

· 论 著 ·

软肝灵对肝纤维化小鼠肝组织病理学及抗脂质过氧化作用的影响

周晓辉¹, 闫冰², 潘士勇¹, 苑小历¹, 赵凌杰³

[摘要] **目的** 探讨软肝灵对四氯化碳(CCl₄)所致肝纤维化小鼠的影响。**方法** 采用 CCl₄复制肝纤维化小鼠模型,60 只昆明种小鼠分为模型组、对照组、软肝灵高、中、低剂量组、秋水仙碱组,每组 10 只。给药 6 周后检测小鼠血清中的丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)及羟脯氨酸(Hyp),并观察小鼠肝组织病理改变。**结果** 模型组造模 6 周时 ALT、AST、MDA、Hyp 水平较对照组升高,SOD、TP 及 ALB 的水平较对照组降低;病理检查提示模型组小鼠肝细胞变性、坏死严重,肝组织损害明显。软肝灵具有剂量依赖性地降低 CCl₄ 致小鼠肝损伤血清 ALT、AST、MDA、Hyp 水平升高($P < 0.01$)的功能,并能显著升高血清中 SOD、TP 及 ALB 的水平而达到延缓肝纤维化进程的作用。同时病理检查也提示,软肝灵中、高剂量组可明显减轻 CCl₄ 所致的小鼠肝细胞变性、坏死及肝组织损害程度。**结论** 软肝灵具有延缓 CCl₄ 所致肝纤维化进程的作用。

[关键词] 软肝灵;肝纤维化;四氯化碳;小鼠

[中图分类号] R329.447 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)04-0297-04

Effects of Ruan gan ling on liver fibrosis pathology and inhibit peroxidation induced by carbon tetrachloride in mice

ZHOU Xiao-hui¹, YAN Bing², PAN Shi-yong¹, YUAN Xiao-li¹, ZHAO Ling-jie³. 1. Department of Cadres Health Care, 2. Department of Pharmaceuticals, 3. Department of Chinese Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of Ruan gan ling on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. **Methods** The experimental hepatofibrosis was produced by CCl₄ in mice. At the same time, Ruan gan ling was given to prevent from hepatofibrosis in other groups. Colchicines was used as a positive control medicine. Sixty Kunming mice were randomly divided into six groups: the normal group, the model group, bifen-date group, high group, middle group and low group. Six weeks later, the blood of experimental mice were taken for the examination of ALT, AST, SOD, MDA, TP, ALB, Hyp. The liver specimen were taken for the observation of pathology. **Results** In the sixth weekend, the level of ALT, AST, MDA, and Hyp increased in model group, but the contents of SOD, TP, ALB decreased. Pathological examination indicates the liver cells and liver organizations in the model group were damaged seriously. Ruan gan ling could increase the level of SOD, TP, ALB ($P < 0.01$), but decrease the contents of ALT, AST, MDA, Hyp. Furthermore, Pathological examination indicates Ruan gan ling could protect mice from hepatofibrosis. **Conclusion** Ruan gan ling is capable of inhibiting hepatofibrosis.

[Key words] Ruan gan ling; hepatic fibrosis; carbon tetrachloride (CCl₄); mice

肝纤维化是多种慢性肝病的共同病理状态,不仅造成肝功能异常并影响慢性肝病的预后,而且也是慢性肝病发展至肝硬化的必经阶段^[1]。因此,抗肝纤维化成为慢性肝病的重要治疗环节。软肝灵选用党参、郁金、姜黄、山芋肉、枸杞子等 9 味中药组

成,已应用于临床,为探讨其作用机制,本研究通过四氯化碳(CCl₄)诱发建立肝纤维化小鼠的动物模型^[2],探讨软肝灵对肝纤维化小鼠的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料及动物 昆明种小鼠 60 只,体重 20~22 g,雌雄兼用,清洁级,由南京江宁区汤山青龙山动物繁殖场提供(实验动物许可证 SCXK 苏 2010-2011)。CCl₄ 分析纯(上海凌峰化学试剂有限公司,

基金项目: 南京军区南京总医院课题(2010M006)

作者简介: 周晓辉(1964-),男,吉林公主岭人,本科,副主任医师,从事医疗保健工作

作者单位: 210002 江苏南京,南京军区南京总医院,1. 干部保健科,2. 制剂科,3. 中医科

批号 110524),秋水仙碱(昆明制药集团股份有限公司,批号 20110318);花生油采用普通食用花生油,实验时用于配制 20% CCl₄ 花生油溶液;软肝灵按人临床剂量用体表面积法换算成小鼠用量后,分别研磨配制成三种实验浓度。天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(批号 20110215)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(批号 20110212)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20110406)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20110418)、羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(批号 20110810)及总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)试剂盒(批号 20110322)均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物分组和造模方法 取 60 只昆明种小鼠,随机分成 6 组,每组 10 只,雌雄兼用。对照组,给予生理盐水。模型组,给予 20% CCl₄ 花生油溶液,按 0.1 ml/10 g 皮下注射,首剂加倍,注射 1 次/5 d,首次注射后,用生理盐水按 0.1 ml/10g 灌胃,1 次/d,连续 6 周。软肝灵高、中、低剂量组(0.12,0.06,0.03 g/kg)按损伤模型组同法给予 CCl₄ 造模,然后给予软肝灵,1 次/d,连续给药 6 周。秋水仙碱组将秋水仙碱配成 0.01 mg/ml 浓度按 10 mg/60 kg 体重给药,1 次/d,连续给药 6 周。

1.3 观察指标 用药 6 周后,各组小鼠眼眶取血,离心分离血清后,按说明书操作测定生化指标。将小鼠肝组织,按常规固定、包埋、切片,HE 染色,对肝损伤程度分级及肝纤维化程度分期,有 2 期以上肝纤维化形成,即确定肝纤维化模型复制成功。

1.4 统计学处理 所有资料的统计分析均用 SPSS 16.0 软件包完成,各项数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,等级资料比较用秩和检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 ALT、AST、SOD 和 MDA 结果 见表 1。模型组血清中 ALT、AST 及 MDA 的含量明显高于对照组(*P* < 0.01),软肝灵能剂量依赖性降低小鼠血清 ALT、AST 水平及 MDA 的含量(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),可提高血清中 SOD 含量;软肝灵高剂量组对降低 ALT、AST 水平及 MDA 含量优于秋水仙碱组(*P* < 0.01)。其中,软肝灵高、中剂量组与秋水仙碱组血清 ALT、AST、MDA 及 SOD 值与模型组比较差异具有统计学意义(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

2.2 各组 ALB、TP 及 Hyp 结果 见表 2。模型组小鼠 TP、ALB 与对照组比较显著降低(*P* < 0.01),Hyp 活性显著升高(*P* < 0.01)。软肝灵高、中剂量组与秋水仙碱组可显著提高血清中 TP、ALB 含量(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),降低 Hyp 含量(*P* < 0.01);软肝灵高剂量组对提高 TP 水平及降低 Hyp 含量优于秋水仙碱组(*P* < 0.01)。软肝灵高、中剂量组与秋水仙碱组血清 TP、ALB 及 Hyp 值与模型组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

2.3 小鼠肝组织病理学结果 对照组小鼠肝小叶结构完整,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,

表 1 软肝灵对小鼠慢性肝损伤模型中 ALT、AST、SOD 和 MDA 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT(U/L)	AST(U/L)	MDA(nmol/ml)	SOD(U/ml)
对照组	10	58.26 ± 11.54	67.26 ± 18.62	5.82 ± 0.61	28.74 ± 2.76
模型组	10	198.61 ± 27.43 ^{##}	225.49 ± 16.78 ^{##}	22.27 ± 3.83 ^{##}	13.56 ± 1.23 ^{##}
软肝灵组(高)	10	154.25 ± 21.72 ^{**Δ}	188.52 ± 14.59 ^{**Δ}	13.83 ± 1.95 ^{**Δ}	22.74 ± 2.35 ^{**}
软肝灵组(中)	10	169.43 ± 24.19 [*]	197.24 ± 18.83 [*]	16.57 ± 2.34 ^{**}	19.18 ± 1.84 [*]
软肝灵组(低)	10	181.45 ± 27.86	212.46 ± 11.46	20.18 ± 2.98 [*]	15.37 ± 1.13 [*]
秋水仙碱组	10	159.37 ± 25.27 ^{**}	192.17 ± 15.76 ^{**}	14.67 ± 1.85 ^{**}	23.83 ± 2.97 ^{**}

注:与对照组比较,^{##}*P* < 0.01;与模型组比较,^{*}*P* < 0.05,^{**}*P* < 0.01;与秋水仙碱组比较,^Δ*P* < 0.01

表 2 软肝灵对小鼠慢性肝损伤模型中 ALB、TP 及 Hyp 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TP(g/L)	ALB(g/L)	Hyp(μg/mg)
对照组	10	74.26 ± 6.53	36.62 ± 3.58	0.427 ± 0.058
模型组	10	57.48 ± 5.22 ^{##}	21.74 ± 2.97 ^{##}	1.386 ± 0.179 ^{##}
软肝灵组(高)	10	69.35 ± 8.69 ^{**Δ}	29.28 ± 5.42 ^{**}	0.735 ± 0.113 ^{**Δ}
软肝灵组(中)	10	64.52 ± 9.37 [*]	28.46 ± 6.37 [*]	0.848 ± 0.135 ^{**}
软肝灵组(低)	10	62.81 ± 6.41 [*]	25.51 ± 5.83	1.126 ± 0.142 [*]
秋水仙碱组	10	67.51 ± 7.84 ^{**}	32.51 ± 4.63 ^{**}	0.859 ± 0.146 ^{**}

注:与对照组比较,^{##}*P* < 0.01;与模型组比较,^{*}*P* < 0.05,^{**}*P* < 0.01;与秋水仙碱组比较,^Δ*P* < 0.01

未见肝细胞变性、坏死等病理变化。CCl₄ 模型组小鼠肝组织结构镜下可见肝组织损害严重,肝小叶结构破坏,环中央静脉分布的肝细胞呈灶性或片状坏死,伴炎性细胞浸润等病理改变。软肝灵各剂量组

均未出现假小叶的形成,相比较而言,中、高剂量组纤维增生较少,局限于汇管区,低剂量组疗效稍差,纤维组织由汇管区向周围延伸,变形坏死较严重;秋水仙碱组显示可较好改善肝纤维化损伤(图 1)。

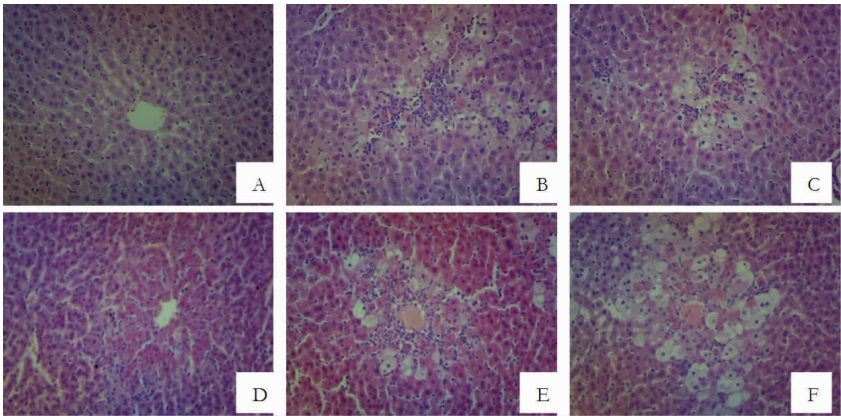


图 1 各组小鼠肝组织染色(HE ×100)
A:对照组;B:模型组;C:秋水仙碱组;D:软肝灵高剂量组;E:软肝灵中剂量组;F:软肝灵低剂量组

2.4 软肝灵对小鼠肝损伤程度分级(G)及肝纤维化分期(S)的影响 经秩和检验软肝灵高、中、低剂量组及秋水仙碱组与模型组小鼠的 G 和 S 的组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。软肝灵高、中剂量组的 G、S 均较低剂量组轻($P < 0.01$,表 3)。

表 3 软肝灵对实验性肝损伤及肝纤维化的保护作用

组别	n	肝损伤程度					肝纤维化程度					
		G0	G1	G2	G3	G4	S0	S1	S2	S3	S4	
对照组	10	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	
模型组	10	0	0	2	8	0	0	0	1	4	5	
软肝灵组(高)	10	0	8	1	1	0	0	7	2	1	0	
软肝灵组(中)	10	0	5	3	2	0	0	1	8	1	0	
软肝灵组(低)	10	0	1	5	4	0	0	2	5	3	0	
秋水仙碱组	10	0	4	6	0	0	0	4	5	1	0	

3 讨 论

肝纤维化是指肝细胞发生坏死及炎症刺激时,肝内纤维及结缔组织增生的病理过程,是慢性肝病的重要病理阶段,也是发展为肝硬化的物质基础,其实质是由于胶原和其他细胞外基质的合成和降解失衡,对此阶段的干预治疗是防止肝纤维化向肝硬化转变的关键^[3-4]。

近年来研究证实肝纤维化是可以逆转的,但临床上缺乏高效、无不良反应的抗肝纤维化西药。而中医中药在治疗此病方面现出巨大的优势,成为抗纤维化领域中研究的热点之一。肝纤维化属于祖国

医学“胁痛”、“症积”等范畴,其病因为情志郁结,气失条达;饮食不节,嗜酒过度及病后继发^[5]。故本病病机为肝脾俱损,气血淤滞,淤凝脉络,以气血凝滞、血淤脉络为主要矛盾,所以治疗应以活血化淤药为主,再辅以益气健脾,疏肝理气之品,则使淤滞得去,肝气条达,则诸证自解。国内外学者致力于中医药抗肝纤维化的研究,包括单味药、复方的研究^[6-7],发现中药在抗肝纤维化治疗中具有明显的优势。

胶原纤维主要由胶原蛋白构成,而 Hyp 在胶原蛋白的含量约为 14%^[8-9],因此测定肝组织 Hyp 含量可间接反映肝纤维化的程度。本实验结果提示软肝灵各剂量均可减低肝组织中 Hyp 含量,高剂量软肝灵对减低 Hyp 的效果优于秋水仙碱。秋水仙碱是一种细胞微管聚合抑制药物,也是抗肝纤维化临床研究最多的药物,秋水仙碱对提高肝硬化患者的存活率有一定作用,但由于不良反应多,目前仅用于临床研究^[10]。实验结果还表明软肝灵可明显降低肝纤维化小鼠血清中 ALT、AST、MDA 水平及提高血清中 SOD、TP 和 ALB 水平,可见软肝灵有降酶和抗脂质过氧化作用。因为 SOD 是氧自由基的清除剂,体内 SOD 活性越高,自由基清除的速度越快。在脂质过氧化反应中,MDA 是其分解的终产物之一,其含量反映了机体组织、细胞损伤的程度^[11-12]。由实验结果可知模型组血清中 MDA 的含量明显高于对照组($P < 0.01$),软肝灵能剂量依赖性降低小鼠血清 MDA 的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),软肝灵高剂量组对降低 MDA 含量优于秋水仙碱组($P < 0.01$),且

病理观察提示高剂量软肝宁可以明显地抑制模型大鼠肝组织胶原纤维的增生,从而减轻肝细胞损伤,说明软肝宁对 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维化有良好的防治作用^[13]。

本实验结果表明,由中药党参、郁金、姜黄、山芋肉、枸杞子等 9 味中药组成复方制剂软肝灵,能延缓 CCl_4 造成的小鼠肝纤维化进程,能改善肝功能,抗脂质过氧化,并能抑制假小叶的形成及纤维组织的增生。软肝灵抗肝纤维化作用机制可能与保护肝细胞、抑制胶原合成、降低转氨酶、抗脂质过氧化反应及促进机体蛋白质合成等因素有关。

【参考文献】

- [1] Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis[J]. Clin Chim Acta, 2006, 364(1): 33-60.
- [2] 丁体龙, 马 勇, 严家春, 等. “抗纤汤”治疗四氯化碳致肝纤维化大鼠模型的实验研究[J]. 东南国防医药, 2004, 6(3): 175-176.
- [3] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209-218.
- [4] 青献春, 刘炳辰, 裴香萍, 等. 软肝散结胶囊抗大鼠肝纤维化实

验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 149-150.

- [5] 池肇春. 实用临床肝病学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 396-397.
- [6] Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, et al. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery[J]. Keio J Med, 2001, 50(2): 58-65.
- [7] Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation[J]. Gut, 2002, 50(6): 891-896.
- [8] 李 亮, 缪英年. 平肝汤抗大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(4): 27-29.
- [9] 黄象安, 陈燕力, 孙利红, 等. 扶正健肝方对免疫性肝纤维化大鼠胶原代谢的影响[J]. 首都医科大学学报, 2007, 28(2): 196-197.
- [10] 田扩寰. 肝脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 583-584.
- [11] 张 奕, 刘永刚. 红景天苷抗肝纤维化的实验研究[J]. 中国药房, 2006, 17(11): 813-814.
- [12] 文 彬, 贺松其, 廖荣鑫. 清热祛湿抗肝纤维化及抗脂质过氧化的实验研究[J]. 陕西中医, 2005, 26(4): 378-379.
- [13] 高作文, 李新慧, 周 燕, 等. 随机对照研究苦参素对乙肝肝纤维化的疗效[J]. 东南国防医药, 2003, 5(2): 94-96.

(收稿日期: 2012-01-30; 修回日期: 2012-03-20)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

· 短 篇 ·

腰交感神经阻滞治疗下肢神经病理性疼痛 35 例

姚永玲, 胡咏兵, 陈 潇, 张晓磊

【关键词】 疼痛; 下肢; 腰交感神经阻滞; 红外热像图

【中图分类号】 R441.1 【文献标志码】 B

【文章编号】 1672-271X(2012)04-0300-02

我科使用腰交感神经阻滞治疗下肢神经病理性疼痛 35 例, 取得较好疗效, 现报告如下。

1 临床资料

1.1 对象 2010 年 8 月至 2011 年 8 月我院收治确诊为下肢神经病理性疼痛 35 例, 年龄 42 ~ 69 岁; 男 18 例, 女 17 例; 其中腰椎间盘突出症 16 例、糖尿病神经病变 12 例、脉管炎 4 例、带状疱疹后神经痛 3 例; 发病时间均 > 2 个月; 经其他方法治疗无效后, 给予患侧腰交感神经阻滞治疗。

1.2 治疗方法 患者取俯卧位, 在 CT 引导下穿刺。穿刺点选在腰 2 棘突上缘旁、距脊柱中线 5 ~ 7 cm 处(左右侧均可), 穿刺针与皮肤成 60°, 朝向椎体前侧缘, 注入 2% 利多卡因 2 ml, 5 ~ 8 min 后患者感觉患肢发热, 查体患者会阴部及

双下肢、腹股沟区无感觉及运动障碍。置入硬膜外导管, 再注入 2% 利多卡因 4 ml + 0.9% 氯化钠注射液 4 ml 的混合液, 按无菌要求包扎好导管。此后通过硬膜外导管注入 2% 利多卡因 4 ml + 0.9% 氯化钠注射液 4 ml 的混合液, 1 次/d, 连续 1 周。35 例患者中 22 例行左侧腰交感神经阻滞, 13 例行右侧腰交感神经阻滞。

1.3 检测方法 使用红外热成像仪(重庆伟联公司), 在无空气对流、无阳光直接照射的屏蔽室内, 室温 20 ~ 25℃, 相对湿度 60%。检查前患者暴露检测部位(患肢小腿), 静坐 10 min。检测时患肢小腿中下 1/3 胫前位置距红外镜头 2 ~ 3 m, 每个患者均摄取规定体位的标准热成像图, 测量 3 次, 取平均值; 于治疗前、治疗后 30 min、治疗后第 1 天和第 3 天、1 周分别检测 1 次; 同时行视觉模拟评分(VAS 评分)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析, 计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.5 结果 治疗后患者静息和活动时的 VAS 评分较治疗前均明显降低, 治疗后局部皮肤的温度有所上升, 差异均有统计学意义(表 1)。

作者单位: 441000 湖北襄阳, 湖北省襄阳市第一人民医院疼痛科

(下转第 307 页)