

加味鳖甲煎丸对四氯化碳所致肝纤维化大鼠肝组织的保护作用

任映^{*}, 宋崇顺, 尹军祥, 孙海芸, 郭菁, 戴欣, 杨金铎, 崔界峰, 谭玮
(北京中医药大学东直门医院中药药理学实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察加味鳖甲煎丸对四氯化碳(CCl₄)所致肝纤维化大鼠肝组织的保护作用。方法: 由皮下注射40% CCl₄溶液首次5 mL/kg, 以后每周2次, 每次3 mL/kg, 连续注射6周, 在病理检查证明造模大鼠肝组织出现肝纤维化后, 分组给药, 连续给药8周后处死大鼠, 病理切片, HE和Masson染色, 观察加味鳖甲煎丸对CCl₄所致肝纤维化大鼠肝组织病变程度的影响, 并对脂质空泡和胶原含量进行定量分析。结果: 加味鳖甲煎丸大、中剂量组大鼠肝组织炎性细胞浸润程度、脂质空泡和胶原含量、肝假小叶形成的数量均较模型组大鼠明显减少, 肝纤维化病变程度明显减轻。结论: 加味鳖甲煎丸对CCl₄所致肝纤维化大鼠肝组织有较好的保护作用, 可明显减轻其病变程度。

[关键词] 加味鳖甲煎丸; 肝纤维化; 四氯化碳

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)01-0049-03

Protective Function of Jiaweibiejiajian Pill on Hepatic Fibrosis of Rats Induced by CCl₄

REN Ying^{*}, SONG Chong-shun, YIN Jun-xiang, SUN Hai-yun, GUO Jing,
DAI Xin, YANG Jin-duo, CUI Jiefeng, TAN Wei

(Pharmacological Laboratory of Herbal Medicine, Dongzhimen Hospital Affiliated to
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect of Jiaweibiejiajian Pill (JWBJ) on hepatic fibrosis of rats induced by Carbon Tetrachloride (CCl₄). **Method:** Rats model with hepatic fibrosis was induced by the multiple subcutaneous injections of 40% CCl₄, 3 mL/kg, twice a week for 6 weeks. When hepatic fibrosis was verified to come into being by pathological examination, the rats were divided into different groups. JWBJ was administrated orally for 8 weeks. Then all rats were sacrificed and their liver were taken out and the pathological sections were stained by HE and Masson. The pathological change, the content of hepatic collagen and hepatic platin of livers were observed. **Result:** Compared with model group rats, the number of lipid vacuolation in liver tissue, collagen fibers deposition, Pseudolobuli and fibroblast hyperplasia, the degree of inflammatory cell filtration, degeneration and necrosis in liver tissue were decreased and alleviated obviously in rats of mediate-dose group and high-dose group of JWBJ. **Conclusion:** JWBJ showed the protective function for hepatic fibrosis and could alleviate the degree of degeneration and necrosis induced by CCl₄.

[Key words] Jiaweibiejiajian pill; Hepatic fibrosis; CCl₄

导致肝纤维化的因素很多,阻止和延缓肝纤维化的形成是药物研究的一个重要环节,我们在鳖甲煎丸这一有效药物的基础上组成加味鳖甲煎丸,并观察了其对 CCL₄ 所致肝纤维化大鼠肝组织的保护作用,报道如下。

1 材料

1.1 药物 加味鳖甲煎丸(JWBJ):主要由丹参、黄芪、苦参、黄芩、鳖甲、茯苓、白芍、白术、阿胶、大黄组成,比例 1.5:1:1:1.5:1.5:1:1:1:0.5:0.5,每 g 粉剂相当于 12.5 g 生药,由北京中医药大学制剂教研室供给,批号 0401。秋水仙碱片:5 mg/日,昆明制药集团股份有限公司生产,批号 20021137。肝脾康胶囊:5.25 g/日,黑龙江中龙医药集团股份有限公司生产,批号 20030201059。四氯化碳(CCL₄):北京益利精细化学品有限公司生产,批号 990715。羧甲基纤维素钠(CMC):中国医药上海化学试剂站供给,批号 970926。

1.2 动物 Wistar 大鼠,清洁级,体重 250~300 g,雌雄各半。由中国药品生物制品鉴定所实验动物中心供给,许可证号:京动许字(2000)第 017 号。大鼠饲养和实验均在清洁级动物实验室内进行,合格证号:京动许字(1999)第 039 号。消毒饲料,由北京科奥协力饲料有限公司供给。

2 方法

2.1 CCL₄ 所致肝纤维化大鼠模型的制作^[1,2] 除正常对照组皮下注射花生油溶液外,其它各组大鼠均在无菌条件下由皮下注射 40% CCL₄ 花生油溶液,首次皮下注射 40% CCL₄ 花生油溶液 5 mL/kg 体重,以后每周皮下注射 2 次,每次注射量均为 3 mL/kg 体重,连续注射 6 周,造成大鼠肝纤维化模型。

2.2 分组与给药 根据文献报道^[1,2]在造模 6 周后随机取材送病理检查证明造模大鼠肝组织出现肝纤维化后,立即将其随机分为 6 组,即加味鳖甲煎丸大、中、小剂量组(简称大、中、小剂量组),造模对照组(简称模型组),阳性药秋水仙碱组(简称秋水仙组),阳性药肝脾康对照组(简称肝脾康组)和正常对照组(简称对照组)。加味鳖甲煎丸大、中、小剂量组的给药剂量分别为 13, 6.5, 3.25 g 生药/kg 体重,分别为临床用药的 12, 6, 3 倍。秋水仙剂量为 1 mg/kg 体重,为临床用药的 12 倍。肝脾康剂量为 1.05 g/kg 体重,为临床用药的 12 倍。模型组和对照组分别灌服 0.5% CMC。以上各药均用 0.5% CMC 配制,各

实验组给药体积均为 10 mL/kg 体重,每天给药 1 次,连续给药 8 周后,大鼠用 10% 水合氯醛麻醉,立即取出肝脾组织,称重后放入 10% PBS 配制的甲醛液中,HE 和 Masson 染色,观察肝组织的病理变化并进行图像分析。

2.3 统计处理方法 用 SPSS 11.5 软件统计分析,计量实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验。计数实验数据组间比较用 χ^2 等级检验。

3 结果

3.1 各实验组大鼠肝、脾指数及肝组织外观变化 肉眼观察模型组大鼠肝脏均呈白色,质硬,肝脏表面可见密密麻麻的凸起和结节。给药组大鼠肝脏呈灰白色,质软稍韧,肝脏表面仍有少量凸起和结节。肝、脾指数结果见表 1。

表 1 各实验组大鼠肝、脾指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 (g/kg)	肝指数 (g/100 g)	脾指数 (mg/100 g)
对照组	10	—	2.28 ± 0.30 ²⁾	18.00 ± 1.58 ²⁾
模型组	12	—	6.71 ± 0.94	27.06 ± 2.57
JWBJ	11	3.25	5.73 ± 0.72 ¹⁾	21.80 ± 7.48 ¹⁾
JWBJ	10	6.50	5.22 ± 0.75 ²⁾	20.90 ± 4.20 ²⁾
JWBJ	11	13.00	4.97 ± 0.61 ²⁾	19.25 ± 1.80 ²⁾
肝脾康组	10	1.05	5.52 ± 1.29 ¹⁾	20.67 ± 4.02 ²⁾
秋水仙组	11	0.001	5.87 ± 0.86 ¹⁾	23.78 ± 4.26 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(表 3.4 同)

从表 1 可看出,同模型组相比,各实验组大鼠肝、脾指数均有明显降低。

3.2 各实验组大鼠肝组织病理变化

①正常组:HE、Masson 染色,肝细胞排列整齐,未见脂质空泡形成,汇管区未见炎症。肝小叶结构清晰可见,未见肝纤维化及假小叶形成。

②模型组:HE、Masson 染色,可见大量脂质空泡形成,汇管区可见大量炎性细胞浸润,成纤维细胞大量增生,肝细胞广泛变性呈片状坏死。汇管区可见大量假小叶形成,肝小叶间隔明显增宽和大量胶原纤维沉积。

③药物治疗组:HE、Masson 染色,小剂量组同模型组相比,未见明显差异,可见大量脂质空泡形成,汇管区见大量炎性细胞浸润、成纤维细胞增生,肝细胞广泛变性及点状、片状坏死及较多假小叶形成。中剂量组同模型组相比,脂质空泡有所减少,肝细胞坏死程度有所减轻,假小叶形成较少,仍明显可见较

多胶原纤维沉积。大剂量组、肝脾康、秋水仙组同模型组相比,脂质空泡明显减少,肝细胞坏死程度明显减轻,假小叶形成、胶原纤维沉积明显减少。

3.3 各实验组大鼠肝纤维化病变程度^[1] 根据肝纤维化病变程度将其分为 4 级: 0 级(记 0): 肝细胞排列整齐,未见脂质空泡形成,汇管区未见炎症,肝小叶结构清晰,未见肝纤维化及假小叶形成。I 级(记+): 脂质空泡形成,汇管区见炎性细胞浸润,成纤维细胞增生,肝细胞变性及点状坏死。II 级(记++): 较多脂质空泡形成,汇管区见较多炎性细胞浸润,成纤维细胞增生,肝细胞变性坏死,汇管区见较多假小叶形成,肝小叶间隔形成,较多纤维沉积。III 级(记+++): 大量脂质空泡形成,汇管区见大量炎性细胞浸润,成纤维细胞大量增生,肝细胞广泛变性呈片状坏死,汇管区见大量假小叶形成,肝小叶间隔明显增宽和大量胶原纤维沉积。各实验组大鼠肝纤维化病变程度比较结果见表 2。

表 2 各实验组大鼠肝纤维化病变程度比较

组别	n	剂量 (g/kg)	0 级 (0)	I 级 (+)	II 级 (++)	III 级 (+++)	χ^2 值	P 值
对照组	10	—	10	0	0	0		
模型组	12	—	0	0	3	9		
JWBJ	11	3.25	0	0	6	5	2.103	> 0.05
JWBJ	10	6.50	0	4	5	1	10.808	< 0.01
JWBJ	11	13.00	0	8	3	0	16.989	< 0.01
肝脾康组	10	1.05	0	5	5	0	14.438	< 0.01
秋水仙组	11	0.001	0	4	7	0	14.584	< 0.01

注: P 值为各实验组与模型组比较

从表 2 可看出,模型组大鼠肝纤维化病变程度的发生百分率明显高于其他各实验组,除加味鳖甲煎丸小剂量组外,其他各实验组大鼠肝纤维化病变程度的轻重发生百分率同模型组相比有明显差异, $P < 0.01$ 。

3.4 各实验组大鼠病变程度图像分析 用 Morphology analysis 将 Masson 染色胶原和 HE 染色脂质空泡进行图像分析,胶原含量用胶原总面积和总光密度来表示,脂质空泡用空泡总面积和总光密度来表示,结果见表 3、4。

从表 3、4 可看出,同模型组相比,各实验组大鼠胶原总面积和总光密度、脂质空泡总面积和总光密度均明显减少。

表 3 各实验组胶原总面积、总光密度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g/kg)	胶原总面积 (μm^2)	胶原总光密度 (OD 值)
对照组	10	—	925.27 ± 185.32 ²⁾	199.62 ± 20.19 ²⁾
模型组	12	—	80479.20 ± 3251.26	1097.88 ± 126.34
JWBJ	11	3.25	53269.15 ± 13865.22 ¹⁾	670.16 ± 108.69 ²⁾
JWBJ	10	6.50	24471.34 ± 4828.53 ²⁾	433.19 ± 81.96 ²⁾
JWBJ	11	13.00	23434.51 ± 3300.57 ²⁾	383.31 ± 36.12 ²⁾
肝脾康组	10	1.05	38589.91 ± 6639.44 ²⁾	704.02 ± 49.16 ²⁾
秋水仙组	11	0.001	16597.93 ± 739.54 ²⁾	356.76 ± 46.25 ²⁾

注: 各组与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 下同。

表 4 各实验组脂质空泡比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 (g/kg)	脂质空泡总面积 (μm^2)	脂质空泡总光密度 (OD 值)
对照组	10	—	未见脂质空泡	未见脂质空泡
模型组	11	—	91374.65 ± 1991.07	24.07 ± 2.00
JWBJ	11	3.25	65770.15 ± 3887.10 ¹⁾	19.20 ± 1.37 ¹⁾
JWBJ	10	6.50	60824.99 ± 6060.54 ¹⁾	15.90 ± 1.61 ¹⁾
JWBJ	10	13.00	39689.68 ± 6692.83 ²⁾	13.83 ± 2.08 ²⁾
肝脾康组	12	1.05	40172.42 ± 9986.41 ¹⁾	18.43 ± 1.38 ¹⁾
秋水仙组	12	0.001	58441.10 ± 8359.77 ¹⁾	19.58 ± 2.18 ¹⁾

4 讨论

肝纤维化是肝细胞严重损伤和胶原纤维代谢紊乱的慢性发展结局。病理组织学呈慢性进行性改变,胶原纤维逐渐增多,胶原纤维沿汇管区或炎症坏死区向外延伸,形成厚薄不一的纤维间隔分割包绕肝小叶,即假小叶形成^[3,4]。本实验使用加味鳖甲煎丸可使 CCL_4 造模大鼠肝纤维化程度明显减轻,肝、脾指数明显减小。病理切片 HE 和 Masson 染色结果表明,加味鳖甲煎丸大、中、小剂量(特别是大剂量)、肝脾康、秋水仙碱均可使 CCL_4 所致肝纤维化大鼠脂质空泡、胶原纤维细胞、I 型、II 型细胞,巨噬细胞明显减少,炎性细胞浸润明显减轻,肝假小叶形成减少,实验结果表明,加味鳖甲煎丸对 CCL_4 所致肝纤维化大鼠肝组织有一定的保护作用,可减轻肝纤维化病变程度,其作用机理有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 展玉涛,魏红山,王志荣,等. 大黄素抗肝纤维化的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(4): 235-239.
- [2] 喻长远,陈珍贵,田永立,等. 大黄蔗虫丸对大鼠两种肝纤维化模型的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(12): 33-34.
- [3] 安永,江正辉. 肝纤维化防治研究现状及展望[J]. 中西医结合肝病杂志, 2000, 10(6): 1-2.
- [4] 谢彦华,李里,王立娥,等. 基质金属蛋白酶-2、-9 与肝纤维化[J]. 临床肝胆病杂志, 2002, 18(2): 82-83.