

清纤方抗实验性大鼠肝纤维化的作用研究

张林军¹, 刘光辉¹, 黄东华¹, 常庚², 杨芸芳³, 张艳红¹, 荣晶¹, 刘静⁴, 张明辉⁴, 董尚普^{5*}

- (1. 河北体育学院, 河北 石家庄 050061; 2. 河北医科大学第二医院, 河北 石家庄 050000;
3. 乐仁堂医药集团股份有限公司, 河北 石家庄 050011; 4. 河北医科大学第一医院, 河北 石家庄 050031;
5. 河北医科大学中医学院, 河北 石家庄 050091)

[摘要] 目的: 探讨清纤方抗肝纤维化的治疗机制。方法: 利用 CCl₄ 制备肝纤维化 Wistar 大鼠模型, 分为正常组、模型组、清纤方组、秋水仙碱组。治疗 8 周后, 用 HE 和 Masson 染色观察肝纤维化的形成, 免疫组化检测 I、III 胶原, RT-PCR 检测肝组织中转化生长因子 β₁(TGF-β₁) mRNA 的表达。结果: I、III 胶原和 TGF-β₁ mRNA 的表达在治疗组均明显减少。结论: 清纤方能有效减轻肝纤维化大鼠的肝脏损伤及纤维化程度, 其机制可能与抑制肝内 TGF-β₁ 的表达有关。

[关键词] 肝纤维化; 复合物; 清纤方; I、III 型胶原; 转化生长因子 β₁

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)12-0075-04

Research on Qingxianfang's Function on Anti-hepatic Fibrosis in Rats

ZHANG Lin-jun¹, LIU Guang-hui¹, HUANG Dong-hua¹, CHANG Geng², YANG Yun-fang³,
ZHANG Yan-hong¹, RONG Jing¹, LIU Jing⁴, ZHANG Ming-hui⁴, DONG Shang-pu^{5*}

- (1. Hebei Institute of Physical Education, Shijiazhuang 050061, China; 2 The No. 2 Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 3. Yuerentang Medicine Group Limited Company, Shijiazhuang 050011, China;
4. The No. 1 Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China;
5. College of Traditional Chinese Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the therapeutic mechanism of Qingxianfang for anti-hepatic fibrosis. **Method:** Hepatic fibrosis of Wistar rat was established by injecting CCl₄ and divided them into groups marked "model", "Qingxianfang" and "colchicines". Another group of normal rat was used as "control". After eight weeks of treatment, an observation of hepatic fibrosis is carried on by using HE and Masson pigmentation, immunohistochemistry and detecting the expression of collagen type I, type III TGF-β₁ mRNA expression in hepatic tissue was determined by RT-PCR. **Result:** The collagen type I, type III and the expression of TGF-β₁ mRNA reduced significantly in treatment group. **Conclusion:** Qingxianfang is effective for easing the liver damage and hepatic fibrosis condition in rats. The mechanism may be relative to the restraining of TGF-β₁ expression in the liver.

[Key words] liver fibrosis; complex; Qingxianfang; collagen type I, type III TGF-β₁

肝纤维化是慢性肝炎的一种常见病理变化, 肝纤维化是现代医学病理形态学概念。胁痛、黄疸是

乙肝肝纤维化的症状和体征, 并未反应其本质特征, 依据病因病机及临床表现, 中医认为肝纤维化属“肝积”之症^[1]。本研究通过清纤方对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠的影响进一步探讨其抗肝纤维化的作用机制。

1 材料与方法

[收稿日期] 2009-05-12

[通讯作者] * 董尚普, Tel: (0311) 86265088

1.1 药品与试剂 清纤方药物组成: 叶下珠 30 g, 山豆根 10 g, 平地木 30 g, 丹参 15 g, 柴胡 8 g, 当归 10 g, 黄芪 15 g, 威灵仙 6 g, 甘草 6 g, 全方共 130 g, 水煎 2 次合并药液, 过滤浓缩, 给药时以蒸馏水稀释至 $2.16 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 生药, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。所用药材均购自乐仁堂药房, 秋水仙碱(昆明制药股份有限公司生产), CCl_4 (分析纯, 上海恒源精细化工有限公司)。I、II 型胶原抗体 SABC 免疫组化检测试剂盒及抗原修复工作液(购自中国武汉博士德生物工程有限公司), TrizolRNA 提取试剂盒(GIBCO 公司), RT-PCR 试剂盒(TAKARA 公司)。

1.2 动物模型制备^[2]与给药方法 健康大鼠 70 只雌雄各半, (体重 150~200g, 由河北医科大学实验动物中心提供), 随机抽取 15 只为正常组, 其余 55 只适应性喂养 1 周后, 制备肝纤维化大鼠模型。将 CCl_4 与花生油按 4:6 比例配成 40% 油剂。按 $0.3 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ 剂量皮下注射, 2 次/周, 自第 7 周开始每周随机处死 1 只大鼠进行肝组织病理学检查直到造模成功, 共持续 8 周。将以上模型大鼠随机分成模型组 19 只、清纤方组 17 只、秋水仙碱组 17 只。清纤方组灌服清纤方生药 $25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重, 为临床剂量的 10 倍; 秋水仙碱组灌服秋水仙碱 $0.14 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重, 为临床剂量的 10 倍; 正常、模型组灌服生理盐水 2 mL。1 次/d, 共 8 周。实验结束后颈动脉取血处死, 分离肝脏, 取部分肝左叶用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋切片, 常规 HE 染色和 Masson 染色, 光镜下观察病理改变, 另取少部分肝左叶 4% 多聚甲醛固定, 待免疫组化备用。取肝右叶分离成小组织块, 液氮冷冻备用。

在整个实验过程中, 模型组大鼠死亡 4 只, 清纤方组、秋水仙碱组各死亡 2 只, 死亡原因是灌胃后发生窒息。

1.3 检测指标

1.3.1 组织病理学 常规 HE 染色观察肝脏病理学改变, Masson 染色观察肝脏纤维化。肝纤维化病理学分级参照 2000 年西安全国肝病会议通过的标准^[3]: 0 级: 正常肝脏, 未见肝纤维化; 1 级: 包括汇管区、汇管区周围纤维化和局限窦周纤维化或小叶内纤维瘢痕, 二者均不影响小叶结构的完整性; 2 级: 可见纤维间隔即桥接纤维化, 虽有纤维间隔形成, 但小叶结构大部仍保留。3 级: 大量纤维间隔, 分隔并破坏肝小叶, 致小叶结构紊乱, 但尚无肝硬化; 4 级: 早期肝硬化, 肝实质广泛破坏, 弥漫性纤维

增生, 被分隔的肝细胞团呈不同程度的再生及假小叶形成。

1.3.2 血清学指标 用全自动生化仪测定 ALT, AST, 按试剂盒说明测定。

1.3.3 I、II 型胶原免疫组化 检测 I、II 型胶原, 方法参照文献^[4] 图像分析结果。

1.3.4 TGF- β_1 mRNA 的水平分析 TRIzol 提取大鼠肝组织 RNA, 方法按照试剂说明书操作, 用紫外分光光度计测定 RNA 浓度, RNA 浓度为 1.8。RT-PCR 分析 TGF- β_1 , 看家基因 GAPDH 作为内参照, TGF- β_1 上游引物序列: 5'-TGAGTGGCTGTCTTTTGACG-3', 下游引物序列: 5'-ACITCCAACCCAGGTCCITG-3', 扩增片段长度 374 bp。GAPDH 上游引物序列 5'-TCCCTCAACATTGTCTCAGCAA-3', 下游引物序列 5'-AGCTCCACAACGGATACATT-3', 扩增片段长度 329 bp。RT-PCR 反应按照 RT-PCR 反应盒。PCR 条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 40 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 共循环 35 次, 最后彻底延伸于 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 7 min, 4° 保存。取 10 μL PCR 产物, 1.5% 含 0.5 mg/LEB 琼脂糖电泳, 紫外灯下观察。凝胶图像分析系统检测 DNA 光带灰度。

1.4 统计方法 计数资料行卡方检验, 计量资料用单因素方差分析。均用 SPSS13.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 肝组织病理学观察 见表 1

表 1 各组大鼠肝脏组织病理学 Masson 染色纤维化分级 (n = 15)

组别	给药剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级
正常组	—	15	0	0	0	0
模型组	—	0	0	0	7	8
清纤方组	25	0	4 ¹⁾	4 ¹⁾	3 ¹⁾	4 ¹⁾
秋水仙碱组	1.4×10^{-4}	0	4 ¹⁾	5 ¹⁾	3 ¹⁾	3 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

模型组肉眼观察肝脏表面粗糙, 质地变硬; HE 染色见汇管区炎症细胞浸润明显与大量肝细胞坏死灶; 胶原染色可见明显的汇管区-中央静脉区宽大的纤维间隔, 可见假小叶。清纤方与秋水仙碱组肉眼观察肝脏表面比较光滑, 质地中等; HE 染色见肝细胞亦有不同程度变性、坏死; 胶原纤维间隔缩小, 着色变浅; 两组均能明显改善模型大鼠的肝纤维化程度, 二者相比无明显差异。

2.2 血清学检测 结果见表 2。

表 2 各组肝功能检测结果($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	给药剂量 (g·kg ⁻¹)	ALT ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	AST ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
正常组	—	72.2 ± 34.1 ²⁾	145.4 ± 47.9 ²⁾
模型组	—	113.2 ± 38.1	213.9 ± 50.4
清纤方组	25	73.1 ± 45.2 ¹⁾	178.8 ± 43.7 ¹⁾
秋水仙碱组	1.4 × 10 ⁻⁴	76.5 ± 41.8 ²⁾	174.7 ± 48.3 ¹⁾

正常、模型组 ALT, AST 比较有统计学意义($P < 0.01$); 清纤方、秋水仙碱组与模型组相比对 ALT, AST 改善明显($P < 0.05, P < 0.01$), 清纤方、秋水仙碱组相比无明显差异($P > 0.05$)。

2.3 肝组织中 I 型胶原、II 型胶原免疫组化结果见表 3。

表 3 各组对 I、II 型胶原和 TGF- β_1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	给药剂量 (g·kg ⁻¹)	I 型胶原	II 型胶原	TGF- β_1 mRNA
正常组	—	3.59 ± 1.31 ²⁾	4.00 ± 3.68 ²⁾	0.74 ± 0.35 ²⁾
模型组	—	10.86 ± 1.80	11.06 ± 5.89	2.01 ± 0.58
清纤方组	25	7.38 ± 1.08 ²⁾	7.56 ± 3.96 ¹⁾	1.46 ± 0.63 ¹⁾
秋水仙碱组	1.4 × 10 ⁻⁴	7.40 ± 2.98 ²⁾	7.33 ± 4.95 ²⁾	1.56 ± 0.75 ¹⁾

正常组大鼠肝组织中 I、II 型胶原的阳性密度值最低; 模型组 I、II 型胶原的阳性密度值最高, 正常、模型组相比有显著差异($P < 0.01$); 清纤方、秋水仙碱组的表达密度明显较低, 与模型组比较有显著差异($P < 0.05, P < 0.01$)。清纤方、秋水仙碱组相比无差别($P > 0.05$)。以上结果说明清纤方可显著抑制肝纤维化大鼠肝组织胶原纤维的产生。

2.4 肝组织中 TGF- β_1 mRNA 的表达变化结果见表 3

正常组大鼠肝组织中 TGF- β_1 mRNA 的表达值最低; 模型组的表达值最高, 正常、模型组相比有显著差异($P < 0.01$); 清纤方、秋水仙碱组的 TGF- β_1 mRNA 的表达值明显较低, 与模型组比较有显著差异($P < 0.05$)。清纤方、秋水仙碱组相比无差别($P > 0.05$)。说明清纤方可显著抑制 TGF- β_1 mRNA 的表达。

3 讨论

3.1 清纤方组方依据与方解 我们总结十几年治疗慢性乙肝的经验, 认为慢性乙肝肝纤维化是由于正气亏虚使残留的湿热疫毒与内生的湿、痰、瘀等病理产物胶结不解形成“复合物”, 其阻于肝络久积成形

聚于胁下而成肝积^[5]。根据以上假说我们制定了扶正祛邪的治则。方中山豆根、叶下珠、平地木清热解毒, 平肝化湿, 活血祛瘀共为君药, 《本草经疏》论山豆根曰“解毒清热之上药。……诸虫亦湿热所化, 故悉主之, 而多获奇效也”。柴胡、当归、丹参疏肝解郁, 养血活血为臣药。黄芪、甘草补益中土、扶正祛邪为佐药。灵仙蠲痰、化瘀、散结、通络, 引领诸药使复合物逐渐散结为使药, 《药品化义》谓其“宣通十二经络……以此疏通经络, 则血滞痰阻, 无不立豁”。诸药共凑清热利湿解毒、化痰祛瘀散结以清解复合物; 疏肝解郁、益气养血调理脏腑机能扶正驱邪, 并截断复合物生成机制, 而达到“正气存内, 邪不可干”的目的。二者相互作用使复合物如蚕抽丝一样逐渐瓦解, 使肝纤维化有逆转的趋势。经实验研究已初步证实本方对肝纤维化大鼠 I、II 型胶原 mRNA 和蛋白表达有较好的抑制作用^[6]。

3.2 肝纤维化与 I、II 型胶原 肝纤维化是许多慢性肝病共同的病理过程, 在各种致肝病因子的持续作用下, 细胞外基质 (ECM) 不能被有效降解吸收时, 肝内胶原纤维会进行性沉积, 逐渐形成肝纤维化。胶原是 ECM 的最重要成分, 其中 I、II 型胶原是构成纤维化组织的主要成分。I、II 型胶原被认为是反映胶原代谢的重要参数以及判定抗纤疗效的重要指标^[7]。秋水仙碱具有较好的抗肝纤维化效果^[8], 清纤方与秋水仙碱相比无明显差异, 证明其对大鼠肝纤维化有控制和改善之功。清纤方组较模型组胶原表达明显减少, 亦说明清纤方能够显著抑制 I、III 型胶原的生成, 而起到抗纤维化的作用。

3.3 肝纤维化与 TGF- β_1 肝纤维化的中心环节是肝星状细胞(HSC)在组织炎症坏死区域向肌成纤维细胞转型的激活过程, 其结果导致 ECM 合成与降解代谢失衡。而 ECM 的合成与降解在很大程度上由 TGF- β_1 调控^[9]。TGF- β_1 是肝纤维化、肝硬化发展中的主要细胞因子, 肝纤维化患者 TGF- β_1 升高水平与肝纤维化严重程度一致^[10]。TGF- β_1 主要通过以下三个方面促进肝纤维化的形成: (1)启动和维持 HSC 的活化, 促进 HSC 的增殖; (2)促进 HSC 等细胞合成 ECM; (3)抑制组织金属蛋白酶的产生, 促进组织金属蛋白酶抑制剂的产生, 以阻碍胶原的降解。所以 TGF- β_1 是一个重要的促纤维化介质, 因而抑制其活性是一个有效的治疗靶标。本研究结果显示, 清纤方和秋水仙碱组对 TGF- β_1 mRNA 的表达都低于模型

组,说明清纤方降低 I、III 胶原生成的途径可能是通过下调 TGF- β_1 mRNA 的表达而实现的。

[参考文献]

- [1] 白宇宁,刘绍能,姚乃礼. 中医药抗肝纤维化的研究概况[J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(8): 74-77.
- [2] M. C. A. Zim, T. R. Silveira, G. Schwartzmann, *et al.* Potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity by pentosan polysulfate in rats[J]. BrazJMed BiolRes, 2002, 35 (11): 1339.
- [3] 2000 年西安第六次全国传染病寄生虫病学术会议·病毒性肝炎防治方案[J]. 中华传染病杂志, 2001, 19(1): 56.
- [4] 朱 冰,刘殿武,房文亮,等. 抗纤 I 号对实验性肝纤维化大鼠组织 I、III 型胶原及转移生长因子 β_1 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(1): 21-23.

- [5] 张林军,刘 静,张明辉. 清纤方治疗慢性乙肝肝纤维化临床观察[J]. 辽宁中医杂志. 2008, 35(11): 1681-1682.
- [6] 张林军,刘 军,马洪坡. 清纤方对肝纤维化大鼠肝脏胶原表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15 (3): 194-196.
- [7] Arthur M J Collagen and liver fibrosis J Hepatol 1995, 22 (2supp): 43-48.
- [8] Lee L J, Kim Y G, Kang, K W, *et al.* Effects of colchicine on liver functions of cirrhotic rats beneficial effects result from stellate cell inactivation and inhibition of TGF beta1 expression. Chem Biol Interact, 2004, 147(1): 9-21.
- [9] GRESSNER A M, WEISKIRCHEN R, BEITKOPF K, *et al.* Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis[J]. Front Biosci, 2002, 7: 793.
- [10] 高玉洁,杨志才,王玉芳,等. 转化生长因子和肿瘤坏死因子在肝纤维化中的表达[J]. 肝脏, 2004, 9(2): 111.