

冷饭团对实验性肝纤维化的防治作用及其机制

李文胜^{1*}, 陈骏¹, 文家萍¹, 郭莲军²

(1. 湖北省宜昌市夷陵区医疗保险局, 湖北 宜昌 443100; 2. 华中科技大学同济医学院, 武汉 430030)

[摘要] 目的:探讨冷饭团对实验性肝纤维化的防治作用及其机制。方法:采用 CCl₄ 和高脂低蛋白等复合因素诱导大鼠实验性肝纤维化,以秋水仙碱为对照,观察冷饭团对大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、白蛋白(Alb)、血清透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)和肝组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、羟脯氨酸(Hyp)的影响;并作肝脏病理切片,光镜下观察组织学改变。结果:冷饭团能显著降低实验性肝纤维化大鼠血清 ALT,AST 活性,升高血清 Alb 含量;显著降低血清 HA, LN, PCⅢ 和肝组织 Hyp, MDA 含量,提高肝组织 SOD 活性;并能明显减轻大鼠肝细胞坏死、肝脏脂肪变性和胶原纤维增生程度。结论:冷饭团有较好的抗肝纤维化作用,其机制可能与抗脂质过氧化作用有关。

[关键词] 冷饭团;肝纤维化;大鼠

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0199-03

Research on the Preventive and Therapeutic Effects of *Kadsura coccinea* on Experimental Hepatic Fibrosis in Rat and the Related Mechanism

LI Wen-sheng^{1*}, CHEN Jun¹, WEN Jia-ping¹, GUO Lian-jun²

(1. Hospitalization Insurance Bureau of Yiling District in Yichang City, Yichang 443100, China;
2. Tongji Medical School, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the preventive and therapeutic effects of *Kadsura coccinea* on experimental hepatic fibrosis in rat and to explore its mechanism. **Method:** The rat model of hepatic fibrosis was induced by giving CCl₄, rich fat and poor protein. Having a controlled trial with colchicines, *Kadsura coccinea*'s effects on alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin (Alb), hyaluronate acid (HA), laminin (LN), type III procollagen (PC III) in serum and malondialdehyde (MDA), dismutase (SOD), hydroxyproline (Hyp) in liver tissue were determined. The pathological section of the rat's liver was examined under an optical microscope. **Result:** *Kadsura coccinea* significantly decreased the activity of ALT, AST and the level of HA, LN, PC III in rat serum, and the level of Hyp, MDA in liver tissue. It also increased the level of Alb in serum and the activity of SOD in liver tissue. The degree of necrosis of liver cells, liver fat's degeneration and collagen fiber hyperplasia were alleviated significantly. **Conclusion:** *Kadsura coccinea* shows significant preventive and therapeutic effects on experimental hepatic fibrosis. The possible mechanism of its preventive and therapeutic effects may be related to its anti-lipid peroxidation.

[Key words] *Kadsura coccinea*; hepatic fibrosis; rat

[收稿日期] 20100105(007)

[基金项目] 湖北省重大科学技术成果(EK010175)

[通讯作者] *李文胜,副主任药师,研究方向:中药药理学,
Tel: (0717) 7201544, 15071811988, E-mail:
ylqjsqx@163.com

冷饭团为民间常用草药,系木兰科植物冷饭团 *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith 的根及藤茎。其性味苦、温,功能行气活血、消胀止痛,用于治疗肝炎、腹胀、腹痛等症^[1]。冷饭团主要含有联苯环辛烯类木脂素,这类化学成分具有保护肝脏、抗氧化、拮抗血小板活化因子等活性^[2]。笔者采用四氯化碳

(CCl₄) 诱导大鼠实验性肝纤维化, 观察冷饭团对其防治作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物 清洁级 Wistar 大鼠, 体质量(180 ± 20) g, 雌雄兼用(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 合格证号: 医动字第 19050 号)。

1.2 药物与试剂 冷饭团(采自宜昌市夷陵区, 切薄片, 干燥, 水煎 2 次, 每次 30 min, 滤过, 合并滤液, 置水浴上浓缩至 1 mL 含生药 1 g); 秋水仙碱片(云南植物药业有限公司, 批号 20060302, 临用时研末以蒸馏水配成 0.04 mg·mL⁻¹ 混悬液); 四氯化碳(郑州化学试剂二厂, 批号 060109)。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、白蛋白(Alb)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(南京建成生物工程研究所); 透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)放射免疫分析试剂盒(上海海研医学生物技术有限公司)。

1.3 仪器 SN-682 型放射免疫 γ 计数器(上海核福光电仪器有限公司); DL-8R 冷冻离心机(上海离心机械研究所); 日立 7060 型全自动生化分析仪。

1.4 分组及造模 取 Wistar 大鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各鼠均按 0.3 mL·100 g⁻¹ 体重皮下注射 40% CCl₄ 橄榄油溶液, 每周 2 次, 共 6 周。在整个实验中, 正常组大鼠饲以全价颗粒饲料, 其余各鼠均以饲料配方一(79.5% 纯玉米粉 + 20% 猪油 + 0.5% 胆固醇压制成颗粒饲料) 喂养 2 周, 继以饲料配方二(89.5% 纯玉米粉 + 10% 猪油 + 0.5% 胆固醇压制成颗粒饲料) 喂养至第 6 周末。另以 30% 乙醇按 1 mL·100 g⁻¹ 体重 ig, 每周 2 次, 共 6 周。

1.5 给药方法 正常组和模型组分别以生理盐水 5 mL·kg⁻¹ ig, 冷饭团低剂量组以冷饭团 2.5 g·kg⁻¹ ig, 冷饭团高剂量组以冷饭团 5 g·kg⁻¹ ig, 秋水仙碱组以秋水仙碱 0.2 mg·kg⁻¹ ig。各组均从实验第 2 天开始给药, 每日 1 次, 共 6 周。

1.6 检测指标及方法 于实验第 43 天, 击昏大鼠, 断头取血 5 mL, 离心分取血清。按试剂盒内说明方法, 用全自动生化分析仪检测大鼠血清 ALT, AST, Alb, 采用放射免疫法测定大鼠血清 HA, PCⅢ。剖腹, 取肝左叶组织约 1 g, 用冰冷生理盐水冲洗后称重, 4 ℃ 下用冷生理盐水制成 10% 肝组织匀浆, 离心

分取上清液。按试剂盒内说明方法, 检测大鼠肝组织匀浆中 MDA, SOD, Hyp 含量。另于肝右叶取小块肝组织, 以 10% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋作病理切片, 苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 染色, 光镜下观察肝组织学改变和胶原纤维增生情况, 按文献^[3] 分级分期标准判定肝纤维化程度(S)。

1.7 统计学处理 使用 SAS6.12 统计软件处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异显著性比较采用 *t* 检验, 分级资料比较采用秩和检验。

2 结果

2.1 冷饭团对大鼠血清 ALT, AST, Alb 的影响 冷饭团高、低剂量组和秋水仙碱组大鼠血清 ALT 和 AST 显著低于模型组, 冷饭团高剂量组和秋水仙碱组大鼠血清 Alb 含量明显高于模型组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。见表 1。

表 1 冷饭团对大鼠血清 ALT, AST, Alb 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	Alb/g·L ⁻¹
正常	-	50.0 ± 13.5 ²⁾	121.8 ± 25.1 ²⁾	33.3 ± 2.1 ²⁾
模型	-	89.0 ± 17.6	240.8 ± 69.7	28.1 ± 2.1
秋水仙碱	2 × 10 ⁻⁴	61.2 ± 20.5 ¹⁾	158.7 ± 28.2 ¹⁾	31.3 ± 2.9 ¹⁾
冷饭团	2.5	55.2 ± 19.2 ²⁾	154.0 ± 24.8 ¹⁾	30.5 ± 1.8
	5.0	54.3 ± 13.9 ²⁾	141.9 ± 34.9 ²⁾	31.6 ± 2.5 ¹⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01 (下同)。

2.2 冷饭团对大鼠血清 HA, LN, PCⅢ 的影响 冷饭团高、低剂量组和秋水仙碱组大鼠肝纤维化各项指标均显著低于模型组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。见表 2。

表 2 冷饭团对大鼠血清 HA, LN, PCⅢ 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HA/μg·L ⁻¹	LN/μg·L ⁻¹	PCⅢ/μg·L ⁻¹
正常	-	137.6 ± 18.2 ²⁾	48.2 ± 10.7 ²⁾	78.9 ± 24.5 ²⁾
模型	-	458.2 ± 104.7	109.3 ± 29.2	242.4 ± 46.7
秋水仙碱	2 × 10 ⁻⁴	206.3 ± 52.5 ²⁾	68.7 ± 21.6 ²⁾	125.2 ± 29.8 ²⁾
冷饭团	2.5	243.2 ± 54.1 ²⁾	82.4 ± 19.5 ¹⁾	153.5 ± 45.2 ¹⁾
	5.0	214.7 ± 46.6 ²⁾	76.8 ± 24.2 ¹⁾	134.4 ± 18.6 ²⁾

2.3 冷饭团对大鼠肝组织 MDA, SOD, Hyp 的影响 冷饭团高、低剂量组和秋水仙碱组大鼠肝组织 MDA, Hyp 明显低于模型组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 冷饭团高、低剂量组大鼠肝组织 SOD 明显高于模型组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。见表 3。

表 3 冷饭团对大鼠肝组织 MDA, SOD, Hyp 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	SOD /NU·mg ⁻¹	Hyp /μg·mg ⁻¹
正常	-	11.64 ± 1.22 ²⁾	33.97 ± 3.43	0.87 ± 0.44 ²⁾
模型	-	27.74 ± 6.20	29.03 ± 8.27	1.86 ± 0.42
秋水仙碱	2 × 10 ⁻⁴	19.08 ± 3.51 ¹⁾	31.34 ± 5.92	1.13 ± 0.57 ¹⁾
冷饭团	2.5	16.65 ± 5.37 ¹⁾	38.61 ± 6.40 ¹⁾	1.36 ± 0.22 ¹⁾
	5.0	10.94 ± 7.69 ²⁾	42.05 ± 8.31 ²⁾	1.21 ± 0.35 ¹⁾

2.4 各组大鼠肝组织病理学检查结果 HE 染色标本观察,模型组大鼠肝小叶结构严重破坏,肝细胞广泛脂肪变性、坏死,肝组织中有炎性细胞浸润。冷饭团低剂量组肝细胞脂肪变性,汇管区及肝小叶可见少量炎性细胞浸润。冷饭团高剂量组肝小叶结构基本正常,肝小叶周边肝细胞有轻度脂肪变性,汇管区偶见少量淋巴细胞浸润。秋水仙碱组肝细胞脂肪变性,汇管区及肝小叶有少量炎性细胞浸润。Masson 染色标本观察,模型组大鼠肝组织内有大量纤维组织增生形成纤维间隔,胶原纤维从汇管区向肝小叶内延伸,其破坏界板,分割、包绕肝小叶,部分标本内可见完整的假小叶。冷饭团低剂量组肝组织内胶原纤维增生均比模型组轻,无假小叶形成。冷饭团高剂量组和秋水仙碱组有轻度纤维组织增生,主要散在于中央静脉和汇管区。其肝纤维化程度分期与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 4。

表 4 冷饭团对大鼠肝纤维化程度分期的影响 ($n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0	1	2	3	4
正常	-	10	0	0	0	0 ²⁾
模型	-	0	0	1	4	5
秋水仙碱	2 × 10 ⁻⁴	3	4	3	0	0 ²⁾
冷饭团	2.5	1	2	4	3	0 ¹⁾
	5.0	2	4	3	1	0 ²⁾

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病的一种组织学诊断,是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经途径。自著名肝病学家 Rogking 提出了人的肝纤维化可以逆转的论述以来,抗肝纤维化的研究不断深入。国内在应用中医药治疗肝纤维化方面做了许多有益研究,认为血瘀是肝纤维化的基本病机,治疗方法为活血化瘀、软

坚散结。本实验采用 CCl₄ 诱导大鼠实验性肝纤维化,以秋水仙碱为对照,观察冷饭团的抗肝纤维化作用及其机制。结果表明,模型大鼠经 6 周 CCl₄ 和高脂低蛋白等复合因素刺激后,其肝小叶结构严重破坏,肝细胞严重坏死、脂肪变性和炎性细胞浸润,肝组织内有大量胶原纤维增生,其病理表现特征与人肝纤维化的形态特征相似。经冷饭团或秋水仙碱治疗后,大鼠肝细胞坏死、肝脏脂肪变性、炎性细胞浸润和胶原纤维增生程度均明显减轻。血清生化指标检测表明,冷饭团高、低剂量组大鼠血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性均明显低于模型组,接近正常水平。说明冷饭团对实验大鼠肝功能有显著改善作用。血清及肝组织中纤维化指标显示,血清 HA, LN 和 PCⅢ 含量显著低于模型组,肝组织 Hyp 含量亦明显少于模型组。说明冷饭团可抑制慢性肝损伤后肝纤维化形成。CCl₄ 对肝毒性损伤是由于 CCl₄ 经肝细胞微粒体内细胞色素 P₄₅₀ 代谢成三氯甲基自由基,并在其启动的过氧化连锁反应中,产生毒性作用更强的超氧阴离子和氢氧离子,这些自由基通过脂质过氧化作用损伤肝细胞。脂质过氧化反应也可直接通过醛的过氧化产物作用于贮脂细胞,或通过激活枯否细胞释放细胞因子如转化生长因子 β₁ 作用于贮脂细胞,增加胶原生成,最终导致肝纤维化^[4]。本实验观察到,CCl₄ 诱导实验性肝纤维化模型大鼠肝组织 MDA 含量显著升高,而冷饭团能明显降低其肝组织 MDA 含量,提高肝组织 SOD 活性。说明冷饭团抗肝纤维化的机制可能与其抗脂质过氧化作用有关。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社,1977:1151.
- [2] 艾菁,李于善. 冷饭团化学成分及其活性研究进展[J]. 化学与生物工程,2005,2:7.
- [3] 第 5 次全国传染病与寄生虫学术会议. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华内科杂志,1995,34(11):788.
- [4] Britton R S, Bacon B R. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis[J]. Hepato-Gastroenterology, 1994,41:343.

[责任编辑 聂淑琴]