

DOI:CNKI:11-3495/R.20110314.0942.010

虫草菌丝逆转二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的有效组分及其作用机制

李风华¹, 刘平^{2*}, 王春树²

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203;

2. 上海中医药大学肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

[摘要] 目的:研究虫草菌丝治疗二甲基亚硝胺(DMN)模型大鼠肝纤维化的有效组分及其作用机制。方法:大鼠 ip DMN 5 mg·kg⁻¹,每周连续 3d,共 4 周。造模结束后,模型大鼠随机分组,治疗组分别以虫草菌丝(CsB)及其组分(C12)以生药 800,5 mg·kg⁻¹ig,每日 1 次,共 2 周;正常组及模型组以等量生理盐水 ig。分别检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)活性,检测肝组织羟脯氨酸(Hyp)、丙二醛(MDA)含量,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和谷胱甘肽-S 转移酶(GST)活性,观察肝组织胶原沉积变化,免疫组织化学和蛋白印迹法(Western)检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和图像分析肿瘤坏死因子- α (TNF- α)阳性面积百分比,观察肝组织病理及胶原沉积变化。结果:与模型组比较,CsB 及 C12 治疗组大鼠血清 ALT,AST 活性显著降低($P < 0.05$)。与 6 周模型组比较,CsB 及 C12 治疗组大鼠肝组织 Hyp 含量显著降低($P < 0.05$)。模型组大鼠肝组织可见炎性细胞浸润,胶原增生明显,大多数形成较厚的完全间隔,假小叶形成。CsB 及 C12 治疗组的坏死出血、炎性细胞浸润、胶原增生、纤维间隔形成有所改善。与 6 周模型组相比,CsB 及 C12 治疗组的 SOD,GSH-Px 活性显著升高,MDA 含量,GST 活性显著降低($P < 0.01$)。与 6 周模型组比较,CsB 及 C12 治疗组大鼠肝组织 α -SMA,TGF- β 1 及 TNF- α 的蛋白表达显著减少($P < 0.01$)。结论:CsB 及 C12 能够显著改善肝功能,有显著抗肝纤维化作用。CsB 及 C12 能够显著减轻过氧化损伤,保护肝细胞,减少胶原生成,阻断和逆转二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化。CsB 和 C12 抑制库普弗细胞(KCs)活化和细胞因子 TNF- α ,TGF- β 1 的释放,抑制肝星状细胞(HSCs)活化,合成和分泌细胞外基质。

[关键词] 肝纤维化;虫草菌丝;氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0164-05

Actions of *Cordyceps sinensis* Berk. Sacc and its Effective Components on Reversing Liver Fibrosis Induced by Dimethylnitrosamine in Rats

LI Feng-hua¹, LIU Ping^{2*}, WANG Chun-shu²

(1. College of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases Approved by Ministry of Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of *Cordyceps sinensis* Berk Sacc (CsB) and its effective components on liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine (DMN) in rats. **Method:** From the 1st to 4th week, rats were treated with intraperitoneal injection of DMN (5 mg·kg⁻¹) for three continuous days each week.

[收稿日期] 20101014(005)

[基金项目] 国家科技部 973 计划(2006CB504801);上海市重点学科建设项目(Y0302);上海市教育委员会 E 研究院建设计划项目(E03008);上海市医学领军人才项目(2007A 卫 01);上海市科技创新团队建设项目(第一期)

[第一作者] 李风华,副研究员,硕士生导师,从事中药及其复方有效物质基础的研究,Tel:021-51322454,E-mail:lfh@hotmail.com

[通讯作者] *刘平,教授,博士生导师,从事中西医结合治疗肝病的临床及机制研究,Tel:021-51322454,E-mail:liuliver@vip.sina.com

[网络出版时间] 2011-03-14 09:42

After modeling, normal group and model group were given saline ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) intragastrically, and rats in drug treatment group were treated separately with CsB and its components C12 ($800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 2 weeks. All the rats were sacrificed to harvest blood and liver tissue sample. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transferase (AST) were detected, maleic dialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione S transferase (GST) in liver tissue were assayed biochemically. Content of hydroxyproline (Hyp) in liver tissue was assayed biochemically; Histological changes with collagen deposition with sirius red staining in rat liver tissue were observed. Expression of α -smooth muscle action (α -SMA), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), hepatocyte growth factor (HGF- α) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected immunohistologically. **Result:** Compared to 6 wk model group, serum ALT and AST in CsB and C12 group were lowered ($P < 0.05$). Compared to 6 wk model group, Hyp content in liver tissue in CsB and C12 group was decreased significantly ($P < 0.05$). Large area of hemorrhage and necrosis, swelling of large amount of hepatocytes, widened portal area, inflammatory cells infiltration, increased collagen deposition, and pseudolobule were seen in liver tissue in the model group. Some histological improvement was seen in CsB group and C12 group. Compared to 6 wk model group, CsB and C12 could increase SOD and GSH-Px activity, meanwhile decrease MDA and GST activity ($P < 0.01$). Compared to 6w model group, expression of α -SMA, TGF- β 1 and TNF- α in CsB and C12 was decreased obviously ($P < 0.01$). **Conclusion:** CsB and C12 blocks development and formation of liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine, through protecting hepatocytes to resist liver injury, decreasing synthesis of collagen, inhibiting oxidative stress. CsB and C12 inhibit KCs activation and release of cytokines, which further inhibits HSCs' activation, synthesis and secretion of ECM.

[**Key words**] liver fibrosis; CsB; oxidative stress

虫草菌丝应用于肝纤维化的治疗于 20 世纪 80 年代开始有相关的报道,本课题组在以往的研究中发现虫草菌丝在早期能抑制金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和金属蛋白酶-4 (MMP-4) 活性的增高,对二甲基亚硝胺 (DMN) 诱导大鼠肝纤维化启动有一定干预作用,对肝纤维化的形成具有良好抑制作用;对于 DMN 大鼠肝纤维化,虫草菌丝能显著促进其肝脏功能(肝功能、血窦内皮细胞功能)的复常及肝病理组织结构的逆转^[1-2]。其后我们以特定的方法分离出虫草菌丝的十多种不同组分进行药效学实验,获得了良好的实验效果。本研究基于前期课题研究成果,采用 DMN 大鼠肝纤维化模型,研究 CsB 及其有效组分 C12 的药效学,并进一步从抗组织氧化损伤,保护肝细胞,减少肝脏胶原的形成和促进分解,抑制库普弗活化和分泌细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α),转化生长因子- β 1 (TGF- β 1),对其有效组分进行研究,以明确虫草菌丝组分的作用机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雄性,清洁级,体重(150 ± 15)g,购自中国科学院上海实验动物中心,动物合格证号 SCXK(沪)2006-0009。上海中医药大学实验动物中心清洁区动物房饲养、造模和观察,自由饮食。

1.2 药物 发酵虫草菌丝 *Cordyceps sinensis* Berk. Sacc,以下简称 CsB,鉴定人谭俊杰副研究员(中国科学院上海药物研究所)。购自江西国药责任有限公司,常规水煎 2 次,每次 30 min 而成的水煎液。虫草菌丝组分(以下简称 C12)为 CsB 经极性提取后上柱分离所得的馏分,由中国科学院上海药物研究所提供,C12 得率为 0.8%。以上各药物均用蒸馏水稀释后 ig。

1.3 试剂 二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN),东京化成工业株式会社产品,批号 MAL06;肝功能[血清丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),白蛋白(Alb),总胆红素(TBil)]测定试剂盒,购自南京建成生物试剂有限公司;羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)对照品,日本ナカテイツク株式会社;小牛血清白蛋白(BSA),低分子标准蛋白,购自上海实生细胞生物技术有限公司;Two-Step™ Anti-Rabbit Detection Reagent (HRP),液体 DAB 酶底物显色试剂盒;兔抗大鼠 TNF- α (tumor necrosis factor- α) 多克隆抗体,武汉博士德公司产品;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、谷胱甘肽-S 转移酶(GST)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒,均购自南京建成

生物工程研究所,批号 20080910,多小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体购自武汉博士德公司产品,批号 BM0002;辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠 IgG, Chemicon 公司产品, Lot24051142;辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔 IgG,北京中杉公司产品,批号 67166; PowerVision™ Two-Step Histostaining Reagent (Goat anti-Rabbit IgG/HRP),北京中杉金桥生物技术公司,批号 N045038;辣根过氧化物酶偶联兔抗山羊 IgG,北京中杉公司产品,批号 65356;硝酸纤维素膜,购自 Amersham 公司, Catalog NoRPN303C; β -巯基乙醇(2-Mercaptoethanol),电泳纯,Amersco 公司产品;预染蛋白标准品,纽英伦生物技术(北京)有限公司产品, LotP7708V。

1.4 仪器 20RS 型高速冷冻离心机,德国 HERAUS 公司产品;紫外-可见光分光光度计 UV2102C 型,上海 Unico 仪器有限公司;pH 计,美国 Beckman 公司产品;照相机 Olympus,型号:IX70;控制系统 Olympus PM-30;HPIAS-1000 高清晰彩色病理图文分析系统,购自同济大千屏影像公司。

2 方法

2.1 模型制备 参考 Ala-kokkol 方法^[3],生理盐水稀释 DMN 为 0.5% (1:199 生理盐水)浓度,以 5 mg·kg⁻¹剂量 ip,每周连续 3 d,每天 1 次,共 4 周。

2.2 分组与给药 造模 4 周后,将大鼠随机分为模型对照组和药物治疗组,药物治疗组 ig 虫草菌丝水提物(CsB)和有效组分(C12),模型对照组 ig 等量蒸馏水。CsB 剂量为生药 800 mg·kg⁻¹·d⁻¹,C12 剂量为提取物 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹,用药治疗 2 周后处死鼠取材。

2.3 样品的采集和处理 用药 2 周结束后,将大鼠用 2% 戊巴比妥钠以 2 mL·kg⁻¹剂量 ip 麻醉,仰卧位固定,打开腹腔,观察大体情况,肝脾的色、质、形态情况。经下腔静脉采血,留取肝组织 -70℃ 保存备用。

2.4 血清肝功能检测 按试剂盒说明书测定血清 ALT,AST,赖氏法均采用卫生部上海生物制品研究所试剂盒说明书测定。

2.5 肝组织羟脯氨酸含量 测定参照 Jamall 氏法^[3]

2.6 肝组织 SOD,MDA,GST,GSH-Px 测定 按照试剂盒的说明书方法分别测定和计算 SOD,MDA,GST 以及 GSH-Px。

2.7 肝组织病理学观察 肝组织常规脱水、包埋、切片(4 μ m 厚),分别作 HE 及天狼星红染色,免疫组织化学染色(两步法),检测指标:光镜观察肝组织病理学变化并拍照、扫描。

2.8 免疫组织化学染色(两步法) 检测指标:肝组织 α -SMA,TGF- β 1,TNF- α 。

2.9 Western blot 印迹法 检测指标:肝组织 α -SMA,TGF- β 1。取 100mg 肝组织置于 1 mL RIPA 裂解液中,于冰浴中 7000 r·min⁻¹匀浆裂解蛋白,将肝组织匀浆液立即移至离心管中,低温高速离心机 12 000 r·min⁻¹离心 10 min,取其上清液按 Bio-Rad 公司试剂盒说明书测定总蛋白以确定上样量。蛋白质电泳:制备 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,取含 30 μ g 总蛋白的匀浆液与 4 倍样品缓冲液混和沸水煮 5 ~ 10 min 变性,上样后电泳。电泳条件:80 V,时间约 2 h。蛋白质的电转移与膜的封闭:电泳后将凝胶取出,上覆与凝胶同样大小硝酸纤维素膜,两侧铺垫滤纸及纤维垫,置于转膜槽中,凝胶朝向负极。转膜条件:电压 100 V,时间 1 h,温度 4℃。转膜结束后,取出硝酸纤维素膜,丽春红染色,用铅笔标出标准蛋白位置,水洗脱色后,以 5% 脱脂奶粉 TTBS 室温封闭 1 h。封闭结束后,分别加入以下抗体稀释液孵育,4℃ 过夜,TTBS 洗 5 min \times 3 次,再以 HRP 偶联的第二抗体作用,室温震荡 1 h,TTBS 洗 5 min \times 3 次,除去未结合的二抗。取 ECL 发光剂,浸膜 5 min,曝光,显影,水洗,定影,烘干。应用复日 FR-980 生物电泳图像分析系统分析底片中的目的条带,计算机自动读取并记录每条带的吸光度(A)。

2.10 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计算机统计分析软件 SPSS 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析,并用 LSD 或 Tamhane 进行两两比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 肝组织形态学变化 肝组织天狼星红胶原纤维染色观察 正常大鼠仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维。模型对照大鼠肝组织胶原增生明显,纤维组织弥漫性增生严重,向肝小叶组织内伸展,分割包绕肝组织,大多数形成较厚的完全间隔,形成网状或龟壳状肝窦周围纤维化,肝小叶结构紊乱形成假小叶。CsB 及 C12 治疗组大鼠肝组织纤维组织增生程度减轻,纤维间隔较窄,着色浅,多为不完全间隔,肝窦内连续性环状胶原减少或断续,见

图 1。

3.2 大鼠血清肝功能的变化 与同期正常组大鼠比较,模型组大鼠血清 ALT 和 AST 活性显著增高($P < 0.01$);与 6 周模型对照组比较,CsB 及 C12 治

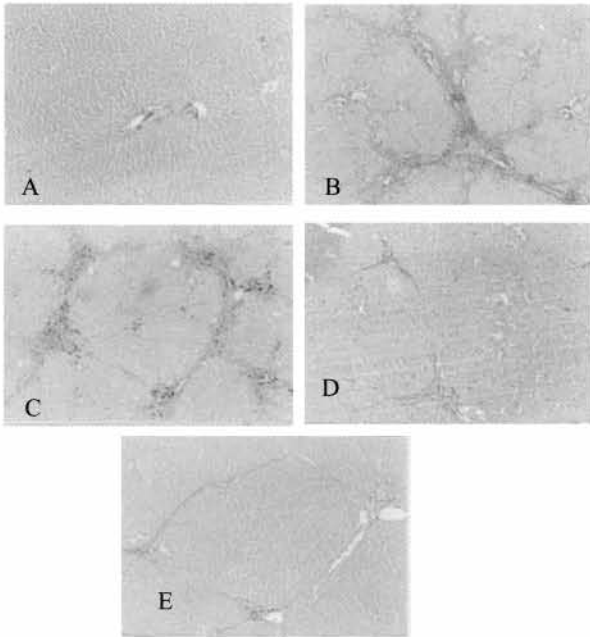


图 1 各组大鼠肝组织变化(天狼星红染色×100)

A. 正常组;B. 4 周模型组;C. 6 周模型组;
D. CsB 800 mg·kg⁻¹ 2 周治疗组;E. C12 5 mg·kg⁻¹ 2 周治疗组

疗组大鼠血清 ALT,AST 活性显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),CsB 及 C12 组之间没有统计学意义,见表 1。

表 1 虫草菌丝及组分对大鼠血清 ALT,AST 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	U·L ⁻¹	
			ALT	AST
正常	8	-	34.95 ± 5.49	228.53 ± 20.19
4 周模型	8	-	82.19 ± 13.13 ²⁾	301.71 ± 28.04 ²⁾
6 周模型	10	-	60.20 ± 25.18 ²⁾	285.04 ± 27.46 ²⁾
CsB 治疗	10	800	36.74 ± 3.33 ⁴⁾	258.98 ± 13.08 ⁴⁾
C12 治疗	10	5	39.73 ± 5.80 ⁴⁾	255.89 ± 24.96 ⁴⁾

注:与正常组比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 6 周模型组比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 肝组织 Hyp,MDA 含量,总 SOD,GSH-Px,GST 活性变化 与同期正常组大鼠比较,4 周与 6 周模型组大鼠肝组织 Hyp 含量显著增加($P < 0.01$),大鼠肝组织总 SOD,GSH-Px 活性明显降低($P < 0.01$),大鼠肝组织 MDA 含量、GST 活性显著升高($P < 0.01$)。与 6 周模型组比较,CsB 及 C12 治疗组肝组织 Hyp 含量显著降低($P < 0.01$),肝组织总 SOD,GSH-Px 活性显著升高($P < 0.01$),MDA 含量及 GST 活性显著降低($P < 0.01$),CsB 及 C12 两组间显著性差异,见表 2。

表 2 虫草菌丝及组分对大鼠肝组织 Hyp,MDA 含量,总 SOD,GSH-Px,GST 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	Hyp	SOD	MDA	GST	GSH-PX
			/mg·g ⁻¹	/U·mg ⁻¹	/nmol·mg ⁻¹	/U·mg ⁻¹	/U·mg ⁻¹
正常	6	-	2.25 ± 0.28	323.14 ± 38.73	1.34 ± 0.24	28.94 ± 5.16	164.62 ± 20.2
4 周模型	6	-	6.51 ± 1.50 ²⁾	229.73 ± 16.01 ²⁾	3.65 ± 0.411 ²⁾	51.20 ± 4.66 ²⁾	118.62 ± 24.36 ²⁾
6 周模型	8	-	6.13 ± 1.75 ²⁾	257.03 ± 26.94 ²⁾	3.03 ± 0.58 ²⁾	45.35 ± 3.69 ²⁾	110.01 ± 21.67 ²⁾
CsB 治疗	8	800	4.71 ± 9.85 ⁴⁾	334.95 ± 11.45 ⁴⁾	1.98 ± 0.15 ⁴⁾	30.73 ± 3.68 ⁴⁾	144.01 ± 20.52 ⁴⁾
C12 治疗	8	5	4.83 ± 0.93 ⁴⁾	350.54 ± 44.22 ⁴⁾	1.79 ± 0.33 ⁴⁾	30.13 ± 4.87 ⁴⁾	147.99 ± 9.31 ⁴⁾

3.4 各组大鼠肝组织 TGF-β1,α-SMA,TNF-α 蛋白表达变化 蛋白印迹显示,正常大鼠肝组织 TGF-β1 和 α-SMA 少量表达,与正常组比较,模型组显著增加($P < 0.01$),CsB 和 C12 组显著低于模型对照组($P < 0.01$);图像分析显示,与正常组比较,模型组肝组织 TNF-α 表达阳性面积比显著增加($P < 0.01$),CsB 及 C12 治疗组肝组织表达阳性面积比显著低于模型对照组($P < 0.01$),见表 3。

4 讨论

氧化应激在 DMN 模型纤维化发生发展过程中发挥着重要作用,DMN 进入体内后其代谢产物可导致活性氧生成与抗氧化防御系统的平衡被破坏,产生氧化应激反应,氧化应激产物直接诱导星状细胞活化和胶原沉积;另外一方面是氧化应激产物 MDA 直接刺激肝脏胶原基因的表达,导致细胞外基质的沉积,氧化应激产物直接激活库普弗细胞并释放

表 3 各组大鼠肝组织 TGF-β1, α-SMA, TNF-α 蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TGF-β1/GAPDH	α-SMA/GAPDH	TNF-α 阳性面积比
正常	-	0.24 ± 0.07	0.022 ± 0.005	0 ± 0
4 周模型	-	1.87 ± 0.04 ²⁾	2.079 ± 0.069 ²⁾	0.29 ± 0.04 ²⁾
6 周模型	-	1.86 ± 0.15 ²⁾	1.908 ± 0.068 ²⁾	0.20 ± 0.02 ²⁾
CsB 治疗	800	1.64 ± 0.06 ⁴⁾	1.107 ± 0.048 ⁴⁾	0.13 ± 0.02 ⁴⁾
C12 治疗	5	1.51 ± 0.03 ⁴⁾	1.025 ± 0.017 ⁴⁾	0.14 ± 0.01 ⁴⁾

TNF-α, 启动肝星状细胞活化^[6-9], 氧化应激刺激库普弗细胞活化, 分泌 TNF-α, TGF-β1。TGF-β1 活化肝星状细胞使之成为肌成纤维细胞, 肌成纤维细胞又可自分泌 TGF-β1, 诱导肝细胞凋亡, 加重肝纤维化的形成。

本研究结果显示, CsB 与 C12 可显著降低 DMN 肝硬化大鼠肝组织 MDA 含量及肝组织 GST 活性分, 显著提高肝组织 GSH-Px 及 SOD 活性; 肝组织 TNF-α, TGF-β1 及 α-SMA 蛋白表达量均显著降低; 且 CsB 与 C12 的作用基本一致, 两者间无显著性差异; 结合药效学实验结果可以认为, CsB 及 C12 实现良好的抗纤维化机制可能与抗组织氧化损伤, 保护肝细胞, 减少肝脏胶原的形成和促进分解, 抑制库普弗活化和分泌 TNF-α, TGF-β1, 抑制肝星状细胞活化有关。

[参考文献]

[1] 李风华, 刘平, 熊伟国, 等. 虫草多糖逆转 DMN 诱导大鼠肝纤维化的作用及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(12): 1968.
[2] 李风华, 刘平, 熊伟国, 等. 冬虫草菌丝对二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化的作用 [J]. 中西医结合学报, 2006, 4(5): 514.

[3] Ala-Kokkol, Pihlajaemi T, Myers. Gene expressions of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat [J]. Biochem, 1987, 16(5): 244, 75.
[4] Wu D, Cederbaum A I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage [J]. Alcohol research & health, 2003, 27(4): 277.
[5] 孙保木. 脂肪性肝纤维化研究进展. 全国中西医结合肝病学术会议论文汇编 2002: 297.
[6] Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver [J]. Immunol Rev, 2000, 174: 21.
[7] Shi G F, Li Q. Effects of oxymatrine on experimental hepatic fibrosis and its mechanism in vivo [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(12): 268.
[8] Dai K, Qi J Y, Tian D Y. Leptin administration exacerbates esthioacetamide-induced liver fibrosis in mice [J]. World Gastroenterol, 2005, 11(4): 4822.
[9] Campo G M, Avenoso A, Campo S, et al. The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride induced liver fibrogenesis [J]. Chem Biol Interact, 2004, 148(3): 125.

[责任编辑 聂淑琴]