

肝硬克颗粒抗复合因素致大鼠慢性肝纤维化的实验研究

莫国艳*, 李洪梅, 李小芹, 吴子伦, 周爱香
(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 采用四氯化碳(CCl₄)高脂低蛋白等复合因素诱导大鼠肝纤维化,以复方鳖甲软肝片作阳性对照,观察肝硬克颗粒对大鼠肝功能、肝纤维化相关指标、肝组织羟脯氨酸(Hyp)及肝组织病理学的影响。结果:肝硬克颗粒和复方鳖甲软肝片有良好的抗肝纤维化效果,其中肝硬克颗粒有显著改善肝功能、降低肝纤维化相关指标和Hyp含量的作用。

关键词: 慢性肝纤维化; 实验研究; 肝硬克颗粒

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)01-0050-03

肝硬克颗粒是由丹参、桃仁、郁金、鳖甲、当归等多味纯中药制成,具有活血化瘀、软坚散结、健脾益气的功能,临床用于治疗慢性肝炎、肝纤维化取得一定的疗效。为了给临床用药提供理论依据,对其作用和机理作了如下研究。

1 实验材料

1.1 药物 肝硬克颗粒,由中国中医研究院中药所剂型室提供,批号:021015,每克浸膏含生药为5.8g,试验时以蒸馏水配制至所需浓度。复方鳖甲软肝片,由中国人民解放军三〇二医院研制,内蒙古集宁制药厂生产,批号:20020609。

1.2 动物 Wistar大鼠,体重190~210g,雌雄各半,由中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供,许可证编号SCXK11-00-0006。

1.3 试剂 丙氨酸氨基转移酶(ALT),批号021130;天门冬氨酸氨基转移酶(AST),批号021130;总蛋白(TP),批号021122;白蛋白(ALB),批号021122;甘油三脂(TG),批号021208,均由北京北化精细化学品有限公司临床诊断试剂分厂提供,有效期为1年;III型前胶原(PC III)放射免疫分析试剂盒、层粘蛋白(LN)放射免疫分析测定盒、透明质酸(HA)放射免疫分析测定盒,均由上海海军医学研究所生物技术中心提供,批号2010301,有效期1个月;CCl₄(分析纯),苏州市第二化工厂研究所,批号980320。

1.4 仪器 Zs-3型半自动生化分析仪,中国科学院

生物物理研究所和北京中生工程高技术公司生产;SAKURA自动脱水机:日本产;Leite旋转式切片机:德国生产;SAKURA RSH-100自动染色机:日本产;光学显微镜:日本尼康;OLYMPUS BH-2自动显微照相系统;GC-911 γ 放射免疫计数器,中国科学技术大学科技实业总公司生产。

2 实验方法

取Wistar大鼠,雌雄各半,按体重随机分为6组,分别为正常对照组、肝损伤模型组、复方鳖甲软肝片阳性组、肝硬克颗粒高、中、低(13.0、6.5、3.25g生药/kg)三个剂量组,每组14只(正常对照组为10只)。正常对照组给予普通饲料,其余各组动物灌胃给予33% CCl₄植物油溶液,给药容量为0.2ml/100g体重,每周2次,连续7周,同时实验第1~2周给予高脂玉米粉饲料(79.5%玉米粉+猪油20%+胆固醇0.5%)^[1,2],第3~7周改为单纯玉米粉饲料。造模同时每日灌胃给药一次(给药容量1ml/100g体重),正常对照组和模型对照组给予相同体积的蒸馏水,连续给药7周。末次给药后,动物禁食12h,股动脉取血,以3000转/分离心10min,分离血清,-60℃保存,测定ALT、AST、TP、ALB、PC-III、LN、HA;采血后将动物处死,取部分肝组织作羟脯氨酸含量测定,计算肝胶原蛋白含量^[3],实验结果作组间t检验;部分肝组织用10%甲醛固定进行病理学检查^[4,5]。肝组织经过梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,切片,HE染色,光学树脂封片,以光学显微镜观察组织病理学变化。肝纤维化病理分级标准和评分标准如下:

“—”正常肝细胞结构,未见有明显脂肪变及炎症浸润,为 0 分;

“+”肝细胞有轻度的纤维化,散在脂滴,轻度炎症浸润,为 1 分;

“++”肝细胞明显肿胀,有脂肪颗粒及炎症浸润,有纤维化,为 2 分;

“+++”肝细胞纤维化较明显,大量脂肪变及炎症细胞浸润,为 3 分;

“++++”肝细胞纤维化较重,大量脂肪细胞堆积及炎症细胞浸润,为 4 分;

结果采用组间比较 *t* 检验和秩和检验两种方法进行统计学处理。

3 实验结果

3.1 对大鼠一般情况的影响 模型对照组大鼠造模 15d 后,精神欠佳,出现脱毛,28d 脱毛加重,体重明显下降,至试验结束时,所有试验组共死亡动物 13 只;所有给药组亦有不同程度脱毛、体重下降、动物死亡等现象,但较模型对照组明显减轻。体重方面,与模型组比较,高剂量肝硬克颗粒能明显增加雌、雄大鼠的体重, $P < 0.05$; 中剂量肝硬克颗粒明显增加雄性大鼠的体重,对雌性大鼠体重的影响无显著性差异;低剂量肝硬克颗粒对雌、雄鼠体重的影响无显著性差异, $P > 0.05$ 。结果见表 1、表 2。

表 1 对复合因素致慢性肝纤维化雌性大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	体重(g)	
			给药前	给药后
模型对照	—	7	210.6 ± 11.6	248.0 ± 10.2
正常对照	—	5	211.4 ± 10.1	287.2 ± 13.4**
复方鳖甲	1.1	7	215.6 ± 13.0	271.3 ± 14.4*
肝硬克	13.0	7	214.0 ± 9.8	278.8 ± 21.7*
肝硬克	6.5	7	217.9 ± 5.4	272.8 ± 30.2
肝硬克	3.25	7	211.3 ± 8.1	266.8 ± 18.9

注:与模型对照组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 以下同。

表 2 对复合因素致慢性肝纤维化雄性大鼠体重的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	体重(g)	
			给药前	给药后
模型对照	—	7	213.4 ± 6.4	340.5 ± 18.8
正常对照	—	5	215.4 ± 8.6	385.8 ± 22.1**
复方鳖甲	1.1	7	213.7 ± 8.1	370.3 ± 22.3*
肝硬克	13.0	7	217.6 ± 8.2	373.4 ± 22.9*
肝硬克	6.5	7	217.7 ± 5.9	373.3 ± 16.5*
肝硬克	3.25	7	218.0 ± 8.0	364.8 ± 24.4

在试验结束时,由于各组剩余动物数不同,血清生化指标、病理检查和血清肝纤维化指标检测均随机每组选取 10 只样品进行。

3.2 对大鼠 AST、ALT、TP、ALB 的影响 多次给予 CCL₄ 和长期给予混合饲料造成大鼠肝纤维化模型后,可引起大鼠 ALT 和 AST 升高,TP 和 ALB 降低。实验结果显示,与模型组比较,肝硬克颗粒三个剂量组均能不同程度降低大鼠 ALT 和 AST,提高 TP 和 ALB 含量,肝硬克颗粒高、中剂量都显著的降低 ALT 活性, $P < 0.05$; 对于 AST 活性,中剂量肝硬克颗粒有极显著的降低作用, $P < 0.01$,高、低剂量有显著的降低作用, $P < 0.05$; 对于 TP 和 ALB 含量,高剂量肝硬克颗粒均能显著升高,中剂量能显著升高 ALB 含量,呈现升高 TP 的趋势,低剂量升高 TP 和 ALB 的作用不明显。结果见表 3。

表 3 肝硬克颗粒对复合因素致大鼠慢性肝纤维化的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	肝功能(生化指标)			
		ALT (nmol/s)/L	AST (nmol/s)/L	TP (g/L)	ALB (g/L)
模型对照	—	1158.0 ± 410.3	1030.0 ± 269.8	57.0 ± 14.6	27.0 ± 4.98
正常对照	—	148.2 ± 110.6**	544.7 ± 157.5**	79.7 ± 10.1**	37.1 ± 2.74**
复方鳖甲	1.1	789.4 ± 292.7*	787.5 ± 203.2*	73.9 ± 18.9*	32.6 ± 3.82*
肝硬克	13.0	711.5 ± 314.1*	785.5 ± 189.5*	71.4 ± 14.2*	33.8 ± 7.14*
肝硬克	6.5	772.6 ± 217.1*	715.4 ± 161.2**	71.4 ± 21.5	32.4 ± 4.61*
肝硬克	3.25	868.0 ± 313.7	797.8 ± 153.5*	70.4 ± 20.1	32.5 ± 6.97

3.3 对大鼠肝胶原蛋白和血清 HA、LN、PC-III 含量的影响 多次给予 CCL₄ 和长期给予混合饲料造成大鼠肝纤维化后,大鼠肝胶原蛋白和血清 HA、LN、PC-III 含量明显增高。实验结果表明,与模型组比较,三个剂量肝硬克颗粒均能不同程度降低大鼠肝胶原蛋白和血清 HA、LN、PC-III 含量,三个剂量肝硬克颗粒均能降低肝胶原蛋白和血清 LN 的含量, $P < 0.01$,能降低血清 PC-III 的含量, $P < 0.05$; 高、中剂量肝硬克颗粒能降低血清 HA 含量,低剂量肝硬克颗粒对 HA 的降低作用不显著。结果见表 4。

3.4 病理检查结果

3.4.1 肉眼观察 正常对照组动物的肝组织表面未见有渗出,未见有瘀血等病理变化;模型对照组动物的肝表面有粘性液体渗出,并有小颗粒突起,切面较粗,颜色发黄,有的动物腹腔有少量腹水,未见有粘连,不同剂量给药组的个别动物的肝组织表面有类似模型对照组的病变。

3.4.2 光镜观察 正常对照组:肝细胞结构正常,未见在脂肪变、肿胀、纤维组织增生等明显的病理组织学的改变。

模型对照组:大部分肝组织间质有不同程度的

表 4 对复合因素致大鼠慢性肝纤维化的影响($\bar{x} \pm s$; $n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	胶原蛋白 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 肝)	血清(肝纤维化指标)		
			HA ($\mu\text{g}/\text{L}$)	LN ($\mu\text{g}/\text{L}$)	PC-III ($\mu\text{g}/\text{L}$)
模型对照	—	136.1 \pm 33.3	315.1 \pm 102.6	255.7 \pm 41.9	133.8 \pm 37.4
正常对照	—	84.3 \pm 2.90**	185.2 \pm 93.1**	140.5 \pm 44.6**	64.7 \pm 43.4**
复方鳖甲	1.1	87.0 \pm 7.99*	223.8 \pm 89.9*	209.9 \pm 37.5*	87.0 \pm 49.7*
肝硬克	13.0	86.4 \pm 5.79**	199.7 \pm 123.6*	197.7 \pm 41.8**	77.8 \pm 50.1*
肝硬克	6.5	88.8 \pm 5.83**	217.1 \pm 105.4*	204.1 \pm 31.2**	97.8 \pm 32.8*
肝硬克	3.25	91.7 \pm 9.07**	266.7 \pm 128.9	187.9 \pm 45.8**	87.7 \pm 56.0*

纤维组织增生,以汇管区为中心,随后延伸到小叶区,小叶结构紊乱,形成大小不等的假小叶,假小叶主要在汇管区与小叶中央区之间形成;肝组织间质含有多量脂肪细胞堆积,因大小不等的脂肪颗粒沉积使肿大的肝细胞压迫肝窦,肝窦变窄,纤维组织中可见有炎症细胞(主要是淋巴细胞、浆细胞及嗜酸性细胞)浸润,并有肉芽肿形成;肝细胞和汇管区的分界不清,同时伴有肝细胞碎片坏死。

与模型对照组比较,肝硬克颗粒三个剂量组和阳性对照组大鼠肝组织病理损伤程度明显轻于模型对照组,与两种统计方法计算结果基本一致(表 5)。

表 5 对复合因素致大鼠慢性肝纤维化的影响(病理检查)($n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	病变积分	
		T 检验	秩和检验
模型对照	—	3.3 \pm 0.67	
正常对照	—	0 \pm 0**	55.0**
复方鳖甲	1.1	2.5 \pm 0.53**	75.0*
肝硬克	13.0	2.2 \pm 0.79**	71.0**
肝硬克	6.5	2.5 \pm 0.71*	77.5*
肝硬克	3.25	2.5 \pm 0.71*	76.5*

注:秩和检验标准, $H_0.01=71$, $H_0.05=78$

4 讨论

肝脏是机体重要代谢器官,也是机体重要屏障器官,当肝功能损伤时则代谢障碍,并影响其他脏器功能,严重者危及生命。肝纤维化是慢性肝病的病理基础,肝硬变则是各种肝病经久不愈的结局。因而,阻断肝纤维化的发生发展在肝病的治疗中有重大意义。研究表明,血清 ALT、AST、ALP 水平的高低可灵敏反映肝细胞变性、坏死的程度,其大部分存在于细胞浆中,只有肝细胞严重受损时才释放入血^[6];血清 ALB 可反映肝脏合成蛋白质功能,是肝细胞特异分泌的功能性蛋白,肝细胞受损,合成蛋白质功能障碍,血清 ALB 减少^[7];肝纤维化的实质是细胞外基质(ECM)成分在肝内异常沉积,参与肝纤维化的 ECM 包括胶原蛋白、蛋白多糖和糖蛋白三大类,PC-

III、HA、LN 分别是三类的代表,为反映肝纤维化的血清学指标^[8],对慢性肝损伤和肝纤维化的诊断价值已普遍承认^[9];羟脯氨酸(Hyp)为胶原蛋白所特有的氨基酸成分,其在肝中的含量可反映胶原代谢的变化情况,与肝纤维化程度相平行^[10]。

本实验以 CCL₄ 高脂低蛋白等复合因素复制肝纤维化动物模型,脂质过氧化是 CCL₄ 造成肝损伤的主要机制, CCL₄ 经肝细胞微粒体 P-450 酶系统代谢后,其分子中的 C—C 键断裂,产生三氯甲基和氯自由基,三氯甲基可致肝细胞膜磷脂分子产生脂质过氧化,脂质过氧化破坏了细胞的结构和功能的完整,表现为膜的流动性降低,对钙的通透性增加^[10]。实验结果显示,所造成的肝纤维化模型稳定、可靠,各项血清学指标与病理改变数据都表明正常对照组与模型对照组间有极显著性差异 $P < 0.01$,且病理改变典型;与模型对照组比较,肝硬克颗粒有显著的降低 ALT、AST、ALB、PC-III、HA、LN 和胶原蛋白含量,升高 TP 和 ALB 含量的作用,并能显著地减轻肝组织的病变损伤程度。这就说明肝硬克颗粒的抗肝纤维化作用是通过抗肝损伤,保护肝细胞、促进肝功能恢复,抑制胶原纤维合成、促进其降解而发挥的。

参考文献:

- [1] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 52.
- [2] 熊益群, 严红梅, 张赤志. 抗纤软肝冲剂抗大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志. 2000, 6(2): 28.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 724, 837, 846.
- [4] 杜卓民. 实用组织学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 4.
- [5] 黄泳齐. 肝病与全身疾病[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993. 245.
- [6] 黄兆胜. 虎金丸对 CCL₄ 所致实验性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 1994, 2(5): 225.
- [7] 梁之彦. 病理生理学[M]. 第三版, 上海: 上海科学技术出版社, 1990. 491.
- [8] 曹献英, 贲长恩, 于世瀛, 等. 活血化癥方药对大鼠实验性肝纤维化和防治作用的机理研究[J]. 北京中医药大学学报, 1998, 21(2): 35.
- [9] Plebai M, Burlina A. Biochemical maker of hepatic fibrosis[J]. Clin Biochem, 1991, 24(3): 219-275.
- [10] 刘永刚, 陈厚昌, 蒋毅萍. 姜黄素抗肝纤维化的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(5): 273-275.