

## 膈下逐瘀汤抗大鼠免疫性肝纤维化的研究

代巧妹, 贾彦\*, 刘宏, 杨婧, 冯涛, 王亚贤, 王蔚, 华东, 肖佳音  
(黑龙江中医药大学基础医学院病理教研室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 观察膈下逐瘀汤逆转大鼠肝纤维化的疗效和对肝损伤的保护作用。方法: 大鼠随机分为空白对照组、膈下逐瘀汤组、猪血清组、猪血清 + 膈下逐瘀汤组。猪血清 0.5 mL/只(2次/周)ip 诱导大鼠免疫性肝纤维化模型, 在制备模型的同时膈下逐瘀汤(含生药 7.37 g·kg<sup>-1</sup>)ig 干预, 共 12 周。实验结束后处死大鼠, HE 染色分析肝组织胶原纤维含量, ELISA 法分析 MMP 胶原酶活性, 分光光度法分析天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)活性。结果: 与模型组比较, 模型 + 膈下逐瘀汤组大鼠肝纤维化程度显著改善( $U = 2.57, P < 0.05$ ), AST 和 ALT 活性显著降低( $P < 0.05$ ), MMP 胶原酶活性显著降低( $P < 0.05$ )。结论: 膈下逐瘀汤对猪血清诱导的免疫性肝纤维化大鼠肝纤维化程度和肝损伤具有明显改善作用。

[关键词] 膈下逐瘀汤; 肝纤维化; 胶原酶活性; 丙氨酸转氨酶; 天冬氨酸转氨酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)22-0187-04

## Effects and Mechanisms of Gexia Zhuyu Decoction on Immunological Hepatic Fibrosis in Experimental Rats

DAI Qiao-mei, JIA Yan\*, LIU Hong, YANG Jing, FENG Tao,  
WANG Ya-xian, WANG Wei, HUA Dong, XIAO Jia-yin

(Department of Pathology, School of Basic Medical Science, Heilongjiang University  
of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanisms underlying the prevention effect of Gexia Zhuyu decoction against porcine serum-induced liver fibrosis in rats. **Method:** Sixty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups as follows: blank control group, Gexia Zhuyu decoction group, Porcine serum group, Porcine serum plus Gexia Zhuyu decoction group. The fibrosis model of rats was achieved by intraperitoneal injection of porcine serum twice weekly for 12 weeks, and simultaneously Gexia Zhuyu decoction administered daily by gavage for 12 weeks. All rats were sacrificed at the end of experiment, and their blood and liver were collected for analysis. The liver histopathology was examined by HE staining. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected by biochemical analysis. MMP collagenase activity in the liver were detected by enzyme linked immunosorbent assay. **Result:** Compared with the porcine serum group, the histopathology of rats given Gexia Zhuyu decoction improved significantly. ALT and AST in serum and MMP collagenase activity in liver were significantly decreased in porcine serum plus Gexia Zhuyu group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Gexia Zhuyu decoction may exert anti-hepatic fibrosis effect in rats via inhibition of hepatic injury and MMP collagenase activity.

[Key words] Gexia Zhuyu decoction; liver fibrosis; MMP collagenase activity; ALT; AST

[收稿日期] 20110313(004)

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金项目(D200820); 黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目(11541344); 黑龙江省中医药科研指导项目(ZHY08-W04)

[第一作者] 代巧妹, 博士, 副教授, 从事免疫病理学研究, Tel: 0451-82195940, E-mail: qq2075@yahoo.com.cn

[通讯作者] \* 贾彦, 硕士, 教授, 中医药防治肝纤维化的基础研究, Tel: 0451-82195940, E-mail: jy570@sohu.com

肝纤维化是肝内纤维结缔组织异常增生的病理过程,是慢性肝病发展为肝硬化甚至原发性肝癌的必经之路<sup>[1]</sup>,肝纤维化是可逆性的病理变化<sup>[2]</sup>。因此,阻断肝纤维化的形成和发展,对于防治肝硬化和原发性肝癌等严重肝脏事件的发生和发展具有重要的意义。目前,肝纤维化尚缺乏针对性较强的治疗药物,中医药防治肝纤维化的研究是近年中西医结合防治慢性肝病的一大热点<sup>[3]</sup>。膈下逐瘀汤是治疗膈下瘀阻气滞的经典名方,基于“气滞血瘀”是肝纤维化的基本病机<sup>[4]</sup>,本研究观察膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠的干预作用,为二次开发有潜力的抗肝纤维化中药复方提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康成年 Sprague-Dawley 大鼠 60 只,190~210 g,雄性,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号 SCXK(京)2002-0003。大鼠适应环境 1 周后开始实验。

**1.2 药品与试剂** 丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒和天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,胶原酶(MMP)活性分析试剂盒由美国 Chemicon 公司提供,猪血清由上海纬群生物技术有限公司提供。膈下逐瘀汤由五灵脂、当归、川芎、桃仁、丹皮、赤芍、乌药、玄胡索、甘草、香附、红花、枳壳(6:9:6:9:6:6:6:3:9:4.5:9:4.5)组成,药材购于齐齐哈尔市中医医院中药房,水煎浓缩后制成含生药 1.5 g·mL<sup>-1</sup>的口服液(由齐齐哈尔医药科学研究所完成)。

**1.3 仪器** Multiskan 354 型酶标仪(芬兰 Labsystems 公司),UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津公司),AH-22 万能研究显微镜(日本 SANJOY 公司),WELL wash 4MK2 洗板机(芬兰 Labsystems 公司),Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统(北京麦克奥迪图像技术有限公司)。

## 2 方法

**2.1 模型制备及给药** 60 只大鼠随机分为 4 组,即空白对照组(Con):ip(0.5 mL/只,2 次/周)和 ig 给予生理盐水(2.0 mL/只,1 次/d);膈下逐瘀汤组(GD):ip 生理盐水(0.5 mL/只,2 次/周),同时 ig 给予膈下逐瘀汤(含生药 7.37 g·kg<sup>-1</sup>,1 次/d);猪血清组(PS):ip 猪血清(0.5 mL/只,2 次/周)和 ig 给予生理盐水(2.0 mL/只,1 次/d);猪血清 + 膈下逐瘀汤组(PS + GD)组:ip 猪血清(0.5 mL/只,2

次/周),同时 ig 给予膈下逐瘀汤(含生药 7.37 g·kg<sup>-1</sup>,1 次/d),共 12 周。

**2.2 样品的采集和处理** 最后 1 次给药后,大鼠用 2% 戊巴比妥钠(2 mL·kg<sup>-1</sup>体重)ip 麻醉后,仰卧位固定,打开腹腔,经下腔静脉采血,4 ℃ 静置 3 h 后,3 000 r·min<sup>-1</sup> × 30 min 离心,-70 ℃ 低温保存,用于检测 ALT 和 AST。摘取肝脏,称重,在肝右叶位置切取小块组织用于 HE 染色病理观察,其余肝组织分装于离心管中低温保存。

**2.3 肝组织病理观察** 大鼠肝组织经 10% 中性甲醛缓冲液固定,石蜡包埋,切片为 5 μm 厚度,多级乙醇脱水,二甲苯透明,作 HE 染色,光镜下观察肝组织的病理变化。肝纤维化分级与计分:0 分,无纤维化;1 分,轻度纤维化,门脉区扩大,有纤维增生;2 分,中度纤维化,门脉周或门脉-门脉间纤维间隔形成,但肝小叶结构未受损;3 分,严重纤维化,纤维形成,肝小叶结构破坏,但无明显肝硬化;4 分,肝硬化,出现由纤维间隔包绕的肝细胞结节,正常肝小叶结构消失,晚期出现肝细胞再生结节。

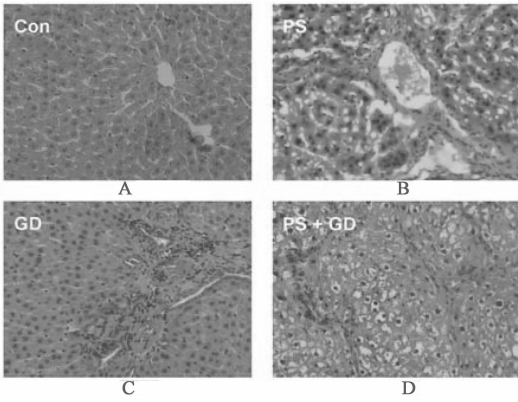
**2.4 AST 和 ALT 活性检测** 全自动生化分析仪试剂盒检测 AST 和 ALT 活性。

**2.5 MMP 胶原酶活性检测** 采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒测定肝组织 MMP 胶原酶(MMP-1,MMP-8 和 MMP-13)活性,具体操作严格按试剂盒说明书进行。根据对照品吸光度值,求出标准曲线回归方程,并计算相应样品活性胶原酶浓度,结果以每微克蛋白的活性胶原酶含量表示。

**2.6 统计学处理** 所有计量资料数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析,组间差异用 SNK 检验。等级资料采用 Ridit 分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对肝纤维化的影响** 肝组织 HE 染色显示,Con 组和 GD 组大鼠肝小叶结构完整,肝索排列整齐,无炎性细胞浸润。PS 组大鼠肝组织纤维间隔纤细,包含明显的胶原沉积,间质细胞成分多,胶原沉积并不弥散,仅限于纤维间隔,见少量细胞损伤。与 Con 比较,PS 组大鼠肝纤维化程度差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。PS + GD 组大鼠纤维化程度有不同程度的减轻,与 PS 组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1 和表 1。



A. 正常组; B. 猪血清组; C. 膈下逐瘀汤 7.37 g·kg<sup>-1</sup>组; D. 猪血清 + 膈下逐瘀汤组

图 1 膈下逐瘀汤对 PS 诱导肝组织纤维化的影响(HE, ×200)

表 1 各组大鼠肝纤维化程度比较

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	各纤维化程度动物数/只					U
			F0	F1	F2	F3	F4	
空白对照	-	15	15	0	0	0	0	4.72 <sup>1)</sup>
膈下逐瘀汤	7.37	15	15	0	0	0	0	4.72 <sup>1)</sup>
猪血清模型		13	0	1	2	6	4	-
猪血清 + 膈下逐瘀汤	7.37	14	0	3	8	2	1	2.57 <sup>1)</sup>

注:U 表示两组之间的 RIDIT 值;与猪血清模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05。

**3.2 对血清 ALT 和 AST 活性的影响** Con 组 ALT 和 AST 分别为 (39 ± 4), (98 ± 9) U·L<sup>-1</sup>; PS 组分别为 (234 ± 16), (333 ± 23) U·L<sup>-1</sup>, ALT 和 AST 活性显著升高 (均 P < 0.05), 分别是 Con 组的 4.93 倍和 2.38 倍; PS + GD 组 ALT, AST (179 ± 17), (242 ± 24) U·L<sup>-1</sup> 与 PS 模型组比降低 23% 和 27%, 具有显著性差异 (P < 0.05)。单独用 GD 的 ALT, AST 分别为 (41 ± 5), (93 ± 8) U·L<sup>-1</sup>, 对基础水平的 ALT, AST 活性没有影响。

**3.3 对 MMP 胶原酶活性的影响** 与 Con 组 (32.28 ± 7.17) mg·g<sup>-1</sup> 蛋白比较, PS 组 (165.21 ± 13.99) mg·g<sup>-1</sup> 蛋白大鼠肝组织 MMP 胶原酶活性显著升高 (P < 0.05), 是 Con 组的 4.11 倍, PS + GD 组 (98.54 ± 11.83) mg·g<sup>-1</sup> 蛋白大鼠肝组织 MMP 胶原酶活性降低 40%, 与 PS 组比较, 具有显著性差异 (P < 0.05)。单独用 GD (33.40 ± 7.47) mg·g<sup>-1</sup> 蛋白对基础水平的 MMP 胶原酶活性没有影响。

#### 4 讨论

近年来,关于抗肝纤维化的研究有不少报道,但目前疗效确切、不良反应少的抗纤维化西药很少,大

多还处在实验研究阶段<sup>[5]</sup>。自 20 世纪 70 年代开始,国内外学者致力于中医药抗肝纤维化的研究,发现中药在抗肝纤维化治疗中具有明显的优势<sup>[6]</sup>。中医并无肝纤维化术语,但根据其临床特征及病理特点,肝纤维则属于中医所说的胁痛、黄疸、积聚等范畴<sup>[7]</sup>。湿热邪毒是肝纤维主要致病因素,血瘀是重要的病理产物及病机的关键环节,故将活血化瘀法贯穿于抗肝纤维化治疗的全程<sup>[8]</sup>。膈下逐瘀汤方出自清代医家王清任所著《医林改错》,由五灵脂、当归、川芎、桃仁、丹皮、赤芍、乌药、玄胡索、甘草、香附、红花、枳壳等 12 味药物组成,具有活血祛瘀、行气止痛之功效。在临床上治疗肝纤维化有确切疗效<sup>[9]</sup>。

肝纤维化是肝脏内纤维结缔组织异常增生和细胞外基质过度沉积的病理过程,是慢性肝损伤向肝硬化甚至原发性肝癌发展的中间环节<sup>[10]</sup>。我国是病毒性肝炎大国,尤以慢性乙型肝炎为最常见<sup>[11]</sup>。临床上,该类患者循环免疫复合物多为阳性,鉴于感染人乙病毒动物模型难以复制,故猪血清诱导免疫性肝纤维化动物模型对防治免疫损伤性肝纤维化有效药物的筛选具有理论和现实意义<sup>[12]</sup>。本研究采用猪血清诱导免疫性肝纤维化动物模型,实验中 Con 组和 GD 组无大鼠死亡,PS 组死亡 2 只,PS + GD 组死亡 1 只。本研究病理结果显示,PS 组大鼠胶原纤维延伸连接,纤维间隔向小叶内伸展形成大小不一纤维包绕,细胞索排列紊乱,纤维间隔增厚,可见假小叶形成,表明猪血清诱导免疫性肝纤维化大鼠模型制备成功,预防性 ig 给予膈下逐瘀汤能明显改善肝细胞损伤及胶原增生。

ALT 和 AST 主要存在于肝细胞的胞液和线粒体中,当肝细胞损害严重时,线粒体内 AST 释放入血<sup>[13]</sup>。正常肝内转氨酶含量约为血中的 100 倍,所以肝脏实质性损害时,只要有 1% 的肝细胞坏死,就可使血清转氨酶活性增加 1 倍。当细胞膜通透性增加时,即使无坏死,肝细胞内的转氨酶也可以顺浓度差而释放入血<sup>[14]</sup>。ALT 和 AST 的升高均与肝实质细胞的多少呈显著负相关,而与总炎症坏死呈显著正相关。血清 AST 水平随肝纤维化分期程度的增加而升高,ALT 水平与肝纤维化的分级无关,只反映肝脏炎症的活动度<sup>[15]</sup>。本研究表明,PS 组大鼠血清 AST 和 ALT 活性显著升高,提示肝细胞严重受损。AST 和 ALT 升高间接提示模型大鼠肝纤维化的形

成。膈下逐瘀汤可显著降低猪血清诱导的肝纤维化模型大鼠血清 AST 和 ALT 活性,表明膈下逐瘀汤可以减轻猪血清诱导的细胞毒性,保护实验性肝纤维化大鼠的肝细胞,明显减轻其肝细胞损伤,从而可减少肝纤维化发生的始动因素,保护肝细胞免于进一步受损。

### [参考文献]

[ 1 ] Ghatak S, Biswas A, Dhali G K, et al. Oxidative stress and hepatic stellate cell activation are key events in arsenic induced liver fibrosis in mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 251(1):59.

[ 2 ] Tsai J H, Liu J Y, Wu T T, et al. Effects of silymarin on the resolution of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *J Viral Hepat*, 2008, 15(7): 508.

[ 3 ] 薛博瑜,胡荣昕,孙丽霞. 中医药治疗肝纤维化临床研究思路探讨[J]. *中华中医药杂志*,2007,22(8): 540.

[ 4 ] 杨倩,冯玉彦,蒋树林. 姚希贤瘀血论治慢性肝纤维化经验[J]. *中华中医药杂志*,2007,22(3):168.

[ 5 ] Douglass A, Wallace K, Koruth M, et al. Targeting liver myofibroblasts: a novel approach in anti-fibrogenic therapy [J]. *Hepato Int*, 2008, 2(4):405.

[ 6 ] 王中甫,宋素华,王玉中,等. 慢性肝炎肝纤维化的中医症状聚类及分期[J]. *世界华人消化杂志*,2010,18(11):1157.

[ 7 ] 丁霞,刘美颖,李晓林,等. 酒精性肝纤维化中医证候学研究[J]. *中华中医药杂志*,2009,24(10):1358.

[ 8 ] 陶翠玲,李延,赵艳波. 慢性病毒性肝炎中医痰瘀互结证与肝纤维化的相关性研究[J]. *中医杂志*,2003, 44(7):535.

[ 9 ] 刘红臣. 膈下逐瘀汤治疗肝脏疾病 332 例观察[J]. *实用中医内科杂志*,2005,19(4):365.

[10] Pereira Tde A, Witek R P, Syn W K, et al. Viral factors induce Hedgehog pathway activation in humans with viral hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinom [J]. *Lab Invest*, 2010, 90(12):1690.

[11] Liu G T. Bicyclol: a novel drug for treating chronic viral hepatitis B and C[J]. *Med Chem*, 2009, 5(1):29.

[12] Liu H, Wei W, Sun W Y, et al. Protective effects of astragaloside IV on porcine-serum-induced hepatic fibrosis in rats and in vitro effects on hepatic stellate cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 122(3):502.

[13] Lin C S, Chang C S, Yang S S, et al. Retrospective evaluation of serum markers APRI and AST/ALT for assessing liver fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis B and C patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Intern Med*, 2008, 47(7):569.

[14] Loaezadel-Castillo A, Paz-Pineda F, Oviedo-Cárdenas E, et al. AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis [J]. *Ann Hepatol*, 2008, 7(4):350.

[15] Jamal M, Worsfold O, McCormac T, et al. A stable and selective electrochemical biosensor for the liver enzyme alanine aminotransferase [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(9):2926.

[责任编辑 聂淑琴]