

# 舒肝宁注射液对大鼠酒精性肝纤维化的防治作用研究<sup>△</sup>

潘婷\*,张金娟,熊英,李玲#,雷珊,兰金芝(贵州医科大学基础医学院,贵阳 550025)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2624-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.09

**摘要** 目的:考察舒肝宁注射液对酒精性肝纤维化(ALF)模型大鼠的防治作用,为其临床用于酒精性肝病的治疗提供实验参考。方法:取50只大鼠,每天ig 60%乙醇-玉米油-吡唑混悬液复制ALF模型;另取同批大鼠10只,ig生理盐水,作为正常对照组。连续16周后,将存活的造模大鼠( $n=40$ )随机分为模型组、阳性对照组(安络化纤丸0.75 g/kg, ig)和舒肝宁注射液高、中、低剂量组(4.8、2.4、1.2 mL/kg, ip),每组8只。正常对照组和模型组大鼠ip等体积生理盐水(5 mL/kg),给药组大鼠给予相应药物,每天1次,连续给药8周,并同时继续进行造模处理。给药结束后,称定大鼠体质量,检测大鼠血清中肝功能指标[天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)]和肝纤维化指标[透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PⅢNP)和Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)]水平,测定大鼠肝指数并观察肝组织病理变化。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠体质量显著降低( $P<0.05$ );肝指数以及血清中肝功能指标和肝纤维化指标水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );肝组织出现脂肪变性、肝细胞空泡化、汇管区周围有大量纤维组织沉积等病理改变。与模型组比较,各给药组大鼠上述变化均显著改善( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:舒肝宁注射液可明显改善ALF模型大鼠的肝组织损伤,对酒精性肝病有一定的防治作用。

**关键词** 舒肝宁注射液;酒精性肝纤维化;大鼠

## Study on the Preventive and Therapeutic Effect of Shuganning Injection on Alcoholic Liver Fibrosis in Rats

PAN Ting, ZHANG Jinjuan, XIONG Ying, LI Ling, LEI Shan, LAN Jinzhi (Basic Medical College of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To investigate the preventive and therapeutic effect of Shuganning injection on alcoholic liver fibrosis (ALF) in model rats, and provide experimental basis for its clinical application for alcoholic liver disease. **METHODS:** 50 rats were enrolled and intraperitoneally given mixed liquid of 60% alcohol-corn oil-pyrazole to reduce ALF model. Another 10 rats were enrolled and intraperitoneally given normal saline, as normal control group. After 16 weeks, survived model rats ( $n=40$ ) were randomly divided into model group, positive control group (Anluo huaxian pill 0.75 g/kg, ig), Shuganning injection high-dose, medium-dose, low-dose groups (4.8, 2.4, 1.2 mL/kg, ip), 8 in each group. Normal control group and model group were intraperitoneally injected equal volume of normal saline (5 mL/kg), administration groups were given relevant medicines, once a day, for 8 weeks; and modeling was continuously conducted at the same time. After administration, body mass of rats was weighed, and the levels of liver function indexes [aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)] and liver fibrosis indexes [hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen (PⅢNP), type IV collagen (Ⅳ-C)] in serum of rats were detected. Liver index of rats was determined and pathological changes of liver tissue were observed. **RESULTS:** Compared with normal control group, body mass of rats in model group was significantly decreased ( $P<0.05$ ); liver index, and liver function index, liver fibrosis index levels in serum were significantly increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Liver tissue showed steatosis, hepatocyte vacuolization, a large number of fibrous tissue deposition around portal areas and other pathological changes. Compared with model group,

瘦素以及瘦素受体的影响[J].世界华人消化杂志,2015,23(7):1052-1058.

[9] Araújo Júnior RF, Garcia VB, Leitão RF, et al. Carvedilol improves inflammatory response, oxidative stress and fibrosis in the alcohol-induced liver injury in rats by regulat-

<sup>△</sup>基金项目:贵州省科技计划课题(No.黔科合重大专项字[2011]6019号)

\* 硕士研究生。研究方向:中药药理。E-mail:1172359936@qq.com

# 通信作者:教授,硕士。研究方向:中药药理。E-mail:354529962@qq.com

ing kuppfer cells and hepatic stellate cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0148868.

[10] Li T, Ke W, Sun P, et al. Carvedilol for portal hypertension in cirrhosis: systematic review with meta analysis[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(5):e010902.

[11] Ding Q, Tian XG, Li Y, et al. Carvedilol may attenuate liver cirrhosis by inhibiting angiogenesis through the VEGF-Src-ERK signaling pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(32):9566-9576.

(收稿日期:2016-10-13 修回日期:2016-11-29)

(编辑:邹丽娟)

above-mentioned changes were improved significantly in administration groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Shuganning injection can obviously improve liver tissue damage of model rats with ALF, showing certain preventive and therapeutic effect on alcoholic liver disease.

**KEYWORDS** Shuganning injection; Alcoholic liver fibrosis; Rats

酒精性肝病(Alcoholic liver disease, ALD)是因为长期持续性摄入酒精引起的肝脏一系列慢性病理改变过程,已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病,是发达国家青壮年死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。随着我国酒精消费量的逐年增加,ALD的发病率也逐渐升高。在ALD患者中,50%可出现酒精性肝纤维化(Alcoholic liver fibrosis, ALF)<sup>[2]</sup>,ALF是酒精性脂肪肝、肝炎向肝硬化甚至肝癌发展的必经之路,是在酒精及其初级代谢产物乙醛的慢性持续损伤作用下,肝脏纤维增生和降解失衡,造成肝脏细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)过度沉积与分布异常的结果。近年来的研究表明肝纤维化的病理是可逆的,因此对其进行有效的治疗可以阻断病情的发展,进而提高患者的生存率与生命质量。

舒肝宁注射液是一种纯中药复方注射剂,由板蓝根、栀子、茵陈、灵芝等药物的提取物组成,目前临床上主要用于治疗急、慢性肝炎<sup>[3-4]</sup>。据文献报道,舒肝宁注射液可以显著减少肝硬化大鼠腹水<sup>[5]</sup>,对顺铂中毒所致小鼠肝脏损伤有明显的防治作用<sup>[6]</sup>,对小鼠实验性肝损伤亦具有明显的保护作用<sup>[7]</sup>。虽然大量临床资料和动物实验已经证实舒肝宁注射液有明显的保肝护肝作用,但其对ALF是否有治疗作用尚未明确。因此,本研究以ALF模型大鼠为研究对象,探讨舒肝宁注射液对ALF的防治作用,为其临床用于酒精性肝病的治疗提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ELx800-MV型酶标仪(美国Bio-Tek公司);IX71型倒置显微镜(日本Olympus公司)。

### 1.2 药品与试剂

舒肝宁注射液(贵州瑞和制药有限公司提供,批号:20150907,规格:2 mL/支);安络化纤丸(森隆药业有限公司,批号:1645400,规格:6 g/袋);丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)测定试剂盒(南京建成有限公司,批号:均为20160911);透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PⅢNP)和Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)测定试剂盒(郑州安图生物工程股份有限公司,批号:均为20161027)。

### 1.3 动物

健康Wistar大鼠60只,♂,体质量180~220 g,SPF级,由辽宁长生生物科技有限公司提供,许可证号:SCXK(辽)2015-0001。

## 2 方法

### 2.1 造模、分组与给药

参考文献[8]中方法并加以改进后进行造模。将50只大鼠适应性喂养1周后,每日上午ig体积比为1 000:250:3的60%乙醇-玉米油-吡啶混悬液,第1周剂量为6 mL/kg,第2周为8 mL/kg,第3周为10 mL/kg,第4周为12 mL/kg,以后维持12 mL/kg直至实验结束。另取同批大鼠10只ig生理盐水,作为正常对照组。16周后,将存活的造模大鼠( $n=40$ )随机分为模型组、阳性对照组和舒肝宁注射液高、中、低剂量组,每组8只。正常对照组和模型组大鼠ip生理盐水,阳性对照组大鼠ig安络化纤丸0.75 g/kg(根据人临床常用剂量换算而得,取安络化纤丸6 g,完全溶解于40 mL重蒸水中,混匀后按5 mL/kg给药),舒肝宁高、中、低剂量组大鼠分别ip舒肝宁注射液4.8、2.4、1.2 mL/kg(根据人临床常用剂量的2、1、0.5倍换算而得),每天给药1次,连续8周。给药期间造模大鼠继续造模处理。

### 2.2 一般情况观察

实验期间,观察大鼠的精神状态、活动度、皮毛、饮水量、大小便状况以及大鼠体质量变化等一般情况。

### 2.3 血清中肝功能指标和肝纤维化指标检测

末次给药后,动物禁食、禁水12 h,称定大鼠体质量。10%水合氯醛(0.4 mL/100 g)麻醉,固定,消毒,打开胸腔,暴露心脏,采血。将血液于室温放置30 min后,以离心半径为3 cm、3 000 r/min离心15 min,取上层血清。按照试剂盒说明书操作,采用微板法检测血清中肝功能指标(ALT、AST)水平,采用化学发光法检测血清中肝纤维化指标(HA、LN、PⅢNP、Ⅳ-C)水平。

### 2.4 肝指数测定

打开大鼠腹腔,取出肝脏,精确称取肝质量并计算肝指数:肝指数=肝质量(mg)/体质量(g)×100%。

### 2.5 肝组织病理学变化观察

将肝组织置于10%中性福尔马林溶液中固定24 h,经脱水、石蜡包埋、切片后,行苏木精-伊红(HE)染色和Masson染色,于显微镜下观察大鼠肝组织病理学改变。

### 2.6 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 一般情况观察结果

正常对照组大鼠精神状态较好,活动自如,被毛干净有光泽,饮水、进食均正常,大小便无异常,体质量随

造模时间的延长而逐渐增加。造模组大鼠 ig 60% 乙醇-玉米油-吡啶混悬液后初表现为兴奋,后进入嗜睡状态;造模 3 周后活动逐渐减少,并出现毛色暗淡、发黄、脱毛、竖毛等现象,饮水量、进食量均减少,出现稀便现象,体质量较正常对照组增长明显缓慢;给予不同剂量的舒肝宁注射液及安络化纤丸后,大鼠的精神状态、活动情况、被毛、饮水量、进食量以及大小便情况均明显改善,体质量增长加快。

### 3.2 大鼠血清中肝功能指标检测结果

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中 ALT、AST 水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠血清中 ALT、AST 水平显著降低( $P < 0.01$ ),结果见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 ALT、AST 水平测定结果( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab 1 Results of ALT, AST levels in serum of rats in each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ALT,U/L	AST,U/L
正常对照组	10	43.60 ± 1.31	171.05 ± 16.86
模型组	8	153.95 ± 16.45**	379.33 ± 61.24**
阳性对照组	8	50.43 ± 7.99**	251.96 ± 27.66**
舒肝宁注射液高剂量组	8	51.99 ± 10.21**	251.42 ± 32.04**
舒肝宁注射液中剂量组	8	48.25 ± 8.11**	230.08 ± 15.83**
舒肝宁注射液低剂量组	8	49.12 ± 7.44**	241.10 ± 16.19**

注:与正常对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,\*\*\* $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, \*\*\* $P < 0.01$

### 3.3 大鼠血清中肝纤维化指标检测结果

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中 HA、LN、PⅢNP、IV-C 水平均显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠血清中 HA、LN、PⅢNP、IV-C 水平均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),结果见表 2。

表 2 各组大鼠血清中 HA、LN、PⅢNP 和 IV-C 水平测定结果( $\bar{x} \pm s$ , ng/mL)

Tab 2 Results of HA, LN, PⅢNP, IV-C levels in serum of rats in each group( $\bar{x} \pm s$ , ng/mL)

组别	n	HA	LN	PⅢNP	IV-C
正常对照组	10	133.74 ± 61.64	0.15 ± 0.04	1.98 ± 0.3	0.48 ± 0.17
模型组	8	419.89 ± 29.80**	0.30 ± 0.08**	3.02 ± 0.6**	0.98 ± 0.35*
阳性对照组	8	171.17 ± 84.06*	0.17 ± 0.04**	2.40 ± 0.44*	0.55 ± 0.27*
舒肝宁注射液高剂量组	8	178.75 ± 88.47*	0.16 ± 0.03**	2.37 ± 0.44*	0.60 ± 0.34*
舒肝宁注射液中剂量组	8	170.14 ± 63.49*	0.21 ± 0.07*	2.39 ± 0.37*	0.64 ± 0.25*
舒肝宁注射液低剂量组	8	167.62 ± 89.21*	0.20 ± 0.07*	2.42 ± 0.36*	0.65 ± 0.27*

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$

### 3.4 大鼠体质量、肝指数测定结果

给药结束后,与正常对照组比较,模型组大鼠体质量显著降低、肝指数显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠体质量显著升高、肝指数显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),结果见表 3。

表 3 各组大鼠体质量、肝指数测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Results of body mass and liver index of rats in each group( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	体质量,g	肝指数,%
正常对照组	10	406.67 ± 54.64	2.50 ± 0.00
模型组	8	353.75 ± 21.27*	3.38 ± 0.49**
阳性对照组	8	385.83 ± 35.20*	2.88 ± 0.27*
舒肝宁注射液高剂量组	8	391.62 ± 40.66*	2.80 ± 0.26*
舒肝宁注射液中剂量组	8	394.50 ± 34.22*	2.85 ± 0.22*
舒肝宁注射液低剂量组	8	393.75 ± 48.86*	2.73 ± 0.17**

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$

### 3.5 大鼠肝组织病理学观察结果

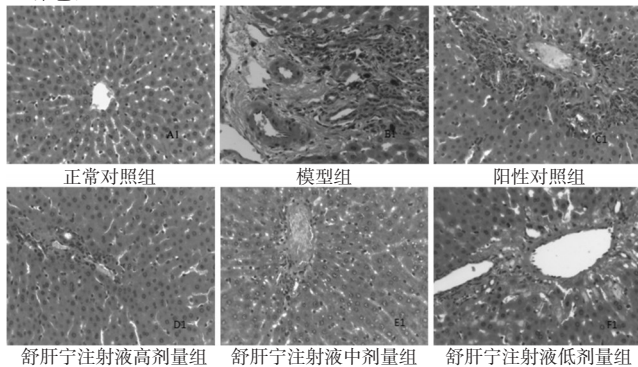
HE 染色结果显示,正常对照组大鼠肝组织细胞排列整齐,细胞核大而圆,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状分布,肝小叶结构完整;模型组大鼠肝组织出现脂肪变性,大量肝细胞呈现空泡化,并有点、灶状坏死伴炎症细胞浸润,汇管区周围有大量纤维组织沉积,部分肝小叶结构被破坏;各给药组大鼠肝组织脂肪变性、肝细胞坏死、炎症细胞浸润、中央静脉以及汇管区的纤维组织沉积均较模型组有不同程度的减轻。Masson 染色结果显示,正常对照组大鼠肝组织汇管区有少许胶原纤维存在;模型组大鼠肝组织有大量胶原纤维沉积在汇管区,破坏了部分肝小叶结构;各给药组大鼠肝组织胶原纤维分布的范围明显减小,尤其以舒肝宁高剂量组大鼠纤维化改善程度最为明显,结果见图 1。

## 4 讨论

本研究采用 60% 乙醇-玉米油-吡啶混悬液 ig 给药的方式复制 ALF 大鼠模型与单独采用乙醇相比,缩短了造模时间,提高了模型制备的成功率<sup>[8-9]</sup>。大量动物实验和临床研究表明,安络化纤丸对肝纤维化具有明确的治疗作用,故本文以其为阳性对照。本研究结果显示,模型组大鼠实验 24 周后肝组织发生脂肪变性,大量肝细胞呈现空泡化,并有点、灶状坏死伴炎症细胞浸润,汇管区周围有大量纤维组织沉积,部分肝小叶结构被破坏,大量胶原纤维呈绿色沉积在汇管区,同时伴随着血清中 ALT、AST、HA、LN、PⅢNP、IV-C 水平的异常升高。上述病理变化与 ALF 的临床表现基本符合<sup>[10]</sup>,表明采用本研究中方法复制 ALF 大鼠模型是可行的。

长期饮酒,酒精会导致肝细胞受损、肝细胞膜的通透性增加,大量 ALT 和 AST 从细胞中溢出,进入血液,使血液中 ALT、AST 水平及活性显著升高。通过检测血清中 ALT、AST 水平对诊断 ALF 或评判治疗是否有效具有重要作用。本研究结果显示,各剂量舒肝宁注射液均可显著降低造模大鼠血清中 ALT、AST 水平( $P < 0.01$ ),提示舒肝宁注射液有保护肝细胞的作用。

HE 染色:



Masson 染色:

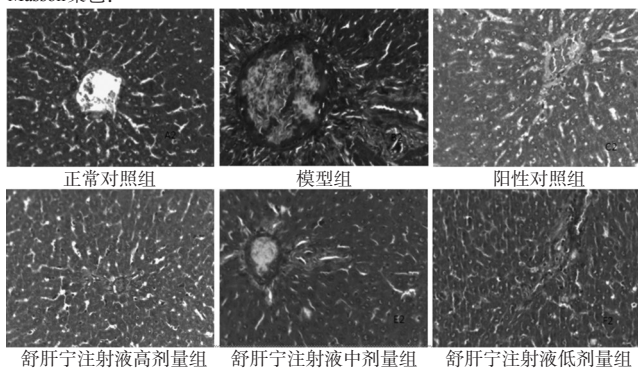


图1 各组大鼠肝组织病理学观察结果(×400)

Fig 1 Results of pathological observation of liver tissue of rats in each group(×400)

肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复过程中的代偿反应,以肝内 ECM 过量沉积、结缔组织增生为病理特征。其中 ECM 的主要成分为胶原,以 I、Ⅲ和 IV 型胶原为主<sup>[11]</sup>,其他成分还有 HA、LN 和蛋白多糖等。HA、LN、PⅢNP 和 IV-C 对肝纤维化具有良好的诊断价值<sup>[12-13]</sup>。其中,HA 是糖胺多糖,由间质细胞合成,其能反映肝脏纤维化活动程度和肝脏损伤程度,是目前抗肝纤维化药物中的最佳检测指标;LN 是基底膜成分中的主要糖蛋白,在肝纤维化发生时沉积于肝血窦,使肝血窦毛细血管化,其含量与肝病纤维化和炎性细胞浸润程度呈正相关;PⅢNP 反映了Ⅲ型胶原的代谢情况,其与肝纤维化的程度呈密切正相关<sup>[14]</sup>,对肝纤维化早期诊断有着特殊的意义;IV-C 与 LN 是构成基底膜的主要成分,正常肝组织中 IV 型胶原含量很少,当肝纤维化发生时,IV 型胶原过量合成。本研究结果显示,各剂量舒肝宁注射液均可以明显降低造模后大鼠血清中异常升高的 HA、LN、PⅢNP、IV-C 水平( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),提示舒肝宁注射液有抗肝纤维化的作用。

ALF 特征性的病理改变有中心静脉纤维化、肝细胞周围纤维化以及汇管区稠密化。本研究病理结果显示,舒肝宁注射液各剂量组大鼠与模型组比较中央静脉以及汇管区胶原纤维增生明显减少,相邻血窦之间的纤维

联络基本消失,提示舒肝宁注射液能明显减轻 ALF 模型大鼠肝组织病理改变,对 ALF 的发生发展具有阻止或者逆转的作用。

综上所述,舒肝宁注射液能减轻肝组织病理损伤,减轻肝细胞的变性、坏死,保护肝细胞以及抑制细胞外基质的沉积等,提示舒肝宁注射液有防治 ALF 的作用。然而,舒肝宁注射液作为中药复合制剂成分复杂,其作用的物质基础及机制还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 许东升.酒精性肝病发病机制的研究概况[J].胃肠病学, 2004,9(1):49-51.
- [2] 梁扩寰,李绍白.肝脏病学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2003:768.
- [3] 陈曙红,邵剑锋,何灿明,等.舒肝宁注射液治疗急性黄疸性病毒性肝炎 49 例[J].中国中医急症,2011,20(10):1686-1687.
- [4] 梁海雄,黎丽群.舒肝宁注射液治疗慢性乙型病毒性肝炎临床研究 Meta 分析[J].世界中西医结合杂志,2016,(8):1057-1062.
- [5] 边鸿铮.舒肝宁注射液对模型大鼠肝硬化腹水改善作用研究[J].中国药房,2012,23(19):1740-1741.
- [6] 张瑾.舒肝宁注射液对顺铂中毒小鼠肝脏损伤的保护作用[J].中国药房,2016,27(7):920-922.
- [7] 赵璐,曾南,刘晓师,等.舒肝宁注射液对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2007,23(6):65-67.
- [8] 丁霞,蒙一纯,贾长恩,等.酒精性肝纤维化动物模型的建立[J].中国中医基础医学杂志,1999,5(7):47-48.
- [9] 王磊,季光,郑培永,等.大鼠酒精性肝纤维化复合模型的建立[J].中西医结合学报,2006,4(3):281-284.
- [10] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病组.酒精性肝病诊疗指南(2010年1月修订)[J].中华内科杂志,2010,27(4):617-621.
- [11] Weerawatanakorn M, Hsieh SC, Tsai ML, et al. Inhibitory effect of tetrahydrocurcumin on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats[J]. *J Funct Foods*, 2014, doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.030.
- [12] 胡义扬,刘平,刘成,等.基于肝组织病理动态变化情况探讨血清学指标在肝纤维化诊断中的意义[J].中华肝脏病杂志,2006,14(3):174-177.
- [13] 常克宏,郭晓玲,程书权. HA, PLD, PCⅢ, LN, IV-C 五项血清学指标联合检测对慢性肝病的诊断价值[J].世界华人消化杂志,2000,8(6):719-720.
- [14] 苑同业,刘国风,张立营.血清Ⅲ型前胶原测定在肝纤维化诊断中的应用[J].中国疗养医学,2014,23(9):830-831.

(收稿日期:2017-01-09 修回日期:2017-04-30)

(编辑:林静)