

软肝化纤丸对 CCl₄ 致大鼠慢性肝纤维化的影响

潘赞红, 宓余强, 毕丽萍, 伍喜良

天津市传染病医院, 天津 300192

摘要: 目的 观察软肝化纤丸对 CCl₄ 致大鼠慢性肝纤维化的治疗作用。方法 采用每周 2 次 sc 10%~40% CCl₄ 油溶液 2 mL/kg 造成大鼠慢性肝纤维化模型, 并同时 ig 给予 1.5、3 g/kg 受试药物, 以联苯双酯滴丸为阳性对照, 观察药物对模型大鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLB)、总胆红素 (TBIL)、白蛋白/球蛋白 (A/G) 及肝组织中羟脯氨酸 (Hyp) 的影响, 并进行肝脏病理切片, 光镜下观察肝脏组织学改变。结果 在造模同时, 连续 8 周 ig 给予 3 g/kg 软肝化纤丸对 CCl₄ 所致慢性肝纤维化大鼠血清 ALT、AST 及肝组织中 Hyp 量的升高均有明显抑制作用; 且能明显减轻动物肝细胞变性、坏死及纤维化等损伤程度。结论 软肝化纤丸对 CCl₄ 所致慢性肝纤维化模型动物具有很好的保肝降酶、改善肝纤维化程度的作用。

关键词: 软肝化纤丸; 肝纤维化; CCl₄; 羟脯氨酸; 丙氨酸氨基转移酶; 天冬氨酸氨基转移酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)05-0951-04

Effect of Ruangan Huaxian Pills on hepatic fibrosis in rats induced by CCl₄

PAN Zan-hong, MI Yu-qiang, BI Li-ping, WU Xi-liang

Tianjin Hospital for Infectious Diseases, Tianjin 300192, China

Key words: Ruangan Huaxian Pills; hepatic fibrosis; CCl₄; hydroxyproline (Hyp); alanine aminotransferase (ALT); aspartate transaminase (AST)

软肝化纤丸系天津市传染病医院自行研制的中药复方制剂, 主要由炙鳖甲、丹参、银杏叶和女贞子、半枝莲等中药组成, 具有滋补肝肾、健脾益气、化痰软坚的功效, 临床用于肝脾肾俱虚、瘀血阻络慢性肝炎及肝硬化患者。组成软肝化纤方的各味药材均具有多种药理活性, 鳖甲具有抑制结缔组织增生和提高血浆白蛋白作用, 并能激活体液免疫^[1]; 丹参有激活胶酶、抗脂质过氧化、清除氧自由基、促进纤维组织降解、抑制纤维组织增生、改善微循环、促进形成的纤维组织重吸收的作用^[2-3]; 银杏叶提取物有明显的抗氧化和抗脂质过氧化作用, 能显著提高肝组织超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘酞过氧化酶 (GSH-Px) 活性, 降低丙二醛 (MDA) 的量, 从而达到抗肝纤维化的作用^[4-5]; 女贞子主要成分齐墩果酸对于 CCl₄ 诱导的肝损伤有保护作用, 能明显降低丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 的活性, 对多种肝毒物有抵抗作用^[6-7]; 半枝莲具有抗肿瘤、抗病原微生物、解热保

肝等活性, 临床可治疗肿瘤、肝炎、肝硬化、腹水、肾炎等^[8-9]。诸药合用, 具有抗氧化、保肝降酶功效。

软肝化纤丸处方自 2003 年以汤剂形式在本院临床应用, 具有良好的保肝和抗肝纤维化作用。依据该药功效, 本课题组以联苯双酯滴丸为阳性对照, 对其进行了保肝降酶及改善肝纤维化程度的药理作用研究, 为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠, SPF 级, 由北京维通利华实验动物有限公司提供, 许可证号 SCXK(京)2007-0001。

1.2 药品和主要试剂

软肝化纤丸 (黄棕色粉末, 天津传染病医院提供, 批号 20070313, 本品每丸含赤芍以芍药苷计, 不得少于 5.2 mg。), 给药剂量按生药粉计算, 用纯化水配成混悬液备用^[10]; 联苯双酯滴丸 (规格 1.5 mg/粒, 北京协和药厂, 批号 0810015); CCl₄ (天津康科德科技有限公司); 羟脯氨酸 (Hyp) 检测试剂盒 (南

收稿日期: 2010-11-04

作者简介: 潘赞红 (1971—), 天津市人, 硕士, 副主任药师, 研究方向为中药制剂的生产、工艺、质量标准及研发。

Tel: 13820206376 E-mail: jeny_pan@163.com

京建成生物工程研究所); ALT、AST、总胆红素(TBIL)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)检测试剂盒,均购自美国贝克曼库尔特有限公司。

1.3 实验仪器

Beckman Coulter™—CX4 全自动生化分析仪,美国贝克曼库尔特有限公司; AE—260 电子天平,瑞士; Nikon 80i 显微镜及病理图文分析系统,日本 Nikon 公司。

1.4 动物分组、造模及给药方法

取健康大鼠 50 只,体质量 180~210 g,雄性,随机分为 5 组,分别为对照组(纯化水 10 mL/kg)、模型组(纯化水 10 mL/kg)、阳性对照药联苯双酯滴丸(0.15 g/kg,给药体积 10 mL/kg)、软肝化纤丸两个剂量(3.0、1.5 g/kg,给药体积均为 15 mL/kg)组。除对照组外,其他各组动物每周 sc CCl₄-花生油诱导剂 2 次,体积为 2 mL/kg,CCl₄ 比例依次为 10%、20%、30%、40%,每 2 周递增一个梯度。在造模同时各给药组 ig 给予受试药物,每天定时给药 1 次,每周称体质量 2 次,以调整药物及 CCl₄ 的剂量。连续给药 8 周,在末次给药后各组动物禁食不禁水 16 h 以上,于次日上午将动物乙醚麻醉后,股动脉采血,同时剖取各组大鼠肝脏和脾脏,称质量,计算各组大鼠的肝脏和脾脏指数。

1.5 生化指标检测

各组动物采血后,以 3 000 r/min 离心 20 min,制备血清,测定血清 ALT、AST、TP、ALB、TBIL 水平。同时每只动物取相同部位肝组织,采用碱水解法测定 Hyp 水平。

1.6 病理组织学检测

剖取同叶肝组织,用 10%甲醛溶液固定,经石蜡包埋,常规制片。HE 染色后进行病理组织形态学检查。镜下检查参考文献方法^[11],将肝细胞纤维化分为 5 个等级:“0”表示无纤维化;“1”表示汇

管区纤维化扩大,限局窦周及小叶内纤维化;“2”表示汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留;“3”表示纤维间隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化;“4”表示早期肝硬化。肝细胞变性分 4 个等级:“-”表示正常肝组织;“+”表示肝细胞变性范围不超过肝小叶半径的 1/2,以水样变性为主,肝细胞呈点状或小灶状坏死,未见纤维组织增生,汇管区炎症细胞浸润;“++”表示肝细胞变性范围超过肝小叶半径的 1/2,以气球样变性为主,较多肝细胞呈碎片状坏死,伴明显的纤维组织增生,汇管区大量炎症细胞浸润;“+++”表示肝细胞大片变性坏死,范围超过肝小叶半径的 2/3,并以肝细胞的碎片状和桥接状坏死为主,肝实质内大量纤维组织增生,向内伸展包绕肝小叶,可见中央静脉偏位或缺如。

1.7 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,对符合参数检验要求的数据进行单因素方差分析,通过单因素方差分析组间差异,不符合参数检验的数据进行非参数 Kruskal-Wallis H 检验,通过 Nemenyi 法检验组间差异,等级资料进行非参数 Kruskal-Wallis H 检验,通过 Nemenyi 法检验组间差异。

2 结果与分析

2.1 生化指标检测结果

由表 1 和 2 结果可见,与模型组比较,软肝化纤丸 3 g/kg 组大鼠血清 ALT、AST 水平均明显降低($P < 0.05$),同时对肝组织中 Hyp 量的升高也有一定抑制作用($P < 0.05$),与对照药联苯双酯的作用相当。但各给药组未见对 TBIL、ALB、GLB 和 TP 有明显的影响。对照药联苯双酯滴丸对血清 TBIL 的升高有明显的降低作用($P < 0.05$)。

2.2 病理组织学检查结果

由表 3 和 4 结果可见,造模 8 周后,对照组动

表 1 软肝化纤丸对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠血清 ALT、AST、TBIL 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Ruangan Huaxian Pills on ALT, AST, and TBIL in liver fibrosis of rats induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALT/(IU·L ⁻¹)	AST/(IU·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	38.50 ± 2.51	96.10 ± 3.04	5.60 ± 1.79
模型	—	186.80 ± 68.34 ^{##}	238.40 ± 64.19 ^{##}	7.32 ± 2.81
联苯双酯滴丸	0.15	63.70 ± 20.91 ^{**}	181.63 ± 25.97	4.90 ± 2.11 [*]
软肝化纤丸	1.5	142.33 ± 73.42 ^{##}	223.00 ± 74.40 ^{##}	6.86 ± 2.83
	3.0	115.70 ± 29.90 ^{##}	176.60 ± 40.83 [#]	6.64 ± 3.11

与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs normal control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 2 软肝化纤丸对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠血清 ALB、TP、GLB、A/G 及肝脏 Hyp 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Ruangan Huaxian Pills on contents of ALB, TP, GLB, A/G, and Hyp in liver fibrosis of rats induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	GLB/(g·L ⁻¹)	A/G	Hyp/(μg·mg ⁻¹)
对照	—	18.30±1.16	69.90±2.33	51.60±1.84	0.35±0.02	0.196±0.02
模型	—	17.40±3.60	63.33±3.23 [#]	45.80±2.90 [#]	0.39±0.11	0.304±0.04 [#]
联苯双酯滴丸	0.15	16.20±1.14	66.50±3.92	50.30±3.34	0.32±0.02	0.269±0.03 ^{##*}
软肝化纤丸	1.5	15.20±1.23 ^{##}	63.60±3.92	48.40±3.78	0.31±0.04 [*]	0.310±0.45 ^{##}
	3.0	15.00±1.63 ^{##}	58.50±11.10 ^{##}	44.20±8.64 [#]	0.33±0.03	0.269±0.02 ^{##*}

与对照组比较: [#]P<0.05 ^{##}P<0.01; 与模型组比较: ^{*}P<0.05
[#]P<0.05 ^{##}P<0.01 vs normal control group; ^{*}P<0.05 vs model group

表 3 软肝化纤丸对 CCl₄ 致大鼠肝脏纤维化的影响

Table 3 Effect of Ruangan Huaxian Pills on liver fibrosis of rats induced by CCl₄

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肝脏纤维化程度分级					P 值
		0	1	2	3	4	
对照	—	10	0	0	0	0	—
模型	—	0	0	5	5	0	<0.01 ^{##}
联苯双酯滴丸	0.15	0	4	5	1	0	<0.05 [#]
软肝化纤丸	1.5	0	3	6	1	0	<0.01 ^{##}
	3.0	0	3	6	1	0	<0.01 ^{##}

与对照组比较: [#]P<0.05 ^{##}P<0.01
[#]P<0.05 ^{##}P<0.01 vs normal group

表 4 软肝化纤丸对 CCl₄ 致大鼠肝细胞病变的影响

Table 4 Effect of Ruangan Huaxian Pills on hepatic cell pathology in liver fibrosis of rats induced by CCl₄

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肝细胞变性				P 值	肝细胞坏死				P 值
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
对照	—	10	0	0	0	—	10	0	0	0	—
模型	—	0	0	3	7	<0.01 ^{##}	0	0	4	6	<0.01 ^{##}
联苯双酯滴丸	0.15	0	0	6	4	<0.01 ^{##}	0	1	5	4	<0.01 ^{##}
软肝化纤丸	1.5	0	0	6	4	<0.01 ^{##}	0	0	7	3	<0.01 ^{##}
	3.0	0	0	6	4	<0.01 ^{##}	0	0	7	3	<0.01 ^{##}

与对照组比较: ^{##}P<0.01
^{##}P<0.01 vs normal control group

物肝组织结构及肝细胞形态无明显异常。模型组大部分动物肝小叶正常结构破坏广泛,肝细胞索排列紊乱,肝细胞肿大,气球样变,汇管区及中央静脉周围可见肝细胞核固缩及再生的肝细胞,大片肝细胞坏死,肝细胞变性范围达到肝小叶半径的 1/2~2/3,局部可见胆小管增生及纤维化,伴多量炎细胞浸润。半数动物局部肝脏网状纤维融合形成细小或较粗的胶原纤维条索,将肝细胞完全分隔成大小不等的肝细胞团,半数动物局部肝脏网状纤维融合形成细小纤维条索形成不完全性间隔。肝脏纤维化程度分级均为 2、3 级。

软肝化纤丸组与阳性药组动物肝小叶结构不同程度被破坏,部分动物肝细胞脂肪变性,肝细胞变

性范围不超过肝小叶半径的 1/2,以水样变性为主,肝细胞呈小灶状坏死,汇管区可见炎细胞浸润。部分动物肝细胞变性范围超过肝小叶半径的 1/2,以气球样变性为主,较多肝细胞呈碎片状坏死,汇管区炎细胞浸润,可见局部细小纤维增生未形成间隔,或纤维组织增生形成不完全性间隔,少数动物局部肝细胞被胶原纤维条索完全分隔成大小不等的肝细胞团。肝脏纤维化程度分级大部分在 1、2 级,见图 1。

3 讨论

近年来,对于中药及其提取物抗肝纤维化实验研究很多^[13-14],其参照的生化指标也不尽相同。徐珊等^[15-16]研究表明 Hyp 和肝纤维化程度密切相关,可作为中医辨证分型、判断病情和指导治疗的客观

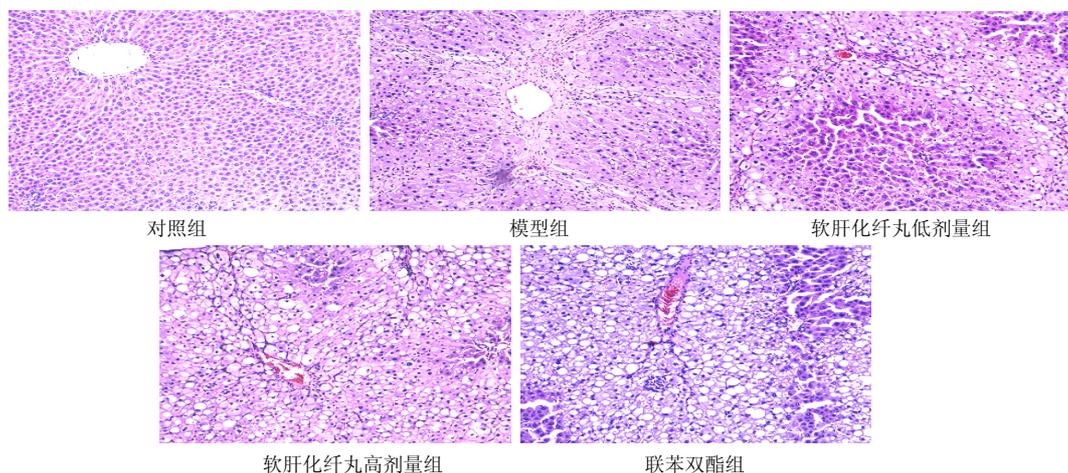


图 1 软肝化纤丸对肝纤维化大鼠肝脏病理形态的影响

Fig. 1 Effect of Ruangan Huaxian Pills on pathological morphology of liver fibrosis in rats

指标之一。本实验将 Hyp 作为肝纤维化指标。

软肝化纤丸是由鳖甲、黄芪、莪术、丹参、银杏叶及女贞子等 12 味中药组成。方中鳖甲、莪术和女贞子为君药，滋补肝肾、软坚散结；黄芪、白术和茯苓益气健脾为臣药；丹参、郁金、赤芍和银杏叶舒肝利疸、理气通络化瘀为佐；白花蛇舌草和半枝莲清热解暑为使，共达滋补肝肾、健脾益气、活血化痰及软坚散结功效。

本实验结果表明，软肝化纤丸 3 g/kg 剂量组连续 ig 给药 8 周，对 CCl₄ 所致慢性肝纤维化大鼠 ALT、AST 值升高有明显的抑制作用。对肝组织中 Hyp 量的升高也有明显抑制作用，其作用与阳性对照药联苯双酯滴丸相当。该药 1.5 g/kg 剂量组与模型组比较各项指标未见有显著性差异。病理检查结果表明，软肝化纤丸 1.5、3 g/kg 剂量组部分动物肝细胞变性范围超过肝小叶半径的 1/2，以气球样变性为主，较多肝细胞呈碎片状坏死，汇管区炎细胞浸润，可见局部细小纤维增生未形成间隔，或纤维组织增生形成不完全性间隔。肝脏纤维化程度降低，与阳性药联苯双酯的作用效果相近。提示该药 3 g/kg 剂量对 CCl₄ 引起的慢性肝纤维化大鼠有很好的保肝降酶、降低肝纤维化程度的作用。

参考文献

[1] 杨凤蕊, 娄建石, 方步武. 蒿鳖养阴软坚方抗 CCl₄ 复合因素所致大鼠肝纤维化的作用 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 530-534.
 [2] 刘德茂, 史德胜. 双丹口服液中药酚酸 B 和丹参素的稳定性研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(2): 102-104.
 [3] 刘尔瑜, 王宝恩, 朱家旋. 丹参对实验性肝纤维化的治

疗作用 [J]. 肝胆病杂志, 1993(1): 93.

[4] 刘诗权, 于皆平, 冉宗学. 银杏叶提取物对大鼠慢性肝损伤的保护作用 [J]. 中国医科大学学报, 2003, 34(1): 61-64.
 [5] 金虹, 黄毅, 王继生, 等. 银杏叶提取物对辐射损伤小鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1339-1342.
 [6] 李阳, 孙文基. 女贞子药理作用研究 [J]. 陕西中医学院学报, 2006, 9(29): 5.
 [7] 程敏, 胡正海. 女贞子的生物学和化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1219-1221.
 [8] 李杰. 中药半枝莲的研究 [J]. 齐鲁药事, 2006, 1(25): 12.
 [9] 石贤枝, 曹树稳, 余燕影. 白花蛇舌草-半枝莲药对提取物抗氧化及清除自由基活性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1434-1438.
 [10] 王北婴, 李仪奎. 中药新药研制开发技术与方法 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001.
 [11] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华肝病杂志, 2000, 8(6): 324-329.
 [12] 周程艳, 艾凌艳, 王美, 等. 杜仲多糖抗肝纤维化作用的实验研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 324-329.
 [13] 孔维涵, 郝洁, 方步武, 等. 蒿鳖养阴软坚方对四氯化碳所致肝纤维化的治疗作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1412-1414.
 [14] 胡金芳, 刘静, 申秀萍, 等. 三参提取物抗肝纤维化作用的研究 [J]. 天津医科大学学报, 2008, 14(3): 365-368.
 [15] 徐珊, 周敏, 包剑锋, 等. 肝纤维化不同证型与肝功能和肝组织羟脯氨酸关系的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(9): 1855-1857.
 [16] 李映菊, 汪煜华, 刘玉美, 等. 白屈菜红碱对肝纤维化大鼠肝脏病理学和肝组织羟脯氨酸含量的影响 [J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(3): 167-170.