

体外培育牛黄制剂对实验性血吸虫病家兔肝纤维化组织细胞外基质的影响*

梁志鹏 杨 镇 蔡红娇 邹卫龙 李崇健 李 涛

华中科技大学同济医学院附属同济医院外科(武汉 430030)

【摘要】 目的 探讨体外培育牛黄制剂(*in vitro* cultivated calculus bovis compound preparation, ICCBco)对血吸虫性家兔肝纤维化组织细胞外基质的影响。方法 血吸虫尾蚴皮肤敷贴法感染 14 只家兔构建肝纤维化模型。其中 7 只家兔于感染后 40 d 开始给予 ICCBco 饲料喂养至 90 d。分别用 Masson 染色法及图像分析仪测定肝组织胶原纤维的含量。结果 血吸虫性家兔肝组织胶原纤维含量健康对照组明显增加(20.37 ± 1.31 vs 4.72 ± 0.85 , $P < 0.01$), ICCBco 干预组肝脏的胶原含量比模型组明显降低(7.25 ± 0.78 vs 20.37 ± 1.31), 差异有显著性($P < 0.05$)。结论 体外培育牛黄制剂可以明显减轻血吸虫病肝纤维化程度, 对肝纤维化有治疗作用。

【关键词】 体外培育牛黄复方制剂 肝硬化 血吸虫病 胶原 三色胶原染色法

The effects of *in vitro* cultivated calculus bovis compound preparation (ICCBco) on extracellular matrix in rabbit experimental liver fibrosis induced by with schistosomia japonicum Liang Zhipeng, Yang Zhen, Cai Hongjiao, et al. Department of Surgery, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030

【Abstract】 Objective To investigate the effect of *in vitro* cultivated calculus bovis compound preparation (ICCBco) on extracellular matrix in rabbit experimental liver fibrosis induced by with schistosomia japonicum. **Methods** The model of liver fibrosis was percutaneously induced by the infection of cercaria of s. japonicum in rabbits. Seven rabbits with liver fibrosis was treated with ICCBco orally for beginning at 40 days after infection. Masson trichome was used to detect the expression of collagen, and the results were analyzed by image analysis system. **Results** Increased content of collagenous fiber was detected in rabbits with schistosomiasis (20.37 ± 1.31 vs 4.72 ± 0.85), which was reversed by ICCBco therapy (7.25 ± 0.78 vs 20.37 ± 1.31). According to image analysis, collagen expression significantly decreased after therapy. **Conclusion** ICCBco can effectively protect liver from deposition of collagen and fibrosis.

【Key words】 *In vitro* cultivated calculus bovis compound preparation Liver cirrhosis Schistosomiasis Collagenous fibre Masson's trichrome stain

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的大量沉积是肝硬化最基本的病理改变,是由于基质蛋白合成增加和基质降解受抑制的结果。近年来临床有应用天然牛黄护肝、利胆、治疗黄胆性肝炎及四氯化碳导致的肝损害的零星报道,但对其基础研究及作用机制的研究报道则极少,其作用途径及分子生物学机制也有待进一步研究证实。本实验通过血吸虫尾蚴皮肤敷贴法感染家兔构建肝纤维化模型,应用体外培育牛黄复合制剂(*in vitro* cultivated calculus bovis compound preparation, ICCBco)进行干预治疗,旨在探讨体外培育牛黄制剂对肝纤维化肝组织细胞外基质的影响及治疗作用。

1 材料与方 法

1.1 肝纤维化模型的建立 成年雄性中国大耳白兔 20 只,体重 1.5~2.2 kg,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。随机分为 3 组:健康对照组 6 只;

模型对照组 7 只; ICCBco 干预组 7 只;其中,模型对照组及 ICCBco 干预组 14 只家兔,腹部去毛,滴以含尾蚴液(200 ± 5)条/只家兔,皮肤敷贴法感染血吸虫^[1]。其中 ICCBco 干预组给以 ICCBco 喂养,600 mg/(kg·d),一次喂服;模型对照组给以单料喂养。

1.2 样本检测 家兔饲养至 90 d 时成批过量麻醉处死(1%硫喷妥钠 50 mg/kg),剖腹采集肝组织标本,相应固定,保存备检。

1.3 试剂来源及方法 ①体外培育牛黄复方制剂(*in vitro* cultivated calculus bovis compound preparation, ICCBco)主要成份为体外培育牛黄,重楼皂甙等,由同济医院体外培育牛黄实验室提供;②肝组织病理学检查:肝脏石蜡切片作 HE 染色及 Masson 三色胶原染色,Masson 三色染色结果用 HMLAS-1000 高倍率显微图像分析系统分析,每张切片选取四周及中央 5 个区域,均取该区域中胶原纤维含量最多的视野(每个视野包括 1 个中央静脉),10 倍物镜下测定胶原纤维面积百分比

* 国家自然科学基金资助项目(编号:30170920)

(胶原纤维组织面积/肝组织面积×100%),取平均值。

1.4 统计学方法 经 SPSS/PC+ 软件进行方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 实验模型 经病理解剖证实,模型对照组家兔感染成功率为 100%,没有家兔死亡。模型对照组家兔解剖见肝脏表面密布灰白色粟粒样颗粒,呈中重度纤维化;伴腹水,脾脏肿大,门静脉系统充血,扩张。

2.2 肝组织病理学改变 HE 染色显示模型对照组家兔肝脏汇管区有大量虫卵肉芽肿形成,炎性细胞聚集,大量胶原纤维形成条束状纤维隔,重新分隔肝小叶;肝板排列紊乱,肝细胞广泛空泡样变性;细小胆管和血管增生明显;ICCBco 干预组没有出现明显的纤维化和假小叶,肉芽肿较小且数目少;肝脏纤维结构存在,基本维持肝小叶结构,纤维成份局限于汇管区。

2.3 Masson 染色结果 模型对照组家兔 Masson 染色可见肝汇管区结缔组织胶原纤维呈兰绿色条索状分布,紫红色条索状为弹性纤维。汇管区周围肝细胞间可见兰绿色条索状胶原纤维和紫红色短线状弹性纤维;胶原纤维增多,大量胶原纤维沿汇管区或炎症坏死区向外延伸,形成薄厚不一的纤维间隔分隔包绕肝小叶。Masson 染色病理图像分析结果,可见模型对照组胶原纤维面积百分比明显高于对照组(20.37 ± 1.31 vs 4.72 ± 0.85 , $P < 0.01$), ICCBco 干预组胶原面积百分比比较模型对照组明显降低(7.25 ± 0.78 vs 20.37 ± 1.31 , $P < 0.05$)。

3 讨论

肝纤维化的形成过程主要取决于胶原的合成、沉积、降解和吸收的动态平衡,当胶原的合成与沉积大于降解和吸收时,肝内胶原纤维增加,形成肝纤维化。因此,细胞外基质(ECM)中胶原含量的变化是衡量药物干预肝纤维化作用的直接指标^[2,3]。

近年来关于牛黄的药理与临床研究发现,牛黄除有清热、解毒、凉肝、抗炎及抑制中枢兴奋作用外,可抑制血管通透性,疏通软化血管,增强非特异性免疫,护肝、利胆及治疗黄疸性肝炎作用;静脉注射可降低自发性高血压家兔血压,并有实验证实,牛黄具有预防四氧化碳对小鼠肝损伤的作用。实验证明体外培育牛黄能明显延长小鼠的生存时间,提高缺氧小鼠的脑、肝、心组织及血清 SOD 活性,降低 MDA 含量,并能明显减轻脑组织的病理损伤^[4,5]。我们采用体外培育牛黄及

重楼皂甙等制成 ICCBco,对血吸虫病家兔门静脉高压性血管病变进行干预治疗。

血吸虫性家兔肝纤维化是研究肝纤维较为理想的模型,符合人类肝纤维化自然病程和病理发展过程^[6]。本研究采用日本血吸虫尾蚴感染中国大耳白兔得到了较为理想的血吸虫病性肝纤维化病变模型,病理证实感染 90 d 时,中重度肝脏纤维化及门静脉血管病变已经基本形成,HE 染色及 Masson 染色显示肝脏大量胶原沉积是肝纤维化基本病理学改变,是公认血吸虫病性肝纤维化门静脉高压血管病变。研究结果显示,ICCBco 干预组没有出现明显的纤维化和假小叶,肉芽肿较小且数目少;肝脏纤维结构存在,基本维持肝小叶结构,纤维成份局限于汇管区。模型对照组家兔 Masson 染色可见肝汇管区结缔组织胶原纤维呈兰绿色条索状分布,紫红色条索状为弹性纤维,汇管区周围肝细胞间可见兰绿色条索状胶原纤维和紫红色短线状弹性纤维;胶原纤维增多,大量胶原纤维沿汇管区或炎症坏死区向外延伸,形成薄厚不一的纤维间隔分隔包绕肝小叶。模型对照组胶原纤维面积百分比明显高于对照组($P < 0.01$), ICCBco 干预组胶原面积百分比比较模型对照组明显降低。

研究表明,ICCBco 可减少胶原纤维在血吸虫病家兔肝组织肝脏的病理性沉积,使胶原蛋白含量明显下降,对实验性血吸虫病家兔肝纤维化具有明显的治疗作用,但 ICCBco 如何使胶原的降解增加而发挥其抗肝纤维化的作用,其干预的作用机制和途径如何有待于进一步深入研究。

参考文献

- 1 杨 镇,裘法祖,王在华,等. 家兔血吸虫病模型的建立及其特点. 中华实验外科杂志,1993,10(6):145
- 2 Kershenovich D, Vargas F, Garcia - Tsao G, et al. Colchicine in the treatment of cirrhosis of the liver. N Engl J Med, 1988,318(26):1709
- 3 Olds GR, Finegan C, Kresina TF. Dynamics of hepatic glycosaminoglycan accumulation in murine Schistosoma japonicum infection. Gastroenterology, 1986,91(6):1335
- 4 蔡虹娇,裘法祖,刘仁则,等. 体外培育牛黄的药学研究. 中国天然药物杂志,2004,2(6):335
- 5 Chojkier M, Lyche KD, Filip M. Increased production of collagen *in vivo* by hepatocytes and nonparenchymal cells in rats with carbon tetrachloride - induced hepatic fibrosis. Hepatology, 1988,8(4): 808
- 6 Kresina TF, He Q, Zern MA, et al. Hepatic fibrosis and gene expression changes induced by praziquantel treatment during immune modulation of schistosoma japonicum infection. Parasitology, 1993, 107:397

(收稿日期:2005-03-22 编辑:庄晓文)

《广东医学》欢迎您订阅、投稿、刊登广告