

中药加味四逆散对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织 型胶原、型胶原的影响

蔡锐¹, 李珊¹, 伍参荣^{1*}, 胡海平²

(1. 湖南中医药大学基础医学院病原免疫学教研室, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学第二附属医院肛肠科, 长沙 410005)

[摘要] 目的: 观察中药复方加味四逆散水煎剂对血吸虫病小鼠肝纤维化形成的影响。方法: NIH 白鼠经皮肤人工感染日本血吸虫尾蚴造模, 随机分为 4 组: B 组(模型组); C 组(吡喹酮组); D 组(吡喹酮 + 加味四逆散组); E 组(吡喹酮 + 秋水仙碱组), 同时设 A 组(正常对照组)。病理证实小鼠肝组织纤维化形成后的第 21 d 开始给药治疗, 第 45 d 时各治疗组分别予以吡喹酮 300 mg·kg⁻¹ 一次性灌胃进行杀虫处理, 第 78 d 处死小鼠, 取肝组织切片 HE 染色观察病理变化, 免疫组化法检测肝组织型、型胶原。结果: 各组小鼠肝组织型胶原积分光密度均值比较: 加味四逆散组明显低于模型组、吡喹酮组及秋水仙碱组($P < 0.05$)。加味四逆散组、秋水仙碱组型胶原的表达明显低于模型组、吡喹酮组($P < 0.05$)。结论: 中药加味四逆散联合吡喹酮能改善血吸虫病小鼠肝组织病理, 降低小鼠肝组织型胶原、型胶原的表达。

[关键词] 加味四逆散; 血吸虫病; 肝纤维化; 秋水仙碱; 吡喹酮; 胶原

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)16-0178-04

Effect of Compound Modified Sini Powder on Expression of Type and Type Collagen in Schistosoma Japonicum-infected Mice

CAI Rui¹, LI Shan¹, WU Can-rong^{1*}, HU Hai-ping²

(1. Department of Pathogenic Biology and Immunology, Preclinical Medicine College,

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Anus-intestines Department, Second Affiliated Hospital,

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410005, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of compound modified SiNi powder(JWSNS) on liver fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected Mice. **Method:** The NIH mice were successfully induced to liver fibrosis by infection with *S. japonicum* and then randomly divided into groups B, C, D and E. The mice in groups C, D and E were treated with praziquantel, praziquantel plus JWSNS and praziquantel plus colchicine, respectively. In addition, a group of uninfected NIH mice(group A) served as normal control. Histological specimens were stained with HE. Expression of type and type collagen were determined by Immunohistochemistry(IHC) . **Result:** The protein levels of type and type collagen in praziquantel plus JWSNS group(group D) were significantly lower than those in model group(group B) , praziquantel group(group C) and praziquantel plus colchicine group(group E) ($P < 0.05$) . These findings showed JWSNS can reduced the hepatic expression of type and type collagen in mice with liver fibrosis. **Conclusion:** JWSNS combined with praziquantel can decrease the expression of type and type

[收稿日期] 20100728(006)

[基金项目] 湖南省科技厅资助项目(04sk1007-26)

[第一作者] 蔡锐, 硕士, 讲师, 研究方向: 中医药抗感染性疾病的免疫学机理, Tel: 13787045457, E-mail: chary1203@sina.com

[通讯作者] * 伍参荣, 教授, 研究方向: 中医药抗感染性疾病的免疫学机理, Tel: 0731-85381154, E-mail: wucanrong@yahoo.com.cn

collagen and improve liver fibrosis due to *S. japonicum*

[Key words] JWSNS; schistosomiasis; liver fibrosis; colchicin; praziquantel; collagen

血吸虫病是一种严重危害人类健康的寄生虫病。临床上可造成急性或慢性肠炎、肝硬化,并导致腹泻、消瘦、贫血与营养障碍等疾患,是人类流行最广的寄生虫病之一。血吸虫感染机体后主要寄生在人体的肝门静脉和肠系膜静脉系统,其虫卵沉积在肝脏及门静脉系统,造成肝组织的损伤,如嗜酸性脓肿的形成,最后导致感染者的肝组织纤维化,以及肝癌等,严重影响感染者的生活质量和生命^[1]。日本血吸虫感染所致的虫卵肉芽肿和肝纤维化是日本血吸虫病 2 种最主要的病理改变,肝纤维化是肉芽肿的间接延伸,是导致日本血吸虫病严重并发症与死亡的最根本的原因。

对血吸虫感染一般用吡 酮杀虫治疗。但血吸虫病杀虫治疗后,如何有效防治肝纤维化的进一步发展,是血吸虫病治疗面临的重要课题。目前,抗肝纤维化治疗尚无特效药。中药具有多途径、多层次、多靶点的综合药理作用,在抗肝纤维化的治疗中发挥重要作用。作者采用中药复方四逆散加丹参联合吡 酮治疗血吸虫病肝纤维化小鼠,观察本方对实验小鼠肝脏 Ⅰ 型、Ⅲ 型胶原表达的影响。

1 材料

1.1 动物 NIH 小白鼠(雌雄各半),共 82 只,体重(20 ± 2) g,鼠龄 6 ~ 8 周(SCXK 湘 2009-0004 湖南中医药大学实验动物中心提供)。

1.2 药品和试剂 加味四逆散浓缩水煎剂:枳实 10 g,柴胡 10 g,白芍 10 g,甘草 10 g(按《伤寒论》张仲景方等量取药),加丹参 10 g,上述药物购自湖南中医药大学附属一医院药房。2 次水煎浓缩,药物浓度为 100% (生药含量 1 g·mL⁻¹),供试验用。秋水仙碱水溶液:秋水仙碱片,0.5 mg/片,购自中国医药集团上海化学试剂公司(批号 060515),用时以生理盐水配成水溶液(0.013 g·L⁻¹)供试验用。吡 酮溶液:吡 酮片,200 mg/片,皖卫药准字 1996 第 100260 号,淮南市第三制药厂生产,批号 0311201,用 1% 羧甲基纤维素钠溶液配成 20 g·L⁻¹ 的悬液(湖南省血吸虫病防治研究所何永康教授赠送)。

1.3 钉螺 实验用全部阳性钉螺,共 60 只(湖南省寄生虫病防治研究所何永康教授赠)。

2 方法

2.1 血吸虫尾蚴孵育 阳性钉螺置于 25 ℃ 环境下

饲养 10 d,使用前将钉螺放入平皿内,用 25 ℃ 脱氯水清洗 3 次,取活钉螺(螺壳口有气泡冒出为活螺)放入 50 mL 烧杯内,用尼龙纱罩住,加满脱氯水,烧置 28 ℃ 环境,离烧杯上方 35 cm 处,用 50 W 灯光照射,静置 4 h,烧杯水面上可见血吸虫尾蚴泳动。

2.2 小鼠造模 小鼠仰卧固定在木板上,组织剪剪去小鼠腹部毛发,面积约 1.5 cm × 1.5 cm,暴露皮肤,用脱氯水将其腹部皮肤浸湿。用细菌接种环在盛有阳性钉螺的烧杯内,蘸取少许疫水,滴在盖玻片上,生物光学显微镜下(接物镜头 × 40)计数尾蚴数(26 ± 2) 条,用镊子小心夹取盖玻片,有尾蚴的一面贴放在小鼠腹部皮肤上,静置感染 3 min。感染后的小鼠放回鼠笼,正常饲养。

2.3 分组给药及处理方法 感染后小鼠随机分为 4 组: B 组(模型组); C 组(吡 酮组); D 组(吡 酮 + 加味四逆散组); E 组(吡 酮 + 秋水仙碱组),同时设 A 组(正常对照组)。感染后第 19 d 每组随机抽取 2 只小鼠解剖观察小鼠肝组织的嗜酸性脓肿,肝门静脉血吸虫成虫数量,病理证实小鼠肝组织纤维化形成后的第 21 d 开始给药治疗, D 组每天灌服加味四逆散浓缩水煎液 0.2 mL/每鼠/次,每日 2 次, E 组每天灌服秋水仙碱溶液每鼠 0.2 mL/次/天,每日 2 次, A, B, C 组灌服生理盐水 0.01 mL·g⁻¹,连续 24 d,第 45 d 时各治疗组分别予以吡 酮 300 mg·kg⁻¹ 一次性灌胃进行杀虫处理,3 d 后各组小鼠继续按原给药方案分别给药,第 78 d(最后 1 次灌胃后),小鼠均禁食不禁水,24 h 后处死,取肝组织备检。

2.4 观察项目、检测指标及方法

2.4.1 肝脏病理组织学观察 HE 染色:取左叶肝组织,多聚甲醛固定,石蜡包埋,用组织切片机(珊顿 325 型,英国)将包埋肝组织切片,常规 HE 染色观察肝脏病理组织改变。

2.4.2 免疫组化染色观察 采用武汉博士德生物工程公司提供的试剂盒,行 Ⅰ 型胶原、Ⅲ 型胶原免疫组织化学染色。染色过程中分别设阳性对照和阴性对照,阴性对照以 PBS 替代 1 抗,阳性对照组切片由博士德公司提供。DAB 显色,阳性细胞及组织呈棕黄色颗粒。每张切片在物镜 10 倍光镜下选择阳性

细胞较多的区域采集 5 个光镜视野(以肉芽肿和汇管区为主),输入 Mico-100 高清晰度彩色病理图文分析系统内,在相同的背底、倍体条件下,选择积分吸光度参数进行计算机定量分析。

2.5 统计学处理 应用 SPSS 14.0 软件进行统计运算,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析比较组间差异,组间两两比较方差齐采用 LSD 检验,方差不齐则采用 Dunnett₃ 检验,以 $P < 0.05$ 判为有统计学意义。

3 结果

3.1 药物对血吸虫病小鼠肝组织病理形态的影响

镜下观察小鼠肝组织病变程度:“-”:肝小叶结构正常,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝窦清晰可见,肝细胞形态规则,核大而圆,无明显变性、坏死,未见纤维组织增生;“+”:肝窦不够清晰,肝细胞形态欠规则,虫卵肉芽肿数量 1~2 个/低倍镜,肝细胞少量炎症细胞浸润,虫卵周围少量梭形细胞包绕,有胶原纤维,肉芽肿周围和汇管区纤维组织增生不明显;“++”:肝窦不清晰可见,肝细胞形态不规则,虫卵肉芽数量明显增多,密度 3~5 个/低倍镜,虫卵周围包绕梭形细胞和胶原纤维,周围可见较

多的炎症细胞浸润;“+++”:小鼠肝内满布大小不等的类圆形虫卵肉芽肿,虫卵位于肉芽肿中央,单个或多个聚集成团,以虫卵为中心,周围可见大量的淋巴细胞、中性粒细胞、成纤维细胞等浸润,虫卵周围纤维组织增生明显。“++++”:小鼠肝内满布大小不等的类圆形虫卵肉芽肿,虫卵位于肉芽肿中央,单个或多个聚集成团,以虫卵为中心,周围可见大量的淋巴细胞、中性粒细胞、成纤维细胞等浸润,部分相邻的虫卵肉芽肿彼此相互融合成团;虫卵周围纤维组织显著增生。从表 1,图 1 中可以看出加味四逆散组小鼠肝组织病变程度明显低于模型组和吡 酮组,各组间小鼠肝组织纤维化病变程度经秩和检验($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠肝组织病理变化比较

组别	肝组织病变程度					合计
	-	+	++	+++	++++	
A	9	1	0	0	0	10
B	0	0	0	2	8	10
C	0	0	1	5	4	10
D	1	2	3	2	2	10
E	0	2	3	3	2	10
合计	10	5	7	12	16	50

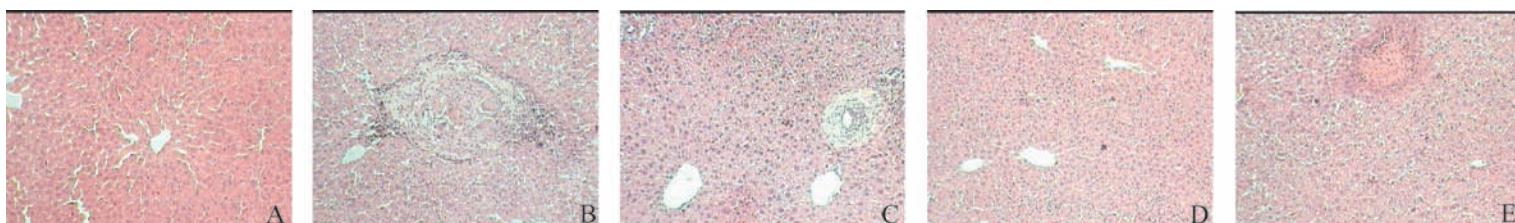


图 1 各组小鼠肝组织病理形态学观察(HE 染色 ×100)

A. 正常组; B. 模型组; C. 吡 酮组; D. 加味四逆散加吡 酮组; E. 秋水仙碱加吡 酮组

3.2 药物对肝组织 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原形成的影响

正常组小鼠肝脏汇管区及中央静脉壁可见少许丝状或点状着色,肝窦周围有少许不连续的点状着色区,淡黄色。模型组和吡 酮组小鼠肝组织 Ⅰ型胶原和 Ⅲ型胶原的表达主要集中在虫卵肉芽肿内部、周围以及汇管区和部分肝细胞,表现为大片状连续的黄色着色区,向周围肝实质内延伸。加味四逆散组和秋水仙碱组小鼠肝内虫卵肉芽肿内部和周围可见 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原的阳性着色区,但范围和着色深度明显少于模型组和吡 酮组。

各组 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原积分吸光度比较:肝组织 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原的表达正常对照组明显低于模型组

和各治疗组($P < 0.05$);加味四逆散组低于秋水仙碱组($P < 0.05$);加味四逆散组与模型组、吡 酮组比较有显著差异($P < 0.05$)(表 2,图 2~3)。

表 2 各组 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原积分吸光度比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Ⅰ型胶原	Ⅲ型胶原
A	14.767 ±6.971	12.088 ±4.598
B	47.532 ±14.894 ¹⁾	43.261 ±6.783 ¹⁾
C	43.742 ±13.201 ^{1,2,4,5)}	41.933 ±11.966 ¹⁾
D	28.246 ±11.527 ^{1,2,3)}	18.951 ±5.814 ^{1,2,3,5)}
E	33.305 ±10.936 ^{1,2,3,4,5)}	30.606 ±4.752 ^{1,2,3,4)}

注:与 A 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 B 组比较²⁾ $P < 0.05$;与 C 组比较³⁾ $P < 0.05$;与 D 组比较⁴⁾ $P < 0.05$;与 E 组比较⁵⁾ $P < 0.05$ 。

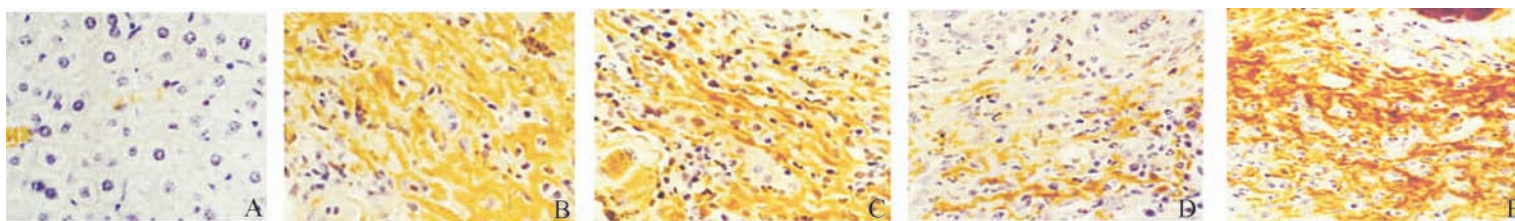


图 2 各组小鼠肝组织 $\alpha_1(\text{I})$ 型胶原免疫组化染色观察($\times 200$)

A. 正常组; B. 模型组; C. 吡 啶 酮组; D. 加味四逆散加吡 啶 酮组; E. 秋水仙碱加吡 啶 酮组

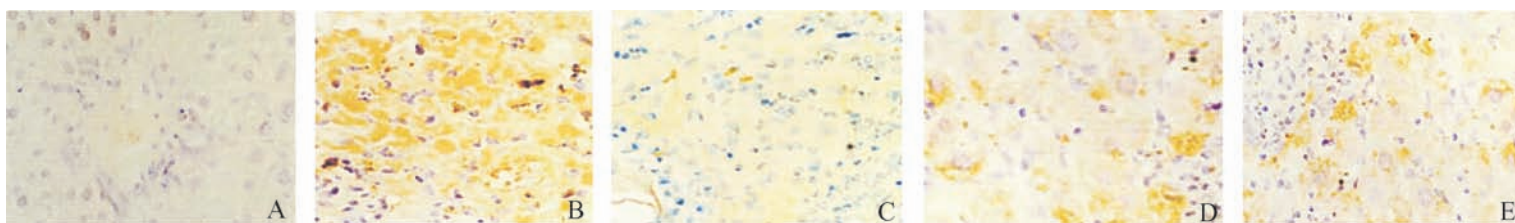


图 3 各组小鼠肝组织 $\alpha_2(\text{I})$ 型胶原免疫组化染色观察($\times 200$)

A. 正常组; B. 模型组; C. 吡 啶 酮组; D. 加味四逆散加吡 啶 酮组; E. 秋水仙碱加吡 啶 酮组

4 讨论

肝脏 $\alpha_1(\text{I})$ 型胶原水平与肝组织纤维化之间有着密切关系, $\alpha_1(\text{I})$ 型胶原表达水平在肝组织纤维化形成的早期即开始升高, 随着肝组织纤维化的加重, 其 $\alpha_1(\text{I})$ 型胶原表达水平也随之增高, 提示 $\alpha_1(\text{I})$ 型胶原表达水平能反映出肝纤维化的发展趋向^[2]。

中医学基础理论认为, 肝藏血, 主疏泄, 是全身气血调节的枢纽。若肝失疏泄, 则肝气郁结, 横逆犯脾, 脾失健运, 致肝郁脾虚; 肝郁气滞则血行不畅, 脾虚则气血生化无源, 最终导致全身气机失调或紊乱, 在肝脏则表现为“积聚”, 即西医学的脂肪肝、肝纤维化和肝硬化。中医主要采用疏肝健脾法进行治疗^[3]。四逆散出自《伤寒论》张仲景方, 由枳实、柴胡、白芍、甘草四味药组成, 具有透邪解郁、疏肝理脾之功效。方中柴胡引药入肝经, 枳实能使肝气得疏, 白芍柔肝止痛, 甘草和诸药, 其甘草甜素有抗 HBV, 保护肝细胞作用^[4]。四药合用使肝气疏、脾胃健, 则气、血、津液、水谷精微生化有源, 输布运行正常, 从而改善“积聚”症状, 起到抗肝纤维化的作用。丹参是目前临床上治疗慢性肝病常用的药物, 尤其在抗肝纤维化中应用广泛。丹参归心、肝经, 味苦, 药性微寒, 具有化瘀止痛、活血调经、养心除烦之功效。《神农本草经》谓之: “主心腹邪气……寒热积聚, 破癥除瘕……”。现代药理学研究证实: 丹参能保护肝

细胞; 抑制成纤维细胞增殖及胶原合成, 改善肝功能^[5]; 其脂溶性成分丹参酮能抑制 HSC 增殖和 $\alpha_1(\text{I})$ 型胶原分泌^[6]。中药四逆散加丹参使得药物抗肝纤维化作用达到事半功倍的效应。

本次试验结果显示, 加味四逆散能有效改善血吸虫病小鼠肝组织病理变化, 减少 $\alpha_1(\text{I})$ 型、 $\alpha_2(\text{I})$ 型胶原的表达, 在抗血吸虫病肝纤维化方面有明显的优势。因此进一步探究其作用机制, 为临床实践提供更为有力的理论与实验依据。

[参考文献]

- [1] 林丹丹, 李平, 顾里, 等. 江西省九江地区日本血吸虫病与肝癌的关系[J]. 流行病学杂志, 2001, 6: 214.
- [2] 崔东来, 姚希贤, 姚金锋, 等. 丹参抗大鼠肝纤维化作用与机制研究[J]. 中华临床医药杂志, 2002, 3(13): 5.
- [3] 赵晓娟. 加味四逆散抗肝纤维化大鼠机理研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2009, 26(5): 7.
- [4] 田德欣, 寇淑蓉. 甘草甜素治疗病毒性肝炎临床观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(21): 2525.
- [5] 姜兆金, 雷明君. 甘利欣联合复方丹参治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究[J]. 肝脏, 2007, 12(2): 159.
- [6] 孙瑞芳, 刘立新. 丹参及其单体治疗肝纤维化的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2009, 2(9): 88.

[责任编辑 邹晓翠]