

软肝宁抗四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化

闫冰, 周晓辉, 潘士勇, 王曙东*
(南京军区南京总医院, 南京 210002)

[摘要] **目的:**探讨软肝宁对四氯化碳(CCl_4)诱导的实验性肝纤维化大鼠纤维化水平的影响。**方法:**将 60 只大鼠随机分为 6 组:正常对照组,给予生理盐水。模型组,给予 20% 四氯化碳花生油溶液按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sc}$,首剂加倍,注射 1 次/5 d,首次注射后,用生理盐水按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$,1 次/d,连续 6 周。秋水仙碱组($\text{ig } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。软肝宁高、中、低剂量组($\text{ig } 0.12, 0.06, 0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)按损伤模型组同法给予 CCl_4 造模,然后给予软肝宁给药,1 次/d,连续给药 6 周后检测大鼠血清中的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)、血清透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)和羟脯氨酸(HYP),并观察大鼠肝组织常规病理改变。**结果:**软肝宁能改善肝纤维化大鼠的肝功能,具有剂量依赖性地使升高的血清 ALT、AST 水平降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),使降低的 ALB 水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);软肝宁高、中剂量可显著降低血清 HA、LN、PCⅢ水平和肝组织中过高的 HYP($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);同时常规病理也提示,软肝宁中、高剂量组可明显减轻 CCl_4 所致的大鼠肝细胞变性、坏死及肝组织损害程度。**结论:**软肝宁对 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化有良好的防治作用。

[关键词] 软肝宁; 肝纤维化; 四氯化碳;

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0205-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120515.1559.023.html>

[网络出版时间] 2012-05-15 15:59

[收稿日期] 20120220(001)

[基金项目] 南京军区南京总医院课题(2010M006)

[第一作者] 闫冰,医学博士,主管药师,研究方向为中药复方机制及药效学研究,Tel:13921430009, E-mail:arain515@sina.com

[通讯作者] *王曙东,医学博士,主任药师,研究方向为中药复方机制及药效学研究,Tel:025-80860161, E-mail:21324375@qq.com

川芎嗪还可降低血脂水平而维持内皮细胞正常的生理功能。因此,川芎嗪靶向内皮细胞干预 AS 早期始动环节,抑制泡沫细胞形成产生抗 AS 作用;川芎嗪对整体 AS 具有良好的治疗作用,拓展了目前其在临床的适应症,为 AS 的防治提供了新思路。

[参考文献]

- [1] 姜宏,施广飞,朱珠. 川芎嗪对心血管作用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(5): 484.
- [2] 刘会芳. 川芎嗪对心血管系统的作用及机制研究进展[J]. 中国药房, 2007, 18(9): 706.
- [3] 张淑娟,王振涛,韩丽华,等. 川芎嗪注射液对心梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF-mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):170.
- [4] 任志强,孙兰军. 川芎嗪的心血管药理作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(5):570.
- [5] Puntmann V O, Bigalke B, Nagel E. Characterization of the inflammatory phenotype in atherosclerosis may contribute to the development of new therapeutic and preventative interventions[J]. Trends Cardiovasc Med,

2010, 20(5):176.

- [6] 马悦颖,刘建勋,李澎,等. 痰瘀同治方含药血清对 ox-LDL 损伤人脐静脉内皮细胞 NF- κ B 和 ICAM-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):140.
- [7] 邬伟魁,张海燕,宋伟,等. 中药对内皮祖细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17):282.
- [8] Moore K J, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Cell, 2011, 145(3): 341.
- [9] Sun C, Wu M H, Yuan S Y. Nonmuscle myosin light-chain kinase deficiency attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced endothelial barrier dysfunction and monocyte migration [J]. Circulation, 2011, 124(1):48.
- [10] van Tits L J, Stienstra R, van Lent P L, et al. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Krüppel-like factor 2 [J]. Atherosclerosis, 2011, 214(2):345.

[责任编辑 聂淑琴]

Experimental Study of Ruanganning in Rats with Counteracting Hepatic Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride

YAN Bing, ZHOU Xiao-hui, PAN Shi-yong, WANG Shu-dong*

(Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Ruanganning on fibrosis level in rats with liver fibrosis. **Method:** Sixty rats were randomly divided into six groups: the normal group, the model group, bifendate group ($0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), high Ruanganning group ($0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), middle Ruanganning group ($0.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and low Ruanganning group ($0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The treatment groups were orally administered once per day for six weeks, whereas the normal and model groups were orally administered with saline. Six weeks later, the blood sample was collected for the examination of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB), hyaluronic acid (HA), Laminin (LN), precollagen type III (PC III), hydroxyproline (HYP) and liver specimen were collected for the observation of pathology. **Result:** Compared with model group, Ruanganning could protect hepatic function. Following the treatment with Ruanganning, ALT and AST activities were significantly reduced and ALB activity was obviously increased in treating group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), especially the middle and high doses could significantly degrade the serum levels of HA, LN, PCIII and the exorbitant HYP in liver tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, pathological examination indicates Ruanganning can protect rats from hepatic fibrosis. **Conclusion:** Ruanganning can greatly protect from liver fibrosis in rats induced by CCl_4 .

[Key words] Ruanganning; hepatic fibrosis; carbon tetrachloride (CCl_4)

肝纤维化是多种慢性肝病的共同病理状态,肝纤维化不仅造成肝功能异常并影响慢性肝病的预后,而且也是慢性肝病发展至肝硬化的必经阶段^[1]。因此,抗肝纤维化成为慢性肝病的重要治疗环节。软肝宁选用党参、郁金、姜黄、山芋肉、枸杞子等9味中药组成,长期应用于临床,为探讨其作用机制,本研究通过四氯化碳诱发肝纤维化大鼠的动物模型^[2],探讨软肝宁对肝纤维化大鼠的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wister 雄性大鼠 60 只,体重 210~230 g,由南京江宁县汤山青龙山动物繁殖场提供,实验动物生产许可证 SCXK(苏)2010-2011。

1.2 药物与试剂 软肝宁选用党参、郁金、姜黄、山芋肉、枸杞子、鸡内金、地鳖虫、胎盘及三七(3:1:1:2:2:1:2:1:2)9味中药组成,制成散剂后经水煎、醇提,按人临床剂量用体表面积法换算成大鼠用量后,分别研磨配制成实验浓度,按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,1次/d,用时摇匀。四氯化碳(CCl_4):分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司生产(批号 110524);秋水仙碱为昆明制药集团股份有限公司生产(批号 20110318);花生油采用普通食用花生油,实验时配

成 20% 四氯化碳花生油;天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(批号 20110312)、丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒(批号 20110426)、透明质酸(HA)试剂盒(批号 20110409)、层黏连蛋白(LN)试剂盒(批号 20110517)、III型前胶原(PC III)试剂盒(批号 20110322)、羟脯氨酸(HYP)试剂盒(批号 20110618)及白蛋白(ALB)试剂盒(批号 20110322),以上试剂均购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 动物分组和造模 将 60 只大鼠随机分为 6 组,每组 10 只。正常对照组,给予生理盐水。模型组,给予 20% 四氯化碳花生油溶液按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ sc,首剂加倍,注射 1 次/5 d,首次注射后,ig 生理盐水按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig,1 次/d,连续 6 周。软肝宁高、中、低剂量组($0.12, 0.06, 0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)按损伤模型组同法给予 CCl_4 造模,然后 ig 给予软肝宁给药,1 次/d,连续给药 6 周。秋水仙碱组配成 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 按 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 ig,1 次/d,连续给药 6 周。

2.2 观察指标

2.2.1 肝纤维化指标 用放射免疫法分别测定血

清 HA, LN, PC III 的含量,均按试剂盒说明书操作。肝组织中 HYP 的检测按文献[3]的方法进行。

2.2.2 肝功能 用自动生化分析仪检测血清 ALT, AST, ALB。

2.2.3 常规病理学观察 将大鼠肝组织,用 10% 的福尔马林溶液固定,肝组织进行石蜡包埋,常规切片,HE 染色,光镜下观察肝脏的病理改变。

2.3 统计学分析 应用 SPSS 16.0 统计软件,各项数据采取 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析进行处理。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对肝纤维化大鼠血清肝纤维化指标及肝组织 HYP 的影响 CCl_4 肝损伤模型组大鼠血清中肝纤维化各项指标及肝组织 HYP 水平明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。与模型组比较,软肝宁高、中剂量组与秋水仙碱组血清 HA, LN, 及肝组织 HYP 水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但未达到正常对照组的水平,而低剂量组与模型组比较无统计学意义;软肝宁各剂量组 PC III 则明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 软肝宁对肝纤维化大鼠血清肝纤维化指标及肝组织 HYP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	HA/ $\mu g \cdot L^{-1}$	LN/ $\mu g \cdot L^{-1}$	PC III/ $\mu g \cdot L^{-1}$	HYP/ $mg \cdot g^{-1}$
正常对照	-	86.4 ± 12.7 ²⁾	25.7 ± 4.8 ²⁾	84.6 ± 9.8 ²⁾	0.45 ± 0.05 ²⁾
模型	-	295.2 ± 58.9	282.4 ± 88.2	105.4 ± 10.5	1.42 ± 0.17
软肝宁	0.12	141.5 ± 56.7 ²⁾	82.3 ± 17.6 ²⁾	88.3 ± 11.2 ²⁾	0.85 ± 0.19 ²⁾
	0.06	203.2 ± 53.2 ²⁾	162.6 ± 71.5 ²⁾	92.1 ± 6.9 ¹⁾	1.14 ± 0.22 ¹⁾
	0.03	272.1 ± 72.2	242.2 ± 71.3	95.8 ± 10.3 ¹⁾	1.37 ± 0.13
秋水仙碱	1 × 10 ⁻⁴	132.8 ± 43.7 ²⁾	84.4 ± 19.7 ²⁾	89.5 ± 12.6 ²⁾	0.76 ± 0.18 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对肝纤维化大鼠肝功能指标的影响 模型组血清中 ALT, AST 水平较正常对照组明显升高,而 ALB 水平明显降低 ($P < 0.01$),软肝宁各剂量组及秋水仙

碱组均不同程度地使升高的血清 ALT, AST 水平降低,而 ALB 水平明显升高,软肝宁组中尤以高剂量组作用更为显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 软肝宁对肝纤维化大鼠肝功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

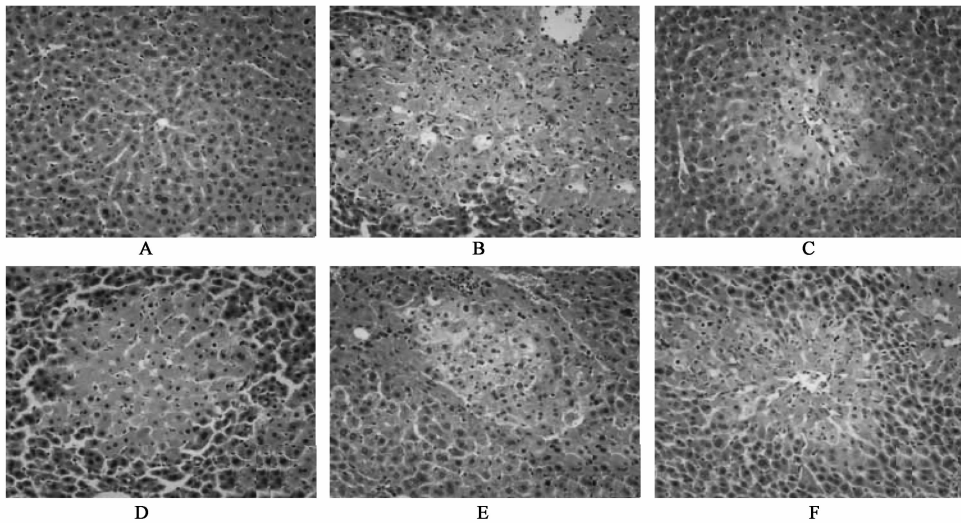
组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$	ALB/ $g \cdot L^{-1}$
正常对照	-	54.25 ± 11.26 ²⁾	63.37 ± 16.84 ²⁾	32.71 ± 3.45 ²⁾
模型	-	193.51 ± 25.23	218.58 ± 16.32	19.42 ± 2.83
软肝宁	0.12	150.46 ± 20.18 ²⁾	186.14 ± 15.49 ²⁾	26.92 ± 4.36 ²⁾
	0.06	166.36 ± 22.77 ²⁾	198.65 ± 15.74 ²⁾	23.15 ± 6.92 ¹⁾
	0.03	182.74 ± 27.59 ¹⁾	212.42 ± 11.78 ¹⁾	20.34 ± 5.68
秋水仙碱	1 × 10 ⁻⁴	152.32 ± 21.73 ²⁾	190.39 ± 16.13 ²⁾	27.57 ± 5.42 ²⁾

3.3 大鼠肝组织病理学 病理切片结果表明,正常对照组肝细胞未见变性与坏死,肝内未见纤维组织增生,小叶结构清晰,肝组织正常。 CCl_4 模型组大鼠肝组织结构镜下可见肝组织损害严重,肝小叶结构破坏,有的呈气球样变,以环中央静脉分布的肝细胞灶性或片状坏死,伴炎性细胞浸润等病理改变。软肝宁各剂量组均未出现假小叶的形成,相比较而言,中、高剂量组纤维增生较少,局限于汇管区,低剂量组疗效稍差,纤维组织又汇管区向周围延伸,变形坏死较严重;秋水仙碱可较好改善肝纤维化损伤。见图 1。

4 讨论

肝纤维化指肝内细胞、纤维及基质的异常增生,纤维结缔组织增生的病理过程,是慢性肝病的重要病理阶段,也是发展为肝硬化的物质基础,并且是个可逆的阶段,其实质是由于胶原和其他细胞外基质的合成和降解失衡,对此阶段的干预治疗处于防止肝纤维化向肝硬化转变的关键地位^[4-5]。

肝纤维化的主要发生机理是由于纤维增生和纤维分解不平衡导致肝脏纤维结缔组织过度沉积所致^[6]。目前对于肝纤维化常用的指标仍以病理组织学检查和反映胶原代谢的指标为主。胶原纤维主



A. 正常组;B. 模型组;C. 秋水仙碱 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D. 软肝宁 $0.12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 软肝宁 $0.06 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;F. 软肝宁 $0.03 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

图 1 软肝宁对肝纤维化大鼠肝组织病理的影响(HE, $\times 100$)

要由胶原蛋白构成,而羟脯氨酸在胶原蛋白的含量约为 14%,所以羟脯氨酸常被认为是胶原蛋白的特有成份,因此测定肝组织羟脯氨酸含量可间接反映肝纤维化的程度。血清中 HA、LN、PCⅢ也常用于肝纤维化的诊断,其水平的高低可作为慢性肝组织炎症坏死、纤维化程度和肝纤维化、肝硬化诊断的重要指标^[7-8]。本实验结果显示,CCl₄ 诱导的慢性肝纤维化大鼠有明显的肝损伤及慢性肝纤维化表现。给予软肝宁治疗后,肝功能指标明显改善,ALT、AST 降低,ALB 升高;高、中剂量还能使升高的 HA、LN、PCⅢ及肝组织中 HYP 水平显著降低,且病理观察提示高剂量软肝宁可以明显地抑制模型大鼠肝组织胶原纤维的增生,从而减轻肝细胞损伤,说明软肝宁对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化有良好的防治作用^[9]。

中药在抗肝纤维化治疗中具有明显的优势,包括单味药,复方的研究^[10-11]。软肝宁是由中药党参、郁金、姜黄、山芋肉、枸杞子等 9 味中药组成,能延缓四氯化碳造成的大鼠肝纤维化进程,能改善肝功能,抗脂质过氧化,并能抑制假小叶的形成及纤维组织的增生。软肝宁抗肝纤维化作用机制可能与保护肝细胞、抑制胶原合成、降低转氨酶、抗脂质过氧化反应及促进机体蛋白质合成等因素有关^[12]。

[参考文献]

[1] Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis[J] Clin Chim Acta, 2006, 64: 33.

[2] 姜辉,尚莉丽,徐松龄,等. 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 167.

[3] 赵珍东. 姜黄素抗肝纤维化作用及机理研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 122.

[4] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209.

[5] 青献春,刘炳辰,裴香萍,等. 软肝散结胶囊抗大鼠肝纤维化实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 149.

[6] 程慧楨. 安络化纤丸治疗慢性乙型肝炎、肝纤维化 86 例体会[J]. 山东医药, 2004, 44(26): 67.

[7] 张媛辉,刘俊田. 中药抗肝纤维化作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6): 66.

[8] 黄象安,陈燕力,孙利红,等. 扶正健肝方对免疫性肝纤维化大鼠胶原代谢的影响[J]首都医科大学学报, 2007, 28(2): 196.

[9] 欧贤红,吕林艳,郑作文. 藤茶提取物抗慢性肝纤维化作用[J]中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 132.

[10] Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, et al. Reversibility of hepatic fibrosis; from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery[J]. Keio J Med, 2001, 50: 58.

[11] Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation[J]. Gut, 2002, 50: 891.

[12] 张林军,刘光辉,黄东华,等. 清纤方抗实验性大鼠肝纤维化的作用研究[J]中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12): 75.

[责任编辑 聂淑琴]