

蒿鳖养阴软坚方抗 CCl₄ 复合因素所致大鼠肝纤维化的作用

杨凤蕊, 娄建石*, 方步武*

天津医科大学 药理学教研室, 天津 300070

摘要: **目的** 观察蒿鳖养阴软坚方抗 CCl₄ 复合因素致大鼠肝纤维化的作用。**方法** Wistar 大鼠随机分为对照组, 模型组, 蒿鳖养阴软坚方低、中、高剂量组, 复方鳖甲软肝片及秋水仙碱阳性对照组。CCl₄ 复合因素法建立肝纤维化模型, 比色法测定血清丙二醛 (MDA)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB) 的量及肝组织羟脯氨酸 (Hyp) 水平, 明胶酶谱法检测肝组织基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 及基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的活性, 免疫组化法检测肝组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达。**结果** 与模型组相比, 随着剂量的增加, 蒿鳖养阴软坚方组大鼠血清 MDA 水平逐渐下降, 血清 TP、ALB 的量逐渐增加, 肝组织 Hyp 的量和 MMP-2 活性逐渐下降, MMP-9 活性变化不明显, 肝组织 α -SMA 的表达下降。**结论** 蒿鳖养阴软坚方能够对抗 CCl₄ 复合因素诱发的大鼠肝纤维化。

关键词: 蒿鳖养阴软坚方 (HYRD); CCl₄; 肝纤维化; 羟脯氨酸 (Hyp); 基质金属蛋白酶 (MMP)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0530-05

Effect of Haobie Yangyin Ruanjian Decoction on rats with hepatic fibrosis induced by CCl₄ composited factor

YANG Feng-rui, LOU Jian-shi, FANG Bu-wu

Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of Haobie Yangyin Ruanjian Decoction (HYRD) on rats with hepatic fibrosis induced by CCl₄ composited factor. **Methods** Wistar rats were randomly divided into seven groups: control group, model group, HYRD groups of low, medium, and high doses, positive groups of Fufang Biejia Rungan Tablets, and colchicin. Model of hepatic fibrosis was induced by CCl₄ composited factor. Malondialdehyde (MDA), total protein (TP), albumin (ALB) in serum and hydroxyproline (Hyp) in liver were detected by chromatometry; MMP-2 and MMP-9 activities in liver were detected by gelatin zymography; α -SMA expression in liver was evaluated by immunohistochemical method. **Results** MDA in serum and Hyp in liver were decreased gradually in HYRD groups compared with those of model group; TP and ALB in serum were increased gradually in HYRD groups compared with those of model group; MMP-2 activity in liver was decreased in HYRD groups compared with those of model group; MMP9 activity had no significant change in each group and α -SMA expression was decreased gradually in HYRD groups compared with those of model group. **Conclusion** HYRD can antagonize the hepatic fibrosis induced by CCl₄ composited factor.

Key words: Haobie Yangyin Ruanjian Decoction (HYRD); CCl₄; hepatic fibrosis; hydroxyproline (Hyp); matrix metalloproteinase (MMP)

各种病因引起的慢性肝病, 都可能发生肝细胞坏死、炎症并继发肝纤维化。肝细胞坏死和炎症等均可导致肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 活化, 活化的 HSC 表达 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 而为肌成纤维细胞并产生大量的细胞外基质^[1], 同时基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 产生增多, 降解肝血窦基底膜的正常成分之一即 IV 型胶原, 促进肝

纤维化的发生发展。蒿鳖养阴软坚方主要由中药青蒿、鳖甲、丹参、虎杖、郁金等组成, 该方剂体现了活血化瘀、清热利湿、软坚散结的组方原则。本课题组经过几年的研究证实该方能够减轻由免疫反应、寄生虫、酒精等所诱发的肝纤维化^[2], 本实验旨在观察该方对化学损伤所致肝纤维化的预防治疗作用。

收稿日期: 2010-05-19

基金项目: 天津市科委应用基础研究计划重点项目 (06YFJZJC 02900)

作者简介: 杨凤蕊 (1972—), 女, 河北省人, 讲师, 博士, 从事中药药理及中西医结合基础与临床应用的研究。E-mail: yangfengrui_tj@126.com

*通讯作者 娄建石

方步武 Tel: (022)23542523

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康 Wistar 大鼠,雌雄各半,体质量(237.8 ± 8.5) g,中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK-(军)2007-004。

1.2 药物

葛鳖养阴软坚方,按所确立的生产工艺在天津市兴达中药材加工厂提取,含丹酚酸 B(5.91 ± 0.17) mg/g、大黄素(4.09 ± 0.13) mg/g 和虎杖苷(3.69 ± 0.03) mg/g。复方鳖甲软肝片(批号 20080111),内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司;秋水仙碱为 Sigma 公司产品,购自天津市联星生物技术有限公司。

1.3 试剂

CCl_4 ,天津市化学试剂一厂;丙二醛(MDA)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;对二甲氨基苯甲醛,天津化学试剂研究所;氯胺 T,天津市化学试剂一厂;明胶蛋白, Sigma 公司;Triton-100, Amresco 公司;考马斯亮蓝 G-250,华美生物工程公司;牛胰蛋白酶(1:250),天津联星生物技术有限公司;小鼠抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体、SABC 免疫组化即用型试剂盒、DAB 显色试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 仪器

VIS—7220 紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;Mini—Protean Tetra Cell 垂直电泳槽, Bio-Rad 公司;WD—9405A 型脱色摇床,北京市六一仪器厂;Universal Hood II 凝胶图像光密度分析系统, Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 模型制备

大鼠四肢 sc CCl_4 花生油溶液(CCl_4 -花生油 4:6),单次 0.5 mL/100 g,以后每隔 3 d 四肢 sc CCl_4 花生油溶液,0.3 mL/100 g,共注射 16 次。前 2 周给予由 80%玉米面、20%猪油、0.5%胆固醇混合制备而成的饲料喂养,2 周后以单纯玉米面及 0.5%胆固醇混合制备而成的饲料喂养。自造模日开始及隔日 ig 30%酒精,每只 1 mL,其余时间饮用洁净自来水。除对照组外,所有大鼠均按此方法造模。对照组大鼠只注射等量花生油,且给予正常饲料。

2.2 实验分组和给药

将所有大鼠随机分为 7 组:对照组($n=6$),

模型组($n=14$),葛鳖养阴软坚方高、中、低剂量(8.2、2.5、0.82 g/kg)组($n=12$),阳性对照复方鳖甲软肝片(0.55 g/kg)组($n=12$),阳性对照秋水仙碱(0.1 g/kg)组($n=12$)。各给药组均于造模当日起每天 ig 相应药物,对照组和模型组给予洁净自来水(1 mL/100 g),共 8 周。末次给药 24 h 后,用乙醚麻醉大鼠,仰卧位剖腹,迅速从下腔静脉取血,3 000 r/min 离心 20 min,分离血清, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,待测。称取 3~4 g 肝组织放于氯仿-甲醇(2:1)的脱水液中,每天换液一次,共 3 d,使肝组织脱水脱脂。另外迅速切取少量肝组织置于 Appendorf 管中,迅速置于液氮灌中,待测。

2.3 比色法测定血清中 MDA、TP 及 ALB 水平

参照试剂盒说明书测定血清中 MDA、TP 及 ALB 水平。

2.4 比色法测定肝组织中羟脯氨酸(Hyp)水平

肝组织脱水脱脂,胶原组织用酸在高温下水解,使结合状态的 Hyp 游离,用氯胺 T 将其氧化,形成含吡咯环的氧化物,再用过氯酸终止氧化,然后氧化物与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色化合物,在 558 nm 处测定吸光度,以测定样品中 Hyp 的量。

2.5 明胶酶谱法测定肝组织中基质金属蛋白酶-2(MMP2)及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的活性

取冰冻肝组织 100 mg,提取蛋白,考马斯亮蓝法蛋白定量,取蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, Triton-100 洗脱 60 min,将凝胶置于反应缓冲液(孵育液)中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温箱中孵育 24 h,将凝胶浸泡在至少 5 倍体积的考马斯亮蓝 G-250 染色液中,室温染色 2 h,将凝胶浸泡于脱色液中,在室温下脱色 60 min,结束后显示在蓝色背景下的透亮条带,对凝胶进行拍照记录或成像仪处理和半定量分析,经图像分析系统读取条带面积和灰度,计算酶解量。

条带酶解量=条带面积 $\times$ (条带灰度-背景灰度)

2.6 免疫组化法检测肝组织 α -SMA 的表达

石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶,滴加 0.1%胰蛋白酶, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化 20 min,5% BSA 封闭,滴加抗 α -SMA 的小鼠单克隆抗体(1:100 稀释), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG(即用型), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,滴加 SABC(即用型), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明、封片。

2.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间比较采用单因素

方差分析 (One-Way ANOVA)。单因素方差分析在总体上存在显著性差异, 方差齐时, 多组间比较使用 LSD 法; 方差不齐时, 采用 Tamhane's T2 法。所有统计分析均使用 SPSS12.0 软件分析。

3 结果

3.1 大鼠一般情况的比较

对照组大鼠饮食正常, 生长正常, 体质量自然增加, 被毛光滑、润泽、致密。模型组大鼠精神萎靡, 喜睡少动, 被毛枯萎晦暗, 食欲下降, 体质量

下降。蒿鳖养阴软坚方组大鼠一般情况好于模型组。

3.2 对肝纤维化大鼠血清 MDA、TP、ALB 及肝组织 Hyp 水平的影响

与对照组相比, 模型组血清 MDA 及肝组织 Hyp 水平明显增加 ($P<0.01$), 血清 TP、ALB 水平明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。与模型组相比, 蒿鳖养阴软坚方组血清 MDA 及肝组织 Hyp 水平逐渐下降, 血清 TP、ALB 水平逐渐增加, 均呈现一定的剂量依赖性, 见表 1。

表 1 蒿鳖养阴软坚方对肝纤维化大鼠血清 MDA、TP、ALB 及肝组织 Hyp 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of HYRD on levels of MDA, TP, and ALB in serum and Hyp in liver of hepatic fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物/只	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	Hyp/(mg·g ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)
对照	—	6	7.0±1.0	0.18±0.13	76.9±13.1	36.3±5.2
模型	—	14	10.4±1.5**	2.39±0.28**	45.8±14.8*	24.3±5.3**
蒿鳖养阴软坚方	0.82	12	9.1±1.7*	1.89±0.99**	53.2±23.5	28.0±7.4*
	2.5	12	8.6±1.6 [#]	1.29±0.56*** [#]	58.8±24.9	30.6±7.5 [#]
	8.2	12	7.9±2.0 [#]	1.22±0.45*** [#]	67.1±20.2 [#]	33.0±5.6 [#]
复方鳖甲软肝片	0.55	12	9.1±1.2*	1.77±0.72*** [#]	60.4±20.2	32.7±7.4 [#]
秋水仙碱	0.1	12	9.1±1.7*	2.19±0.66**	42.7±26.9*	31.9±8.3 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

3.3 对肝纤维化大鼠肝组织 MMP-2 及 MMP-9 活性的影响

与对照组相比, 模型组肝组织中的 MMP-2 的活性明显升高。蒿鳖养阴软坚方组肝组织中的 MMP-2 活性逐渐降低, 呈现一定的剂量依赖性, 见表 2。对照组 MMP-9 活性较低, 模型组与对照组相比变化不明显, 蒿鳖养阴软坚方组、复方鳖甲软肝片组及秋水仙碱组与模型组相比变化不明显, 但趋势与 MMP-2 相同, 见图 1。

3.4 对大鼠肝组织 α -SMA 表达的影响

对照组阳性染色仅见于血管壁。模型组棕黄色阳性染色广泛见于血管壁、纤维间隔及间质细胞。各治疗组血管壁均见阳性染色, 但蒿鳖养阴软坚方高剂量组纤维隔少而薄、阳性染色淡, 中剂量组阳性染色可见于间质细胞, 纤维隔中阳性染色较淡; 其余各治疗组阳性染色可见于间质细胞和纤维间隔, 但较模型对照组有所减轻。结果见图 2。

4 讨论

CCl₄ 为无色液体, 易挥发, 经不同途径对人和多种动物均可致肝损害。CCl₄ 可以引起氧化应激反应^[3-4], 氧化应激在 CCl₄ 引发肝损伤的早期发挥着

表 2 蒿鳖养阴软坚方对肝纤维化大鼠肝组织 MMP-2 及 MMP-9 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of HYRD on levels of MMP-2 and MMP-9 in liver of hepatic fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	MMP-2($\times 10^8$)
对照	—	6	0.46±0.46
模型	—	6	1.20±0.57**
蒿鳖养阴软坚方	0.82	8	0.93±0.47
	2.5	8	0.65±0.48 [#]
	8.2	8	0.44±0.21 ^{##}
复方鳖甲软肝片	0.55	8	0.46±0.32 ^{##}
秋水仙碱	0.1	8	0.86±0.58

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

重要作用。脂质过氧化链式反应造成的肝细胞损伤可以导致狄氏间隙内原本静止的贮脂细胞活化, 激活后的 HSC 表达 α -SMA, 活化的 HSC 可以释放 IV 型胶原, IV 型胶原是维持 HSC 于生理性静息状态的必要物质。MMP-2 是主要的 IV 型胶原降解酶, 故 MMP-2 通过降解 IV 型胶原而激活 HSC, 并促其增殖, 活化的 HSC 可以产生大量 ECM。同时该细

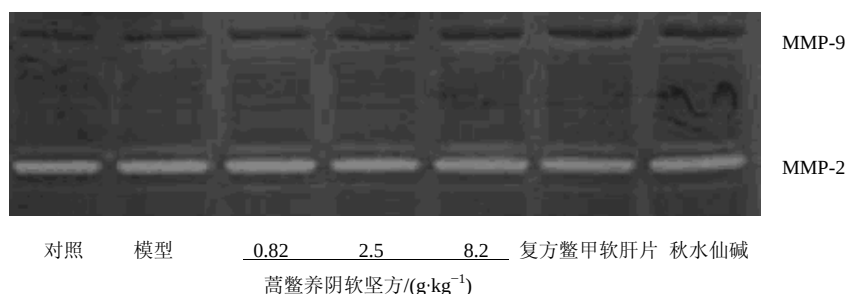


图 1 蒿鳖养阴软坚方对肝纤维化大鼠肝组织 MMP-2 及 MMP-9 表达的影响 (明胶酶谱法)
Fig. 1 Effects of HYRD on MMP-2 and MMP-9 expression in liver of hepatic fibrosis rats (gelatin zymography)

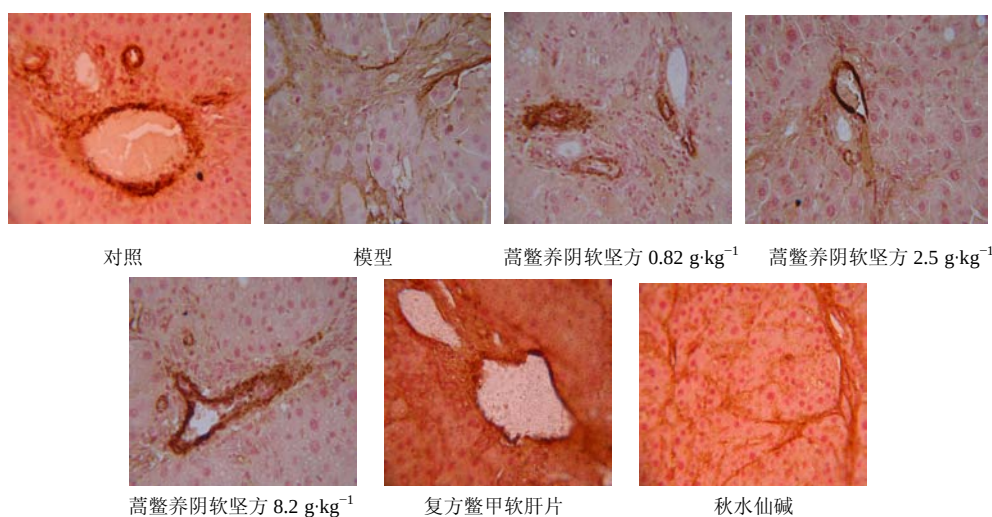


图 2 蒿鳖养阴软坚方对肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA 表达的影响
Fig. 2 Effect of HYRD on α -SMA expression in liver of hepatic fibrosis rats

胞由合成分泌 III 型胶原改为可合成分泌 I 型胶原, 并分布于肝血窦基底膜, 促使肝纤维化。胶原纤维是 ECM 的主要成分之一, 胶原纤维主要由胶原蛋白构成, Hyp 是胶原蛋白特有的氨基酸, 胶原蛋白代谢异常时, 会反映在 Hyp 的变化上。

MMP-9 以酶原的形式从胞内分泌到胞外, 经一系列酶解过程而激活。MMP-9 可降解细胞外基质。在正常肝脏中, MMPs、基质金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMPs) 有一定程度的表达, 用单次给予 CCl_4 制造的急性肝损伤模型, 早期即有 MMPs 的诱导, 而 TIMPs 在早期保持不变, 在组织炎症期被强烈诱导, 并持续至恢复期。 CCl_4 导致的慢性肝损伤主要有 MMP-2、TIMPs 升高, 而其他的 MMPs 基本不变或消失^[5]。

当肝细胞受到慢性损害时, 其合成蛋白能力降低, 血浆中的蛋白质即会发生质和量的变化。肝纤维化时肝细胞损伤引起 ALB 减少, ALB 与球蛋白比值 (A/G) 降低。ALB 与 A/G 值与肝脏炎症分级和

纤维化分期呈负相关。

蒿鳖养阴软坚方能够不同程度地降低血清 MDA 水平, 抑制过氧化反应的发生, 保护肝细胞的完整性, 改善肝功能, 从而使蛋白的生成恢复正常。另外本实验结果还表明该药物能够通过降低 MMP-2 的活性, 抑制对 IV 型胶原的降解作用, 抑制 HSC 的激活, 减少肝组织中 α -SMA 的表达, 减少 ECM 的生成, 降低肝纤维化的发生程度。同时本实验研究发现, MMP-9 的活性无明显变化, 与文献报道一致^[5]。

蒿鳖养阴软坚方是由青蒿、鳖甲、丹参、虎杖等组成的抗肝纤维化中药复方, 其在注重活血化瘀的同时, 根据辨证论治, 兼顾扶正、补虚、软坚、利湿等, 以提高疗效。本课题组实验结果表明蒿鳖养阴软坚方具有保护肝细胞、改善肝功能、抗肝纤维化的多重作用^[2,6-7], 这也在一定程度上说明蒿鳖养阴软坚方防治肝纤维化的组方符合中医的基础理论, 为其在临床上的应用提供理论支持。

参考文献

- [1] Li D, Friedman S L. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cell: new insights and prospects for therapy [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 1999, 14(7): 618-633.
- [2] 邢伟, 方步武. 葛鳖养阴软坚方对 BSA 免疫性大鼠肝纤维化的治疗作用 [J]. *中草药*, 2010, 41(10): 1667-1672.
- [3] Bedossa P, Houghlum K, Trauwein C, et al. Stimulation of collagen Palha l (I) gene expression is associated with lipidpoerxldation in hepatocellular injury: a link to tissue fiborsis? [J]. *Hepatology*, 1994, 19(5): 1262-1271.
- [4] 汪涛, 姜华, 陆国才, 等. 四氯化碳肝脏毒性机制的研究进展 [J]. *毒理学杂志*, 2007, 21(4): 383.
- [5] 帅峰, 田字彬. 基质金属蛋白酶及其组织抑制因子在肝脏疾病中的表达 [J]. *山东医药*, 2004, 44(10): 60-62.
- [6] 张竹, 刘洁莹, 方步武, 等. 葛鳖养阴软坚方对小鼠血吸虫病肝纤维化的疗效 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2010, 18(2): 113-118.
- [7] 赵敏, 郭娟, 方步武, 等. 葛鳖养阴软坚方对大鼠酒精性肝损伤的预防作用 [J]. *时珍国医国药杂志*, 2010, 21(11): 2887-2889.

关于推荐 2011 年中国药学会科学技术奖的通知

中国药学会科学技术奖是 2005 年 7 月经国家科学技术部批准设立的我国药学领域的科学技术奖, 每年评选一次, 2006 年至 2010 年已经五次颁奖。2011 年项目奖励最高限额分为: 一等奖 2 名、二等奖 5 名、三等奖 8 名, 项目奖励金额 (含税) 分别为 50 000 元、30 000 元、10 000 元人民币。中国药学会将从获得奖励项目中推荐国家科技奖励项目。

申报截止时间: 2011 年 4 月 30 日, 以邮戳为准。

申报地点和联系人

地 址: 北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1802 室

联系人: 孙文虹 (010-58699280-819)、范玫杉 (010-58699280-820)

邮 编: 100022

传 真: 010-58694812

E-mail: sunwenhong2002@163.com; yxhfms@163.com

推荐要求、推荐申报渠道、推荐材料要求及附件等相关事宜均请在中国药学会网站 (<http://www.cpa.org.cn>) 查询下载。

中国药学会