# 荣肝化瘀解毒汤干预大鼠胆汁淤积性肝纤维化的实验研究

★ 王兵 （上海交通大学附属第六人民医院中医科 上海 200233）
★ 朱平生 （河南中医学院肝病研究所 郑州 450008）
★ 党中勤 牛学恩 （河南省中医院消化科 郑州 450002）

**摘要**：目的：研究养肝化瘀利湿法有效干预大鼠胆汁淤积性肝纤维化的作用机制。方法：胆管结扎的方法制备大鼠胆汁淤积性肝纤维化模型，造模一周后随机分为模型组和药物干预组，药物干预经口灌胃分别给予荣肝化瘀解毒汤和小柴胡汤，模型组给予等量生理盐水，用药4周后杀鼠取材，观测内容包括肝功能、肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量，组织病理学、免疫组织化学观测IV型胶原(Col IV)、层粘蛋白(LM)和增殖性细胞核抗原(PCNA)。结果：(1)荣肝化瘀解毒汤显著改善胆汁淤积性肝纤维化大鼠肝功能($P<0.05$)，降低肝组织Hyp含量($P<0.05$)；肝组织纤维化程度计分评定结果显示，荣肝化瘀解毒汤组肝组织纤维化程度显著减轻($P<0.05$)，而小柴胡汤组无显著性变化($P>0.05$)。(2)模型组大鼠BECs增殖非常显著，肝实质细胞比例显著减少，其肝组织PCNA阳性BECs数显著增多($P<0.001$)，荣肝化瘀解毒汤组大鼠肝组织PCNA阳性BECs数显著减少($P<0.05$)，小柴胡汤组无显著性变化($P>0.05$)。(3)模型组大鼠增生胆管周围的LM表达显著增加，肝窦壁Col Ⅳ表达未见明显变化，但强烈表达于增殖的BECs周围的基底膜上；图象分析显示荣肝化瘀解毒汤显著减少LM和Col IV的阳性表达($P<0.05$)。结论：胆管上皮细胞增殖在胆管结扎大鼠胆汁淤积性肝纤维化形成中起重要作用，荣肝化瘀解毒汤抑制胆管上皮细胞增殖，抑制增殖的胆管上皮细胞基底膜上细胞外基质的沉积，是其有效干预胆汁淤积性肝纤维化的重要机制之一。

**关键词**：养肝化瘀利湿法；荣肝化瘀解毒汤；胆汁淤积性肝纤维化；胆管上皮细胞
**中图分类号**：R 285.5 **文献标识码**：A

实验研究

中医对肝硬化病机的认识已逐渐趋向一致，综合关幼波[1]、刘树农[2]、姜春华[3]三位全国名老中医的观点及目前已有的相关报道，可以认为，肝硬化的中医基本病机为气阴虚损、血瘀阻络、湿热内蕴等，益气、养阴、化瘀与清热利湿则是常用的基本治法。笔者结合自己的临床治疗经验，以益气活血、滋养肝肾、清热利湿为主，自拟荣肝化瘀解毒汤（由黄芪、姜黄、虎杖、白术、丹参、参三七、白芍、女贞子、鸡内金和柴胡等组成），发现其对胆汁淤积相关的慢性肝病有很好的治疗效果。我们采用胆管结扎(BDL)大鼠胆汁淤积性肝纤维化模型，对荣肝化瘀解毒汤干预BDL大鼠胆汁性肝纤维化的作用机制进行深入研究。

## 1 材料和方法

**1.1 实验材料** SD大鼠，雄性，48只，清洁级，体重(190±15) g。

主要试剂及药物：对二甲基氨基苯甲醛(P-Dimethylaminobenzal)，上海三爱思试剂有限公司；氯氨-T(Chloramines-T)，中国医药(集团)上海化学试剂公司；羟脯氨酸(HYP)标准品，日本ナカティテスク株式会社；高氯酸，分析纯，上海金鹿化工有限公司(原桃浦化工厂)。荣肝化瘀解毒汤由河南省中医院制剂室制备。小柴胡汤：日本ツムテ株式会社生产的颗粒剂（成人每日7.5 g）。

**1.2 造模及用药方法** 参照文献[4]，沿腹正中线切开，暴露胆总管，逆行向肝门部注入硬化剂，远近端结扎胆总管，中间剪断，关腹。假手术仅开腹并游离胆总管后关腹（12只）。造模1周后随机分为模型组和药物干预组（各16只），药物干预分别经口灌胃给予荣肝化瘀解毒汤流浸膏及小柴胡颗粒冲剂，灌胃剂量每天1 mL/100 g（成人日剂量的8倍），模型组大鼠给予等量生理盐水。用药4周后杀鼠取材。（实验结束时模型组、荣肝化瘀解毒汤组和小柴胡汤组分别死亡3只、1只和2只）

**1.3 常规检测方法** 用药4周结束后（即造模第5周结束），大鼠用2%戊巴比妥钠以2 mL/kg体重剂量腹腔注射麻醉后，仰卧位固定，打开腹腔，观察大体情况，肝脾的色、质、形态、体积及门静脉、肠系膜静脉、腹水情况。经下腔动脉采血，摘取肝、脾，称重后，选取肝右侧最厚一叶，切取1.0 cm×0.8 cm×

作者简介：王兵，医学博士，主治医师，主要从事慢性肝病研究。



http://www.ajutcm.com

0.3 cm 大小肝组织 2 块,10%中性福尔马林固定,自动脱水机逐级酒精脱水、二甲苯透明、包埋、4 μm 厚切片,用于 HE 及胶原染色,以观察组织的病理变化,肝组织纤维化程度,并制定肝组织胶原纤维增生程度的半定量判断标准及胶原沉积的图像定量分析。组织羟脯氨酸含量测定采用 Jamall 氏法[5]。

1.4 参考文献制定大鼠胆汁性肝纤维化程度评分标准[6] (1)门管区纤维组织:无增生"-";增生后面积占肝小叶 1/3 以下为"+";占肝小叶 1/3~2/3 为"++";占肝小叶 2/3 以上为"+++"。(2)小叶内纤维组织分布:无增多为"-";比例增多但无搭桥现象为"+";出现少数搭桥为"++";弥漫搭桥为"+++"。(3)形成假小叶的范围:无假小叶为"-";假小叶的范围占切片 1/3 以下为"+";占切片 1/3~2/3 为"++";占切片 2/3 以上为"+++"。(4)小胆管增生程度:无增生为"-";增生后面积占小叶 1/3 以下为"+";占肝小叶 1/3~2/3 为"++";占肝小叶 2/3 以上为"+++"。每个"+"记 1 分,每个标本记总分。

1.5 免疫组织化学染色(两步法) 石蜡切片常规脱蜡至水→0.3% $H_2O_2$-甲醇 37 ℃ 10 min→0.01M PBS(pH7.35~7.4)轻洗 5 min×3 次→0.1%胰蛋白酶消化,37 ℃,30 min→0.01M PBS(pH 7.35~7.4)轻洗 5 min×3 次→第一抗体→0.01M PBS(pH7.35~7.4)轻洗 5 min×3 次→Two-StepTM Anti-Mouse Detection Reagent(HRP)或 Anti-Rabbit Detection Reagent(HRP),37 ℃ 30 min→0.01M PBS(pH7.35~7.4)轻洗 5 min×3 次→DAB 显色 5 min,镜下分色→水洗→烘干,封片。PBS(pH7.4)作空白对照染色。

免疫组化图像半定量分析:采用 HPIAS-1 000 高清晰度彩色病理图文分析系统,免疫组化染色切片每组各取 3 张,随机选择 5 个不同视野,在 20×10 放大倍数下,测定计算阳性区域与标准测量窗口的面积比。

1.6 阳性染色细胞计数标准(PCNA) 每组各取 3 张免疫组化片,低倍镜(×100)下观察并确定有代表性 PCNA 染色阳性视野,后在高倍镜(×400)下每张选择 5 个视野,每个视野分别计数 PCNA 阳性胆管上皮细胞和肝细胞,最后统计结果。PCNA 阳性判定标准:以细胞核呈界限清楚的棕色反应为阳性。

1.7 统计方法 计量资料用计算机统计软件 SPSS11.5 中 ANOVA 程序进行单因素方差分析,用 LSD 程序进行两两比较。

## 2 结果

2.1 荣肝化瘀解毒汤对胆汁淤积性肝纤维化大鼠血清指标的影响 从表 1 和表 2 可以看出,模型组大鼠血清转移酶和反映胆汁淤积的指标(TBil、ALP 和 γ-GT)较假手术组显著升高($P<0.01$),血清白蛋白和白球比值显著降低($P<0.01$)。荣肝化瘀解毒汤组可显著降低血清转氨酶和反映胆汁淤积的指标($P<0.05$),但对血清白蛋白和白球比却无显著升高作用。小柴胡汤组无显著性变化($P>0.05$)。

表 1 荣肝化瘀解毒汤对胆汁淤积性肝纤维化大鼠 TBil、AST、ALT 的影响($\bar{x}\pm s$)

| 分组 | $n$ | TBil/mg·DL$^{-1}$ | AST/U·L$^{-1}$ | ALT/U·L$^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| 假手术组 | 12 | 0.26±0.14** | 128.24±14.08** | 38.55±4.26** |
| 模型组 | 9 | 5.78±3.00 | 276.77±53.60 | 106.49±31.69 |
| 荣肝化瘀解毒汤组 | 11 | 3.11±2.05* | 208.96±59.00* | 67.36±21.50* |
| 小柴胡汤组 | 10 | 4.01±3.05 | 269.66±72.49 | 97.49±46.32 |

与模型组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$。下表同。

表 2 荣肝化瘀解毒汤对胆汁淤积性肝纤维化大鼠 ALB、A/G、ALP、γ-GT 的影响($\bar{x}\pm s$)

| 分组 | $n$ | ALB(g/L) | A/G | ALP(μ/L) | γ-GT(μ/L) |
|---|---|---|---|---|---|
| 假手术组 | 12 | 26.68±2.61** | 0.88±0.11** | 326.58±94.48** | 3.01±1.82** |
| 模型组 | 8 | 15.21±3.02 | 0.31±0.07 | 595.90±144.11 | 115.94±63.15 |
| 荣肝化瘀解毒汤组 | 12 | 17.53±6.76 | 0.48±0.19 | 417.80±165.43* | 60.54±24.12* |
| 小柴胡汤组 | 10 | 15.75±6.03 | 0.41±0.21 | 571.17±151.93 | 110.52±50.63 |

2.2 荣肝化瘀解毒汤对肝组织羟脯氨酸含量的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肝组织 Hyp 含量显著增高($P<0.01$),为假手术组的 4 倍,与模型组比较,荣肝化瘀解毒汤组的肝组织 Hyp 含量显著下降($P<0.05$),小柴胡汤组无显著变化($P>0.05$)。

表 3 肝组织 Hyp 含量($\bar{x}\pm s$)

| 分组 | $n$ | Hyp/μg·g$^{-1}$ |
|---|---|---|
| 假手术组 | 12 | 125.7±25.5** |
| 模型组 | 8 | 536.2±105.6 |
| 荣肝化瘀解毒汤组 | 12 | 371.9±130.8* |
| 小柴胡汤组 | 10 | 540.4±102.3 |

2.3 组织形态及胶原纤维增生程度的变化 HE 染色显示假手术组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列。模型组(5 周)大鼠肝脏内小胆管大量增生,以汇管区为中心放射状向肝实质内延伸,增值的胆管呈花环样,胆管上皮细胞周围有肌成纤维细胞的聚集和细胞外基质的沉积;肝细胞与增生的胆小管相比明显减少,剩余肝细胞的形态结构尚正常。荣肝化瘀解毒汤组小胆管增生较模型组明显减少,剩余肝细胞量较多。模型及荣肝化瘀解毒汤组的炎症及坏死均不明显。

天狼猩红染色显示:假手术组仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维。模型组大鼠胆管大量增生,大量的细胞外基质沉积在增殖的胆管上皮细胞周围,以汇管区为中心向肝实质内延伸;肝窦内有少量的细胞外基质沉积。增生的小胆管及其周围的胶

原纤维形成间隔，与临近增生的间隔互相连接、包绕、分割，改建原来的肝小叶而形成假小叶。在胆小管增生严重的区域，已见不到大的肝细胞团块，虽然肝纤维化很严重，却见不到较典型的假小叶形成。荣肝化瘀解毒汤组小胆管增生及细胞外基质的沉积较模型组有明显的减轻。肝组织纤维化程度计分评定结果显示(见表4)，与模型组比较，荣肝化瘀解毒汤组肝组织纤维化程度显著减轻($P<0.05$)，小柴胡汤组无显著性变化($P>0.05$)。

表4　胆汁性肝纤维化程度评分结果($\bar{x}\pm s$)

| 分组 | n | 积分 |
|---|---|---|
| 假手术组 | 12 | 0** |
| 模型组 | 10 | 10.10±2.49 |
| 荣肝化瘀解毒汤组 | 10 | 6.24±2.51* |
| 小柴胡汤组 | 10 | 9.70±2.40 |

2.4　IV型胶原和层粘蛋白免疫组织化学　假手术组大鼠肝脏Col IV主要存在于大血管壁和胆管壁，肝窦壁呈连续弱阳性表达。模型组大鼠Col IV肝窦壁表达未见显著变化，但强烈表达在增殖的胆管上皮细胞周围基底膜上。荣肝化瘀解毒汤组Col IV染色明显减弱。假手术组大鼠LM仅见于血管和大胆管周围，肝窦内不明显。模型组大鼠LM明显表达于增生的胆管周围。荣肝化瘀解毒汤组LM阳性染色显著减弱。图像分析结果见表5。

表5　Col IV和LM免疫组化图象分析结果(半定量，$\bar{x}\pm s$)

| 分组 | n | Col IV (阳性面积比，%) | LM (阳性面积比，%) |
|---|---|---|---|
| 假手术组 | 3 | 0.45±0.05** | 0.60±0.12** |
| 模型组 | 3 | 8.61±0.70 | 7.63±1.36 |
| 荣肝化瘀解毒汤组 | 3 | 4.35±0.61* | 6.05±1.05* |
| 小柴胡汤组 | 3 | 8.12±0.59 | 7.01±1.06 |

2.5　各组大鼠肝组织PCNA阳性胆管上皮细胞计数的变化　与假手术组大鼠比较，模型对照组大鼠肝组织PCNA阳性胆管上皮细胞数显著增多($P<0.001$)；与模型对照组大鼠比较，荣肝化瘀解毒汤组大鼠肝组织PCNA阳性胆管上皮细胞数显著减少($P<0.05$)，小柴胡汤组无显著性变化。

表6　各组大鼠肝组织PCNA阳性胆管上皮细胞计数变化分析($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | $n$ | PCNA阳性胆管上皮细胞数(个/400倍视野) |
|---|---|---|
| 假手术组 | 3 | 0** |
| 模型组 | 3 | 10.97±1.64 |
| 荣肝化瘀解毒汤组 | 3 | 4.11±1.09* |
| 小柴胡汤组 | 3 | 10.03±1.93 |

## 3　讨论

胆汁淤积性肝纤维化模型国外多采用胆总管结扎法，该法复制的动物模型能较好地模拟人因长期胆汁淤积引起的肝纤维化疾病，且重复性好，成功率高。此模型以耳黄、爪黄、尾巴黄、小便黄甚至腹水为主要症状，后期进展为胆汁性肝纤维化。实验结果表明荣肝化瘀解毒汤明显降低血清谷草转氨酶和谷丙转氨酶的活性；明显降低反映胆汁淤积的血清总胆红素浓度，ALP和γ-GT的活性，说明荣肝化瘀解毒汤通过改善胆汁的代谢，减轻了胆汁淤积造成的肝细胞损伤。胆汁淤积造成肝纤维化的机理复杂，但是有一共同的病理特点：胆管上皮细胞的增生，胆管结扎大鼠胆汁淤积性肝纤维化尤其明显，模型组大鼠胆管大量增生，大量的细胞外基质沉积在增殖的胆管上皮细胞周围，以汇管区为中心向肝实质内延伸；肝窦内只有少量的细胞外基质沉积。免疫组织化学染色显示胶原(IV型)和糖蛋白(层粘蛋白，LM)均强烈表达在增生的胆管上皮细胞周围基底膜上。因此我们推断胆管上皮细胞增殖在胆管结扎大鼠胆汁淤积性肝纤维化形成中起重要作用。

荣肝化瘀解毒汤组小胆管增生较模型组明显减少，剩余肝细胞量较多；荣肝化瘀解毒汤明显降低肝组织羟脯氨酸含量，胆汁性肝纤维化程度评分结果显示与模型组有显著差异，免疫组化显示荣肝化瘀解毒汤组胶原(IV型)和糖蛋白(层粘蛋白，LM)的表达明显减弱，图像分析结果显示其阳性面积比也有明显差异。因此，我们认为荣肝化瘀解毒汤抑制胆管上皮细胞增殖，抑制增殖的胆管上皮细胞基底膜上细胞外基质的沉积，是其有效干预胆汁淤积性肝纤维化的重要机制之一。至于胆管上皮细胞增殖在大鼠胆汁性肝纤维化形成中的明确机制及荣肝化瘀解毒汤的干预作用的始动靶点，还有待于我们进一步研究。

**参考文献**


[1]北京中医医院．关幼波临床经验选[M].北京：人民卫生出版社，1979.127

[2]刘树农．刘树农医论选[M].上海：上海科学技术出版社，1987.292

[3]陈泽霖，宋祖敬．名医特色经验精华[M].上海：上海中医学院出版社，1989

[4]贾继东，Michael Bauer, Gabriele Boigk, et al. 大鼠结缔组织生长因子部分cDNA序列的克隆及其mRNA在实验性肝纤维化中的表达[J].中华肝脏病杂志，2000，8(2)：102

[5]Jamall IS. Asimple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues[J]. Analytical biochemistry, 1981, 112：70

[6]沈宏亮，徐冠南，陈克明等．IFNγ防治大鼠胆总管结扎所致肝纤维化的实验研究[J].第二军医大学学报，1999，20(1)：48


(收稿日期：2005-04-12)



江西中醫學院學報 Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine　http://www.ajutcm.com