

# 软肝化癥丸抗肝纤维化作用和机制的研究

晏 军, 王 煦 (北京中医药大学附属东方医院, 北京 100078)

**摘要:** 复制大鼠免疫性肝纤维化模型, 采用 Griess 反应法测定一氧化氮(NO), 结晶紫染色法测定肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 胸腺细胞法测定白介素 1(IL-1), 并用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 mRNA 的表达。结果: (1) 软肝化癥丸各剂量组均能明显抑制血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)的升高, 提高白蛋白(A1b), 减轻肝细胞坏死、变性及胶原增生程度; (2) 抑制大鼠腹腔巨噬细胞产生 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-1; (3) 抑制大鼠肝组织 I 胶原、II 型前胶原 mRNA 的表达。

**关键词:** 肝纤维化大鼠; 软肝化癥丸; 细胞因子; 基因表达

**中图分类号:** R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2002)01-0048-03

软肝化癥丸系北京中医药大学王绵之教授的经验方, 该方具有疏肝理气, 益气健脾, 活血化痰, 软坚散结功用。经长期的临床观察和实验研究表明该方具有良好的抗肝纤维化作用。为了进一步研究该方抗肝纤维化作用, 并探讨该方的作用机制, 进行了以下研究。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** Wistar 雄性大鼠, 140~150g, 购于北京医科大学动物实验中心, 合格证号: (京动字) 第 01-3054; C57BL/6 雌性小鼠, 18~20g, 购于中国预防医学科学院流行病与微生物研究所, 合格证号: (京动字) 第 01-3059。

**1.2 药物** 软肝化癥丸由醋制鳖甲、人参、白术、清半夏、柴胡、香附、枳壳、川芎、当归、红花、丹参、石韦等组成。将该方经两次水煎浓缩, 制成含生药为 0.58g/ml、1.16g/ml 及 2.32g/ml 三种浓度的药液; 秋水仙碱系巴黎 Houds 实验室产品, 用蒸馏水配成 0.01mg/ml 溶液, 低温保存备用。

**1.3 主要试剂及仪器** 新鲜猪血购于北京第三肉联厂, 离心取血清, 微孔滤膜滤过除菌, 分装并于低温冰箱保存备用。羟脯氨酸检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所, 批号: 20000531。RPMI1640 培养基, 美国 GIBCO 公司产品。ConA、LPS 均为美国 Sigma 产品。 $^3\text{H-TdR}$  为中国原子能科学研究院产品。RT-PCR 试剂盒、肝组织 I、II 型胶原引物由北京赛百胜公司合成。液体闪烁计数器: Beckman 公司, 酶标仪: 日本 Bio-Rad 2550。PCR 仪: ERICOMPinc PCR。

**1.4 分组、造模与给药方法** 本实验动物共分 6

组, 即正常组、模型组、秋水仙碱组、软肝化癥丸大剂量组、软肝化癥丸中剂量组和软肝化癥丸小剂量组(以下称大、中、小剂量组)。参照中野雅行及顾立刚等<sup>[1,2]</sup>的猪血清腹腔注射方法复制模型。除正常组外, 其余各组均腹腔注射猪血清, 每只 0.5ml, 每周 2 次, 连续 5 周后, 改为每周 1 次腹腔注射, 10 周后结束。于造模第六周起, 正常组和模型组灌胃自来水、秋水仙碱组灌胃 0.01mg/ml 浓度秋水仙碱, 大、中、小剂量组分别灌胃 2.32g/ml、1.16g/ml、0.58g/ml 浓度软肝化癥丸水煎液。容量为 1ml/100g 体重/d。

**1.5 腹腔巨噬细胞收集、培养** 于实验前 3d 腹腔注射 10% 的硫乙醇酸盐 3ml, 诱导巨噬细胞聚集, 动物处死后, 用含肝素的冷 Hank's 液灌洗腹腔, 吸取腹腔液, 用 Hank's 液洗两次, 用完全 RPMI1640 培养基将细胞调为  $5 \times 10^6/\text{ml}$ , 传入 24 孔培养板中, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2h, 弃去上清(非贴壁细胞), 每组加用完全 RPMI1640 培养基配制的 LPS(使其终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 用于 IL-1、TNF- $\alpha$ 、NO 刺激)各 1ml, 继续进行 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24h, 收集上清。IL-1、TNF- $\alpha$  培养 24h, NO 培养 48h 并直接检测, IL-1、TNF- $\alpha$  收集上清-20℃保存待测。

**1.6 NO、TNF- $\alpha$  活性及 IL-1 水平测定** NO 活性测定采用 Griess 反应法<sup>[3]</sup>; TNF- $\alpha$  活性测定采用结晶紫染色法<sup>[4]</sup>, 其活性以对靶细胞 L<sub>929</sub> 细胞生长的抑制率表示, 计算公式为: L<sub>929</sub> 细胞毒百分率(%) = (1 - 样品 OD 值/对照组 OD 值)  $\times$  100%; IL-1 水平测定采用胸腺细胞法<sup>[5]</sup>。

**1.7 肝组织 I 胶原、II 型前胶原 mRNA 表达检测** 总 RNA 的提取采用异硫氰酸胍一步法, 自肝组织中提取总 RNA, 经鉴定纯度在 1.8~2.0 之间; 用 RT-

PCR 法检测肝组织 I 胶原、III 型前胶原 mRNA 表达<sup>[6,7]</sup>。

**1.8 其它** 血清生化用全自动生化分析仪测定; 肝组织羟脯氨酸含量测定按试剂盒说明操作, 并以  $\mu\text{g/g}$  肝组织表示; 病理学观察作 HE 常规染色。

**1.9 统计方法** 全部数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检测法。

表 1 软肝化癥丸对免疫性肝纤维化大鼠肝功能和 Hyp 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | n  | 剂量(g/kg)   | ALT(IU/L)                        | AST(IU/L)                        | Alb(g/L)                      | Hyp( $\mu\text{g/g}$ 肝组织)        |
|-------|----|------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| 正常组   | 12 | —          | 43.70 $\pm$ 9.74                 | 160.20 $\pm$ 26.88               | 3.51 $\pm$ 0.34               | 233.62 $\pm$ 39.90               |
| 模型组   | 10 | —          | 109.00 $\pm$ 18.82 <sup>##</sup> | 244.3 $\pm$ 38.47 <sup>##</sup>  | 2.73 $\pm$ 0.23 <sup>##</sup> | 430.96 $\pm$ 99.55 <sup>##</sup> |
| 秋水仙碱组 | 9  | 0.1(mg/kg) | 72.22 $\pm$ 9.24 <sup>**</sup>   | 186.11 $\pm$ 32.94 <sup>**</sup> | 2.93 $\pm$ 0.14               | 313.49 $\pm$ 57.06 <sup>**</sup> |
| 大剂量组  | 11 | 23.2       | 50.20 $\pm$ 6.03 <sup>**</sup>   | 165.90 $\pm$ 16.30 <sup>**</sup> | 3.19 $\pm$ 0.29 <sup>**</sup> | 240.80 $\pm$ 24.63 <sup>**</sup> |
| 中剂量组  | 12 | 11.6       | 55.80 $\pm$ 10.69 <sup>**</sup>  | 151.40 $\pm$ 27.01 <sup>**</sup> | 3.35 $\pm$ 0.33 <sup>**</sup> | 238.59 $\pm$ 74.22 <sup>**</sup> |
| 小剂量组  | 12 | 5.8        | 73.70 $\pm$ 15.65 <sup>**</sup>  | 200.60 $\pm$ 53.08 <sup>*</sup>  | 2.99 $\pm$ 0.17 <sup>*</sup>  | 260.13 $\pm$ 67.41 <sup>**</sup> |

注: 与正常组比较<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ (下同)。

**2.2 软肝化癥丸对大鼠腹腔巨噬细胞产生 NO、TNF- $\alpha$  及 IL-1 的影响** 与正常组比, 经猪血清刺激后, 大鼠腹腔巨噬细胞产生 NO、TNF- $\alpha$  及 IL-1 明显增加; 与模型相比, 经秋水仙碱、软肝化癥丸各剂量组均有明显的抑制作用。结果见表 2 和表 3。

表 2 软肝化癥丸对大鼠腹腔 M $\Phi$  产生 IL-1 影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 剂量(g/kg)   | Cpm(1:4)                            | Cpm(1:2)                            |
|-------|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 正常组   | —          | 4193.67 $\pm$ 3169.99               | 1563.83 $\pm$ 711.92                |
| 模型组   | —          | 9734.17 $\pm$ 3523.24 <sup>##</sup> | 3858.50 $\pm$ 1931.73 <sup>##</sup> |
| 秋水仙碱组 | 0.1(mg/kg) | 7140.50 $\pm$ 2316.86               | 3275.50 $\pm$ 1912.81               |
| 小剂量组  | 23.2       | 4735.00 $\pm$ 1556.89 <sup>*</sup>  | 1895.33 $\pm$ 859.53 <sup>**</sup>  |
| 中剂量组  | 11.6       | 4814.17 $\pm$ 1611.25 <sup>**</sup> | 2074.17 $\pm$ 258.73 <sup>*</sup>   |
| 大剂量组  | 5.8        | 6963.83 $\pm$ 975.58                | 2654.67 $\pm$ 601.66                |

注: 与正常组比较<sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ 。

**2.3 软肝化癥丸对免疫性肝纤维化大鼠肝组织病理学改变的影响** 光镜下见正常组大鼠肝组织结构无异常。模型组大鼠肝组织可见不同程度的纤维组

2 结果

**2.1 软肝化癥丸对大鼠肝功能及肝组织羟脯氨酸含量的影响** 与正常组比较其余各组大鼠血清 ALT、AST 及肝组织羟脯氨酸含量明显增加, 但较模型组明显降低; 模型组大鼠血清 Alb 明显降低, 而其余各组与正常组接近。见表 1。

织增生, 由汇管区、小叶间进一步深入并分割肝小叶, 汇管区、肝窦及中央静脉周围可见炎性细胞浸润, 正常肝小叶结构破坏, 假小叶形成。秋水仙碱组仍可见炎性细胞浸润, 但纤维组织增生较模型组明显减轻。软肝化癥丸三个剂量组也可见少量炎性细胞浸润, 纤维组织增生明显减轻。

电镜下观察到正常组肝细胞结构完整, 细胞器及糖元丰富, 血窦面有枯否细胞存在, 内皮下可见少量胶原纤维; 模型组肝细胞结构差, 出现糖元脱失形成的空隙, 毛细胆管有扩张, 部分区域微绒毛短粗, 血窦面有大量的胶原纤维, 贮脂细胞明显增生; 秋水仙碱组肝细胞结构尚完整, 细胞器及糖元丰富, 部分细胞内可见脂滴, 血窦面可见部分微绒毛突起, 可见散在及束状胶原纤维及贮脂细胞增生; 软肝化癥丸三个剂量组肝细胞结构完整, 细胞器丰富, 糖元丰富, 毛细胆管未见病变, 血窦面可见部分微绒毛突起, 内皮下仅见部分胶原纤维及少数贮脂细胞增生。

表 3 软肝化癥丸对大鼠腹腔 M $\Phi$  产生 TNF- $\alpha$  及 NO 影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 剂量(g/kg) | TNF- $\alpha$<br>(OD 值 1:2)   | 细胞毒<br>(%) | TNF- $\alpha$<br>(OD 值 1:4)  | 细胞毒<br>(%) | NO<br>(OD 值)                    |
|-------|----------|-------------------------------|------------|------------------------------|------------|---------------------------------|
| 正常组   | —        | 1.51 $\pm$ 0.13               | 15.25      | 1.45 $\pm$ 0.22              | 18.68      | 0.131 $\pm$ 0.008               |
| 模型组   | —        | 0.74 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup> | 58.80      | 0.88 $\pm$ 0.24 <sup>#</sup> | 54.50      | 0.191 $\pm$ 0.011 <sup>##</sup> |
| 秋水仙碱组 | 0.1(mg)  | 0.81 $\pm$ 0.06               | 54.80      | 0.91 $\pm$ 0.46              | 49.04      | 0.176 $\pm$ 0.017               |
| 小剂量组  | 5.8      | 1.50 $\pm$ 0.16 <sup>**</sup> | 15.74      | 1.15 $\pm$ 0.24              | 24.52      | 0.133 $\pm$ 0.051 <sup>**</sup> |
| 中剂量组  | 11.6     | 1.12 $\pm$ 0.15 <sup>**</sup> | 37.56      | 1.24 $\pm$ 0.35              | 21.00      | 0.159 $\pm$ 0.015 <sup>*</sup>  |
| 大剂量组  | 23.2     | 1.05 $\pm$ 0.10 <sup>**</sup> | 41.24      | 1.23 $\pm$ 0.34              | 31.16      | 0.170 $\pm$ 0.018               |

**2.4 软肝化癥丸对免疫性肝纤维化大鼠肝组织 I 胶原、II 型前胶原 mRNA 表达的影响:** 模型组大鼠肝组织 I 胶原、II 型前胶原 mRNA 表达较正常组明显增强,秋水仙碱和软肝化癥丸均能抑制其表达,其中以软肝化癥丸中、小剂量组的抑制作用最为明显。

### 3 讨论

肝纤维化是多种慢性肝病迁延不愈,逐渐发展至肝硬化过程中共有的病理学改变,它是由于肝细胞变性坏死,炎性细胞浸润,肝细胞再生和纤维组织异常增生与沉积的结果。该病属于中医“癥积”的范畴。肝纤维化病程缠绵,病情复杂,既有正气的耗损,又有气滞血瘀的表现,属本虚标实的病证。王绵之教授根据肝纤维化的病理特点结合自己多年临床实践经验创立软肝化癥丸,集益气健脾、疏肝理气、活血化瘀、软坚散结于一方,扶正与祛邪兼顾,实践证明这一多法联用的治疗方法对抗肝纤维化确有良好的疗效<sup>[8]</sup>。

免疫性肝纤维化动物模型与慢性病毒性肝炎导致肝纤维化的发生机理相似<sup>[9]</sup>,这为研究我国慢性肝病抗肝纤维化的治疗提供更有价值的依据。本实验显示软肝化癥丸各剂量组均具有保护肝功能的作用;减少肝组织羟脯氨酸含量,抑制肝组织胶原蛋白的过度增生或沉积,病理学观察也证实了这一点;在猪血清的刺激下,NO、TNF- $\alpha$  及 IL-1 这些细胞因子的活性或水平明显升高,经治疗后它们均不同程度地

受到抑制,从而阻逆它们对肝脏的损害和对肝纤维化的启动及促进作用;软肝化癥丸各剂量组不同程度地抑制大鼠肝组织 I 胶原、II 型胶原 mRNA 的表达,降低肝组织胶原蛋白过度增生,这可能就是其抗肝纤维化的主要机制之一。

### 参考文献:

- [1] 中野雅行,小型岳三郎. づた血清より肝硬変样纤维化の形态学の研究[J]. 日本病理学会会志, 1982, 71: 319.
- [2] 顾立刚,王庆国,于世瀛,等. 柴胡鳖甲汤对大鼠免疫损伤性肝纤维化的治疗作用[J]. 上海免疫学杂志, 1998, 18(1): 25-26.
- [3] 汪谦. 现代医学实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 218-221.
- [4] George E, Gifford. Comparistion in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor[J]. J Immunol. 1983, 68: 167.
- [5] 钱玉昆. 实用免疫学新技术[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994. 46.
- [6] 郭葆玉. 细胞分子生物学实验操作指南[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 1998. 7-14, 141-149.
- [7] 吴乃虎. 基因工程原理(上册)[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 110-111.
- [8] 杨彦芳,刘成海,王绵之,等. 王氏抗肝纤方治疗肝纤维化的实验研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2000, 10(3): 19-21.
- [9] 贲长恩. 中医药抗肝纤维化研究的现状和展望[J]. 北京中医药大学学报, 1996, 19(5): 2-8.