

中药复方金三裁对肝纤维化大鼠的治疗作用及其机制研究

宋仕玲, 龚作炯*, 张全荣

(武汉大学人民医院 感染科, 湖北 武汉 430060)

摘要:目的 观察中药复方金三裁抗大鼠肝纤维化的疗效及其机制。方法 将 50 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组: A 组为正常组 ($n=8$), B 组为肝纤维化模型组 ($n=14$), C 组为金三裁治疗低剂量组 ($n=14$), D 组为金三裁治疗高剂量组 ($n=14$)。B、C、D 组大鼠 sc CCl_4 诱导大鼠肝纤维化模型, C、D 组大鼠于造模第 4 周开始 ig 金三裁, 剂量分别为 0.6、1.2 g/100 g, 每日 1 次; A、B 组 ig 生理盐水 1 ml/kg, 第 8 周处死全部大鼠。免疫组化技术检测转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), Smad3 及 Smad7 在肝内的表达及定位; 常规生化方法检测肝功能; 放射免疫方法检测透明质酸 (HA) 含量; Van Gieson 染色和 HE 染色观察肝组织病理形态学改变。结果 肝纤维化模型大鼠经金三裁治疗后肝组织内 TGF- β_1 及 Smad3 表达降低, 而 Smad7 的表达增加, 与模型组大鼠比较差异显著 ($P<0.05$), TGF- β_1 及 Smad3 的免疫阳性反应信号主要位于纤维间隔中的细胞浆, Smad7 则主要在肝细胞浆表达。与模型组比较, 金三裁治疗后大鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST), HA 含量显著减低 ($P<0.05$); 肝小叶结构趋于正常, 纤维间隔明显变薄 ($P<0.01$)。结论 中药复方金三裁能有效减轻肝纤维化大鼠的肝脏损伤及纤维化程度, 其机制与抑制肝内 TGF- β_1 及 Smad3 表达, 促进 Smad7 表达有关。

关键词: 中药复方金三裁; 肝纤维化; 转化生长因子- β_1 ; Smad3; Smad7

中图分类号: R286.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)03-0293-04

Therapeutic effect and mechanism of traditional Chinese compound decoction of *Radix Curcumae*, *Rhizoma Sparganii*, *Rhizoma Zedoariae* on fibrotic liver in rats

SONG Shi-ling, GONG Zuo-jiong, ZHANG Quan-tong

(Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: **Object** To investigate the therapeutic effects and mechanism of traditional Chinese compound decoction of *Radix Curcumae* (RC), *Rhizoma Sparganii* (RS), and *Rhizoma Zedoariae* (RZ) (DRRR) on liver fibrosis in rats induced by carbon tetrachloride (CCl_4). **Methods** Fifty Wistar rats were randomly divided into four groups: group A was healthy control ($n=8$), group B was model rats of liver fibrosis induced by CCl_4 ($n=14$), group C and D were treated with DRRR after the liver fibrosis in rats induced by CCl_4 four weeks later ($n=14$). B, C, and D groups were injected subcutaneously with CCl_4 ; C and D groups were administrated with DRRR 0.6 and 1.2 g/100 g, once per day. After administration of DRRR four weeks all rats were sacrificed, their blood and liver were harvested for further examination. The effect of DRRR was explored by the expressions and sites of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), Smad3 and Smad7 in liver tissues by immunohistochemical staining. The liver function, serum hyaluronic acid (HA), and liver histopathology were also examined by biochemistry, RIA, HE, and Van Gieson stainings respectively. **Results** To compare with model group, in rats that received DRRR, the expressions of TGF- β_1 and Smad3 were significantly decreased, while the expression of Smad7 was obviously increased in the livers ($P<0.05$), the levels of serum ALT and AST were markedly decreased, HA content ($P<0.05$) was considerably attenuated and liver fibrosis as assessed by histology ($P<0.01$). **Conclusion** The DRRR has protective effects on liver injury and can inhibit liver fibrosis in rats induced by CCl_4 . The mechanisms possibly contribute to its action of anti-inflammatory, which is relative to its effect of down-regulating TGF- β_1 and Smad3, up-regulating Smad7 and results in suppressing the activation of hepatic stellate cells.

Key words: the decoction of *Radix Curcumae*, *Rhizoma Sparganii*, and *Rhizoma Zedoariae* (DRRR); liver fibrosis; TGF- β_1 ; Smad3; Smad7

收稿日期: 2003-08-26

基金项目: 湖北省教育厅基金资助项目 (2003X113)

作者简介: 宋仕玲 (1970-), 女, 贵州省人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事肝纤维化发病机制及治疗研究。Tel: (027) 62552740

* 通讯作者 Tel: (027) 88041911-8535 E-mail: zjgong@163.com

肝纤维化的病理特征是肝脏细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成降解失衡而过度沉积, 肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 和细胞因子在肝纤维化形成进展中起着重要作用, 目前认为肝纤维化是可以逆转的。中药复方金三莪由郁金、三棱、莪术 3 味中药组成, 具有活血化瘀、软坚散结、行气通络作用。本实验研究该复方中药对 CCl_4 致实验性肝纤维化大鼠的转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)、Smad3 和 Smad7 肝内定位及表达的影响, 探讨该方治疗实验性肝纤维化大鼠的效果及作用机制。

1 材料

1.1 药物: 郁金 *Radix Curcumaes*、三棱 *Rhizoma Sparganii*、莪术 *Rhizoma Zedoariae* 购于武汉大学人民医院中药房, 经本院药学部鉴定, 郁金为姜科植物的干燥块根, 三棱为黑三棱科植物黑三棱的干燥块状根茎, 莪术为姜科植物蓬莪术的干燥块茎。由本院药学部中药制剂室制备为煎剂, 批号 20021016, 简单工艺为: 将中药郁金 20 g, 三棱 12 g, 莪术 12 g 用 500 mL 蒸馏水浸泡 60 min 后, 置不锈钢电热蒸气煎药锅 100 煎煮 30 min, 煎液滤过, 滤渣再次加 500 mL 蒸馏水煎煮 30 min, 煎液滤过, 合并滤液, 浓缩成含生药 0.3 g/mL 煎剂, 4 保存, 给药前复温至 25 ~ 35 。

1.2 试剂: CCl_4 (carbon tetrachloride) 分析纯, 购自武汉亚法生物技术有限公司, 以食用调和油配制成 40% 溶液; 抗 TGF- β 单克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司; 抗 Smad3、抗 Smad7 多克隆抗体为美国 Santa Cruza 产品; 即用型 S—P 试剂盒为福州迈新生物技术开发公司产品; 透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 试剂盒为上海海军医学研究所产品。

1.3 动物: 清洁级 Wistar 大鼠, 体重 (200 $\pm$ 20) g, 雌雄各半, 武汉大学人民医院实验动物中心提供。

2 方法

2.1 肝纤维化大鼠模型建立及给药方法: CCl_4 肝纤维化大鼠模型制备参照 Wang 等方法^[1] 略加改进。50 只大鼠随机分为 4 组, A 组为正常对照组 ($n=8$), B 组为肝纤维化模型组 ($n=14$), C 组为金三莪低剂量组 ($n=14$), D 组为金三莪高剂量组 ($n=14$)。B、C、D 组 sc 40% CCl_4 3 mL/kg, A 组 sc 生理盐水 3 mL/kg, 每周 2 次, 持续 8 周。C、D 组于造模第 4 周开始 ig 金三莪, 剂量分别为中药生药 0.6, 1.2 g/100 g, A、B 组于第 4 周 ig 生理盐水 1 mL/

kg, 每日 1 次, 共用 4 周。所有大鼠于第 8 周处死, 采集血清及肝脏标本待测。

2.2 指标检测

2.2.1 免疫组织化学: 采用 SP 法检测 TGF- β , Smad3 和 Smad7 在大鼠肝组织内的定位表达, 按照说明书操作。全自动图像分析系统上采用 HPIAS2000 型图像分析软件进行定量分析, 每张切片随机选取 10 个视野 ($\times 400$ 倍) 测定阳性物质所占面积及平均光度, 两者乘积越大表明组织中该抗原含量越高。

2.2.2 肝功能: 应用 RA1000 全自动生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLB) 含量, 计算 ALB/GLB (A/G) 比值。

2.2.3 血清 HA 含量测定: 放射免疫分析法检测血清 HA 含量, 按说明书操作。

2.2.4 病理形态学观察: HE 染色光镜下观察肝组织病理学改变。Van Gieson 胶原纤维染色, 在全自动图像分析系统上采用 HPIAS2000 型图像分析软件测定胶原总面积, 取平均值, 计算其占视野总面积的百分比。肝纤维化病理学分级参照《肝纤维化诊断及诊疗评估共识》^[2]。

2.3 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 统计软件 (11.0 版) 进行组间方差分析。

3 结果

3.1 大鼠存活状况: 实验结束前, A 组 8 只大鼠全部存活; B 组大鼠死亡 4 只, 存活 10 只; C、D 组大鼠各死亡 2 只, 各存活 12 只。

3.2 TGF- β , Smad3 和 Smad7 在肝组织中的表达与分布: A 组: Smad3 在正常肝细胞内几乎无表达, 汇管区基质及间质细胞胞浆内 Smad3 少量表达, TGF- β 在上述部位的表达较 Smad3 明显。Smad7 在肝细胞胞浆内明显表达, 汇管区及 Disse 间隙内未见明显表达; B 组: 肝内 TGF- β , Smad3 表达明显增强, TGF- β 表达极为明显, 阳性细胞数目明显增多, 主要见于小叶周围扩大的纤维组织内的成纤维细胞、窦周细胞、炎性细胞以及增生的胆小管周围梭状细胞内, 阳性物质主要集中在胞浆内, 胞膜上也有少量表达。肝组织内 Smad7 表达极少, 集中在少数肝细胞、纤维间隔细胞胞浆内, 阳性细胞着色浅淡; C、D 组: TGF- β , Smad3 在肝组织内的表达量减少, 阳性表达集中在汇管区、间质细胞和炎性细胞胞浆内, 阳性程度弱于 B 组。Smad7 在肝细胞胞浆内表达极为明显, 接近于正常肝组织, 汇管区及纤维组织

内表达不明显。C、D 组比较, 结果差异不显著 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 金三莪对大鼠肝组织 TGF- β_1 , Smad3 和 Smad7 表达量化结果的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of DRRR on results of quantitative analysis of TGF- β_1 , Smad3, and Smad7 expression in liver tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	TGF- β_1 含量	Smad3 含量	Smad7 含量
A	8	0.61 $\pm$ 0.33	0.25 $\pm$ 0.04	4.67 $\pm$ 1.14
B	10	1.57 $\pm$ 0.53*	0.79 $\pm$ 0.90*	0.47 $\pm$ 0.10*
C	12	0.69 $\pm$ 0.32#	0.22 $\pm$ 0.09#	1.76 $\pm$ 0.36#
D	12	0.87 $\pm$ 0.39#	0.29 $\pm$ 0.07#	0.74 $\pm$ 0.13#

与 A 组比较: * $P < 0.05$; 与 B 组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.01$ vs group A; # $P < 0.05$ vs group B

表 2 金三莪对大鼠肝功能及血清 HA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of DRRR on liver function and HA content in serum of rats ($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	ALT/(U · L ⁻¹)	AST/(U · L ⁻¹)	ALB/(g · L ⁻¹)	ALB/GLB	HA/(nmol · L ⁻¹)
A	8	50.17 $\pm$ 2.36	77.83 $\pm$ 13.36	35.40 $\pm$ 1.50	1.30 $\pm$ 0.09	116.04 $\pm$ 17.81
B	10	276.00 $\pm$ 23.07*	554.80 $\pm$ 68.32*	24.74 $\pm$ 1.64*	0.57 $\pm$ 0.48*	318.65 $\pm$ 20.83*
C	12	105.33 $\pm$ 8.27* #	331.50 $\pm$ 47.85* #	30.05 $\pm$ 0.58* #	0.89 $\pm$ 0.04* #	138.20 $\pm$ 11.39* #
D	12	109.50 $\pm$ 28.50* #	248.50 $\pm$ 9.42* #	32.70 $\pm$ 1.80* #	0.94 $\pm$ 0.07* #	129.50 $\pm$ 17.04#

与 A 组比较: * $P < 0.05$; 与 B 组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs group A; # $P < 0.05$ vs group B

润, 坏死区及汇管区纤维结缔组织增生形成宽窄不一的纤维, 呈星芒状向肝小叶内延伸, 部分形成假小叶; C、D 组肝细胞变性减轻, 纤维组织增生减少, 肝小叶结构较正常, 两组肝组织病理变化相似。Van Gieson 染色: A 组无明显胶原纤维, B 组大量胶原纤维宽窄不一, 星芒状伸入肝小叶, 部分形成假小叶; C、D 组汇管区有胶原纤维形成, 纤维窄而短, 无假小叶形成。肝纤维化积分: B、C、D 组与 A 组之间病理学分期差异非常显著 ($P < 0.01$), C、D 组与 B 组相比, 分期有明显改善, C、D 组间比较, 差异不显著。见表 3。

表 3 金三莪对大鼠肝组织炎症及纤维化积分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of DRRR on liver inflammatory and fibrosis scores of rats ($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	炎症积分	纤维化积分
A	8	0	0
B	10	5.28 $\pm$ 1.31	7.44 $\pm$ 1.59
C	12	3.18 $\pm$ 0.95* #	4.40 $\pm$ 1.27* #
D	12	3.32 $\pm$ 1.17* #	4.16 $\pm$ 0.96* #

与 B 组比较: ## $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs group B

3.5 胶原面积定量分析: B 组胶原面积显著高于 A、C、D 组 ($P < 0.01$), C、D 组与 A 组比较, 差异不显著, C、D 组间差异不显著, 见表 4。

4 讨论

3.3 肝功能及 HA 含量测定结果: B、C、D 组血清 ALT, AST 含量均显著低于 A 组 ($P < 0.05$), B 组最高, C、D 组血清 ALT, AST 含量低于 B 组 ($P < 0.05$)。B 组 A/G 比值显著低于 A 组 ($P < 0.05$), C 组 A/G 比值与 A 组相比, 差异不显著 ($P > 0.05$)。B 组血清 HA 含量显著高于 A 组 ($P < 0.05$), C、D 组 HA 含量有所降低, 与 B 组比较差异显著 ($P < 0.05$), C、D 组间差异不显著 ($P > 0.05$)。见表 2。

3.4 肝纤维化病理学观察: HE 染色: A 组肝脏肝小叶结构正常, 肝细胞索排列规则有序; B 组肝小叶结构紊乱, 可见嗜酸性小体, 间质中有炎性细胞浸

表 4 金三莪对大鼠胶原面积及所占百分比的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of DRRR on area and percentage of collagen in liver tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组 别	动物数	胶原总面积/ (μm^2)	面积百分比/ %
A	8	1.03 $\pm$ 0.20	0.01 $\pm$ 0.01
B	10	6.00 $\pm$ 2.84* #	0.30 $\pm$ 0.14* #
C	12	1.80 $\pm$ 0.52* #	0.09 $\pm$ 0.02* #
D	12	1.50 $\pm$ 0.38* #	0.07 $\pm$ 0.02* #

与 A 组比较: ** $P < 0.01$; 与 B 组比较: ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs group A; ## $P < 0.01$ vs group B

中医中药治疗肝纤维化具有特有的优越性, 肝纤维化属于中医“症瘕积聚”, 病机特点为肝血瘀阻, 兼有寒热虚实的表现, 治则为破血活瘀, 软坚散结为主, 辅以益气健脾, 行气通络, 清热凉血。郁金具有行气解郁, 凉血破瘀的作用; 三棱、莪术可破血行气, 消积止痛。三药合用具有活血化瘀、行气解郁、消积止痛之功效。本实验通过对实验动物血清学检测、肝纤维化病理学观察及肝内细胞因子定位表达变化的观察, 发现高、低剂量金三莪均可以保护肝脏细胞的正常结构, 改善肝纤维化大鼠病理状态; 促进白蛋白合成; 降低血清 ALT, AST, 促进慢性损伤肝细胞功能向正常转化; 降低肝内炎症程度; 减少 HA 分泌; 明显减少肝内胶原纤维合成, 不同剂量金三莪治疗大鼠肝纤维化疗效相似。说明金三莪具有抗肝纤维化的作用。其作用机制为抑制 TGF- β_1 , Smad3, 增加

Smad7 表达, 阻止 TGF- β 刺激所致的肝星状细胞 (HSC) 活化及胶原形成。

TGF- β 是组织修复和肝纤维化的重要细胞因子, 调控 HSC 的活化、增殖^[3]。TGF- β 表达增加, 介导 HSC 产生细胞外基质 (ECM), 抑制肝细胞 DNA 合成, 导致肝纤维化的产生。抑制型 Smad6, Smad7 是细胞中 T β R1 型受体丝氨酸/苏氨酸激酶的拮抗蛋白, 可阻止 Smad2, Smad3 磷酸化, 从而阻断 TGF- β 的信号转导过程, 在 TGF- β 信号转导中构成负反馈调节环路^[4]。在肝纤维化模型组大鼠肝内抑制性 Smad7 明显减少, 同时具有促纤维化作用的 Smad3 表达增加, 其增加与减少程度与肝内纤维化多少呈正相关。正常情况下, TGF- β 可快速诱导 Smad7 的表达^[5], 但在肝纤维化大鼠中, 由 HSC 转化的成纤维细胞失去 TGF- β 诱导下的 Smad7 表达上调敏感性, 而 Smad2, Smad3 表达增加, 促使肝纤维化进程。金三莪治疗后的肝纤维化大鼠 TGF- β 在肝内表达明显降低, 表达量接近正常组, 显示该药抗肝纤维化作用与抑制 TGF- β 过度表达及抑制 HSC 活化有关; 治疗后的大鼠肝内 Smad7 表达增加并接近正常组, 而 Smad3 表达减少, 进一步说明该方剂能抑制 Smad3 而明显促进 Smad7 的表达, 后者负反馈调节 TGF- β 的胞内信号传递, 阻止 HSC 的活化及信号放大, 发挥抗肝纤维化作用。C 组 A/G 比值升高并与 A 组比较差异无显著性, 证明该方剂具有促进白蛋白合成, 改善肝脏生理功能的作用。HA 由间质细胞合成, 绝大多数存在于组织间隙或结缔组织中, 与肝纤维化程度符合率最高^[6]。血中 HA 被肝窦内皮细胞 (SECs) 摄取^[7], 活化的 SECs 能分

泌 HA 的受体 CD44, 通过受体循环通路, 在溶酶体内降解成乙酸和乳酸。低水平的 CD44 mRNA 表达水平与血清持续性高水平的 HA 密切相关, 可提示 SECs 功能不足。HA 有协同胶原聚合、沉积, 激活 HSC 与肝细胞的作用。本实验中模型组大鼠血清 HA 增高, 而金三莪治疗后大鼠血清 HA 水平降低, 是否与该方剂促进 SECs 分泌 CD44, 增强对 HA 结合转化有关, 尚待进一步研究证实。

References:

- [1] Wang Y Q, Ikeda K, Ikebe T, *et al*. Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats [J]. *Hepatology*, 2000, 32(5): 980-989.
- [2] Hepatic Fibrosis Study Group of Chinese Liver Diseases Association. Consensus on evaluation of the diagnosis and efficacy of hepatic fibrosis [J]. *Chin J Hepatology* (中华肝脏病杂志), 2002, 10(5): 327-328.
- [3] Nieto N, Friedman S L, Cederbaum A I. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species [J]. *Hepatology*, 2002, 35(1): 62-73.
- [4] Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, *et al*. Differential regulation of TGF- β signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury [J]. *Hepatology*, 2002, 35(1): 49-61.
- [5] Dooley S, Delvoux B, Streckert M, *et al*. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during *in vitro* progression to myofibroblasts. TGF beta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells [J]. *FEBS Lett*, 2001, 502(1-2): 4-10.
- [6] Patel K, Lajoie A, Heaton S, *et al*. Clinical use of hyaluronic acid as a predictor of fibrosis change in hepatitis C [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(3): 253-257.
- [7] Saegusa S, Isaji S, Kawarada Y. Changes in serum hyaluronic acid levels and expression of CD44 and CD44 mRNA in hepatic sinusoidal endothelial cells after major hepatectomy in cirrhotic rats [J]. *World J Surg*, 2002, 26(6): 694-699.

川芎嗪和丹参对小鼠 Lewis 肺癌生长的抑制作用与抑制血管生成的关系

陈 刚¹, 徐晓玉¹, 严鹏科², 廖端芳^{2*}

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400050; 2. 南华大学 药理教研室, 湖南 衡阳 410016)

摘要: 目的 观察川芎嗪注射液 (TMP)、丹参注射液对小鼠 Lewis 肺癌生长和转移及肿瘤血管生成的影响。方法 用 C₅₇BL 小鼠 Lewis 肺癌模型, 分别 ip TMP 50, 100, 200 mg/(kg·d), 丹参注射液 5, 10, 20 g/(kg·d), 共 21 d, 检测小鼠 Lewis 肺癌移植瘤体积、质量、肺转移灶数、肿瘤微血管密度 (MVD) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达。结果 与模型组相比, TMP 组小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的体积、质量、肺转移灶数、肿瘤 MVD 和 VEGF 的表达均显著降低; 丹参组与模型组比较差异无显著性。结论 TMP 可抑制小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的生长和转移, 其作用机制与抑制 VEGF 的表达、抑制血管生成有关。丹参对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的生长和转移无明显影响。

* 收稿日期: 2003-07-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (300070915)

作者简介: 陈 刚 (1974—), 男, 湖南省长沙市人, 重庆医科大学在读博士, 主要从事中药药理研究。Tel: (023) 68733591