

季德胜蛇药抗四氯化碳致小鼠肝纤维化的作用及机制研究

徐爱东¹, 李慧², 汤伟^{2*}, 周跃², 汪晓莺³

(1. 海门市人民医院传染科, 江苏 海门 226100; 2. 南通大学附属医院传染科, 江苏 南通 226001;
3. 南通大学医学院免疫学系, 江苏 南通 226001)

[摘要] **目的:**观察季德胜蛇药对四氯化碳(CCl₄)致小鼠肝纤维化的拮抗作用,探讨其抗纤维化的作用机制。**方法:**ICR小鼠48只随机分为正常对照组、模型组、季德胜蛇药(0.25, 0.37 g·kg⁻¹)2组。除正常组外各组小鼠均以40% CCl₄ sc共5周。自造模日起,各治疗组小鼠每日分别给予季德胜蛇药ig,正常对照组及模型组小鼠每天灌胃等量容积蒸馏水。5周后,放射免疫法检测小鼠血清透明质酸(HA)和层黏蛋白(LN)水平;Masson三色染色法观察肝组织病变。制备季德胜含药兔血清,不同体积分数的含药血清培养肝星状细胞(HSC),CCK-8法检测HSC的增殖,流式细胞仪检测HSC凋亡。**结果:**季德胜蛇药0.25, 0.37 g·kg⁻¹组小鼠肝组织纤维化程度及计分均较模型组明显减轻($P < 0.05$);季德胜蛇药0.25 g·kg⁻¹组血清HA, LN水平均明显低于模型组($P < 0.05, P < 0.01$),且0.37 g·kg⁻¹组均低于0.25 g·kg⁻¹组($P < 0.01$);与对照组比较,以10%和12.5%季德胜蛇药含药血清培养的HSC细胞的增殖率明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),而细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$)。**结论:**季德胜蛇药能抑制HSC的增殖和促进HSC凋亡,具有一定的抗肝纤维化作用。

[关键词] 季德胜蛇药; 肝纤维化; 四氯化碳; 肝星状细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0287-05

[doi] 10.11653/syfy2013190287

Effect and its Mechanism of Jidesheng Sheyao on Hepatic Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Mice

XU Ai-dong¹, LI Hui², TANG Wei^{2*}, ZHOU Yue², WANG Xiao-ying³

(1. Department of Infectious Disease, Haimen People's Hospital, Haimen 226100, China;

2. Department of Infectious Disease, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China;

3. Department of Immunology, Medical College of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of Jidesheng Sheyao, a Chinese patent medicine, on liver fibrosis of mouse caused by carbon tetrachloride (CCl₄) and to explore the action mechanism of the drug. **Method:** Forty-eight ICR mice were randomly divided into four groups: the normal control group, the model group, treatment group 1 and treatment group 2. All mice were subcutaneously injected with 40% CCl₄ for 5 weeks in order to prepare liver fibrosis model. Meanwhile, the mice of two treatment groups were given with Jidesheng Sheyao in different doses and the normal the mice of control group were given with distilled water in the same volume, by intragastric administration. The concentrations of hyaluronic acid (HA) and laminin (LN) in serum of mouse were measured with the method of radioimmunoassay. Masson trichrome staining was adopted to prepare hepatic tissue section. The pathological variations in hepatic tissue were observed under light microscope and the score of hepatic fibrosis was evaluated. The rabbits were given with Jidesheng Sheyao by intragastric administration to prepare medicated serum. The hepatic stellate cell strain (HSC-T6) was taken as the model for study *in vitro*. HSC cells were cultured with medicated serum in different concentrations. The proliferation of HSC was assessed

[收稿日期] 20121201(012)

[第一作者] 徐爱东, 副主任医师, 从事感染性疾病的临床与科研工作, Tel: 0513-82263803, E-mail: sun0982000@126.com

[通讯作者] * 汤伟, 硕士, 教授, 从事感染性疾病的临床、科研与教学工作, Tel: 0513-85052490, E-mail: tdfy16302@163.com

with CCK-8 assay. Labeled with annexin V/PI, the apoptosis of HSC was analyzed with flow cytometry. **Result:** Compare with mice of model group, the severities of fibrosis in mice in treatment groups were obviously alleviative, the levels of fibrosis score and the serum content of HA, LN of mice in treatment groups were all lower. After cultured with the medicated serum respectively in the concentration of 10% and 12%, the proliferations of HSC were obviously inhibited and the apoptosis rates of the cells were significantly increased, compared with the cells of control group cultured with normal rabbit serum. **Conclusion:** Jidesheng Sheyao can inhibit the proliferation of HSC and promote the apoptosis of HSC, so the drug has some efficacy of anti-hepatic fibrosis.

[**Key words**] Jidesheng Sheyao; hepatic fibrosis; carbon tetrachloride; hepatic stellate cell

季德胜蛇药又名南通蛇药,是著名南通蛇医专家季德胜先生祖传六世秘方,具有清热解毒、活血化瘀、消痈散肿、熄风定痉功效,对毒蛇、毒虫咬伤有很好的疗效。近年来,有临床研究报道季德胜蛇药治疗病毒性肝炎具有一定效果^[1-2]。作者前期研究已证实,季德胜蛇药具有一定的抗乙型肝炎病毒复制作用^[3]。本研究采用四氯化碳(CCl₄)制备小鼠肝纤维化模型验证了季德胜蛇药的抗肝纤维化作用,并采用血清药理学方法对其作用机制进行了初步探讨。

1 材料

1.1 药物 季德胜蛇药,粉剂,由南通精华药业有限公司提供,批号 080511。用双蒸水配制成溶液,4℃冰箱保存备用,临用前摇匀。CCl₄,南京化学试剂一厂,批号 20050510。

1.2 动物 ICR 级雄性小鼠 48 只,体重 18~22 g;中国大耳白兔,雄性,4 只,体重 3.0~3.5 kg;均由南通大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(苏)2007-0021。

1.3 细胞株 大鼠肝星状细胞(HSC)株 HSC-T6,购自上海中医药大学肝病研究所。

1.4 试剂与仪器 血清透明质酸(HA),层黏蛋白(LN)放射免疫分析测定盒(上海海研生物技术中心,批号 20080901);Masson 三色染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司,批号 080012);Cell counting kit-8 (CCK-8)试剂盒(日本同仁化学研究所,批号 00080045);AnnexinV-FITC 试剂盒(碧云天生物技术研究所,批号 c1062)。ELx800 型酶联免疫测定仪(美国仪器有限公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

2 方法

2.1 对肝纤维化小鼠的作用

2.1.1 小鼠肝纤维化模型的制备及药物干预 将 48 只 ICR 级小鼠随机分为 4 组:正常对照组、模型组、季德胜蛇药(0.25, 0.37 g·kg⁻¹)组。除正常组

外,其余各组小鼠均自实验开始之日起,按 5 mL·kg⁻¹以 40% CCl₄ 油溶液 sc, 2 次/周,持续 5 周;正常组以等量的灭菌生理盐水 sc。自造模日起开始 ig 给药,共 5 周。正常组及模型组予蒸馏水 ig。实验期间所有小鼠标准饮食,自由饮水。

2.1.2 肝纤维化标记物检测 末次给药后,所有小鼠均禁食不禁水过夜。次日晨,摘眼球取血,分离血清,以放射免疫分析法检测血清 HA, LN 含量,操作按试剂盒说明。

2.1.3 病理学检查 取血后处死各组小鼠,取肝脏左叶,10% 甲醛固定 24 h 后制片,分别作 HE 染色及 Masson 染色,光镜下观察及分析肝组织病变,参照《病毒性肝炎防治方案》^[4] 的诊断标准,确定各实验小鼠肝组织的纤维化分期,并进行半定量计分。0 级:无纤维化,计 1 分;I 级:纤维结缔组织局限于汇管区或汇管区扩大,有向小叶发展倾向,计 2 分;II 级:纤维结缔组织增生进入肝小叶 2/3,及有 I 级同样改变,计 3 分;III 级:纤维结缔组织增生进入肝小叶达中央静脉周围,计 4 分;IV 级:纤维结缔组织在全小叶呈多处弥漫性增生,并有 III 级样改变,计 5 分。

2.2 季德胜蛇药含药兔血清对肝星状细胞(HSC)的作用

2.2.1 含药兔血清的制备 正常大耳白兔 6 只,随机分为正常对照组和处理组。处理组常规饲养 1 d 后开始 ig 给药,季德胜蛇药剂量为正常成人剂量的 10 倍(1 540 mg·kg⁻¹),2 次/d,给药容量为 5 mL·kg⁻¹;正常对照组给予相同容量的生理盐水 ig。连续 7 d。末次给药前禁食 12 h,不禁水,给药 2 h 后经心脏穿刺取血,静置 1 h 后,离心分离血清。分别混合含药血清及正常血清,56℃水浴 30 min 灭活,0.22 μm 微孔滤膜过滤,分装入 EP 管,置 -20℃冻存备用。

2.2.2 HSC 的培养及传代 将 HSC-T6 细胞接种于培养瓶中,在 37℃,5% CO₂ 及饱和湿度下培养,当细胞密度约 80%~90% 时,开始传代。

2.2.3 HSC 培养液中兔血清最高添加浓度的确定^[5-6] 取指数生长期 HSC-T6 细胞,制备成密度为 1×10^5 个/ mL^{-1} 的单细胞悬液,接种于 96 孔板(100 μL /孔),置 37°C ,5% CO_2 饱和湿度培养箱内培养,待细胞长成单层细胞时,吸弃上清液,换用 100 μL 含 5%,10%,15% 和 20% 体积分数的正常兔血清和含药兔血清继续培养,每个体积分做 5 个复孔,同时设正常血清对照组(含有胎牛血清的完全 DMEM 高糖培养基)。培养 7 d,每日于倒置显微镜下观察细胞生长情况,与正常血清对照组相比,以细胞不出现退变、变形、脱落的最低添加体积分数为无毒界限,从而得出对 HSC 最小毒性的正常兔血清最大添加体积分数。

2.2.4 CCK-8 法检测 HSC 增殖^[7-8] HSC-T6 细胞培养 24 h 后细胞密度达 90% 以上,再以无血清培养基同步化培养 24 h。改用添加含药血清的培养液培养。根据 2.2.3 所得的正常兔血清的最大添加体积分数,按 2.5% 递减共设置 6 个组,每组 6 个复孔,同时设立添加相应体积分数正常兔血清对照组;另设正常血清对照组及空白孔。继续培养 12, 24 h 后每孔加入 CCK-8 10 μL , 培养 1 h 后,测定各孔吸光度($A_{450\text{nm}}$),计算各孔的细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = \frac{\text{实验组 } A_{450\text{nm}}}{\text{正常血清对照组 } A_{450\text{nm}}} \times 100\%$$

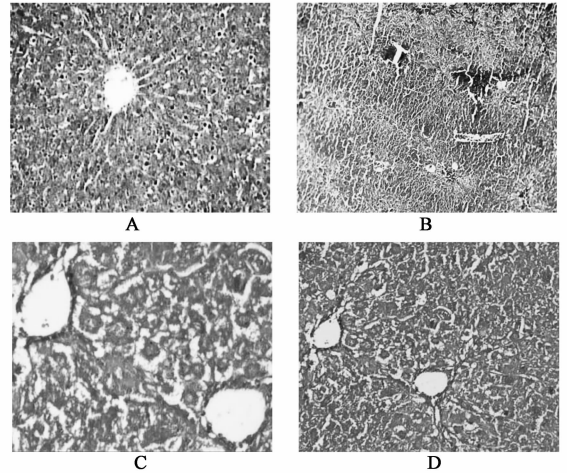
2.2.5 Annexin-V/PI 双标记流式细胞术检测 HSC 凋亡 将指数生长期的 HSC-T6 细胞制备密度为 1×10^5 个/ mL 细胞悬液,接种于 24 孔板(0.5 mL /孔)。常规培养 24 h 后,换用含兔血清的培养液培养,根据 2.2.3 的结果,共设 4 个组(10% 正常兔血清组,10% 含药兔血清组,12.5% 正常兔血清组,12.5% 含药兔血清组)。培养 24 h 后,用 Annexin-V/PI 双标记法标记细胞。将标记好的细胞置流式细胞仪检测,获取 1×10^4 个以上细胞,用 ModFitLT 软件分析结果。

2.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;等级资料组间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对肝纤维化小鼠肝组织病变的影响 肝组织切片 Masson 三色染色后光镜下观察肝组织内蓝色胶原纤维分布情况:正常组仅于血管周围可见少量蓝色纤维,细且短,模型组肝脏组织中纤维明显增

多,分布广泛,可相互连接形成较粗大的纤维间隔,多位于汇管区和血管周围,两蛇药治疗组的肝组织中可见明显的蓝色纤维,但较细,且主要走行于血管周围。2 个治疗组的肝纤维化半定量计分明显低于模型组,但两组之间无显著性差异。见图 1。



A. 正常对照组;B. 模型组;

C. 季德胜蛇药 0.25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. 季德胜蛇药 0.37 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 季德胜蛇药对肝纤维化小鼠肝组织病变的影响(Masson 染色, $\times 200$)

3.2 各组小鼠肝纤维化病变半定量计分 2 个治疗组的肝纤维化半定量计分明显低于模型组,但 2 组之间无显著性差异。见表 1。

表 1 季德胜蛇药对肝纤维化小鼠肝组织纤维化分级的影响 例

组别	n	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肝纤维化分级					平均秩次
			0	I	II	III	IV	
正常对照	10	-	12	0	0	0	0	8.50
模型	12	-	0	0	3	3	4	35.45
季德胜蛇药	12	0.25	2	3	3	2	2	26.00 ¹⁾
	12	0.37	2	4	1	3	2	26.04 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对肝纤维化小鼠血清肝纤维化指标的影响 与模型组比较,各治疗组小鼠的血清 HA, LN 水平明显降低,且季德胜蛇药 0.37 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组低于季德胜蛇药 0.25 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。见表 2。

3.4 HSC 培养液中正常兔血清的最高添加浓度 在培养液中添加 $< 15\%$ 正常大耳白兔血清对 HSC 细胞的生长无明显影响,兔血清 $> 15\%$ 培养的细胞皱缩,部分抱成团,细胞内出现颗粒和黑色絮状沉淀物。

表 2 季德胜蛇药对肝纤维化小鼠血清 HA, LN 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	ng·L ⁻¹	
			HA	LN
正常对照	10	-	289.56 ± 18.30	185.46 ± 8.40
模型	12	-	910.25 ± 41.26	392.50 ± 40.96
季德胜蛇药	12	0.25	773.13 ± 72.01 ²⁾	335.50 ± 43.73 ¹⁾
	12	0.37	533.25 ± 89.11 ^{2, 3)}	223.38 ± 58.64 ^{2, 3)}

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01; 与季德胜蛇药 0.25 g·kg⁻¹ 组比较³⁾P < 0.01。

3.5 季德胜蛇药含药血清对 HSC-T6 增殖的影响 以不同体积分数季德胜蛇药含药血清及对应正常兔血清培养 12 h 和 24 h 后, 采用 CCK-8 比色法测定 HSC 增殖情况, 10% 和 12.5% 含药兔血清组的 HSC 细胞增殖率均低于正常兔血清组, 差异显著 (P < 0.05, P < 0.01)。见表 3。

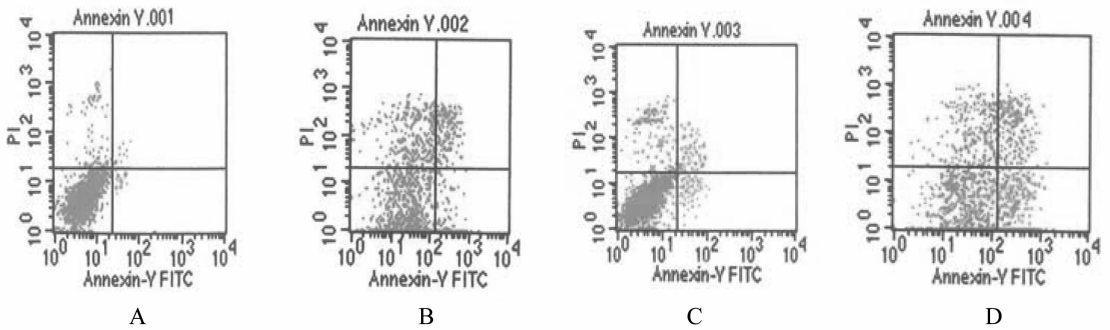
表 3 季德胜蛇药含药兔血清对 HSC-T6 细胞增殖率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

兔血清体积分数 /%	细胞增殖率			
	12 h		24 h	
	正常兔血清组	含药兔血清组	正常兔血清组	含药兔血清组
2.5	97.3 ± 5.08	93.0 ± 13.96	61.1 ± 16.2	62.0 ± 9.58
5.0	95.3 ± 11.24	90.6 ± 14.21	73.8 ± 4.97	71.5 ± 3.24
7.5	78.5 ± 15.12	64.1 ± 9.18	65.3 ± 8.22	66.4 ± 5.18
10.0	55.4 ± 12.28	40.3 ± 8.18 ¹⁾	57.4 ± 3.89	28.1 ± 5.91 ²⁾
12.5	45.3 ± 5.97	17.7 ± 8.16 ²⁾	31.9 ± 5.75	21.9 ± 8.00 ¹⁾
15.0	20.3 ± 2.84	16.8 ± 2.91	19.9 ± 4.72	12.5 ± 2.13

注:与正常兔血清组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

3.6 季德胜蛇药含药血清对 HSC-T6 凋亡的影响 10% 和 12.5% 季德胜蛇药血清作用于 HSC-T6 细胞 24 h 后, 细胞凋亡率分别为 (22.60 ±

2.38)% , (37.94 ± 2.74)% , 均明显高于相应正常兔血清对照组 (0.88 ± 0.33)% , (2.68 ± 0.68)%。见图 2。



A. 10% 正常血清; B. 10% 季德胜蛇药含药血清; C. 12.5% 正常血清; D. 12.5% 季德胜蛇药含药血清

图 2 季德胜蛇药含药血清对 HSC-T6 凋亡的影响 (n = 5)

4 讨论

肝纤维化是指肝内纤维组织异常增生, 是各种慢性肝病共用的病理学改变, 是肝组织炎症病变向肝硬化、肝癌发展的中间环节^[9]。通过抗肝纤维化治疗以减缓甚至阻止慢性肝病进展, 已成为各种慢性肝病治疗的一个重要的方面。

CCl₄ 诱导的肝损害动物模型, 其肝纤维化改变与人类肝纤维化的形态特征相似, 是经典的研究慢性肝损伤及肝纤维化的模型, 已广泛应用于慢性肝炎及肝纤维化的防治作用及其作用机制的研

究^[10-11]。治疗 5 周后, 季德胜蛇药治疗组小鼠肝组织细胞病变和纤维化程度较模型组明显减轻, 且肝纤维化半定量积分明显低于模型组; 上述结果证实了季德胜蛇药具有较好的抗肝纤维化作用。

肝脏细胞外基质 (ECM) 增多是肝纤维化形成的重要原因, HA 和 LN 都是 ECM 的重要成分, 二者的血清水平能较敏感的反映肝纤维化活动情况和程度^[12]。在本项研究中, 以 CCl₄ 橄榄油造模的各实验组小鼠血清 HA, LN 水平均显著高于正常对照组, 季德胜蛇药高、低剂量组小鼠血清 HA, LN 水平

明显低于模型组,且季德胜蛇药 $0.37\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组低于季德胜蛇药 $0.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组。现已明确,HSC 是肝脏 ECM 的主要来源细胞,当肝组织受损、肝细胞遭到破坏时,将释放大量的炎症介质和细胞因子如肿瘤坏死因子 β (TGF- β) 等,促进 HSC 活化、增殖并合成和分泌大量的 ECM 而导致肝纤维化的形成,故 HSC 是参与肝纤维化发生发展的重要细胞,在肝纤维化中发挥了关键性的作用^[13]。抑制 HSC 增殖或促进 HSC 凋亡在治疗慢性肝损伤引起的抗肝纤维化中有重要意义^[14-15]。目前,体外培养的 HSC 已成为成熟的细胞模型用于药物抗肝纤维化的研究^[16-17]。

本研究采用血清药理学方法观察到,季德胜蛇药不仅能明显抑制 HSC 的增殖,而且能促进 HSC 凋亡,且其作用强度呈浓度依赖性递增趋势。

上述研究结果表明,季德胜蛇药能够通过抑制 HSC 增殖和促进 HSC 凋亡而发挥较强的抗肝纤维化的作用。

[参考文献]

[1] 于文龙. 南通蛇药治疗慢性乙型肝炎的疗效观察[J]. 蛇志, 2003, 15(3): 52.

[2] 袁定清. 南通蛇药对亚急性重症肝炎疗效的临床观察[J]. 恩施医专学报, 1994, 11(2): 42.

[3] 孙晓雷, 丁丽娟, 汤伟, 等. 季德胜蛇药抗乙肝病毒的体外实验研究[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(4): 57.

[4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324.

[5] 杨雷, 何秋莎. 兔血清浓度对肝癌细胞系 2. 2. 15 细胞培养的影响[J]. 温州医学院学报, 2000, 30(3): 223.

[6] 张红敏, 谢春光, 陈世伟. 含药血清体外药理试验的评价[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 741.

[7] 黄兆胜, 葛峥, 施旭光, 等. 虎金颗粒对肝功能及星状细胞增殖的影响[J]. 中药材, 2006, 29(4): 362.

[8] 朱慧利, 沈薇, 陈忠勇. 柳氮磺胺吡啶对 HSC-T6 和 L02 细胞增殖和凋亡的初步观察[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(9): 1054.

[9] 徐列明. 重视肝纤维化的治疗[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(17): 1448.

[10] 吴丽, 魏伟. 肝纤维化动物模型及治疗药物研究[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(5): 48.

[11] 邵志祥, 汤伟. 抗肝胶囊对实验性大鼠肝纤维化的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 212.

[12] 彭安国, 陈东风, 冷恩仁, 等. 透明质酸、血型前胶原、层黏蛋白对肝纤维化诊断价值的研究[J]. 中国实用内科杂志, 1996, 16(8): 495.

[13] Gressner A M, WeNkirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(1): 76.

[14] Mann D A, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 2010, 52(8): 1949.

[15] Watanabe A, Sohail M A, Gomes D A, et al. Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(9): 1248.

[16] 张室志, 南伟宁, 陈兆霓, 等. 复方六月青对肝星状细胞增殖和细胞外基质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 135.

[17] 郭敏, 李佃贵. 化浊解毒含药血清对大鼠肝星状细胞增殖及细胞因子的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 263.

[责任编辑 李玉洁]