

扶正化痰方抗CCl₄大鼠肝纤维化作用与抗脂质过氧化

□ 胡义扬 刘成 刘平 顾宏图 季光 王晓玲

Anti-fibrosis and anti-peroxidation of lipid effects of Fuzhenghuayu decoction on rat liver induced by CCl₄

HU Yi-Yang, LIU Cheng, LIU Ping, GU Hong-Tu, JI Guang and WANG Xiao-Ling

Liver Diseases Research Center, Shanghai Academy of TCM, Shanghai 200032, China

Subject headings Liver cirrhosis/zhong yi yao liao fa
Huo xue qu yu yao ji/therapeutic use Lipid peroxides/
metabolism

Abstract

AIM To study the anti-fibrosis effects and mechanisms of Fuzhenghuayu Decoction (319 formula) on rat liver.

METHODS The carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis rat models were used. The animals were divided into 3 groups and administered with 319 formula, Colchicine and d. d. w. for 6 weeks, respectively. Liver samples were analyzed histopathologically, hydroxyproline (Hyp), malondialdehyde (MDA) level and superoxide dismutase (SOD) activities were observed. Serum samples were analyzed for ALT, AST activities and albumin contents.

RESULTS Compared with the controls, in the 319 formula and colchicine groups, AST activities attenuated (u/L, 99.5 ± 24.7, 100.6 ± 24.9 vs 134.5 ± 37.4, P < 0.05), albumin contents increased (g/L, 29.6 ± 1.3, 28.9 ± 1.9 vs 26.8 ± 2.2, P < 0.01, P < 0.05), Hyp level decreased (μg/g liver, 172.6 ± 37.5, 190.2 ± 30.6 vs 241.4 ± 47.9, P < 0.01), hepatic fibrosis and adiposis degree were alleviated markedly. In the 319 formula group, the SOD activities remained normal and the MDA contents were obviously lower than in the control group (nmol/g liver, 273.8 ± 48.2 vs 329.2 ± 67.9, P < 0.05). There was a close relationship between liver Hyp level and liver MDA contents (r = 0.779, P < 0.01).

CONCLUSION Chinese medicine 319 formula has remarkable preventive effects on hepatic fibrosis of rats induced by CCl₄ and anti-peroxidation of lipid is one of the mechanisms.

主题词 肝硬变/中医药疗法 活血化痰药[剂]/治疗应用 过氧化脂质类/代谢

中国图书资料分类号 R 575.2

摘要

目的 探讨扶正化痰方(319方)抗肝纤维化作用机理。

方法 采用 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化模型,分为模型组、秋水仙碱组及 319 方组,分别在造模期间每日灌胃给药 6 周,观测肝脏的病理变化,肝组织羟脯氨酸(Hyp)、丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性以及血清中 ALT、AST 活性和白蛋白含量。

结果 较之模型组,319 方组和秋水仙碱组的血清 AST 活性低(u/L, 99.5 ± 24.7, 100.6 ± 24.9 vs 134.5 ± 37.4, P < 0.05), Alb 含量高(g/L, 29.6 ± 1.3, 28.9 ± 1.9 vs 26.8 ± 2.2, 分别 P < 0.01, P < 0.05), 肝组织 Hyp 含量低(μg/g 肝, 172.6 ± 37.5, 190.2 ± 30.6 vs 241.4 ± 47.9, P < 0.01), 肝脏脂肪变性和纤维增生程度均显著减轻; 319 方组的肝组织 SOD 活性维持正常水平,而 MDA 含量显著低于模型组(nmol/g 肝, 273.8 ± 48.2 vs 329.2 ± 67.9, P < 0.05); 肝组织 MDA 含量与 Hyp 含量之间有非常显著的相关性(r = 0.779, P < 0.01)。

结论 中药 319 方对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化有显著抑制作用;抗脂质过氧化是 319 方抗肝纤维化的作用机理之一。

上海市中医药研究院肝病研究中心 200032

扶正化痰方(319方)由丹参、虫草菌丝、桃仁等组成,既往研究表明该方对肝炎后肝硬变及实验性肝纤维化有良好的防治作用^[1,2],本研究以秋水仙碱为对照,验证扶正化痰方抗 CCl₄ 大鼠肝纤维化的效果,同时探讨该方的抗脂质过氧化作用及其与抗肝纤维化的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 319 方,由上海中华制药厂中心实验室协助制成流浸膏,每克折合生药 8.16 g。

秋水仙碱(Colchicine) Serva 公司产品进口分装。

四氯化碳(CCl₄),分析纯,宜兴化学试剂三厂产品,批号:920901。胆固醇(Cholesterol),分析纯,广州化学试剂公司进口分装,批号 890320 -

9。动物 Wistar 大鼠,SPF 级,体重 181 g ± 18 g,购于中国科学院上海实验动物中心。

1.2 方法 首次于大鼠皮下注射 CCl₄ 5 ml · kg⁻¹,以后每周 2 次皮下注射 40% CCl₄ - 橄榄油 3 ml · kg⁻¹,共 6 周。另外,在第 1 周 ~ 2 周予 20% 猪油加 0.5% 胆固醇的玉米粉饲料,第 3 ~ 6 周予单纯玉米粉饲料。大鼠 44 只,均单居饲养,其中 8 只用于正常组,另 36 只在造模之日起随机分 3 组,并开始灌胃治疗 6 周,其中模型组,蒸馏水 10 ml · kg⁻¹ · d⁻¹;秋水仙碱组,药物浓度 10 mg/L, 10 ml · kg⁻¹ · d⁻¹;319 方组,药物浓度 460 g/L, 10 ml · kg⁻¹ · d⁻¹。各组用药周期完成后,乙醚麻醉下开腹,经下腔静脉采血,其后从肝左叶取病理标本置于中性缓冲液加福尔马林和 2% 戊二醛溶液内固定,其余部分肝组织 - 70℃ 冰冻保存,分别观测:血清 ALT 活性及 AST 活性,赖氏法;血清白蛋白(Albumin, Alb)含量测定,溴甲酚绿法;肝组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,南京建成生物工程研究所生产的生化药盒测定;肝组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,南京建成生物工程研究所生产的生化药盒测定,活性单位以 NU(亚硝酸盐单位)/mg 计;肝组织羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)含量,Jamall 法^[3]测定。病理学观察:分别作 HE 染色及胶原纤维染色(武兆发改良的 Mallory 法)。在光镜下,观察肝脏组织、细胞的病理变化,并参照有关文献^[4,5]制定病理观察积分标准。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST 活性及 Alb 含量 模型组 ALT 及 AST 活性显著升高,其中 ALT 上升近 3.5

倍,而 Alb 含量显著下降,表明该模型动物的肝损伤明显. 319 方组和秋水仙碱组血清 Alb 含量下降幅度较模型组小 ($P < 0.001, P < 0.05$),且 319 方组与正常组无显著性差异. 在 ALT 方面,均有不同程度低于模型组的趋势;在 AST 活性方面,319 方组与秋水仙碱组同等水平,均显著低于模型组 ($P < 0.05$). 见表 1.

2.2 肝组织病理变化 HE 染色观察:模型组动物正常肝小叶结构破坏,肝索排列紊乱,肝细胞水肿明显,脂肪变性广泛,汇管区结缔组织有不同程度增生,肝组织中有少量炎细胞浸润. 两药物组肝组织中仍可见到少量炎细胞浸润,但肝小叶结构破坏明显减轻,肝细胞水肿,脂肪变性的程度显著轻于模型组,汇管区结缔组织增生不明显. 胶原纤维染色:模型组动物的肝脏内主要由胶原纤维构成的纤维间隔正在形成或已经形成,其破坏界板,分割、包绕肝小叶,其中 1 例已见有较多完整的假小叶. 两药物组肝内胶原纤维增生均减轻(表 2).

2.3 肝组织 Hyp 和 MDA 含量及 SOD 活性 经 6 周病理刺激后,模型组肝组织 Hyp 含量显著上升,均值为正常组的 2.1 倍. 而两药物组皆显著低于模型组,并以 319 方组更为显著. 同时,模型组肝组织 MDA 含量大幅度增加,近正常组的 3 倍,秋水仙碱组与之相似,而 319 方组则显著低于模型组 ($P < 0.05$). 在肝组织 SOD 活性方面,秋水仙碱组仍和模型组一样显著下降,而 319 方组的 SOD 活性在正常组的水平,显著高于模型组与秋水仙碱组(表 3). 以未经药物治疗的两组(正常组及模型组共 20 例),进行 MDA 含量与 Hyp 含量之间的相关性分析,其 $r = 0.779, P < 0.001$,即两者间有非常显著的相关性,其线性回归方程为 $Y = 76.7 \pm 0.47X$.

表 1 血清 ALT、AST 活性及 Alb 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(u/L)	AST(u/L)	Alb(g/L)
正常组	8	37.6 ± 4.5 ^b	79.2 ± 8.9 ^b	30.3 ± 0.6 ^b
模型组	12	125.1 ± 60.4	134.5 ± 37.4	26.8 ± 2.2
秋水仙碱组	11	89.5 ± 59.6	100.6 ± 24.9 ^a	28.9 ± 1.9 ^a
319 方组	12	85.1 ± 45.6	99.5 ± 24.7 ^a	29.6 ± 1.3 ^a

^a $P < 0.05, ^b P < 0.01, vs$ 模型组.

表 2 肝组织病理变化积分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脂肪变性	胶原纤维
模型组	12	2.58 ± 0.79	2.42 ± 0.90
秋水仙碱组	11	1.64 ± 0.67 ^b	1.55 ± 0.93 ^a
319 方组	12	1.60 ± 0.70 ^b	1.40 ± 0.70 ^b

^a $P < 0.05, ^b P < 0.01, vs$ 模型组.

表 3 肝组织 Hyp,MDA 含量和 SOD 活性的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hyp(μg/g 肝)	MDA(nmol/g 肝)	SOD(NU/mg 肝)
正常组	8	115.4 ± 26.4 ^b	117.9 ± 36.0 ^b	113.7 ± 20.4 ^{b,c}
模型组	12	241.4 ± 47.9	329.2 ± 67.9	83.7 ± 20.9
秋水仙碱组	11	190.2 ± 30.6 ^b	312.6 ± 109.6	91.7 ± 20.8
319 方组	12	172.6 ± 37.5 ^b	273.8 ± 48.2 ^a	110.6 ± 14.2 ^{b,c}

^a $P < 0.05, ^b P < 0.01, vs$ 模型组;^c $P < 0.05, vs$ 秋水仙碱组.

3 讨论

从本实验病理组织学变化来看,模型组脂肪变性

明显,由胶原纤维构成的纤维间隔正在形成或已经形成,其破坏界板、分割、包绕肝小叶. 而 319 方组和秋水仙碱组脂肪变性和胶原纤维增生程度均较模型组轻,并以 319 方更为显著;从生化检测结果看,两药物组的肝功能损伤皆显著轻于模型组,另一方面,作为胶原蛋白独特的氨基酸成分 Hyp,在模型组中有较大幅度升高(高于正常大鼠 2~3 倍),提示肝内胶原蛋白的大量沉积,而在两治疗组中同样得到显著性抑制,并以 319 方的含量为最低,与组织学观察呈一致性. 上述结果再次证实 319 方有显著的抗肝损伤、抗肝纤维化的作用.

现已发现,除乙醛、纤维发生因子、转化生长因子等外,脂质过氧化物是直接刺激胶原基因转录的重要因素^[6]. 脂质过氧化物在所有肝病中(除肝癌外)皆显著升高^[7],体外研究发现,肝细胞经 CCl₄ 损伤后,其细胞损伤产物 MDA 可促进贮脂细胞活化及其胶原 mRNA 表达^[6]. 在乙醇、CCl₄、铁过载等引起的肝纤维化中,脂质过氧化是其主要的肝损伤形成机制^[6,8]. MDA 是主要脂质过氧化产物之一,检测显示,模型组肝脏的 MDA 含量显著升高,并且与肝组织羟脯氨酸含量的升高有着极其显著的相关性,同时 319 方组 MDA 含量显著低于模型组,这一结果不仅证实了脂质过氧化与肝纤维化的密切关系,同时表明 319 方的抗肝纤维化作用与抗脂质过氧化作用机制有关. 此外,现已知 SOD 是超氧阴离子自由基的清除剂,可抑制自由基启动的脂质过氧化反应,本文进一步对肝组织 SOD 活性进行检测,结果发现模型组 SOD 活性下降,而 319 方组 SOD 活性保持在正常水平,表明 319 方的抗脂质过氧化作用又与提高 SOD 活性有关. 实验中还发现,秋水仙碱抗脂质过氧化作用不明显,这可能也是 319 方在 CCl₄ 实验中的抗肝纤维化作用一定程度上优于秋水仙碱之故.

4 参考文献

- 刘成,刘平,胡义扬,等. 扶正化痰方抗肝纤维化的研究. 中医杂志,1994;35(10):602-605
- 刘平,刘成,胡义扬,等. 扶正化痰方对肝炎后肝硬化的治疗作用. 肝病杂志,1994;2(2):75-78
- Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem*, 1981;112:70-75
- Ruwart MJ, Rush BD, Snyder KF, et al. 16, 16-dimethyl prostaglandin E₂ delays collagen formation in nutritional injury in rat liver. *Hepatology*, 1988;8(1):61-64
- Ala Kokko L, Gunzler V, Hoek JB, et al. Hepatic fibrosis in rats produced by carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine: observations suggesting immunoassays of serum for the 7 s fragment of type collagen are a more sensitive index of liver damage than immunoassays for the NH₂-terminal propeptide of type pro-collagen. *Hepatology*, 1992;16(1):167-172
- Bedossa P, Houglum K, Trautwein C, et al. Stimulation of collagen 1() gene expression is associate with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a Link to tissue fibrosis? *Hepatology*, 1994;19(5):1262-1268
- Britton RS, Bacon BR. Role of free radicals in liver disease and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology*, 1994;41(4):343-348
- Nieneia O, Parkkila S, Yla-Herttuala S, et al. Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology*, 1995;22(4):1208-1214

作者简介 胡义扬,男,1962-08-10 生,浙江武义人,汉族. 医学博士,副研究员. 主要从事中医药防治肝病的研究,曾获上海市科技进步二、三等奖各 1 项,国家中医药管理局科研成果三等奖 1 项,参与编著《实用中医肝病学》等著作 3 部,发表论文 25 篇[上海市零陵路 530 号. 电话(021)64036889].

(收稿 1996-08-22 修回 1996-10-02)