

柔肝抗纤方对活动性和非活动性 肝纤维化大鼠作用的实验研究

上海中医学院附属曙光医院(200021) 金树根* 王灵台 任家骝 陈勤杰 夏炎兴**

摘要 活血化癥与扶正补虚组成的柔肝抗纤复方对DMN造模的纤维化大鼠有明显的保肝降酶和抗纤维化作用,其治疗处理优于预防(防治)处理;柔肝抗纤复方对活动性和非活动性肝纤维化的不同作用,显示出活血化癥药对活动性肝纤维化没有良好的防治作用;DMN造模制作的肝纤维化模型具有较多的优越性,此模型在防治肝纤维化的研究中,有实际意义。

关键词 中药复方 肝纤维化 活动性与非活动性

中草药抗肝纤维化研究是近10年来在国内活跃开展的研究新领域,通过较多的临床观察和实验研究,初步显示活血化癥和扶正补虚两大类中药对肝纤维化有良好的预防和治疗作用,而且有实验表明合并使用活血化癥与扶正补虚二类中药其疗效优于单独使用活血化癥类中药。考虑肝纤维化是个动态变化过程,即早期肝纤维化表现为胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成和分解均亢进,而且异常亢进的基质降解如Ⅳ型胶原酶/明胶酶、基质酶(stromelysin)破坏正常的肝内胞外基质可能对启动和促进肝纤维化的发生和发展有重大作用;晚期肝纤维化时肝内基质合成可正常或甚至下降,而以基质降解低下尤以降解Ⅰ、Ⅲ型胶原的间质胶原酶活性降低为显目。鉴此,为观察药物对不同阶段(活动性)肝纤维化的作用,我们采用二甲基亚硝酸胺(简称DMN)造模制作大鼠肝纤维化模型,分别对活动性肝纤维化(造模染毒期间,肝纤维化形成阶段)和非活动性肝纤维化(停止染毒后,肝纤维化形成后阶段)大鼠给予活血化癥和益气养阴两法组成的柔肝抗纤方灌服处理,观察中药复方对不同活动性(即不同阶段)肝纤维化大鼠的作用。

1 材料和方法

1.1 品系选择与分组:雄性SD大鼠21只,体重 295 ± 20 g,随机分成4组即正常对照组5只,病理对照组5只,中药Ⅰ(防治)组(简称Ⅰ组)5只和中药Ⅱ(治疗)组(简称Ⅱ组)6只,普通颗粒饲料喂养,自由吸水,实验全程8周。

1.2 造模与用药

1.2.1 造模:除5只大鼠作正常对照组外,其它大鼠均以DMN(日本国东京化成工业株式会社, Lot MA104)溶于生理盐水配成1%(v/v)溶液,以每日1ml/kg 体重(即10 μ l DMN)每周连续2d腹腔注射,共4周。正常对照组大鼠以相应剂量的生理盐水处理。

1.2.2 用药:柔肝抗纤方组成及剂量(成人剂量,单位为g):太子参、元参各15,黄芪、石斛、杞子、鳖甲、丹参各12,白术、白芍各10,泽兰、郁金各9,佛手、桃仁各6,红花3。由曙光医院中药研究室制作水醇提取物,每毫升含生药约3.5g。Ⅰ、Ⅱ组大鼠以成人10倍的剂量,每日灌服1次,其中Ⅰ组大鼠在染毒第3周开始灌服给药,其余各组以等量蒸馏水处理。

*Address, Jin Shugen, The Affiliated Shuguang Hospital, Shanghai College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

*曙光医院的研究生,现在附属岳阳医院

**上海中医学院

理,而Ⅰ组大鼠在停止染毒6d后改为中药灌服处理,直至实验第8周末。

1.3 观察项目和方法

1.3.1 一般情况:包括体重、活动、摄食、饮水以及死亡率等。

1.3.2 肝脾大体:包括大小、重量、质地以及体率等。

1.3.3 血清生化:包括碱性磷酸酶(sAKP)、白蛋白(sA)、球蛋白(sG)以及透明质酸(sHA等),其中血清透明质酸采用透明质酸结合蛋白(HABP)放免法检测^[1]。

1.3.4 肝脏生化:肝脏羟脯氨酸(lHyp)采用Jamall氏法测定^[2]。

1.3.5 肝脏组织病理学检查:包括Weigert氏铁苏木精伊红染色、Cason氏胶原三色法染色以及糖醛酸染色等^[3]。

2 结果

2.1 一般情况变化:DMN染毒后大鼠生长减慢,尤以Ⅰ组大鼠在染毒与给药同时处理的2周期间生长最慢(体重明显减轻,如实验第3周其体增为 $-0.41 \pm 5.13\text{g}$,与正常对照组 $9.01 \pm 2.52\text{g}$ 比, $P < 0.01$,与病理对照组 $4.05 \pm 6.33\text{g}$ 比, $P < 0.05$),同时摄食、饮水和活动等减少,并伴稀便。染毒停止后,Ⅰ组大鼠体重增长最快,尤以停止染毒后2周内最明显(如实验第6周其体增为 $7.04 \pm 2.433\text{g}$,与正常对照组 $0.08 \pm 4.358\text{g}$ 比, $P < 0.05$,而与病理对照组比 $-3.62 \pm 7.396\text{g}$ 和Ⅱ组 $-6.62 \pm 2.566\text{g}$ 比, P 均 < 0.01),伴一般情况明显改善。Ⅱ组大鼠灌服后一时性稀便和体重下降,但尔后体重明显增长,活动、摄食及饮水亦增加。Ⅰ、Ⅱ组均未见大鼠死亡,而病理对照组中有1只大鼠在实验第6周(即灌服蒸馏水的第2周)时死亡,尸检肝脏缩小、其表面脑回样改变。实验各组实验前后和灌服前后体增以及体增率变化见表1。

表1 实验各组大鼠体重变化 ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

观察项目	正常对照组(5)	病理对照组(5)	Ⅰ组(5)	Ⅱ组(5)
总增重(g)	131.2 ± 32.97	86 ± 23.03	96.8 ± 33.9	104 ± 27.8
总增率(%)	47 ± 11.7	29.1 ± 8.7	32 ± 11.7	35 ± 11.7
中增重(g)	26 ± 13.5	15 ± 10.4	$87 \pm 17.8^{*\bullet}$	$51 \pm 19.8^{*\Delta}$
中增率(%)	6.7 ± 3.41	4.1 ± 2.81	$28.5 \pm 7.37^{*\bullet}$	$14.5 \pm 6.07^{*\Delta}$

注:1.总增重、总增率表示实验前后增重、体增率,中增重、中增率表示灌服前后体增重、体增率。

2.★、●分别表示与正常对照比,其 $P < 0.05$ 、 0.01 ;○、●分别表示与病理对照组比, $P < 0.05$ 、 0.01 ;△、▲分别表示与Ⅰ组比, $P < 0.05$ 、 0.01 ,以下各表均同。

3.由于Ⅰ组大鼠在染毒期间给药后体重增加明显下降至减重,而停止染毒后继续给药体重增加明显加速,因此,Ⅰ组大鼠中增重及中增率数值较其它各组大鼠的要高。

2.2 肝脾大体:病理对照组大鼠肝脏色黯质中、表面呈脑回样改变。Ⅱ组大鼠肝脏色黯、质偏中,脑回样改变不明显。Ⅰ组大鼠肝脏改变介于上述两者之间。除正常对照组外,其它各组大鼠脾脏紫黯而肿大,以病理对照组最明显,Ⅰ组次之,Ⅱ组较轻。各组大鼠肝脾湿重及其体率改变见表2。

2.3 血清AKP和蛋白改变:见表3。

2.4 血清HA(sHA)和肝脏Hyp(lHyp)改变:见表4。

2.5 肝脏组织病理学改变:正常肝脏细胞核多为单个核,肝板以中央静脉为中心呈条索状向四周放射样排列,板间有不规则肝窦,门脉区不增宽。胶原染色发现肝窦内有少许网状

表2 各组大鼠肝脾湿重及其体率改变 ($\bar{x} \pm SD$)

观察项目	正常对照组 (5)	病理对照组 (5)	I 组 (5)	II 组 (5)
肝湿重 (g)	12.6 ± 1.1	11.6 ± 1.7	11.9 ± 1.1	12.0 ± 0.8
肝体率 (%)	3.06 ± 0.05	3.02 ± 0.13	3.27 ± 0.11	2.97 ± 0.09
脾湿重 (g)	0.6 ± 0.123	1.76 ± 0.09	1.1 ± 0.859**	0.8 ± 0.089**
脾体率 (%)	1.5 ± 0.346	4.6 ± 0.343	2.8 ± 0.154**	2.01 ± 0.204**

表3 各组大鼠血清AKP和蛋白改变 ($\bar{x} \pm SD$)

观察项目	正常对照组 (5)	病理对照组 (5)	I 组 (5)	II 组 (5)
AKP (u)	10.8 ± 1.11	18.3 ± 2.36	19.6 ± 6.47*	10.8 ± 0.98**
TP (g/L)	64.0 ± 5.81	66.3 ± 2.75	62.8 ± 2.17	64.5 ± 2.51
A (g/L)	25.8 ± 2.62	21.5 ± 2.58	24.3 ± 2.59	24.8 ± 2.27
G (g/L)	38.2 ± 2.75	44.8 ± 2.22	38.5 ± 1.87*	39.7 ± 4.06
A/G	0.68 ± 0.12	0.48 ± 0.11	0.63 ± 0.08*	0.64 ± 0.12°

表4 各组大鼠血清HA和肝脏Hyp (IHYP) 改变 ($\bar{x} \pm SD$)

观察项目	正常对照组 (5)	病理对照组 (5)	I 组 (5)	II 组 (6)
SHA (μg/l)	68.6 ± 46.77	391.2 ± 45.89	279.2 ± 63.69**	254.17 ± 61.84**
IHYP (mg/g)	0.3 ± 0.043	1.073 ± 0.031	1.027 ± 0.036**	0.524 ± 0.047**

纤维, 门脉区胶原纤维包绕门脉管。糖醛酸染色发现肝内均匀染布, 以胞外为主、胞内多一侧分布而呈流水样改变。

病理对照组大鼠肝脏丧失正常小叶结构, 肝内可见细胞变性坏死和炎性浸润, 胞周纤维化与完全性中心-中心性和/或中心-门脉性纤维间隔并存。胶原染色发现胶原纤维包绕肝细胞而致肝细胞间隙增宽, 纤维间隔中央淡染而外周浓染, 并见黄褐色颗粒及细胞残骸。糖醛酸染色浓染而不均匀, 以变性坏死肝细胞和成熟(陈旧)的纤维间隔淡染、而新生纤维及陈旧纤维间隔以及其周边细胞浓染。

I组大鼠肝细胞变性坏死和炎性浸润仍存, 但残存肝小叶有正常化趋向, 纤维间隔仍存, 与大量的成纤维样细胞并见。胶原染色发现胶原纤维包绕成纤维样细胞, 中心-中心性和/或中心-门脉纤维间隔仍存。糖醛酸染色肝组织呈斑点状改变, 即纤维间隔周边肝内细胞浓染, 而远离纤维间隔的细胞淡染。

II组大鼠肝内变性坏死和炎性浸润不明显, 纤维间隔变细小窄, 残存肝小叶基本呈正常辐射样排列。胶原染色支持上述改变。糖醛酸染色发现肝内浓染, 但分布较均匀, 接近正常流水样分布, 即胞外为主、胞内多一侧分布但较正常组浓染。

3 讨论

中草药抗肝纤维化作用的实验研究初步表明, 活血化瘀类中药具有良好的抗肝纤维化作用, 而合并使用扶正补虚类中药则疗效更佳^[4, 5]。然而我室80年代中期采用DMN制作大鼠肝纤维化模型, 并以活血化瘀、益气养阴和温肾益精三大类药物分别组成活血方、养阴方和补肾方进行抗肝纤维化的研究, 结果发现, 活血方不仅未显示抗肝纤维化作用, 而且可加重肝内病变而致大鼠死亡, 而养阴方和补肾方均有良好的抗肝纤维化作用。本实验以益气养阴

和活血化瘀二法组成的柔肝抗纤中药复方,分别在肝纤维化的不同阶段(即活动性肝纤维化阶段——伴明显肝内炎性坏死的肝纤维化形成阶段和非活动性肝纤维化阶段——病变相对静止的肝纤维化形成后阶段)给予其水醇提取物,结果发现在活动性肝纤维化阶段灌服此中药复方可使大鼠生长受抑,同时摄入和活动均明显减少、以及稀便;但在肝内病变相对静止的肝纤维化阶段(即染毒停止后)继续灌服中药复方则加快大鼠生长,且一般情况明显好转。另外,中药复方给入致大鼠体重增长和蛋白代谢改善,但中药复方预防性处理6周(I组)的降酶和改善肝组织病变特别是减轻肝内纤维化等作用却不如中药复方治疗组(II)4周。上述结果表明,以活血化瘀和益气养阴的柔肝抗纤中药复方具有保肝降酶和抗肝纤维化作用,尤其对非活动性肝纤维化大鼠有较好的疗效,而对活动性肝纤维化大鼠疗效欠佳。上述结果与临床上用该中药复方治疗稳定期和活动期慢性肝病有不同的疗效相符合(临床结果,另文发表),与我院中医夏德馨指出“对肝病活动期或有出血倾向的肝病患者,应少用慎用活血化瘀药物,否则于病不利”这一观点一致,也与我们以往的中草药抗肝纤维化实验研究中——活血化瘀类药物不仅不能有效地预防肝纤维化,而且因加重肝内出血致大鼠全部死亡此一结果相吻合。因此本实验结果对于临床肝病的治疗,有一定的参考价值。

此外,由于肝纤维化是以肝内过多的胶原等胞外基质沉积为特征的病理改变,其发生发展与肝脏受到病理刺激时肝内正常间质的过多破坏和异常间质增生密切相关,其早期多伴有胶原酶等基质降解酶活性上升^[6]。采用四氯化碳(CCl_4)制作肝纤维化模型是国内中草药抗肝纤维化作用研究中较多采用的模型,文献报道 CCl_4 所致的肝内坏死为凝固性坏死而病情多轻,与DMN所致的肝内坏死为出血性坏死而病情多重有异^[7, 8]。由于活血化瘀类中药大多具有抗凝(血)和/或促(纤)溶作用^[9],因此认为这可能是我们实验结果与国内以往其他研究结果相异的原因。近来研究表明单用具有抗凝血作用的活血化瘀药物如川芎嗪进行抗肝纤维化实验治疗研究,结果发现其致血清ALT上升^[5]。考虑肝病尤其是活动性肝病如重症肝炎、慢性活动性肝炎和进展型肝硬化多伴有肝功能障碍而表现凝血障碍与纤溶亢进,临床上表现多有出血倾向^[10]。与 CCl_4 不同,而DMN本身可在人体内自然形成,病变以左叶受损严重,血液凝固纤溶系统为凝血障碍和纤溶亢进,其所致肝脏各种损伤比较类似人类的各种肝脏疾病,如肝衰竭,肝肿瘤等^[11]。因此,我们认为在中草药抗肝纤维化作用的研究中,采用DMN制作肝纤维化模型进行认证临床疗效、筛选药物以及寻找新药,具有一定的实际意义。

参 考 文 献

- 1 张鲁榕,等.第二军医大学学报,1990,11(6):497
- 2 Jamall I S, et al. Anal Biochem, 1981, 112: 70
- 3 Kierma J A. Histological & Histochemical Methods: Theory & Practice. 2nd Edition. Oxford, Perymen Press, 1990. 115
- 4 王宝恩,等.中草药,1990,31(4):23
- 5 傅其黎,等.中国中西医结合杂志,1992,12(4):228
- 6 Michael J P Arthur. Semin Liver Dis, 1990, 10(1):47
- 7 Pritchard D J, et al. J Appl Toxicol, 1987, 7(4):229
- 8 Leena Ala-Kokka, et al. Hepatology, 1992, 16(1):167
- 9 喻之杰,等.中西医结合杂志,1986,6(8):484
- 10 Francesco Vieli, et al. Hepatology, 1992, 15(4):672
- 11 金树根,等.中西医结合肝病杂志,1993,3(1):49

(1993-09-01收稿)

Fubider Granule is a new Chinese herbal preparation. It consists of Rizoma Chuansiong, Fructus Forsythiae and Herba Asari. It is used for the treatment of acute and subacute paranasal sinusitis. This work reports a new HPLC method for the determination of tetramethylpyrazine in the Chinese herbal preparation. A reverse phase column C_{18} was used for the separation with methanol-water (52:48) at 1.0 ml/min as eluent and measured by UV detector at 292 nm. The extraction recovery was 99.2%, RSD was 1.1% ($n=4$) and the sensitivity limit of quantitative analysis was 0.5 μ g/ml. The assay is simple, rapid and sensitive with good reproduction.

(Original article on page 459)

Experimental Studies on the Effect of "Liver-Softening Anti-Fibrotic Decoction" on Active and Inactive Fibrotic Rats

Jing Shugen, Wang Lingtai, Ren Jiawei, et al

"Liver-Softening Anti-Fibrotic Decoction", a preparation consisted mainly of medicinal herbs with tonifying "Qi", flourishing "Yin", activating blood and eliminating stasis, was given by gavage to Dimethyl nitrosamine (DMN) induced fibrotic rat to assess its effect on active and inactive liver fibrosis. It was found that this preparation, besides its promoting growth and protein metabolism activities, can also lower serum alkaline phosphatase, decrease serum hyaluronate and liver hydroxy proline, with a better curative effect on experimental liver fibrosis in rats than its prophylactic effect.

(Original article on page 468)

Effect of Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) on Water-Immersion Stress Ulcer in Mice and Its Antagonism to Acetylcholine in Vitro

Cheng Zhanghua, Masao Mori, et al

Mice were pretreated po with 0.4g/kg, 1.0g/kg, 2.0g/kg Lingzhi aqueous extract once daily for 3 days respectively. 1h after the last dose, they were kept under restraint plus water-immersion stress for 22h. Lingzhi 1.0g/kg, 2.0g/kg, and atropine 0.04g/kg markedly decreased ulcer formation and hemorrhage incidences compared with control ($P<0.01$). Lingzhi in different dosages could be produced by acetylcholine. Its IC_{50} was found to be 8.5×10^{-4} g/ml. Ulcer formation under stress condition is due to stimulation of the excessive central hypothalamus and parasympathetic nervous system; especially vagal overactivity plays an important role. The results suggest that Lingzhi possesses a blocking effect on peripheral parasympathetic nervous system.

(Original article on page 472)

Effect of Ginseng and Angelica Sinensis Decoction (GASD) on Learning and Memory of Dementia Rat with Hippocampal Lesions Induced by Quinolinic Acid

Song Qianliu, Zong Ruiyi and Xie Xianglin