

抗肝纤方对大鼠肝纤维化防治作用的实验研究

★ 蒋苏贞 (广州荔湾区中医医院 广州 510080)

★ 江一平 (江西中医学院附属医院消化内科 南昌 330006)

摘要:目的:通过大鼠肝纤维化动物模型,研究抗肝纤方预防肝纤维化的作用,并探讨其作用机制。方法:采用二甲基亚硝胺(DMN)诱导大鼠制备肝纤维化模型,以秋水仙碱为阳性对照,采用光镜观察组织学改变并测定血清谷丙氨酸转移酶(ALT)、谷草氨酸转移酶(AST)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLB)、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、III型前胶原(PCIII)、和IV型胶原(IV-C),以反映肝细胞损伤及肝纤维化的程度。结果:抗肝纤方能显著降低大鼠血清中ALT、AST、HA、LN、PCIII、IV-C的水平,升高ALB。病理组织学检查亦表明,抗肝纤方能明显减轻实验大鼠肝脏纤维化程度。结论:抗肝纤方对实验性肝纤维化有预防作用。

关键词:肝纤维化;抗肝纤方;实验研究

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

肝纤维化是各种慢性肝病共同病理基础,是肝硬化的必经阶段,其实质是细胞外基质(ECM)的合成与降解失衡,导致ECM在肝内过量沉积^[1]。随着对肝纤维化发生机制认识的不断深化,现已证实肝纤维化是可逆性病变^[2],因此,如何防治肝纤维化是目前备受关注的问题^[3]。中药抗肝纤维化有广阔的前景,近年来研究结果表明,中药复方抗纤维化的特点是多环节、多靶位,与化学合成药物往往仅作用在单一环节或靶位相比有其独特的优势,值得深入研究^[4]。

抗肝纤方是作者治疗慢性肝炎(肝纤维化)多年临床经验总结出的经验方,在临床使用中取得了较好疗效。本实验旨在通过观察实验动物血清学指标及肝脏病理切片的改变,了解该方预防和治疗DMN导致的大鼠肝纤维化的效果,初步探讨其抗肝纤维化的机理,为临床应用该方提供更加可靠的依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SD大白鼠46只,雄雌各半,体重150~180g,由江西省实验动物中心提供,动物合格证号:医动字第021-9704号。

1.2 试剂和仪器 二甲基亚硝酸(DMN)购自上海中医药研究所,由瑞典JDK公司提供。HA放免试剂盒、PCIII放免试剂盒、LN放免试剂盒、IV-C放免试剂盒均由上海海军医学研究所提供,批号:20010101。 γ 放射免疫分析仪购自西安262厂FJ-2008P型。全自动生化测定仪为美国杜邦Dimen-

sion RxC型。

1.3 试验药物 抗肝纤方由生黄芪、黄精、白术、紫河车、片姜黄、地鳖虫、制鳖甲、田七、郁金、茜草、鸡骨草、垂盆草、败酱草、鸡内金、山楂组成,购自江西中医学院附属医院门诊部,均由江西中医学院药理学系鉴定确认。药物经常规煎煮,过滤,水浴蒸发至1mL含生药材1.8g,置于4℃冰箱内保存备用。秋水仙碱由云南西双版纳制药厂生产,生产批号002722,研末溶于生理盐水中,制成0.01mg/1ml混悬液,置于冰箱内保存备用。

1.4 动物分组 将大鼠随机分成4组,正常组8只,病理组14只,中药组12只,秋水仙碱组12只,每组大鼠均雌雄各半。

1.5 模型制备 按文献方法^[5],取二甲基亚硝酸(DMN)1mL加生理盐水至200mL稀释备用(浓度为0.5%)。大鼠除正常组8只外,其余38只大鼠每周第1、2、3天连续腹腔注射DMN稀释液0.2mL/100g体重,每天1次,共3周。

1.6 处理方法 从实验第1天始,正常组与病理组给予生理盐水灌胃(1mL/100g体重),中药组以抗肝纤方煎剂浓缩液灌胃(1mL/100g体重),秋水仙碱组以秋水仙碱生理盐水溶解液灌胃(0.01mg/1mL/100g体重),均为每日1次,至实验结束,共4周。

1.7 标本采集及制备 实验结果时,各组大鼠股动脉取血8mL,待测血清生化指标,并立即脱椎处死,剖腹取肝脏、脾脏,观察大体外观后,将肝脏固定于

10% 甲醛溶液中,待作病理切片。

1.8 观察指标及测定方法 一般情况:包括大鼠体重变化、活动、皮毛、摄食、排泄、死亡等。

血清生化指标:ALT、AST、ALB、GLB 用自动生化分析仪分析;用放免法检测 HA、PCIII、IV-C、LN。

肝脏组织病理学检查:取肝脏左叶以 10% 甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,连续切片,HE 染色观察肝组织学改变,VG 胶原纤维染色观察胶原纤维增生情况。

1.9 统计方法 上述各项指标数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表

表 1 各组大鼠血清肝功能改变($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·g ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	GLB/g·L ⁻¹
正常组	8	42.08 ± 9.53	103.08 ± 10.25	32.54 ± 3.96	37.57 ± 1.91
病理组	13	118.02 ± 21.40 ^{△△}	174.21 ± 18.67 ^{△△}	27.48 ± 2.21 ^{△△}	40.83 ± 1.99 [△]
中药组	12	74.54 ± 19.56 ^{△△*}	127.83 ± 14.34 ^{△*}	29.44 ± 2.11 ^{△*}	40.08 ± 2.49 [△]
秋水仙碱组	11	98.07 ± 23.40 ^{△△*}	156.23 ± 22.47 ^{△*}	28.64 ± 2.33 ^{△△}	40.60 ± 2.17 [△]

注:与正常组比较,△P<0.05,△△P<0.01;与病理组比较,*P<0.05,**P<0.01;与中药组比较,#P<0.05,##P<0.01;下表同。

2.3 血清中 HA、PCIII、IV-C、LN 的变化 见表 2。

表 2 各组大鼠血清肝纤维化指标改变($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HA/μg·L ⁻¹	PCIII/μg·L ⁻¹	LN/μg·L ⁻¹	IV-C/μg·L ⁻¹
正常组	8	248.19 ± 11.00	132.92 ± 13.60	84.16 ± 13.85	103.45 ± 14.32
病理组	13	455.04 ± 16.06 ^{△△}	277.31 ± 17.23 ^{△△}	212.18 ± 25.57 ^{△△}	186.54 ± 16.21 ^{△△}
中药组	12	380.37 ± 23.89 ^{△△*}	239.18 ± 20.05 ^{△△*}	179.31 ± 18.16 ^{△△*}	138.56 ± 17.85 ^{△△*}
秋水仙碱组	11	394.81 ± 26.89 ^{△△*}	267.33 ± 23.14 ^{△△*}	195.55 ± 19.90 ^{△△*}	148.92 ± 24.52 ^{△△*}

2.4 肝脏组织病理改变 光镜观察:正常组 HE 染色见肝小叶结构完整,无肝细胞变性坏死,无炎细胞浸润及纤维组织增生。胶原染色见肝板间有少许极为细的网状纤维包绕肝窦,门脉区少有纤维分布。病理组 HE 染色多数大鼠肝脏小叶失去正常结构,肝板排列紊乱,肝细胞肿胀、变性,汇管区中-重度炎性细胞浸润;胶原染色显示汇管区大量胶原沉积,呈较宽的条索状,纤维伸入肝小叶,或见相互连接的纤维隔,重新分割肝小叶。中药组 HE 染色见多数大鼠肝小叶结构尚正常,肝细胞肿胀变性,以靠汇管区为主,汇管区轻-中度炎症及碎屑样坏死。胶原染色显示汇管区纤维组织轻-重度增生,呈窄带状,部分由汇管区向周围延伸。秋水仙碱组 HE 染色大鼠肝细胞变性坏死及炎性浸润较明显,少部分肝小叶结构破坏。胶原染色显示汇管区纤维组织轻-重度增生,呈条索状,大部分由汇管区向周围延伸。

肝纤维化程度半定量分析^[6]:-无胶原纤维增生;+汇管区有少量纤维组织增生,纤维组织短而细;++汇管区有较多纤维组织;+++汇管区有大量纤维组织增生,呈窄带状,并向肝小叶周围伸展;++++汇管区有大量纤维组织增生,呈宽

示,两组均数比较采用 t 检验,等级分组资料采用 Ridit 分析,所有数据均利用 SPSS 软件包分析。

2 结果

2.1 一般情况 DMN 染毒期间,大鼠生长减慢,精神萎靡,反应迟钝,活动减少,饮食下降,粪便稀薄,皮毛皱而不洁、缺乏光泽。与病理组相比,中药组和秋水仙碱组症状稍轻,非染毒期间恢复较快。实验期间,病理组与秋水仙碱组死亡大鼠各 1 只。

2.2 血清中 ALT、AST、ALB、GLB 的变化 测定结果见表 1。

带状,伸展包绕或分割肝小叶,中央静脉有偏位现象。分别给予 0、1、2、3、4 分。

中药组、秋水仙碱组大鼠肝脏纤维化程度明显轻于病理组(P<0.05);中药组与秋水仙碱组之间大鼠肝脏纤维化程度无明显差异(P>0.05),但有减轻的趋势(见表 3)。

表 3 大鼠肝纤维化程度光镜观察结果

组别	n	肝纤维化程度/例					总积分	平均积分
		0 分	1 分	2 分	3 分	4 分		
正常组	8	8	0	0	0	0	0	0
病理组 ^{△△}	13	0	0	1	5	7	45	3.46
中药组 [*]	12	0	2	4	4	2	30	2.5
秋水仙碱组 [*]	11	0	1	3	4	3	31	2.83

3 讨论

肝纤维化是现代医学病理形态学概念,中医并无此称谓。根据其病理特征及临床表现,可归属于“胁痛”、“臌胀”、“积聚”、“黄疸”等病的病理过程中的某一阶段。本病的病因病机众多观点侧重不同,有强调“湿热”、“疫毒”、“痰瘀”或“肝郁”者,亦有强调“正虚”、“血瘀”者^[7~13]。治则上强调“顾正气”和“攻补兼施”。调治重心是肝、脾、肾。常用治法有:活血化瘀、清热利湿、疏肝理气、健脾化湿、滋养肝

肾、消积化癥等^[14]。主流治法是活血化癥。

我们认为肝纤维化是慢性肝炎日久不愈,反复活动发展而来,它具有病程长、病情缠绵和正伤邪不去的特点,先因湿热邪毒伤肝,肝病日久及脾,肝脾同病人肾,最后导致肝脾肾同病、湿热邪毒留恋不去,形成脾虚、血瘀、肝肾精血不足、湿热留滞的复杂证候。具体来说,湿热疫毒是启动因素和长期作用的基本病因,气滞血瘀是脏腑功能失调的病理结果,正气虚弱是内因和转归,肝病传脾是必然演变过程。因此临床辨治本病,必需抓住虚、瘀、毒三个字,当以扶正为主、祛邪为辅为治疗原则,以益气活血、调补肝肾、兼祛湿毒为法,具体用药当清灵活泼,切忌过于滋腻,以免留邪为患。基于以上观点,我们以益气健脾、调补肝肾、活血解毒为组方思想,自拟抗肝纤方防治慢性肝炎(肝纤维化)。方中黄芪、黄精、白术、紫河车健脾益气,调补肝肾,为主药;姜黄、地鳖虫、制鳖甲、田七、茜草、郁金、鸡内金、山楂等相伍,在活血化癥的同时,兼具软坚散结、疏肝养肝之功;配用鸡骨草、垂盆草、败酱草清解湿热,剔除余邪,攘外而安内。本方立足于补,兼具化癥散结,解毒护肝之功,贴近肝纤维化的中医病机特点,因而临床效果明显。

从本实验结果表明,抗肝纤方可使大鼠血清ALT、AST、HA、PCIII、IV-C、LN明显降低,升高血清白蛋白,与病理组比较有明显差异;病理组织学改变亦有明显改善,胶原染色提示中药组大鼠肝脏纤维化程度明显轻于病理组。反映了抗肝纤方具有良好的保护肝细胞,抑制胶原合成、沉积,促进其降解的作用。其疗效略优于秋水仙碱。秋水仙碱已被证实可以增加肝硬化患者的生存率,该药具有抗炎、抗纤维化作用,实验亦证实其可以抑制增生的肝细胞。活化的贮脂细胞合成和分泌胶原^[15]。

不过,本实验观察时间短,其结果只表明了抗肝纤方对实验大鼠肝纤维化具有较好的预防作用。今后可另外立项,就其对肝纤维化的治疗效果问题设计不同疗程予以对照研究,进一步观测该方治疗肝纤维化的确切效果。

参考文献

- [1]李石.肝纤维化发生机制[J].中华消化杂志,1999,19(1):48
- [2]贾克明.加强对乙型病毒性肝炎治疗的研究[J].中华内科杂志,2000,39(12):797
- [3]谢仕斌,姚集鲁.肝纤维化的诊断与治疗对策[J].新医学,1999,30(3):177
- [4]贾继东,王宝恩.肝纤维化的中医中药治疗[J].中华肝脏病杂志,2001,9(2):120
- [5]Ala-Kokko L, Pihlajaemi T, Myers J, et al. Gene expression of type I, III and IV collagen in hepatic fibrosis induced by dimethylnitroamine in the rat[J]. Biochem J. 1987, 244: 75
- [6]姜德友,王远红,吴艳敏,等.肝舒康冲剂防治二甲基亚硝胺致大鼠肝纤维化的实验研究[J].中西医结合肝病杂志,2000,10(4):21
- [7]张俊富,崔丽安.慢性肝炎及肝硬化辨证分型与血清肝纤维化指标的关系[J].中西医结合肝病杂志,1995,5(4):10
- [8]盛国光.慢性乙型肝炎中医病因病机的探讨[J].中西医结合肝病杂志,1997,7(2):126
- [9]蒋本尤.以肝郁为核心论治慢性乙型肝炎[J].中医杂志,1990,31(6):30
- [10]何建成.周信有教授治疗肝炎后肝硬化经验介绍[J].新中医,1996,28(12):2
- [11]马克明.扶正祛邪治疗乙型肝炎150例[J].新中医,1996,28(9):46
- [12]程雅君,程雅菲,刘平.肝苏方防治肝纤维化机理探讨及临床体会[J].中医药研究,2002,18(1):22
- [13]刘宏元,刘作恩.慢性乙肝早期纤维化的治疗研究[J].天津中医,1997,14(3):101
- [14]贾长恩.中医药抗肝纤维化研究的现状和展望[J].北京中医药大学学报,1996,19(5):2
- [15]Kershehovich O. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver [J]. N Engl J Med, 1988, 318: 1 709

(收稿日期:2003-08-25)

Experimental Study on Kangganqian Decoction in Rats with Liver Fibrosis

JIANG Su-zhen, JIANG Yi-ping

(Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Kangganqian decoction in the Prevention of liver fibrosis through the rat model and to discuss its mechanism. Method: The rat model of liver fibrosis was induced by intraperitoneal injection of DMN. They were treated with Kangganqian decoction or colchicines as positive control. The histological changes were observed with microscope. The levels of ALT, AST, ALB, GLB, HA, LN, PCIII, IV-C in serum were determined to reveal the event of liver damage. Results: Kangganqian decoction significantly reduced the levels of ALT, AST, HA, LN, PCIII, IV-C and improved the level of ALB in serum. Pathological examination suggested with the degree of liver fibrosis was obviously relieved after the treatment of Kangganqian decoction. Conclusion: Kangganqian decoction has preventive effect on liver fibrosis in the rats induced by DNM.

Key words: Liver fibrosis; Kangganqian decoction; experimental study