

• 实验研究 •

消黄方对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝硬化的干预作用

刘 成 陈晓蓉* 杨宗国 陆云飞

上海市公共卫生临床中心, 国家中医药管理局中医药防治传染病

重点实验室临床基地, 上海市金山区漕廊公路 2901 号, 201508

基金项目: “十一五”国家重大科技专项资助项目(2009ZX10005-019); 上海市科学技术委员会资助项目(25382);

上海市科学技术委员会引导类项目(10411963000); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(10F115)

* 通讯作者: xiaorong3chen@yahoo.com.cn, (021)37990333 转 3289

[摘要] 目的 探讨消黄方对进展期二甲基亚硝胺(DMN)诱导大鼠肝硬化的干预作用。方法 Wistar 雄性大鼠 34 只, 随机分为正常组(10 只)和模型组(24 只)。腹腔注射 DMN 4 周制备肝硬化模型。造模 2 周末取正常和模型大鼠各 3 只做药前观察, 其余模型大鼠随机分为消黄方组、三氯化钆组和模型对照组(各 7 只); 消黄方组于继续造模同时每天给予消黄方煎出液灌胃 2 周; 三氯化钆组予三氯化钆每周 2 次(7mg/kg)尾静脉注射。4 周末处死全部大鼠。观察大鼠的死亡情况、体重、肝脏大体形态、肝功能、肝脏及脾脏重量、肝脏组织学变化等。结果 DMN 造模 2 周, 大鼠肝脏呈现明显的纤维化, 造模 4 周大鼠肝硬化形成。与正常组相比, 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)活性及总胆红素(TBiL)含量随造模时间呈梯形增加; 而血清总蛋白(TP)和白蛋白(Alb)含量随模型进展逐渐降低; 4 周时与模型对照组相比, 消黄方组显著降低血清 ALT、AST、ALP 活性及 TBiL 含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 显著提高血清 TP 及 ALB 含量($P < 0.01$)。消黄方显著改善肝组织病理和胶原染色, 三氯化钆无此显著作用。结论 具有清热利湿、活血化瘀功用的消黄方显著干预 DMN 诱导大鼠肝硬化形成。

[关键词] 消黄方; 二甲基亚硝胺; 肝硬化

Effect of Xiaohuang Decoction on Liver Cirrhosis Rats Induced by Dimethylnitrosamine

LIU Cheng, CHEN Xiaorong, YANG Zongguo, LU Yunfei

(Clinical Center of Shanghai Public Health, Shanghai 201508)

ABSTRACT Objective To study the effect of Xiaohuang Decoction (Decoction to abate jaundice) on liver cirrhosis rats induced by dimethylnitrosamine (DMN). **Methods** Thirty-four male Wistar rats were randomized into normal group ($n=10$) and DMN model group ($n=24$). The liver cirrhosis models were established by intraperitoneally injecting DMN. After 2 weeks, 3 rats were selected for observation from the normal group and the model group respectively. The remaining model rats were randomized into Xiaohuang Decoction group, Gadolinium chloride (GdCl₃) group and model control group, with 7 in each. Each group was given DMN for another 2 weeks. Xiaohuang Decoction and GdCl₃ was given to Xiaohuang Decoction group by gastric perfusion, and GdCl₃ (7mg/kg) was given to the GdCl₃ group by tail vein injection twice per week. All rats were executed after 4 weeks. The death condition, body weight, liver morphous, liver function the weight of liver and spleen and the histological change of hepatic issue were observed. **Results** The liver fibrosis and cirrhosis occurred respectively after 2 weeks and 4 weeks of modeling. Comparing with the normal group, the contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and total bilirubin (TBiL) increased significantly in the model group, but the contents of total serum protein (TP) and albumn (Alb) decreased significantly. At the end of the 4th week, the contents of ALT, AST, ALP and TBiL decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in Xiaohuang Decoction group, but the contents of TP and Alb increased significantly ($P < 0.01$) as compared with the model control group. Xiaohuang Decoction could obviously improve the histopathology and collagen dyeing change of the hepatic tissue. But GdCl₃ did not have the significant effect as compared with Xiaohuang Decoction. **Conclusion** Xiaohuang Decoction is significantly effective for DMN induced liver cirrhosis in rats with clearing heat, dis-inhibiting dampness, quickening the blood and transforming stasis.

Keywords Xiaohuang Decoction (Decoction to abate jaundice); dimethylnitrosamine; liver cirrhosis

肝纤维化是指各种致病因子致肝内结缔组织异常增生, 肝内细胞外基质过度沉积的病理过程, 是慢

性肝病向肝硬化发展的必经之路^[1-3], 阻断、减轻乃至逆转肝纤维化, 从而阻止肝硬化形成是改善慢性

肝病预后的治疗目标之一。近年来,中医药治疗肝硬化显示出明显的优势^[4-5],明确了湿热内蕴、瘀血阻络是肝硬化主要病机之一。基于以上认识,本研究以二甲基亚硝胺(DMN)诱导的大鼠肝纤维化为载体,以巨噬细胞阻断剂三氯化钆作对照,探讨具有清热利湿兼活血化瘀功用的消黄方对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝硬化的干预效果。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar 雄性大鼠 34 只,清洁级,体重(180±20)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,生产许可证号:SCXK(沪)2007-0006。上海市公共卫生临床中心实验动物中心恒温饲养,自由饮食。

1.2 药物与试剂

消黄方由茵陈 2.4kg、赤芍 1.2kg、栀子 1.2kg、茯苓 1.2kg、甘草 0.8kg 组成,所含生药均购自上海华宇药业有限公司,由上海中医药大学中药制剂中心一次制备干燥(1.124kg)后冷藏。每克药粉含 6.05g 生药。三氯化钆购自美国 Sigma-Aldrich 公司(Cat:13450-84)。DMN 购自日本公司(Cat:149-05882)。

1.3 肝硬化模型制备

大鼠肝硬化模型制备参照 Ala-Kokko 方法^[6]。模型组大鼠以 10mg/kg 剂量于每周前 3 天连续腹腔注射 0.5% DMN 溶液(以生理盐水稀释),共 4 周,正常组大鼠腹腔注射等量的生理盐水。

1.4 分组与给药

随机取 10 只大鼠作为正常组,24 只大鼠造模,造模 2 周末取正常和造模大鼠各 3 只作药前观察,21 只模型大鼠随机分为模型组、消黄方组和三氯化钆组,每组 7 只。消黄方组于继续造模的同时按成人(65kg)体重用量的 8 倍,以 10ml/kg 大鼠体重的容量灌胃给药,每日 1 次,连续 2 周;三氯化钆组于继续造模的同时每周 2 次^[7](每次间隔 2 天)按照 7mg/kg 剂量经尾静脉注射 2 周。

1.5 样品采集和处理

实验 4 周末处死全部大鼠,用 7%水合氯醛腹腔注射麻醉后,仰卧位固定,打开腹腔,观察肝脾的色、质、形态等情况。经下腔静脉采血,静置 1h 后,3000r/min 离心 15min,分离血清,检测肝功能指标。摘取肝脾,称重,自肝右叶切取 1.0cm×0.8cm×0.3cm 肝组织 1 块,10%中性甲醛固定,脱水、包埋。

1.6 观察指标

1.6.1 一般情况 包括大鼠的死亡情况,体重、肝脏大体形态、肝脏及脾脏重量等。计算肝、脾脏器指数。脏器指数=脏器重量/体重(%)。

1.6.2 肝组织 HE 及天狼星红染色观察肝脏组织学变化 肝组织胶原纤维增生程度分期分级采用 ScheuerP 分级^[8]。0 期:正常肝脏,无明显胶原纤维增生;Ⅰ期:胶原纤维增生,中央静脉和门脉区有少量星状胶原纤维束放散,但无间隔形成;Ⅱ期:胶原纤维增生,中央静脉和门脉区结缔组织变厚,由此向四周伸出纤维索,形成不完全间隔;Ⅲ期:胶原纤维大量增生,有个别菲薄的完全间隔形成,或较厚的不完全间隔即将形成假小叶;Ⅳ期:完全纤维间隔,假小叶形成。

1.6.3 血清肝功能检测 包括血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)活性、血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)水平,均由上海市公共卫生临床中心检验科检测。

1.7 统计学方法

计量资料以 SPSS 18.0 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析,等级资料采用 Ridit 分析。

2 结果

造模第 4 周时,模型组死亡 2 只,三氯化钆组死亡 1 只,消黄方组大鼠无死亡。

2.1 各组大鼠体重、肝重等指标比较

与正常大鼠比较,造模 1 周后大鼠体重增长速度明显减缓,表 1 示,4 周模型组肝脏指数显著低于正常组大鼠($P<0.01$);脾脏指数显著增加($P<0.01$);与 4 周模型组相比,消黄方可以显著增加大鼠体重、肝重及肝脏指数($P<0.01$);但消黄方对大鼠脾重及脾脏指数改善不明显。三氯化钆组大鼠体重显著低于模型组大鼠($P<0.05$),三氯化钆对大鼠脾重及脾脏指数作用明显,其脾重($P<0.01$)及脾脏指数($P<0.05$)显著低于模型组大鼠。对肝脏及肝脏指数无改善作用。

2.2 各组大鼠肝脾色、质观察

正常大鼠肝脏表面光滑,红润柔软;造模 2 周大鼠肝脏充血、色泽暗红,肿胀明显,4 周模型组大鼠肝脏明显缩小,质地变韧,呈暗红色,表面颗粒感强;脾脏明显增大,功能亢进,形成巨脾。与 4 周模型组大鼠比较,消黄方组大鼠肝脏表面较为光滑,色泽较红润。三氯化钆组对肝脏改善不明显。

表 1 各组大鼠体重、肝重、脾重、肝脏指数、脾脏指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	肝重(g)	肝脏指数(%)	脾重(g)	脾脏指数(‰)
2 周正常组	3	199.33±9.45	6.81±0.61	3.43±0.45	0.54±0.11	2.73±0.64
2 周模型组	3	180.33±0.55	7.67±0.27	4.25±0.26 [△]	0.77±0.06	4.25±0.33 [△]
4 周模型组	5	201.50±17.81 ^{△△}	5.92±1.64 ^{△△}	2.90±0.70 ^{△△}	1.38±0.30 ^{△△}	6.79±0.99 ^{△△}
消黄方组	7	219.30±35.98 ^{**}	8.33±1.36 ^{**}	3.59±0.59 ^{**}	1.50±0.15	6.48±0.77
三氯化钆组	6	183.5±13.99 [*]	4.73±0.41	2.58±0.09	1.10±0.08 ^{**}	5.82±0.35 [*]

注:与 4 周模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与正常组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

表 2 各组大鼠肝功能比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/100ml)	TP(g/L)	ALB(g/L)	TBiL(μ mol/L)
正常组	10	27.14±5.98	56.14±2.26	226.71±24.7	57.60±1.98	29.16±1.10	2.40±0.08
2 周模型组	3	50.67±17.10 ^{*△}	136.00±26.05 ^{**△△}	383.00±72.34 ^{**△△}	48.53±4.56 ^{**△△}	26.33±1.18 ^{△△}	3.30±0.17 [△]
4 周模型组	5	123.20±18.2 [*]	312.40±73.04 ^{**}	608.80±97.91 ^{**}	35.96±8.55 ^{**}	20.52±3.78 ^{**}	34.18±20.62 ^{**}
消黄方组	7	90.00±18.8 [△]	148.00±45.12 [△]	366.70±76.95 ^{△△}	46.81±3.04 ^{△△}	24.95±1.33 ^{△△}	11.71±5.64 [△]
三氯化钆组	6	110.10±76.70	515.00±291.00 [△]	503.80±123.34	41.56±9.15	22.00±4.63	56.60±36.70 [△]

注:与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 4 周模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

2.3 各组大鼠肝功能比较

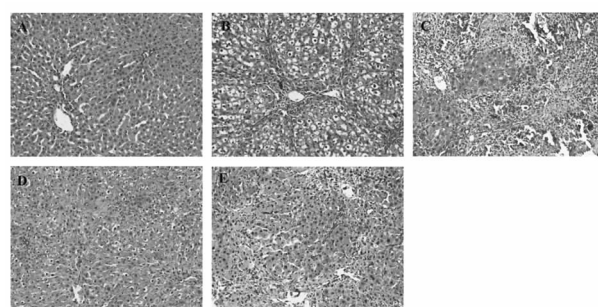
表 2 示,与正常组比较,2 周模型组大鼠的血清 ALT、AST、ALP 活性显著增高($P<0.05$ 或($P<0.01$),血清 TP 含量显著降低($P<0.01$);血清 TBiL 含量升高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。造模 4 周时各项指标进一步增高或降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与 4 周模型组比较,消黄方组血清 ALT、AST、ALP 活性和 TBiL 含量均显著下降($P<0.05$),TP 及 ALB 含量显著的升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。三氯化钆对肝功能基本无改善作用。

2.4 各组大鼠病理组织学比较

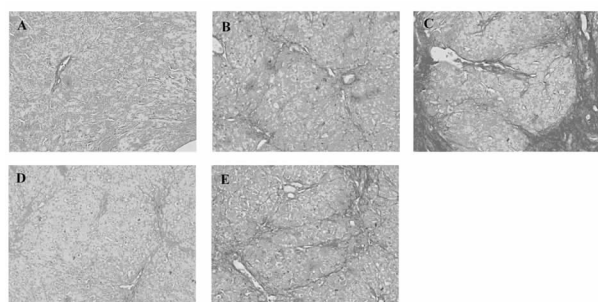
2.4.1 各组大鼠 HE 染色 图 1 示,正常大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列,汇管区可见极少量纤维结缔组织。与正常大鼠比较,造模 2 周模型大鼠肝细胞肿胀,呈水样变,肝细胞出现较明显的空泡样脂肪变;汇管区及肝小叶之间开始有大量炎性细胞浸润,中央静脉开始偏离肝小叶中央。造模 4 周时见广泛的肝细胞水肿和脂肪变,伴大量炎性细胞浸润,浸润的炎性细胞不断破坏肝小叶,并伴随广泛增生的纤维组织,把正常的肝小叶分割、包绕形成大小不等的假小叶。消黄方对肝细胞变性、炎性浸润、出血、纤维增生都有不同程度的改善,其中对纤维增生及炎症改善最为显著。

2.4.2 各组大鼠天狼星红染色 图 2 示,正常大鼠肝组织仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维。造模 2 周时胶原纤维广泛增生并从汇管区向肝小叶内伸展,可见部分菲薄的不完全间隔形成;造模 4 周时,胶原增生更加明显,在小叶间形成粗大的纤维,

弥漫性增生的胶原纤维分割肝小叶形成较粗大的完全间隔,并向肝小叶内延伸、分割,正常肝小叶结构消失,形成假小叶。消黄方组大鼠胶原纤维增生明显减轻,纤维间隔较窄、疏松、不连续;三氯化钆对改善粗大的纤维有一定的作用。表 3 示,肝组织胶原增生程度,消黄方组与 4 周模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

图 1 各组大鼠肝脏组织病理观察(HE 染色, $\times 100$)

注:A. 正常组;B. 2 周模型组;C. 4 周模型组;D. 消黄方组;E. 三氯化钆组

图 2 各组大鼠肝组织胶原纤维增生观察
(天狼星红染色, $\times 100$)

注:A. 正常组;B. 2 周模型组;C. 4 周模型组;D. 消黄方组;E. 三氯化钆组

表 3 各组大鼠肝脏胶原增生程度分期

组别	鼠数	0 期	I 期	II 期	III 期	IV 期	Radit 值
正常组	10	10	0	0	0	0	0.161
2 周模型组	3	0	0	2	1	0	0.468*
4 周模型组	5	0	0	0	1	4	0.803**
消黄方组	7	0	0	3	3	1	0.433△
三氯化钆	6	0	0	1	1	4	0.769

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 4 周模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

3 讨论

DMN 诱导大鼠肝纤维化、肝硬化是国际上公认的经典方法^[9]。造模 2 周的大鼠肝脏充血、肿胀,脾脏肿大明显。肝组织病理变化表现为小叶中心性出血性坏死,肝小叶周围炎细胞浸润,间质细胞大量增生,有菲薄的纤维间隔形成。肝功能显著异常,ALT、AST、ALP 等指标显著升高,TP 和 ALB 下降明显。DMN 造模 4 周时大鼠肝脏较正常大鼠肝脏显著的缩小,重量减轻,颗粒样的结节明显,脾脏肿大,巨脾形成,肝功能损害显著加重,肝组织结构紊乱、纤维化快速进展,模型大鼠已形成肝硬化,与文献报道^[10]一致。

我院中医科陈晓蓉主任在临床经验的基础上,以茵陈蒿汤去大黄,加入赤芍、茯苓、佐以甘草调和诸药,拟定消黄方,全方配伍得当,主要用于各种慢性肝炎引起的难治性黄疸和肝硬化^[11-12]。本研究提示,消黄方可显著抑制模型大鼠体重的下降,增加肝重及肝脏指数。对肝功能的改善也非常的明显,可以显著降低 ALT 活性,对 AST、ALP 及 TP、ALB 及 TBil 的改善作用基本达到 2 周水平。肝组织病理损害也显著减轻,纤维化程度得到遏制。此时期 DMN 诱导的肝细胞坏死和脂肪变,炎症反应及纤维增生是促进纤维化快速发展的病理因素,提示减轻肝细胞坏死和脂肪变、炎症反应和纤维增生是消黄方发挥作用的生物学基础,也说明消黄方是通过多途径、多层次发挥治疗作用的。

既往研究表明,巨噬细胞和炎症是 DMN 诱导肝硬化主要的病理学基础^[13],然而我们用巨噬细胞阻断剂三氯化钆做对照,发现三氯化钆显著降低脾重和脾脏指数,但对大鼠体重、肝重、及肝脏指数没有改善甚至还有降低作用。三氯化钆对肝功能 ALP 活性有显著的降低作用,对其他指标基本无显著作用。与国外报道三氯化钆显著改善大鼠肝硬化报道^[7,14]不一致,分析原因可能是造模方法和给药时间不同。同时也提示,单因素靶点阻断可能不能作为肝硬化治疗的策略,联合用药或多靶点阻断可能是一个较为可行的方法。与三氯化钆不同,具有

清热利湿兼活血化瘀的消黄方能降低死亡率、改善肝功能及组织病理,对 DMN 肝硬化效果显著,不仅仅对单一靶点有抑制作用,而是通过对整体的、多途径改善来实现的。

参考文献

- [1] Patsenker E, Popov Y, Stickel F, et al. Pharmacological inhibition of integrin alphavbeta3 aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis[J]. Hepatology, 2009,50(5):1501-1511.
- [2] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annu Rev Pathol, 2011,6:425-456.
- [3] Thomas JA, Pope C, Wojtacha D, et al. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function[J]. Hepatology, 2011,53(6):2003-2015.
- [4] 陆雄,刘平,刘成海,等.扶正化瘀方促进二甲基亚硝胺肝纤维化大鼠肝窦毛细血管化逆转作用的实验研究[J]. 中医杂志,2003,44(2):136-139.
- [5] 刘为民,姚乃礼.络病理论与肝纤维化关系探讨[J]. 中医杂志,2003,44(2):85-87.
- [6] Ala-Kokko L, Pilajaniemi T, Myers J, et al. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethyltetrosamine in the rat[J]. Biochem J, 1987;244(1):75-79.
- [7] Sakaida I, Hironaka K, Terai S, et al. Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells[J]. Life Sci, 2003,72(8):943-959.
- [8] Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment[J]. J Hepatol, 1991,13(3):372-374.
- [9] Lin HJ, Chen JY, Lin CF, et al. Hepatoprotective effects of Yi Guan Jian, an herbal medicine, in rats with dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3):953-960.
- [10] Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats[J]. Nat Med, 1999,5(2):226-230.
- [11] 陆云飞,慕永平,陈晓蓉.消黄方对异硫氰酸-α-萘酯诱导大鼠急性肝的干预作用研究[J]. 甘肃中医, 2009, 22(8):68-71.
- [12] 陆云飞,陈晓蓉,慕永平,等.消黄方联合西药治疗难治性黄疸 51 例临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(5):60-62.
- [13] Liu C, Tao Q, Sun M, et al. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats[J]. Lab Invest, 2010,90(12):1805-1816.
- [14] Ide M, Kuwamura M, Kotani T, et al. Effects of gadolinium chloride (GdCl₃) on the appearance of macrophage populations and fibrogenesis in thioacetamide-induced rat hepatic lesions[J]. J Comp Pathol, 2005,133(2-3):92-102.

(收稿日期:2011-05-25;修回日期:2011-10-09)

[编辑:行 之]