

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

王付, 尚立芝*, 苗小玲, 甘陈菲, 张慧娜

(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:探讨四逆散加味对大鼠肝纤维化的防治作用。方法:80 只 Wister 大鼠随机分为 8 组:正常对照组、病理模型对照组、秋水仙碱治疗组、四逆散对照组、四逆散加味高、中、低剂量组、四逆散预防组。除正常对照组外,其余各组均采用猪血清 ip 诱发肝纤维化,0.5 mL/只,2 次/周,连续 10 周,5 周后即可形成肝纤维化。预防组于造模同时给药(以四逆散加味 7 g·kg⁻¹),各治疗组于造模第 6 周给药,四逆散组 4 g·kg⁻¹,四逆散加味高、中、低剂量组(14,7,3.5 g·kg⁻¹),连续 10 周。全自动分析法测定各组血清肝功能、放射免疫法测定血清肝纤维化指标,酸性水解法检测肝组织羟脯氨酸(HYP)含量,观察病理变化。结果:与模型组比较,四逆散加味中剂量组大鼠血清中丙氨酸转氨酶[ALT U·L⁻¹(138.88 ± 21.52), (75.20 ± 3.80), (P < 0.05)],天冬氨酸转氨酶[AST U·L⁻¹, (375.25 ± 10.95), (227.10 ± 19.08), (P < 0.05)],碱性磷酸酶(ALP, P < 0.05)、透明质酸[HA, μg·L⁻¹(258.10 ± 32), (135.26 ± 34.09), (P < 0.05)],Ⅲ型胶原[μg·L⁻¹(105.28 ± 15.31), (85.32 ± 9.53), (P < 0.05)],Ⅳ型胶原[μg·L⁻¹(109.10 ± 8.31), (86.48 ± 19.17), (P < 0.05)],层黏连蛋白(LN, P < 0.05)含量均显著下降,肝组织 HYP, (P < 0.01)含量显著降低。结论:四逆散加味有明显的抗肝纤维化作用。

[关键词] 四逆散; 肝功能; 肝纤维化; 透明质酸; 羟脯氨酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0177-04

Effects of Supplemental Sini San on Hepatic Function and Liver Fibrosis in Rat Hepatic Fibrosis Model

WANG Fu, SHANG Li-zhi*, MIAO Xiao-ling, GAN Chen-fei, ZHANG Hui-na

(Department of Physiology, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects and its mechanism of supplemental Sini San on hepatic fibrosis in rats. **Method:** The immunohepatic fibrosis model was induced by intraperitoneal injection of porcine serum in rats. Eighty Wister rats were divided into eight groups: normal control group, model control group, prevention group (7 g·kg⁻¹), high dose group (14 g·kg⁻¹), mediate dose group (7 g·kg⁻¹), and low dose group (3.5 g·kg⁻¹) of supplemental Sini San, colchicin control group (0.2 mg·kg⁻¹), Sini San control group (4 g·kg⁻¹). Except the normal control group, all the other groups were injected with pig serum without inactivation into abdominal cavity, twice per week and 0.5 mL each time, lasting 10 weeks. The prevention group was given supplemental Sini San, 10 weeks at the same time when establishment of models began, the other groups were treated with corresponding drugs after 6 weeks of modelling, and lasted 10 weeks. The changes of the biochemical indicator in serum and hepatic fibrosis were detected respectively. **Result:** Compared with model group, the serum content of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), r-glutamyl transpeptidase (GGT), alkaline phosphatase (ALP) and type I, III, IV collage, hyaluronic acid (HA), laminin (LN) were depressed obviously, the content of hydroxyproline (HYP) in liver tissue was significantly

[收稿日期] 20110831(012)

[基金项目] 河南省科学技术厅科技攻关项目(0424420047); 郑州市科技领军人才项目(112PLJRC360)

[第一作者] 王付,教授,从事经方配伍及临床应用研究, E-mail: wfwf2088@yahoo.cn

[通讯作者] *尚立芝,副教授,从事经方配伍及基础研究, E-mail: lzshang2001@yahoo.com.cn

lower in supplemental Sini San mediatedose group. **Conclusion:** Supplemental Sini San has a treatment; action on hepatic fibrosis model rats.

[**Key words**] Sini San; hepatic function; liver fibrosis; hyaluronic acid; hydroxyproline

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理基础,是肝硬化的必经阶段,阻断与逆转肝纤维化已被作为防治肝硬化的一个新的热点。本课题组以四逆散疏肝解郁,调理气机,以四君子汤益气健脾,已取得显著的临床治疗效果^[1-3]。为深入探讨其作用疗效及其机制,本研究制备大鼠猪血清复制免疫损伤性肝纤维化模型,用四逆散加味处理,观察反映疗效的肝功能、肝纤维化的血清学指标、病理学形态改变,探讨四逆散加味对肝纤维化的防治作用。

1 材料

1.1 药物 四逆散方由柴胡、芍药、枳实、炙甘草(各 10 g)组成。四逆散加味方药由柴胡、芍药、枳实、炙甘草、人参、白术、茯苓、鳖甲(各 10 g)、穿山甲 5 g 组成。上述药物均购自河南中医学院第三附属医院,并经中药教研室鉴定。秋水仙碱:西双版纳制药厂(批号 010218)。

1.2 试剂与仪器 测定血清透明质酸(HA)、I 型胶原(CI)、III 型前胶原肽(PCIII)、IV 型胶原(CIV)、层黏连蛋白(LN)的放免分析试剂盒均为北京北方生物技术研究所产品(编号分别为 s20083010, G18TLB, 11060747, S20090004, G09PJA)。羟脯氨酸(HYP)(酸水解法)试剂盒为南京建成生物工程研究所产品(A030-3)。日立 750 型自动生化分析仪(日本),SN-695 型智能放射免疫测量仪(上海光辐射仪器有限公司)等。

1.3 动物 6 月龄雄性 Wistar 大鼠,清洁级,体重(300 ± 20)g,由郑州大学医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(豫)2010-0001。

2 方法

2.1 动物分组 将 80 只 Wistar 大鼠随机分为 8 组:正常组,模型组,秋水仙碱组,四逆散组,加味四逆散高、中、低剂量组,加味四逆散预防组,每组 10 只。

2.2 模型制备与给药 参考文献方法[4] 制备模型。除正常组外,其余各组均用猪血清复制免疫损伤性肝纤维化模型。用未灭活猪血清腹腔注射,每次 0.5 mL/只,2 次/周,连续 10 周,5 周后即可形成肝纤维化。预防组于造模同时给药,每天下午 6:00 ig,以四逆散加味 7 g·kg⁻¹连续 10 周。各治疗组于造模第 6 周给药,每天下午 6:00 ig,秋水仙碱组剂

量 0.2 mg·kg⁻¹,四逆散组剂量(4 g·kg⁻¹),加味四逆散高、中、低剂量(14,7,3.5 g·kg⁻¹),模型组给予等量的生理盐水 ig,均至第 10 周结束。

2.3 取材与标本制作^[5-6] 水合氯醛麻醉,剖腹,腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心 25 min,分离血清用于生化分析。全自动生化分析仪检测肝功能指标丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、r-谷氨酰转肽酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP),放射免疫法测定血清肝纤维化标志物,另固定部位取肝组织 1 g,采用酸性水解法检测肝组织 HYP 含量,所有操作均按试剂盒说明书进行。取新鲜左叶肝组织 2.5 cm × 2 cm × 0.5 cm,各组取材部位基本一致,福尔马林固定,常规石蜡包埋,7 μm 厚切片,Masson 染色与常规 HE 染色。

2.4 肝组织病理学结果判定 各组行常规 HE 染色及胶原纤维染色,病理组织学分级标准^[7]为:“- , ± , + , ++ , +++”级。

2.5 统计学处理 数据处理采用 SPSS 13.5 统计软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,组间两两均数比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 实验结束时,正常组大鼠无死亡。模型组死亡 2 只。秋水仙碱组无死亡。四逆散组死亡 1 只,四逆散加味高、低剂量组各死亡 1 只。

3.2 对大鼠肝功能的影响 与正常组比较模型组大鼠血清 ALT, AST, GGT, ALP 含量均有显著升高(*P* < 0.05),提示造模成功。与模型组比较,四逆散加味中剂量组、预防组和秋水仙碱组大鼠血清中 ALT, AST, GGT, ALP 含量均显著下降(均 *P* < 0.05)。见表 1。与正常对照组比较,模型组大鼠血清白蛋白(ALB)显著降低,球蛋白(GLB)明显升高,白球比(A/G)明显降低(均 *P* < 0.05);与模型组比较,四逆散加味中剂量血清 GLB 明显降低,ALB 显著升高,A/G 接近正常(均 *P* < 0.05)。见表 2。

3.3 对肝纤维化指标的影响 四逆散加味对 HA, PCIII, CIV 和 LN 含量的影响 与正常组比较,模型组 HA, III, IV 型胶原、和 LN 的含量显著增高(*P* < 0.01)。与模型组比较,秋水仙碱组、四逆散中剂

表1 四逆散加味对大鼠血清 ALT,AST,ALP,GGT 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

U·L⁻¹

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	ALT	AST	ALP	GGT
正常	10	-	44.60 ± 7.46 ^{1,3,5)}	183.20 ± 10.53 ^{1,3,5)}	19.70 ± 2.41 ^{1,3,5)}	43.60 ± 3.57 ^{1,3,5)}
模型	8	-	138.88 ± 21.52 ^{3,5)}	375.25 ± 10.95 ^{3,5)}	164.88 ± 7.06 ^{3,5)}	101.00 ± 7.11 ^{3,5)}
秋水仙碱	10	2 × 10 ⁻⁴	71.20 ± 5.67 ^{1,5)}	245.20 ± 13.24 ^{1,5)}	41.80 ± 6.37 ^{1,5)}	56.70 ± 4.57 ^{1,5)}
四逆散	9	4	107.78 ± 7.21 ^{1,3)}	309.67 ± 5.85 ^{1,3)}	100.11 ± 5.78 ^{1,3)}	86.33 ± 3.57 ^{1,3)}
四逆散加味	9	14	83.89 ± 4.40 ^{1,5)}	257.22 ± 11.03 ^{1,5)}	72.67 ± 7.11 ^{1,3,5)}	64.22 ± 3.35 ^{1,3,5)}
	10	7	75.20 ± 3.80 ^{1,5)}	227.10 ± 19.08 ^{1,3,5)}	39.20 ± 5.14 ^{1,5)}	56.50 ± 3.31 ^{1,5)}
	9	3.5	97.33 ± 4.69 ^{1,3)}	299.22 ± 6.83 ^{1,3)}	91.33 ± 4.64 ^{1,3,5)}	80.56 ± 5.98 ^{1,3)}
四逆散加味预防	10	7	58.10 ± 6.64 ^{1,3,5)}	201.10 ± 5.22 ^{1,3,5)}	33.30 ± 3.09 ^{1,3,5)}	50.50 ± 2.64 ^{1,3,5)}

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与秋水仙碱组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01;与四逆散组比较⁵⁾P < 0.05, ⁶⁾P < 0.01(表2~4同)。

表2 四逆散加味对大鼠血清 ALB, GLB, TP, A/G 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

g·L⁻¹

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	ALB	GLB	TP	A/G
正常	10	-	34.67 ± 1.63 ^{1,5)}	41.61 ± 1.95 ¹⁾	76.28 ± 1.91 ^{1,5)}	0.84 ± 0.065 ^{1,5)}
模型	8	-	26.49 ± 1.97 ³⁾	45.15 ± 1.83 ^{3,5)}	73.17 ± 2.06 ³⁾	0.59 ± 0.066 ³⁾
秋水仙碱	10	2 × 10 ⁻⁴	33.13 ± 1.96 ^{1,5)}	43.45 ± 1.76 ¹⁾	75.58 ± 2.29 ^{2,5)}	0.76 ± 0.059 ^{1,5)}
四逆散	9	4	27.41 ± 1.24 ³⁾	44.37 ± 1.39	71.78 ± 0.63 ³⁾	0.62 ± 0.045 ³⁾
四逆散加味	9	14	29.28 ± 0.81 ^{3,5)}	44.29 ± 1.31 ¹⁾	73.57 ± 0.93 ³⁾	0.66 ± 0.035 ^{1,3)}
	10	7	32.62 ± 1.55 ^{1,5)}	43.41 ± 2.29 ¹⁾	76.03 ± 2.72 ^{1,5)}	0.75 ± 0.017 ^{1,5)}
	9	3.5	28.47 ± 0.88 ³⁾	45.26 ± 1.26	72.72 ± 1.11 ³⁾	0.61 ± 0.032 ³⁾
四逆散加味预防	10	7	34.19 ± 1.44 ^{1,5)}	42.50 ± 1.02 ¹⁾	75.70 ± 2.15 ^{1,5)}	0.80 ± 0.029 ^{1,5)}

表3 四逆散加味对大鼠血清 HA, PCIII, CIV 和 LN 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

μg·L⁻¹

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	HA	PCIII	CIV	LN	HYP
正常	10	-	101.25 ± 10.41 ²⁾	63.24 ± 10.25 ²⁾	78.39 ± 17.29 ²⁾	123.41 ± 13.09 ²⁾	236.45 ± 12.69 ²⁾
模型	8	-	258.10 ± 32.40	105.28 ± 15.31	109.10 ± 8.31	228.73 ± 22.35	478.32 ± 42.35
秋水仙碱	10	2 × 10 ⁻⁴	126.15 ± 23.17 ²⁾	75.39 ± 15.34 ²⁾	81.44 ± 14.05 ²⁾	145.30 ± 41.32 ²⁾	302.18 ± 15.37 ²⁾
四逆散	9	4	132.38 ± 12.19 ²⁾	90.31 ± 9.86	87.20 ± 32.41 ²⁾	157.21 ± 35.62 ²⁾	360.35 ± 17.39 ¹⁾
四逆散加味	9	14	147.32 ± 31.41 ²⁾	91.33 ± 18.25	83.23 ± 15.34 ²⁾	155.35 ± 34.17 ²⁾	350.37 ± 32.01 ¹⁾
	10	7	135.26 ± 34.09 ²⁾	85.32 ± 9.53 ²⁾	86.48 ± 19.17 ²⁾	145.32 ± 20.33 ²⁾	327.09 ± 39.41 ²⁾
	9	3.5	152.09 ± 32.18 ²⁾	98.21 ± 23.19	91.35 ± 17.38 ¹⁾	160.78 ± 20.52 ²⁾	347.15 ± 39.01 ¹⁾
四逆散加味预防	10	7	115.25 ± 17.21 ²⁾	80.29 ± 10.53 ²⁾	82.35 ± 10.29 ²⁾	133.79 ± 32.05 ²⁾	298.35 ± 39.43 ²⁾

量、预防组 HA, III, IV型胶原、LN 和 HYP 的含量均显著降低(P < 0.01)。见表3。

3.4 肝组织形态学改变

3.4.1 肝组织观察 与模型组比较,秋水仙碱组、四逆散加味中剂量组肝小叶结构破坏轻微,偶见正常肝小叶,汇管区纤维增生明显。见表4。

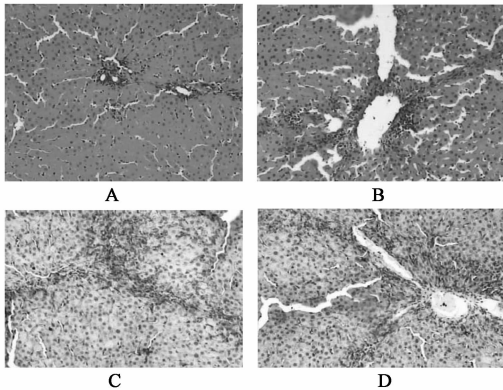
3.4.2 肝组织胶原纤维染色 正常组:肝细胞索以肝小叶中央静脉为中心呈放射状排列, Mallory 染色仅见汇管区有少量的纤维组织。模型组:肝细胞变性、坏死和再生, Mallory 染色见大量纤维组织增生,纤维延伸入肝小叶或相互连接的纤维隔,假小叶形

表4 四逆散加味对免疫性肝纤维化大鼠肝组织病理学的影响

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	着色程度				
			-	±	+	++	+++
正常	10	-	10	0	0	0	0
模型	8	-	0	1	2	5	0
秋水仙碱 ¹⁾	10	2 × 10 ⁻⁴	6	2	2	0	0
四逆散	9	4	1	1	4	3	0
四逆散加味 ¹⁾	9	14	2	2	4	1	0
	10	7	6	3	1	0	0
	9	3.5	2	2	2	3	0
四逆散加味预防	10	7	7	2	1	0	0

成。四逆散加味中剂量组:纤维组织增生不明显,肝细胞变性较轻, Mallory 染色显示有较少纤维组织增

生,显示其良好的治疗作用。中药低剂量组:见部分肝细胞空泡变性、坏死,但较模型组明显减轻,Mallory 染色纤维组织增生,较模型组轻。四逆散加味高剂量组:见肝细胞空泡变性、坏死及假小叶形成,Mallory 染色显示,纤维组织增生较模型组为轻。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 模型组;
D. 四逆散加味 7 g·kg⁻¹ 治疗组

图 1 四逆散加味给药至第 10 周对肝脏病理的影响(A~B:HE 染色;C~D:Mallory 染色;×100)

4 讨论

四逆散加味是在张仲景经典方“四逆散”基础上,加人参、白术、茯苓、鳖甲、穿山甲而成。本方作用特点是疏肝解郁,益气健脾,体现了“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”的理论。方中柴胡疏肝理气;枳实降泄浊气;白芍益血缓急,甘草益气缓急。加味人参、白术、茯苓健脾益气,生化气血,渗利祛邪,鳖甲、穿山甲软坚散结;与柴胡、枳实、白芍、甘草相配伍,既疏肝又健脾,达到扶正祛邪之作用。

4.1 四逆散加味对血清肝功能指标的影响及其意义 ALT,AST,GGT,A/G 是反映肝细胞坏死及炎症活动的指标^[3]。本研究结果显示:模型组较正常组大鼠血清中 ALT,AST,GGT,ALP 含量均显著升高,表明造模成功。与模型组比较,四逆散加味中剂量组、预防组大鼠血清中 ALT,AST,GGT,ALP 含量均显著下降,A/G 接近正常,提示四逆散加味中剂量组可明显改善肝功能。体现了本方药功效疏肝理气,健脾益气,软坚散结,“肝主疏泄”的科学性。

4.2 四逆散加味对肝纤维化指标的影响及其意义

肝纤维化的实质是细胞外基质过度沉积。HA 是细胞外基质的组成成分,血中 HA 在肝纤维化早期即显著增加。检测血清 HA,可反映肝纤维化的程度、活动性,对肝纤维化的诊断及预后判断有重要临床意义。LN 是一种非胶原结构糖蛋白,肝纤维化时,LN 与 C IV 结合沉积于 Disse 腔,形成内皮基底

膜,可作为反映基底膜变化的指标,其血清水平被认为可反映肝窦毛细血管化、汇管区 ECM 增生的表现。联合检测 HA,Ⅲ,Ⅳ型胶原和 LN,有助于判断肝内纤维增生程度及活动度^[5-6]。本研究为更全面客观的观察实验结果,联合检测 HA,Ⅲ,Ⅳ型胶原和 LN,结果显示:与模型组比较,四逆散中剂量、预防组 HA,Ⅲ,Ⅳ型胶原和 LN 的含量均显著降低($P < 0.01$),提示四逆散加味对大鼠肝纤维化有显著的预防和治疗作用。肝脏胶原纤维是反映肝纤维化的客观指标,胶原中 HYP 含量最高,测定肝组织中 HYP 的含量可反映肝纤维化的程度,在肝纤维化的诊断中有重要意义^[7-8]。本结果显示:与模型组比较,四逆散加味中剂量、预防组 HYP 的含量均显著降低($P < 0.01$),提示四逆散加味中剂量、预防组均具有良好的防治肝纤维化作用。

4.3 四逆散加味对肝脏病理组织学影响及其意义

本结果显示,与模型组相比,四逆散加味中剂量组中组织病理学改变较轻。提示四逆散加味中剂量可能减轻肝细胞的变性、坏死,具有保护肝细胞的结构,抑制肝纤维化,改善肝组织结构的作用。有关其详细机制,本课题组已完成四逆散加味抗肝纤维化作用机制的部分研究,见后续报道。

[参考文献]

- [1] 王付. 经方临证答疑[M]. 北京:人民军医出版社, 2009,1:133.
- [2] 王付. 运用四逆散方证的若干问题[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):289.
- [3] 王付. 四逆散合方辨治肝胆病证[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,15(19):300.
- [4] 都广礼,刘平,王磊,等. 猪血清肝纤维化大鼠肝组织基质金属蛋白酶-9/13 和基质金属蛋白酶组织抑制因子-1/2 表达的动态变化及下瘀血汤对其影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(11):48.
- [5] 陆伦根,曾民德. 肝纤维化非创伤性诊断研究进展[J]. 中华医学杂志,2005,85(15):1078.
- [6] LI C H, Piao D M, XU W X, et al. Morphological and serum hyaluronic acid laminin and type IV collagen changes in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis of rats[J]. World J Gastroenterol,2005,11(48):7620.
- [7] 毕红征,杜春燕,黄国钧. HG 颗粒对肝纤维化大鼠肝脏胶原纤维及羟脯氨酸含量的影响[J]. 郑州大学学报:医学版,2007,42(3):526.
- [8] 青献春,刘丙辰,裴香萍,等. 软干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(16):149.

[责任编辑 聂淑琴]