

保肝片对大鼠肝纤维化模型的影响

王丽, 吕纪华, 饶伟源*, 刘瑛, 覃潇, 周军
(广西壮族自治区中医药研究院, 南宁 530022)

[摘要] **目的:**探讨中药保肝片对四氯化碳(CCl_4)复合因素改良法所致大鼠肝纤维化的治疗作用。**方法:**将雄性 SD 大鼠随机分为空白组, 模型组, 中药保肝片高、中、低剂量组及秋水仙碱组, 除空白组外, 其余各组应用 CCl_4 复合因素改良法制备肝纤维化模型, 并于造模同时予中药保肝片高、中、低剂量($27.55, 13.78, 6.89 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和秋水仙碱片($0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)进行抗肝纤维化干预, 共 6 周。通过计算肝脏指数, 检测肝功能丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)水平, 观察肝脏病理切片并进行肝纤维化分级, 评价药物的抗纤维化作用。**结果:**与空白组比较, 模型组大鼠肝脏指数增加, 血清 AST、ALT 升高, ALB 含量降低, 且肝脏病理呈现明显肝纤维化, 具有显著性差异($P < 0.01$); 与模型组比较, 保肝片($27.55 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组 ALB 含量明显升高, 且肝脏病理肝纤维化程度显著改善, 差异具有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论:**保肝片可明显改善模型大鼠肝纤维化程度, 具有抗肝纤维化作用。

[关键词] 保肝片; 肝纤维化; CCl_4 复合因素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0234-03

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070234

Effect of Baogan Tablets on Hepatic Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride Complex Factors in Rats

WANG Li, LV Ji-hua, RAO Wei-yuan*, LIU Ying, QIN Xiao, ZHOU Jun
(Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Baogan tablets against CCl_4 complex factors induced hepatic fibrosis in rats. **Method:** The SD rat were divided into six groups randomly: control group (NC), hepatic fibrosis model group, 3 different does drug group ($27.55, 13.78, 6.89 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) of Baogan tablets and a positive control group (colchicine tablets $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The rats of NC group were given normal saline, the other group were induced by CCl_4 complex factors. At the same time, the other groups were treated by Baogan tablets and colchicine tablets. The effects of drugs were observed by calculating the liver index, detecting liver function alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB) and observing the extent of liver fibrosis. **Result:** Compared with control group, the content of AST, ALT in serum, liver index, and the extent of liver fibrosis were increased significantly, ALB was decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the content of ALB in serum was increased significantly ($P < 0.01$), and the extent of liver fibrosis was lessened significantly in the drug group ($27.55 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Baogan tablets could improve the degree of liver fibrosis in rats.

[Key words] Baogan tablets; hepatic fibrosis; CCl_4 complex factors

[收稿日期] 20120907(017)

[第一作者] 王丽, 医学硕士, 助理研究员, 从事中药药理学研究, E-mail: wangli_li_82@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 饶伟源, 副主任药师, 从事中药新药研发, E-mail: 736083039@qq.com

肝纤维化是指肝脏内以胶原为主的肝脏细胞外基质(ECM)合成增多, 降解相对不足, 导致 ECM 过度沉积。它不是一个独立的疾病, 而是多种慢性肝脏疾病的共同病理基础与特征, 是肝硬化的前期阶段, 若进一步发展可致肝小叶改建、假小叶与结节形

成,最终必然导致肝硬化^[1-2]。因此,肝纤维化的早期诊断和治疗可以预防肝硬化的发生、发展,具有重要的临床意义和价值。本文通过制备肝纤维化模型,观察中药保肝片的抗肝纤维作用。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠60只,清洁级,体重(220±30)g,雄性,广西医科大学动物中心提供,许可证号SCXK(桂)2009-0002。饲养于20~25℃、相对湿度60%±10%环境中。

1.2 药品与试剂 保肝片由党参、黄芪、丹参、三七、黄精、鳖甲、柴胡、茯苓、赤芍、甘草等药物组成,由广西民族医药研究所提供,批号100101,每片含生药9.84g,临床成人日用量为每次6片,每日2次,临用时用蒸馏水配制为所需浓度;秋水仙碱片(云南昊邦制药有限公司生产,批号090920),天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒、丙氨酸转氨酶(ALT)和白蛋白(ALB)试剂盒(均为长春汇力生物技术有限公司,批号分别为2010002,2010002,2010003)。

1.3 仪器 BS224S型电子天平(北京赛多利斯),AMS-18A全自动生化分析仪(北京奥普森),SW-261-79型电热恒温水浴箱(上海医疗器械厂)

2 方法

2.1 分组、造模、给药 大鼠60只,随机分为6组:空白组,模型组,中药保肝片高、中、低剂量组,秋水仙碱组,每组10只。除空白组外,其余各组应用CCl₄复合因素改良法制备大鼠肝纤维化模型,造模开始2周给予高脂、低蛋白质复合饲料(20%猪油+80%玉米粉),2周后改用普通饲料,造模期间正常饮水,每周2次ip 50% CCl₄花生油溶液1 mL·kg⁻¹体重,空白组予ip相应体积花生油溶液,6

周后成模。自造模第1天起,中药保肝片高、中、低剂量组按生药量计分别为27.55,13.78,6.89 g·kg⁻¹ ig;秋水仙碱组按0.2 mg·kg⁻¹剂量给药。各组ig容量均为10 mL·kg⁻¹,空白组、模型组分别ig等体积蒸馏水,每天ig 1次,共6周。

2.2 检测指标 各组末次给药后禁食(不禁水)12 h,称重,经35 mg·kg⁻¹戊巴比妥钠ip麻醉,腹主动脉采血,2 500 r·min⁻¹离心15 min,取血清用全自动生化分析仪测定血清ALT,AST,ALB;采血后处死大鼠,剖取肝脏,称重,计算肝脏指数(脏器指数=脏器质量/体重×100);肝脏左叶标本用10%甲醛溶液固定进行HE染色,光镜下观察肝脏纤维的增生程度,并参照《病毒性肝炎防治方案》中的标准^[3-4]对肝组织病理结果进行肝纤维化分级。每张切片随机选取5个视野,分别记录病理分级,并取其平均值作为该动物肝脏的病理分级。

2.3 统计学分析 实验数据均采用SPSS 13.0统计软件包处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析与t检验,计数资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠肝纤维化模型血清学指标及肝指数的影响 与空白组比较,模型组及各用药组大鼠肝脏指数均明显增加,血清AST,ALT明显升高,ALB含量明显降低,有显著性差异($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组大鼠肝脏指数、血清AST含量显著降低,秋水仙碱组与中药保肝片组ALB含量均明显升高,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示大鼠肝纤维化模型制备成功,秋水仙碱及中药保肝片高剂量组有抗肝纤维化作用。见表1。

表1 保肝片对大鼠肝纤维化模型血清学指标及肝指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝脏指数/%	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹
空白	-	2.27 ± 0.29	140.20 ± 33.18	69.81 ± 42.78	27.40 ± 1.07
模型	-	4.68 ± 0.45 ¹⁾	633.29 ± 233.45 ¹⁾	575.97 ± 212.56 ¹⁾	20.21 ± 2.05 ¹⁾
保肝片	27.55	4.30 ± 0.57 ¹⁾	511.32 ± 239.43 ¹⁾	443.79 ± 220.38 ¹⁾	25.38 ± 1.66 ^{1,3)}
	13.78	4.34 ± 0.63 ¹⁾	460.60 ± 234.11 ¹⁾	540.16 ± 245.47 ¹⁾	21.59 ± 1.07 ¹⁾
	6.89	4.34 ± 0.56 ¹⁾	489.60 ± 180.46 ¹⁾	548.65 ± 189.67 ¹⁾	23.09 ± 2.55 ¹⁾
秋水仙碱	2 × 10 ⁻⁴	4.24 ± 0.38 ^{1,2)}	449.83 ± 170.60 ^{1,2)}	477.15 ± 148.67 ¹⁾	24.18 ± 1.56 ^{1,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

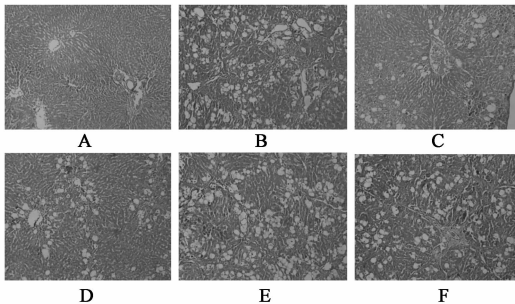
3.2 对大鼠肝纤维化模型肝脏组织病理的影响 肝组织HE染色,光镜下观察显示:空白组大鼠肝小叶结构完整清晰,肝板以中央静脉为中心呈条索状向四周放射状排列,板间有不规则肝窦,仅于汇管区

和中央静脉有少许胶原纤维存在。模型组多数正常小叶结构破坏或消失,由汇管区和中央静脉伸出粗大胶原纤维条索分割、包绕肝小叶,肝细胞索排列紊乱,肝细胞水肿明显,脂肪变性广泛,部分有坏死。

纤维隔内有大量单核细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞及成纤维细胞等细胞浸润。与模型组比较,各药物治疗组肝小叶结构破坏明显减轻,肝脏胶原纤维增生亦明显减轻,纤维条索疏松变窄。肝细胞水肿好转,变性情况明显改善,炎细胞浸润减少。其中以秋水仙碱组及中药保肝片高剂量组肝脏结构改善较为明显。各组肝纤维化程度分级比较结果:与空白组比较,其余各组均呈现明显肝纤维化,有显著性差异 ($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组及中药保肝片高剂量组肝脏纤维化程度改善较为明显,差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 2,图 1。

表 2 各组肝脏肝纤维化程度分级比较 ($n = 10$)

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	肝纤维化分级/只				
		S0	S1	S2	S3	S4
空白	-	10	0	0	0	0
模型	-	0	0	1	3	6 ¹⁾
保肝片	27.55	0	1	3	5	1 ^{1,2)}
	13.78	0	0	1	5	4 ¹⁾
	6.89	0	0	2	5	3 ¹⁾
秋水仙碱	2×10^{-4}	0	2	3	4	1 ^{1,2)}



A. 空白组; B. 模型组; C. 秋水仙碱 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组;
D. 保肝片 $27.55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组; E. 保肝片 $13.78 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组;
F. 保肝片 $6.89 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组

图 1 各组大鼠肝脏组织病理形态改变 (HE, $\times 100$)

4 讨论

CCl_4 是一种选择性的肝毒性物质,经口服、腹腔注射或皮下注射等途径制备肝纤维化模型。 CCl_4 进入机体后在肝内活化成自由基 ($-\text{CCl}_3$ 和 $-\text{OOC}\text{Cl}_3$),后者可直接损伤质膜,增强过氧化脂质作用,破坏肝细胞膜性结构,造成肝细胞变性、坏死,并可导致肝脏蛋白质合成和能量代谢的障碍,引起 ECM 的过度沉积而成肝纤维化^[5]。本实验动物模型制备是在文献^[6-7]基础上改进而成,采用复合因素改良法,以高脂低蛋白食物 (20% 猪油 + 80% 玉米粉) 喂养 2 周,促进肝脂肪病变,同时采用每周腹腔注射 50% 花生油溶液 2 次,进行 CCl_4 毒性干预,6 周成模。本实验结果表明模型组大鼠血清 ALT、AST 显著升高,

ALB 含量降低,且肝脏指数及肝脏病理变化均表明模型成功。

中医学认为,肝纤维化的成因在于肝气不畅,经脉瘀滞,脾气虚弱,正气不足所致^[8],属本虚标实之证,治疗当以扶正逐瘀,研究亦表明治疗肝纤维化中药中补虚药使用频率最高,其次为活血化瘀药^[9-11]。中药保肝片是由党参、黄芪、丹参、三七等中药组成,方中党参、黄芪、黄精补中益气,健脾扶正,丹参、三七、鳖甲活血祛瘀,通利血脉,辅以柴胡疏肝解郁,茯苓健脾化湿,赤芍凉血活血,共奏补虚祛瘀,清热利湿,疏肝解郁之功效。本实验结果表明中药保肝片能显著改善模型大鼠肝功能及肝组织纤维化程度,抑制假小叶的形成及纤维组织的增生,具有抗肝纤维化作用。

[参考文献]

[1] 李季,叶军,薛冬英,等. 桂枝茯苓丸抗大鼠肝纤维化作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24):171.

[2] 李成浩,张红英. 黄芪提取物对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20):217.

[3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,中华医学会肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1):56.

[4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,中华医学会肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6):324.

[5] 刘立新,石永强. 药物所致肝纤维化动物模型的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2009, 9(9):851.

[6] 方厚华. 医学实验模型动物[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2002:118.

[7] 王金娥. 制备不同种类肝纤维化及肝硬化动物模型研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2011, 14(1):68.

[8] 尚立芝,王付,苗小玲,等. 四逆散加味抗大鼠肝纤维化作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18):194.

[9] 刘鸣昊,薛博瑜. 近 5 年来肝纤维化中医证治用药规律的文献研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):279.

[10] 张媛辉,刘俊田. 中药抗肝纤维化作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6):66.

[11] 赵志敏,余慧颖,彭渊,等. 清热活血类方剂防治 CCl_4 小鼠肝纤维化的药效比较[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12):1804.

[责任编辑 聂淑琴]