

• 实验研究 •

大黄廑虫丸对实验性肝纤维化大鼠肝组织病理学及其细胞凋亡的影响

于亚男¹, 钟俊², 刘晓雨², 王京², 马蕊², 吴秋萍², 成家茂^{1*}

1. 大理大学 基础医学院 人体解剖学教研室, 云南 大理 671003

2. 大理大学 临床医学院, 云南 大理 671003

摘要:目的 观察大黄廑虫丸对肝纤维化模型大鼠肝组织病理学及其细胞凋亡的影响, 探讨其抗肝纤维化的作用机制。方法 将30只SD大鼠随机分为对照组、模型组和大黄廑虫丸组, 后两组行CCl₄诱导肝纤维化造模, 8周后大黄廑虫丸组大鼠ig大黄廑虫丸0.45 g/kg, 另两组给予等量生理盐水, 同时称体质量。连续ig 4周后, 断头处死各组大鼠, 摘取肝脏, 观察色泽、质地并称重, 计算肝脏指数(LI); 采用HE染色、Masson染色法光镜下观察各组肝组织病理改变, 采用纤维化半定量计分系统结合测量胶原纤维面积密度, 评估肝纤维化程度; 采用TUNEL法检测肝脏细胞凋亡, 计算凋亡指数(AI)。

结果 大黄廑虫丸组大鼠肝的色泽和质地介于对照组和模型组之间。与模型组比较, 大黄组廑虫丸组大鼠的LI、炎症活动度半定量、纤维化半定量评分、胶原纤维面积密度和细胞凋亡指数(AI)明显下降, 两组比较差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。HE染色显示大黄廑虫丸组大鼠的肝小叶结构破坏较轻, 肝索排列紊乱、肝细胞变性得到改善, 汇管区增生不明显。Masson染色显示大黄廑虫丸组大鼠肝小叶结构紊乱有所改善, 汇管区胶原纤维沉积和小叶内纤维间隔明显减少。FITC荧光标记染色显示大黄廑虫丸组肝小叶结构较清晰, 可见少量凋亡细胞。

结论 大黄廑虫丸可以降低大鼠的LI、炎症活动度半定量、纤维化半定量评分和胶原纤维面积密度, 可能通过抑制肝细胞凋亡来改善大鼠肝纤维化程度。

关键词: 大黄廑虫丸; 肝纤维化; 肝星状细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)02-0197-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.02.001

Effect of Dahuang Zhechong Pills on hepatic histopathology and apoptosis in rats with experimental hepatic fibrosis

YU Ya-nan¹, ZHONG Jun², LIU Xiao-yu², WANG Jing², MA Rui², WU Qiu-ping², CHENG Jia-mao¹

1. Department of Human Anatomy of Basic Medical College, Dali University, Dali 671003, China

2. College of Clinical Medicine, Dali University, Dali 671003, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of Dahuang Zhechong Pills on hepatic histopathology and apoptosis in rats with experimental hepatic fibrosis for exploring the mechanism of Dahuang Zhechong Pill on anti-hepatic fibrosis. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into control group, model group, and Dahuang Zhechong Pill group. And the ones of latter two groups were used to establish the CCl₄-induced liver fibrosis model. After 8 weeks, the rats in Dahuang Zhechong Pills group were ig Dahuang Zhechong Pills 0.45 g/kg, while the ones of other two groups only given normal saline. After 4 weeks, the rats in each group were sacrificed by breaking head, their livers were taken out to observe the color and texture, and weighed for calculating the liver index (LI). HE and Masson staining were used to observe the pathological changes of liver tissues in each group under light microscope. A semi quantitative scoring system of fibrosis combined with the measurement of the area density of collagen fiber was used to evaluate the degree of hepatic fibrosis. TUNEL method was used to detect the apoptosis of liver cells by the apoptosis index (AI). **Results** The color and texture of the liver in Dahuang Zhechong Pills group were between those in the control and model groups. Compared with

收稿日期: 2019-12-22

基金项目: 云南省自然科学基金高校联合项目(2017FH001-076); 国家级大学生创新训练项目(201810679008、201810679009)

作者简介: 于亚男, 女, 硕士研究生。E-mail: 1090972935@qq.com

*通信作者 成家茂, 副教授, 主要研究方向为中医药抗肝纤维化作用机制研究。E-mail: chjmao@163.com

the model group, LI, inflammatory activities, the semi-quantitative scores of fibrosis, the area density values of collagen fiber, and AI of hepatic tissues of rats in Dahuang Zhechong Pill group were significantly decreased ($P < 0.01$). HE staining showed that the hepatic lobules of rats were less damaged, liver cords were disorganized, hepatocyte degeneration was improved, and the hyperplasia in the manifold area was not obvious in Dahuang Zhechong Pill group. Masson staining showed the structural disorder of hepatic lobule in rats was improved, and collagen deposition and interlobular interlobular septum were decreased obviously in Dahuang Zhechong Pill group. FITC fluorescent staining showed that the liver lobule structure of rhubarb pills group was clear, and a small number of apoptotic cells could be seen. **Conclusion** Dahuang Zhechong Pills can decrease LI, inflammatory activities, the semi-quantitative scores of fibrosis, and the area density values of collagen fiber, and maybe improve the liver fibrosis in rats by inhibiting the hepatocyte apoptosis.

Key words: Dahuang Zhechong Pills; hepatic fibrosis; hepatic stellate cells; apoptosis

肝纤维化是由各类慢性肝病最终发展为肝硬化以及肝癌的必经病理学过程^[1], 而肝星状细胞(HSC)在肝纤维化中发挥重要作用^[2]。研究发现细胞凋亡是肝星状细胞失活或死亡的抑制机制之一, 通过内质网应激介导细胞凋亡可导致 HSC 的死亡, 但仍然存在争议^[2-3]。本研究前期发现, 大黄廑虫丸不仅能改善肝炎肝硬化患者的临床症状和肝功能, 还通过抑制活化的 HSC 增殖和细胞因子 TGF- β 1 的表达, 抑制基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP)生成和促进基质金属蛋白酶(MMP)胶原酶合成, 促进肝纤维化病变的修复^[4-5]。本文进一步观察了大黄廑虫丸对实验性肝纤维化大鼠肝组织病理学及其细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

随机选取 30 只体质量为 150~200 g 的同一批 SPF 级 SD 大鼠, 均购自成都达硕实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK(川)2015-030, 普通饲料和饮水饲养。

1.2 主要试剂与仪器

大黄廑虫丸, 规格 3 g/丸, 购自北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂, 产品批号 190301。四氯化碳(CCl_4) 500 mL, 购自天津市福晨化学试剂厂。Tunel 法细胞凋亡试剂盒, 购自武汉博士德生物有限公司。主要仪器包括瑞士 Precisa XS 225A 电子天平, Leica RM2126 组织切片机, OLYMPUS IX51 倒置荧光显微镜(配 DP72 数码成像系统及 cellSens Standard 图像处理软件), 以及日本 Nikon TS100 相差显微镜等。

1.3 分组及给药

实验前禁止饮食饮水 12 h。随机将大鼠分成 3 组: 对照组 5 只, 模型组 10 只, 大黄廑虫丸组 15 只。随机选取 30 只 SD 正常大鼠饲养 5 d 后, 按照课题组的研究方法^[4]将模型组、大黄廑虫丸组行

CCl_4 诱导肝纤维化造模, 对照组则分笼饲养。将大黄廑虫丸用超纯水充分溶解, 冰箱内 -4°C 保存备用。8 周后, 给药组 ig 给药, 每天每只下午定时给药 1 次, 给药剂量为 0.45 g/kg, 连续给药 4 周。给药剂量依据人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值, 如人的临床剂量为 X mg/kg, 换算成大鼠的剂量为 $6.3 \times \text{mg/kg}$, 即大黄廑虫丸组大鼠的剂量为 0.45 g/kg; 对照组和模型组 ig 等量生理盐水。

1.4 肝脏指数

实验结束时, 对照组、模型组和大黄廑虫丸组的所有大鼠分别断头处死, 取肝组织经 10% 甲醛固定 48 h 后, 石蜡包埋、切片。至实验取材时, 模型组共死亡 1 只, 大黄廑虫丸组共死亡 3 只。每周记录各组大鼠体质量, 计算肝脏指数(LI)。

$\text{LI} = \text{肝湿质量} / \text{体质量}$

1.5 肝组织病理学检测

将对照组、模型组和大黄廑虫丸的肝组织分别经修块, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度 3 μm 。分别进行 HE 染色、Masson 染色, 在光镜下观察肝组织; 根据试剂盒说明书操作进行染色, 进行肝组织 FITC 荧光染色, 荧光显微镜下激发波长为 493 nm, 发射波长为 526 nm, 观察 FITC 标记染色的肝组织切片, 数字成像系统拍照。

1.6 纤维化半定量评分

光镜下主要检查肝脏纤维化程度并采用半定量计分系统(SSS)^[6], 结合胶原纤维面积密度测定进行纤维化程度分析, 计分方法为: (1) 炎症活动度半定量计分公式为 $P+L+2 \times (PN+BN)$, P 为汇管区炎症, L 为小叶内炎症, PN 为碎屑坏死, BN 为桥接坏死; (2) 纤维化半定量计分公式为 $L+P+2 \times (N \times W)$, L 为小叶纤维化, P 为汇管区纤维化, N 为纤维间隔数量, W 为纤维间隔宽度; (3) 疗效判断标准: 肝组织活检肝纤维化 SSS 评分较治疗前下降 ≥ 2 分, 可视为有效; 凡未达到有效标准者视为

无效；(4) 胶原纤维面积密度：每张切片随机取 5 个视野，应用图像成像分析软件测量面积密度（阳性面积占视野面积百分比）。

1.7 TUNEL 法检测细胞凋亡

根据 FITC 荧光标记染色图，利用 Image pro plus 6.0 图像分析软件，计数阳性细胞及区域内总细胞，计算阳性细胞百分比，计算细胞凋亡指数 (AI)。

AI = 阳性细胞数 / 总细胞数

1.8 统计学方法

形态学变化采用统计描述，计量资料采用配对 t 检验，计数资料采用单因素方差分析检验，所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并应用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 肝脏标本肉眼观测结果

与对照组比较，模型组大鼠肝脏的色泽较灰暗，触膜肝表面有颗粒感，质地较硬，而大黄廬虫丸组大鼠肝的色泽和质地介于二者之间。

2.2 肝脏指数

与对照组比较，模型组大鼠 LI 升高，两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)；与模型组比较，大黄廬虫丸组大鼠的 LI 明显下降，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，见表 1。

表 1 大鼠肝脏指数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison on liver index of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	LI/(g·kg ⁻¹)
对照	5	—	25.53 ± 1.74
模型	9	—	34.26 ± 4.19**
大黄廬虫丸	12	0.45	22.72 ± 4.73 ^{▲▲}

与对照组比较：** $P < 0.01$ ；与模型组比较：^{▲▲} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group

2.3 肝组织病理学检测

2.3.1 常规 HE 染色 光镜下观察显示，对照组大鼠的肝小叶结构正常，肝索、窦周隙和肝血窦以中央静脉为中心呈放射状排列，小叶间分界不明显，无胶原纤维增生；模型组大鼠肝小叶结构严重破坏，小叶间分界明显，肝索排列紊乱，肝窦扩张，肝细胞不同程度空泡变性或脂肪变性，汇管区扩大，可见大量增生的纤维结缔组织向肝实质延伸，形成假小叶；大黄廬虫丸组大鼠的肝小叶结构破坏较轻，肝索排列紊乱、肝细胞变性得到改善，汇管区增生不明显。

2.3.2 Masson 染色 光镜下观察显示红染为肌纤维，蓝染为胶原纤维，对照组大鼠肝组织正常，无胶原纤维沉积；模型组大鼠大量肝细胞变性，肝索严重紊乱，红染的肌纤维少见，汇管区扩张增厚，有大量蓝染胶原纤维沉积，并可形成较多连续的纤维间隔延伸向小叶内；大黄廬虫丸组大鼠肝小叶结构紊乱有所改善，汇管区胶原纤维沉积和小叶内纤维间隔明显减少。

2.3.3 FITC 荧光标记染色 对照组肝的细胞形态正常，呈圆形或类圆形，可见少量凋亡细胞；模型组肝小叶结构紊乱，可见大量凋亡细胞；大黄廬虫丸组肝小叶结构较清晰，可见少量凋亡细胞。

大鼠肝组织 HE 染色、Masson 染色及凋亡细胞和 FITC 标记荧光染色结果见图 1。

2.4 纤维化半定量评分

与对照组比较，模型组大鼠炎症活动度半定量、纤维化半定量评分和胶原纤维面积密度均显著升高，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)；与模型组比较，大黄廬虫丸组大鼠炎症活动度半定量、纤维化半定量评分和胶原纤维面积密度均显著降低，两组比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)，见表 2。

2.5 肝组织的细胞凋亡情况

与对照组比较，模型组肝细胞的 AI 升高，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)；与模型组比较，大黄廬虫丸组肝细胞的 AI 降低，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)，见表 3。

3 讨论

肝细胞凋亡和炎症细胞可引发促纤维化和促炎症因子分泌，激活 HSC^[7]。大量研究证实活化 HSC 是胶原纤维的主要来源，在纤维化逆转过程中，肝纤维化逆转的关键是减少胶原分泌，增加其降解。本研究表明，大黄廬虫丸组大鼠的肝脏指数下降，肝组织病理性损伤较模型组明显减轻，汇管区的胶原纤维沉积和肝小叶内的纤维间隔数量减少，纤维化程度明显降低，表明大黄廬虫丸对 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠的肝损伤具有逆转作用。

内质网应激是一种重要的细胞自我防御机制。肝细胞内有大量的内质网，持续的内质网应激将启动细胞凋亡途径，但具体的凋亡途径尚不十分清楚，已知的凋亡途径主要包括 PERK/eIF-2 α -CHOP 途径、IRE1 α -JNK 途径和 Caspase-12 途径等^[8-9]。另有研究认为 HSC 凋亡是肝纤维化逆转中的重要环节，

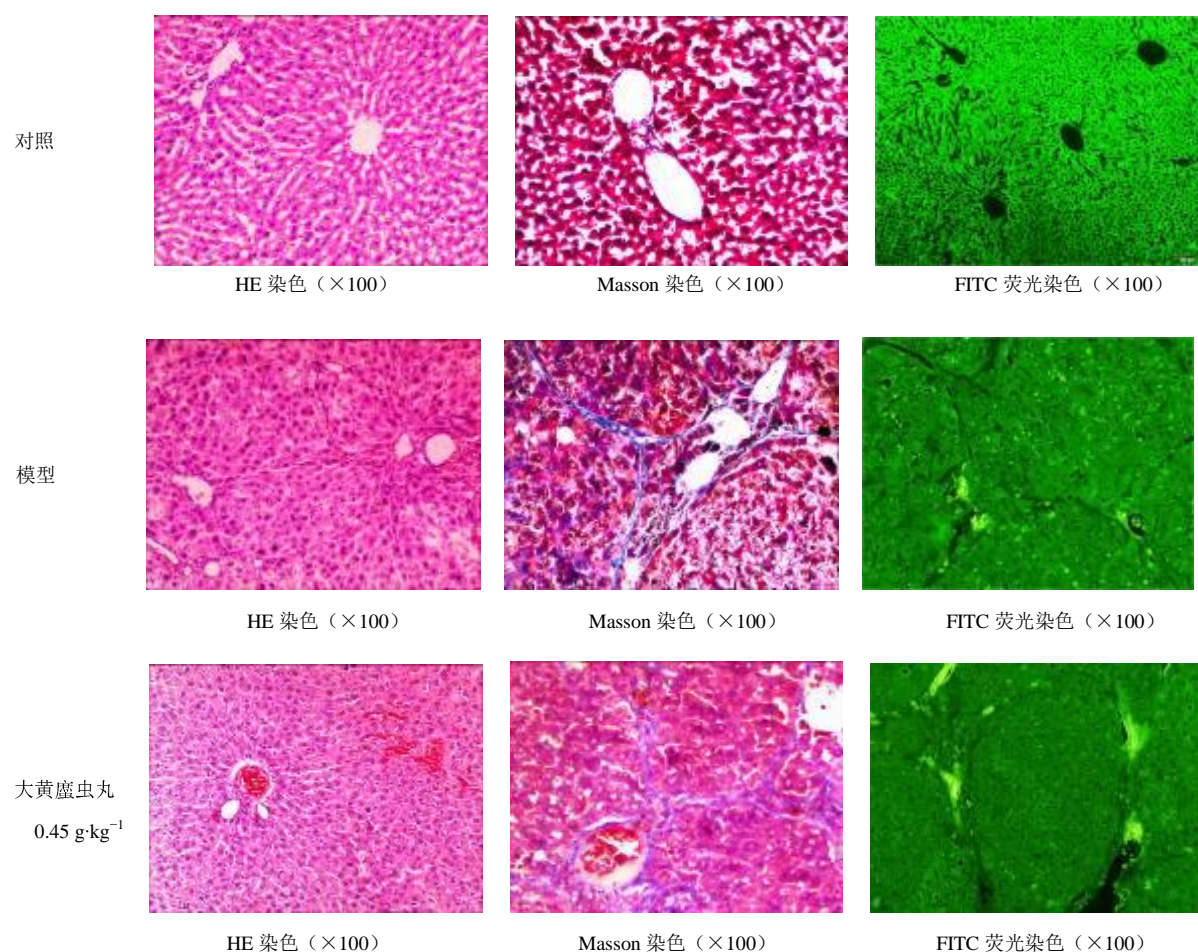


图 1 大鼠肝组织 HE 染色、Masson 染色及凋亡细胞和 FITC 标记荧光染色结果

Fig. 1 Effects of HE, Masson staining, and FITC-labeled fluorescent staining of hepatic tissue in rats

表 2 大鼠肝组织 SSS 评分和胶原纤维面积密度的比较 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison on SSS scores and collagen fiber area density of liver tissue in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	SSS 评分		胶原纤维面积密度/%
			炎症活动度半定量	纤维化半定量	
对照	5	—	0.61 ± 0.27	0.00 ± 0.00	2.48 ± 0.82
模型	9	—	16.25 ± 2.07**	18.26 ± 2.61**	11.37 ± 3.54**
大黄廬虫丸	12	0.45	11.33 ± 3.16 ^{▲▲}	12.55 ± 3.74 ^{▲▲}	4.98 ± 2.58 ^{▲▲}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group表 3 肝组织的细胞凋亡情况 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Apoptosis in liver tissue ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	AI/%
对照	5	—	7.73 ± 2.14
模型	9	—	41.57 ± 4.35**
大黄廬虫丸	12	0.45	23.65 ± 3.47 ^{▲▲}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group

在肝损伤恢复过程中, 存在活化 HSC 凋亡, 促进其凋亡被认为是肝纤维化逆转的始动因素, 已知的 HSC 凋亡信号途径主要包括线粒体途径、死亡受体途径和非死亡受体途径^[10-11]。由此可见, 肝细胞和 HSC 的凋亡在肝纤维化过程中发挥着不同的作用: 肝细胞的凋亡促进肝纤维化的形成; 促进 HSC 的凋亡可逆转肝纤维化^[11-12]。本研究发现, 模型组的肝

组织内凋亡细胞增多, 出现典型的肝纤维化改变, 说明 CCl_4 有可能主要通过促进肝细胞凋亡来诱导大鼠的肝发生纤维化; 而大黄蛰虫丸组的凋亡细胞明显减少, 肝纤维化病理改变得明显改善, 说明大黄蛰虫丸抑制了肝细胞的凋亡, 从而发挥抗肝纤维化作用。

综上所述, 大黄蛰虫丸可以降低大鼠的 LI、炎症活动度半定量、纤维化半定量评分和胶原纤维面积密度, 可能通过抑制肝细胞凋亡来改善大鼠肝纤维化程度。

参考文献

- [1] 秦冬梅, 张 钰, 李 莉. 具有抗肝纤维化作用的植物药研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2017, 25(11): 958-965.
- [2] Senoo T, Sasaki R, Akazawa Y, *et al.* Geranylgeranylacetone attenuates fibrogenic activity and induces apoptosis in cultured human hepatic stellate cells and reduces liver fibrosis in carbon tetrachloride-treated mice [J]. *BMC Gastroenterol*, 2018, 18(1): 34.
- [3] Lim M P, Devi L A, Rozenfeld R. Cannabidiol causes activated hepatic stellate cell death through a mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2: e170.
- [4] 成家茂, 潘志恒, 谢 瑶, 等. 大黄蛰虫丸经旁分泌途径对早期肝纤维化的干预作用 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 296-299.
- [5] 潘志恒, 成家茂, 李永伟, 等. 大黄蛰虫丸对大鼠肝星状细胞活化增殖的影响 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2009, 30(3): 250-254, 274.
- [6] 中华肝脏病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识 [J]. 药品评价, 2007, 4(4): 265-266.
- [7] Kisseleva T, Brenner D A. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(1): S73-S78.
- [8] Malhi H, Kaufman R J. Endoplasmic reticulum stress in liver disease [J]. *J Hepatol*, 2011, 54(4): 795-809.
- [9] 王洪岩, 刘晓璐, 杜雅菊, 等. 内质网应激与肝脏疾病研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(6): 451-459.
- [10] 丁 倩. 凋亡相关蛋白 BCL-B 在肝纤维化逆转中对肝星状细胞凋亡的调节及机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [11] 张 怡, 平 洁, 汪 晖. 肝星状细胞凋亡信号途径及其药物治疗的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(1): 16-18.
- [12] 韦新焕, 马丽霞, 张 晶. 肝细胞凋亡与肝纤维化 [J]. 肝脏, 2012, 17(12): 887-890.