

## 复方六月青对肝纤维化大鼠肝脏 I 型胶原合成的抑制作用

张士军<sup>1</sup>, 陈兆霓<sup>1</sup>, 张志伟<sup>2</sup>, 刘曦<sup>1</sup>, 付书婕<sup>1</sup>, 黄仁彬<sup>\*</sup>

(1. 广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021; 2. 广西中医学院附属瑞康医院, 南宁 530011)

[摘要] 目的: 研究复方六月青(CLYQ)对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)致肝纤维化大鼠肝组织 I 型胶原(Col I)合成的抑制作用。方法: SD 大鼠 sc CCl<sub>4</sub> 建立肝纤维化模型, 随机分为 5 组: 模型对照组、秋水仙碱组、CLYQ 高剂量组、中剂量组、低剂量组, 并设正常 SD 大鼠为空白对照组。模型组和空白对照组 ig 生理盐水, 其他组 ig 相应的药物, 连续 4 周。采用实时荧光定量 PCR 法检测各组肝组织 Col I mRNA 表达情况, 采用免疫组织化学法检测各组肝组织 Col I 蛋白表达情况。结果: 与模型对照组比, CLYQ 各剂量组大鼠肝组织 Col I mRNA 的表达均下调 ( $P < 0.01$ ), 且表现一定的剂量依赖性; CLYQ 各剂量组大鼠肝组织 Col I 蛋白阳性表达面积和强度显著减少和减弱 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 且呈明显的剂量依赖性。结论: CLYQ 可下调肝纤维化大鼠肝组织 Col I mRNA 表达及其蛋白质合成以抑制细胞外基质的沉积, 从而发挥其抗肝纤维化的作用。

[关键词] 复方六月青; 肝纤维化; I 型胶原; 实时荧光定量 PCR; 免疫组织化学法

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0140-04

## Inhibitory Effect of Compound Liuyueqing on Synthesis of Collagen Type I in Hepatic Tissues in Rats with Hepatic Fibrosis

ZHANG Shi-jun<sup>1</sup>, CHEN Zhao-ni<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-wei<sup>2</sup>, LIU Xi<sup>1</sup>, FU Shu-jie<sup>1</sup>, HUANG Ren-bin<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530011, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of Compound Liuyueqing(CLYQ) on the synthesis of Collagen type I (Col I) in hepatic tissues in rats with hepatic fibrosis. **Method:** Hepatic fibrosis model of SD rats was induced by subcutaneous injection (sc) of CCl<sub>4</sub>. Hepatic fibrosis SD rats were divided into 5 groups randomly: model control group, colchicina-group, high dose, middle dose and low dose of CLYQ groups, and normal SD rats were the blank control group. Model control group and blank control group were treated with normal saline, and the other groups were treated with corresponding drugs for four consecutive weeks by intragastric administration (ig). The relative quantification of Col I mRNA expression in hepatic tissues was detected by real time fluorescence quantitative PCR, and the quantification of Col I protein expression was detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the model group, the various dosage groups of CLYQ could down regulate significantly Col I mRNA expression ( $P < 0.01$ ) and showed a dose-dependent relationship according to the results of real time fluorescence quantitative PCR. The results of immunohistochemistry showed that after treated with CLYQ the area and the intensity of Col I protein expression in hepatic tissues were reduced and weakened significantly ( $P < 0.05$ , or  $P < 0.01$ ) compared with that of the model group. Col I protein expression was reduced obviously in a dose = dependent manner. **Conclusion:** CLYQ can down-regulate the expression of Col I mRNA and protein synthesis in hepatic

[收稿日期] 20100522(003)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0322024-5 E); 广西研究生教育创新计划资助项目(2006105981007D14)

[第一作者] 张士军, 博士, 副教授, 研究方向: 抗肝纤维化药物研究, Tel: 0771-5358272, E-mail: gxykdxzsj@163.com

[通讯作者] \* 黄仁彬, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 抗肝纤维化和心血管药物研究, Tel: 13807713926, E-mail: huangrenbin518@163.com

tissues of hepatic fibrosis rats. The results suggest that CLYQ can reduce the collagen, thus suppressing the deposition of ECM. Hence CLYQ has the marked effect of anti-hepatic fibrosis.

**[Key words]** Compound Liuyueqing; hepatic fibrosis; collagen type I; real time fluorescence quantitative PCR; immunohistochemistry

六月青系爵床科(Acanthaceae)肖鸡笼属植物肖鸡笼(顶花马兰)*Taraphochlamys affinis*(Giff) Bremekhu的干燥地上部分<sup>[1]</sup>,为广西民间草药。它与白花蛇舌草、栀子花根等组成复方六月青(CLQ),又称复方六月雪)。CLQ是根据长时期的临床观察而拟定的治疗急慢性乙型肝炎的验方,用于治疗急性黄疸性肝炎的湿热黄疸等证。试验研究发现,CLQ对鸭乙型肝炎病毒 DNA 具有抑制作用<sup>[2]</sup>,CLQ有效地抑制 HepG2. 2. 15 细胞 HBV DNA 的复制<sup>[3]</sup>。本试验采用 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化模型,研究 CLQ 对肝纤维化大鼠肝脏 Ⅰ型胶原 mRNA 表达和蛋白合成的抑制作用,为开发 CLQ 用于肝纤维化治疗提供试验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD(Sprague-Dawley)大鼠,雄性,体重(230 ± 30)g;由广西医科大学试验动物中心提供。试验动物生产许可证 SCXKG(桂)2003-0003,试验动物使用许可证 SYKG(桂)2003-0005。

**1.2 药品与试剂** CLQ:由广西医科大学药理学教研室采用醇水双提的最佳工艺提取<sup>[4]</sup>;秋水仙碱:云南昊邦制药有限公司,批号 20061109。Trizol 试剂,美国 Invitrogen 公司,批号 1382739; cDNA 逆转录试剂盒,美国 MBI 公司,批号 00041427; TaqDNA 聚合酶:美国 MBI 公司,批号 0023191; RealMasterMix(SYBR Green):天根生化科技(北京)有限公司,批号 J8204;一抗 RAB ANTI RAT COLLAGEN : Biogenesis Morphosys,批号 080606;二抗 Super Picture™-HRP Polymer(广谱):天津津脉,批号 87-8963。

**1.3 仪器** iCycler iQ 实时荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司; 76002 凝胶电泳成像分析系统,英国 UVitec 公司;核酸蛋白测定仪,美国 Bio-Rad; 4590 型包埋机,日本 SAKURA FINETECHNICAL CO. LTD; RM 2235 型病理组织切片机,德国 Leica 公司; DMR + 550 型病理图像分析仪:德国 Leica 公司。

## 2 方法

**2.1 CCl<sub>4</sub> 诱发 SD 大鼠肝纤维化动物模型的建立**

SD 雄性大鼠按体重随机分为 2 组:空白对照组及肝纤维化模型组。肝纤维化模型组 100 只,背部 sc CCl<sub>4</sub> 造模,剂量 0.3 mL·100 g<sup>-1</sup>,每周 2 次。空白对照组 10 只,采用生理盐水背部 sc,剂量同肝纤维化模型组,每周 2 次。分别于造模后第 4 周、第 5 周及第 6 周抽取 2 只肝纤维化大鼠及 1 只正常对照组大鼠,进行病理学检查,监测肝纤维化形成的情况。

**2.2 分组及用药** 选择肝纤维化大鼠 50 只,随机分为以下 5 组,每组 10 只。模型对照组:等量的生理盐水; 阳性对照组:秋水仙碱,0.2 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>; CLQ 高剂量组:30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>; CLQ 中剂量组:15 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>; CLQ 低剂量组:7.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。未注射 CCl<sub>4</sub> 造模的空白对照组给予等量的生理盐水。试验期间各组动物饲标准饲料,在同样条件下饲养,均以每天 1 次 ig 连续给药 4 周。每天观察大鼠一般状况、饮食变化、行为变化、毛发变化。末次给药 24 h 后,戊巴比妥钠麻醉,打开腹腔,迅速称取约 50 ~ 100 mg 肝组织放入液氮中迅速冷冻后,转移放置于 - 80 °C 超低温冰箱保存,用于抽提肝组织总 RNA。于肝左叶同一部位取肝组织约 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小,固定于 10% 中性福尔马林溶液,做免疫组化用。

**2.3 CLQ 对肝纤维化大鼠肝脏 Col I mRNA 表达的影响** 采用 Trizol 法抽提细胞中总 RNA。用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 均在 1.8 ~ 2.0。取 cDNA 5 μg,采用 M-MuLV 逆转录酶将其逆转录成 cDNA。根据 Gene Bank 查找基因序列,利用 Primer 5.0 自行设计引物。引物序列为: Col I: FP: 5'-CAACCTCAAGAAGTCCCTGC-3', RP: 5'-AGGTGAATCGACTGTTGCCT-3'; GAPDH: FP: 5'-ATGATTCTACCCACGGCAAG-3', RP: 5'-CTGGAAGATGGTGATGGGTT-3'。Genebank 号分别为 Z78279.1 和 NM-017008.3。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。将 FQ-PCR 反应体系各成分充分混匀后,按以下条件进行: 95 °C 预变性, 5 min; 94 °C 变性, 10 s; 55 °C 退火, 20 s; 72 °C 延伸, 20 s。共反应 40 个循环。 72 °C 延伸, 5 min。扩增过程

及荧光信号检查、数据的储存和分析均由仪器及自带的软件自动完成。

### 2.4 CLYQ 对肝纤维化大鼠肝脏 Col I 蛋白的影响

严格按试剂盒说明依次操作,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。选取阳性部位明显的区域采图,Col I 蛋白表达的定量结果分析使用图像分析系统计算阳性面积百分比(%)。

### 2.5 统计方法

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,以 SPSS13.0 统计学软件统计。组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 CLYQ 对肝纤维化大鼠肝脏 Col I mRNA 表达的影响

与模型对照组相比较,CLYQ 各浓度组均可显著下调 Col I mRNA 的表达( $P < 0.01$ ),且表现一定的剂量依赖性。结果见表 1。

表 1 CLYQ 对肝纤维化大鼠肝组织 Col I mRNA 相对表达量的影响

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	相对表达量
空白对照	-	0.48 ± 0.09
模型对照	-	2.40 ± 0.32
秋水仙碱	0.2	0.92 ± 0.14 <sup>2)</sup>
CLYQ	30	0.84 ± 0.10 <sup>2)</sup>
	15	1.61 ± 0.24 <sup>2)</sup>
	7.5	1.97 ± 0.17 <sup>2)</sup>

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)。

### 3.2 CLYQ 对肝纤维化大鼠肝脏 Col I 蛋白的影响

正常对照组 Col I 蛋白在正常大鼠肝脏呈低水平表达,表达部位局限于汇管区和肝窦的结缔组织、血

管壁及胆管壁,在肝实质内沿肝窦壁形成的丝状着色,肝细胞浆内没有表达。模型对照组 Col I 蛋白表达广泛,呈弥漫性,主要表达在中央静脉周围及纤维组织增生的汇管区纤维间隔、肝窦壁、血管内皮细胞和胆管上皮细胞,形成宽而粗大的纤维条索,肝细胞浆可见有表达,免疫组化染色呈强阳性。CLYQ 各剂量组 Col I 蛋白表达特点同模型组,但表达面积和强度显著减少和减弱( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),中央静脉周围及汇管区,着色减少且浅,呈细丝状,肝细胞浆内表达呈明显的剂量依赖性降低。结果见图 1 和表 2。

表 2 CLYQ 对肝纤维化大鼠肝组织 Col I 蛋白合成的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	阳性面积比 / %
空白对照	-	1.55 ± 0.46
模型对照	-	18.11 ± 1.54
秋水仙碱	0.2	8.37 ± 1.03 <sup>2)</sup>
CLYQ	30	5.46 ± 1.07 <sup>2)</sup>
	15	9.83 ± 1.36 <sup>2)</sup>
	7.5	16.24 ± 1.33 <sup>1)</sup>

## 4 讨论

肝纤维化是多种慢性肝病发展的共同病理基础,也是慢性肝炎、肝硬化等进一步发展、恶化的重要环节,是肝脏纤维组织的过度沉积,是细胞外基质的合成大于降解的结果,其中心环节是肝星状细胞的活化和向肌成纤维样细胞和成纤维细胞的转化,导致大量细胞外基质(ECM)的合成,另一方面 ECM

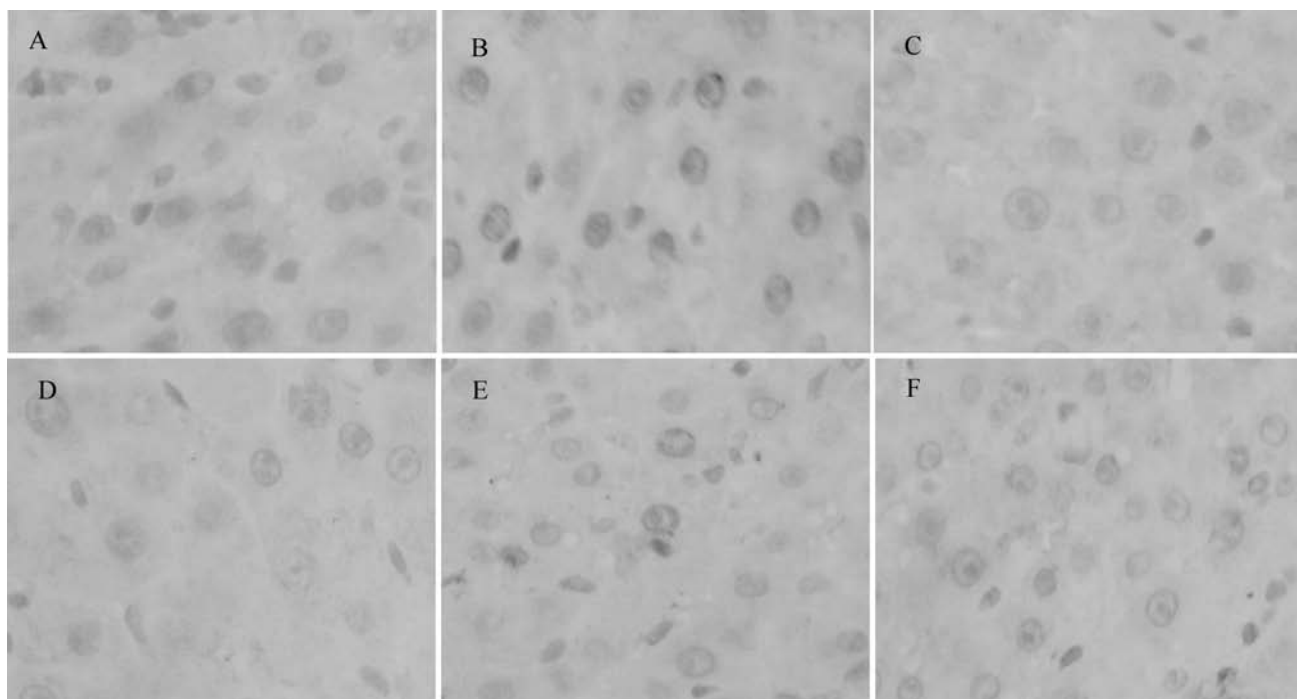


图 1 CLYQ 对肝纤维化大鼠肝组织 Col I 蛋白合成的影响(200 ×)

A. 空白对照组; B. 模型对照组; C. 秋水仙碱  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; D. CLYQ  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; E. CLYQ  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; F. CLYQ  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组

的降解减少导致其合成与降解的不平衡促进了肝纤维化形成。肝纤维化是肝硬化的早期阶段和必经阶段,若病因持续存在,肝纤维化逐渐加重,肝小叶及血管等逐渐被改建,肝脏的正常结构遭到破坏,中心静脉区和汇管区出现间隔、假小叶形成,即发展为不可逆转的肝硬化<sup>[5-7]</sup>。近年来大量试验及临床研究表明在此时如果病因消除并经适当治疗,纤维化可被逐渐吸收,肝纤维化是可以逆转的<sup>[8]</sup>。目前除病因治疗(通过作用于肝纤维化始动因子,间接发挥改善纤维化的功能)外,阻抑、逆转肝纤维化进程成为非常重要的治疗对策。

肝脏有多种胶原,其中以 Col I 为主,测定 Col I mRNA 的表达和蛋白合成可以从分子水平最先反映出肝脏胶原合成的变化,单一的反映药物对胶原合成的影响,而与胶原的降解无关。

本试验运用实时荧光定量 PCR 方法对肝组织 Col I mRNA 表达进行相对定量和免疫组织化学法检测肝组织 Col I 蛋白表达。试验结果表明,CLYQ 各浓度组均可显著下调肝组织 Col I mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ),且表现一定的剂量依赖性。CLYQ 作用后的大鼠肝纤维化组织 Col I 蛋白表达面积和强度显著减少和减弱 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),呈明显的剂量依赖性降低,表明肝组织中 I 型胶原含量明显减少。试验结果提示,CLYQ 通过下调肝组织 Col I mRNA 的表达和蛋白合成,抑制胶原的合成,减少

ECM 的沉积,从而逆转肝纤维化。

#### [参考文献]

- [1] 林兴,黄权芳,黄仁彬,等. 广西民间药六月青的性状与显微鉴定[J]. 中药材, 2005, 28(7): 541.
- [2] 张士军,林军,黄仁彬,等. 复方六月雪对鸭乙型肝炎病毒 DNA 的抑制作用[J]. 中药材, 2007, 30(2): 191.
- [3] 张士军,焦杨,黄仁彬,等. 复方六月雪对 HepG2. 2. 15 细胞 HBV DNA 的抑制作用[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 59.
- [4] 李江,黄忠仕,黄仁彬,等. 复方六月雪颗粒提取工艺研究[J]. 中国药房, 2005, 16(1): 16.
- [5] Hui A Y, Friedman S L. Molecular basis of hepatic fibrosis[J]. Expert Rev Mol Med, 2003, 5(5): 1.
- [6] Friedman S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury[J]. J Biol Chem, 2000, 275(4): 2247.
- [7] Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, et al. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery[J]. Keio J Med, 2001, 50(2): 58.
- [8] Murphy F, Arthur M, Iredale J. Developing strategies for liver fibrosis treatment[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2002, 11(11): 1575.

[责任编辑 聂淑琴]