

五味子藤茎提取物抗大鼠肝纤维化作用及机制探讨

胡彦武^{1*}, 刘凯², 闫梦彤², 王雷¹, 刘明冬¹, 于俊林¹, 武子敬¹

(1. 通化师范学院 制药与食品科学学院, 吉林 通化 134002; 2. 吉林大学 药学院, 长春 130021)

[摘要] 目的:观察五味子藤茎提取物抗四氯化碳(CCl₄)及乙醇所致肝纤维化的作用及机制。方法:50只Wistar大鼠随机分为正常组、模型组、五味子藤茎提取物高、中、低剂量组,采用ip CCl₄,并饮用乙醇、饲用高脂饲料等复合因素制造肝纤维化模型,造模后,给药组分别ig高、中、低不同剂量(5.0,2.5,1.25 g·kg⁻¹)五味子藤茎提取物,正常组和模型组灌服等量的生理盐水。末次给药后,检测血清丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST)活性,层粘蛋白(LN),透明质酸(HA),Ⅲ型前胶原(PCⅢ)水平,同时取大鼠肝组织,分别用于苏木素-伊红(HE)染色观察病理变化,蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测转化生长因子-β₁(TGF-β₁),α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清AST,ALT活性及HA,LN,PCⅢ水平均显著升高,肝组织TGF-β₁,α-SMA蛋白表达水平显著增高(P<0.01);与模型组比较,五味子藤茎提取物能显著降低肝纤维化大鼠血清ALT,AST活性及HA,LN,PCⅢ水平,病理组织学检查结果显示,五味子藤茎提取物各剂量组大鼠肝组织结构明显改善,肝纤维化程度减轻,五味子藤茎提取物各剂量组均可显著降低肝组织TGF-β₁,α-SMA蛋白表达水平(P<0.01)。结论:五味子藤茎提取物对CCl₄及乙醇所致肝损伤有明显保护作用,其机制可能与降低肝组织TGF-β₁,α-SMA蛋白表达、抑制肝星状细胞活化有关。

[关键词] 五味子; 藤茎提取物; 转化生长因子-β₁; α-肌动蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)17-0122-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016170122

Anti-hepatic Fibrosis Effect and Mechanism of Schisandrae Chinensis Fructus Caulis Extract on Liver Fibrosis in Rats

HU Yan-wu^{1*}, LIU-Kai², YAN Meng-tong², WANG Lei¹, LIU Ming-dong¹, YU Jun-lin¹, WU Zi-jing¹

(1. College of Pharmaceutics and Food Science, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China;

2. Pharmacy College of Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-fibrosis effects and mechanism of Schisandrae Chinensis Fructus caulis extract (SCFCE) on liver fibrosis in rats caused by CCl₄ and alcohol. **Method:** Totally 50 Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, SCFCE high, medium and low dose (5.0, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹) groups. Liver fibrosis models were established by intraperitoneal injection of CCl₄, drinking alcohol and feeding high fat diets. After modeling, the rats in treatment groups were received different concentrations of SCFCE by intragastric administration, while the rats in the normal group and model group received the same volume of normal saline. After the last administration, the levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), laminin (LN), hyaluronic acid (HA), and procollagen Ⅲ (PC Ⅲ) were detected, and their hepatic tissues were taken for HE staining. The protein expression levels of transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁), α-smooth muscle actin (α-SMA) were detected by Western blot assay. **Result:** As compared with the normal group, the levels of serum AST, ALT, HA, LN and PC Ⅲ were significantly elevated, and the protein expression levels of TGF-β₁, and α-SMA in hepatic tissues were significantly increased in the model group. As compared with the model group, the levels of serum ALT, AST, HA, LN, PC Ⅲ were significantly decreased in SCFCE groups. Histopathological test results showed that SCFCE groups could significantly improve the hepatic

[收稿日期] 20150608(014)

[基金项目] 吉林省教育厅“十一五”规划项目(吉教科合字[2008]第216号);通化师范学院科研项目(201271);通化师范学院大学生创新科研项目(201330)

[通讯作者] * 胡彦武,博士,副教授,从事心血管分子药理学方向研究,Tel:0435-3209377,E-mail:hywcz@163.com

histological structure of rats, decrease the degree of liver fibrosis, and significantly reduce the protein expression levels of TGF- β_1 , α -SMA ($P < 0.01$). **Conclusion:** SCFCE has obvious protective effects on CCl₄ and alcohol-induced liver fibrosis in rats, and its mechanism may be related to decreasing the protein expression levels of TGF- β_1 , α -SMA, and inhibiting the proliferation of hepatic stellate cells.

[**Key words**] Schisandrae Chinensis Fructus; caulis extraction; transforming growth factor- β_1 ; α -smooth muscle actin

肝纤维化是各型病毒性肝炎及慢性肝病共有的病理特征,是慢性肝炎向肝硬化发展的必经阶段,目前普遍认为,在未进入肝硬化之前,若能早期发现并予有效的药物治疗,肝纤维化病理过程可被逆转^[1]。而成功复制肝纤维化动物模型,是深入研究肝纤维化发病机制、筛选保肝及抗肝纤维化药物的前提。

五味子藤茎被《中国药典》2010 年版收载,具有益气生津、补肾养心、收敛固涩之功效^[2]。北五味子所含木脂素类成分,是预防和治疗肝炎的要药,具有明显降低肝炎患者血清转氨酶水平、保护肝细胞等药理作用^[3]。本课题组前期研究发现^[1,4],五味子藤茎中含有与五味子果实相同的木脂素类成分,且含量较高;进一步的药理实验表明^[5],五味子藤茎提取物对小鼠实验性肝损伤具有明显的保护作用。但对大鼠实验性肝纤维化是否有作用尚不清楚。因此,本研究中以四氯化碳(CCl₄)结合乙醇、高脂饲料等复合因素诱导的大鼠肝纤维化模型,研究五味子藤茎提取物对其治疗作用,并初步探讨其可能的作用机制,为开发利用五味子藤茎资源提供依据。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,SPF 级,雌雄各半,体重(200 ± 20) g,由吉林大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(吉)2007-0011。

1.2 药物与试剂 五味子藤茎,2013 年采自通化市白鸡峰,由通化师范学院制药与食品科学学院于俊林教授鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 的木质藤本茎;CCl₄(国药集团化学试剂有限公司,批号 20130601);兔抗鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 BA1401, BM1407),BCA 蛋白测定试剂盒(南京凯基生物有限公司,批号 20130908),化学发光液和硝酸纤维素膜(密理博中国有限公司,批号 20120612);丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),层粘蛋白(LN),透明质酸(HA)及Ⅲ型前胶原(PCⅢ)酶联免疫检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分

别为 20140102, 20140118, 20140106, 20140120, 20140108)。

1.3 仪器 Nikon ECLIPSE 80i 型正置显微镜及 H1650 型台式高速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司),DG5031 型酶联免疫检测仪(南京华东电子团体医疗装备有限责任公司),TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),MP21001 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),KQ-200KDB 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司)。

2 方法

2.1 五味子藤茎提取物的制备 五味子藤茎粉碎成粗粉后烘干,利用 80% 乙醇浸泡 24 h,超声提取 3 次,30 min/次,滤过,合并提取液,回收乙醇,减压蒸干,贮存备用。经 HPLC 法检测^[6],五味子甲素、五味子乙素和五味子醇甲的质量分数分别为 0.07%, 0.28%, 0.21%。

2.2 动物模型制造^[6]及给药 大鼠 50 只,雌雄各半,适应性喂养 1 周后,随机分为 5 组,分别为正常组、模型组、五味子藤茎提取物高、中、低剂量(按生药剂量 5.0, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹)组,每组 10 只。除正常组不予处理外,其他各组大鼠于实验第 1 周 ip 40% CCl₄ 橄榄油溶液,给药体积为 5 mL·kg⁻¹,此后给药体积改为 3 mL·kg⁻¹,2 次/周,连续 6 周。造模期间,以高脂饲料(20% 猪油 + 79.5% 普通饲料 + 0.5% 胆固醇)喂养,另以含 10% 乙醇的自来水作为唯一饮料。造模期间,各组动物分别 ig 给药,1 次/d,给药体积 2 mL·kg⁻¹体重,正常组和模型组 ig 等体积的蒸馏水。

2.3 指标检测

2.3.1 血清 AST,ALT,HA,LN,PCⅢ水平测定 末次给药后禁食不禁水 12 h,10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,室温静置 1 h,3 000 r·min⁻¹ 转速离心 10 min,分离血清。检测血清中 AST,ALT 活性以及 HA,LN 和 PCⅢ水平。

2.3.2 蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测肝组织中 α -SMA,TGF- β_1 蛋白的表达 取冻存肝组织 100

mg,剪成小块,加入组织裂解液裂解后,BCA 法进行蛋白定量,加 5 × 上样缓冲液煮沸 5 min 后,即可进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,经 PVDF 膜转膜,5% 脱脂奶粉封闭,α-SMA, TGF-β₁ 一抗(1:1 000) 稀释液孵育过夜,继以辣根酶标记的二抗(1:5 000) 稀释液孵育 1 h,按照 ECL 试剂盒说明书进行操作,将发光液均匀地滴在 PVDF 膜上,反应 1 min,最后将膜放入凝胶成像系统检测。结果用目的蛋白的灰度值与内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的灰度值的比值表示。

2.3.3 肝组织病理学检查 处死动物后,迅速取出肝组织,剪取各鼠肝左叶相同部位,在 10% 甲醛溶液(pH7.4)中固定,常规石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肝细胞变性 & 胶原纤维增生情况。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件包进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肝纤维化大鼠血清 AST,ALT 活性的影响

表 2 五味子藤茎提取物对肝纤维化大鼠血清 HA, LN 和 PCIII 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LN	HA	PCIII
正常	-	99.76 ± 13.73	176.75 ± 18.64	88.57 ± 10.17
模型	-	197.40 ± 20.38 ¹⁾	374.20 ± 38.66 ¹⁾	269.77 ± 31.23 ¹⁾
五味子藤茎提取物	5.0	98.07 ± 14.07 ²⁾	274.95 ± 18.78 ²⁾	119.15 ± 14.03 ²⁾
	2.5	143.79 ± 19.43 ²⁾	296.18 ± 30.15 ²⁾	143.05 ± 20.68 ²⁾
	1.25	161.80 ± 21.70 ²⁾	328.90 ± 32.46 ²⁾	211.30 ± 31.25 ²⁾

3.3 对肝纤维化大鼠肝组织结构影响 正常组大鼠肝脏内可见多个肝小叶,小叶结构完整清晰,肝板、肝窦排列整齐。模型组大鼠肝脏内可见肝实质内纤维组织明显增生,构成的纤维间隔破坏界板,包绕邻近肝小叶,小叶结构紊乱,肝细胞索排列紊乱,有假小叶形成。造模期间,经五味子藤茎提取物 5.0, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹ 剂量预防性给药后,各组大鼠肝纤维化形态学得到明显改善,肝细胞索排列紊乱及胶原纤维增生程度均显著减轻,大部分肝小叶结构接近正常。见图 1。

3.4 对肝纤维化大鼠肝组织中 α-SMA, TGF-β₁ 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠的 α-SMA, TGF-β₁ 蛋白表达明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,五味子藤茎提取物各剂量组 α-SMA, TGF-β₁ 蛋白表达水平均有所降低($P < 0.01$)。见图 2。

模型组大鼠血清 AST,ALT 活性显著高于正常组($P < 0.01$);五味子藤茎提取物各剂量组大鼠血清 AST, ALT 活性均显著低于模型组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 五味子藤茎提取物对肝纤维化大鼠血清 AST,ALT 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AST	ALT
正常	-	80.46 ± 13.20	37.48 ± 9.49
模型	-	546.73 ± 38.52 ¹⁾	436.03 ± 36.42 ¹⁾
五味子藤茎提取物	5.0	179.56 ± 21.90 ²⁾	95.52 ± 11.84 ²⁾
	2.5	251.12 ± 21.69 ²⁾	160.02 ± 19.44 ²⁾
	1.25	328.79 ± 23.81 ²⁾	187.05 ± 22.74 ²⁾

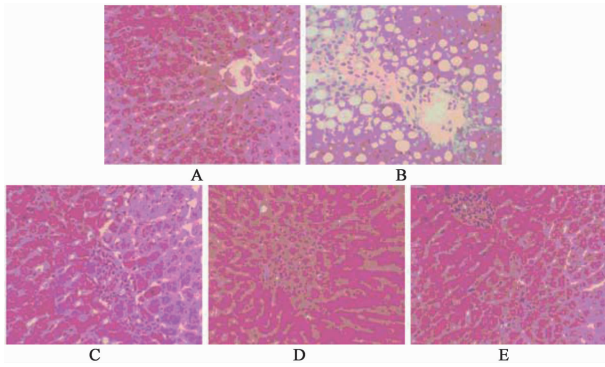
注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2,图 2 同)。

3.2 对肝纤维化大鼠血清 HA, LN 和 PCIII 水平的影响 模型组大鼠血清 HA, LN, PC III 水平显著高于正常组($P < 0.01$);五味子藤茎提取物各剂量组大鼠血清 HA, LN, PCIII 水平均显著低于模型组($P < 0.01$)。见表 2。

4 讨论

本研究以 CCl₄ 结合乙醇、高脂饲料等复合因素的方法复制大鼠肝纤维化模型,主要利用 CCl₄ 进入机体后在肝内活化成自由基,后者可直接损伤质膜,启动脂质过氧化作用,破坏肝细胞的膜性结构,进而造成肝细胞变性坏死;而乙醇可诱导肝微粒体细胞色素 P450 酶活性,从而加重 CCl₄ 对肝脏的毒性;此外,在高脂饲料和乙醇所致肝脂肪变又可加速 CCl₄ 造成的肝细胞坏死进程^[7]。

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝纤维化时细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要来源,HSCs 活化活化和增殖是肝纤维化形成的关键,与肝纤维化的发展亦关系密切,各种细胞因子通过自分泌和或旁分泌机制实现对 HSCs 的调控^[8],因此,通过抑制 HSCs 的活化增殖,对于阻止肝纤维化发展具有积极的治疗意义。有研究表明,α-SMA



A. 正常组; B. 模型组; C. 五味子藤茎提取物 5.0 g·kg⁻¹组; D. 五味子藤茎提取物 2.5 g·kg⁻¹组; E. 五味子藤茎提取物 1.25 g·kg⁻¹组 (图 2 同)

图 1 五味子藤茎提取物对肝纤维化大鼠肝组织结构的影响 (HE, ×200)

Fig.1 Effects of SCFCE on liver histopathological change in rats with hepatic fibrosis(HE, ×200)

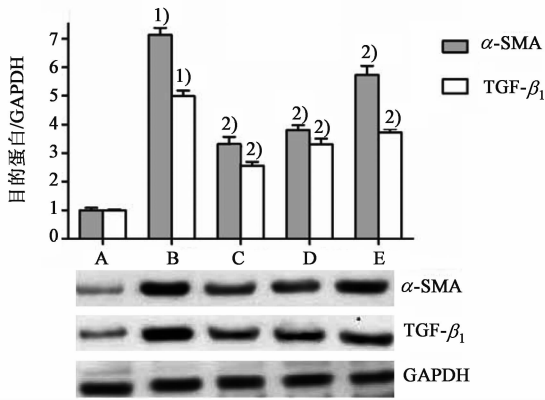


图 2 五味子藤茎提取物对肝纤维化大鼠肝组织中 α -SMA, TGF- β_1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig.2 Effects of SCFCE on expression levels of α -SMA, TGF- β_1 in liver of rats with hepatic fibrosis($\bar{x} \pm s, n = 10$)

是 HSCs 活化的重要标志物,其原因在于,肝损伤后,HSCs 被激活,转变成肌成纤维细胞,后者具增殖活性、产生纤维,并表达 α -SMA,合成大量 ECM^[9]。而 TGF- β_1 为促进肝纤维化的关键细胞因子之一,肝细胞受损后,释放的 TGF- β_1 启动和维持 HSCs 的活化,而被激活后增殖的 HSCs 通过自分泌方式使 TGF- β_1 水平持续升高,后者继续参与 HSCs 的活化和增殖、促进 ECM 的合成、抑制胶原酶及基质降解来参与肝纤维化发展过程^[10],另有研究表明,TGF- β_1 可通过抑制谷氨酰半胱氨酸连接酶的表达,进一步损伤肝细胞,尚可通过抑制肝细胞 DNA 合成,从而妨碍肝细胞再生^[11]。

本研究结果显示,五味子藤茎提取物具有保护肝纤维化模型大鼠肝功能和抗肝纤维化的作用,与

模型组比较,五味子藤茎提取物 5.0,2.5,1.25 g·kg⁻¹组大鼠血清 ATL,AST 水平均显著降低,HA, LN,PC III 等肝纤维化指标水平亦显著降低;此外,五味子藤茎提取物可抑制肝纤维化模型大鼠 α -SMA 及 TGF- β_1 的表达,Western blot 实验结果显示,五味子藤茎提取物 5.0,2.5,1.25 g·kg⁻¹组大鼠肝组织 α -SMA 及 TGF- β_1 表达情况均较模型组显著减少。上述研究结果证实,五味子藤茎提取物具有降低肝纤维化模型大鼠血清及肝组织中肝纤维化指标的作用,而其抗纤维化作用机制可能在于:通过降低 TGF- β_1 的表达,妨碍 HSCs 的活化,进而降低 α -SMA 表达水平,阻止 ECM 的产生和蓄积。上述作用机制可能仅仅是一方面,但其具体的作用机制及体内过程、尚需进一步研究探讨。

[参考文献]

[1] 于俊林,孙仁爽,胡彦武,等. 五味子藤茎木脂素含量变化规律的研究[J]. 中国中药杂志, 2009,34(2): 3239-3241.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010,61-62.

[3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999,38(6):902.

[4] 于俊林,秦璐,胡彦武,等. HPLC 法测定五味子藤茎中木脂素的含量[J]. 中草药,2003,34(10):9-10.

[5] 胡彦武,于俊林. 五味子藤茎提取物急性毒性试验及对小鼠试验性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(15):172-174.

[6] 郑亚江,周振华,任滕,等. 补肾柔肝方对肝纤维化大鼠肝组织病理学以及 α -SMA 蛋白表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2014(34):3770-3773.

[7] 魏香兰,方如塘,冀爱云,等. 高脂饲料中胆固醇含量对大鼠非酒精性脂肪肝病模型建立的影响[J]. 西北药学杂志,2012,27(3):233-236.

[8] 李映菊,汪煜华,刘映霞. 白屈菜红碱对肝纤维化大鼠肝脏 TGF- β_1 和 α -SMA 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(18):1821-1826.

[9] 吴繁荣,陈飞虎,胡伟,等. 鬼针草总黄酮抗大鼠免疫性肝纤维化作用及部分机制研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(6):753-756.

[10] 刘浩,魏伟. TGF- β 信号转导通路及其为靶点的肝纤维化治疗[J]. 中国药理学通报,2007,23(5): 561-565.

[11] 付德才,杨世忠,孙钰玮,等. 甲珠对肝纤维化大鼠 α -SMA 和 TGF- β_1 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(3):253-258.

[责任编辑 周冰冰]