗组,I,III型胶原及纤维连接蛋白的含量均显著高于正常组($P < 0.01$),模型组LN和Desmin的含量显著高于正常组($P < 0.01$),狼毒大戟配伍大枣组能显著降低LN和Desmin的积分吸光度IA。**结论:**狼毒大戟配伍大枣可明显改善肝硬化腹水大鼠肝硬化病理进程:增加尿量,促进腹水排泄,其作用机制可能与狼毒大戟配伍大枣对Collagen I, Collagen III, FN, LN, Desmin的调控有关。

[关键词] 狼毒大戟; 大枣; 肝硬化腹水; 免疫组化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0117-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210117

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1027.022.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:27

Resistance Effect and Mechanism of Radix of *Euphorbia fisheriana* Combined with *Jujubae Fructus* on Cirrhosis in Rats

LI Wen-jing¹, XING Gui-hua¹, LIU Jun¹, XU Tian-jiao¹, FAN Song-jie¹, WANG Yu-chun¹,
MA Chun-mei², HONG Bo^{1*}

(1. School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China;
2. Heilongjiang Nongken Vocational College, Harbin 150025, China)

[Abstract] **Objective:** To research the resistance effect of radix of *Euphorbia fisheriana* (REF) combined with *Jujubae Fructus* (JF) on liver cirrhosis ascites in rat model. **Method:** Phenobarbital combined with CCl₄ method was used to establish the rat live cirrhosis ascites model. The rats were divided into 4 groups, namely normal group, model group, REF group, and REF combined with JF group, with 10 rats in each group. Water metabolism and liver pathological changes in 4 groups were observed by HE staining method. Expressions of Collagen I, Collagen III, Fibronectin (FN), Laminin, Desmin in different groups of rat liver issues were determined by immunohistochemical method. **Result:** Compared with the model group, the REF group and the REF combined with JF group significantly increase 24 h urine volume ($P < 0.01$), and reduced peritoneal seroperitoneum ($P < 0.01$). Compared with the model group, the treatment groups significantly improved liver fiber interval and degeneration degree. The results of immunohistochemistry showed that the contents of Collagen I,

[收稿日期] 20170609(002)

[基金项目] 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(7UNPYSCT-201611)

[第一作者] 李文静, 博士, 讲师, 从事中药质量标准研究, Tel:0452-2663159, E-mail:lwj022325@163.com

[通讯作者] *洪博, 博士, 副教授, 从事中药配伍机制研究, Tel:0452-2663159, E-mail:bohong200630174@163.com

Collagen III and FN in liver cirrhosis model group and REF group were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.01$). The contents of LN and Desmin in the model group were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.01$), and the treatment group can significantly decreased integral absorbance (IA). **Conclusion:** The combination of REF and JF can obviously improve the pathological process of cirrhotic ascites in rats, increase the amount of urine, and promote the excretion of ascites. The mechanism may be related to the regulatory effect of REF combined with JF on Collagen I, Collagen III, FN, LN, Desmin factors.

[Key words] radix of *Euphorbia fisheriana* (REF); Jujubae Fructus (JF); liver cirrhosis ascites; immunohistochemistry

大多数的慢性肝病具有肝炎-肝纤维化-肝硬化-肝癌的病理进程^[1-3], 本文从防治肝硬化的角度考虑, 研究干预肝硬化病程的中药。肝硬化腹水是肝硬化失代偿期常见临床表现之一^[4-6]。目前现代医学对硬化的治疗着重于缓解病情, 包括抗纤维化及调节免疫等, 对腹水的策略是调节水、钠平衡, 纠正循环功能紊乱^[7-10]。中医药在这方面具有较大的优势和潜力, 对肝硬化腹水治疗能充分发挥整体观念和辩证论治的特色, 方法主要有健脾利水法、攻逐水饮法以及疏肝理气等, 旨在控制腹水、延缓病程进展等方面^[11-14]。狼毒大戟性苦寒, 有毒, 主治水腫、腹脹, 痰飲积聚, 为峻下逐水药, 有保护肝细胞和促进肝功能恢复等多种药理功效^[15-17]。临床上常配伍大枣使用治疗肝癌、乳腺癌等肿瘤性疾病, 大枣甘缓和缓中, 能缓和狼毒大戟峻猛的药性, 减其毒性。

已有相关文献报道与肝纤维化有关的因子: 纤维粘连蛋白 (Fibronectin, FN) 是主要的黏附分子, 在细胞、纤维间质间的正常连接以及组织的炎症、修补、纤维化、硬化等过程中起着重要作用^[18]。层粘连蛋白 (laminin, LN) 是一种大分子非胶原性糖蛋白, 肝脏发生纤维化时, LN 的合成与沉积大大增加, 是评价肝纤维化的指标, 并在肿瘤的浸润、转移过程中起重要作用^[19]。结蛋白 (Desmin) 作为大鼠肝星状细胞的标志物^[20], 常被大多数研究者采用, 观察纤维化肝脏中 Desmin 的异常表达。肝脏组织胶原主要是 I, III, IV, V, VI 型胶原, 其中以 I 型胶原 (Collagen I), Collagen III 型为主, I, III 型胶原是肝纤维化、肝硬化时细胞外基质的主要成分^[21-22]。在正常肝脏中, 胶原蛋白约占总蛋白的 5% ~ 10%, 肝组织发生纤维化或硬化时, 胶原蛋白含量可占肝脏蛋白总量的 50%, 并且 Collagen I / Collagen III 增加, 到肝硬化后期该比例可增至 3 倍左右。本课题应用苏木素-伊红 (HE) 染色法和免疫组化法测定 FN, LN, Desmin, Collagen I 和 Collagen III 在肝硬化

大鼠肝脏中的表达, 比较了狼毒大戟和狼毒大戟配伍大枣提取物对肝硬化腹水大鼠的干预作用, 初步探讨狼毒大戟配伍大枣对肝硬化形成过程中的作用机制, 为研发防治肝硬化的中药制剂奠定基础。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 40 只, 雌性, 体重 (200 ± 20) g, 由北京维通利华实验动物公司提供, 合格证号 SCXK(京)2007-0001。动物均喂以标准灭菌鼠饲料, 自由饮水, 用普通饮水瓶饮水。动物房设定室温 20 ~ 22 °C, 湿度 40% ~ 70%。在代谢笼内饲养大鼠 24 h 后进行实验研究, 研究符合齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会标准 (标准号 201714)。

1.2 药物 狼毒大戟 (由本课题组采自齐齐哈尔市), 大枣 (产自新疆和田玉地区), 经齐齐哈尔医学院药学院中药教研室主任郭丽娜教授鉴定为大戟科植物狼毒大戟 *Euphorbia fisheriana* 的干燥根和鼠李科植物枣 *Ziziphus jujube* 的干燥成熟果实。

1.3 试剂 四氯化碳 (CCl₄, 分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司, 批号 20160212); 多力浓香菜籽油 (中国佳格食品有限公司, 批号 20151207); 甲醛 (分析纯, 辽宁泉瑞试剂有限公司, 批号 20160120); 苯巴比妥片 (吉林省神经精神病医院制药厂, 批号 20150474); 无水乙醚 (分析纯, 齐齐哈尔市龙沙区天华化工有限公司, 批号 20160718); 引物 Collagen I (批号 13B113), Collagen III (批号 13CM215), Fibronectin (FN, 批号 153188), Laminin (LN, 批号 152178), Desmin (批号 ZP650BBP50) 均购自武汉博士德生物技术有限公司; 兔抗大鼠 Collagen I (批号 PB0981), Collagen III (批号 PB0125), FN (批号 MK1175), LN (批号 PB0150), Desmin (批号 PB0095) 多克隆抗体, 抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒, DAB 酶底物显色试剂盒, 均购自武汉博士德生物技术有限公司; 软蜡 (深圳市科奇泰化工有限公司, 批号 20150215); 碳酸锂 (分析纯, 成都市科龙化

工试剂厂,批号 20140325);苏木素(上海蓝季科技发展有限公司,批号 20151025);伊红 Y(上海佳伦生物科技有限公司,批号 20151124);中性树胶(上海行知化工有限公司,批号 20160327);二甲苯(汕头市西陇化工厂,批号 20141226)。

1.4 仪器 NIKON-ECLIPSE CI 型显微镜(CCD 成像系统,Nikon 公司),Tissue-Tek TEC 型组织包埋机(日本樱花有限公司),LEICA RM 2235 型轮转式石蜡切片机(德国徕卡有限公司),GZX-9140 MBE 型电热鼓风干燥箱恒温箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),MJ2016 型包埋模具(实验室自制),世泰黏附载玻片(海口市春博生物实验器材厂),盖玻片(上海精轮工业玻璃有限公司),LD4-2A 型常温离心机(北京医用离心机厂),Sartorius BS 223 S 型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),Sartorius 型 pH 计(北京赛多利斯科学仪器有限公司),KAT-DXL-D 型代谢笼(上海同育教学仪器设备制造有限公司)。

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 35% 苯巴比妥液 精密称取羧甲基纤维素钠粉末 50.0 g,置于塑料水桶中,加入蒸馏水 10 L,搅拌均匀即得 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液。精密称取 10 片苯巴比妥片(30 mg/片),测得平均片重为 0.066 56 g。称取苯巴比妥药粉 7.765 3 g,加入至预先配制的混悬液中,边加边搅拌,即得 35% 苯巴比妥液。

2.1.2 CCl₄ 油溶液的制备 精密量取 CCl₄ 溶液(1.0,1.2,1.4,1.6,1.8,2.0 mL)置于 10 mL 量瓶中,菜籽油定容至刻度。

2.1.3 HE 染色及免疫组化试剂配制 4% 甲醛溶液[称取多聚甲醛 4 g,加入 0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲溶液(pH 7.3)100 mL,溶解后保存备用];梯度乙醇(70%,75%,80%,90%,95%乙醇溶液各 100 mL);1% 盐酸乙醇(75%乙醇 99 mL 加入浓盐酸 1 mL 混匀);苏木素(称取硫酸铝钾 50 g,苏木精 2.5 g,碘酸钠 0.25 g,量取无水乙醇 25 mL,加入蒸馏水 500 mL,溶解后避光保存);1% 伊红(称取伊红 Y 1 g,加入 90%乙醇 100 mL,溶解后避光保存);0.01 mol·L⁻¹PBS 缓冲液(pH 7.2~7.4)(称取氯化钠 4.25 g,磷酸氢二钠 3.5 g,磷酸二氢钠 0.25 g,加入蒸馏水 1 000 mL,溶解后 4 ℃保存)。

2.2 动物分组、造模及给药

2.2.1 动物分组 将 40 只健康雄性 Wistar 大鼠随

机分为正常组,肝硬化模型组,狼毒大戟单煎液组及狼毒大戟配伍大枣合煎液组,每组 10 只。分好组的大鼠分别放在不同的鼠笼里进行喂养,每日清晨进行大鼠的喂养(放入鼠粮)、换水,并在适当的时候为各组大鼠换垫料,防止细菌滋生危害大鼠的健康,影响实验结果。

2.2.2 造模^[3] 大鼠至实验室适应 1 周后,正常组给予蒸馏水,其他 3 组大鼠给予 35% 苯巴比妥溶液(第 1 周),诱导 1 周。每周 2 次腹腔注射 10% CCl₄ 油溶液(2~3 周),剂量为 1 mL·kg⁻¹,首次剂量加倍;12% CCl₄ 油溶液(4~5 周);14% CCl₄ 油溶液(6~7 周);16% CCl₄ 油溶液(8~9 周);18% CCl₄ 油溶液(10~11 周);20% CCl₄ 油溶液(12~14 周)。从第 4 周开始,取 2~3 只动物,每隔 2 周取 1 次,对肝脏进行病理检测,观察造模过程肝脏病理动态变化。

2.2.3 药物制备及给药方案 前期预实验结果最终确定,狼毒大戟药材 3 g 加入 1 L 水中浸泡 30 min 后,煎煮 2 h,共 2 次,合并水提液过滤,旋转蒸发仪 70 ℃ 蒸发浓缩成 100 mL;分别称取狼毒大戟药材 3 g 和大枣 50 g,粉碎混合,加入 1 L 水浸泡 30 min 后,煎煮 2 h,共 2 次,合并水提液过滤,旋转蒸发仪 70 ℃ 蒸发浓缩成 100 mL。第 10 周开始给药组分别给予狼毒大戟提取液和狼毒大戟配伍大枣提取液,灌胃给予 1 mL·kg⁻¹的药液,2 次/周。

2.3 成模标准^[3] 与正常组比较①尿量显著减少;②腹腔积液量显著增加;③肉眼观察肝脏,可见再生结节,肝脏组织切片观察纤维间隔互相扩展和连接,分割肝小叶形成假小叶。

2.4 考察指标

2.4.1 状态观察 观察实验动物的精神状态、体重、有无死亡等状况。

2.4.2 肝重指数 (肝脏质量/体重)×100%。

2.4.3 尿量 收集大鼠 24 h 尿液并进行测量。

2.4.4 腹腔积液量 第 14 周末,大鼠乙醚麻醉,沿腹中线剪开 3.0 cm,将规格为 2.5 cm×5.0 cm 已称重滤纸塞入腹腔,3 min 后滤纸充分吸收腹腔积液,取出,称重,计算 2 次质量之差。

2.4.5 肝组织 HE 染色 取 2.0 cm×2.0 cm×0.5 cm 的肝脏组织。于 10% 甲醛溶液中固定。脱水透明程序如下:75%乙醇中放置 1.5 h,85%乙醇中放置 1.5 h,95%乙醇中放置 2.5 h,无水乙醇 I 中放置 30 min,无水乙醇 II 中放置 30 min,最后置于二甲苯 I 中放置 15 min,再至二甲苯 II 中至透明。将

组织埋入溶化的石蜡中,凝固后修整成正方形并切成 4~6 μm 厚度,置于载玻片中。脱蜡程序如下:二甲苯 I 中放置 10 min,二甲苯 II 中放置 10 min,二甲苯 III 中放置 10 min,无水乙醇中放置 2 min,95% 乙醇中放置 2 min,80% 乙醇中放置 2 min,最后用自来水冲洗。染色程序:苏木精中放置 5 min,自来水洗,1% 盐酸乙醇 3 s,自来水洗,置于 PBS 中 2 min,自来水洗,置于伊红中 1 min,最后用自来水洗。脱水、透明程序:95% 乙醇中放置 1 min,100% 乙醇 I 中放置 1 min,100% 乙醇 II 中放置 3 min,二甲苯 I 中放置 5 min,二甲苯 II 中放置 5 min,最后置于二甲苯 III 中 5 min。封片在通风厨中进行:1~2 滴中性树胶置于载玻片上用盖玻片封固,晾干后进行观察。

2.4.6 肝组织免疫组织化学染色步骤 于肝右叶相同的部分距边缘处取肝组织数块,用作免疫组织标本,固定于 4% 中性甲醛溶液中,分析时常规乙醇逐级脱水,石蜡包埋。为使切片紧密黏附且利于脱蜡,需将制备好的切片置于恒温箱 60 $^{\circ}\text{C}$ 中。脱蜡至水:①将切片放于玻片架上,依次浸泡于二甲苯 I 中脱蜡 10 min,二甲苯 II 中脱蜡 10 min,置于 100%,95%,85%,70% 乙醇和蒸馏水中各 3 min,逐级充分水化。湿盒中蒸馏水冲洗、浸泡 2 min;PBS 冲洗、浸泡 5 min。将切片置于 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸缓冲液中,105 $^{\circ}\text{C}$ 高压 10 min,进行热修复,最后取出,室温下自然冷却。使用 PBS 冲洗、浸泡 3 min,3 次;除去 PBS 液,每张切片加 3% H_2O_2 阻断液 1 滴或 50 μL ,室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶活性;PBS 冲洗、浸泡 3 min,3 次。每张切片滴加一抗 50 μL (1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;PBS 冲洗、浸泡 3 min,3 次;除去 PBS 液,每张切片滴加 50 μL 辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵 15 min;PBS 冲洗、浸泡 3 min,3 次;蒸馏水 850 μL ,分别加入即用型 DAB 试剂盒中 A,B,C 试剂各 1 滴,混均后加至玻片上,反应 10 min,PBS 漂洗 3 min,2 次;苏木精复染 5 min,自来水漂洗;上行梯度乙醇脱水,并于二甲苯中 2 次进行透明,树胶封片并观察、拍照。

2.4.7 狼毒大戟配伍大枣对大鼠肝组织中 Collagen I, Collagen III, FN, LN, Desmin 表达的测定 以细胞间或细胞胞质、胞核内出现棕黄色物质为阳性结果。随机选取视野,采用倒置荧光显微镜图像采集系统进行采集、拍照。每张切片选取四周及中央区域视野对染色结果进行量化,采用 Image-Pro Plus 6.0 显微图像分析系统,自动记录每张图片

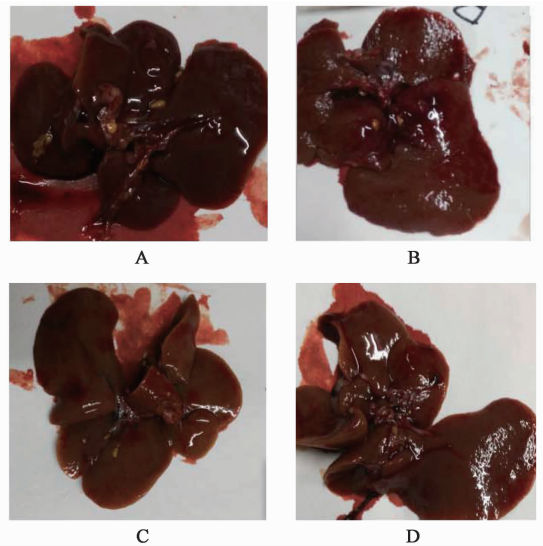
阳性物质的累积吸光度和面积,计算阳性物质的平均 A - 累积 A 面积,取视野平均值作为该切片的积分 $A(IA)$ 。

2.5 统计学分析 数据采用统计学软件 SPSS 11.0 进行分析,组间比较采用单因素 ANOVA 分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 动物一般状况及病理变化 正常组大鼠活动正常,大小便正常,体重稳步增长。模型组动物毛皮易脱落,精神不振,尿量减少,体重增长缓慢或减轻。狼毒大戟组和狼毒大戟配伍大枣组大鼠,性情较模型组温和,尿量明显增多,体重没有明显下降。模型组大鼠腹部膨隆,死亡 2 只,死亡率为 20%。

肝脏病理变化,正常大鼠肝脏红润且柔软;模型组大鼠肝脏体积增大,色泽暗沉,变硬,可见再生结节;两个给药组肝脏体积、质地、色泽均有所改善。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 狼毒大戟组;D. 狼毒大戟配伍大枣组(图 2,3 同)

图 1 狼毒大戟配伍大枣对肝脏形态的影响

Fig.1 Effect of radix *Euphorbia fisheriana* compatibility *Jujubae Fructus* on liver morphology

3.2 狼毒大戟配伍大枣对肝硬化大鼠体质量、肝湿重和肝指数的影响 与正常组比较,模型组和狼毒大戟组体重降低($P < 0.01$),狼毒大戟配伍大枣组体重降低($P < 0.05$)。与模型组比较,正常组、狼毒大戟组和狼毒大戟配伍大枣组大鼠肝湿重均升高($P < 0.01$)。正常组大鼠肝指数为(3.08 \pm 0.48)%,经 CCl_4 菜籽油溶液造模后大鼠肝指数增大,与模型组相比,正常组、狼毒大戟组及狼毒大戟配伍大枣组肝指数均升高($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 狼毒大戟配伍大枣对肝硬化大鼠体重、肝湿重、肝指数及 24 h 尿量、腹腔积液量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of radix *Euphorbia fischeriana* compatibility *Jujubae Fructus* on body weight, liver weight, liver index and 24 h urine volume, volume of ascites of liver cirrhosis rat ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg/只	体重 /g	肝湿重 /g	肝指数 /%	24 h 尿量 /mL	腹腔积液量 /g
正常	-	325.2 ± 27.34	9.954 ± 1.30	3.08 ± 0.48	25.89 ± 4.413	0.266 0 ± 0.060 2
模型	-	286.3 ± 19.02 ²⁾	12.94 ± 1.95 ²⁾	4.53 ± 0.70 ²⁾	17.75 ± 2.472 ⁴⁾	0.401 3 ± 0.070 3 ⁴⁾
狼毒大戟	8.83 ± 0.89	294.4 ± 29.54 ²⁾	10.29 ± 0.81 ⁴⁾	3.51 ± 0.30 ^{1,4)}	21.59 ± 3.502 ^{1,3)}	0.278 6 ± 0.060 1 ²⁾
狼毒大戟配伍大枣	8.99 ± 0.70	299.8 ± 23.32 ¹⁾	9.638 ± 0.47 ⁴⁾	3.23 ± 0.27 ⁴⁾	23.57 ± 4.033 ²⁾	0.265 9 ± 0.050 6 ²⁾

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 同)。

3.3 狼毒大戟配伍大枣对肝硬化大鼠 24 h 尿量及腹腔积液量的影响 模型组大鼠 24 h 尿量较正常组明显减少 ($P < 0.01$),狼毒大戟组和狼毒大戟配伍大枣组尿量显著增加 ($P < 0.05$);模型组大鼠腹腔积液量较正常组显著升高 ($P < 0.01$),给药组大鼠腹腔积液量均有不同程度减少,与模型组相比显著减少 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.4 狼毒大戟配伍大枣大鼠肝组织的影响 HE 染色结果显示,正常组大鼠肝组织结构完整,未见变性或坏死细胞,肝小叶结构清晰。模型组大鼠肝小叶结构破坏,纤维组织增生,假小叶形成,大鼠肝硬化模型复制成功。同时肝细胞大量脂肪变性、坏死、纤维间隔形成,肝细胞增生明显,间质内弥漫性炎细胞浸润。狼毒大戟和狼毒大戟配伍大枣组大鼠肝小叶结构因纤维组织分割而紊乱,原肝小叶没有被完全分割,未见假小叶形成,肝细胞形态与正常者相似。见图 2。

静脉管壁,Ⅲ型胶原及纤维连接蛋白主要存在于大血管周围:肝硬化模型组肝脏中 I,Ⅲ型胶原及纤维连接蛋白表达显著增加,在汇管区和中央静脉区以及肝窦周围出现阳性着色区,呈棕黄色,并向肝实质内延伸形成纤维间隔,形成假小叶。与正常组比较胶原沉淀显著增加,肝细胞胞质疏松,肝血窦闭塞或窦周纤维化。狼毒大戟治疗组病变程度显著减轻,胶原较肝纤维化组明显减少。结果表明,肝硬化模型组及狼毒大戟治疗组,I,Ⅲ型胶原及纤维连接蛋白的含量均显著高于正常组。正常组大鼠肝组织中肝窦壁缺乏 LN 表达,随着肝纤维化程度的加重,LN 在纤维间隔及肝窦壁中表达逐渐增强,模型组可见 LN 呈连续线状分布,LN 免疫组化染色阳性反应面积百分比增加。Desmin 免疫组化显示,正常组肝细胞呈均匀的棕黄色阳性颗粒,胞体较小,形状不规则或呈星形;模型组肝窦周围阳性细胞明显增多,甚至融合成片状;狼毒大戟组和狼毒大戟配伍大枣组肝窦周围阳性细胞较多,体积较大,着色较深,少见片状融合区,但明显少于模型组,二者之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 3,表 2。

4 讨论

本文意在通过动物实验研究,为研发有防治肝硬化作用的中药奠定基础。肝硬化伴腹水的形成和发展,涉及多个环节与因素,治疗方法包括抗炎、抑制胶原纤维形成与促进胶原降解等方面。本文建模用的 CCl_4 ,是氯化烷烃类化合物,是最广泛使用的化学肝毒物。本法建立的肝硬化动物模型,费用低廉,病理特征稳定可靠,诱导的肝硬化动物模型在病理生理学的某方面与人肝硬化相似,所以本研究用这种方法建立肝硬化模型。

本实验证实狼毒大戟配伍大枣对 CCl_4 复制的肝硬化大鼠的体重、肝湿重及肝指数均有影响,可以降低肝硬化大鼠的肝指数,增加其体重等。本实验证实了狼毒大戟对 CCl_4 复制的肝硬化大鼠的肝脏

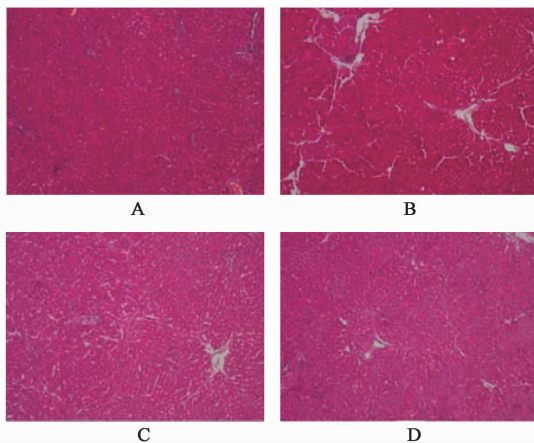


图 2 狼毒大戟配伍大枣对大鼠肝组织的影响 (HE, ×100)

Fig. 2 Effect of radix of *Euphorbia fischeriana* compatibility *Jujubae Fructus* on rat liver (HE, ×100)

3.5 狼毒大戟配伍大枣对大鼠肝组织中 Collagen I, Collagen III, FN, LN, Desmin 表达的影响 正常肝脏 I 型胶原阳性染色只见于汇管区纤维隔和中央

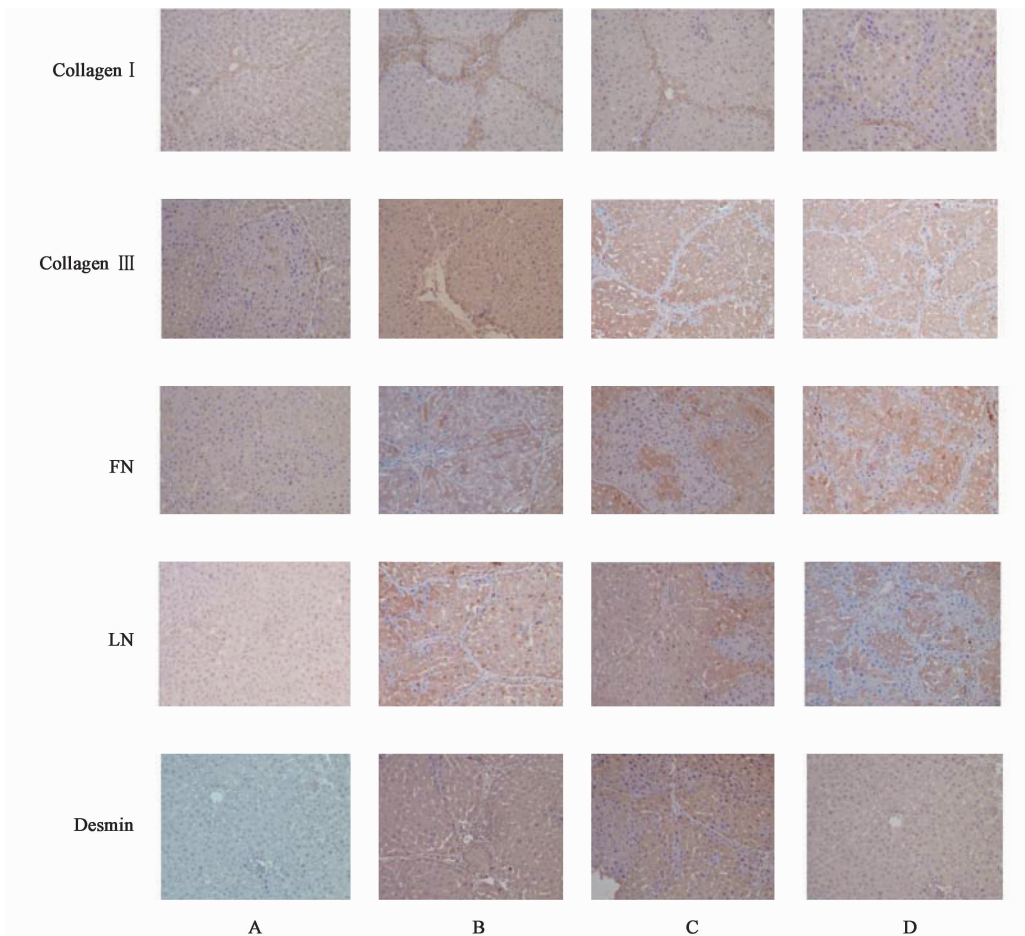


图 3 狼毒大戟配伍大枣对大鼠肝组织中 Collagen I , Collagen III , FN , LN , Desmin 蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig.3 Effect of radix of *Euphorbia fisheriana* compatibility Jujubae Fructus on Collagen I , Collagen III , FN , LN , Desmin expression in rat liver (immunohistochemical, ×200)

表 2 狼毒大戟配伍大枣对大鼠肝组织中 Collagen I , Collagen III , FN , LN , Desmin 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of radix of *Euphorbia fisheriana* compatibility Jujubae Fructus on Collagen I and Collagen III , FN , LN , Desmin expression in rat liver ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg/只	Collagen I	Collagen III	FN	LN	Desmin
正常	-	0.238 8 ± 0.044 6	0.249 4 ± 0.060 9	0.110 5 ± 0.014 3	0.006 4 ± 0.003 8	0.061 7 ± 0.071 2
模型	-	0.846 6 ± 0.083 2 ²⁾	0.655 1 ± 0.052 1 ²⁾	0.195 1 ± 0.0139 1 ²⁾	0.191 9 ± 0.044 7 ²⁾	0.209 2 ± 0.057 6 ²⁾
狼毒大戟	8.83 ± 0.89	0.554 6 ± 0.088 8 ⁴⁾	0.543 8 ± 0.061 3 ⁴⁾	0.150 6 ± 0.018 3 ⁴⁾	0.071 8 ± 0.022 7 ⁴⁾	0.127 1 ± 0.034 3 ⁴⁾
狼毒大戟配伍大枣	8.99 ± 0.70	0.348 0 ± 0.1079 ⁴⁾	0.425 0 ± 0.081 9 ⁴⁾	0.136 8 ± 0.015 5 ⁴⁾	0.044 7 ± 0.018 5 ⁴⁾	0.102 2 ± 0.032 3 ⁴⁾

硬化程度有所减轻,通过测定 Collagen I , Collagen III , FN , LN , Desmin 在肝脏组织中的表达,并与模型组的结果进行比较,提示狼毒大戟配伍大枣对肝硬化病变有良好的的干预作用,可延缓大鼠肝硬化进程。但其防治肝硬化的作用机制尚不明确,所以未来探索其防治肝硬化的主要单体成分、确切的作用靶点与分子机制,并探索最佳的药物剂量,给药方式,进一步证实其抗肝硬化的疗效和机制,为肝硬化的临床防治无疑具有一定实用价值。

本研究结果表明,狼毒大戟配伍大枣可有效地减轻肝硬化大鼠增生程度,并改善肝细胞超微结构,具有良好的抗肝硬化作用,体现了中医多层次的整合治疗观念。由于肝纤维化直至硬化的发病机制比较复杂,考虑综合治疗更有价值,本文中的狼毒大戟配伍大枣复方制剂,临床可辅佐已经上市的治疗肝硬化的方法进行取长补短,使其治疗方法不断完善。

[参考文献]

[1] 陆伦根,李郑红.肝纤维化及肝硬化研究近况[J].临

- 床肝胆病杂志, 2013, 29(5): 321-323.
- [2] Missaka P B W, Charith U B W, Chandana B H. Indigenous herbal recipes for treatment of liver cirrhosis [J]. *Proce Chem*, 2015, 14(3): 270-276.
- [3] 方庆, 王成业, 姚瑶, 等. 苯巴比妥联合 CCl_4 法建立肝硬化腹水大鼠模型[J]. *安徽医药*, 2015, 19(2): 230-232.
- [4] Funyon B A. AASLD Practice guideline: management of adult patients with ascites due to cirrhosis; an update [J]. *Hepatology*, 2009, 49(6): 2087-2107.
- [5] ZHAO C Q, ZHOU Y, PING J, et al. Traditional Chinese medicine for treatment of liver diseases: progress, challenges and opportunities [J]. *J Integr Med*, 2014, 12(5): 401-408.
- [6] 王倩, 王燕, 高健, 等. 肝硬化患者自我管理行为量表的研制 [J]. *中华护理杂志*, 2014, 49(12): 1515-1520.
- [7] 尚士国. 西医内科对肝硬化腹水的临床治疗进展 [J]. *当代医学*, 2014, 20(5): 14-15.
- [8] 孟晓丹, 向国卿, 贺小虎, 等. 肝硬化病因及临床特点分析 178 例 [J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(17): 1880-1884.
- [9] 曾星华, 陈晓丽, 刘飞跃. 中西医结合治疗肝硬化腹水 34 例临床观察 [J]. *实用中西医结合临床*, 2012, 12(1): 31-33.
- [10] TENG L C, ZHANG J S, DAI M, et al. Correlation between traditional Chinese medicine symptom patterns and serum concentration of zinc, iron, copper and magnesium in patients with hepatitis B and associated liver cirrhosis [J]. *J Tradi Chin Med*, 2015, 35(5): 546-550.
- [11] 张福兴, 马兰香, 江一平. 中医药治疗肝硬化腹水的研究进展 [J]. *江西中医药*, 2014, 45(380): 78-80.
- [12] 孙宁宁, 杨先照, 李莹, 等. 中医药治疗肝硬化腹水随机对照临床试验质量评价 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2015, 25(2): 115-117.
- [13] 舒盼, 崔丽安. 中医药治疗肝硬化腹水体会 [J]. *中医杂志*, 2012, 53(22): 1963-1964.
- [14] 韩莉, 赵文霞. 中医药治疗肝炎后肝硬化的研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(68): 25.
- [15] 蔡珍珍, 金铭, 杨盼盼, 等. 狼毒大戟石油醚提取物对小鼠肝脏细胞凋亡及 p-ERK、Bcl-2、Bax、半胱氨酸蛋白酶-3 的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(1): 1-5.
- [16] 吴宏辉, 李红丽, 王文全, 等. 瑞香狼毒抗癌作用研究进展 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(11): 127-130.
- [17] 周跃华, 路金才. 关于大毒药材的范围及相关问题探讨 [J]. *中草药*, 2016, 47(1): 149-156.
- [18] 贾镭, 姜达, 董倩, 等. 诱导小鼠肝硬化对结肠癌肝转移的抵抗作用 [J]. *中国癌症杂志*, 2005, 15(4): 317-320.
- [19] 徐薇, 秦斌, 邵景东, 等. 层粘连蛋白测定在肝硬化诊断中的意义 [J]. *镇江医学院学报*, 2001, 11(2): 171-172.
- [20] Bleser P, Niki T, XU G. Localization and cellular sources of activins in normal and fibrotic rat liver [J]. *Hepatology*, 1997, 26(4): 905-912.
- [21] 赵强, 陈卫刚, 郑勇, 等. 硫化氢对肝纤维化大鼠肝脏 I、III 型胶原表达的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(4): 300-306.
- [22] SHI H T, SHI A M, DONG L, et al. Chlorogenic acid protects against liver fibrosis *in vivo* and *in vitro* through inhibition of oxidative stress [J]. *Clin Nutri*, 2016, 35(6): 1366-1373.

[责任编辑 邹晓翠]