

复方 991 抗肝纤汤治疗肝纤维化的机制探讨

★ 彭惠平 (浙江省昆山市中医院消化内科 昆山 215300)
★ 温扬智 (江西医学院第二附属医院中医科 南昌 330006)

摘要:目的:探讨复方 991 抗肝纤汤对大鼠肝纤维化的治疗作用及其机理。方法:以四氯化碳诱导大鼠肝损伤及肝纤维化,同时予复方 991 抗肝纤汤灌胃治疗,5 周后对肝组织病理学及波形蛋白(Vimentin)免疫组化进行观察,并测定肝组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及血清丙氨酸转移酶(ALT)、白蛋白(ALB)、透明质酸(HA)水平。结果:与模型组比较,抗肝纤汤组大鼠 ALT、HA、MDA 水平均明显降低($P < 0.01$),而 ALB 活性升高($P < 0.01$);与秋水仙碱组比较,抗肝纤汤组 HA、MDA 水平明显较低($P < 0.05$)。病理证实,抗肝纤汤组能减轻肝损伤及肝纤维化程度,减少 Vimentin 阳性细胞的表达。结论:复方 991 抗肝纤汤有良好的抗肝纤维化作用,其机制之一与抗肝细胞过氧化损伤有关。

关键词:肝纤维化;复方 991 抗肝纤汤;动物实验;中医药疗法

中图分类号:R 256.4 **文献标识码:**A

复方 991 抗肝纤汤是导师温扬智教授治疗慢性肝病的经验方,临床实践表明,该方对各种慢性肝病、肝硬化有较好疗效,本实验在此基础上,采用 CCl₄ 造成大鼠肝纤维化模型,通过血清学及肝脏病理学方法,探讨该方对大鼠肝纤维化的治疗作用及部分机理。

1 材料与方法

1.1 实验药物及试剂 复方 991 抗肝纤汤由酒大黄、黄芪、丹参、赤芍、桃仁等组成,由江西中医学院附属医院制剂中心提供,含生药 0.58 g/mL。秋水仙碱,云南西双版纳制药厂出品,以蒸馏水配成 1 mg/100mL 的浓度。四氯化碳(CCl₄)分析纯,上海菲达有限公司生产,批号 20000510,用纯花生油配成 40% 的油剂。

1.2 动物选择与分组 普通级 SD 大鼠 46 只,体重 150~180 g,雌雄各半,分笼饲养,由江西医学院动物科学部提供。按性别随机分成 4 组,各组均雌雄各半。A 组(正常对照组)10 只,同等条件下喂养,不造模,不给药。B 组(模型组)12 只,各鼠予 2 mL 蒸馏水灌胃,每日 1 次。C 组(秋水仙碱组)12 只,每日以 0.01 mg/100g(1mL/100g)灌胃。D 组(991 抗肝纤汤组)12 只,每日以 1.5 mL/100g 灌胃。

1.3 造模与用药 分组完成后,第一周先普通饲养 4 天,再分别按要求灌胃给药 3 天,第二周开始和造模。除正常组外,其余各组均首次皮下注射 40% CCl₄ 花生油 0.4 mL/100g 体重,以后每次皮下注射量为 0.3 mL/100g 体重,每周 2 次(周二上午、周五下午),连续 5 周。期间,各组均继续按要求每日灌胃给药 1 次,并喂以普通饲料,末次注射后 3 天处死大鼠,由心尖部刺入采血,分离血清备测,取肝左叶做病理切片及 MDA、SOD 等测定。

1.4 观察指标 (1)采用全自动生化分析仪常规法检测 ALT、ALB 水平。放射免疫法测定透明质酸(HA)水平,试剂盒购自上海海军医学研究所。

(2)肝组织 MDA、SOD 活性检测均采用南京建成生物工程研究所检测试剂盒,严格按试剂盒说明书方法操作。

(3)取肝左叶组织,10% 甲醛固定分别行 HE 染色及波形蛋白(Vimentin)免疫组化。Vimentin 免疫组化染色采用 SP 法,DAB 显色,小鼠抗人和大鼠 Vimentin 抗体及即用型 SABC(小鼠 IgG)试剂购自福建华美公司,采用北航图像中心病理图文管理系统 4.0 进行图像分析,自动检测阳性细胞面密度,每一玻片任选 5 个视野取其平均值进行统计学分析。

1.5 统计方法 用 SPSS 10.0 软件软件进行资料的分析处理,数据用描述,显著性分析采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 一般情况 造模期间,正常对照组大鼠体形肥硕,毛发光泽,活动正常,实验结束时平均体重达 360.8 g;模型组食量明显减少,体形瘦小,毛枯无泽,部分脱毛,其中死亡 4 只,平均体重 311.7 g;秋水仙碱组死亡 2 只,复方 991 抗肝纤汤组未出现死亡,一般情况均较模型组轻。

2.2 肝功能情况 见表 1。

表 1 各组大鼠肝功能比较

组别	n	ALT / U·L ⁻¹	ALB / g·L ⁻¹
A	10	48.0 ± 9.33	5.0 ± 4.4
B	8	145.8 ± 32.3 [#]	27.0 ± 3.5 [#]
C	10	88.3 ± 17.9 ^{* #}	31.8 ± 3.7 ^{* #}
D	12	84.8 ± 20.0 ^{* #}	32.2 ± 4.0 ^{* #}

注:与模型组比较 * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$;与正常组比较 # P

< 0.01。

2.3 各组大鼠血清透明质酸(HA)水平比较 见表2。

表2 各组大鼠血清 HA 水平比较

组别	n	HA/g·L ⁻¹
A	10	287.1±31.8
B	8	631.3±63.8 [#]
C	10	504.5±47.4 ^{*#}
D	12	456.7±40.5 ^{*#△}

注:两治疗组比较 $\Delta P < 0.05$ 。

2.4 对氧自由基的影响 见表3。

表3 各组大鼠肝组织 MDA、SOD 活性比较

组别	n	MDA/nmol·mg ⁻¹	SOD/NU·mL ⁻¹
A	10	1.3351±0.6408	175.2019±5.0343
B	8	2.8592±0.7515 [#]	164.3028±7.2321 [#]
C	10	2.3261±0.8607 [#]	173.5440±8.7574 ^{*#}
D	12	1.6221±0.5534 ^{*#△}	173.8110±7.4254 ^{*#}

表3显示991抗肝纤汤能显著降低纤维化大鼠肝组织的MDA水平。

2.5 肝组织病理学变化与免疫组织化学图像分析 HE染色显示正常肝脏细胞多呈单核,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,门脉区不增宽。模型组大鼠肝组织病理损害严重,正常结构破坏,肝索排列紊乱,可见明显肝细胞浊肿、坏死和脂肪变性,有些小叶结构紊乱,纤维组织增生明显,并向周围延伸,有的包绕整个肝小叶。两治疗组病理改变程度介于正常组和模型组之间,仅见不同程度得肝细胞浊肿、脂肪变性和纤维增生。

肝星状细胞(HSC)表达波形蛋白(Vimentin),波形蛋白免疫组化是一种较好的肝星状细胞显示方法^[1]。波形蛋白免疫组化结果见表4。

表4 各组大鼠肝组织 Vimentin 免疫组化观察

组别	n	Vimentin 阳性灶面积/mm ² ·cm ⁻²
A	10	2.48±0.78
B	8	7.35±1.45 [#]
C	10	6.91±1.534 [#]
D	12	5.48±0.9 ^{*#△}

免疫组化Vimentin阳性的HSC呈棕黄色,正常组可见少量Vimentin阳性的HSC分布于肝窦;模型组及秋水仙碱组阳性细胞增多,主要分布于纤维沉积部且体积肥大,可见到片状或条索状排列。复方991抗肝纤汤组阳性细胞虽也增生,但较模型组为轻,其程度介于正常组和模型组之间,偶见线状或条索状分布。

3 讨论

肝纤维化是多种慢性肝病发展至肝硬化的必由之路。中医临床观察显示,患者在向肝纤维化、肝硬化发展过程中,往往表现为正虚邪恋,缠绵难愈,正气亏损,瘀血内结之象。

近年的研究认为,血瘀证的程度与肝纤维化之间呈相关关系,血瘀证存在于慢性肝病的整个过程^[2]。张赤志等报道,慢性肝炎和肝硬变,肝组织学的碎样坏死、桥状坏死和界板破坏(均系形成肝纤维化的基本病理特征)者,血瘀组明显高于非血瘀组,肝功能的损害与血瘀呈正相关^[3]。据此,国内许多学者在四氯化碳造成大鼠肝纤维化或免疫性肝纤维化的动物模型实验研究中,证明益气活血剂有抗肝纤维化的作用。导师温扬智教授经验方复方991抗肝纤汤是在中医辨证论治的指导下,结合现代医学认识,应用辨证与辨病相结合,并通过不断的临床实践总结出来的有效方剂。该方立足于肝纤维化“瘀”与“虚”两大特点,扶正与化瘀并举,由酒大黄、丹参、赤芍、黄芪、桃仁等17味中药组成,共奏益气活血化瘀,理气健脾,养血柔肝之功。

HA是监测肝纤维化变化的有用指标,可取代反复肝活检,也是一个判断抗肝纤维化药物疗效的理想指标^[4]。在我们的实验中,两治疗组HA水平于模型组相比较均显著降低($P < 0.01$),并且991抗肝纤汤组明显优于秋水仙碱组($P < 0.05$)。HE染色也显示991抗肝纤汤能降低大鼠肝纤维化程度,减轻肝细胞损伤。表明991抗肝纤汤对肝纤维化有良好的治疗作用。HSC的激活是肝纤维化形成的关键步骤,激活的HSC是产生包括胶原在内的细胞外基质(ECM)的主要细胞^[5]。脂质过氧化损伤与肝纤维化的形成密切相关,脂质过氧化的主要降解产物MDA早于肝细胞坏死及炎症出现,可直接刺激HSC活化及胶原基因表达^[6]。我们的研究表明,991抗肝纤汤具有抗肝细胞过氧化损伤,减少MDA生成的作用,进而抑制Vimentin阳性的HSC的增殖及ECM合成,阻抑肝纤维化的发展和形成。

参考文献

- [1]杜卓明主编.实用组织学技术.第二版[M].北京:人民卫生出版社,1998.188~189
- [2]刑练军,张伟,王奕,等.活血化瘀法对慢性病毒性肝炎患者血清中HA,CG变化的探讨[J].中国中西医结合脾胃杂志,1996,4(4):214~215
- [3]张赤志,吴寿善,罗欣拉.肝病血瘀症临床病理学特点和肝功能变化[J].中国中西结合杂志,1992,12(4):210~217
- [4]Murawaki Y, Ikuta Y, Kodo M, et al. Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1996, 11:459~465
- [5]Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy[J]. J Gastroenterol, 1997, 32:424~430
- [6]Bronk E, O'Neil R, Higashikubo R. Activated of hepatic stellate cells in vitro is associated with increased intracellular levels of praoxidants [J]. Hepatology, 1999, 30(4pt2):1 309~1 315

(收稿日期:2005-11-17)