

# 苦参素对肝纤维化大鼠肝组织 NF- $\kappa$ B 和 CTGF 表达的影响

杨华<sup>1\*</sup>, 张知贵<sup>1</sup>, 封家福<sup>1</sup>, 杨学诚<sup>2</sup>

(1. 乐山职业技术学院, 四川 乐山 614000; 2. 广州中医药大学 2009 级研究生, 广州 510120)

**[摘要]** 目的: 探讨苦参素对实验性肝纤维化大鼠的肝组织核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和结缔组织生长因子(CTGF)表达的影响。方法: 利用四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导大鼠肝纤维化模型。SD 雄性大鼠 45 只, 随机分为苦参素组(60 mg·kg<sup>-1</sup> ip, 1 次/d, 连续 10 周)、模型组和正常对照组(ip 溶液橄榄油)于造模同时开始给予。10 周后剖取肝脏采用 HE 染色观察各组大鼠肝组织病理改变; 免疫组织化学法检测 NF- $\kappa$ B, CTGF 在肝组织内的表达。结果: 与模型组大鼠比较, 苦参素组大鼠肝纤维化水平明显减轻( $P < 0.01$ ), 肝组织 NF- $\kappa$ B, CTGF 表达明显降低( $P < 0.01$ )。结论: 苦参素可抑制模型大鼠肝纤维化的形成和发展, 其机制可能与下调肝内 NF- $\kappa$ B, CTGF 表达有关。

**[关键词]** 肝纤维化; 核转录因子- $\kappa$ B; 结缔组织生长因子; 苦参素

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0245-02

苦参素(oxytropine)又名氧化苦参碱, 是从中药广豆根中提取所得生物碱类, 具有抗炎、抗菌、抗病毒、抑制免疫、抗肿瘤等生物学作用, 近年来在抗纤维化治疗方面受到广泛的关注, 研究表明它可以影响转移生长因子- $\beta$ 1 表达, 抑制肝星状细胞(HSC-T6)增殖、胶原及透明质酸(HA)合成等, 从而发挥抗纤维化作用<sup>[1-2]</sup>。本实验观察了苦参素对实验性肝纤维化大鼠核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)和结缔组织生长因子(CTGF)表达的影响, 旨在探讨苦参素的抗纤维化作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 SD 雄性大鼠 45 只, 体重(200 ± 20)g, 购自成都中医药大学动物实验中心, 合格证号 SCXK(渝)2004-45。

**1.2 试剂与药物** 四氯化碳(CCl<sub>4</sub>, 上海联试化工试剂有限公司, 批号 000357), 40% 多聚甲醛、焦碳酸二乙酯(DEPC)、多聚赖氨酸、鼠 NF- $\kappa$ B P65 原位杂交检测试剂盒、原位杂交专用盖玻片(武汉博士德公司提供, 批号 20090124), 羊抗鼠 CTGF 即用型免疫组化试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司, 批号 090042F1), 苦参素(宁夏制药厂提供, 批号 090246)。

## 2 方法

**2.1 造模与给药** 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分

成 3 组: 模型组(CCl<sub>4</sub> 组)15 只, 40% CCl<sub>4</sub> 橄榄油 3 mL·kg<sup>-1</sup> 背部 sc, 2 次/周。实验第 6 周处死 2 只进行病理学检查, 证实肝纤维化已形成。剩余 13 只大鼠继续 sc 40% CCl<sub>4</sub> 橄榄油, 共 10 周。苦参素组 15 只, 造模同时予苦参素 60 mg·kg<sup>-1</sup> ip, 1 次/d, 共 10 周。正常对照组 15 只, sc 等量橄榄油, 共 10 周。

**2.2 病理学检测** 取各组大鼠肝脏, 10% 甲醛固定, 常规切片, HE 染色, 光学显微镜下观察肝脏组织学变化, 将肝纤维化分为 0~4 级<sup>[3]</sup>。

**2.3 免疫组化检测** 末次给药 24 h 后, 用 4% 水合氯醛 ip 麻醉大鼠, 取左叶同一部位肝组织, 置 10% 甲醛溶液中固定, 常规制片, 厚 4  $\mu$ m。NF- $\kappa$ B 克隆抗体以 1:200 稀释, 羊抗大鼠 CTGF 抗体工作浓度为 1:100, SP 法染色, DAB 显色。PBS 代替 I 抗作为阴性对照, 显色结果采用 Image-proplus 6.0 图像分析软件进行吸光度分析, 常规吸光度校正, 记录平均吸光度(A)。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, 等级资料比较采用秩和检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 大鼠肝脏组织病理学变化(HE 染色)** 正常对照组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞索排列规则, 在中央静脉周围呈放射状分布, 无细胞变性, 无炎症细胞浸润。模型组肝小叶结构破坏, 肝细胞索排列紊乱, 纤维结缔组织增生, 深入、包绕并分割正常肝组织, 形成假小叶; 纤维间隔内有炎细胞浸润。苦参素

[收稿日期] 2011-02-10

[通讯作者] \* 杨华, 讲师, 生物学, Tel: 18990602779, E-mail: 0811yh@163.com

组肝细胞变性坏死及肝纤维化程度较模型组明显减轻,炎性细胞浸润及结缔组织形成明显减少,纤维间隔显著变薄,未见明显假小叶。见表 1。

表 1 苦参素对大鼠肝脏组织病理学变化的影响

分组	n	肝纤维化分级				
		0	I	II	III	IV
正常对照	15	14	1	0	0	0
模型 <sup>1)</sup>	13	0	1	3	4	5
苦参素 <sup>1,2)</sup>	15	1	6	4	2	2

注:与正常对照组比<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2 同)。

### 3.2 对大鼠肝组织 NF- $\kappa$ B, CTGF 蛋白表达的影响

正常对照组 NF- $\kappa$ B p65 和 CTGF 蛋白在肝细胞质内有少量或无表达;模型组 NF- $\kappa$ B p65, CTGF 蛋白在肝细胞质内广泛大量表达;与模型组比,苦参素组 NF- $\kappa$ B p65, CTGF 蛋白表达明显下降( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 苦参素对大鼠肝组织 NF- $\kappa$ B, CTGF 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	NF- $\kappa$ B	CTGF
正常对照	15	-	0.48 ± 0.07	0.184 ± 0.051
模型	13	-	0.91 ± 0.10 <sup>1)</sup>	0.706 ± 0.142 <sup>1)</sup>
苦参素	15	60	0.61 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.252 ± 0.055 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

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。NF- $\kappa$ B 是近年来发现的一种多向性转录因子,参与调控多种细胞凋亡、增殖,并与肝纤维化关系密切。正常情况下 NF- $\kappa$ B 以无活性的形式存在细胞浆中。在病毒感染、内毒素、细胞因子等作用下 NF- $\kappa$ B 可活化,进入细胞核与相应的靶基因结合,启动细胞黏附分子、NOS 和环氧化酶-2(COX-2)等基因转录,导致促炎因子、自由基等炎症介质的产生,不断刺激 HSC 活化增殖,导致相应的病变。NF- $\kappa$ B 可抑制 HSC 的凋亡,使得活化的 HSC 的数量维持在一定的水平,一定程度上促进了纤维化的发生<sup>[4-5]</sup>。

研究发现 HSC 的活化是诱导 CTGF 表达的重要因素,CTGF 反过来也可能参与 HSC 的活化以及发挥其功能的全过程<sup>[6]</sup>。CTGF 还可能是多种纤维化

信号通路下游的共同效应因子,在肝纤维化的发生、发展过程中起着关键作用,是扳动肝纤维化产生的“总开关”<sup>[7]</sup>。因此,CTGF 生物学作用比其上游控件 TGF- $\beta_1$  更单一,主要局限在纤维化的发生方面。抑制 CTGF 表达的治疗比抗 TGF- $\beta_1$  更具针对性,而不影响 TGF- $\beta_1$  的抗炎、免疫抑制等重要生理作用。

本研究结果表明,模型组出现明显肝纤维化,苦参素组肝纤维化程度明显低于模型组;模型组肝组织 NF- $\kappa$ B, CTGF 蛋白表达均高于正常对照组,苦参素组 NF- $\kappa$ B, CTGF 蛋白表达较模型组明显下降。提示苦参素能使 NF- $\kappa$ B, CTGF 蛋白表达抑制,从而减缓 HSC 激活与增殖,进而减少细胞外基质(ECM)的合成、促进 ECM 分解,最终达到抗纤维化的作用。

### [参考文献]

- [1] 陈小亮,李俊,邓子煜,等.苦参素对肝纤维化大鼠肝脏 TGF- $\beta_1$  的调节作用[J].中国药理学通报,2009,25(6):761.
- [2] 刘涛,胡晋红,蔡溱.苦参碱抗肝纤维化机理的体外研究[J].解放军药理学学报,2000,16(3):119.
- [3] 立敏,陈丽艳.漏芦提取物对四氯化碳致肝纤维化大鼠 SOD,MD 及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达的影响[J].时珍国医国药,2007,18(10):2444.
- [4] Ruddell R G, Hoang-Le D, Barwood J M, et al. Ferritin functions as a proinflammatory cytokine via iron-independent protein kinase Czeta/nuclear factor kappaB-regulated signaling in rat hepatic stellate cells [J]. Hepatology, 2009, 49(3):887.
- [5] Son G, Imuro Y, Seki E, et al. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCL<sub>4</sub>-induced liver injury and fibrosis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 293:G631.
- [6] Dang M X, Jia Y, Zhang Y B, et al. Emodin protects rat liver from CCL<sub>4</sub> induced fibrogenesis via inhibition of hepatic stellate cells activation [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(38):4753.
- [7] Gressner O A, Gressner A M. Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases [J]. Liver Int, 2008, 28(8):1065.

[责任编辑 何伟]