

玉米须醇提物对肝纤维化大鼠药效学研究

陈艳军^{1*}, 高旭珍², 关大勇¹, 耿丹¹, 张敬华¹

(1. 哈尔滨医科大学附属五院, 黑龙江 大庆 163316; 2. 大庆市第二医院, 黑龙江 大庆 163461)

[摘要] 目的: 观察玉米须(stigma maydis or corn silk)醇提取物对实验性肝纤维化大鼠的治疗效果, 并探讨其作用机制。

方法: 用四氯化碳(CCl₄)诱导大鼠肝纤维化模型(皮下注射为 8 周, 腹腔注射为 4 周), 将实验动物随机分为正常对照组(A)、模型组(B)、秋水仙碱组(C, 0.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、玉米须醇提取物组(D, 5.4 g·kg⁻¹·d⁻¹)。除正常对照组外, 其余 3 组均用四氯化碳(sc, 每次 3 mL·kg⁻¹, 2 次/周)诱发肝纤维化。各组于造模第 8 周末处死动物, 分别用放射免疫法检测血清层黏连蛋白(LN), Ⅲ型前胶原(PCⅢ), 透明质酸(HA)及Ⅳ型胶原(CⅣ); RT-PCR 检测肝组织 Smad₃ mRNA 的表达; 作 HE 染色和胶原纤维特殊染色行肝组织病理形态学观察及电镜观察治疗前后大鼠肝脏的超微结构。结果: 模型组与正常组比较, 大鼠血清中 LN (207.6 ± 27.4) μg·L⁻¹, PCⅢ (280.1 ± 3.2) μg·L⁻¹, HA (357.0 ± 14.1) μg·L⁻¹, CⅣ (180.0 ± 7.0) μg·L⁻¹, 大鼠肝组织内 Smad₃ mRNA (0.865 ± 0.084) 水平明显升高 (P < 0.01), 经玉米须醇提取物治疗 8 周, 大鼠血清中 LN (162.4 ± 2.2) μg·L⁻¹, PCⅢ (193.2 ± 1.8) μg·L⁻¹, HA (219.4 ± 3.7) μg·L⁻¹, CⅣ (138.0 ± 2.5) μg·L⁻¹ 水平明显降低 (P < 0.01); 大鼠肝组织内 Smad₃ mRNA (0.410 ± 0.026) 表达明显下降 (P < 0.01); 大鼠肝组织病理学检测改善显著。结论: 玉米须能有效地抑制肝纤维化的发展, 其机制可能是通过下调肝组织内 Smad₃ mRNA 表达, 降低 ECM 的分泌而达到的。

[关键词] 玉米须醇提取物; 肝纤维化; 细胞外基质

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)11-0195-04

Study on the Pharmacodynamic of Ethanol Extracts from *Lonicera japonica* in Rats with Hepatic Fibrosis

CHEN Yan-jun^{1*}, GAO Xu-zhen², GUAN Da-yong¹, GENG-Dan¹, ZHANG Jing-hua¹

(1. Department of Digestive Diseases, the Fifth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Daqing 163316, China; 2. The Second Hospital of Daqing City, Daqing 163461, China)

[Abstract] Objective: To investigate the therapeutic effects of ethanol extracts from *Lonicera japonica* on experimental hepatic fibrosis in rats and its mechanism.

Method: The rat hepatic fibrosis model was established with carbon tetrachloride (CCl₄, sc 8 weeks, ip 4 weeks). All the experimental rats were divided into four groups: normal group (A), model group (B), colchicines group (C, 0.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹), ethanol extracts from *L. japonica* group (D, 5.4 g·kg⁻¹·d⁻¹). All groups except A were given carbon tetrachloride (sc 3 mL·kg⁻¹, 2/weeks) to induce the rat model of hepatic fibrosis. All experimental rats were killed at eight weeks after the models were established. Serum levels of hyaluronic acid (HA), laminin (LN), pro-collagen type III peptide (PCⅢ) and collagen type IV peptide (CⅣ) were detected by radio immunoassay; and examined the Smad₃ mRNA expression in rat hepatic tissue by using RT-PCR technology. The liver histopathological changes were observed with HE or special collegin fibrosis staining and its ultrasructures were observed in electronic-microscope before and after therapy. Result: Compared with normal group in model group, the serum level of LN (207.6 ± 27.4) μg·L⁻¹, PCⅢ (280.1 ± 3.2) μg·L⁻¹, HA (357.0 ± 14.1) μg·L⁻¹, CⅣ (180.0 ± 7.0) μg·L⁻¹, the Smad₃ mRNA expression in the rat hepatic tissue were significantly increased (P < 0.01), ethanol extracts of

[收稿日期] 20110918(004)

[通讯作者] * 陈艳军, 副主任医师, 硕士研究生, 副教授, 从事消化内科临床, 教学, 科研工作, Tel: 18708091188, E-mail: chenyanjun20042000@yahoo.com.cn

L. japonica treatments (8 weeks) significantly decreased the serum level of LN (207.6 ± 27.4) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, PC III (280.1 ± 3.2) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, HA (357.0 ± 14.1) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, CIV (180.0 ± 7.0) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$). Also the Smad₃ mRNA expression in the rat hepatic tissue decreased markedly ($P < 0.01$). The liver histopathological improvement was also obvious. **Conclusion:** *L. japonica* can effectively suppress the development of hepatic fibrosis, its mechanism may be achieved by down-regulating the Smad₃ mRNA expression in hepatic tissue, and reducing the secretion of extracellular matrix (ECM).

[**Key words**] ethanol extracts of *Lonicera japonica*; hepatic fibrosis; extracellular matrix (ECM)

现代药理研究证实玉米须有利尿、利胆、降血压、降血糖、抗癌、止血等作用。目前临床上广泛用于高血压、肝炎、胆道结石、鼻炎、糖尿病及哮喘等多种疾病的治疗^[1]。肝纤维化以肝脏细胞外基质 (ECM) 大量增生沉积为特征, 以肝星状细胞 (HSC) 激活为其细胞学基础, 在水平上与细胞因子、化学因子等有关^[2]。转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 是导致肝纤维化的最重要的细胞因子, 其作用的发挥和细胞内信号转导蛋白 Smad 密切相关。本研究通过观察中药制剂——玉米须醇提取物对肝纤维化大鼠肝组织病变、细胞外基质及 Smad₃ mRNA 表达的影响, 探讨该药抗肝纤维化作用的机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 44 只, 体重 180 ~ 200 g, 由哈尔滨医科大学动物实验中心提供, 许可证号 SCXK(黑) 动字第 99102001 号, 大鼠在通风, 温度湿度适宜的动物室内常规饲养。

1.2 药物与试剂 玉米须 *Lonicera japonica* Thunb., 经哈尔滨医科大学药学院张娟教授鉴定为禾本科植物玉蜀黍的花柱。干品 2 kg, 用 75% 乙醇加热回流提取, 减压回收溶剂得乙醇提取物, 浓缩后冷藏备用, 灌胃时将浓缩物用蒸馏水稀释成 $1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液, 由哈尔滨医科大学药学院代煎。四氯化碳 (CCl₄ 分析纯, 哈尔滨化工化学试剂厂, 批号 GB688-92), 用食用色拉油配制成 40% 溶液, 冷藏备用。秋水仙碱片, 云南植物药业有限公司。滇卫药准字 (1995) 第 000134 号。配制方法为取秋水仙碱 2 mg, 溶解于 100 mL 蒸馏水中, 用量瓶定容, 冷藏备用; 层黏连蛋白 (LN), III 型前胶原 (PC III), 透明质酸 (HA) 及 IV 型胶原 (CIV) 放免试剂盒均为上海海军医学研究所生物技术中心产品; Trizol 试剂盒, Oligo-DT₁₈, Ribonuclease inhibitor, AMV 及缓冲系统, PCR 扩增试剂盒等均为上海生工产品, 批号分别为 1311251007A, 3498101107, 20291010, 2492101009, DGL2000 DNAMarker 为北京鼎国生物技术有限责

任公司产品, 批号 18U00150。

1.3 仪器 Biometra 型 PCR 基因扩增仪 (德国), DU800 紫外-可见光分光光度计 (核酸/蛋白分析仪, 美国贝克曼库尔特有限公司), YLN-2000 型凝胶成像分析系统 (北京亚力恩机电技术研究所), XH-6020 型 γ 免疫计数器 (中国核工业总公司西安二六二厂), JEM-1220 型透射电镜 (日本电子公司)。

1.4 引物 由北京奥科生物技术有限责任公司设计并合成。Smad₃ 上游引物 5'-GAGGGGAGGTCTTTGCAGACT-3', 下游引物 5'-GGGTGCTGTCACTGTCTGTC-3', 扩增长度 279 bp; β -actin 上游引物 5'-GGGAAATCGTGCCTGACAT-3', 下游引物 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3', 扩增长度 385 bp。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 将健康大鼠 44 只随机分成 4 组, 即正常对照组 (A)、模型组 (B)、秋水仙碱组 (C)、玉米须醇提取物组 (D)。模型的制作参照文献 [3] 并略加改进。除正常组外, 其余 3 组均用 CCl₄ 诱发肝纤维化: 于实验第 1 天以 40% CCl₄ 色拉油溶液侧腹部 sc $3 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 2 次/周。首次剂量为 $5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 共 8 周。B 组 (12 只): 造模同时 ig 给予生理盐水 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; C 组 (12 只): 造模同时 ig 秋水仙碱 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; D 组 (12 只): 造模同时 ig 玉米须醇提取物 $5.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; A 组 (8 只): 用生理盐水侧腹部 sc $3 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 2 次/周, 同时给予生理盐水 ($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) ig。各组均正常饮水和标准大鼠饲料喂养, 实验于造模第 8 周末乙醚麻醉动物, 摘眼球采集血液, 分离血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 备血清学检测; 取肝组织标本甲醛固定, 备组织病理学检测; 每组随机选一例肝组织标本戊二醛固定, 备超微结构检测; 取肝组织标本, 投入液氮中速冻后, 冰箱 ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) 保存待测相关指标。

2.2 血清学指标检测 采用放射免疫分析法检测 LN, PC III, HA, CIV, 具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

2.3 RT-PCR 检测 Smad₃ 基因的表达 ①肝组织总 RNA 提取:按 Trizol 试剂盒操作说明书进行。测 RNA 浓度:标本均经紫外分光光度计测定其纯度及含量,标本总 RNA A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8 ~ 2.0 为提取 RNA 纯度较好。②逆转录反应:反应条件为 30 °C 10 min,45 °C 60 min,99 °C 5 min,5 °C 5 min 合成 cDNA。③PCR 扩增:扩增条件:Smad₃ 和 β-actin:94 °C 4 min,一个循环,94 °C 30 s,57 °C 45 s,72 °C 45 s,共 35 个循环,72 °C 7 min,一个循环;④取 PCR 反应产物 5 μL 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, YLN-2000 型凝胶成像分析系统采集图像,以内参 β-actin 为基准,作半定量分析,即以 Smad₃/β-actin 的灰度比值代表所扩增目的基因片段的相对表达水平,值越大表示 Smad₃ 表达水平越高。

2.4 病理学检测 肝组织分别行 HE 染色和胶原纤维染色^[4],在光镜下观察肝组织病理学改变。按照改良 Knodell 评分标准^[5]进行纤维化程度分级:0,无纤维化;1,汇管区扩大,轻度纤维化;2,汇管区周围纤维化,纤维隔形成,小叶结构保留;3,纤维隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化;4,早期肝硬变或肯定的肝硬化。

2.5 大鼠肝组织超微结构检测 取材,戊二醛锇酸双重固定,丙酮梯度脱水树脂包埋,超薄切片机超薄切片,染色,电镜观察。

2.6 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 17.0 统计软件进行组间方差分析,q 检验。纤维化程度以等级资料表示,采用 Ridit 检验进行分析。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠的一般情况 在实验期间,模型组大鼠逐渐出现皮毛松弛紊乱,毛色晦暗,精神差,好斗易怒,活动减少,食欲差,消瘦,至 8 周末实验结束时共死亡 2 只,因灌胃时误入气管窒息而死亡 2 只;玉米须醇提粉组于给药第 2 周因灌胃时误入气管窒息而各死亡 3 只;秋水仙碱组于给药第 3 周因患中耳炎防止传染而处死 1 只,因灌胃时误入气管窒息而死亡 2 只;A 组大鼠精神、活动、毛色及食欲无明显变化,因灌胃时误入气管窒息而死亡 2 只;将存活动物进行各项指标检测。

3.2 各组大鼠血清 LN,PC III,HA,CIV 检测 玉米须组 PC III,HA,CIV, LN 值,明显低于秋水仙碱组,差异有统计学意义(P < 0.01, P < 0.05),见表 1。

表 1 各组大鼠血清 LN,PC III,HA,CIV 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	HA	LN	PC III	CIV
正常对照	6	-	132.3 ± 7.4 ^{1,2,4)}	157.2 ± 11.7 ^{1,3)}	96.7 ± 2.4 ^{1,2,4)}	48.5 ± 1.2 ^{1,2,4)}
模型	8	-	357.0 ± 14.1 ⁴⁾	207.6 ± 27.4 ^{2,4)}	280.1 ± 3.2 ⁴⁾	180.0 ± 7.0 ⁴⁾
秋水仙碱	9	0.2	278.0 ± 13.3 ¹⁾	178.6 ± 4.3 ^{1,5)}	215.9 ± 4.0 ¹⁾	154.8 ± 0.9 ¹⁾
玉米须	9	5 400	219.4 ± 3.7 ^{1,2)}	162.4 ± 2.2 ^{1,3)}	193.2 ± 1.8 ^{1,2)}	138.0 ± 2.5 ^{1,2)}

注:与模型组比较¹⁾P < 0.01;与秋水仙碱组比较²⁾P < 0.01,³⁾P < 0.05;与玉米须组比较⁴⁾P < 0.01,⁵⁾P < 0.05。

3.3 肝脏组织病理学变化 HE 染色结果:A 组肝脏肝小叶结构正常,未见脂肪变性、坏死,无纤维增生;模型组正常肝小叶结构紊乱,纤维结缔组织增生形成纤维条索,分隔肝组织形成完全性假小叶;秋水仙碱组肝纤维组织增生减轻,纤维分隔肝组织形成不完全性假小叶;玉米须醇提物组肝细胞索排列较规则,接近正常肝组织,改善较显著。胶原纤维特殊染色结果:正常对照组脉管周围可见少量绿色胶原纤维;模型组见大量绿色胶原纤维增生,肝细胞被分割成大小不等的假小叶;秋水仙碱组汇管区及小叶间内见中等量绿色胶原纤维组织;玉米须醇提物组脉管周围见少量绿色胶原纤维;各组纤维组织增生情况与模型组比较差异显著,改善明显(P < 0.05)。见表 2。各组大鼠纤维组织分布情况,见表 2,图 1。

表 2 玉米须对大鼠肝纤维化分期的影响

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	0	1	2	3	4	Ridit 值
正常对照	6	-	6	0	0	0	0	0.375 0
模型	8	-	0	0	1	6	1	0.500 0
秋水仙碱	9	0.2	0	5	3	1	0	0.256 9 ¹⁾
玉米须	9	5 400	2	6	1	0	0	0.284 7 ¹⁾

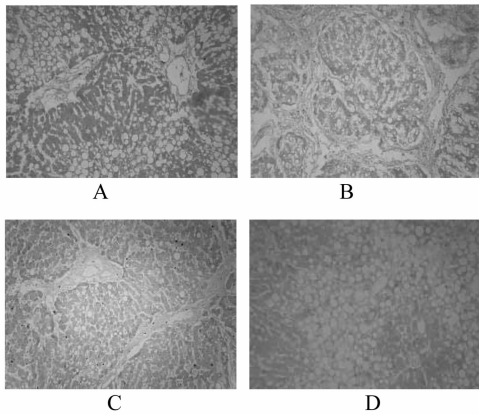
注:与模型组比较¹⁾P < 0.05。

3.4 各组大鼠肝组织 Smad₃ mRNA 检测 玉米须组 Smad₃ mRNA 值与正常对照组比较,无显著性差异,可见玉米须组降低 Smad₃ mRNA 的效果好,接近于正常组。见表 3。

表 3 各组大鼠肝组织 Smad₃ mRNA 的表达
变化 ($\bar{x} \pm s$) 目的基因/ β -actin 灰度比

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	Smad ₃ mRNA
正常对照	6	-	0.349 ± 0.066 ^{1,2)}
模型组	8	-	0.865 ± 0.084
秋水仙碱	9	0.2	0.632 ± 0.073 ¹⁾
玉米须	9	5 400	0.410 ± 0.026 ^{1,2)}

注:与模型组比较¹⁾P < 0.01;与秋水仙碱组比较²⁾P < 0.01。



A. 正常对照组; B. 模型组;

C. 秋水仙碱 0.2 mg·kg⁻¹组; D. 玉米须 5 400 mg·kg⁻¹组

图 1 各组大鼠肝组织胶原纤维染色(三色染色, ×200)

3.5 大鼠肝组织超微结构检测 A 组:肝细胞核圆形,肝细胞胞质内充满大量的线粒体,粗面内质网,线粒体嵴密集,基质密度集中。B 组:肝细胞核固缩,双层核膜结构清晰,核膜下可见轻度高密度染色质的边集现象,胞质内有大量的脂滴颗粒沉积。C 组:肝细胞核缩小,线粒体丰富嵴消失,呈絮状变,粗面内质网数量减少。D 组:肝细胞膜结构完好,核变圆,细胞核表面有轻度的皱缩,细胞器丰富,偶见脂滴颗粒。

4 讨论

肝纤维化是肝脏内纤维结缔组织异常增生,细胞外基质过度沉积的病理过程,是慢性肝病共有的病理特征,也是慢性肝炎、肝硬化发展恶化的重要中间环节,甚至原发性肝癌发展的中间环节。近年来随着对肝纤维化发生机制不断深入的研究发现,肝纤维化在未进入肝硬化之前是可能逆转的^[6],因而成为研究的热点。目前认为,肝星状细胞(HSC)的活化、增殖、过度分泌是肝纤维化形成的中心环节。HSC 激活后转化为肌纤维母细胞(MFb)样细胞表型,合成大量细胞外基质(ECM)沉积于肝脏,导致

纤维化的发生^[7]。TGF- β_1 是影响活化 HSC 促进胶原等细胞外基质合成、加剧肝纤维化形成的主要生物因子。TGF- β_1 对 HSC 的活化信号必须经过细胞膜相应受体及其下游效应分子(如 SMAD 蛋白),启动 HSC 细胞内信号传导系统而实现^[8]。因此,通过靶向性阻断 Smad₃ 信号有望成为治疗肝纤维化的新手段。

玉米须是禾本科玉蜀黍属植物玉米的花柱和柱头。经动物实验表明:玉米须水煎剂可加速血液凝固,血红蛋白、中性粒细胞、胆固醇、天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、酸性磷脂酶和钙含量降低,白血球、血红蛋白、碱性磷脂酶和肌酸酐含量增加,表明玉米须对血液病和肝病有一定的治疗作用^[9]。

HA, LN, PC III, CIV 是早期诊断肝纤维化最可靠的血清学指标。HA 在肝纤维化早期即见显著增加;LN 和 CIV 是构成基膜的成分,对上皮细胞的生长、分化具有重要意义,两者联合可反映肝窦毛细血管化和门管区纤维化;血清 PC III 的升高则提示活动性肝纤维化^[10]。在本实验中,各组 PC III, CIV, HA, LN 值均显著低于模型组,差异有统计学意义;玉米须组降 LN, HA, PC III, CIV 的效果优于秋水仙碱组;经过玉米须治疗后的大鼠肝内 Smad₃ mRNA 表达明显下降, 综上所述表明该药可能通过下调纤维化大鼠肝内 Smad₃ mRNA 的表达,靶向性阻断 Smad₃ 信号,反馈影响 HSC 的活化增殖,阻断了肝内胶原等 ECM 过度产生和沉积和 TGF- β 的分泌释放,从而减轻和控制肝纤维化。说明了该药具有良好的抗肝纤维化效果,其确切的机制有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 徐燕,邹忠梅,梁敬钰. 玉米须的化学成分[J]. 中国天然药物,2008,6(3):237.
 [2] 何艳,胡志峰,李平,等. 柴胡皂苷 d 抗肝纤维化大鼠脂质过氧化作用的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(8):915.
 [3] 龚作炯,宋仕玲,黄砚青,等. 培哚普利和缬沙坦对肝纤维化大鼠 TGF- β_1 及其 I, II 型受体 mRNA 与 Smad₃、Smad₇ 表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(12):738.
 [4] 刘月霞,金维哲,李尧,等. 大动脉三色染色法探讨[J]. 黑龙江医药科学,2005,28(4):62.