

蒿鳖养阴软坚方对免疫性肝纤维化大鼠的治疗作用

邢伟^{1,2}, 孔维涵^{1,3}, 方步武^{1*}

(1 天津医科大学 药理教研室, 天津 300070; 2 天津医科大学总医院 药剂科, 天津 300052;

3. 天津医院 临床药理学室, 天津 300070)

摘要:目的 探讨蒿鳖养阴软坚方对牛血清白蛋白 (BSA) 免疫性肝纤维化大鼠的治疗作用。方法 以 18 mg/mL BSA 与等体积的弗氏不完全佐剂混悬液足跖皮下多点注射 5 次免疫大鼠后, 尾静脉攻击注射 BSA 生理盐水 (每次 2 mg/0.4 mL 递增至 3.4 mg/0.4 mL) 15 次, 每周 2 次, 制备肝纤维化模型; 按体质量随机区组法分为模型组, 蒿鳖养阴软坚方高、中、低剂量 (8.2、2.59、0.82 g/kg, 2.59 g/kg 为临床等效剂量) 组, 复方鳖甲软肝片组, 秋水仙碱组, 各治疗组均于造模结束后 ig 给药 (1 mL/100 g), 每日 1 次, 连续 2 个月, 对照组和模型组分别 ig 等体积蒸馏水。酶谱法检测肝组织基质金属蛋白酶 2 和 -9 (MMP-2、MMP-9), 荧光法测定血清丙二醛 (MDA), 放免法检测血清透明质酸 (HA)、层粘连蛋白 (LN)、IV 型胶原 (IV-C)、III 型前胶原 (PC III)。结果 蒿鳖养阴软坚方各剂量均能显著降低肝组织羟脯氨酸 (Hyp)、MMP-2 及 MMP-9、肝纤维化程度、血清 HA、LN、IV-C 水平 ($P < 0.05$), 其高、中剂量能明显降低血清 MDA 水平 ($P < 0.05$)。结论 蒿鳖养阴软坚方对 BSA 免疫性肝纤维化大鼠具有治疗作用, 抗脂质过氧化与降低 MMP-2 及 MMP-9 为其部分作用机制。

关键词: 蒿鳖养阴软坚方; 牛血清白蛋白; 肝纤维化; 基质金属蛋白酶 2; 丙二醛

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1667-06

Therapeutic effects of Haobie Yangyin Ruanjian Prescription on immunity hepatic fibrosis rats

XING Wei^{1,2}, KONG Weihan^{1,3}, FANG Buwu¹

(1. Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Pharmacy,

General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 3. Department of Clinical

Pharmacy, Tianjin Hospital, Tianjin 300070, China)

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect of Haobie Yangyin Ruanjian Prescription (HYRP) on immunity hepatic fibrosis rat caused by bovine serum albumin (BSA) immunologic injury.

Methods Ten rats were taken randomly as normal control, others were immunologically sc injected at several points of foot pad with BSA 18 mg/mL suspended with Freund's incomplete adjuvant for 5 times, then BSA in NS (2 mg/0.4 mL gradually increased to 3.4 mg/0.4 mL) was injected into tail vein for 15 times, two times per week, hepatic fibrosis was induced successfully. After that the rats were divided by randomized block of body weight into model control, high (8.2 g/kg), middle (2.59 g/kg, equivalency to clinical therapeutic dose), and low (0.82 g/kg) dose groups of HYRP, compound recipe of Biejia Ruangan Tablet group, colchicine group, and then ig administered corresponding drugs (1 mL/100 g) after model established, once a day for 2 months; While normal control and model control were given distilled water (1 mL/100 g) instead. Matrix metalloproteinase 2, -9 (MMP-2 and MMP-9) in liver were determined with gelatin zymography, serum malondialdehyde (MDA) with fluorospectrophotometry, serum hyaluronic acid (HA), laminin (LN), collagen type IV (IV-C) and procollagen type III (PC III) with radioimmunoassay.

Results Groups of 0.82, 2.59, and 8.2 g/kg of HYRP could reduce the level of hepatic hydroxyproline (Hyp), MMP-2, MMP-9, hepatic fibrosis degree, serum HA, LN, and IV-C significantly ($P < 0.05$), 2.59 and 8.2 g/kg groups of HYRP could lower MDA remarkably ($P < 0.05$). **Conclusion** HYRP has therapeutic effect on hepatic fibrosis rat caused by BSA immunologic injury, one of its mechanisms may be antiperoxidation of lipid and decrease in MMP-2 and MMP-9.

Key words: Haobie Yangyin Ruanjian Prescription (HYRP); bovine serum albumin (BSA); hepatic fibrosis; matrix metalloproteinase 2 (MMP-2); malondialdehyde (MDA)

①收稿日期: 2009-12-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30772856); 天津市应用基础研究计划重点资助项目 (06YFJZJC 02900)

作者简介: 邢伟, 男, 河北省廊坊市人, 硕士, 天津医科大学总医院药师, 主要从事中药药理学研究。

Tel: (022) 60363379 E-mail: xingwei530@163.com

* 通讯作者 方步武 E-mail: fangdch@yahoo.com.cn

许多慢性肝脏疾病均可引起肝纤维化, 其中免疫因素发挥了重要作用。即使在酒精性肝炎和肝硬化, 也有 58%~60% 患者被检测出循环免疫复合物 (CIC)^[1]; 慢性活动型肝病患者体液免疫异常亢进, 过多的脂多糖 (LPS) 等可封闭 Kupffer 细胞 (KC) 的功能; 适当大小的免疫复合物 (IC) 可沉积于肝脏引起炎症反应, 若 KC 吞噬功能障碍, 则炎症持续及慢性化, 而形成肝纤维化。慢性肝病常见证型之一是阴虚血瘀^[2], 其活动期则又常伴血热毒蕴。慢性活动型肝病病情较重、治疗较难、预后较差, 但未见针对阴虚血瘀毒蕴证型的上市药物。以往研究表明, 养阴活血合剂对免疫性肝纤维化有一定的预防作用^[3-5]。故本研究采用由青蒿、鳖甲、生地、丹参、虎杖、白花蛇舌草等组成的具有养阴活血、凉血解毒功效的蒿鳖养阴软坚方, 在牛血清白蛋白 (BSA) 免疫性肝纤维化形成后用药, 评价其对免疫性肝纤维化的治疗作用, 并初步探讨其作用机制, 为其应用及研发提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物: SPF 级 Wistar 大鼠, 317 只, 分 5 批 (分别为 55、60、60、62、80 只) 购买, 第 1 批雄鼠多 1 只, 第 2、5 批雌雄各半, 第 3 批均雄性, 第 4 批均雌性, 体质量 100~140 g, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 动物许可证: SCXK-(军) 2002-001, 饲养于天津医科大学实验动物中心, 室温 20~22 ℃, 24 h 昼夜节律。实验前大鼠适应环境 3 d, 自由进食饮水。

1.2 药物: 根据正交试验和药理试验筛选结果, 蒿鳖养阴软坚方中含丹酚酸 B (5.91 ± 0.17) mg/g、大黄素 (4.09 ± 0.13) mg/g 和虎杖苷 (3.69 ± 0.03) mg/g。采用水煮醇提法及中试生产规模制备成原料药粉, 用前配成混悬液。复方鳖甲软肝片: 内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司产品, 批号 20080206。秋水仙碱: Sigma 公司产品。

1.3 主要试剂: BSA: Fraction V, roche 735108 产品, 分装。弗氏不完全佐剂: 羊毛脂 50 g、液体石蜡 100 mL (化学纯, 天津化学试剂二厂), 加热至 70 ℃ 混匀, 高压灭菌。L-羟脯氨酸 (Hyp): 电泳纯, 上海康达氨基酸厂。放免试剂盒: 透明质酸 (HA)、IV 型胶原 (IV-C)、II 型前胶原 (PCII)、层黏连蛋白 (LN), 均为北京北方生物技术研究所产品。蛋白定量试剂盒: 天根生化科技(北京)有限公司。凝胶配制试剂盒: 江苏碧云天生物技术研究所。生物染色剂: 丽春红 S, 上海三爱思试剂有限公司; 维

多利亚蓝 B, 华东师范大学化工厂。

1.4 主要仪器: VIS-7220 紫外可见分光光度计, 北京瑞利分析仪器公司; RF-510 型荧光分光光度计, 日本岛津; 低温高速离心机, eppendorf 产品; 小型电泳仪、垂直电泳槽、凝胶分析仪, 均为 BIO-RAD 产品。

2 方法

2.1 分组、模型制备及给药: 每批随机取 2 只大鼠 (雌雄各 1 只) 为对照组, 其余大鼠均按文献方法造模^[3]: 以 9 mg/mL BSA 弗氏不完全佐剂乳剂每次每只 0.5 mL 足垫皮下多点注射以致敏动物, 共 5 次, 第 1、2 次间隔 2 周, 其余间隔 1 周; 末次致敏注射后 1 周, 采血, 以琼脂双向扩散法测血清中抗 BSA 抗体, 结果阳性者进入实验。每只大鼠 sc 0.05 mg/mL 肾上腺素 0.3~0.4 mL, 尾静脉攻击 iv BSA 生理盐水稀释液 18 mg/mL, 每次每只剂量由 2 mg (0.4 mL) 递增至 3.4 mg (0.4 mL), 每周 2 次, 共 15 次。其后随机取 6 只留肝组织, 作 HE 染色和 Hyp 检测, 证实肝纤维化形成 (6 只模型动物中 1 期肝纤维化的有 1 只大鼠, 4 期肝纤维化的有 5 只大鼠, 肝纤维化计分为 23.08 ± 10.17 , 说明模型成功)。将造模大鼠按体质量随机区组法分 6 组: 模型组, 蒿鳖养阴软坚方高、中、低剂量组, 复方鳖甲软肝片组, 秋水仙碱组, 每批造模大鼠被分至各组的例数基本相同, 剂量分别为蒿鳖养阴软坚方 8.2、2.59 (临床等效剂量)、0.82 g/kg, 复方鳖甲软肝片 0.55 g/kg, 秋水仙碱 0.1 mg/kg, 用药量为 1 mL/100 g, ig 给药, 每日 1 次, 共 2 个月, 至实验结束。模型组和对照组 ig 等体积蒸馏水。末次给药后处死动物。

2.2 标本留取与指标观测

2.2.1 取材: 大鼠称体质量, 乙醇麻醉, 下腔静脉取血, 分离血清, -20 ℃ 保存。取肝, 称质量; 取肝右叶相同部位以 10% 甲醛缓冲溶液固定; 另一部分肝入液氮速冻, 转入 -80 ℃ 保存; 其余肝以氯仿-甲醇 (2:1) 脱水脱脂。

2.2.2 大鼠一般情况观察: 包括精神、活动、进食、体质量等状况。

2.2.3 肝组织形态: 石蜡切片, HE 染色, 胶原染色用新染法^[6]并按表 1 标准评定^[7]。

2.2.4 Hyp 测定, 采用 Jamall 方法^[8], 用肝组织干粉。

2.2.5 血清中相关指标测定: HA、LN、IV-C、PC III 检测采用放免法, 按试剂盒说明书操作。

2.2.6 血清 MDA 测定: 按 Yagi 方法^[9]测定。

2.2.7 肝组织基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和基

表 1 肝纤维化程度的分期和计分标准

Table 1 Criteria of staging and scoring for hepatic fibrosis degree

分期	纤维化程度	计分	中央静脉	汇管区	纤维间隔(S)	
			周窦周(L)	(P)	数量(N)	宽度(W)*
0	无	0	无	无	无	-
1	汇管区扩大,纤维化	1	限局、少数	扩大无隔	< 6/ cm	细
2	汇管区周围纤维化,纤维隔形成,小叶结构保留	2	弥漫、多数	扩大有隔	> 6/ cm	疏松、宽
3	纤维隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化	3	-	肝硬化	肝硬化	致密、宽
4	早期肝硬化或肯定的肝硬化	4	-	-	≥2/3 活检面积	

计分: L+ P+ 2(N× W); * 标本内仅一细纤维隔, W 计分 0.5

Scoring: L+ P+ 2(N× W)

* W scored 0.5 if there is a thin fiber septum

质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 测定: 采用明胶酶谱法^[10]。肝组织用 PBS 冰浴匀浆后离心, 用考马斯亮蓝 G-250 法定量蛋白。配制 SDS-PAGE 胶 (底物明胶已加入), 以每孔 50 μg 蛋白量上样。电泳结束后, 凝胶经洗脱、孵育、考马斯亮蓝染色、脱色至显示出 MMP-2 和 MMP-9 为位于蓝色背景上的透亮带。比对标准蛋白, 为酶原型 MMPs。通过凝胶成像仪扫描, 用分析软件测定酶分解条带的亮度和面积, 条带酶解量= 条带面积× (条带灰度- 背景灰度)。

2.3 统计分析: 采用 SPSS 15.0 统计软件; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 方差齐性时用 Tukey HSD 检验, 方差不齐时用 Tamhane 检验; 偏态分布者用 Kruskal Wallis 及 Mann-Whitney U 检验; 单向有序的计数资料采用 Ridit 分析。

3 结果

3.1 大鼠一般情况及存活率: 对照组大鼠生长、饮食、活动、体质量状况良好, 皮毛柔顺有光泽; 模型组大鼠精神萎靡, 活动少, 体质量减轻, 肝脏指数增加, 皮毛松弛无光泽; 各治疗组大鼠皮毛少光泽, 体质量增加, 一般状况改善。见表 2。第 1、2、3、4、5 批各剩下 12、3、16、6、31 只, 其中第 2 批因最后无模型组大鼠故废弃, 故存活大鼠以 65 只计, 治疗前处死模型组 6 只, 对照组 10 只, 造模鼠存活率为 27.0%。

3.2 对大鼠肝组织中 Hyp 的影响: 模型组肝组织 Hyp 水平显著高于对照组, 蒿鳖养阴软坚方各剂量组及复方鳖甲软肝片组、秋水仙碱组 Hyp 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对血清 MDA 的影响: 模型组血清 MDA 水平显著高于对照组, 蒿鳖养阴软坚方高、中剂量组及秋水仙碱组 MDA 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 蒿鳖养阴软坚方对肝纤维化大鼠肝质量、肝中 Hyp 和血清中 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of HYRP on liver weight, Hyp in liver, and MDA level in serum of hepatic fibrosis rat ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	Hyp/ (mg·g ⁻¹)	MDA/ (nmol·mL ⁻¹)	体质量/ g	肝脏指数/ (g·kg ⁻¹)
对照	-	10	0.45±0.18	6.42±1.00	415.8±130.4	31.4±4.0
模型	-	10	1.30±0.50*	8.97±1.58*	306.1±51.5*	42.9±11.2*
蒿鳖养阴软坚方	8.2	9	0.62±0.18 [△]	6.87±1.08 [△]	402.8±74.8 [△]	39.3±8.9
	2.59	9	0.63±0.20 [△]	7.06±0.90 [△]	407.3±69.1 [△]	37.2±3.7
	0.82	9	0.72±0.20 [△]	8.52±1.77	424.7±64.1 [△]	35.4±2.4
复方鳖甲软肝片	0.55	9	0.65±0.23 [△]	7.51±0.94	385.1±63.9 [△]	36.0±3.2
秋水仙碱	0.0001	9	0.56±0.20 [△]	7.06±1.65 [△]	430.8±60.9 [△]	31.8±2.8 [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group

3.4 大鼠肝组织形态变化

3.4.1 大体形态: 模型组大鼠肝表面亮度降低, 颜色灰暗, 边缘较钝, 质韧, 剪切时有沙粒感; 各治疗组肝表面较光亮, 质稍韧。

3.4.2 肝组织病理变化

(1) 胶原染色: 对照组汇管区胶原纤维少。模型组汇管区胶原纤维增多并向小叶内伸展形成多个大小不等的假小叶; 各治疗组汇管区纤维组织增多并向小叶内伸展, 但多数未形成假小叶。见表 3, 图 1。

表 3 蒿鳖养阴软坚方对大鼠肝纤维化程度分期及计分的影响

Table 3 Effects of HYRP on staging and scoring of hepatic fibrosis degree in rats

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	肝纤维化程度分期/例					肝纤维化程度计分 ($\bar{x} \pm s$)
			0	1	2	3	4	
对照	-	8	8	-	-	-	-	0.00±0.00
模型	-	10	-	1	2	3	4*	15.00±9.73*
蒿鳖养阴软坚方	8.20	9	2	4	2	1 [△]	-	3.06±2.78 [△]
	2.59	9	2	1	3	3 [△]	-	4.94±2.80 [△]
	0.82	9	-	3	3	3 [△]	-	5.83±3.88 [△]
复方鳖甲软肝片	0.55	9	-	5	1	2	1 [△]	8.56±8.94
秋水仙碱	0.0001	9	-	3	4	2 [△]	-	4.94±1.93 [△]

与对照组比较: ** $P < 0.01$

与模型组 (治疗后) 比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

(2) HE 染色: 对照组肝组织结构正常, 汇管区无扩大, 肝小叶结构完整, 未见炎细胞浸润。模型组汇管区扩大, 充满纤维组织, 炎细胞浸润, 界板破坏, 肝细胞坏死, 肝小叶结构破坏, 被纤维隔分割成肝细胞团; 各治疗组汇管区未见明显扩大, 炎细胞浸润和纤维组织增生少, 界板完整, 肝小叶结构破坏轻。见图 2。

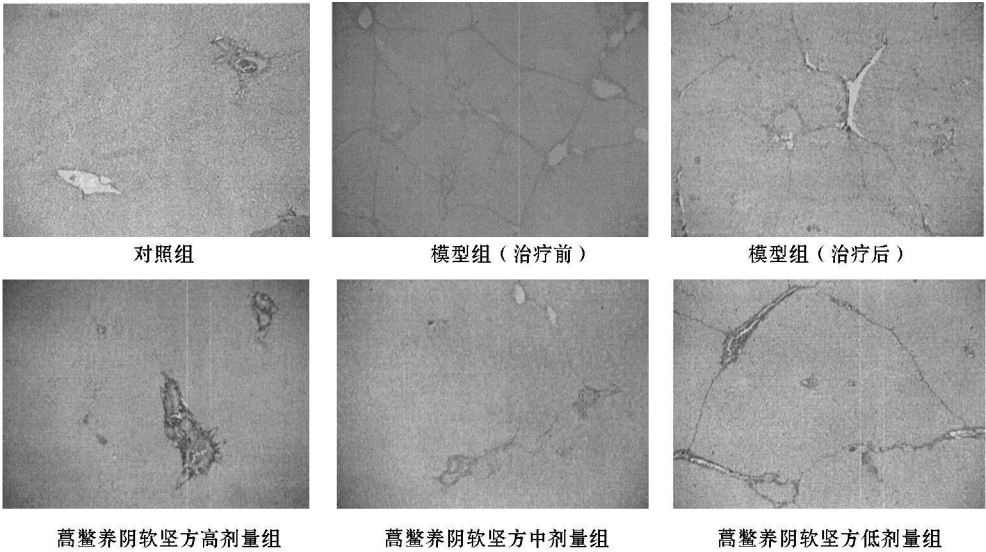


图 1 大鼠肝组织胶原染色

Fig. 1 Rat hepatic tissue collagen staining

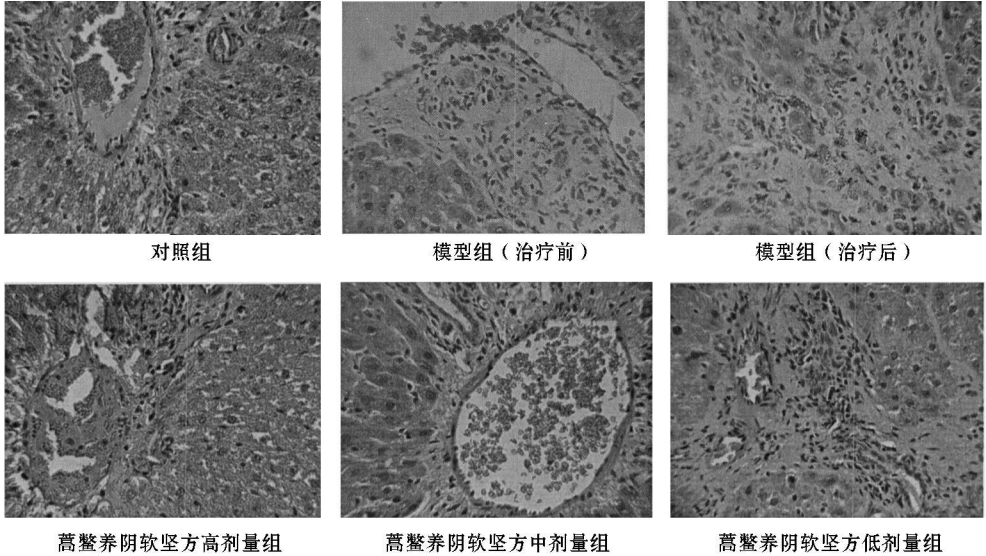


图 2 大鼠肝组织 HE 染色

Fig. 2 Rat hepatic tissue HE staining

3.5 对大鼠血清中肝纤维化标志物的影响: 模型组血清 HA、LN 和 IV-C 水平显著高于对照组, 治疗组 HA、LN 和 IV-C 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$)。各组间的血清 PC III 水平未见统计学差异, 见表 4。

3.6 对大鼠肝组织 MMP-2 和 MMP-9 水平的影响: 与对照组比较, 模型组大鼠肝组织 MMP-2、MMP-9 水平均显著升高; 与模型组比较, 各治疗组 MMP-2、MMP-9 均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 5, 图 3。

4 讨论

由于目前我国的慢性肝病主要由乙型和丙型病

毒性肝炎引起, 其中免疫因素发挥了重要作用, 如慢性活动期肝病患者体液免疫反应异常亢进, 甚至 B 细胞在 CCl₄ 所致小鼠肝纤维化中也发挥重要作用^[11], 故本研究采用 BSA 制备免疫性肝纤维化模型, 经肝组织形态学、肝 Hyp 和血清中肝纤维化标志物等证实肝纤维化模型形成。该模型主要是由 III 型变态反应引起的慢性炎症所致, 在其纤维化过程中转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 及其受体表达增加、肝星状细胞 (HSC) 增殖^[12], 造模结束后脂质过氧化物增多。人血清白蛋白 (HSA) 所致肝纤维化过程中, 尾静脉攻击注射中期 MMP-2 和 MMP-9 基因表达达峰值, 造模后 1.5 和 3 个月二者表达仍均

表 4 蒿鳖养阴软坚方对大鼠血清中肝纤维化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of HYRP on hepatic fibrosis indices in serum of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	HA/(ng·mL ⁻¹)	LN/(ng·mL ⁻¹)	IV ^C /(ng·mL ⁻¹)	PCIII/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	10	135.41±28.98	103.04±10.58	3.84±2.63	14.57±5.33
模型	—	10	246.16±69.86*	180.16±88.70*	9.33±3.88*	20.73±9.26
蒿鳖养阴软坚方	8.2	9	158.78±35.59 [△]	111.64±36.04 [△]	4.93±3.51 [△]	14.97±5.60
	2.59	9	145.23±36.97 [△]	98.48±22.99 [△]	6.18±2.94 [△]	16.06±2.84
	0.82	9	161.18±39.04 [△]	114.03±45.56 [△]	5.97±2.02 [△]	13.67±3.29
复方鳖甲软肝片	0.55	9	163.18±41.60 [△]	131.30±72.59 [△]	4.01±1.94 [△]	15.56±8.77
秋水仙碱	0.000 1	9	172.35±38.22 [△]	115.33±41.46 [△]	4.56±2.28 [△]	16.72±9.66

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

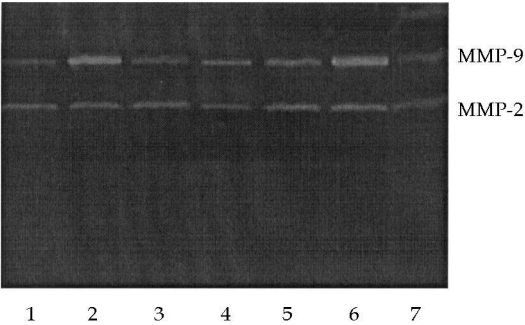
表 5 蒿鳖养阴软坚方对肝纤维化大鼠肝 MMP-2、MMP-9 酶解量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of HYRP on MMP-2 and MMP-9 enzymolysis in liver of hepatic fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	MMP-2 ($\times 10^7$)	MMP-9 ($\times 10^7$)
对照	—	10	2.068 1±0.321 1	8.529 8±0.270 0
模型	—	10	4.116 9±0.190 5*	14.223 8±0.831 2*
蒿鳖养阴软坚方	8.2	9	2.013 3±0.212 1 [△]	10.561 5±0.649 8 [△]
	2.59	9	2.632 2±0.632 1 [△]	10.597 4±0.719 2 [△]
	0.82	9	2.484 9±0.127 2 [△]	11.834 1±0.785 2 [△]
复方鳖甲软肝片	0.55	9	3.003 0±0.305 1 [△]	10.570 1±0.562 6
秋水仙碱	0.000 1	9	2.125 1±0.129 8 [△]	12.626 0±0.719 1 [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group



1 秋水仙碱组 2 复方鳖甲软肝片组 3~5 蒿鳖养阴软坚方低、中、高剂量组 6 模型对照组 7 对照组
1 colchicine group 2 compound recipe of Biejia Ruangan Tablet group 3~5 HYRP low, middle, and high dose groups 6 model group 7 control group

图 3 大鼠肝脏 MMP-2、MMP-9 酶解条带

Fig. 3 Enzymolysis band caused by MMP-2 and MMP-9 in rat liver

明显高于正常组^[13], 在 CCl₄所致肝纤维化中呈类似变化^[13-14]。本实验观察到 BSA 引起肝纤维化后 2 个月, MMP-2 和 MMP-9 酶原水平皆明显高于对照组, 但活性酶的水解条带很弱, 此时反映活性氧 (ROS) 净效应的脂质过氧化物之一的 MDA 水平仍明显升高, 肝组织炎细胞浸润及肝细胞变性坏死,

表明慢性炎症仍存在, 炎性损伤引起 ROS 增加, MMP-2 介导了 ROS 的效应, 引起 HSC 增殖等^[15], 故胶原蛋白显著增多。

本研究采用蒿鳖养阴软坚方于 BSA 引起大鼠肝纤维化后治疗用药 2 个月, 能明显改善肝脏病理变化, 减轻肝纤维化程度分期和计分, 降低肝组织 Hyp 及血中 HA、LN、IV-C 水平 ($P < 0.05$), 表明蒿鳖养阴软坚方对免疫性肝纤维化具有治疗作用, 且以 8.2、2.59 g/kg (临床等效剂量) 的效果为佳, 其综合效应略优于复方鳖甲软肝片和秋水仙碱。

蒿鳖养阴软坚方能显著降低 MDA 水平, 减轻 ROS 的效应, 同时能降低 MMP-2 及 MMP-9 水平, 且对主要由 HSC 产生的 MMP-2 的影响更突出, 系列研究发现该方能抑制肝脏 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达, 在体外该方含药血清能抑制 HSC 增殖及阻止 HSC 由 G₀/G₁期进入 S 期, 表明蒿鳖养阴软坚方可能通过减轻自由基损伤, 减少 MMP-2 产生、抑制 HSC 增殖及活化等, 减少胶原蛋白、HA 等细胞外基质, 其是否还通过增加 MMP-13 等而起作用有待进一步研究。

参考文献:

[1] Gluud C, Jans H. Circulating immune complexes and complement concentrations in patients with alcoholic liver disease [J]. *J Clin Pathol*, 1982, 35: 380-384
[2] 张 琴, 张文彤, 魏建军, 等. 公因子和聚类分析联合在肝炎后肝硬化证候分类研究中的应用 [J]. *中西医结合学报*, 2005, 3(1): 14-18.
[3] 方步武, 朱起贵, 竺稽能, 等. 益气活血合剂抗牛血清白蛋白免疫性肝纤维化作用的实验研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1992, 12(12): 738-740
[4] 王宝恩, 孙 森. 活血化瘀中药复方对实验性肝纤维化的疗效观察 [J]. *中草药*, 1990, 21(4): 23-25
[5] 曹志飞, 顾振纶, 周文轩, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对肝纤维化作用机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2008, 39(4): 628-630
[6] 龚志锦, 詹谕洲. 病理组织制片和染色技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994
[7] 王泰龄, 刘 霞, 周元平, 等. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案 [J]. *中华肝脏病杂志*, 1998, 6(4): 195-197

- [8] Jamall I S, Finelli V N, Que Hee S S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues [J]. *Analyt Biochem*, 1981, 112(1): 70-75
- [9] Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma [J]. *Biochem Med*, 1976, 15: 212-216
- [10] Kleiner D E, Stellerstevenson W G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases [J]. *Analyt Biochem*, 1994, 218(2): 325-329
- [11] Bhogal R K, Bona C A. B cells: no longer bystanders in liver fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(11): 2962-2965
- [12] 刘平, 方步武, 刘成, 等. 转化生长因子 $\beta 1$ 及虫草多糖对大鼠肝纤维化形成的影响 [J]. 中华肝病杂志, 1998, 6(4): 232-234
- [13] 王爱民, 王宝恩, 杨跃伟, 等. 实验性肝纤维化明胶酶 A 基因表达的研究 [J]. 中华医学杂志, 1999, 79(5): 394-395
- [14] Takahara T, Furui K, Funaki J, *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinase 2 in experimental liver fibrosis in rats [J]. *Hepatology*, 1995, 21: 787-795
- [15] Galli A, Sveglia F, Baroni G, Ceni E, *et al.* Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2 mediated mechanism [J]. *Hepatology*, 2005, 41(5): 1074-1084

当归多糖铁复合物在缺铁性贫血大鼠与正常大鼠体内药动学比较研究

刘金玉¹, 张玉², 王凯平^{1*}, 李石军², 刘茂昌¹, 曾芳¹

(1 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030; 2 华中科技大学同济医学院协和医院药剂科, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 比较当归多糖铁复合物 (APIC) 在缺铁性贫血大鼠与正常大鼠体内的药动学差异, 为优化临床给药方案提供参考。方法 采用低铁饲料并辅以定期放血法建立缺铁性贫血模型, 缺铁性贫血大鼠与正常大鼠分别随机分为 APIC 低、中、高剂量 (5.83, 8.75, 17.5 mg/kg) 组, ig 给药, 以原子吸收法测定各时间点血清铁浓度, 用 DAS 2.0 软件求算药动学参数, 并采用 SPSS 13.0 软件对同剂量组的缺铁性贫血大鼠和正常大鼠的主要药动学参数进行 *t* 检验。结果 APIC 在两种不同生理状况下大鼠的药动学过程均符合二室模型, 3 个剂量组的缺铁性贫血大鼠的血清铁浓度在 4 h 以后均显著高于健康大鼠, 3 个剂量组的 CL/F 、 $t_{1/2\beta}$ 与正常组均有显著差异 ($P < 0.05$), 但只有高剂量组的 $t_{1/2\alpha}$ 与正常组有显著差异。结论 APIC 在缺铁性贫血大鼠与正常大鼠体内的药动学存在显著差异, 并且这种差异与剂量有一定的关系。

关键词: 当归多糖铁复合物; 药动学; 缺铁性贫血

中图分类号: R285.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1672-05

In vivo pharmacokinetic comparison of *Angelica sinensis* polysaccharide iron complex in iron deficiency anemia rats and normal rats

LIU Jir-yu¹, ZHANG Yu², WANG Kai-ping¹, LI Shi-jun², LIU Mao-chang¹, ZENG Fang¹

(1 School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

2. Department of Pharmacy, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: Objective To study the pharmacokinetic differences of *Angelica sinensis* polysaccharide iron complex (APIC) in iron deficiency anemia (IDA) rats and normal rats. **Methods** The IDA model rats were established by feeding iron deficiency diet and periodic bleeding, IDA rats and normal rats were randomly divided into three groups, respectively. In APIC low, medium, and high (5.83, 8.75, and 17.5 mg/kg) dosage groups, serum iron concentration was assayed by atomic absorption spectrometry after ig administration of APIC, the pharmacokinetic parameters were analyzed by DAS 2.0 software. The statistical test was carried out by SPSS 13.0 to compare the main pharmacokinetic parameters (*t*-test) between IDA rats and normal rats of the same dosage. **Results** The concentration-time curves of APIC in all groups were fitted to two-compartment open model. Marked differences of iron concentration in serum were found 4 h after administration between IDA rats and normal rats, the serum iron concentration in IDA rats was significantly higher than that in normal rats ($P < 0.05$). In low, medium, and high dosage groups $t_{1/2\beta}$ of the IDA rats was significantly longer than that of the normal rats, but there was marked

①收稿日期: 2009-12-22

基金项目: 湖北省自然科学基金重点项目 (2008CDA064)

作者简介: 刘金玉 (1985—), 女, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 主要研究药物新剂型及其生物有效性。

Tel: 15871397942 E-mail: cherrylanyu@163.com

* 通讯作者 王凯平 Tel: (027) 63559222 E-mail: wkpzq@163.com