

积雪草苷抗大鼠免疫性肝纤维化作用研究

赵嗣霞¹, 张如松¹, 杨苏蓓² (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江省中药研究所有限公司, 杭州 310023)

摘要: 目的 研究积雪草有效成分积雪草苷的抗纤维化作用。方法 建立猪血清致大鼠免疫性肝纤维化模型, 设正常组、模型组、 γ 干扰素组、积雪草苷高、中、低剂量组(0.9, 0.3, 0.1 g·kg⁻¹), 检测大鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)以及肝组织中羟脯氨酸(Hyp)的含量, HE 及 Masson 染色观察肝组织病理学变化, 并且对纤维化程度进行半定量评分。结果 积雪草苷能显著降低大鼠血清中的 ALT、AST 水平以及肝组织中的 Hyp 水平; 积雪草苷各剂量组均能减轻大鼠肝组织的纤维化程度, 其中高剂量组尤为显著($P<0.01$)。结论 积雪草苷具有抗免疫性大鼠的肝纤维化作用, 且呈现出一定的量效关系。

关键词: 积雪草苷; 肝纤维化; 猪血清; 丙转氨酶; 谷草转氨酶; 羟脯氨酸

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2017)05-0666-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.05.007

引用本文: 赵嗣霞, 张如松, 杨苏蓓. 积雪草苷抗大鼠免疫性肝纤维化作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 666-670.

Study on Effects of Asiaticoside Against Hepatic Fibrosis in Rats

ZHAO Sixia¹, ZHANG Rusong¹, YANG Subei² (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To research the effect and mechanism of asiaticoside from *Centella asiatica* (L.) Urban on rats with hepatic fibrosis. **METHODS** Hepatic fibrosis model was induced by intracutaneous injection of swine serum. The rats were divided into normal group, model group, γ -interferon group, and asiaticoside group with the dose of 0.9, 0.3, 0.1 g·kg⁻¹. The content of alanine aminotransferase(ALT) and aspartate aminotransferase(AST) in serum and liver hydroxyproline(Hyp) from hepatic tissue were detected. The pathological change of hepatic tissue were observed by HE and Masson staining, and the extent of fibrosis by semi quantitative score were evaluated. **RESULTS** The levels of ALT, AST in serum and Hyp in liver tissue were decreased obviously by asiaticoside. All asiaticoside groups could reduce the extent of fibrosis, significantly in the high dose group($P<0.01$). **CONCLUSION** Asiaticoside has the raputic effect on immune hepatic fibrosis which shows a dose-dependent manner.

KEY WORDS: asiaticoside; hepatic fibrosis; swine serum; ALT; AST; Hyp

肝纤维化是指肝脏纤维结缔组织的过度沉积, 是纤维增生和纤维分解失衡的结果, 是多种原因引起的慢性肝损害所致的病理改变, 是慢性肝病发展到肝硬化的必经阶段^[1]。阻断或逆转病理性肝纤维化是预防肝硬化导致的肝脏功能丧失的重要治疗措施, 但目前仍缺乏有效的药物。近年来, 中药治疗肝纤维化、肝硬化逐渐被人们重视^[2], 许多中药已应用于临床治疗, 取得了一些令人瞩目的进展。

积雪草为伞形科植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 的全草, 具有清热利湿、解毒消肿的功效^[3], 在民间用于肝炎、肝硬化的治疗。积雪草苷为积雪草的主要有效成分, 具有抑制成纤维细胞增殖、促进伤口愈合、抗溃疡、抗抑郁等多种药

理作用^[4]。本研究采用猪血清致大鼠肝纤维化模型, 通过检测大鼠血清中丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)以及肝组织中羟脯氨酸(Hyp)的含量, 并且观察肝组织病理学变化, 进一步评价积雪草苷的抗纤维化作用。

1 材料

1.1 动物

健康 Wistar 大鼠 60 只, ♂, SPF 级, 体质量 (100±20)g, 由浙江省医科院实验动物中心提供, 普通饲料喂养, 动物许可证号: SCXK(浙)2014-0001。

1.2 药品

积雪草苷(南宁维康医药科技有限公司, 批号: 20150915, 含量: 92.5%); γ 干扰素(上海克隆生物

作者简介: 赵嗣霞, 女, 硕士生 Tel: 15968845336 E-mail: 1422551821@qq.com

高技术有限公司, 批号: 20150404, 规格: 每瓶 1 000 000 U); 精制猪血清(上海纬群生物技术有限公司, 批号: 20150805); Hyp 标准品(杭州昊天生物技术有限公司, 批号: 20160205); ALT 试剂盒(批号: 20160105)、AST 试剂盒(批号: 20160329)均购自宁波塞克生物技术有限公司。

1.3 试剂

95%乙醇(杭州长征化工厂, 批号: 20141020); 丙酮(衢州巨化试剂有限公司, 批号: 20151103); 柠檬酸(如皋市金陵试剂厂, 批号: 20141012); 氯胺 T(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20160301); 三水合乙酸钠(温州润华化工实业公司, 批号: 20150609); 对二甲氨基苯甲醛(上海三爱思试剂有限公司, 批号: 20150411); 乙二醇甲醚(上海化学试剂采购供应五联化工厂, 批号: 20150708); 高氯酸(上海金鹿化工有限公司, 批号: 20140521); 盐酸(衢州巨化试剂有限公司, 批号: 20140807); 氢氧化钠(杭州萧山化学制剂厂, 批号: 20151225); 冰醋酸(汇普化工仪器有限公司, 批号: 20140716)。

1.4 仪器

Thermo Shandon 自动脱水机(英国 SHANDON 公司); MICROM HM340E 石蜡切片机(德国 MICROM 公司); BMJ-III 型包埋机(常州中威电子仪器厂); Leica DM LB2 显微镜(德国 Leica 公司); AB104-N 型电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); ANALYTECH-738PLU 半自动生化仪(上海安泰分析仪器有限公司); TD5A-WS 台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); HH-2 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司); WH-861 漩涡混合器(江苏太仓市华美生化仪器厂)。

2 方法

2.1 药物配制

积雪草苷配制: 积雪草苷粉末溶于水中, 每 5 g 加植物油和吐温各 1 滴助溶, 分别配成浓度为 10, 30, 90 mg·mL⁻¹ 的溶液。

阳性药配制: 将 100 万单位的 γ 干扰素干粉溶于 5 mL 的灭菌生理盐水, 制备成 2×10^5 U·mL⁻¹ 的 γ 干扰素注射液。4 °C 冰箱保存备用。

2.2 模型制备及分组

Wistar 大鼠 60 只, 随机分为正常组、模型组、

γ 干扰素组(1×10^4 U·kg⁻¹)、积雪草苷高、中、低剂量组(0.9, 0.3, 0.1 g·kg⁻¹)。其中正常组 8 只, 模型组 12 只, 其余各组各 10 只。按文献方法制备猪血清致免疫性肝纤维化模型, 即每只大鼠腹腔注射 0.5 mL 精制猪血清, 每周 2 次, 持续 8 周, 正常组大鼠注射 0.5 mL 生理盐水作为对照^[4]。4 个给药组均从造模的第 1 天开始给药, 积雪草苷各剂量组采用灌胃给药, 给药量为 1 mL·(100 g)⁻¹, γ 干扰素组采用肌肉注射给药, 正常组和模型组给予等量的蒸馏水。

2.3 样本采集与处理

实验持续 8 周, 用药期间各组动物每 3 d 称重 1 次; 最后一次造模后, 禁食 12 h, 眼眶取血, 静置 30 min, 血液凝固后, 于 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上层血清, 用以测定 ALT、AST。低温处死动物后, 摘除肝脏, 称重后, 切取肝左叶的相同部位, 置于 10% 甲醛固定后, 脱水、包埋、切片, 进行 HE 染色和 Masson 染色, 于光镜下观察, 进行组织病理学评价, 并使用 Motic Images Advanced 3.0 测试系统软件对其进行定量分析。剩余的肝组织加少量生理盐水碾磨成肝匀浆, 脱脂烘干后, 磨成肝粉, 测定 Hyp。

2.4 观察指标及测定方法

2.4.1 对大鼠一般情况及体质量的观察 每天观察大鼠的一般症状, 包括饮食变化, 行为(自主活动, 精神状态)及毛发变化, 记录体质量, 并计算肝脏指数。肝脏指数=肝脏湿重/空腹体质量 $\times$ 100%。

2.4.2 大鼠血清肝功能指标的测定 按试剂盒说明书操作, 采用赖氏法^[5]测定 ALT、AST 水平。

2.4.3 大鼠肝纤维组织标志物 Hyp 含量测定 Jamall 法测定肝组织中 Hyp 含量。

2.4.4 疗效判定 大鼠肝组织病理学评价, 采用半定量计分系统, 通过对 HE 染色、Masson 染色切片的组织病理学观察, 对肝组织纤维化程度进行量化处理, 进而评估药物对肝纤维化的治疗效果^[6]。具体标准见表 1。

肝表面纤维化程度半定量处理: 于 10 倍镜下, 随机对各组 Masson 染色切片截取 3 个不同的视野, 利用 Motic Images Advanced 3.0 测试系统软件对肝表面纤维束进行周长(C)与面积的测定, 用单位视野内纤维束总面积(S)和各条纤维束面积与周长的比值(S/C)作为肝组织表面纤维沉积程度的量

度, 进而来判断积雪草苷的治疗效果。

表 1 纤维化半定量计分系统

Tab. 1 Semi quantitative scoring system

记分	小叶(L)	汇管区	纤维间隔	
	静脉周/窦周	(P)	数量(N)	宽度(W)
0	无	无	无	—
1	局限, 少数	扩大无隔	≤6/10 mm	细
2	弥散, 多数	扩大有隔	≥6/10 mm	疏松, 宽
3	—	肝硬化	肝硬化	致密, 宽
4	—	—	—	≥2/3 活检面积

注: 纤维化程度计分= $L+P+2\times(N\times W)$ 。

Note: fibrosis degree score= $L+P+2\times(N\times W)$ 。

2.5 统计方法

采用 EXCEL 统计软件进行统计学处理, 各计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异以 t 检验进行统计学处理。

3 结果

3.1 积雪草苷对大鼠一般情况的影响

正常组大鼠毛色光泽, 粪便成形; 模型组大鼠毛发蓬松, 无光泽, 粪便常常呈稀湿状, 易激怒; 各给药组大鼠毛发较模型组大鼠良好, 粪便基本成型, 干燥, 偶见黏湿现象。各组大鼠间的体质量以及肝脏指数无明显差异, 结果见表 2。

表 2 积雪草苷对肝纤维化大鼠体质量、肝重及肝脏指数的影响

Tab. 2 Effects of asiaticoside on the change of body weight, liver weight and liver coefficient of rats with hepatic fibrosis

组别	<i>n</i>	体质量/g	肝重/g	肝脏指数
正常组	8	321±16	10.7±0.8	3.33±0.24
模型组	12	303±25	11.1±0.9	3.36±0.35
γ 干扰素组	10	316±10	11.2±0.3	3.53±0.21
积雪草苷低剂量组	10	311±23	11.1±1.3	3.57±0.77
积雪草苷中剂量组	10	319±14	11.1±1.0	3.50±0.47
积雪草苷高剂量组	10	306±13	10.6±1.5	3.47±0.64

3.2 积雪草苷对大鼠血清指标的影响

模型组大鼠血清中的 ALT 以及 AST 活性明显高于正常大鼠($P<0.01$)。各给药组的 ALT 与 AST 含量均低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 3。

3.3 积雪草苷对大鼠肝组织中 Hyp 含量的影响

模型组大鼠肝组织中 Hyp 含量明显高于正常大鼠($P<0.01$)。与模型组相比, 各给药组均能显著降低模型 Hyp 水平($P<0.01$), 明显减轻猪血清诱导的大鼠慢性肝损伤。结果见表 3。

表 3 积雪草苷对肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST 和肝组织中 Hyp 的影响

Tab. 3 Effects of asiaticoside on AST, ALT in serum and Hyp in liver tissue of hepatic fibrosis rats

组别	<i>n</i>	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	Hyp/μg·g ⁻¹
正常组	8	53.2±5.2 ²⁾	121±24 ²⁾	65±12 ²⁾
模型组	12	85.5±12.5	195±36	147±19
γ 干扰素组	10	60.9±14.1 ²⁾	130±22 ²⁾	85±22 ²⁾
积雪草苷低剂量组	10	71.6±6.3 ¹⁾	166±19 ¹⁾	112±25 ²⁾
积雪草苷中剂量组	10	68.6±11.9 ¹⁾	150±26 ²⁾	99±15 ²⁾
积雪草苷高剂量组	10	64.8±8.8 ²⁾	142±18 ²⁾	92±11 ²⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

3.4 积雪草苷对大鼠肝脏形态的影响

正常组肝脏呈红褐色, 表面光滑, 质软; 模型组肝脏明显肿胀, 粗糙, 色苍黄, 部分肝表面呈结节状, 质硬, 油腻; γ 干扰素组和各积雪草苷给药组部分肝脏轻度肿大, 黄褐色, 表面尚光滑。

3.5 积雪草苷对大鼠肝脏组织病理学的影响

正常组肝脏结构正常, 肝细胞索围绕中央静脉呈放射状排列, 未见明显病变, 肝细胞结构完整, 其围绕中央静脉呈放射状排列, 未见假小叶形成和大量纤维束的沉积; 模型组肝脏组织破坏, 肝细胞明显肿胀变性, 部分气球样变性, 其中多为脂肪变性、小灶性坏死, 部分肝细胞呈结节样再生, 门脉区及坏死区纤维组织大量增生, 包绕肝细胞形成大小不等的假小叶, 假小叶间隔明显增宽, 大量纤维沉积; 积雪草苷低剂量组与模型组比较, 病变程度有所减轻, 但汇管区仍可见大量炎性细胞浸润, 肝细胞可见点状和片状坏死, 纤维细胞明显增生, 有大量纤维沉积; γ 干扰素组和积雪草苷中、高剂量组与模型组比较, 肝组织结构较为完整, 肝细胞坏死程度明显减轻, 假小叶形成明显较少, 假小叶间隔稍有增宽, 纤维沉积明显减少。结果见图 1~2。

3.6 积雪草苷对大鼠肝组织纤维化程度的影响

在光镜下观察比较各组大鼠肝脏 Masson 染色切片, 参照 SSS 系统对其进行纤维化半定量计分。结果正常组、模型组、γ 干扰素组、积雪草苷低、中、高剂量组的半定量计分分别为 0, 13.3±4.6, 7.6±2.4, 11.8±3.6, 9.4±2.7, 8.5±2.8。

利用 Motic Images Advanced 3.0 测试系统软件测量 Masson 染色切片视野下的纤维面积(S)和周长(C), 计算 S 与 S/C , 进而考查积雪草苷对肝表面纤维的治疗效果。结果见表 4。

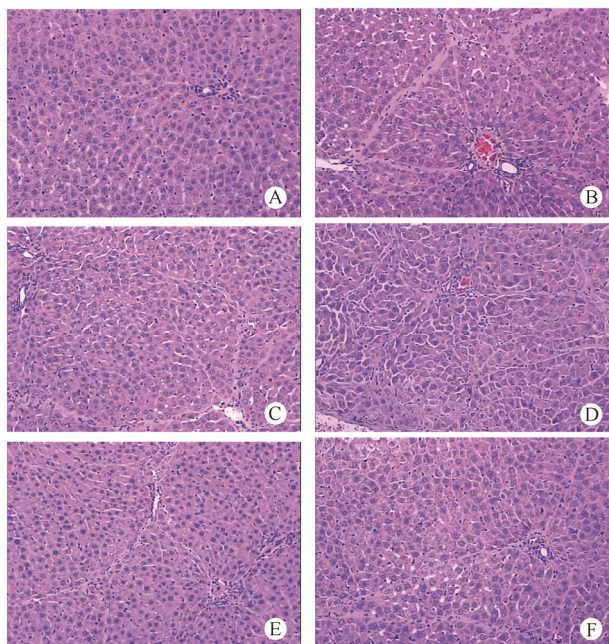


图 1 积雪草苷对肝纤维化大鼠肝组织病理学的影响(HE 染色)

A-正常组; B-模型组; C- γ 干扰素组; D-积雪草苷低剂量组; E-积雪草苷中剂量组; F-积雪草苷高剂量组。

Fig. 1 Effects of asiaticoside on liver histopathology in hepatic fibrosis rats (HE staining)

A-normal group; B-model group; C- γ -interferon group; D-asiaticoside low-dose group; E-asiaticoside middle-dose group; F-asiaticoside high-dose group.

表 4 各组大鼠肝脏表面纤维表现比较

Tab. 4 Effect of asiaticoside on the degree of fiber proliferation among each rats

组别	n	S/mm ²	S/C
正常组	8	0	0
模型组	12	0.057 6 $\pm$ 0.012 ³⁾	103.4 $\pm$ 9.0 ³⁾
γ 干扰素组	10	0.020 2 $\pm$ 0.009 9 ²⁾³⁾	67.0 $\pm$ 5.7 ²⁾³⁾
积雪草苷低剂量组	10	0.047 8 $\pm$ 0.004 7 ³⁾	95.5 $\pm$ 11.1 ³⁾
积雪草苷中剂量组	10	0.035 0 $\pm$ 0.009 2 ¹⁾³⁾	87.9 $\pm$ 6.9 ¹⁾³⁾
积雪草苷高剂量组	10	0.028 4 $\pm$ 0.005 8 ²⁾³⁾	80.6 $\pm$ 15.2 ²⁾³⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与正常组比较, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with normal group, ³⁾ $P<0.01$.

4 讨论

肝纤维化是肝脏纤维性结缔组织异常增生, 进而肝脏内弥漫性纤维结缔组织过度沉积, 是慢性肝病发展到肝硬化必经之阶段^[7]。近年来的研究表明, 在有效的病因治疗基础上, 抗纤维化治疗不仅可以抑制肝纤维化的进一步发展, 而且能够一定程度的逆转肝纤维化甚至早期肝硬化病变^[8-9]。

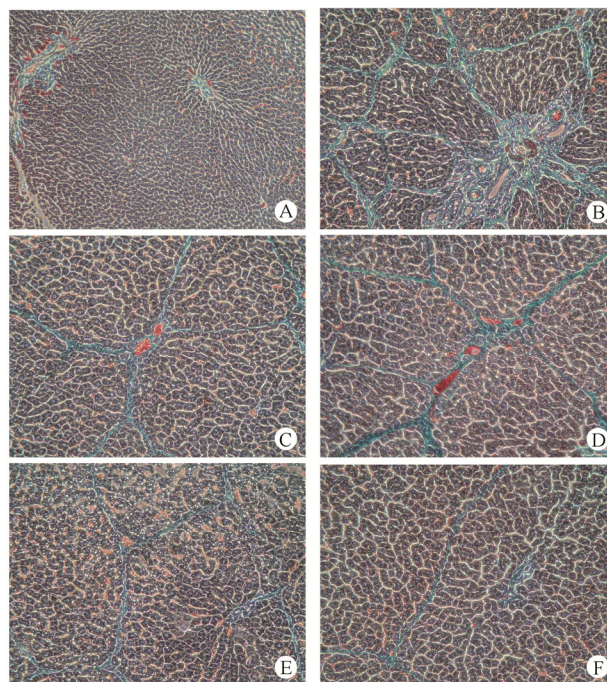


图 2 积雪草苷对肝纤维化大鼠肝组织病理学的影响(Masson 染色)

A-正常组; B-模型组; C- γ 干扰素组; D-积雪草苷低剂量组; E-积雪草苷中剂量组; F-积雪草苷高剂量组。

Fig. 2 Effects of asiaticoside on liver histopathology in hepatic fibrosis rats (Masson staining)

A-normal group; B-model group; C- γ -interferon group; D-asiaticoside low-dose group; E-asiaticoside middle-dose group; F-asiaticoside high-dose group.

本实验建立的猪血清致大鼠肝纤维化模型与免疫性肝纤维化的形成有关, 与人类慢性肝炎中肝纤维化的发生相似。猪血清蛋白作为抗原刺激大鼠, 可产生抗猪血清蛋白抗体, 并形成免疫复合物, 从而激活补体。由于抗原反复、长期的刺激, 过量的免疫复合物来不及被清除, 沉积于肝窦和肝血管壁内外, 引起炎症细胞浸润, 释放炎症介质, 导致血管炎和血管周炎, 形成广泛的进行性慢性炎症病变, 造成肝细胞变性、坏死, 肝细胞纤维增生等变化, 最终形成免疫性肝纤维化大鼠^[10]。

血清 ALT、AST 水平在一定程度上能反应出肝组织的炎症状况以及损伤程度。Hyp 是胶原蛋白的特有成分之一, 而胶原蛋白是肝组织纤维化基质中最主要的成分, 通过测定肝组织中 Hyp 的含量可以间接反应出纤维化的程度。肝脏组织病理学观察, 并在此基础上, 结合定量计分分析是诊断肝纤维最为直接和有效的方法。

γ 干扰素是目前研究最广泛的抗纤维化细胞因

子。 γ 干扰素是由活化的T细胞产生,可抑制肝组织成纤维细胞增殖,减少细胞外基质合成,是肝纤维化的主要抑制因子^[11-12]。

本研究结果显示,猪血清致免疫性肝纤维化模型大鼠血清中的ALT、AST含量和肝组织中的Hyp含量均升高,以及肝组织纤维化程度明显增高,表明本实验成功建立了肝纤维化大鼠模型。与模型组比较,积雪草苷各剂量组能显著降低大鼠血清中的ALT、AST水平,显著降低大鼠肝组织中的Hyp水平,其中中、高剂量组能显著减轻肝组织的病变,明显减少胶原纤维,其效果与阳性药 γ 干扰素相当。研究结果提示,积雪草苷具有明显的抗免疫性肝纤维化作用,为中药积雪草临床治疗肝纤维化提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] XIA H S, CHEN S R, ZHONG Y C, et al. Pathogenesis of liver fibrosis and its treatment status [J]. China Med Her(中国医药导报), 2014, 11(18): 162-165.
- [2] ZHANG Y, YANG Z Y, LI J, et al. Chemical constituents in anti-hepatic fibrosis extracts from root of *Prismatomeris tetrandra* (Roxb.) K. Schum [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2016, 25(24): 2868-2870.
- [3] 丁元, 张翥, 王锁刚. 积雪草苷的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(3): 697-699.
- [4] YANG G, TAN J J, CHEN H J, et al. The blocking effects of glucoside of *Centella asiatica* on rat liver fibrosis induced by CCl_4 [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol(胃肠病学和肝病学杂志), 2009, 18(5): 397-399.
- [5] ZHENG Y Y, PENG Z Y, LI N, et al. An experimental study on effects of HS against hepatic fibrosis in rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2010, 28(2): 322-325.
- [6] ZHOU X D, LIU Q T. Improving effect of total flavone from *Litchi chinensis* on the hepatocyte injury in liver fibrosis model rats [J]. Chin Pharm(中国药房), 2015, 26(22): 3099-3102.
- [7] PAN T L, WANG P W, HUANG C, et al. Herbal formula, *Scutellariae Radix* and *Rhei Rhizoma* attenuate dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in a rat model [J]. Sci Rep, 2015(5): 11734. Doi: 10.1038/srep11734.
- [8] 张国民, 王鑫, 赵新辉. 肝纤维化形成机制的研究进展[J]. 中国健康月刊, 2011, 30(8): 56-58.
- [9] ISMAIL M H, PINZANI M. Reversal of liver fibrosis [J]. Saudi J Gastroenterol, 2009(15): 72-79.
- [10] 陈家, 顾丰华, 刘翔, 等. 鳖甲煎丸对猪血清所致大鼠免疫性肝纤维化的治疗作用[J]. 上海中医药大学学报, 2013, 27(1): 69-73.
- [11] HONG L, ERIC R, DONNA H, et al. Transforming growth factor β neutralization ameliorates pre-existing hepatic fibrosis and reduces cholangiocarcinoma in thioacetamide-treated rats [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54499. Doi: 10.1371/journal.pone.0054499.
- [12] LIU J Q, HU D H, ZHANG Z F, et al. Effect of IFN- γ on mRNA level of connective tissue growth factor in fibroblasts [J]. J Fourth Mil Univ(第四军医大学学报), 2008, 29(23): 2131-2133.

收稿日期: 2016-11-23
(本文责编: 曹粤锋)