

雄芍汤抗大鼠免疫性肝纤维化作用研究

郝瑞春¹, 门九章^{1*}, 李孝波¹, 李霞¹, 梁锐¹, 吕建军²

1. 山西中医学院, 山西 太原 030024

2. 山西生物应用职业技术学院, 山西 太原 030031

摘要: **目的** 研究雄芍汤抗大鼠免疫性肝纤维化的作用。**方法** 84只SD大鼠随机分为对照组、模型组、扶正化瘀胶囊阳性对照组、雄芍汤预防组和雄芍汤高、低剂量(生药15.8、7.9 g/kg)组(造模后给药)。采用ip猪血清法制备大鼠肝纤维化模型,观察雄芍汤对肝纤维化大鼠血清肝功能指标丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)、白蛋白与球蛋白比值(A/G)和肝纤维化血清标志物透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、III型前胶原(PCIII)、IV型胶原(CIV)水平,以及肝组织病理学的影响。**结果** 与模型组比较,雄芍汤各给药组血清ALT、AST、HA、LN、PCIII水平明显降低($P<0.05$ 、 0.01),血清ALB水平和A/G值明显升高($P<0.01$);雄芍汤预防组血清CIV水平明显降低($P<0.05$);所有给药组肝细胞变性和坏死程度轻微,肝组织纤维增生较少,雄芍汤高剂量组和预防组的作用尤为明显。**结论** 雄芍汤能减轻免疫性肝纤维化大鼠的肝细胞损伤,改善肝功能,调节细胞外基质的代谢,阻止或逆转肝纤维化。

关键词: 雄芍汤; 免疫性肝纤维化; 肝功能; 细胞外基质; 透明质酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)01-0115-04

Effects of Xiongshao Decoction on immune liver fibrosis in rats

HAO Rui-chun¹, MEN Jiu-zhang¹, LI Xiao-bo¹, LI Xia¹, LIANG Rui¹, LV Jian-jun²

1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China

2. Shanxi Vocational and Technical College of Biological Application, Taiyuan 030031, China

Abstract: **Objective** To research the effects of Xiongshao Decoction (XSD) on immune liver fibrosis in rats. **Methods** Eighty-four SD rats were randomly divided into normal control group, model group, Fuzheng Huayu (FZHY) Capsule group, XSD prevention group, XSD high-dose and low-dose groups (15.8 and 7.9 g/kg). The hepatic fibrosis model was induced by injecting porcine serum to the abdominal cavity of rats. To observe the effects of XSD on the serum hepatic function of rats: ALT, AST, ALB, and A/G, the serum marker of hepatic fibrosis: hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen III (PCIII), and collagen IV (CIV), and hepatic tissue pathomorphology as well. **Results** Compared with the model group, the levels of ALT, AST, HA, LN, and PCIII in every XSD treatment group were obviously decreased ($P<0.05$, 0.01), the levels of ALB and A/G were obviously increased ($P<0.01$). The CIV level of serum in XSD prevention group was significantly decreased ($P<0.05$) and the degrees of hepatocyte degeneration and necrosis in all treatment groups were lower, with less liver fibrosis, especially those in XSD prevention group and high-dose group. **Conclusion** XSD could not only relieve the degree of liver cells damage of immune hepatic fibrosis in rats, improve hepatic function of them, and regulate the extracellular matrix metabolism, but also arrest the hepatic fibrosis or make it reversed.

Key words: Xiongshao Decoction (XSD); immune hepatic fibrosis; hepatic function; extracellular matrix; hyaluronic acid

肝纤维化是指肝组织内细胞外基质成分过度增生与异常沉积,导致肝结构和(或)功能异常的病理变化。肝纤维化常见于不同病因的大多数慢性肝脏疾病中,若病因持续存在,肝纤维化逐渐加重,引起肝小叶及血管等改建,假小叶和结节形成,则

发展为肝硬化,严重影响患者健康与生命^[1]。由于多种慢性肝病均发生肝纤维化,而纤维化又是肝硬化、肝癌等严重致死性疾病的必经病变过程,因此,抗肝纤维化成为慢性肝疾病治疗的重中之重。

近年来有关中药复方抗肝纤维化的研究报道数

收稿日期: 2011-06-02

基金项目: 太原市科技项目(100115176)

作者简介: 郝瑞春(1975—),女,讲师,主治医师,博士,从事中医内科学教学及肝病研究。Tel: 18734864633 E-mail: ruichun75@126.com

*通讯作者 门九章 Tel: (0351)2272628 E-mail: zydrmjz2005@163.com

量众多^[2-3],但组方多以活血化瘀或益气养血为主,对其他治法的探讨较少。雄芍汤是门九章教授治疗肝纤维化的有效经验方,由制附子、生白芍、干姜、白术、茯苓、人参6味中药组成,功效为温阳健脾。临床研究显示,雄芍汤有良好的抗肝纤维化、保护肝细胞、改善肝功能的作用^[4]。本实验研究了雄芍汤抗大鼠免疫性肝纤维化的作用,旨在进一步探讨雄芍汤抗肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 动物

雄性SD大鼠,清洁级,体质量(200±20)g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK京2009-0007。

1.2 药品与试剂

雄芍汤组方6味药材购自山西中医学院第二中医院药房,取制附子9g、生白芍18g、干姜5g、白术12g、茯苓12g、人参9g,由该院制剂室煎制成含生药分别为3.16、1.58g/mL浓缩液;扶正化瘀胶囊(主要组成:丹参、发酵虫草菌粉、桃仁、松花粉、绞股蓝、五味子),上海黄海制药有限责任公司,批号100121;猪血清,北京燕生政博生物科技有限责任公司;III型前胶原(PCIII)、IV型胶原(CIV)、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)放免试剂盒,北京北方生物技术研究所。

1.3 仪器

AU-400全自动生化分析仪,IX71型倒置显微镜,日本Olympus公司;GC-2012 γ 放射免疫计数器,安徽科大创新股份有限公司中佳分公司;Image-Pro Plus 7.0显微摄像软件。

2 方法

2.1 免疫性肝纤维化模型制备

前8周给每只大鼠每次ip猪血清0.5mL,每周2次,后7周每次ip0.6mL,每周2次,共15周。随机处死动物,肝组织病理切片进行HE染色,判定模型复制是否成功。试验期间所有大鼠均给予标准维持饲料,饮用滤过后的自来水。

2.2 分组与给药

大鼠随机分为6组,即对照组、模型组、扶正化瘀胶囊(0.525g/kg)阳性对照组、雄芍汤预防(7.9g/kg)组、雄芍汤高和低剂量(15.8、7.9g/kg)组,每组14只。除对照组不予处理外,雄芍汤预防组从造模第2天开始ig给予雄芍汤浓缩液7.9g/kg,每日1次,连续给药23周。在造模成功后,模型组

ig蒸馏水,扶正化瘀胶囊组、雄芍汤高和低剂量组分别ig相应药物,每日1次,连续8周。扶正化瘀胶囊组、雄芍汤预防组和雄芍汤低剂量组给药剂量分别为临床给药剂量的7倍。

2.3 指标观察

大鼠用2%戊巴比妥钠ip麻醉后,立即剖开腹腔,迅速从下腔静脉取血6~9mL,静置4h后,3000r/min离心10min,取上层血清。采用全自动生化分析仪检测肝功能相关指标:丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)、白蛋白与球蛋白比值(A/G);放射免疫分析法检测血清HA、LN、PCIII、CIV水平;取部分肝右叶组织,置于中性甲醛溶液中固定,常规制备肝组织切片,HE和Masson染色,于光镜下观察肝组织病理改变。

2.4 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用统计软件SPSS 17.0进行分析,组间均数比较采用单因素方差分析、LSD或Tamhane检验。

3 结果

3.1 对免疫性肝纤维化大鼠肝功能指标的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清AST、ALT水平显著升高($P < 0.01$),ALB水平、A/G值显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,除雄芍汤低剂量组大鼠血清AST水平降低和扶正化瘀胶囊组大鼠A/G值升高不明显外,其他各治疗组大鼠血清AST、ALT水平均显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),ALB水平、A/G值显著升高($P < 0.01$)。结果见表1。

3.2 对免疫性肝纤维化大鼠血清肝纤维化指标的影响

与对照组比较,模型组血清HA、LN、PCIII、CIV水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠血清HA、LN、PCIII水平均显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),雄芍汤高剂量组大鼠血清HA、LN水平均低于雄芍汤预防组($P < 0.01$ 、 0.05),且该组血清LN水平低于扶正化瘀胶囊组($P < 0.05$),雄芍汤预防组大鼠血清CIV水平显著降低($P < 0.05$)。结果见表2。

3.3 免疫性肝纤维化大鼠肝组织病理学观察

HE染色病理观察($\times 400$)和Masson染色病理观察($\times 200$)结果见图1和2。对照组大鼠肝小叶结构清晰完整,肝细胞索以肝小叶中央静脉为中心向周围呈放射状排列,肝细胞排列整齐,细胞核

多为单个核,核仁清晰,无明显变性坏死,汇管区清晰可辨,无扩大,未见纤维组织增生及炎细胞浸润。模型组肝小叶结构破坏紊乱,肝细胞索排列紊乱,肝细胞有明显肿胀或萎缩变性,部分肝细胞内还有细小的空泡样改变,部分肝细胞坏死,伴有炎

细胞浸润,肝窦瘀血明显,汇管区扩大,汇管区和中央静脉周围纤维组织增生明显,并向肝小叶内延伸形成较细的纤维隔,部分已形成假小叶。雄芍汤高剂量组和雄芍汤预防组肝脏病变相当,肝小叶结构基本正常,肝细胞排列尚整齐,中央静脉周围偶

表 1 雄芍汤对免疫性肝纤维化大鼠血清 AST、ALT、ALB、A/G 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of XSD on AST, ALT, ALB, and A/G in serum of rats with immune liver fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	AST / (U·L ⁻¹)	ALT / (U·L ⁻¹)	ALB / (g·L ⁻¹)	A/G
对照	—	12	105.18 ± 5.81	50.09 ± 2.77	32.32 ± 2.58	1.03 ± 0.02
模型	—	12	191.75 ± 16.69 ^{△△}	106.60 ± 13.06 ^{△△}	25.02 ± 1.04 ^{△△}	0.82 ± 0.10 ^{△△}
雄芍汤预防	7.9	9	129.98 ± 20.09 ^{**}	61.89 ± 9.57 ^{**}	28.90 ± 1.94 ^{**△△}	0.99 ± 0.04 ^{**▲}
雄芍汤	15.8	10	134.37 ± 16.00 [*]	63.98 ± 7.62 ^{**}	28.77 ± 0.70 ^{**△△}	0.97 ± 0.05 ^{**▲}
	7.9	9	157.77 ± 27.12 [△]	75.13 ± 12.92 ^{**△}	27.83 ± 1.11 ^{**△△}	0.93 ± 0.04 ^{**△△}
扶正化瘀胶囊	0.525	9	144.76 ± 21.23 [*]	68.93 ± 10.11 ^{**}	28.05 ± 1.08 ^{**△△}	0.88 ± 0.06 ^{△△}

与对照组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与扶正化瘀胶囊组比较: [▲] $P < 0.05$

[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs FZHY Capsule group

表 2 雄芍汤对免疫性肝纤维化大鼠血清 HA、LN、PCIII、CIV 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of XSD on levels of HA, LN, PCIII, and CIV in serum of rats with immune liver fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	HA / (ng·mL ⁻¹)	LN / (μg·L ⁻¹)	PCIII / (μg·L ⁻¹)	CIV / (μg·L ⁻¹)
对照	—	12	39.07 ± 3.39	51.68 ± 4.46	41.93 ± 6.25	9.09 ± 1.78
模型	—	12	66.05 ± 4.49 ^{△△}	68.41 ± 3.91 ^{△△}	72.87 ± 39.35 ^{△△}	17.03 ± 2.98 ^{△△}
雄芍汤预防	7.9	9	51.12 ± 2.54 ^{**△△##}	61.18 ± 4.36 ^{*△△#}	48.56 ± 10.90 [*]	10.73 ± 1.45 [*]
雄芍汤	15.8	10	44.94 ± 1.60 ^{**△}	54.68 ± 6.13 ^{**▲}	45.22 ± 3.55 ^{**}	11.37 ± 2.52
	7.9	9	47.35 ± 2.81 ^{**△△}	58.09 ± 4.25 ^{**△}	46.45 ± 4.40 ^{**}	14.50 ± 1.89 ^{△△}
扶正化瘀胶囊	0.525	9	48.24 ± 4.13 ^{**△△}	61.08 ± 6.02 ^{*△△}	42.46 ± 7.37 ^{**}	12.22 ± 2.45

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$; 与对照组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与扶正化瘀胶囊组比较: [▲] $P < 0.05$; 与雄芍汤高剂量组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ vs FZHY Capsule group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs XSD high-dose group

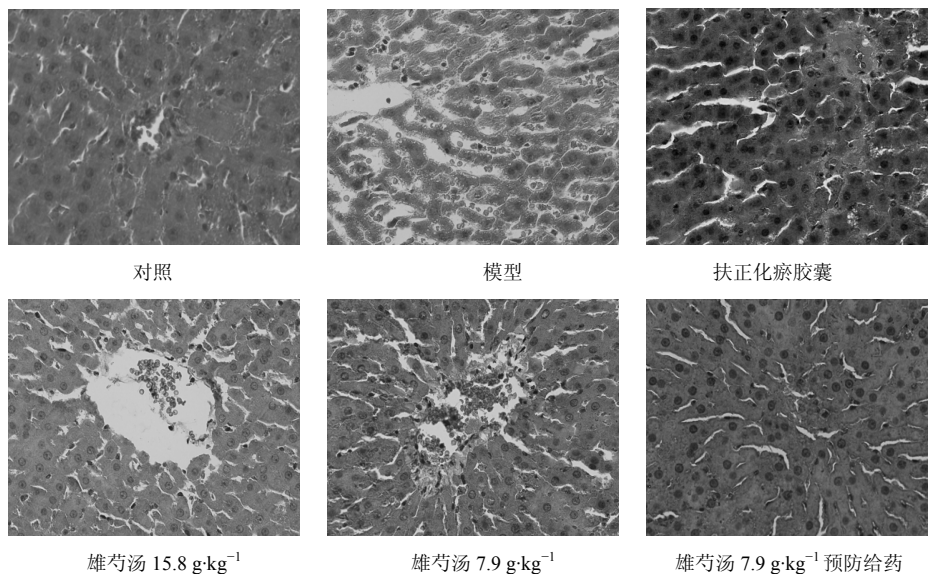


图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色病理学观察

Fig. 1 Pathological observation on HE staining of hepatic tissue in rats of every group

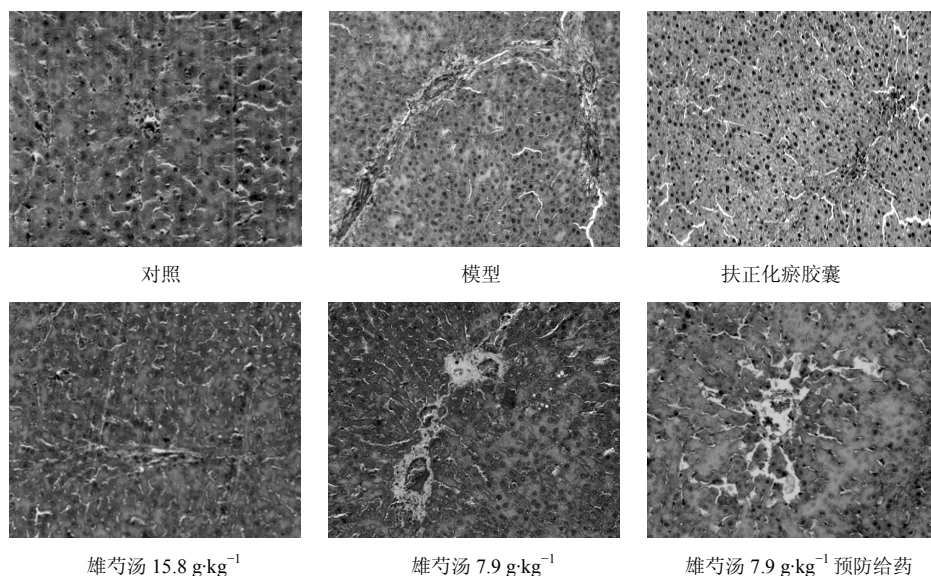


图 2 各组大鼠肝组织 Masson 染色病理学观察

Fig. 2 Pathological observation on Masson staining of hepatic tissue in rats of every group

见部分肝细胞变性，纤维增生程度轻，仅在部分血管周围有少量增生。扶正化瘀胶囊组肝脏炎症和纤维化均较模型组和雄芍汤低剂量组轻，但较雄芍汤高剂量组和雄芍汤预防组稍重。在各给药组中，雄芍汤低剂量组大鼠的肝脏炎症和纤维化程度最重。

4 讨论

雄芍汤是治疗脾肾阳虚型肝纤维化的有效经验方，主要功效为健脾温阳。现代药理研究表明，方中各味中药有抗炎、增强免疫功能等作用，除附子外，其他中药均具有保肝作用。

肝组织病理学、肝功能指标、血清肝纤维化标志物^[5-6]为治疗肝纤维化效果评估的主要项目，本实验从这 3 个方面综合评价雄芍汤的抗肝纤维化疗效。结果表明，雄芍汤具有保护肝细胞、减轻肝细胞炎症和坏死的作用，作用与扶正化瘀胶囊相当，且升高 A/G 值的作用优于扶正化瘀胶囊；还具有一定的调节细胞外基质（ECM）代谢的作用，即或抑制 ECM 的合成，或促进其降解，且作用与一定范围内的给药剂量呈正相关。肝组织病理观察结果也表明，雄芍汤可改善肝纤维化大鼠肝组织炎性改变，减轻肝细胞变性或坏死，阻止或逆转纤维组织增生，且雄芍汤高剂量和其预防给药的疗效稍优于扶正化

瘀胶囊。

综上所述，雄芍汤具有保护肝细胞、恢复肝功能、减轻肝纤维化病理改变等作用，是较为理想的抗肝纤维化中药复方，其预防性给药较治疗性给药效果更好。

参考文献

- [1] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南 [J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(11): 866-870.
- [2] 周程艳, 艾凌艳, 王 美, 等. 杜仲多糖抗纤维化作用的实验研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 324-329.
- [3] 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.
- [4] 郝瑞春, 门九章, 李孝波, 等. 健脾温阳法治疗慢性乙型肝炎肝纤维化临床研究 [J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(3): 34-36.
- [5] 廖柏明, 罗光汉. 血清透明质酸、III 型前胶原、IV 型胶原水平与肝组织炎症坏死程度、肝纤维化程度关系的探讨 [J]. 广西医学, 2001, 23(3): 441-441.
- [6] 冯继红, 刘文芝, 刘 玲, 等. 血清透明质酸、III 型前胶原、层粘连蛋白、IV 型胶原对肝纤维化的诊断意义 [J]. 中国误诊学杂志, 2001, 1(2): 166-167.