

广西桂郁金对肝纤维化大鼠肝脏组织病理的影响

秦华珍^{1*}, 李彬², 时博¹, 李世阳¹, 邓家刚¹, 郑作文¹

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 南宁输血医学研究所, 南宁 530003)

[摘要] 目的: 观察广西桂郁金(GGYJ)的抗肝纤维化(HF)作用。方法: 采用 sc 四氯化碳油溶液造成大鼠 HF 模型, 以秋水仙碱(Col)为阳性对照, 测定肝组织羟脯氨酸(Hyp)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量, 观察 HE 和 Masson 染色后的肝组织病理学变化。结果: GGYJ 能明显降低肝组织中 Hyp, MDA 的含量, 升高肝组织中 SOD, GSH-Px 的含量。GGYJ 高、中剂量组能够明显改善 HF 的程度, 而低剂量组的作用不明显。结论: GGYJ 具有抗 HF 作用, 其机制与清除自由基、抗脂质过氧化、抗肝损伤有关。

[关键词] 广西桂郁金; 肝纤维化; 病理

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0129-04

Effect of Guangxi *Curcuma Kwangsiensis* on Hepatic Histopathology of Hepatic Fibrosis in Rat

QIN Hua-zhen^{1*}, LI Bin², SHI Bo¹, LI Shi-yang¹, DENG Jia-gang¹, ZHENG Zuo-wen¹

(1. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;

2. Nan-Ning Institute of Transfusion Medicine, Nanning 530003, China)

[Abstract] Objective: To observe anti-hepatic fibrosis (HF) effect of Guangxi *Curcuma kwangsiensis* (GGYJ). **Method:** The models of rat with HF were duplicated by hypodermic injection CCl₄. Colchicine (Col) were used as a positive control. The quantities of hydroxyproline (Hyp), Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and Glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver tissue were determined. The pathological shapes of liver tissue and the level of HF by using HE and Masson staining were observed. **Results:** GGYJ could reduce remarkably the quantities of Hyp and MDA, and rise the quantities of SOD and GSH-Px. Compared with model group, there are obvious differences in high dose and mid-dose groups of GGYJ ($P < 0.01$). And there are differences in low dose groups of GGYJ ($P < 0.05$). Meanwhile, high dose and mid-dose groups of GGYJ could reduce remarkably the level of fibrosis in liver tissue ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while low dose groups of GGYJ did 'nt have this action. **Conclusions:** GGYJ has anti-HF action. The actions of high dose group of GGYJ are better. Its mechanisms may relate to clearing out free radical, anti-lipoid peroxidation and anti-liver injury.

[Key words] Guangxi *Curcuma Kwangsiensis*; hepatic fibrosis; histopathology

GGYJ 是商品药材郁金的品种之一, 为姜科植物广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* 的块根。主产于广西, 近几年产量约占全国郁金总产量的 60% 以

上^[1], 对我国市场有较大的影响力。郁金具有活血化瘀、行气解郁、清心开窍、利胆退黄的功效, 临床常用于治疗各种肝胆疾病^[2-3]。以郁金和其他中药组成的复方如金三莪、虎金颗粒等实验与临床研究均显示有良好的抗 HF 作用^[4-6]。至今对 GGYJ 抗 HF 作用的研究尚无报道。为促进 GGYJ 的进一步开发利用, 笔者对其抗 HF 作用进行了研究。

[收稿日期] 2009-07-13

[基金项目] 广西科技厅自然科学基金项目(桂科自 0542099)

[通讯作者] * 秦华珍, Tel: 13807816597, E-mail: qinhuazhen@

126.com

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 120 ~150 g,由广西药品检验所实验动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK 桂 2003-2001,实验动物编号 20050805-2。

1.2 药材 GGYJ:采集于广西玉林,经广西中医学院中药鉴定学教研室蔡毅教授鉴定为姜科植物广西莪术 *C. kwangsiensis* 的块根。取 GGYJ 药材分别加 12 倍、10 倍量水提取 2 次,第 1 次 2 h,第 2 次 1.5 h,提取液经过过滤、合并、浓缩成可供灌胃的稠膏,相当于生药 3.4 g·mL⁻¹。

1.3 试剂 CCl₄:分析纯,天津市博迪化工有限公司,批号 20040710; Col 片:昆明制药集团股份有限公司,批号 20050216; Hyp 试剂盒:南京建成生物工程研究所,20051103; MDA, SOD, GSH-Px 试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号 050606。

1.4 仪器 CHEM300 半自动生化分析仪,德国豪迈克公司;高速低温离心机,德国 Eppendorf, Centrifuge 5804R; LG16-W 型离心机,北京医用离心机厂; JY92-2D 超声波细胞粉碎机,宁波新芝科器研究院; 8453 紫外-可见分光光度计,美国 Agilent; 722-紫外光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂。

2 方法

2.1 动物分组与给药 动物分笼适应性饲养 1 周后开始实验。取大鼠 120 只,雌雄各半,随机分为 6 组,即空白对照组、模型对照组、Col 对照组 (Col)、GGYJ 高、中、低剂量组,空白组动物 24 只,模型组 24 只,其余各组 18 只。各组均 ig, Col 组 ig Col 水溶液 0.2 mg/kg, GGYJ 高、中、低剂量组 ig GGYJ 水提取物混悬液,给药剂量分别为 20, 10, 5 g·kg⁻¹, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹, 空白对照组与模型对照组 ig 同体积生理盐水,连续给药 8 ~12 周。

2.2 动物造模 实验开始时,除空白对照组外,其余各组每只大鼠首次于背部 sc 纯 CCl₄ 5 mL·kg⁻¹,以后 sc 40% CCl₄ 花生油 3 mL·kg⁻¹,每周 2 次,共 10 周;空白组首次注射等体积生理盐水,以后 sc 花生油 3 mL·kg⁻¹。在造模同时,实验期间所有大鼠标准饮食。每天观察大鼠的一般状况(饮食、行为、精神状态、毛发等)的变化,每周称量体重 2 次。于 8, 10, 12 周随机取空白组和模型组各 2 只大鼠,处死,取肝脏做病理切片,如果造模成功,则进行标本采集,如果造模不成功,则继续延长造模时间,直到

造模成功为止。

2.3 指标检测 禁食 24 h 后,处死各组大鼠,仰位固定于板上,剖腹,取肝脏,去筋膜,用肉眼观察大鼠肝脏的外形、体积、颜色、质地改变,将肝脏置于冰生理盐水中充分洗涤后,一部分用生理盐水制备成 10% 肝匀浆,分别测定组织匀浆中的 Hyp, MDA, SOD, GSH-Px 含量。MDA 采用硫代巴比妥酸法, SOD 采用黄嘌呤氧化酶法, GSH-px 采用二硫代二硝基苯甲酸法, Hyp 测定采用盐酸水解法,均按试剂盒说明书步骤操作。另一部分肝组织固定于多聚甲醛溶液中,分别做 HE, Masson 染色,按照 2000 年 9 月西安会议制定的《病毒性肝炎防治方案》^[7] 进行纤维化程度分期: 0 期,无纤维化; S1, 汇管区扩大,轻度纤维化; S2, 汇管区周围纤维化,纤维隔形成,小叶结构保留; S3, 纤维隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化; S4, 早期肝硬化。采用双盲法制片,光镜下阅片,观察 HF 组织病理学改变,对记分进行统计。

2.4 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,组间比较采用方差分析,病理组织学检查结果采用 Ridit 分析方法, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 动物数量变化 实验进行至第 12 周,造模组大鼠形成明显的 HF,动物死亡数量较多,空白组动物死亡原因是由于 ig 给予生理盐水操作不当造成,动物数量变化见表 1。

表 1 实验前后动物数量变化

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	n	造模过 程死亡	送病理切片			剩余
				10 周	11 周	12 周	
正常	—	24	2	4	4	4	10
模型	—	24	6	2	2	2	12
Col	2 × 10 ⁻⁴	18	7	0	11		
GGYJ	20	18	6	0	12		
GGYJ	10	18	7	0	11		
GGYJ	5	18	10	0	8		

3.2 对 HF 大鼠肝脏组织 Hyp, MDA, SOD 及 GSH-Px 含量的影响 表 2 显示:与空白组比较, HF 模型组肝脏 Hyp, MDA 含量明显升高 ($P < 0.01$), SOD, GSH-Px 含量明显降低 ($P < 0.01$)。Col 组、GGYJ 各剂量组均能明显降低肝脏组织 Hyp 与 MDA 的含量;与模型组比较, Col 组、GGYJ 高、中剂量组 $P < 0.01$, 低剂量组 $P < 0.05$ 。在降低 Hyp 含量方面, Col 组和

GGYJ 高、中剂量组作用相当, GGYJ 高剂量组的作用优于中、低剂量组 ($P < 0.05$)。在降低 MDA 含量方面, Col 组和 GGYJ 高剂量组作用相当, Col 组和 GGYJ 高剂量组的作用优于 GGYJ 中、低剂量组 ($P < 0.01$)。Col 组、GGYJ 各剂量组均能明显升高肝脏组织 SOD 与 GSH-Px 含量; 与模型组比较, Col 组、GGYJ 高、中剂量组升高 SOD 的作用有非常显著性

差异 ($P < 0.01$), GGYJ 低剂量组有显著性差异 ($P < 0.05$); Col 组、GGYJ 各剂量组升高 GSH-Px 的作用有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。在升高 SOD 含量方面, GGYJ 高、中剂量组的作用与 Col 组相当; GGYJ 高剂量组的作用优于中、低剂量组 ($P < 0.01$)。在升高 GSH-Px 含量方面, Col 组与 GGYJ 各剂量组、GGYJ 各剂量组相互之间无明显的量效关系。

表 2 GGYJ 对 HF 大鼠肝脏组织 Hyp, MDA, SOD, GSH-Px 含量的影响 (柳士)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	Hyp / $mg \cdot g^{-1}$	MDA / $u \cdot L^{-1}$	SOD / $u \cdot L^{-1}$	GSH-Px / $u \cdot L^{-1}$
正常	—	10	1.74 ± 0.38 ²⁾	9.95 ± 1.13 ²⁾	44.8 ± 3.32 ²⁾	183.82 ± 22.22 ²⁾
模型	—	12	4.47 ± 0.52	26.97 ± 3.38	26.97 ± 3.37	87.48 ± 13.41
Col	0.2	11	2.62 ± 0.41 ²⁾	18.59 ± 1.74 ²⁾	35.87 ± 3.58 ²⁾	122.27 ± 12.63 ²⁾
GGYJ	20	12	2.55 ± 0.17 ²⁾	17.28 ± 2.73 ²⁾	38.32 ± 3.72 ²⁾	136.25 ± 23.92 ²⁾
GGYJ	10	11	2.84 ± 0.34 ^{2,4)}	23.04 ± 3.17 ^{1,4,6)}	33.04 ± 3.05 ^{2,6)}	126.21 ± 18.28 ²⁾
GGYJ	5	8	3.01 ± 0.49 ^{1,3,5)}	23.02 ± 2.69 ^{1,4,6)}	30.52 ± 3.29 ^{1,4,6)}	122.36 ± 21.70 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 Col 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与 GGYJ 高剂量组比较, ⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.3 对 HF 大鼠肝脏组织病理变化的影响

3.3.1 肝脏大体病变 空白组大鼠肝脏外观正常; 模型组肝脏体积肿大, 质地较韧, 边缘较钝, 颜色呈暗红色, 表面粗糙; Col 组与 GGYJ 各剂量组大鼠肝脏在色泽、质地、大小及表面光滑度方面较模型对照组均有明显改善。Col 组与 GGYJ 高剂量组改善较明显。

3.3.2 HF 分级和半定量计分 结果见表 3。

表 3 各组大鼠 HF 程度 / 分

组别	<i>n</i>	HF 分级					积分
		-	+	++	+++	++++	
		0	1	2	3	4	
正常	10	9	1	0	0	0	0.10 ± 0.3 ²⁾
模型	11	0	0	3	5	3	3.00 ± 0.74
Col	11	1	3	4	3	0	1.82 ± 0.94 ²⁾
GGYJ 大	12	1	3	6	2	0	2.00 ± 0.71 ²⁾
GGYJ 中	11	0	3	4	3	1	2.18 ± 0.94 ²⁾
GGYJ 小	8	0	2	3	2	1	2.25 ± 0.97

表 3 显示: 与空白组比较, 模型组 HF 程度有非常显著性增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, Col 组、GGYJ 高、中剂量组能够明显改善 HF 的程度 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 而 GGYJ 低剂量组的作用不明显。

3.3.3 肝脏组织病理变化 空白组肝细胞结构正常, 无炎性细胞浸润 (见图 1)。模型组肝细胞排列紊乱、浊肿明显, 有点状坏死, 可见核碎裂、嗜酸小体。肝组织脂肪变性广泛, 部分有坏死。汇管区炎性细胞浸润, 结缔组织增生明显, 纤维束分割肝组

织, 形成多个假小叶, 原小叶结构破坏或消失, 由门管区和中央静脉伸出粗大胶原纤维条索分割、包绕肝小叶形成假小叶, 纤维间隔内有大量单核、淋巴、嗜酸性细胞等炎症细胞及成纤维细胞浸润 (见图 2)。

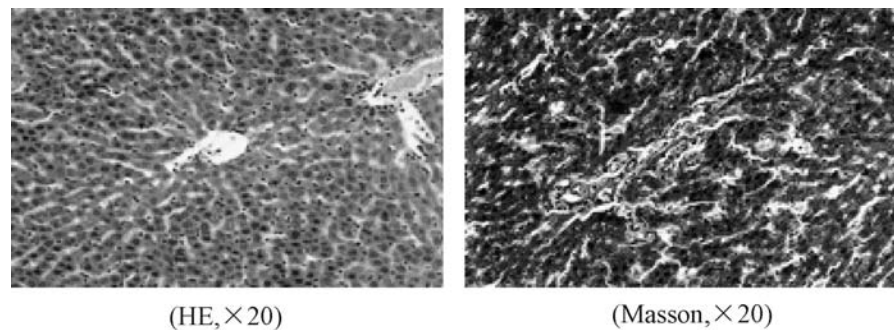


图 1 空白组

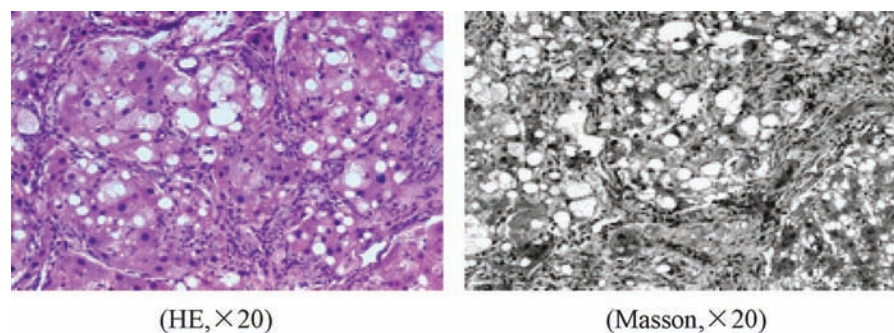


图 2 模型组

Col 组、GGYJ 高、中剂量组肝细胞脂肪样变性和小叶周围形成的纤维间隔较模型组明显减轻, 肝组织胶原纤维明显减少, 肝小叶结构也有所恢复, 但仍有部分点状细胞坏死, 汇管区可见少量细胞浸润。部分面积肝细胞脂肪变性、空泡变性及嗜酸性变, 汇管区扩张, 小胆管增生, 中央静脉周围可见胶原纤维沉积环绕, 个别可见有细小的纤维结缔组织形成汇

管区与中央静脉间的桥连,肝小叶结构基本正常(见图 3~5)。GGYJ 低剂量组肝细胞病理变化较模型组差异不显著,但肝小叶仍可见(见图 6)。

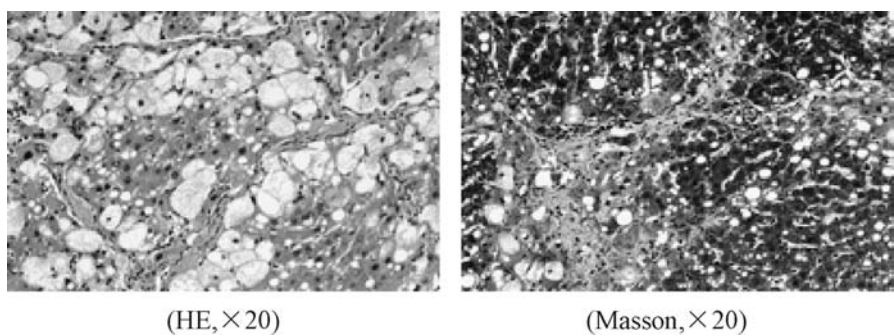


图 3 coL 组

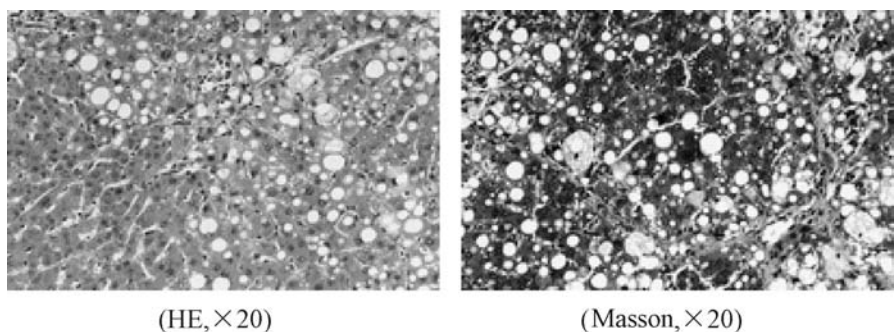


图 4 GGYJ 20 g·kg⁻¹组

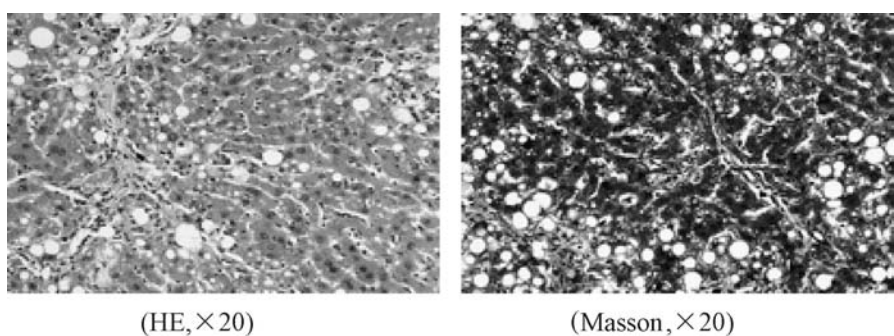


图 5 GGYJ 10 g·kg⁻¹组

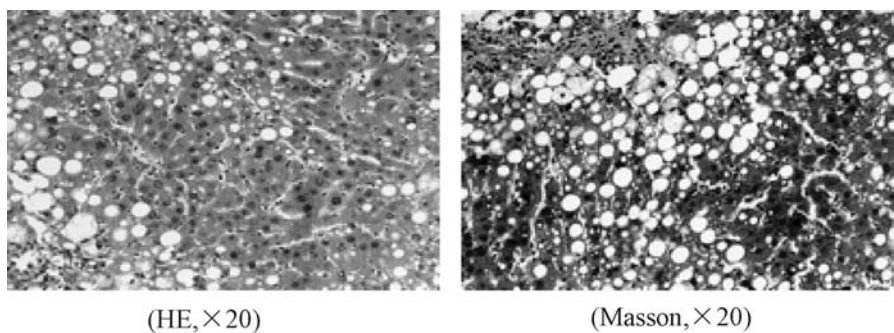


图 6 GGYJ 5 g·kg⁻¹组

4 讨论

CCl₄ 诱导的 HF 动物模型在形态学、病理生理学某些方面与人 HF 相似^[8]。而脂质过氧化是肝损伤与纤维化之间病理发展的中间环节。因此,抗脂质过氧化在抗肝损伤和抗 HF 中的作用至关重要。

本实验结果显示,GGYJ 能降低 HF 大鼠肝组织中 Hyp, MDA 的含量,升高 SOD, GSH-Px 的含量,具有良好的抗脂质过氧化作用。病理学检查显示,GGYJ 能减轻炎症反应,减少肝细胞损害,恢复变性的细胞结构,抑制胶原纤维增生。说明 GGYJ 具有良好的抗 HF 作用,其机理与保护自由基、抗脂质过氧化、抗肝损伤等有关。

[参考文献]

- [1] 姜宏伟,叶虹. 郁金治疗淤胆型肝炎的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(4): 433.
- [2] 刘素娟. 四金利胆排石汤治疗胆石症 86 例[J]. 中医药学刊, 2005, 23(9): 1728.
- [3] 张全月. 自拟郁金降酶汤治疗血清转氨酶升高 45 例[J]. 浙江中西医结合杂志, 2006, 16(11): 717.
- [4] 黄兆胜,黎俏梅,王宗伟,等. 虎金颗粒对 HF 大鼠血清型前胶原、血清透明质酸及层粘蛋白作用的动态观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(6): 447.
- [5] 黎俏梅,黄兆胜,黄真炎等. 虎金颗粒抗大鼠 HF 的免疫组化和超微结构观察[J]. 暨南大学学报(医学版), 1999, 20(6): 104.
- [6] 秦华珍,郑作文,邓家刚,等. 广西桂郁金对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 广西中医学院学报, 2008, 11(1): 1.
- [7] 中华医学会传染病与寄生虫学会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324.
- [8] 王晓萍. 肝纤维化动物模型制作的研究进展[J]. 甘肃中医, 2006, 19(1): 13.

[责任编辑 何伟]