

## 八味柔肝颗粒对肝纤维化大鼠肝组织 TGF- $\beta_1$ , $\alpha$ -SMA 及 TIMP-1 表达的影响

伍朝君<sup>1</sup>, 朱舟<sup>2\*</sup>, 邓志刚<sup>3</sup>

(1. 乐山职业技术学院, 四川 乐山 614000; 2. 重庆市中医研究院, 重庆 400013;  
3. 乐山市中医院, 四川 乐山 614000)

**[摘要]** 目的: 探讨八味柔肝颗粒对大鼠实验性肝纤维化的治疗作用。方法: 以四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导大鼠肝纤维化模型。将大鼠随机分为八味柔肝颗粒治疗组(0.75, 1.5, 3 g·kg<sup>-1</sup>)、模型组、秋水仙碱组(0.5 mg·kg<sup>-1</sup>)和空白对照组。均连续 ig 6 周, 观察各组肝组织中转移生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)蛋白表达情况。结果: 八味柔肝颗粒组 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, TIMP-1 表达明显低于模型组( $P < 0.01$ )。结论: 八味柔肝颗粒能抑制 CCl<sub>4</sub> 诱导实验性肝纤维化大鼠肝组织 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, TIMP-1 的表达, 可能是其抗肝纤维化的主要作用机制。

**[关键词]** 肝纤维化; 八味柔肝颗粒; 四氯化碳(CCl<sub>4</sub>); 转移生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ );  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA); 金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0217-02

八味柔肝颗粒是乐山市中医院使用多年的院内制剂, 临床用于治疗肝纤维化、肝硬化, 具有较好的临床疗效。本研究观察了八味柔肝颗粒对 CCl<sub>4</sub> 造模大鼠肝纤维化的治疗作用。

### 1 材料

清洁级 SD 雄性大鼠 70 只, 体重 180 ~ 200 g, 由成都中医药大学动物实验中心提供, 动物合格证号 SCXK(渝)2004-17。

八味柔肝颗粒(三七、穿山甲、防己、商陆等组成), 由乐山市中医院提供, 批号 100411; 秋水仙碱, 西双版纳版纳药业有限责任公司, 批号 20080121; 四氯化碳(CCl<sub>4</sub>), 上海联试化工试剂有限公司, 批号 000320;  $\alpha$ -SMA, TIMP-1, TGF- $\beta_1$  抗体, 武汉博士德生物工程有限公司, 批号 20090541。

### 2 方法

**2.1 模型制备** SD 雄性大鼠 70 只, 其中 10 只为正常对照组, 其余大鼠采用花生油配成 50% 的 CCl<sub>4</sub> 溶液, 按 CCl<sub>4</sub> 1 mL·kg<sup>-1</sup>, ig, 2 次/周, 于造模第 6 周随机抽取 2 只进行病理学检查, 检测肝纤维化已经形成。

**2.2 给药方法** 58 只大鼠随机分成模型组、秋水仙碱组和八味柔肝颗粒高、中、低剂量组, 每组 10 只。从第 6 周开始, 正常对照组与模型组予生理盐水 10 mL·kg<sup>-1</sup> ig, 秋水仙碱组以秋水仙碱水溶液 0.5 mg·kg<sup>-1</sup>, ig, 八味柔肝颗粒组分别以八味柔肝颗粒 0.75, 1.5, 3 g·kg<sup>-1</sup>, ig, 1 次/d, 共 6 周。

**2.3 标本采集与制备** 末次给药 24 h 后, 用 4% 水合氯醛 ip 麻醉, 取左叶同一部位肝组织置 10% 甲醛溶液中固定备用, 常规制片, 厚度为 4  $\mu$ m。

**2.4 免疫组化检测** 以试剂公司提供的 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, TIMP-1,  $\alpha$ -SMA I 和 II 型胶元阳性片作阳性对照, PBS 代替第一抗体作为阴性对照, DAB 染色。每张切片取 5 个视野, 测定 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, TIMP-1 蛋白阳性产物的积分吸光度(IA)。

**2.5 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

实验结束时, 模型组和秋水仙碱组各有 1 只死亡, 正常对照组和八味柔肝颗粒各组均存活。

**3.1 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达检测** 正常对照组 TGF- $\beta_1$  表达仅见于汇管区、肝窦内皮细胞、中央静脉周围细胞, 着色较浅、范围窄; 模型对照组 TGF- $\beta_1$  的表达分布除上述区域外还分布在部分肝细胞及纤维间隔内, 呈棕黄色颗粒状, 并且范围广; 与模型组比较, 用

**[收稿日期]** 2011-01-25

**[第一作者]** 伍朝君, 讲师, 中药学, Tel: 15283303686, E-mail: wuchaojun11x@163.com

**[通讯作者]** \*朱舟, 副主任中药师, 从事中药药理研究, Tel: 15002370997, E-mail: zlxhj@163.com

药后秋水仙碱组、八味柔肝颗粒各组阳性表达有所降低,分布范围变小( $P < 0.01$ ),见表 1。

**3.2  $\alpha$ -SMA 表达检测** 正常对照组血管壁有少量  $\alpha$ -SMA 阳性表达,肝小叶未见阳性反应;模型组静脉、汇管区、纤维间隔和邻近的肝窦分布大量的阳性表达细胞,胞体伸展,胞质呈棕黄色,着色明显。与模型组比较,用药后秋水仙碱组、八味柔肝颗粒各组上述部位阳性细胞数目显著减少,胞质阳性染色显

著减轻, $\alpha$ -SMA 表达明显降低( $P < 0.01$ ),见表 1。

**3.3 TIMP-1 表达检测** 正常对照组仅少数标本血管壁和中央静脉周围有少量 TIMP-1 阳性染色,且着色较浅;模型组阳性染色多集中于纤维间隔、中央静脉周围、肝窦处间质,胞质呈棕黄色,着色较深。与模型组比较,用药后秋水仙碱组、八味柔肝颗粒各组在汇管区和纤维间隔中有少许淡黄色的阳性染色, TIMP-1 表达明显降低( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 八味柔肝颗粒对肝纤维化大鼠 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, TIMP-1 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

IA

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TGF- $\beta_1$	$\alpha$ -SMA	TIMP-1
正常对照	-	0.37 $\pm$ 0.07 <sup>2)</sup>	1.72 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>	2.71 $\pm$ 0.61 <sup>2)</sup>
模型	-	0.79 $\pm$ 0.08	7.33 $\pm$ 1.24	7.72 $\pm$ 0.84
秋水仙碱	5 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	0.49 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>	3.37 $\pm$ 0.92 <sup>2)</sup>	3.77 $\pm$ 0.44 <sup>2)</sup>
八味柔肝颗粒	0.75	0.67 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>	5.42 $\pm$ 0.71 <sup>1)</sup>	5.39 $\pm$ 0.57 <sup>1)</sup>
	1.5	0.38 $\pm$ 0.06 <sup>2,4)</sup>	2.58 $\pm$ 0.49 <sup>2,3)</sup>	2.70 $\pm$ 0.24 <sup>2,4)</sup>
	3.0	0.36 $\pm$ 0.04 <sup>2,4)</sup>	2.55 $\pm$ 0.48 <sup>2,4)</sup>	2.68 $\pm$ 0.21 <sup>2,4)</sup>

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

#### 4 讨论

肝纤维化的基本证候病机为正虚血瘀,正虚主要表现为气阴两虚;血瘀则主要表现为瘀血阻络<sup>[1]</sup>。八味柔肝颗粒中三七、穿山甲、土鳖虫活血散瘀,防己、商陆利水消肿,郁金行气化瘀,白术健脾、沙苑子补肝益肾,诸药相伍,共奏活血化瘀、利水消肿之功,祛邪而不伤正。

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<sup>[1]</sup>。TGF- $\beta_1$  是提高肝纤维化最有效的细胞因子,能够抑制肝细胞的增殖,激发 HSC 的活化,促进 ECM 的产生,并调节肝细胞的凋亡<sup>[2]</sup>。研究表明, TGF- $\beta_1$  水平在有病变的组织器官中会大大提高,尤其是在纤维病变的区域,是调控肝纤维化发生发展的核心物质<sup>[3]</sup>。 $\alpha$ -SMA 是 HSC 激活的标志,激活的 HSC 可分泌包括 TGF- $\beta_1$  在内的多种细胞因子; TIMP-1 为可溶性蛋白质分子,在肝纤维化形成过程中 TIMP-1 表达增强,可抑制 MMPs 活力,使 ECM 降

解减少,促使肝纤维化形成, TIMP-1 增加的程度可反映肝纤维化的严重程度<sup>[4]</sup>。

本研究结果表明,八味柔肝颗粒各剂量组 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, TIMP-1 表达明显低于模型组。八味柔肝颗粒临床治疗肝纤维化的机制可能为降低 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA, TIMP-1 蛋白表达,从而抑制 HSC 的活化,降低胶原纤维的过度生成。八味柔肝颗粒对实验性肝纤维化具有很好防治作用,为临床应用提供了一定理论依据,值得进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南[J]. 药品评价, 2007, 4(4): 260.
- [2] 党双锁, 李亚萍. TGF- $\beta_1$  在肝纤维化研究中的新进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010(16): 1631.
- [3] 殷亮, 杨生生. 转化生长因子  $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 在肝纤维化中的作用[J]. 肝脏, 2007, 12(5): 416.
- [4] 张连峰, 田笑笑, 王春峰. 转化生长因子  $\beta_1$  和基质金属蛋白酶抑制因子-1 在肝纤维化诊断中的作用及关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(4): 258.

[责任编辑 何伟]