

三叶香茶菜防治大鼠肝纤维化作用机制研究

夏星¹, 覃洪含², 王勤^{1*}, 肖刚²

(1. 广西中医药大学广西中药药效研究重点实验室, 南宁 530001;

2. 右江民族医学院, 广西百色 533000)

[摘要] **目的:**探讨三叶香茶菜防治大鼠肝纤维化的作用机制。**方法:**大鼠每3 d接受一次背部sc 40% CCl₄花生油(首次5 mL·kg⁻¹,其余为3 mL·kg⁻¹),连续8周引发肝纤维化模型,造模同时每日分别给予三叶香茶菜提取物20,40,80 g·kg⁻¹灌胃。给药8周后取血,ELISA法测定大鼠血清中Ⅲ型前胶原(procollagen type Ⅲ, PCⅢ)、透明质酸(hyaluronic acid, HA)、金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)及肝脏中转化生长因子-β₁(transforming growth factor-β₁, TGF-β₁)含量;Masson染色病理切片观察肝脏胶原纤维生成。**结果:**模型组血清中HA, PCⅢ, TGF-β₁及TIMP-1含量较正常组显著升高($P < 0.01$),且MMP-2浓度显著下降($P < 0.01$)。与模型组比较,三叶香茶菜高、中剂量组能显著降低大鼠血清HA, PCⅢ, TIMP-1的含量,提高MMP-2含量($P < 0.01$);并能显著降低肝组织TGF-β₁水平($P < 0.01$)。三叶香茶菜低剂量组能显著降低大鼠血清HA, PCⅢ含量($P < 0.05$);并有降低血清TIMP-1及肝组织TGF-β₁水平,提高MMP-2含量的趋势。**结论:**三叶香茶菜能有效减轻慢性肝损伤大鼠肝纤维化程度,其作用机制可能与调节TGF-β₁水平,控制肝星状细胞释放TIMP-1及MMP-2有关。

[关键词] 三叶香茶菜; 肝纤维化; 四氯化碳

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0238-04

[doi] 10.11653/syfy2013190238

Study on Therapeutic Mechanism of *Rabdosia ternifolia* on Rat Hepatic Fibrosis

XIA Xing¹, QIN Hong-han², WANG Qin^{1*}, XIAO Gang²

(1. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of *Rabdosia ternifolia* on hepatic fibrosis in rats. **Method:** Rat hepatic fibrosis model was produced by back subcutaneous injection of 40% carbon tetrachloride (CCl₄) peanut oil, once every three days, for eight consecutive weeks, at the same time the rats were given *R. ternifolia* extract at 20, 40, 80 g·kg⁻¹ with gavage. Take blood After 8 weeks of administration, serum were collect, and the ELISA method was used for the determination of serum procollagen type Ⅲ (PCⅢ), hyaluronic acid (HA), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and liver transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁) concentration. The liver collagen fiber formation was observed by Masson staining. **Result:** Serum HA, PCⅢ, TGF-β₁ and TIMP-1 concentration were significantly raised in model group rats than normal group rats ($P < 0.01$), while MMP-2 was significantly decreased ($P < 0.01$). *R. ternifolia* at high, medium dosage significantly reduced the content of HA, PCⅢ, TIMP-1, as well as increased the content of

[收稿日期] 20130302(010)

[基金项目] 广西教育厅科研项目(201012MS152);广西科技基础条件平台建设项目《中药药效研究重点实验室建设》(10-046-04-Z16);广西自然科学基金创新研究团队项目(2011GXNSFF018006)

[第一作者] 夏星,博士,副教授,中药及天然产物药理活性及产品开发, Tel:0771-2279423, E-mail:xiaxing66@163.com

[通讯作者] *王勤, Tel:0771-3140360, E-mail:wq@gxtcmu.edu.cn

MMP-2 in serum ($P < 0.01$); and the extract significantly reduced TGF- β_1 level in liver ($P < 0.01$). The *R. ternifolia* at low dosage significantly reduces the levels of serum HA, PCIII content ($P < 0.05$); it also demonstrated a trend of decreasing serum TIMP-1 and liver TGF- β_1 content, increasing of the content of MMP-2, but the difference with the model group is not significant. **Conclusion:** *R. ternifolia* effectively alleviated the degree of the chronic liver injury in liver fibrosis rat, the mechanism may be related to the regulation of TGF- β_1 level and the controlling of the release of the TIMP-1 and MMP-2 in hepatic stellate cells.

[**Key words**] *Rabdosia ternifolia*; liver fibrosis; carbon tetrachloride

三叶香茶菜又名细叶香茶菜或三姐妹,为岭南地区常见中草药,在两广地区尤为常见,能用于黄疸型肝炎及其他炎症性疾病的治疗。以三叶香茶菜为主要原料的复方三叶香茶菜片已成功开发,并应用于临床治疗急慢性肝炎和肝损伤。有研究发现,复方三叶香茶菜片能有效地抑制四氯化碳诱导肝纤维化大鼠的肝损伤及肝脏纤维化进程,其主要机制可能与复方三叶香茶菜显著抑制 TGF- β_1 和 CTGF 的表达有关^[1-2]。三叶香茶菜本身亦具有保肝降酶作用,其乙醇提取物和乙醇提取物的 5% 盐酸可溶性组分均能明显降低 CCl₄ 所致急性肝损伤小鼠的血清 ALT 活性^[3]。本课题组的前期研究已经发现,三叶香茶菜在 20 ~ 80 g·kg⁻¹ 内能显著缓解四氯化碳诱导肝纤维化大鼠的肝损伤程度,抑制肝脏纤维化进程,但其抗肝纤维化的具体机制还未明了。本文通过实验研究探讨三叶香茶菜在四氯化碳致肝纤维化大鼠模型中的抗纤维化作用机制。

1 材料

1.1 药材与试剂 三叶香茶菜干燥药材采摘于广西金秀县,经广西中医药大学田辉教授鉴定为三叶香茶菜 *Rabdosia ternifolia* (D. Don) Hara。药材水提醇沉,过滤,滤液合并,浓缩成浸膏,冷藏备用;秋水仙碱(云南西双版纳制药厂,批号 110102),大鼠 III 型前胶原(PCIII) ELISA 试剂盒(批号 201112)及大鼠透明质酸(HA) ELISA 试剂盒(批号 201112),均为 RB 公司产品;大鼠转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) ELISA Kit(批号 228792),大鼠基质金属蛋白酶抑制物-1(TIMPI-1) ELISA Kit(批号 2887114)及大鼠总基质金属蛋白酶-2(total MMP-2) ELISA Kit(批号 306799)均由武汉博士德生物工程有限公司生产;CCl₄ 分析纯(成都市科龙化工试剂厂,批号 20110222)。

1.2 动物 雄性健康 Wistar 大鼠 72 只,SPF 级,体重 180 ~ 220 g,由广西医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号 SCXK(桂)2009-0002,批号 0006530。

1.3 仪器 Sorvall ST16R 超低温离心机(美国, Thermo Fisher 公司),DML 3000B 倒置荧光显微镜(德国,莱卡仪器有限公司),Epoch 酶标仪(美国, Biotek 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 将动物随机分成 6 组,分别为:正常组,普通喂养;模型组,背部 sc 40% CCl₄,首次 5 mL·kg⁻¹,之后每 3 天注射 1 次,每次 3 mL·kg⁻¹;秋水仙碱组,同模型组接受 CCl₄ 处理,并 ig 秋水仙碱溶液 0.2 mg·kg⁻¹;三叶香茶菜高、中、低剂量组,同模型组接受 CCl₄ 处理,同时分别 ig 三叶香茶菜 80, 40, 20 g·kg⁻¹(以生药量计)。各组动物每天 ig 1 次给药,空白组和模型组以 10 mL·kg⁻¹ ig 服用纯净水,连续 8 周。

2.2 肝脏组织纤维化病变观察 末次灌胃 24 h 后脱颈椎处死大鼠,所有大鼠取同一部位肝组织,用 4% 的多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,切片并 Maasson 染色,显微镜下观察组织学变化。按照肝纤维化依据其严重程度,分为 0 ~ 4 级:0(-)级表示无明显胶原纤维增生;1(+)级表示胶原纤维增生,中央静脉和门脉区有少量纤维索放射延伸,但无间隔形成;2(++)级表示胶原纤维明显增生,中央静脉和门脉区纤维索向周围延伸,形成不完全间隔;3(+++)级表示胶原纤维大量增生,少量菲薄完全间隔(假小叶)形成;4(++++级表示完全间隔增厚,假小叶大量形成。

2.3 血清 PCIII, HA, TIMP-1, MMP-2 水平检测 各组大鼠于末次灌胃 24 h 后腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹,离心 10 min 分离血清,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作说明测定血清中 HA, PCIII, TIMP-1, MMP-2 的含量。

2.4 肝脏中 TGF- β_1 水平检测 末次灌胃 24 h 后脱颈椎处死大鼠,取部分肝脏,用冰冷的生理盐水漂洗,以 1:9 比例制成肝匀浆,按 ELISA 试剂盒说明书所述方法测定肝匀浆中 TGF- β_1 的含量。

2.5 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采

用 *t* 检验,数据的组间比较采用秩和检验,以 SPSS 13.0 进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

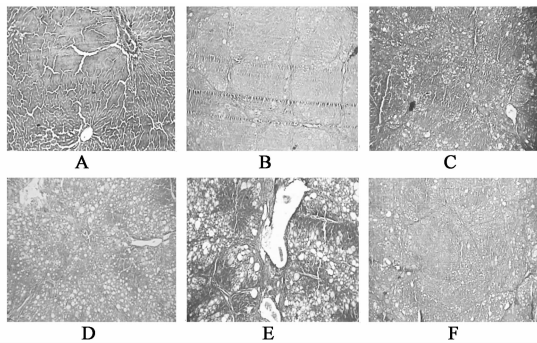
3 结果

3.1 大鼠肝纤维化水平比较 实验过程中各组动物有不同程度的死亡,根据 Masson 染色的肝纤维化评分标准,模型组肝纤维化程度与正常组比较有显著性差异($P < 0.01$);高、中剂量组肝纤维化程度显著低于模型组($P < 0.05$)。见表 1 及图 1。

表 1 三叶香茶菜对 CCl_4 致肝纤维化大鼠各组肝组织病理学评分的影响

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	肝纤维化分级各级动物数/只					P
			-	+	++	+++	++++	
正常	12	-	12	0	0	0	0	-
模型	10	-	0	0	1	4	5	1)
秋水仙碱	12	0.2 × 10 ⁻³	0	2	5	3	2	-
三叶香茶菜	11	80	0	2	5	2	2	3)
	10	40	0	2	4	2	2	2)
	10	20	0	1	1	3	5	-

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。



A. 空白组;B. 模型组;C. 秋水仙碱 0.2 mg·kg⁻¹组;
D. 三叶香茶菜 80 g·kg⁻¹组;E. 三叶香茶菜 40 g·kg⁻¹组;
F. 三叶香茶菜 20 g·kg⁻¹组

图 1 三叶香茶菜对 CCl_4 致肝纤维化大鼠各组肝组织病理学的影响(Masson, ×100)

3.2 血清肝纤维化标志物 HA, PCIII 的比较 模型组血清中 HA, PCIII 含量较正常组显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比较,秋水仙碱组和三叶香茶菜高、中、低剂量均能显著降低肝纤维化大鼠血清 HA 和 PCIII 的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

3.3 肝组织 TGF-β₁ 水平对比 与正常组比较,模型组肝组织匀浆 TGF-β₁ 含量显著高于正常组($P < 0.01$)。与模型组相比较,秋水仙碱和三叶香茶菜

高剂量($P < 0.01$)、中剂量($P < 0.05$)均能显著降低肝纤维化大鼠肝匀浆的 TGF-β₁ 的含量。见表 3。

表 2 三叶香茶菜对 CCl_4 致肝纤维化大鼠血清 HA 及 PCIII 水平的影响($\bar{x} \pm s$) μg·L⁻¹

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	HA	PCIII
正常	12	-	305.21 ± 20.66	19.24 ± 2.25
模型	10	-	341.34 ± 11.90 ¹⁾	21.71 ± 1.92 ¹⁾
秋水仙碱	12	0.2 × 10 ⁻³	312.67 ± 10.39 ³⁾	19.74 ± 2.22 ³⁾
三叶香茶菜	11	80	325.24 ± 19.98 ²⁾	18.91 ± 1.94 ³⁾
	10	40	320.99 ± 20.02 ²⁾	19.82 ± 2.43 ²⁾
	10	20	310.61 ± 12.83 ³⁾	20.17 ± 1.89 ²⁾

表 3 三叶香茶菜对 CCl_4 致肝纤维化大鼠肝组织 TGF-β₁ 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	TGF-β ₁ /ng·L ⁻¹
正常	12	-	3 759.15 ± 224.53
模型	10	-	4 505.56 ± 231.65 ¹⁾
秋水仙碱	12	0.2 × 10 ⁻³	4 130.87 ± 255.47 ³⁾
三叶香茶菜	11	80	4 041.73 ± 297.03 ³⁾
	10	40	4 283.07 ± 223.84 ²⁾
	10	20	4 436.91 ± 168.24

3.4 血清 TIMP-1 及 MMP-2 水平比较 与正常组比较,模型组血清 TIMP-1 浓度显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比较,秋水仙碱组和三叶香茶菜高、中剂量能显著降低肝纤维化大鼠血清 TIMP-1 的含量($P < 0.05$),而三叶香茶菜低剂量作用不显著。模型组血清 MMP-2 浓度显著低于正常组($P < 0.01$)。与模型组相比较,秋水仙碱和三叶香茶菜高、中剂量能显著提高肝纤维化大鼠血清的 MMP-2 的含量($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 三叶香茶菜对 CCl_4 致肝纤维化大鼠血清 TIMP-1 和 MMP-2 含量的影响($\bar{x} \pm s$) μg·L⁻¹

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	TIMP-1	MMP-2
正常	12	-	17.66 ± 3.44	608.48 ± 31.60
模型	10	-	75.28 ± 7.31 ¹⁾	510.56 ± 39.80 ¹⁾
秋水仙碱	12	0.2 × 10 ⁻³	67.76 ± 7.90 ²⁾	578.28 ± 64.47 ³⁾
三叶香茶菜	11	80	64.31 ± 11.5 ²⁾	563.94 ± 36.19 ²⁾
	10	40	68.20 ± 4.87 ²⁾	557.14 ± 85.83 ²⁾
	10	20	72.62 ± 6.93	526.80 ± 31.90

4 讨论

肝纤维化是多种原因所致的慢性肝病发展至肝硬化过程中所共有的病理组织学变化,是影响慢性肝病预后的重要环节,是多种原因引起的肝组织动态创伤-愈合过程,表现为肝内结缔组织的异常增生,其病理特征为汇管区大量纤维组织异常增生,但无假小叶和再生结节形成^[4]。CCl₄ 大鼠肝纤维化模型制备是成熟的肝纤维化造模方法,该方法能有效的模拟人体肝纤维化模型,被广泛使用^[5]。有关研究表明,血清 HA,PCIII 水平可反映肝纤维化的程度,并与病变程度呈正相关^[6-7],HA 属于蛋白多糖,肝纤维化时产生增加,是反映肝纤维化最敏感的指标。

哺乳动物 TGF- β 共有 3 种:TGF- β_1 , TGF- β_2 和 TGF- β_3 ,肝脏含量最高且具有生物活性的是 TGF- β_1 ,可促使肝星状细胞(HSC)转化为肌成纤维细胞并分泌胶原纤维,具有强烈促进细胞外基质合成的作用,可上调 HSC 表达 I,III,IV 型胶原,促进静息 HSC 的激活;并通过抑制 MMPs 的合成、促进 TIMPs 及纤溶酶原激活物抑制因子-1 的生成而抑制细胞外基质(ECM)降解。此外,TGF- β 尚能促进肝窦内皮细胞、枯否细胞等合成和分泌 TGF- β 、表皮生长因子等促纤维化细胞因子,进一步激活 HSC,促进细胞外基质的分泌。因此 TGF- β 阻断剂可能成为治疗肝纤维化的有效手段^[8-12]。HSC 在肝纤维化过程中起关键作用,伴随着肝细胞损伤 HSC 活化,于活化早期 HSC 释放基质金属蛋白酶(MMPs)促进 ECM 降解,当 HSC 完全活化后通过释放基质金属蛋白酶抑制因子(TIMPs)下调此降解作用,使 ECM 合成超过降解而达到沉积,促进肝纤维化的进展^[13],从而在肝纤维化进展过程中调控着合成和降解两个矛盾过程。

本研究结果表明,三叶香茶菜高、中剂量组可以显著降低大鼠血清 HA,PCIII,TIMP-1 的含量,提高大鼠血清 MMP-2 的含量,并显著降低大鼠肝纤维化肝组织 TGF- β_1 的含量,在光镜下观察到三叶香茶菜组的肝纤维化程度明显减轻,因此,三叶香茶菜高、中剂量可以较好地防治肝纤维化,其作用机制可能与调节 TGF- β_1 的水平,控制肝星状细胞释放 TIMP-

1 及 MMP-2 有关。上述研究能为深入研究三叶香茶菜抗肝纤维化机制指明方向,为三叶香茶菜药材的进一步开发提供依据。

[参考文献]

- [1] 周至品,王勤,叶晓雪,等. 三叶香茶菜根茎对免疫性肝损伤保护作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2012,28(2):102.
- [2] 甄茂川,汪谦,陈锡林,等. 复方三叶香茶菜抗大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中华普通外科学文献,2007, 1(1):4.
- [3] 王勤,李爱媛,陈居旭,等. 三姐妹保肝活性成分的研究[J]. 广西中医学院学报,2001,4(4):93.
- [4] 展玉涛,刘宾,李定国,等. 大黄素抗肝纤维化的作用机制[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(4):245.
- [5] 姜辉,尚莉丽,徐松龄,等. 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(12):167.
- [6] 黄萍. 柴胡总皂苷对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的保护作用[J]. 中国医药导报,2009,6(5):43.
- [7] 潘智敏,施铁英,马宝莲. 调脂积冲剂对肝纤维化大鼠肝纤指标的影响[J]. 河南中医学院学报,2007,22(4):20.
- [8] Liu X, Hu H, Yin J Q. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis [J]. Liver Int,2006,26(1):8.
- [9] Jiang W, Yang C Q, Liu W B, et al. Blockage of transforming growth factor beta receptors prevents progression of pig serum-induced rat liver fibrosis [J]. World J Gastroenterol,2004,10(11):1634.
- [10] Tsukada S, Parsons C J. RIPPc RA Mechanisms of liver fibrosis [J]. Clin Chim Acta,2006,364(1/2):33.
- [11] 刘萱,尤红,贾继东. 肝纤维化重要细胞因子的主要信号转导途径[J]. 肝脏,2005,10(3):251.
- [12] Nakamura T, Ueno T, Sakamoto M, et al. Suppression of transforming growth factor beta results in upregulation of transcription of regeneration factors after chronic liver injury [J]. Hepatol,2004,41:974.
- [13] 郝瑞春,门九章,李霞,等. 雄芍汤对免疫性肝纤维化大鼠 MMP-9 和 TIMP-1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,16(16):219.

[责任编辑 聂淑琴]