

清肝化瘀胶囊对大鼠免疫性肝纤维化的影响

王惠明¹, 姜 溪², 陈芙蓉², 岳 南^{2*}

1. 天津中医药研究院附属医院, 天津 300120

2. 天津药物研究院 新药评价中心, 天津 300193

摘要: **目的** 研究清肝化瘀胶囊对大鼠免疫性肝纤维化的防治作用。**方法** Wistar 大鼠随机分为 7 组, 除对照组外, 其余大鼠用牛血清白蛋白诱导免疫性肝纤维化模型, 造模大鼠随机分为模型组, 清肝化瘀胶囊低、中、高剂量 (0.9、1.8、3.6 g/kg) 组, 复方鳖甲软肝片 (2 g/kg) 和秋水仙碱 (0.25 mg/kg) 阳性对照组。观察清肝化瘀胶囊对免疫性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)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB), 以及肝羟脯氨酸 (Hyp)、唾液酸 (SA) 的影响, 计算肝脏、脾脏的脏器指数, 观察肝组织病理学改变。**结果** 清肝化瘀胶囊明显减小肝脏、脾脏的脏器指数, 明显降低肝脏 Hyp 的水平, 明显减轻肝纤维化程度, 其作用随剂量增加而增强。**结论** 清肝化瘀胶囊对大鼠免疫性肝纤维化有明显的防治作用。

关键词: 清肝化瘀胶囊; 免疫性肝纤维化; 肝功能; 羟脯氨酸; 唾液酸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)06-1157-05

Effect of Qinggan Huayu Capsules on immunohepatic fibrosis of rats

WANG Hui-ming¹, JIANG Xi², CHEN Fu-rong², YUE Nan²

1. Affiliated Hospital of Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300120, China

2. Center for Drug Evaluation and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Key words: Qinggan Huayu Capsules (QHC); immunohepatic fibrosis (IHF); liver function; hydroxyproline (Hyp); sialic acid (SA)

目前治疗肝纤维化的药物多用秋水仙碱和青霉胺, 但其疗效不理想, 且不良反应较大。临床及实验研究显示, 运用中医理论、采用中医药治疗肝纤维化具有明显的优势^[1-2], 具有广阔前景。清肝化瘀胶囊主要由丹参、三七等多味中药组成, 具有活血化瘀、软肝散结的作用。本实验以牛血清白蛋白诱导免疫性肝纤维化大鼠模型, 观察清肝化瘀胶囊的防治作用, 为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

Wistar 大鼠, 体质量 130~150 g, 雌雄各半, 军事医学科学院卫生学环境医学研究所提供, 合格证号: 军医动字 B98014。

1.2 药品与试剂

清肝化瘀胶囊, 石家庄制药集团制药技术开发有限公司, 批号 030321; 复方鳖甲软肝片, 内蒙古

福瑞中蒙药科技股份有限公司, 批号 20021010; 秋水仙碱, Serva 公司, 批号 C9754。羟脯氨酸 (Hyp)、唾液酸 (SA) 试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 牛血清白蛋白 (BSA), 天津市灏洋生物制品有限公司; 羊毛脂, 上海嘉定华亭羊毛脂厂; 液体石蜡, 天津市化学试剂二厂; 弗氏不完全佐剂: 羊毛脂 120 g 加入液体石蜡 240 mL, 在 65 °C 水浴搅拌混匀, 高压消毒后, 置 4 °C 冰箱保存备用。

1.3 仪器

Olympus Au 640 全自动生化分析仪, Olympus 显微镜, 日本; TU—1800/1800s 紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

2 方法

2.1 大鼠免疫性肝纤维化模型的制备

参考文献方法^[3-4], 选用健康 Wistar 大鼠 100 只, 除对照组 (雌、雄各 5 只) 外, 其余大鼠均多

收稿日期: 2012-03-05

作者简介: 王惠明 (1966—), 女, 天津人, 主治医师, 研究方向为中西医结合治疗脑血管与内科疾病。

Tel: (022) 27285270 E-mail: huiming-wang@263.net

*通讯作者 岳 南 Tel: (022) 84845239 E-mail: yuen@tjipr.com

点 sc 9 mg/mL BSA 弗氏不完全佐剂混悬液致敏, 每只每次 0.5 mL, 连续注射 5 次。第 1、2 次间隔 2 周, 其余各次均间隔 1 周。末次致敏后 1 周, 所有动物均眼眶静脉取血, 用毛细管法^[5-6]测定血清 BSA 抗体。取 BSA 抗体阳性的大鼠 (87 只) 尾静脉攻击不同质量浓度的 BSA 生理盐水溶液, 每只 0.4 mL, 每周 2 次, 共 15 次, 剂量从 2.0 mg 逐次递增至 3.0 mg (每次递增 0.1 mg), 以后每次递增 0.2 mg, 至第 15 次为 4.0 mg。对照组大鼠以生理盐水代替 BSA。

2.2 分组与给药

BSA 生理盐水溶液攻击注射后, 大鼠发生不同程度的过敏休克样反应, 呼吸急促、走路不稳、俯卧不起, 甚至死亡 (共死亡 16 只, 雌鼠 10 只、雄鼠 6 只), 死亡动物立即解剖, 肉眼观察未见各脏器明显异常; 存活动物约 30 min 后恢复正常。存活动物 71 只, 按体质量随机分成 6 组, 即模型组, 清肝化瘀胶囊低、中、高剂量 (药粉 0.9、1.8、3.6 g/kg) 组, 复方鳖甲软肝片 (药粉 2 g/kg)、秋水仙碱 (0.25 mg/kg) 阳性对照组, 除秋水仙碱组 11 只大鼠外, 其他 5 组每组均 12 只大鼠。各给药组大鼠于攻击注射 BSA 生理盐水 4 次后, 开始均 ig 给予相应药物 10 mL/kg, 对照组、模型组大鼠给予等容量 0.5% CMC 混悬液, 每天 1 次, 每周 7 次, 连续给药 6 周。

2.3 指标观察

末次给予 BSA 生理盐水溶液后 3 d, 大鼠 (已禁食 15 h) ip 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉取血, 离心后吸取上清液, 在 Olympus Au640 全自动生化分析仪上测定丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLOB) 水平和白蛋白与球蛋白比值 (A/G)。以酶速率法检测 ALT、AST 水平; 双缩脲法检测 TP 水平; 溴甲酚绿法检测 ALB 水平, 计算 GLOB 及 A/G 值。按试剂盒说明, 比色法检测 SA 水平。取大鼠肝组织约 1 g, 加入 9 倍生理盐水匀浆, 3 500 r/min 离心 10 min, 按试剂盒说明测定 Hyp 的量, 用于判定肝纤维化的程度。

称大鼠体质量, 取出肝脏、脾脏, 称湿质量, 计算脏器指数。

2.4 肝组织病理学观察

取部分肝脏, 用 10% 福尔马林固定, 常规取材后, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋, 制片, HE 及 Masson 染色, Olympus 显微镜下观察 (HE 染色病理观察 $\times 100$, Masson 染色病理观察 $\times 200$) 肝组织病理学

变化。肝纤维化病变程度分为 4 级: “—”, 肝组织正常, 无纤维化组织增生; “+”, 汇管区及窦隙有纤维组织增生; “++”, 肝小叶结构有破坏, 纤维组织增生形成纤维间隔, 有少量假小叶形成趋势; “+++”, 肝小叶结构破坏, 纤维组织增生明显, 假小叶广泛形成。

2.5 统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数采用统计分析 t 值法, 有等级关系的则采用等级序值法进行统计分析。

3 结果

3.1 一般观察

在实验过程中, 清肝化瘀胶囊高剂量组给药时因药物误入气管致大鼠死亡 1 只 (雌性), 模型组 2 只 (雌雄各 1 只)、清肝化瘀胶囊中剂量组 1 只 (雌性)、清肝化瘀胶囊低剂量组 2 只 (雌雄各 1 只)、复方鳖甲软肝片组 1 只 (雌性)、秋水仙碱组 1 只 (雄性) 大鼠死亡。

3.2 对免疫性肝纤维化大鼠脏器指数的影响

与对照组比较, 模型组大鼠的肝脏、脾脏指数明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 清肝化瘀胶囊 1.8、3.6 g/kg 剂量组以及阳性对照组大鼠肝脏、脾脏指数明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 1。

表 1 清肝化瘀胶囊对免疫性肝纤维化大鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of QHC on organ indices of rats with IHF ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	肝脏指数 / %	脾脏指数 / %
对照	—	10	2.776 ± 0.242	0.253 ± 0.035
模型	—	10	3.744 ± 0.631 ^{▲▲}	0.366 ± 0.037 ^{▲▲}
清肝化瘀胶囊	0.9	10	3.348 ± 0.406	0.318 ± 0.069
	1.8	11	3.224 ± 0.370 [*]	0.321 ± 0.057 [*]
	3.6	11	3.187 ± 0.303 ^{**}	0.309 ± 0.046 ^{**}
复方鳖甲软肝片	2.0	11	3.645 ± 0.491	0.327 ± 0.047 [*]
秋水仙碱	0.000 25	10	3.217 ± 0.414 [*]	0.317 ± 0.0504 [*]

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$;
表 3、4 同

^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group;
same as Tables 3 and 4

3.3 对免疫性肝纤维化大鼠血液生化指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清 SA 水平明显升高 ($P < 0.05$), 其余各项指标均无明显变化。与模型组比较, 清肝化瘀胶囊 3.6 g/kg 剂量组大鼠血清 SA 水平明显降低 ($P < 0.05$), 其余各项指标均

无明显变化。结果见表 2。

3.4 对免疫性肝纤维化大鼠肝脏 Hyp 的影响

与对照组比较,模型组大鼠肝脏 Hyp 的量明显增加 ($P<0.01$),表明肝纤维化形成。与模型组比

较,清肝化瘀胶囊 1.8、3.6 g/kg 剂量组大鼠肝脏 Hyp 的量明显减少 ($P<0.05$ 、 0.01),减少量与剂量呈正相关,复方鳖甲软肝片、秋水仙碱亦有类似作用 ($P<0.05$)。结果见表 3。

表 2 清肝化瘀胶囊对免疫性肝纤维化大鼠血液生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effects of QHC on blood biochemical indices of rats with IHF ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	ALT / (U·L ⁻¹)	AST / (U·L ⁻¹)	TP / (g·L ⁻¹)	ALB / (g·L ⁻¹)	GLOB / (g·L ⁻¹)	A/G	SA / (mmol·L ⁻¹)
对照	—	10	34.90±7.22	105.90±28.93	58.98±3.93	30.25±2.65	28.76±1.58	1.05±0.07	3.34±0.38
模型	—	10	37.10±8.82	123.40±26.40	58.55±3.24	29.00±2.85	28.98±2.17	0.99±0.13	3.79±0.47 [▲]
清肝化瘀胶囊	0.9	10	56.90±39.09	155.30±57.20	59.16±3.19	29.38±1.80	29.78±2.69	0.99±0.12	3.63±0.41
	1.8	11	40.18±13.72	107.82±54.88	60.68±2.44	30.34±1.80	30.33±2.94	1.01±0.14	3.62±0.69
	3.6	11	34.73±12.18	114.55±35.83	58.92±2.44	29.67±1.89	29.30±2.54	1.03±0.13	3.40±0.40 [*]
复方鳖甲软肝片	2.0	11	44.45±19.78	124.91±43.07	59.80±3.06	29.81±2.14	29.9±2.03	1.00±0.09	3.46±0.50
秋水仙碱	0.000 25	10	45.20±22.25	126.20±35.91	61.23±2.71	30.64±1.92	30.59±2.97	1.01±0.14	3.55±0.68

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

表 3 清肝化瘀胶囊对免疫性肝纤维化大鼠肝脏 Hyp 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of QHC on Hyp in liver of rats with IHF ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	Hyp / (μg·mg ⁻¹)
对照	—	10	0.609±0.151
模型	—	10	0.903±0.121 ^{▲▲}
清肝化瘀胶囊	0.9	10	0.768±0.190
	1.8	11	0.726±0.163 [*]
	3.6	11	0.689±0.131 ^{**}
复方鳖甲软肝片	2.0	11	0.732±0.153 [*]
秋水仙碱	0.000 25	10	0.727±0.158 [*]

3.5 对免疫性肝纤维化大鼠肝脏病理变化的影响

对照组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞无明显变性、坏死,汇管区不扩大,可见少量纤维组织及少量小圆形细胞浸润。模型组大鼠肝细胞可见明显变

性、坏死(其中一只大鼠肝损伤不明显),纤维组织均不同程度地增生,增生的纤维组织将肝组织分成广泛的假小叶,汇管区由于纤维组织增生、胆管增生而扩大,且有不同程度的炎细胞浸润。与模型组比较,清肝化瘀胶囊 3.6 g/kg 组 2 只大鼠肝形成假小叶,其余各鼠肝纤维化明显减轻,1 只大鼠肝汇管区及窦隙有少量肝纤维组织增生,其余大鼠肝组织结构基本正常;清肝化瘀胶囊 1.8 g/kg 组 2 只大鼠肝形成假小叶,其余各鼠肝纤维化明显减轻,有 2 只大鼠在汇管区及窦隙有少量肝纤维组织增生,其余动物肝组织结构基本正常;清肝化瘀胶囊 0.9 g/kg 组大鼠肝纤维化略减轻,但假小叶形成的大鼠数量与模型组相同;复方鳖甲软肝片组、秋水仙碱组大鼠肝纤维组织形成的广泛假小叶程度较轻,且有 1/3 以上大鼠肝组织结构基本正常。结果见表 4、图 1 和 2。

表 4 清肝化瘀胶囊对免疫性肝纤维化大鼠肝纤维化程度的影响

Table 4 Effects of QHC on level of fibrosis in rats with IHF

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物/只	Masson 染色肝纤维化程度					HE 染色肝纤维化程度				
			—	+	++	+++	<i>P</i>	—	+	++	+++	<i>P</i>
对照	—	10	10	0	0	0	—	10	0	0	0	—
模型	—	10	1	3	1	5	<0.01 ^{▲▲}	1	3	1	5	<0.01 ^{▲▲}
清肝化瘀胶囊	0.9	10	3	1	1	5	>0.05	3	1	1	5	>0.05
	1.8	11	7	1	1	2	<0.05 [*]	7	1	1	2	<0.05 [*]
	3.6	11	8	1	0	2	<0.05 [*]	8	1	0	2	<0.05 [*]
复方鳖甲软肝片	2.0	11	5	2	3	1	<0.05 [*]	5	2	3	1	<0.05 [*]
秋水仙碱	0.000 25	10	4	3	2	1	<0.05 [*]	4	3	2	1	<0.05 [*]

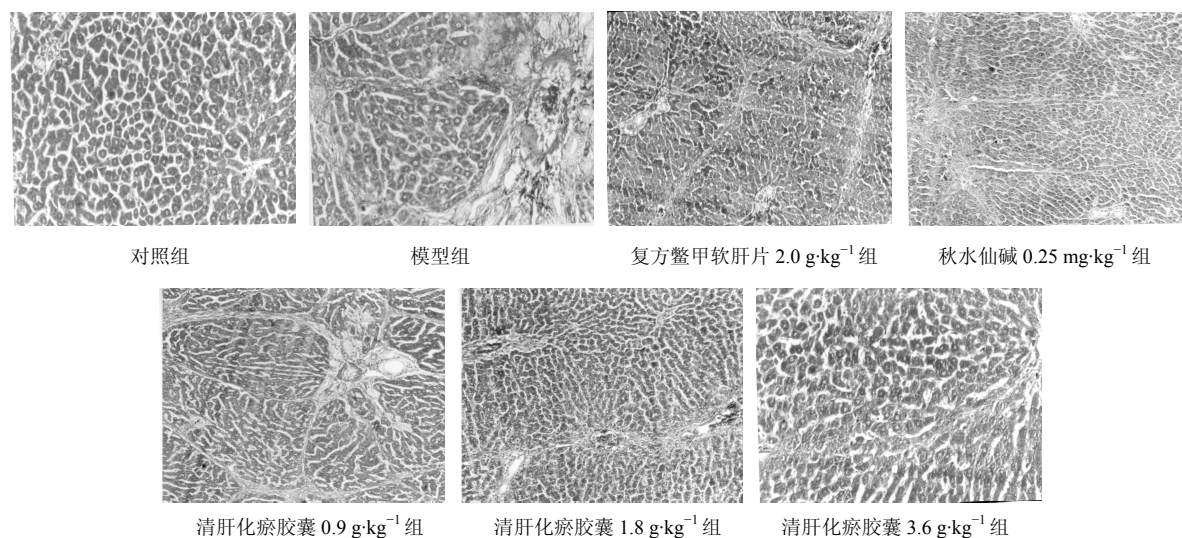


图 1 大鼠肝组织病理学观察 (Masson 染色)

Fig. 1 Pathological observation in liver tissues of rats (Masson staining)

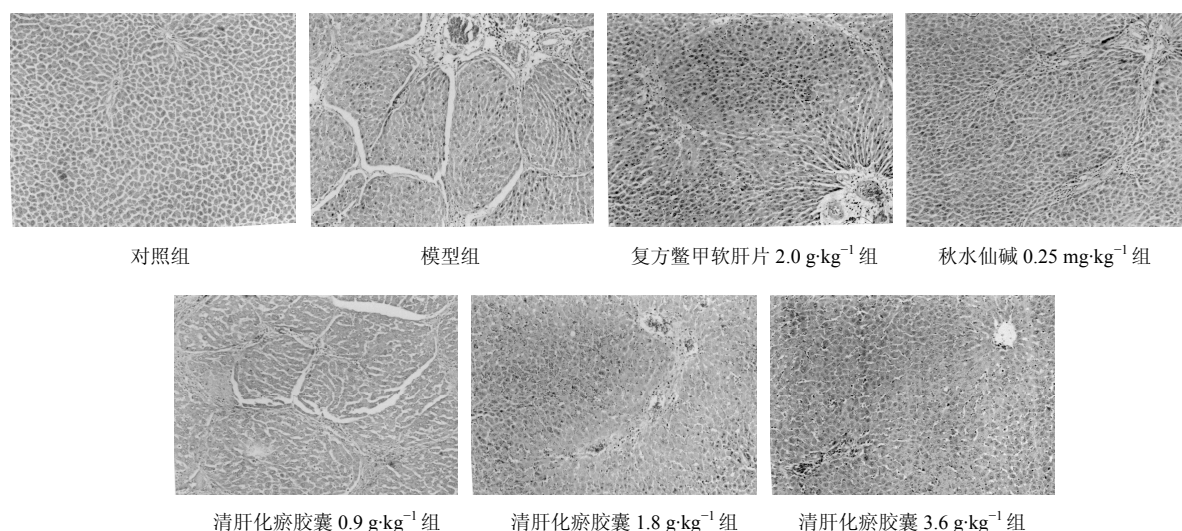


图 2 大鼠肝组织病理学观察 (HE 染色)

Fig. 2 Pathological observation in liver tissues of rats (HE staining)

4 讨论

肝纤维化是慢性肝病的一种组织学诊断,是多种慢性肝病向肝硬化发展的必经途径。早期的纤维化具有可逆性,但若病因持续存在,肝纤维化便逐渐加重,肝脏的正常结构遭到破坏,中心静脉区和汇管区出现间隔和假小叶形成,即发展为不可逆的肝硬化。在肝纤维化进程中,肝组织 Hyp 的量可间接反映肝纤维化的程度,是肝纤维化检测的一个定量指标。肝纤维化还可导致肝组织增生及炎细胞浸润,使肝脏、脾脏的脏器系数明显增大。

中医认为“血瘀”是肝纤维化的基本病机之一,临床上采用活血化瘀、软坚散结等疗法治疗肝纤维化已取得了很好疗效。本实验采用免疫性肝纤维化模型,研究清肝化瘀胶囊对肝纤维化的治疗作用,结果显示,清肝化瘀胶囊能使免疫性肝纤维化大鼠肝脏 Hyp 的量明显减少,肝脏及脾脏的脏器系数明显减小,表明清肝化瘀胶囊能下调肝纤维化大鼠肝脏中胶原蛋白的量,使纤维化程度减轻。组织病理学观察也表明,给予清肝化瘀胶囊治疗后,模型大鼠的肝纤维化程度明显减轻,表现在肝纤维组织增生减少、形成的假小叶程度较轻。以上结果均表明,

清肝化瘀胶囊对大鼠免疫性肝纤维化有明显的治疗作用,其机制可能是通过抑制细胞外基质的产生与沉积,同时减少胶原蛋白的生成,从而达到治疗肝纤维化的目的。

参考文献

- [1] 胡义杨,刘成.中药有效成分抗肝纤维化研究现状与展望动物模型的研究[J].中草药,1996,27(3):183-185.
- [2] 杨凤蕊,姜建石,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.

- [3] 朱起贵,方步武,吴贺算,等.牛血清白蛋白致免疫损伤性肝纤维化动物模型的研究[J].中华病理学杂志,1993,22(2):121-122.
- [4] 付修文,车念聪,高连印,等.软肝煎防治大鼠免疫损伤性肝纤维化的实验研究[J].中国中医基础医学杂志,1999,5(8):20-22.
- [5] 徐静为.实验免疫学技术[M].北京:科学出版社,1979.
- [6] 王世中.免疫化学技术[M].北京:科学出版社,1980.

《中草药》杂志最新佳绩

《中草药》杂志2011年荣获**第二届中国出版政府奖**,中国出版政府奖是国家新闻出版行业的最高奖,第二届中国出版政府奖首次设立期刊奖,《中草药》等10种科技期刊获此殊荣。2011年3月18日于北京举行了盛大的颁奖典礼。

《中国科技期刊引证报告》2011年12月2日发布:《中草药》杂志2010年总被引频次6178,名列我国科技期刊第14名,中医学与中药类期刊**第1名**;影响因子**0.904**,基金论文比0.680,权威因子2269.200;综合评价总分76.6,位列中医学与中药学类期刊第1名。连续7年(2005—2011年)荣获“百种中国杰出学术期刊”,再次荣获“中国精品科技期刊”(2008年首次设立,每3年一届),荣获天津市第十届优秀期刊评选特别奖。

中国知网(CNKI)《中国学术期刊影响因子年报》2011年12月22日发布:《中草药》杂志总被引频次16359,影响因子1.453,位列中医学与中药学期刊第1名,基金论文比0.74,WEB下载量39.1万次。

注册商标“**中草药**”2011年被评为天津市著名商标。