

平肝散降解肝内纤维定量变化及意义*

陈建明 强世平 赵 冬 宋世震 张晓平 万远太

(武汉冶金科技大学医学院 武汉 430062)

摘要 采用日本血吸虫感染动物制备小白鼠病理性肝纤维化模型。并观察平肝散对早期血吸虫性肝纤维化病理过程的阻断及逆转作用。中药组动物血清 I 型前胶原(PC-I)及血清 III 型前胶原(PC-III)含量减少,血清 III 型前胶原与对照组比较有显著性差异;动物血清中肿瘤坏死因子(TNF- α)及白细胞介素 6(IL-6)均低于实验对照组;肝组织中羟脯氨酸(HY_p)含量下降。图象分析结果表明平肝散能使日本血吸虫性肝虫卵肉芽肿的周长、最大直径及最小直径缩小,肝内病灶中网状纤维减少,增生纤维组织所占面积下降,肝病灶炎性细胞浸润明显减轻。

关键词 肝纤维化 平肝散 血清前胶原 肿瘤坏死因子 白细胞介素 6 羟脯氨酸

Effect of the Anti-hepatic Fibrosis by Pinggansan Granule in Mice Infected with Schistosoma Japonicum

*Chen Jianming, Qiang Shiping, Zhao Dong, Song Shizhen, Zhang Xiaoping, Wan Yuantai
(Wuhan University of Metallurgical Science and Technology, Wuhan, 430062)*

Abstract: Morphometric techniques, RIA and histochemical techniques were applied to study effect of the anti-hepatic fibrosis by Pinggansan Granule. The results showed that the percentage of the area full of reticular fiber in affected location was smaller than that of control group, the perimeter, long and short diameter of the egg granuloma in the experimental

* 冶金工业部自然科学基金资助项目

mice was decreased. And PC-Ⅲ, PC-Ⅰ and HY_p in the drug-treated group was decreased.

Key words: hepatic fibrosis, Pinggansan Granule, procollagen, $TNF-\alpha$, IL-6, HY_p

肝纤维化(hepatic fibrosis)是指致病因素作用下肝脏内纤维结缔组织异常增生的病理过程。目前阻断和降解肝纤维化已发展到细胞学、细胞因子及其分子水平的研究^[1~3]。为了挖掘我国传统医学宝库,开发我国丰富的中医药资源,我们以水蛭为主制备平肝煮散治疗日本血吸虫病肝纤维化小白鼠,并与实验对照组动物比较药物作用后细胞学、细胞外基质及细胞因子的改变,报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备

1.1.1 实验动物 18~22g 健康小白鼠,雌雄各半,由我校医学实验动物中心提供。

1.1.2 日本血吸虫尾蚴及感染 以湖北省汉川县中国大陆株日本血吸虫,实验感染湖北钉螺逸出的尾蚴,由湖北省血吸虫病防治所提供。将新逸出的尾蚴以盖玻片法经小白鼠腹部皮肤攻击感染。每只小白鼠感染 50 条日本血吸虫尾蚴,将动物置于 25℃ 室温下,以全价颗粒饲料喂养。

1.1.3 实验分组 实验动物攻击感染后 45d,将动物随机分为 4 组,每组 20 只。①实验对照组:每日以 0.5ml/只生理盐水灌胃;②秋水仙碱组:每日以秋水仙碱(巴黎 Hond's 实验室)0.025mg/只灌胃;③中药组:每日以平肝散治剂(我院制剂室,每 ml 含生水蛭 0.05g,桃仁 0.1g,葛根 0.05g,防己 0.05g)0.5ml/只灌胃;④空白对照组:另取未感染之同日龄小白鼠 20 只,每日以 0.5ml/只生理盐水灌胃;以上各组动物每日各灌胃 1 次,45d 后以断头法取血并处死动物。

1.2 检测方法

1.2.1 动物血清 I 型前胶原(PC-Ⅰ)及Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)测定 以放射免疫的方法选用人 PC-Ⅰ, PC-Ⅲ 放射免疫试剂盒(重庆

肿瘤研究所中心研究室),检测各组动物血清中 PC-Ⅰ 及 PC-Ⅲ 含量。

1.2.2 动物血清中白细胞介素-6(IL-6)及肿瘤坏死因子 α ($TNF-\alpha$)的测定 应用北京东亚免疫研究所放射免疫试剂盒,以放射免疫方法测定各组动物血清中 IL-6 及 $TNF-\alpha$ 的含量。

1.2.3 肝组织羟脯氨酸(HY_p)含量的测定

取肝组织匀浆用乙醇、丙酮脱水脱脂,经盐酸高压水解,再水浴冷却后,在 562nm 波长处比色。按公式求得样本羟脯氨酸的含量。

$$\text{羟脯氨酸}(\mu\text{g})/\text{mg 组织} = \frac{\text{样品管 OD}}{\text{标准管 OD}} \times 10 \times \text{稀释倍数} \div \text{样品管重量}(\text{mg})$$

1.2.4 切片制作及图象分析计算 解剖动物肝脏右叶膈面,以 10% 福尔马林固定 72h,石蜡包埋。切片厚度 6 μm ,每隔五张切片抽取一张作 Gordon-Sweet 染色。以 FJTY-300 型细胞图象分析处理系统计算比较各组动物肝内虫卵肉芽肿中网状纤维面积及胶原纤维占据虫卵肉芽肿面积的百分比。同时测量各组动物肝内虫卵肉芽肿的周长、最大直径、最小直径。

2 结果

2.1 各组动物血清中 PC-Ⅰ 和 PC-Ⅲ 值的变化 见表 1。结果显示药物灌胃后,中药组动物血清中 I 型前胶原及Ⅲ型前胶原均有所下降,与模型组比较,血清Ⅲ型前胶原下降更明显,血清 I 型前胶原下降,但统计学分析无明显差异。

表 1 各组动物血清 PC-Ⅰ 及 PC-Ⅲ 的含量($\bar{x} \pm s$)

组别	血清 P-Ⅰ ($\mu\text{g/L}$)	血清 P-Ⅲ ($\mu\text{g/L}$)
模型组	107.24 $\pm$ 46.36	18.45 $\pm$ 2.87
中药组	58.82 $\pm$ 39.76	5.89 $\pm$ 3.11***

与模型组比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (以下表皆同); $n = 7$

2.2 各组动物血清中细胞因子含量的变化

见表 2。结果显示中药组血清中细胞介素-6 下降明显,与模型组有差异。肿瘤坏死因子也有所下降,但与模型组比较没有显著差异。

表 2 各组小鼠血清 IL-6、TNF- α 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6(ng/ml)	TNF- α (ng/ml)
空白组	7	0.36 $\pm$ 0.07	1.10 $\pm$ 0.24
模型组	6	0.48 $\pm$ 0.04 ^Δ	1.63 $\pm$ 0.29 ^Δ
中药组	9	0.40 $\pm$ 0.06*	1.41 $\pm$ 0.16

与空白组比较^ΔP<0.05

2.3 肝组织内羟脯氨酸(HY_p)含量的变化

见表 3。结果显示给动物灌服药物后,中药组小白鼠肝组织内羟脯氨酸含量下降,与模型组比较有明显差异。

表 3 各组小鼠肝内羟脯氨酸(HY_p)含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HY _p (μ g/mg)
模型组	9	3.18 $\pm$ 0.49
秋水仙碱组	8	2.43 $\pm$ 0.46
中药组	8	1.67 $\pm$ 0.34*

2.4 平肝散对动物肝内网状纤维沉积的影响 见表 4。中药组动物肝内网状纤维沉积面积明显低于模型组,中药组动物肝内虫卵肉芽肿的平均周长、最大直径、最小直径均较模型组小。

表 4 平肝散对肝内虫卵肉芽肿网状纤维沉积的影响

($\bar{x} \pm s$)

参 数	模型组	秋水仙碱组	中药组
面积(%)	59.10 $\pm$ 10.26	36.13 $\pm$ 5.42	32.61 $\pm$ 6.32**
周长PC/ μ m	1155.3 $\pm$ 153.3	813.8 $\pm$ 152.8	747.8 $\pm$ 167.9*
Dmax/ μ m	166.89 $\pm$ 42.42	135.57 $\pm$ 30.56	123.03 $\pm$ 34.37*
Dmin/ μ m	131.20 $\pm$ 39.57	93.94 $\pm$ 18.31	93.16 $\pm$ 17.33*

注:n=10,Dmax/ μ m=最大直径,Dmin/ μ m=最小直径

3 讨论

肝纤维化是指肝细胞发生坏死及炎症刺激时,肝脏内纤维结缔组织异常增生的病理过程。立足于祖国传统医学,探索中药抑制肝纤维化或促进纤维化分解与吸收,为抗肝纤维化的治疗提供了一条可能途径。我国学人观察到肝硬化患者可溶性白细胞介素 2 受体(SIL-2R)高于正常人,认为由淋巴细胞活化后产生和分泌纤维母细胞生长刺激因子,导致此类细胞因子促进肝内胶原的产生与沉

积^[4]。白细胞介素 6 能准确地反映机体应激能力,是介导人体炎症反应的重要因子,它可以预测手术后并发症的产生^[5]。在病毒性肝损伤时,血清中 IL-6 含量上升^[6]。IL-6、TNF- α 等类细胞因子是由细胞分泌的小细胞多肽,它能调节细胞功能,在肝纤维化的病程中促进纤维母细胞及肝内 Ito 细胞增殖,使 Ito 细胞加速向纤维母细胞转化,增加肝内细胞外基质(ECM)的合成,从而推动肝内胶原纤维的沉积。

平肝散为我院治疗慢性乙型肝炎协定处方:复方祛 HBV 袋煮散中抗肝纤维化药组。本方临床疗效好,长期服用未见毒副作用,1 疗程(3 个月)后临床症状、体征消失,HBsAg、HBV-DNA、HBsAg 转阴率均较高。可示肝纤维化逆转明显。该药组以水蛭入肝逐瘀通经为主药,桃仁辅助水蛭行瘀,葛根解郁,防己行水泻湿热为佐,主攻肝纤维症结。达到逆转肝纤维化的目的。

参考文献

- 1 Masayohi Y, Hisato N et al. Detection of Fibronectin Receptor in Sera; It's clinical Significance as a Parameter of Hepatic fibrosis. Hepatology, 1991, 14(2): 244
- 2 Galambos M, Collins DC. Galambos J T et al. Aradioimmunoassay procedure for type III procollagen; It's use in the detection of hepatic fibrosis. Hepatology, 1985, 5: 38
- 3 Chojkier and Brenner. Therapeutic Strategies for Hepatic fibrosis. Hepatology, 1988, 8(1): 176
- 4 叶红军. III 型前胶原和可溶性 IL-2 受体在肝纤维化治疗的动态观察. 临床肝胆病杂志, 1997, 13(1): 25
- 5 张光金, 潘雷达. 手术前后检测 IL-6 的临床意义. 上海免疫学杂志, 1997, 17(2): 177
- 6 樊万虎. 乙型肝炎患者血清中 IL-6 和 IL-8 的动态变化及意义. 上海免疫学杂志, 1997, 17(5): 293

(收稿: 1998-04-22)