

抗纤软肝冲剂抗大鼠肝纤维化的实验研究*

熊益群¹, 严红梅², 张赤志¹

(1 湖北中医学院肝病研究所, 武汉 430061; 2 湖北中医学院 96 级研究生, 武汉 430061)

摘要: 采用四氯化碳(CCl₄)高脂低蛋白等复合因素诱导的大鼠肝纤维化模型, 以秋水仙碱作对照, 观察抗纤软肝冲剂对肝功能、免疫学、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: 抗纤软肝冲剂和秋水仙碱有良好的抗肝纤维化效果, 其中抗纤软肝冲剂有显著改善肝功能、调节免疫功能、降低免疫复合物(IC)、降低肝纤维化相关指标和 Hyp 含量的作用。

关键词: 实验性肝纤维化; 中医药疗法; 动物实验; 抗纤软肝冲剂

中图分类号: 285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2000)02-0028-03

Experimental Studies of the Kangxian Ruangan Granule on Anti-hepatic Fibrosis in Rats

XIONG Yi-qun¹, YIAN Hong-mei², ZHANG Chi-zhi¹

(1 Liver Diseases Institute of Hubei College of CTM Wuhan, 430061;

2 Graduate of the 96-year Grade of Hubei College of CTM, Wuhan, 430061)

Abstract: The effect and mechanism of the Kangxian Rungan granule (KXRG) on anti-hepatic fibrosis were studied in rat model of hepatic fibrosis induced by complex factors of CCl₄ and foods of high fat and low protein. The results showed that KXRG and colchicine had good effects on anti-hepatic fibrosis. KXRG could obviously improve liver functions, regulate immunologic functions and decrease immunologic compound(IC), relevant index on hepatic fibrosis and the level of hydroxyproline(Hyp).

Key words: experimental hepatic fibrosis; therapeutic method of traditional Chinese medicine; experiment on animals

抗纤软肝冲剂系临床经验方, 由鳖甲、海藻、牡蛎、丹参、莪术等药组成, 其疗效肯定^[1]。进一步的实验研究, 对其作用和机理作了更深入的探讨。

1 材料与方法

1.1 动物 Wistar 大鼠 100 只, 雌雄各半, 体重 140~200g。由华中农业大学动物饲养中心提供。

1.2 药物 抗纤软肝冲剂(主要组成: 海藻、鳖甲、牡蛎、莪术、丹参等)由湖北中医学院附属医院制剂科生产。秋水仙碱(Colchicine)由上海化学试剂站进口分装, 批号 950516, 配

制方法为取秋水仙碱 40mg, 溶解于 1L 蒸馏水。CCl₄ 分析纯由老河口市石油化工总厂生产, 批号 950807。

1.3 造模 除正常组外其余各组均采用 CCl₄ 高脂低蛋白等复合因素致大鼠肝纤维化模型^[2]。首次腹腔注射 CCl₄ 分析纯 5ml/kg 体重, 以后每次注射 30% CCl₄ 蓖麻油溶液 2ml/kg, 每周 2 次, 连续 8 周。实验第 1~2 周给予高脂玉米粉饲料(79.5% 玉米粉+20% 猪油+0.5% 胆固醇), 第 3~8 周改为单纯玉米粉饲料(均分笼定量饲养), 隔日给予 30% 乙醇 1ml/只灌胃。正常组予正常饮

* 基金项目: 湖北省教委重点资助项目(96A02)

食,自由饮水。

1.4 分组及用药 自造模之日起随机分为6组。正常组10只、病理组18只、秋水仙碱组18只、抗纤软肝冲剂大、中、小剂量组各18只。第8周末与造模同时每日分别以生理盐水2ml/只(正常组、病理组)、秋水仙碱0.1mg/kg(秋水仙碱组)、抗纤软肝冲剂2.4g、1.2g、0.6g/100g灌胃(抗纤软肝冲剂大、中、小剂量组)。第16周末将大鼠乌拉坦麻醉后心脏取血、取肝组织标本。

1.5 检测项目 血清丙氨酸转氨酶(ALT)测定(赖氏法);血清白蛋白、球蛋白(Alb、G)测定(溴甲酚绿法);血清IC检测(聚乙二醇沉淀法);血清透明质酸(HA)、层粘蛋白(LN)、IV型胶原(IV-C)、III型前胶原(PCIII)测定均采用放免法,按试剂盒操作;肝组织Hyp测定采取许志勤^[3]法;病理组织学观察采用常规石蜡切片,HE染色。

表1 各组大鼠ALT、Alb、G、Hyp的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(U/L)	Alb(g/L)	G(g/L)	Hyp(mg/g)
正常组	10	56.7±7.6 ^{△△}	29.5±1.3 ^{△△}	37.2±3.5 ^{△△}	19.3±4.3 ^{△△}
病理组	10	158.4±18.3	25.6±2.1	47.6±2.8	41.5±6.2
秋水仙碱组	10	116.7±23.4 ^{△△}	28.2±1.7 ^{△△}	44.0±3.5 [△]	30.1±5.2 ^{△△}
抗纤软肝冲剂大剂量组	13	96.3±9.2 ^{△△*}	29.9±1.4 ^{△△*}	42.5±3.6 ^{△△}	30.5±4.9 ^{△△}
抗纤软肝冲剂中剂量组	12	100.2±11.0 ^{△△*}	29.1±2.0 ^{△△}	43.9±3.7 [△]	32.0±5.2 ^{△△}
抗纤软肝冲剂小剂量组	12	101.4±8.8 ^{△△*}	28.5±2.1 ^{△△}	44.4±3.2 [△]	35.8±8.1

注:与病理组比较 [△]P<0.05, ^{△△}P<0.01;与秋水仙碱组比较 *P<0.05, **P<0.01;与小剂量抗纤软肝冲剂组比较[#]P<0.05, ^{##}P<0.01(以下同)

2.3 各组大鼠免疫功能变化情况 各组中,IC值正常组、抗纤软肝冲剂大、中、小剂量组与病理组有非常显著性差异,抗纤软肝冲剂大、中、小剂量组明显低于秋水仙碱组,且大剂量抗纤软肝冲剂的效果优于小剂量组。详见表2。

2.4 各组大鼠血清肝纤维化指标变化情况

结果:正常组、秋水仙碱组、抗纤软肝冲剂大、中、小剂量组PCIII、和IV-C、HA、LN值均低于病理组。抗纤软肝冲剂大剂量组LN值、IV-C值,抗纤软肝冲剂大、中、小剂量组PCIII值明显低于秋水仙碱组。大剂量抗纤软肝冲剂组降LN的效果优于小剂量组。详见表3。

1.6 统计方法 计量资料用F分析,两两比较用q检验,等级资料用秩和检验。

2 结果

2.1 死亡率 正常组大鼠无死亡。试验8周时,病理组、秋水仙碱组、抗纤软肝冲剂大、中、小剂量组分别死亡8只、8只、5只、6只、6只,死亡率分别为44.4%、44.4%、27.8%、33.3%、33.3%。

2.2 各组大鼠ALT、Alb、G、Hyp变化情况

第16周末,病理组大鼠的肝功能有所恢复,但与正常组仍有显著性差异。秋水仙碱组、抗纤软肝冲剂大、中、小剂量组ALT值、Alb值、G值,秋水仙碱组、抗纤软肝冲剂大、中、小剂量组Hyp值也较病理组有显著性差异。抗纤软肝冲剂大、中、小剂量组降ALT的效果,抗纤软肝冲剂大剂量组升Alb的效果明显优于秋水仙碱组。详见表1。

表2 各组大鼠免疫功能的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IC(mg/L)
正常组	10	6.5±1.9 ^{△△}
病理组	10	14.6±2.9
秋水仙碱组	10	13.1±3.3
抗纤软肝冲剂大剂量组	13	7.9±2.2 ^{△△*}
抗纤软肝冲剂中剂量组	12	9.2±2.9 ^{△△*}
抗纤软肝冲剂小剂量组	12	10.4±3.4 ^{△△*}

2.5 各组大鼠肝脏病理学变化

2.5.1 肉眼观察 模型组大鼠肝脏普遍肿大,表面较粗糙,有较粗的颗粒,暗红色,质地变硬,部分大鼠出现腹水,而治疗组大鼠肝脏变化大体较模型组为轻。

表 3 各组大鼠血清肝纤维化指标的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	HA($\mu\text{g/L}$)	LN($\mu\text{g/L}$)	PCIII($\mu\text{g/L}$)	IV-C($\mu\text{g/L}$)
正常组	10	49.3 \pm 16.6 $^{\Delta\Delta}$	89.1 \pm 18.1 $^{\Delta\Delta}$	125.5 \pm 32.6 $^{\Delta\Delta}$	61.2 \pm 8.4 $^{\Delta\Delta}$
病理组	10	126.3 \pm 19.4	203.9 \pm 11.9	284.1 \pm 12.5	149.0 \pm 13.9
秋水仙碱组	10	103.9 \pm 9.1 $^{\Delta\Delta}$	170.4 \pm 10.1 $^{\Delta\Delta}$	235.8 \pm 13.8 $^{\Delta\Delta}$	123.3 \pm 5.2 $^{\Delta\Delta}$
抗纤软肝冲剂大剂量组	13	96.4 \pm 10.9 $^{\Delta\Delta}$	155.5 \pm 7.9 $^{\Delta\Delta\#\#}$	197.9 \pm 10.9 $^{\Delta\Delta\#\#}$	113.5 \pm 8.7 $^{\Delta\Delta\#\#}$
抗纤软肝冲剂中剂量组	12	98.9 \pm 14.9 $^{\Delta\Delta}$	166.4 \pm 9.2 $^{\Delta\Delta}$	196.3 \pm 17.7 $^{\Delta\Delta\#\#}$	117.4 \pm 16.4 $^{\Delta\Delta}$
抗纤软肝冲剂小剂量组	12	101.9 \pm 10.3 $^{\Delta\Delta}$	171.1 \pm 7.1 $^{\Delta\Delta}$	206.3 \pm 17.4 $^{\Delta\Delta\#\#}$	118.9 \pm 19.1 $^{\Delta\Delta}$

2.5.2 光镜观察 病理组:肝组织正常结构被破坏,肝索排列紊乱,肝细胞明显肿胀变性,其中多为脂肪变性,部分呈气球样变,肝小叶中央区明显坏死。间质内有炎性细胞浸润,胶原增生显著,增生结缔组织进一步深入并分割肝小叶,接近形成假小叶。

抗纤软肝冲剂组:与病理组相比,肝组织结构破坏不明显,肝细胞脂肪变性程度显著减轻,可见少量炎性细胞浸润,肝细胞坏死减轻,少见纤维结缔组织增生。

经统计学处理发现,中、小剂量抗纤软肝冲剂组以及秋水仙碱组纤维化程度与病理组相比有显著差异。正常组、大剂量抗纤软肝冲剂组与病理组相比有非常显著差异。详见表4。

表 4 各组大鼠肝脏胶原纤维增生情况对比

组别	n	-	±	+	++	+++
正常组	10	10	0	0	0	0 $^{\Delta\Delta}$
病理组	10	0	0	1	6	3
秋水仙碱组	10	1	2	3	2	2 $^{\Delta}$
抗纤软肝冲剂大剂量组	13	1	5	5	1	1 $^{\Delta\Delta}$
抗纤软肝冲剂中剂量组	12	1	2	5	2	2 $^{\Delta}$
抗纤软肝冲剂小剂量组	12	0	3	5	3	1 $^{\Delta}$

注:参照有关文献^[4],制定胶原纤维增生程度半定量标准:“-”,正常肝脏或无明显胶原纤维增生;“±”,胶原纤维增生,中央静脉和汇管区有少量纤维索放散延伸,但无间隔形成;“+”,胶原纤维增生、中央静脉和汇管区结缔组织变厚,由此向四周伸出纤维索,形成不完全间隔;“++”,胶原纤维大量增生,有个别菲薄的完全间隔形成(假小叶);“+++”,完全间隔较厚,假小叶大量形成。

3 讨论

肝纤维化是慢性肝病的病理基础,肝硬化则是各种慢性肝病经久不愈的结局。因此

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,Disse 间隙 ECM 成分合成增多,降解减少,纤维组织沉积增加,导致肝窦壁毛细血管化是肝纤维化形成的病理基础,其中 HA、LN、IV-C 以及 PCIII 作为肝纤维化血清学观测指标已有大量报道。本实验结果显示,复合因素造肝纤维化模型稳定、可靠,各项血清学指标与病理改变都表明正常组与病理组对照有显著差异,且病理改变较典型。疗效观察表明,和秋水仙碱一样,抗纤软肝冲剂有良好的抗肝纤维化效果,与之对照,抗纤软肝冲剂还有显著的降 ALT、升 A1b、降 IC 等作用。这说明抗纤软肝冲剂的抗肝纤维化作用是通过调节免疫功能、抗肝损伤、保护肝细胞,促进肝功能恢复,抑制胶原纤维合成,促进其降解而达到的。

参考文献:

[1] 张赤志,严红梅. 抗纤软肝冲剂治疗肝硬化的疗效观察[J]. 中西医结合肝病杂志, 1999, 9(2): 65

[2] 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

[3] 许志勤, 骆佑教, 朱淑敏. 组织羟脯氨酸测定方法的改进[J]. 解放军预防医学杂志. 1990, 11: 23

[4] Ruwart MJ, Relpech B. 16, 16-dimethyl prostaglandin E₂ delays collagen formation in nutritional injury in rat liver[J]. Hepatology. 1998, 8: 61

(收稿日期: 1999-09-01)