DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.031

肝结散预防慢性肝损伤性纤维化的实验研究*

杨国汉** 戴裕光 谭晓明 (第三军医大学附属大坪医院中医科) 重庆,400042

提 要 目的: 观察肝结散对 CCl_4诱导的小鼠肝纤维化损害的预防作用。方法: 以小剂量 CCl_4橄榄油溶液长期腹腔注射造成小鼠慢性肝损伤性纤维化模型,同时预先以不同剂量肝结散口服给药,与秋水仙碱对照,观察肝组织形态结构及其胶原代谢等的变化。结果: 肝结散高、低剂量组小鼠血谷丙转氨酶活性(ALT 130.44± 42.8, 145.3± 38.9)、LPO(6.42± 0.64, 6.74± 0.71)、PCⅢ(1459.7± 174.8, 1485.46± 163.4)、HA(1761.35± 151.36, 1814.28± 170.31)和肝纤维化积分(1.3± 0.84, 1.42± 0.77)均明显低于对照组(分别为 ALT 201.8± 78.5, LPO 8.70± 0.72, PCⅢ 1956.88± 201.71, HA 2339.64± 209.83, 纤维化积分 1.96± 1.06),而白蛋白含量(36.1± 2.5, 34.6± 2.7)、SOD(19.38± 4.21, 18.83± 3.90)、GSH(48.52± 3.67, 46.67± 3.42)均明显高于对照组(分别为白蛋白含量 30.4± 5.6, SOD 12.75± 2.70, GSH 40.00± 2.65)。结论: 肝结散对 CCl_4性肝损害有保护效应,这一作用可能与其促进自由基清除,减少 PCⅢ和 HA的合成和沉积有关。

关键词 肝纤维化;肝结散;秋水仙碱
中图法分类号 R287; R575.2

肝纤维化的治疗是目前较为困难的研究领域,国内学者在挖掘中草药抗肝纤维化领域取得了一些可喜的进展,但多偏重于活血化瘀法及其相关药物[1]。中医认为肝纤化的过程以肝阴亏损和肝脉瘀阻为主要病机特征。为此,我们以养阴活血法为指导,选用二至丸和桂枝茯苓丸加减组方并制成肝结散,旨在观察肝结散对 CCl_4所致慢性肝损伤时肝脏形态学及自由基代谢、和某些细胞外间质(Extracelluar matrix, ECM)成分的影响。探讨其对慢性肝损伤的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物

成年健康昆明种小白鼠,清洁级,雌雄兼用,体重(20± 2) g,由野战外科研究所动物室提供。

1.2 肝结散

主要由黄芪、桃仁、茯苓、丹参、丹皮等组成,并由院制剂室制成可溶性散剂,经重蒸水溶解,冰箱保存备用。

1.3 秋水仙碱

按临床用量约10倍稀释成 10 mg/ml冷藏备用[2]。

1.4 肝纤维化模型

每只小鼠以 20% CCl_4橄榄油溶液(将 CCl_4溶于橄榄油,V/V)腹腔注射,0.1 ml/次,每周 2次,连续 3个月。

1.5 动物分组及给药

将纳入实验的小鼠随机分成 5组,每组 20只。A组为正常对照组,以生理盐水腹腔注射,自来水灌胃; B组为模型组; C组为秋水仙碱治疗组,造模同时以秋水仙碱每只每次 0.5 ml灌胃; D组和 E组分别以肝结散 2.5 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$, 1.25 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$灌胃,作为高、低剂量治疗组。小鼠给药量系按等效量公式算出。每日给药 1次,连续 3个月。末次给药 2 h后,小鼠称重,眼眶取血,留取血样;断头处死,取肝、脾脏称重并留取肝脏标本。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 小鼠体重及肝脾系数 脏器系数 = (脏器重量/体重)× 100%。

1.6.2 组织学检查及判定标准 按参考文献[3]所用方法进行。

1.6.3 外周血生化指标 按常规方法及有关文献方法测外周血中丙氨酸氨基转换酶(ALT, u),总蛋白(g/L),白蛋白(g/L),过氧化脂质(LPO, nmol/ml),超氧化物歧化酶(SOD, u/ml),还原型谷胱苷肽(GSH, mg/ml),Ⅲ型前胶原(PCⅢ, u/l),透明质酸(HA, mg/L)。

1.6.4 肝组结匀浆生化指标 肝右叶对应部位取组织 20 g,冰浴状态下以匀浆器匀浆 1.5 min,分离上清,按常规方法测定蛋白含量及 LPO(mmol/mg protein)、SOD(u/mg protein)、GSH(mg/mg protein)。

2 结果

2.1 肝结散对各组小鼠体重及肝脾系数的影响

如表 1所示,各组间小鼠体重差异不明显,肝、脾系数与正常组比较各组明显增加,与模型组比较各组显著减少,提示各给药组肝脾肿大均有减轻,但给药组间差异不明显。

2.2 肝结散对各组小鼠肝功能的影响

如表 2所示,各组间总蛋白量差异不明显,各给药组白蛋白含量与正常组比较差异不显著,与模型组比较则差异显著(P

* 第三军医大学青年科研基金资助项目, No. 93045
** 杨国汉,男,36岁,副主任医师,副教授,博士
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

< 0. 05) , ALT含量以模型组最高,明显高于其它各组,各给药组亦显著高于正常对照组。

表 1 各组小鼠体重及肝脾系数 ($\bar{x}\pm s$, n= 20)

Tab 1 Weight and relative weight of spleen and liver ($\bar{x}\pm s$, n= 20)

Group	n	Weight(g)	Spleen relative weight	Liver relative weight
A	20	33. 55± 3. 59	0. 56± 0. 15	4. 70± 0. 36
B	20	33. 98± 2. 94	0. 99± 0. 18△△	6. 85± 0. 82△△
C	20	34. 15± 2. 20	0. 74± 0. 22△*	5. 64± 0. 87△*
D	20	35. 64± 2. 10	0. 76± 0. 17△*	5. 57± 0. 76△*
E	20	35. 07± 1. 90	0. 78± 0. 16△*	5. 68± 0. 73△*

△: P < 0. 05,△△: P < 0. 01 *vs* A;* : P < 0. 05 *vs* B

表 2 各组小鼠肝功能变化 ($\bar{x}\pm s$, n= 20)

Tab 2 Changes of liver function in different groups of mice($\bar{x}\pm s$, n= 20)

Group	Total protein(ρ_B/g· L^{-1})	Albumin(ρ_B/g· L^{-1})	ALT(IU)
A	66. 29± 14. 6	37. 2± 2. 8	80. 4± 17. 6
B	65. 3± 13. 4	30. 4± 5. 6△	201. 8± 78. 5△△
C	66. 40± 15. 1	36. 3± 2. 7*	142. 7± 40. 4△*
D	64. 70± 13. 7	36. 1± 2. 5*	130. 4± 42. 8△*
E	65. 30± 12. 9	34. 6± 2. 7*	145. 3± 38. 9△*

△: P < 0. 05,△△: P < 0. 01 *vs* A;* : P < 0. 05 *vs* B

2. 3 各组小鼠肝脏病理形态学检查

2. 3. 1 肝脏外观 A组小鼠肝脏表面光滑,边缘锐利,呈红褐色,质软,无肿胀结节等; B组肝脏肿胀明显,质硬,呈暗褐色,无光泽,表面粗糙,布满大小不等的暗紫色结节,肝脏边缘不齐; 3个给药组肝脏外观情况相似,与 B组比较,肿胀减轻,质中等硬度,色紫红,表面可见少数散在细小暗红色结节,肝脏边缘锐利。

2. 3. 2 肝脏纤维化光镜检查

在 HE和 VG切片上,各组小鼠肝脏纤维化如表 3所见。经 Ridti分析, 3个给药组肝纤维化程度明显低于 B组,而各给药组间差异不显著;经 t 检验,成纤维细胞数以 C组最低,显著低于 B组, 3个给药组间差异不显著。

表 3 各组小鼠肝脏纤维化情况 ($\bar{x}\pm s$, n= 20)

Tab 3 Measurement of liver fibrosis in different groups of mice($\bar{x}\pm s$, n= 20)

	B	C	D	E
Liver fibrosis (Point)	1. 96± 1. 06	1. 12± 0. 76*	1. 3± 0. 84*	1. 42± 0. 77*
Fibroklast (Number)	9. 94± 8. 47	3. 76± 2. 86*	4. 63± 3. 06*	4. 88± 3. 56*

* : P < 0. 05 *vs* B

2. 4 肝结散对小鼠 LPO、SOD、GSH的影响,见表 4

表 4 各组小鼠外周血及肝组织匀浆中 LPO、SOD、GSH的变化 ($\bar{x}\pm s$, n= 20)

Tab 4 Concentrations of LPO, SOD and GSH in serum and liver homogenate in different groups of mice($\bar{x}\pm s$, n= 20)

	Serum			Homogenate		
	LPO(C_B/nmol· ml^{-1})	SOD(u/ml)	GSH(ρ_B/mg· ml^{-1})	LPO(nmol/mg· protein)	SOD(u/mg· protein)	GSH(mg· protein)
A	5. 12± 0. 47	22. 5± 2. 44	55. 4± 2. 43	3. 32± 0. 4	23. 8± 2. 1	4. 05± 0. 21
B	8. 70± 0. 72△△	12. 75± 2. 70△△	40. 00± 2. 65△△	7. 16± 0. 80△△	12. 8± 2. 12△△	2. 28± 0. 56△△
C	7. 89± 0. 52	13. 20± 3. 81△△	43. 63± 4. 25△△	6. 37± 0. 56△△	13. 88± 3. 71△△	3. 45± 0. 43△□*
D	6. 42± 0. 64△△□**	19. 38± 4. 21△△□**	48. 52± 3. 67△□**	4. 72± 0. 36△□**	20. 43± 4. 25△□**	3. 89± 0. 54△□*
E	6. 74± 0. 71△□*	18. 83± 3. 90△□*	46. 67± 3. 42△□*	4. 89± 0. 56△□*	19. 39± 3. 59△□*	3. 59± 0. 48△□*

△: P < 0. 05,△△: P < 0. 01 *vs* A;* : P < 0. 05,** : P < 0. 01 *vs* B;□: P < 0. 05 *vs* C

如表 4所示: D组与 E组各项指标与 B组比较均有显著性差异;与 C组比较,除肝 GSH外,其它各项均有显著性差异; C组与 B组比较,只有肝 GSH含量差异显著; A组与其它各组比较,各项指标均有显著性差异。提示慢性 CCl_4性肝损害时存在自由基代谢异常,主要表现为血及肝中 LPO蓄积和 SOD、GSH降低,秋水仙碱只对肝 GSH有所提高,而肝结散对这种代谢异常有良好的调节作用。

2. 5 肝结散对小鼠外周血 PCⅢ、HA的影响,见表 5

表 5 各组小鼠外周血中 PCⅢ、HA的变化 ($\bar{x}\pm s$, n= 20)

Tab 5 Concentrations of PCⅢ and HA in serum in different groups of mice($\bar{x}\pm s$, n= 20)

	A	B	C	D	E
PCⅢ(u/L)	1181. 25± 106. 87	1956. 88± 201. 71△△	1368. 0± 184. 57△△**	1459. 7± 174. 8△**	1485. 46± 163. 4△**
HA(ρ_B/mg· L^{-1})	1411. 32± 158. 02	2339. 64± 209. 83△△	1641. 24± 149. 64△△**	1761. 35± 151. 36△**	1814. 28± 170. 31△**

△: P < 0. 05,△△: P < 0. 01 *vs* A;** : P < 0. 01 *vs* B

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

如表 5所示: B组小鼠 PCⅢ、HA较 A组显著增高; 3个给药组小鼠 PCⅢ、HA较 A组升高,较 B组降低,给药组间差异不显著。

3 讨论

国内外近年来的研究证实,肝纤维化时细胞外间质过度表达,血清及肝组织中 HA、PCⅢ等含量随肝细胞损伤程度及纤维化程度而变化[4]。临床研究证实: 血清 HA升高幅度与肝组织病变的严重性呈正相关,并且与肝功能指标之间也有密切相关性,认为 HA可以反映肝脏的损伤程度和肝纤维化发展变化。PCⅢ与肝脏纤维化形成的活动程度亦有密切的相关性。其血清含量随肝脏胶原合成的活跃而增多[5]。本实验观察到具有养阴活血功效的肝结散能明显减少实验性肝纤维化小鼠血清及肝组织匀浆中 HA、PCⅢ含量;同时观察到用药组小鼠肝细胞损害较轻,肝纤维化及肝脾肿胀程度较对照组均有明显改善,与具有抗肝纤维化作用的秋水仙碱对照,表现出良好的保护效应。

肝纤维化形成的最直接原因是肝细胞坏死,因为坏死本身即是一种强有力的刺激和诱导因素。另一重要因素是免疫调节紊乱,即肝脏内的 Kupffer细胞和淋巴细胞被激活,激活的细胞释放各种细胞因子和其受体的表达,从而引发病理改变[6]。CCl_4诱导肝纤维化的机制涉及这两方面的原因,其中以细胞损害尤为重要。CCl_4在肝脏经微粒体酶还原活化生成自由基(CCl_3和$\cdot OOCCl_3$),后者对质膜的直接损伤及启动膜脂质过氧化是其重要的初始和二次反应[7]。CCl_4所致的小鼠肝损伤时存在着明显的自由基代谢异常。肝结散能增加小鼠血清及肝脏中 SOD、GSH含量,减少 LPO蓄积,由此减轻自由基损伤作用,这可能是其抗CCl_4性肝损伤的作用机制之一。到于肝结散在肝损伤状态下的免疫调节作用则有待进一步研究。

参考文献

1 李国定,陆汉民,李宣海等.钙通道阻滞剂在肝硬化门脉高压患者中的应用.中华医学杂志, 1990; 20(7): 370

2 Kershenobich D, Uribe M, Suarez G I *et al*. Treatment of cirrhosis with colehicine. Gastroenterology, 1979; 77: 532

3 杨大国.活血养血中药为主逆转肝纤维化的组织学观察.中西医结合杂志, 1993; 13(3): 3

4 陈东风,冷恩仁,刘为纹等.大鼠实验性纤维化过程中血清和肝 PCⅢ、HA、LN水平的动态变化.第三军医大学学报, 1996; 18(3): 234

5 金　博,尤大栋.肝脏胶原代谢特点和纤维化的诊断.中华传染病杂志, 1992; 10(2): 96

6 孔宪涛,高　峰.肝纤维化的实验与临床研究.第二军医大学学报, 1996; 17(1): 1

7 Boobis A R, Fawthrop D J, Davis D S. Mechanisms of cell death. Tips, 1989; 10: 275

(收稿: 1997-04-25;修回: 1998-01-11)

(编辑　张大春)

Preventive effects of Ganjiesan on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice

Yang Guohan, Dai Yuguang, Tan Xiaoming (Department of Traditional Chinese Medicine, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract **Objective**: To investigate the preventive effects of Ganjiesan (GJS) on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl_4). **Methods**: After the hepatic fibrosis was induced by CCl_4 in mice, the hepatic morphology and function were observed and the levels of procollagen Ⅲ (PCⅢ), hyaturonic acid (HA), glutathione (GSH), lipid peroxides (LPOs) and superoxide dismutase (SOD) in the plasma were determined. **Results**: In the mice without oral administration of GJS, collagen synthesis was increased while hepatic function was impaired. Meanwhile, plasma levels of PCⅢ and LPOs were increased whereas those of SOD and GSH decreased. In the mice with oral administration of GJS, collagen synthesis and deposition were inhibited, the hepatic function appeared normal and the plasma levels of the above-mentioned biochemical parameters gradually normalized. The effects of GJS paralleled with those of colchicine. **Conclusion**: GJS can exert significant preventive effects of hepatic fibrosis induced by CCl_4 in mice, which might be due to its promoting the removal of free radicals and decreasing the synthesis and accumulation of PCⅢ and HA.

Key words hepatic fibrosis; Ganjiesan; colchicine; mouse

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net