

芪蚣抗纤方拆方对肝纤维化大鼠 Smad2/3 及 Smad7 蛋白的影响

高 媛, 陈桂敏*, 梁振钰, 谢毅强, 杨世忠
(海南医学院, 海口 571199)

[摘要] 目的: 观察芪蚣抗纤方(Qigong Kangxian Prescription, QF)活血组和软坚组对肝纤维化大鼠细胞内信号转导分子 2,3,7(Smad 2/3 及 Smad7)的影响。方法: 成年健康雄性 SD 大鼠 60 只, 随机分为 6 组, 除正常对照组 10 只外, 其余 50 只均用猪血清腹腔注射法复制免疫损伤性肝纤维化大鼠模型, 0.5 mL/只, 每周 2 次, 连续 8 周。活血组和软坚组分别给予活血方和软坚方。低、高剂量组按生药量以 5, 10 g·kg⁻¹ig 给药。实验结束处死大鼠, 断头取血, 分离血清, 用 ELISA 法测定转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β_1 的含量。部分肝组织固定于 10% 甲醛液, 石蜡包埋, 制光镜切片, 免疫组织化学法检测肝组织 TGF- β_1 、Smad2、Smad3 及 Smad7 蛋白的表达。结果: ①血清及肝组织 TGF- β_1 含量及表达 活血高剂量组分别为(0.65 ± 0.09) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 4.33 ± 2.06, 软坚低剂量组分别为(0.62 ± 0.08) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 4.11 ± 1.14, 与模型组(1.22 ± 0.16) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 10.33 ± 3.34 相比有显著差异($P < 0.01$); ②Smad2 和 Smad3 蛋白表达显色指数活血高剂量组分别为(3.88 ± 2.00), (3.22 ± 1.89)分, 软坚低剂量组分别为(4.22 ± 1.49), (4.77 ± 1.75)分, 与模型组(10.20 ± 3.06), (10.22 ± 3.06)分相比有显著差异($P < 0.01$); ③Smad7 蛋白表达显色指数活血高剂量组为(6.89 ± 1.50)分, 软坚低剂量组为(4.33 ± 1.78)分, 与模型组(1.56 ± 0.73)分相比有显著差异($P < 0.01$)。结论: 芪蚣抗纤方活血组及软坚组可通过减少 Smad 2/3 的激活, 增加 Smad7 的表达, 抑制肝纤维结缔组织增生, 减轻肝损伤及肝纤维化程度。具有抑制肝纤维化作用。

[关键词] 芪蚣抗纤方拆方; 活血组; 软坚组; 肝纤维化; Smad 2/3; Smad 7

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0229-04

[doi] 10.11653/syfy2013140229

[收稿日期] 20121210(003)

[基金项目] 2008 年海南省自然科学基金项目(808165)

[第一作者] 高媛, 硕士, 副教授, 从事中医肝病研究, Tel: 0898-66890539, E-mail: gaoyuan58505@163.com

[通讯作者] * 陈桂敏, 教授, 硕士生导师, 从事肝纤维化研究, Tel: 0898-66960792, E-mail: hehuanchgm@163.com

氨基酸类神经递质含量的显著改变, 其具体原因还需进一步研究。

在上述镇静催眠小鼠模型上, 肝胆两益汤表现出了较好的镇静催眠作用, 其中以 2.6 g, 1.3 g·kg⁻¹药效学最显著, 其作用机制可能与增加脑组织中抑制性神经递质 GABA 及 Gly 的含量有关。

[参考文献]

[1] Neubauer D N. Pharmacologic approaches for the treatment of chronic insomnia[J]. Clinical Cornerstone, 2003, 5(3):16.
[2] Allison G. Harvey sleep and circadian functioning: critical mechanisms in the mood disorders[J]. Clin Psychol, 2011, 7:297.
[3] Richard R Bootzin, Dana R Epstein. Understanding of treating insomnia[J]. Clin Psychol, 2011, 7:435.

[4] 张丽, 叶翠飞, 沈芊, 等. 高效液相荧光测定大鼠脑内氨基酸类神经递质方法的改良[J]. 中国实验动物学学报, 2011, 19(5):377.
[5] 陈百泉, 杜钢军, 需启蒙. 酸枣仁皂苷的镇静催眠作用[J]. 中药材, 2002, 25(6):429.
[6] 李廷利, 刘立, 孙加源, 等. 生、炒酸枣仁催眠作用的实验研究[J]. 中医药学报, 2001, 29(5):351.
[7] 马进杰, 刘萍, 马百平. 酸枣仁化学成分及其镇静催眠作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2011, 38(3):206.
[8] 张耀春, 王立为. 远志药理研究进展[J]. 国外医药, 2004, 19(2):59.
[9] 王建, 瞿燕, 吴晖晖, 等. 远志及其不同蜜炙品的镇静安神作用对比研究[J]. 江苏中医, 2007, 39(6):60.
[10] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994:643.

[责任编辑 聂淑琴]

Impact of Qigong Kangxian Prescription on Smad2/3 and Smad7 in Hepatic Fibrosis Rat

GAO Yuan, CHEN Gui-min*, LIANG Zhen-yu, XIE Yi-qiang, YANG Shi-zhong
(Hainan College of Medicine, Haikou 571199, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the impact of Qigong Kangxian prescription (QF) on Smad 2/3, Smad7 in hepatic fibrosis rats. **Method:** Sixty SD rats randomly divided into 6 groups, in addition to the normal control group, the other groups were intraperitoneally injected with 0.5 mL pig's serum twice per week for 8 weeks, the rat hepatic fibrosis model was induced. Rats were given corresponding herbal medicines. After the end of experiment, serum samples were collected. Determination of the content of transforming growth factor was carried out by using ELISA method. Sections of liver tissue was fixed in 10% formaldehyde solution, and then embedded in paraffin, Under the light microscope. Expression of liver tissue TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad7 was detected by immunohistochemical method. **Result:** In the Content of TGF- β_1 and expression of liver tissue TGF- β_1 , Smad2, Smad3 and Smad7 the significant differences were found in administration groups compared with the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** QF can suppress hyperplasy of hepatic fibrous connective tissue, lessen hepatic injury through decreasing Smad 2/3 expression and increase Smad7 expression.

[Key words] Qigong Kangxian open the prescription; promoting blood-flow group; softening hard-mass group; hepatic fibrosis; Smad 2/3; Smad 7

在前期的实验研究中,已证实芪蚣抗纤方(Qigong Kangxian prescription, QF)及拆方能显著降低转化生长因子 β_1 (TGF- β_1),抑制肝纤维结缔组织增生,减轻肝损伤及肝纤维化程度,具有较明显的抗肝纤维化作用^[1-2]。本文试图通过QF两组拆方(活血组、软坚组),从TGF- β_1 信号转导关键蛋白Smad2/3及Smad7的角度,深入探讨其抗肝纤维化的机制,并进行组间比较及量效评价。

1 材料

1.1 动物 成年健康雄性SD大鼠60只,体重(180±20)g。购自广州中医药大学实验动物中心,SPF级。许可证号SCXK(粤)2008-0020。

1.2 药品 芪蚣抗纤方由黄芪、白术、三七、桃仁、郁金、山慈菇、蜈蚣等组成,各药物比例为10:10:2:2.5:2.5:1,药物由河北北方学院第一附属医院制剂室惠赠,按标准工艺制成颗粒剂备用,用时配成液体灌胃,生药含量1g·mL⁻¹。QF拆方①活血方:三七、桃仁、郁金;②软坚方:蜈蚣、山慈菇。新鲜猪血购自海口琼山区肉联厂,自提血清,分装灭菌,-20℃冰箱保存备用。

1.3 试剂 免疫组化试剂盒:TGF- β_1 , smad2,3(批号BA1396);Smad7(批号BA1399);配套使用稀释液(1:100)(批号SA1022);DAB显色剂以上试剂均

购自武汉博士德生物工程公司。

1.4 仪器 RM2235型石蜡切片机(德国LEICA);多功能光学显微镜(日本Olympus公司);ELx800型全自动酶标仪(美国宝特);BX50 Olympus图像分析仪(日本);-20℃低温冰箱(日本Sanyo公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备与给药 大鼠60只,随机分为6组,每组10只。正常对照组、模型组、QF活血低、高剂量组、QF软坚低、高剂量组。除正常对照组外(生理盐水ip 2 mL/只,2次/周),其余各组均采用猪血清腹腔注射法复制免疫损伤性肝纤维化大鼠模型^[2-3],0.5 mL/只,2次/周,连续造模8周。从第9周开始灌胃给药。活血组和软坚组分别给予活血方和软坚方,低、高剂量组5,10 g·kg⁻¹ ig,每天1次,给药共4周。

2.2 取材 实验过程中两次尾静脉采血,实验结束第2天,大鼠麻醉,断头取血,分离血清,-20℃保存备用;取大鼠肝脏左、右叶各1块,用10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,制备光镜标本切片。

2.3 指标检测

2.3.1 双抗体夹心法(ABC-ELISA)测定血清TGF- β_1 含量 按试剂盒要求操作,酶标仪在450 nm波长测量各孔的吸光度(A)。

2.3.2 免疫组织化学(SP法)观察肝脏 TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad7 的分布,半定量用 Olympus BX50 图像分析仪分析显色程度与范围 参照 SP 试剂盒说明书进行。结果判定^[4]:阳性细胞着色为棕黄色颗粒,参照免疫组化显色标准略作修改:每个指标的每个标本取 10 个较好的高倍视野,按显色程度分弱、中、强 3 种,分别记以 1,2,3 分;按显色范围分为 4 度。+:显色范围占高倍视野 < 25%;++:显色占高倍视野 25% ~ 50%;+++ :显色占高倍视野 50% ~ 75%;++++:显色占高倍视野 > 75%。将每个高倍视野显色程度和范围换算成“显色指数”,显色指数 = 显色程度 × 显色范围(+ 为 1 分,++ 为 2 分,+++ 为 3 分,++++ 为 4 分),取其均数为每个检测指标的最终显色指数。

2.4 统计方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异使用 *t* 检验。计数资料用 PEMS 3.1 软件分析,比较用 χ^2 检验,所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 血清及肝组织 TGF- β_1 含量及表达 模型组血清及肝组织 TGF- β_1 含量及表达较其他组明显升高 ($P < 0.01$);活血组血清及肝组织 TGF- β_1 含量和表达显著下降 ($P < 0.01$);软坚组血清及肝组织 TGF- β_1 含量和表达显著下降 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 芪蚣抗纤方拆方对大鼠血清及肝组织 TGF- β_1 含量及表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	n	血清 TGF- β_1 /μg · L ⁻¹	肝 TGF- β_1 显色指数/分
正常对照	-	10	0.26 ± 0.06 ¹⁾	1.00 ± 0.00 ¹⁾
模型	-	9	1.22 ± 0.16	10.33 ± 3.34
活血	5	9	0.67 ± 0.11 ¹⁾	6.56 ± 1.90 ²⁾
	10	9	0.65 ± 0.09 ¹⁾	4.33 ± 2.06 ¹⁾
软坚	5	9	0.62 ± 0.08 ¹⁾	4.11 ± 1.14 ¹⁾
	10	8	0.70 ± 0.09 ¹⁾	6.75 ± 1.92 ²⁾

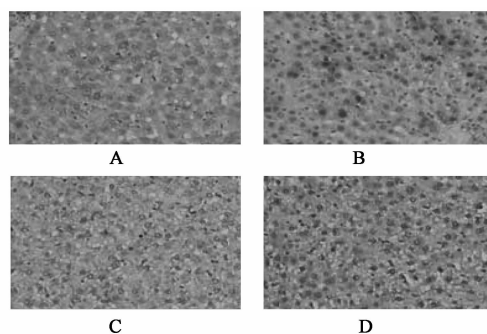
注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 各组大鼠肝组织 Smad2、Smad3 蛋白表达 正常组呈弱阳性表达;模型组明显高于其他各组 ($P < 0.01$),活血组均低于模型组 ($P < 0.01$),低、高剂量组间有显著差异 ($P < 0.01$);软坚组低于模型组,低、高剂量组相比有明显差异 ($P < 0.05$)。见表 2,图 1。

3.3 各组大鼠肝组织 Smad7 蛋白表达 正常组表达明显;模型组低水平表达,活血组表达高于模型

表 2 芪蚣抗纤方拆方对大鼠肝组织 Smad2, Smad3, Smad7 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	n	显色指数/分		
			Smad2	Smad3	Smad7
正常对照	-	10	1.30 ± 0.47 ¹⁾	1.40 ± 0.50 ¹⁾	10.10 ± 2.18 ¹⁾
模型	-	9	10.20 ± 3.06	10.22 ± 3.06	1.56 ± 0.73
活血	5	9	6.33 ± 1.65 ¹⁾	6.44 ± 1.51 ²⁾	4.11 ± 1.17 ¹⁾
	10	9	3.88 ± 2.00 ¹⁾	3.22 ± 1.89 ¹⁾	6.89 ± 1.50 ²⁾
软坚	5	9	4.22 ± 1.49 ¹⁾	4.77 ± 1.75 ¹⁾	4.33 ± 1.78 ¹⁾
	10	8	6.88 ± 1.56 ²⁾	7.13 ± 1.80 ²⁾	3.88 ± 2.10 ²⁾



A. 正常组;B. 模型组;C. 活血 10 g · kg⁻¹组;
D. 软坚 5 g · kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 芪蚣抗纤方拆方对大鼠肝组织 Smad3 的影响(免疫组织化学法, × 200)

组,高、低剂量组间有显著差异。软坚组也有表达,但低、高剂量组间无显著差异。见表 2,图 2。

由此可见, TGF- β_1 在肝组织中的表达随活血方剂量的增加而表达明显减弱;而软坚低剂量组能明显减低其表达。

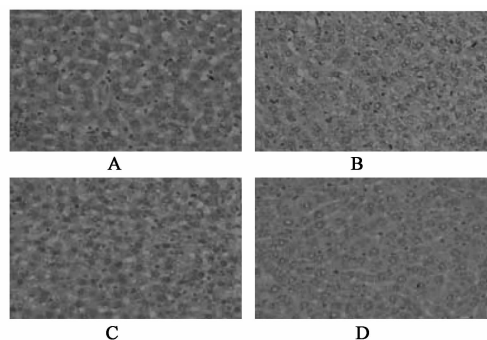


图 2 芪蚣抗纤方拆方对大鼠肝组织 Smad7 蛋白表达的影响(免疫组织化学法, × 200)

4 讨论

中医认为肝纤维化是由于外感六淫、饮食劳伤、七情内伤等病因,导致脏腑的功能异常,肝失疏泄、脾失运化,气机失调,气血运行不畅,津液输布异常,

血瘀,痰湿内停。针对肝纤维化是因脏腑功能下降,气血津液运行失常所致,治宜标本兼治^[5],益气健脾、行气活血、软坚散瘀。芪蚣抗纤方确立益气活血大法,方中黄芪、白术益气健脾,三七、桃仁、郁金行气活血,蜈蚣、山慈菇软坚散瘀,全方配伍立意正和其病机。

目前研究已经明确,Smads 通路是 TGF- β_1 信号转导中最重要的通路^[6]。Smad2 和 Smad3 是 TGF- β_1 信号下传的重要信号分子。其中 Smad3 在介导 TGF- β_1 诱发肝纤维化中起着关键作用^[7]。

在此次两组拆方对照实验中,模型组不仅在血清和肝组织中 TGF- β_1 含量及表达有明显提高,Smad2 和 Smad3 也明显高于其他组。其机制可能是 TGF- β_1 通过激活 Smad 通路,来促进胶原成分的增生、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的沉积,从而导致肝纤维化的发生^[8]。正常对照组以上 3 个指标不表达或微量表达^[1];而免疫组化结果显示:①经活血组药物干预后,Smad2/3 降低,这可能与药物抑制及阻断 TGF- β_1 激活 Smad2/Smad3 有直接关系。从量效关系比较,活血高剂量干预作用更明显。②软坚组可降低肝组织 Smad2/3 的表达。但从实验结果看,软坚药有一定毒性,高剂量对肝组织有损害,在发挥治疗作用的同时也表现出其副作用。低剂量作用优于高剂量。说明软坚药在一定浓度范围内,可能通过抑制 Smad2/3 的表达,发挥抗纤维化作用。从用药的安全性考虑,软坚低剂量则应是选择的剂量。

一般认为,在肝纤维化发生发展的分子机制中,Smad2/3 传递的可能是致肝纤维化信号^[9],Smad7 携带的可能是抗肝纤维化信号^[10]。Smad7 在 TGF- β_1 信号传导中可与 Smad2/3 结合,阻止 Smad 2/3 向下游传导,从而阻止 TGF- β_1 信号传导,可能是其抗肝纤维化的机制之一^[11]。本实验中,通过免疫组化半定量法测定 Smad7 的表达,拆方中活血组及软坚组均能提高 Smad7 的表达,尤其以活血高剂量组提高明显。

本实验基于 QF 在实验及临床观察中所具有的良好功效,进一步探讨拆方中活血化瘀药及软坚散结药所发挥的作用。通过实验,证实了拆方能有效保护受损肝细胞,减少肝细胞、Kupffer 细胞和内皮

细胞产生 TGF- β_1 ,并可能通过调控 TGF- β , Smad 通路,达到抗肝纤维化的目的。

[参考文献]

- [1] 高媛,陈桂敏,梁振钰,等. 芪蚣抗纤方活血组对肝纤维化大鼠 TGF- β_1 及 Smad 2/3 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15):260.
- [2] 梁振钰,陈桂敏,高媛,等. 芪蚣抗纤方(QF)拆方中软坚散结药对免疫损伤性肝纤维化大鼠 TGF- β_1 定性定量表达的影响[J]. 海南医学院学报, 2012, 18(9):1173.
- [3] 于世瀛,贾长恩,杨美娟,等. 活血化瘀方药抗大鼠肝纤维化的形态学和组织化学定量研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 1996, 6(2):21.
- [4] 都广礼,刘平,王磊,等. 猪血清肝纤维化大鼠肝组织基质金属蛋白酶-9/13 和基质金属蛋白酶组织抑制因子-1/2 表达的动态变化及下瘀血汤对其影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11):48.
- [5] 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.
- [6] 刘鸣昊,薛博瑜. 近 5 年来肝纤维化中医证治用药规律的文献研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):279.
- [7] 吴晓玲,曾维政,蒋明德,等. 肝纤维化的信号转导通路[J]. 世界华人消化杂志 2006, 14(22):2223.
- [8] 陈峰,郑敏,陈智. Smad2 和 Smad3 在 TGF- β_1 信号转导中的作用[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2006, 33(3):187.
- [9] 张林军,刘光辉,黄东华,等. 清纤方抗实验性大鼠肝纤维化的作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12):75.
- [10] 孙校男,王先开,娄国强. Smad 蛋白与肝纤维化[J]. 国外医学:流行病学传染病学分册, 2005, 32(4):243.
- [11] 李蕴伽,魏来. 转化生长因子 β /Smad 信号传导机制及其与肝纤维化的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(6):476.
- [12] 周朝晖,蔡瑜,沈锡中,等. 甘草酸对 CCl₄ 肝纤维化大鼠肝组织 Smad7 免疫组化表达的影响[J]. 中国临床医学, 2006, 13(1):67.

[责任编辑 聂淑琴]