

复方芪珠方对肝纤维化大鼠 4 种细胞因子表达的影响

刘鸣昊¹, 贾涵婷², 薛博瑜^{1*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**观察复方芪珠方的不同提取物对大鼠肝脏肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-4(IL-4)、白介素-8(IL-8)、白介素-10(IL-10)表达的影响,探讨复方芪珠方抗肝纤维化的作用机制。**方法:**70 只大鼠随机分为空白、模型组、复方芪珠方水提高、低剂量组、复方芪珠方醇提高、低剂量组,秋水仙碱组。除正常组外,其余各组大鼠皮下注射 40% 四氯化碳(CCl₄)橄榄油造模,首次 5 mL·kg⁻¹,以后每次 3 mL·kg⁻¹,每周 2 次,共 8 周。于造模开始次日给药,复方芪珠方高、低剂量组 16.2, 9.72 g·kg⁻¹ig,秋水仙碱组 0.5 mg·kg⁻¹ig,每日 1 次,连续 8 周。造模结束后所有大鼠处死,肝脏组织学观察,测定肝脾指数,酶联免疫吸附试验(ELISA)技术检测 TNF- α , IL-4, IL-8, IL-10 在肝内的表达。**结果:**模型组大鼠肝组织炎症程度及纤维化程度均高于正常组,且肝组织中 TNF- α , IL-4, IL-8 的表达也明显增加,IL-10 的表达则显著减少;应用复方芪珠方后,肝组织炎症和纤维化程度降低,同时相对模型组,肝组织中 TNF- α , IL-4, IL-8 的表达减少,IL-10 的表达增加。**结论:**复方芪珠方用于大鼠肝纤维化有显著效果,其机制可能与其能影响 TNF- α , IL-4, IL-8, IL-10 等细胞因子在肝组织的表达有关。

[关键词] 复方芪珠片; 肝纤维化; 肿瘤坏死因子; 白介素-4; 白介素-8; 白介素-10

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0218-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120827.1047.013.html>

[网络出版时间] 2012-08-27 10:47

Effect of Compound Qizhu Tablet on the Expression of 4 Cytokines in Rats with Liver Fibrosis

LIU Ming-hao¹, JIA Han-ting², XUE Bo-yu^{1*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Compound Qizhu tablet on the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-4 (IL-4), interleukin-8 (IL-8) and Interleukin-10 (IL-10) in rats with liver fibrosis. **Method:** Seventy SD rats were randomly divided into normal group, model group, Qizhu high-dose group (water preparation), Qizhu low dose group (water preparation), Qizhu high-dose group (ethanol preparation), Qizhu low dose group (ethanol preparation), and colchicine group. All the rats except normal group received 40% CCl₄ subcutaneous injection twice a week for 8 weeks, rats was firstly given 40% CCl₄ (5 mL·kg⁻¹) and 3 mL·kg⁻¹ secondly. Rats in both Qizhu high-dose group and small dose group were ig given 16.2, 9.72 g·kg⁻¹ Qizhu decoction respectively, while rats in colchicine group were fed with 0.5 mg·kg⁻¹ colchicine. Liver histology and liver and spleen index were observed after the modelling. The expression of TNF- α , IL-4, IL-8 and IL-10 was detected by enzyme linked immune sorbent assay (ELISA). **Result:** The degree of hepatic fibrosis in all treatment groups was obviously reduced compared with model group. Compared with normal group,

[收稿日期] 20120511(001)

[基金项目] 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项(2008ZX10005-009);江苏省研究生培养创新工程项目

[第一作者] 刘鸣昊,在读博士,从事肝胆病的中医研究,Tel:18638606031, E-mail:liumh015@yahoo.com.cn

[通讯作者] *薛博瑜,教授,主任中医师,博士生导师,从事肝胆疾病的中医临床与教学研究,Tel:18951631349, E-mail:xueboyu9502@sina.com

the expression of TNF- α , IL-4 and IL-8 in model group was elevated significantly, whereas the expression of IL-10 was decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, the expression of TNF- α , IL-4 and IL-8 in treatment groups were decreased significantly, whereas the expression of IL-10 was increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Compound Qizhu tablet has obvious therapeutic effect on rats with liver fibrosis. The mechanism may be correlated to interfering the disturbance of some cytokines such as TNF- α , IL-4, IL-8 and IL-10.

[**Key words**] Compound Qizhu tablet; hepatic fibrosis; tumor necrosis factor- α ; interleukin-4; interleukin-8; interleukin-10

复方芪珠方是由叶下珠、虎杖等多味药材提取精制而成,具有清热解毒、益气活血之功效,是南京中医药大学薛博瑜教授的临床经验方,用于慢性乙型病毒性肝炎的治疗。前期研究表明,复方芪珠方对急慢性肝损伤和肝纤维化具有良好的保护作用^[1-2]。临床研究^[3-4]也表明,复方芪珠方具有良好的保肝、降酶、抗纤维化作用。为了进一步探讨其抗肝纤维化作用机制,本文就复方芪珠方的不同提取物作用于四氯化碳(CCl₄)所致肝纤维化模型大鼠白介素-4(IL-4)、白介素-8(IL-8)、白介素-10(IL-10)及肿瘤坏死因子(TNF- α)的表达进行研究。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠70只,雌性,体重180~220g,由河南省实验动物中心提供。动物质量合格证号SCXK(豫)2010-0002。实验动物使用许可证号SYXK(豫)2101-0001。给药前后,实验大鼠分笼饲养,喂饲全价颗粒饲料,由河南省实验动物中心提供,合格证号SCXK(豫)2010-0002,自由饮水,室温(20±2)℃,湿度50%~70%。

1.2 药物 复方芪珠方由叶下珠、黄芪、丹参、虎杖、白花蛇舌草等组成,购自郑州东升医药商店,经河南中医学院生药教研室鉴定无劣品。秋水仙碱片(西双版纳药业有限责任公司,批号110806)。

1.3 仪器、试剂 MK-353酶标仪(Thermo Labsystems公司荷兰),H300透射电镜(日立公司,日本),四氯化碳分析纯(恒兴试剂,批号20120211)。100%食用纯橄榄油(Hojiblanca公司,西班牙)。大鼠IL-4,IL-8,IL-10,TNF- α ELISA试剂盒(均购自美国Rapidbio公司,批号20120201A)。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 芪珠方水提物制备 按方取单味药物混合浸泡30min,加水(10+8)倍量回流提取(0.5+0.5)h合并提取液,高剂量组浓缩至每1mL含生药1g,低剂量组浓缩至每1mL含生药0.6g。

2.1.2 芪珠方醇提物制备 按方取单味药物混合

浸泡30min,分别以(5+4)倍量70%乙醇回流提取(1.5+1.5)h合并提取液,高剂量组浓缩至每1mL含生药1g,低剂量组浓缩至每1mL含生药0.6g。

2.2 动物模型 所有动物实验室安静饲养1周后,随机分成7组:正常组、模型组、芪珠方水提取高、低剂量组、芪珠方乙醇提取高、低剂量组、秋水仙碱组,其中正常组8只,模型组12只,其余各组10只。实验第1天,除正常组外其余各组大鼠均sc40%CCl₄橄榄油0.5mL,以后每周2次sc40%CCl₄橄榄油,每次3.0mL·kg⁻¹,连续8周。

2.3 给药方法 中药高、低剂量组以(16.20,9.72g·kg⁻¹)ig,每日1次,于造模开始次日给药,连续8周;秋水仙碱组(制成0.1g·L⁻¹水溶液秋水仙碱)5.0mL·kg⁻¹ig,剂量为0.5mg·kg⁻¹,每日1次,亦于造模开始次日给药,连续8周;模型组用同等体积的生理盐水ig,每日1次,连用8周;正常组不作任何处理,作为正常对照使用。

2.4 观察指标及检测方法

2.4.1 组织学检测 造模结束后将动物处死,立即解剖,取肝脏,10%福尔马林固定。常规石蜡包埋切片,行HE染色。光镜下观察肝脏病变程度。另取0.1cm×0.1cm×0.2cm体积的肝组织5块经2.5%戊二醛固定24h,再经1%锇酸固定1h,常规梯度丙酮脱水,Epon812包埋,LKB-V型超薄切片机做半薄片定位,超薄切片,常规铀、铅染色后,透射电镜观察。

2.4.2 肝脾指数 取所有动物肝脏脾脏称重,计算肝脾指数(肝质量/体重,脾质量/体重)。

2.4.3 检测大鼠肝脏组织内IL-4,IL-8,IL-10,TNF- α 表达 各组大鼠各取相同质量肝组织,加入适量生理盐水捣碎制成10%肝匀浆,3000r·min⁻¹离心10min取上清,余下按试剂盒说明书进行操作,酶标仪450nm处测定吸光度(A)。以对照品浓度作为横坐标,对应A为纵坐标,绘制出标准品线性回归曲线,按曲线方程计算各样品实际浓度值。

2.4.4 数据处理 各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,

多组间均数比较采用方差分析,组间两两均数比较采用 *t* 检验。采用统计软件 SPSS 13.0 进行方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 光镜观察 模型组大鼠结缔组织增生,向肝小叶侵入分割肝小叶,肝小叶结构改建,并见大量炎细胞浸润和脂肪变性;高剂量组仅见脂肪变性和少量炎细胞浸润;低剂量组可见少量炎细胞浸润,汇管区有不同程度的结缔组织增生;秋水仙碱组出现明显脂肪变性,汇管区轻度结缔组织增生,炎细胞浸润^[1]。

3.2 电镜观察 正常组:肝细胞、肝窦显示正常超微结构特征。肝细胞呈卵圆形,核仁清,胞质内有丰富的线粒体、发达的粗面网和大量的溶酶体及糖原颗粒。模型组:肝细胞萎缩,线粒体肿胀,嵴不清晰,粗面内质网脱颗粒,核固缩,核间隙变宽,充满增生的胶原纤维,并有大量的贮脂细胞、成纤维细胞增生。复方芪珠方高剂量组:肝细胞、肝血窦结构规整,未见纤维增生,有的肝细胞胞质中粗面内质网增生,平行排列,贮脂细胞内细胞器未见增多。复方芪珠方低剂量组:肝细胞内粗面内质网较多,贮脂细胞胞质内可见较多的脂滴,细胞器多于正常组,血窦增宽,肝窦周隙可见少量胶原纤维增生。秋水仙碱组:有粗细不均的纤维束从汇管区伸出,窦周隙内可见有胶原纤维束,贮脂细胞胞质内粗面内质网和线粒体等细胞增多。

3.3 大鼠肝脏、脾脏系数 与正常组比较,模型组大鼠肝脾质量明显增加,肝脾指数明显升高 ($P < 0.01$),提示造模成功;与模型组比较,芪珠方各剂量组大鼠肝、脾系数显著降低 ($P < 0.01$),并能明显降低肝、脾的质量 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.4 肝脏组织内 IL-4, IL-8, IL-10, TNF- α 表达 结果表明,模型组 IL-4, IL-8, TNF- α 的表达相对高于正常组,IL-10 的表达相对低于正常组,两组相比差

表 1 复方芪珠方的不同提取物对大鼠肝脏、脾脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肝脏指数 /g·kg ⁻¹	脾脏指数 /g·kg ⁻¹
正常	-	32.7 ± 4.5 ^{2,4)}	1.9 ± 0.3 ^{2,4)}
模型	-	60.5 ± 18.9 ⁴⁾	9.5 ± 1.1
复方芪珠方水提	16.20	56.6 ± 9.4 ^{2,3)}	5.9 ± 2.6 ^{2,4)}
	9.72	57.6 ± 9.3 ^{2,3)}	6.6 ± 1.9 ³⁾
复方芪珠方醇提	16.20	51.4 ± 14.2 ^{1,3)}	4.9 ± 1.4 ^{2,4)}
	9.72	58.2 ± 11.0 ^{2,3)}	5.5 ± 1.6 ^{2,4)}
秋水仙碱	5 × 10 ⁻⁴	46.9 ± 7.1 ^{2,4)}	8.2 ± 1.7 ^{2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与秋水仙碱组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

异有统计学意义 ($P < 0.01$);各治疗组 IL-4, IL-8, TNF- α 的表达低于模型组,IL-10 的表达高于模型组,治疗组与模型组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$);高剂量组 IL-4, IL-8, TNF- α 的表达低于小剂量组,IL-10 的表达高于小剂量组,有明显的剂量依赖性 ($P < 0.01$);水提组 IL-4, IL-8, TNF- α 的表达低于同剂量乙醇提取组,IL-10 的表达高于同剂量乙醇提取组 ($P < 0.01$)。见表 2。

4 讨论

白介素 (interleukin, IL) 是由单核巨噬细胞、T 淋巴细胞分泌的具有某些非特异性免疫调节作用和炎症反应中起作用的细胞因子。IL-8 可通过趋化炎症细胞,刺激 CK 的大量释放而间接激活 HSC,影响肝纤维化的病理过程。IL-10 能抑制肝纤维化的进展,其机制可能为 IL-10 不足时可上调 I 型胶原的合成并促进胶原蛋白酶基因表达重构 ECM,亦可使促纤维化因子 TGF-B 的产生无法有效抑制,且与巨噬细胞 TNF- α 的分泌水平相关^[5]。Thompson

表 2 复方芪珠方的不同提取物对肝脏组织内 IL-4, IL-8, IL-10, TNF- α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-4	IL-8	IL-10	TNF- α
正常	-	36.92 ± 0.85 ^{2,4)}	82.44 ± 2.65 ^{2,4)}	42.21 ± 0.89 ^{2,4)}	122.19 ± 2.45 ^{2,4)}
模型	-	90.53 ± 1.22 ⁴⁾	157.45 ± 2.94 ⁴⁾	20.53 ± 0.88 ⁴⁾	272.21 ± 4.36 ⁴⁾
复方芪珠方水提	16.20	54.83 ± 1.69 ^{2,3)}	117.25 ± 2.58 ^{2,4)}	28.29 ± 0.89 ^{2,4)}	180.11 ± 2.86 ^{2,4)}
	9.72	65.02 ± 1.31 ^{2,4)}	131.96 ± 2.25 ^{2,4)}	26.39 ± 0.55 ^{2,4)}	219.68 ± 3.79 ^{2,4)}
复方芪珠方醇提	16.20	60.54 ± 1.24 ^{2,4)}	136.37 ± 2.58 ^{2,4)}	24.99 ± 0.46 ^{2,4)}	205.29 ± 3.79 ^{2,4)}
	9.72	67.87 ± 1.31 ^{2,4)}	140.05 ± 1.53 ^{2,4)}	23.46 ± 0.67 ^{2,4)}	230.47 ± 2.72 ^{2,4)}
秋水仙碱	5 × 10 ⁻⁴	50.90 ± 1.02 ²⁾	109.40 ± 2.25 ²⁾	34.52 ± 1.13 ²⁾	156.01 ± 4.36 ²⁾

等^[6]和 Louis^[8]用 CCl₄ 构建肝纤维化模型, IL-10 基因敲除小鼠较野生型小鼠肝纤维化程度明显加重,提示内源性 IL-10 对肝纤维化起抑制作用。TNF- α 主要由单核巨噬细胞、肝星状细胞及 Kupper 细胞等产生,与其他细胞因子等形成调节网络,对肝纤维化的启动及调控起重要作用。TNF- α 能加强肝星状细胞的趋化性,促进星状细胞增生,并可通过刺激肝脏炎症反应的产生间接发挥促纤维化作用。IL-4 由 Th2 细胞产生,可促进 B, T 淋巴细胞生长、分化及抗体表达,并可抑制 Th1 细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ 等细胞因子。Sugimoto^[8]等发现 IL-4 可抑制人 HSC 增殖,促进胶原合成,认为 IFN 的抗纤维化作用在一定程度上被 IL-4 对 HSC 的刺激作用所阻碍。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^[9-11]。

实验结果表明,模型组大鼠肝组织炎症程度及纤维化程度均高于正常组,肝组织中 TNF- α , IL-4, IL-8 的表达也明显增加,IL-10 的表达则显著减少;应用复方芪珠方后,肝组织炎症和纤维化程度降低,同时相对模型组,肝组织中 TNF- α , IL-4, IL-8 的表达减少,IL-10 的表达增加,而后者可抑制肝纤维化形成,提示复方芪珠方抗肝纤维化的作用机制可能与降低 TNF- α , IL-4, IL-8, 提高 IL-10 表达有关。

复方芪珠方水提组 IL-4, IL-8, TNF- α 的表达低于同剂量乙醇提取组,IL-10 的表达高于同剂量乙醇提取组($P < 0.01$),可能是因为复方芪珠方的有效成分在乙醇和水中的溶解度不同造成的,提示在确定复方制剂的提取工艺时应予以考虑。

[参考文献]

[1] 谢东浩,薛博瑜,张林松,等. 复方芪珠片对大鼠 CCl₄

慢性肝损伤及肝纤维化模型的保护作用研究[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(3): 250.

[2] 王学东,胡荣昕,叶放,等. 复方芪珠片对急性肝损伤和肝纤维化的实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(4): 150.

[3] 薛博瑜,殷杰,潘林梅,等. 复方芪珠片治疗慢性乙型肝炎 100 例临床研究[J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(1): 24.

[4] 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.

[5] 陈治新,王小从,张莉娟,等. IL-10 对实验性肝纤维化大鼠血小板衍生生长因子- AA、BB 表达的影响[J]. 临床消化病杂志, 2003, 15(3): 99.

[6] Thompson K, Maltby J, Fallow field J, et al. Interleukin -10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis [J]. Herpetology, 1998, 28(6): 1597.

[7] Louis H, Vanlaethem J L, Wa W, et al. Inerleukin-10 controls neutrophil in filtration, hepatocyte proliferation and liver inflammation and fibrosis [J]. Herpetology, 1998, 28(6): 1597.

[8] Sugimoto R, Enjoji M. Effect of IL- 4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells[J]. Liver Int, 2005, 25(2): 420.

[9] 青献春,刘炳辰,裴香萍,等. 软肝散结胶囊抗大鼠肝纤维化实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 149.

[10] 杨华,张知贵,封家福,等. 苦参素对肝纤维化大鼠肝组织 NF- κ B 和 CTGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 245.

[11] 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.

[责任编辑 聂淑琴]