

软肝解毒煎对大鼠酒精性肝纤维化的防治研究

刘声¹, 杨长福², 张明雪^{3*}, 李彦军⁴

(1. 山西中医学院, 太原 030029; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002;
3. 辽宁中医药大学, 沈阳 110000; 4. 中国藏学研究中心北京藏医院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 观察软肝解毒煎预防治疗酒精性肝纤维化, 阻断肝组织硬化, 改善肝功能的作用。方法: 选用纯系 Wistar 雄性大鼠, 按体重随机均分为正常组、模型组、软肝解毒煎组 3 组。以正常组和模型组为对照, 采用白酒 ig 造模, 同时预防给予软肝解毒煎剂, 剂量为 $21 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 12 周后, 各组大鼠肝脏取材, 应用光镜及电镜观察大鼠肝脏组织及超微结构, 并测定血清单胺氧化酶(MAO)、羟脯氨酸(HP)含量。结果: 软肝解毒煎组 MAO, HP 含量较模型组显著下降, 均 $P < 0.01$, 模型组肝组织大量胶原纤维增生, 脂肪变性严重; 软肝解毒煎组胶原纤维增生不明显, 肝组织学及超微结构损伤显著减轻。结论: 软肝解毒煎能有效预防酒精性肝纤维化。

[关键词] 软肝解毒煎; 酒精性肝纤维化; 超微结构

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0201-03

随着酒精消费的增多, 酒精对人体特别是肝脏的损害日益引起人们的重视。在酒精性肝病中, 由于肝纤维化是肝硬化的前期阶段且具有可逆性, 因此成为研究的焦点^[1]。本课题根据中西医理论, 结合现代化研究进展, 通过实验研究, 探讨软肝解毒煎

抗肝纤维化机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠, 体重 100 ~ 200 g, 来源于辽宁中医学院实验动物中心。清洁级、合格证号 SCXK(辽)19940017。将大鼠饲养在 23 ~ 25 °C 室内, 自由进食、进水。

1.2 受试药物 软肝解毒煎由丹参 15 g, 田七 9 g, 穿山甲 9 g, 虎杖 12 g, 苦参 12 g, 草果 15 g, 草豆蔻 12 g, 柴胡 8 g, 葛花 12 g, 枳椇子 9 g, 白芍 12 g 等药物组成。草药由辽宁中医药大学附属医院中草药房提供, 由中药煎制机煎制成软肝解毒煎(原液), 生

[收稿日期] 20110219(004)

[基金项目] 辽宁省教育厅高等专科学校科研项目(9603321103)

[通讯作者] * 张明雪, 博士生导师, 教授, 从事中医证候的规范化研究, Tel: 13552023626, E-mail: zmx6228@yahoo.com.cn

治疗作用与药物对穴位的刺激和调整作用合二为一, 可以大幅度提高黄萸巴布剂的疗效。

以上试验结果表明, 黄萸巴布剂可显著抑制干酵母、牛奶、伤寒、副伤寒甲、乙三联菌苗所致发热反应; 对醋酸和热板诱发的小鼠疼痛均有明显的抑制作用; 可减轻蛋清所致大鼠足趾肿胀度; 降低醋酸引起的小鼠腹腔毛细血管通透性增高, 证明黄萸巴布剂具有明显的解热、镇痛和抗炎作用, 试验研究结果与临床功效基本相符, 为黄萸巴布剂治疗小儿外感发热提供了一定的动物实验依据。至于黄萸巴布剂是否具有抗菌、抗病毒、促进汗腺分泌及对免疫功能的影响等作用, 则有待进一步研究。

黄萸巴布剂是临床经验方, 将组方中药经提取, 用新型水溶性辅料为基质, 加附加剂制成的外用剂

型。与传统的贴膏相比, 巴布剂是一种载药量大, 对皮肤无过敏刺激反应, 保湿和透气性能良好, 不经肝脏首过消除和胃肠道破坏, 适用范围广, 可反复揭贴的一类新型经皮给药系统^[3], 是中药经皮给药研究与发展的一个方向。

[参考文献]

- [1] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 170, 245, 1063.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 300, 301, 366.
- [3] 崔秀华, 崔淑芹, 张艳, 等. 国内巴布剂的研究现状及展望[J]. 德州学院学报, 2010, 26(4): 80.

[责任编辑 聂淑琴]

药含量为 70.7% ;准确量取软肝解毒煎原液,隔水加热蒸发浓缩而制成软肝解毒煎浓缩液(含生药 $2.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.3 药物及试剂 二锅头白酒选自北京酿酒总厂出品的 56 度红星二锅头;玉米油选自美国出产的产品;吡啶 Sigma C9261 为美国 Sigma 公司产品,由沈阳市试剂大楼购得;胆固醇由北京化工厂出品;羟脯氨酸(HP) Sigma C9891、单胺氧化酶(MAO)试剂 GIBCO17104-019 南京建成生物工程研究所购得。

1.4 仪器 KYUNGSEO MACHINE 13272 7024 型中药煎制机;美国 Bio-rad550 型酶标仪。

2 方法

2.1 动物分组及造模 将纯系雄性 Wister 大鼠 39 只按体重随机均分为正常组、模型组、软肝解毒煎组 3 组。正常组大鼠普通饲料喂养,自由进食进水;模型组大鼠每天清晨给予二锅头白酒-吡啶-玉米油混悬液^[2],下午灌饮生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,另外给予高脂饲料(含 10% 猪油、10% 花生油、15% 炼乳、65% 普通饲料)喂养。其中酒的摄入量为 $8 \sim 12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,随时间的延长而递增;玉米油的摄入量为 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,吡啶的摄入量为 $24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,造模时间为 12 周。造模过程中要不断观察动物一般情况及体重的变化。软肝解毒煎组每天清晨灌白酒混悬液,下午再灌以软肝解毒煎剂,用量为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,按生药剂量为 $21 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 亦同时给予高脂饲料喂养。

2.2 观察项目

2.2.1 血清酶测定 酶联免疫法测羟脯氨酸(HP)、单胺氧化酶(MAO)含量。

2.2.2 病理形态观察

2.2.2.1 光镜观察 摘取肝脏用 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 生理盐水冲洗干净,称肝全重,肉眼观察,在肝脏最大叶距边缘 5 mm 处取小块肝组织,甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色供组织形态学观察。

肝纤维化分级诊断标准^[3]:肝纤维化指肝内有过多胶原沉积,依其对肝结构破坏范围、程度和对肝微循环影响的大小划分为 1(4 期($S_1(S_4)$)). S_1 :包括汇管区、汇管区周围纤维化和局限窦周纤维化或小叶内纤维瘢痕,二者均不影响小叶结构的完整性。 S_2 :纤维间隔即桥接纤维化,主要由桥接坏死发展而来, S_3 虽有纤维间隔形成,但小叶结构大部分仍保留。 S_3 :大量纤维间隔分隔并破坏肝小叶,致小叶结

构紊乱,但尚无肝硬化。此期一部分患者可出现门脉高压和食管静脉曲张。 S_4 :早期肝硬化,肝实质广泛破坏,弥漫性纤维增生,被分隔的肝细胞团呈不同程度的再生及假小叶形成。此期炎症多尚在进行,纤维间隔宽大疏松,改建尚不充分。 S_0 :无肝纤维化表现。

2.2.2.2 电镜观察 取新鲜肝组织,于冰块上迅速切割下 1 mm^3 大小组织块,逐级乙醇、丙酮脱水,2.5% 戊二醛固定,E-pon812 包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸染色,透射电镜观察。

2.3 统计学处理 用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况 模型组大鼠每天早晨灌酒后出现四肢瘫软、步履蹒跚。酣睡时间延长,饮食减少,大便不成形。皮毛疏松无光泽,精神萎靡不振,易激惹,体重后期下降。而正常组大鼠皮毛光泽、反应灵敏、行动自如、饮食正常。中药组一般状况稍差,但明显好于模型组。

3.2 一般组织形态学观察 肉眼观察:正常组大鼠肝脏被膜光滑,色泽暗红,弹性好;模型组肝脏体积增大、表面粗糙、色泽灰白、质地变硬。有些可见白色点状突起,边缘发钝;中药组除有 3 只肝脏体积增大,色泽浅灰,被膜发白外,其余与正常组基本相同。光镜下:正常组肝小叶清晰,结构完整,肝细胞大小、形态、排列均正常;模型组可见不同类型的细胞变性、坏死及胶原纤维增生,相邻肝小叶间纤维组织增生,中央静脉瘀血、肝细胞排列不规则,肝组织正常结构被分割破坏,脂肪变性严重并可见 Mallory 小体;中药组肝组织,肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐,部分区域肝细胞变性,表现为脂肪变性。见图 1。

3.3 电镜观察 正常组肝细胞核圆,核仁明显,核膜清晰,核周间隙均匀,线粒体等细胞器结构正常;模型组肝细胞核萎缩,呈不规则状,无核仁,异染色质浓缩成块,电子密度降低,核周间隙扩张不均,胞质内可见大量的滑面内质网呈扩张,粗面内质网重度扩张成池、线粒体数量减少,肿胀变形,并出现大量大小不一的脂肪滴空泡;中药组肝细胞核大,核仁圆形,轻度萎缩,异染色质浓缩聚集在核周围,胞质内线粒体正常,滑面内质网粗面内质网轻度扩张,细胞内可见少量脂滴,较模型组明显减轻。

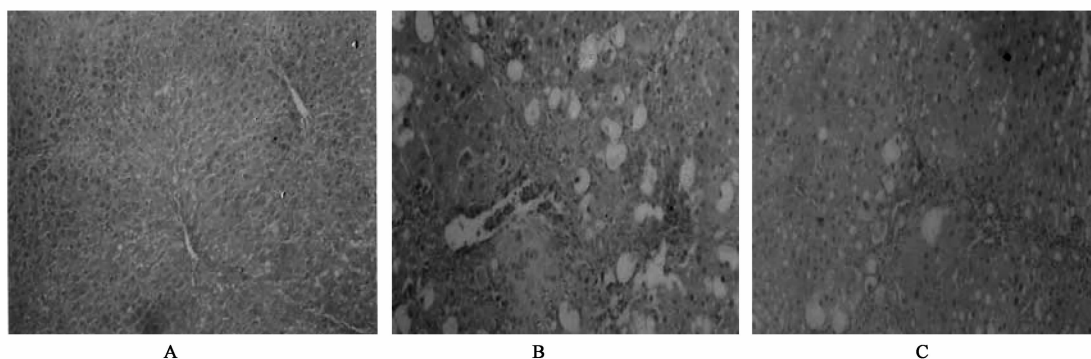
A. 正常组; B. 模型组; C. 软肝解毒煎 21 g·kg⁻¹组

图1 各组大鼠肝脏组织形态(HE, ×200)

3.4 各组大鼠肝脏纤维化分级结果 见表1。

表1 各组大鼠肝脏纤维化分级

组别	剂量/g·kg ⁻¹	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
正常	-	13	0	0	0	0
模型	-	0	2	4	1	1
软肝解毒煎	21	1	5	3	0	0

正常组 13 只大鼠均 S₀ 期而无肝纤维化表现;模型组大鼠肝纤维化以 S₂ 期即桥接纤维化居多;软肝解毒煎组大鼠则以 S₁ 期即汇管区、汇管区周围纤维化居多。

3.5 血清酶学检测 血清 HP, MAO 检测结果显示,模型组较正常组显著升高 ($P < 0.01$);中药组无明显升高,与模型组相比有显著差异 ($P < 0.01$)。见表2。

表2 各组大鼠血清 HP, MAO 的测定 ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	HP	MAO
正常	-	13	2.10 ± 1.82 ¹⁾	1.05 ± 2.03 ¹⁾
模型	-	8	6.34 ± 2.74	3.57 ± 2.05
软肝解毒煎	21	9	2.53 ± 1.80 ¹⁾	2.53 ± 1.80 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

肝纤维化时,肝内主要增加的成分为胶原纤维,而羟脯氨酸 HP 为胶原纤维所特有,因此测定肝羟脯氨酸的含量,可以在一定程度上反映肝纤维化;单胺氧化酶 MAO 参与胶原成熟的最后阶段架桥形成,

在肝纤维化时阳性率可达 80% 以上,并与镜下肝脏纤维化程度相平行。中医学认为,酒精性肝纤维化的基本病机为正衰邪盛,湿热未尽兼血瘀,经隧阻塞,血不养肝,日久损伤脾肾,最终致肝郁脾肾气虚;其中关键是血瘀。本实验所用软肝解毒煎是由葛花、枳椇子、白芍、丹参等组成的中药复方制剂,方中葛花解肌发表、解酒毒,其中大量的黄酮类物质还具有防癌抗癌等特殊作用;枳椇子甘平无毒,具有清热、生津、利小便利便之用,二者共为解湿热酒毒之要药;丹参为活血化瘀良药,配合桃仁、田七、穿山甲,正是针对肝血瘀这一酒精性肝纤维化关键;白茅根清热利尿,配合苦参、草果、白豆蔻、柴胡以清利湿热、疏肝气兼解酒毒。方中各药协同作用,针对酒精性肝纤维化病机,活血、除湿、疏肝、解酒,在实验中取得良好效果。

[参考文献]

- [1] 丁霞,蒙一纯,贾长恩.酒精性肝纤维化动物模型的建立[J].中国中医基础医学杂志,1999,5(7):46.
- [2] 丁霞,蒙一纯,田德禄.天狼猩红偏振光法在酒精性肝纤维化研究中的应用[J].中国中医基础医学杂志,2000,6(3):168.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学会联合修订.病毒性肝炎防治方案[J].中华传染病杂志,2001,19(1):56.

[责任编辑 聂淑琴]