

## 鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠 TGF- $\beta_1$ /smad 信号通路的影响

孙玉凤<sup>1,2</sup>, 李媛<sup>2\*</sup>, 李风华<sup>2</sup>, 张艺凡<sup>2</sup>, 张玉<sup>2</sup>, 任荣<sup>2</sup>

1. 河北医科大学第二医院 消化内科, 河北 石家庄 050000

2. 河北医科大学, 河北 石家庄 050011

**摘要:**目的 探讨鳖甲煎丸抗肝纤维化的作用机制。方法 SD大鼠随机分成6组:对照组,模型组,秋水仙碱(0.1 mg/kg)阳性对照组,鳖甲煎丸低、中、高剂量(0.55、1.1、2.2 g/kg)组。除对照组外,其他各组大鼠sc 40% CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液,每周2次,连续给予6周,建立大鼠肝纤维化模型。在造模同时,各给药组每天给予相应药物10 mL/(kg·d)1次,连续给药11周。于11周末处死大鼠,免疫组化法检测肝组织中 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达,反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测大鼠肝组织中转化生长因子(TGF- $\beta_1$ )及smad 3基因的表达。结果 与对照组比较,模型组大鼠肝组织 $\alpha$ -SMA蛋白及TGF- $\beta_1$ 、smad 3基因的表达显著上调( $P < 0.05$ )。与模型组比较,鳖甲煎丸和秋水仙碱可显著降低大鼠肝组织 $\alpha$ -SMA蛋白及TGF- $\beta_1$ 、smad 3基因的表达,其中以鳖甲煎丸2.2 g/kg的效果更显著。结论 鳖甲煎丸抗肝纤维化作用机制可能与其下调TGF- $\beta_1$ /smad 3信号通路、抑制肝星状细胞活化和增殖有关。

**关键词:** 鳖甲煎丸; 肝纤维化; 转化生长因子- $\beta_1$ ; smad 3;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; 肝星状细胞

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)23-3364-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.019

## Effect of Biejiajian Pill on TGF- $\beta_1$ /smad signal pathway in rats with liver fibrosis

SUN Yu-feng<sup>1,2</sup>, LI Yuan<sup>2</sup>, LI Feng-hua<sup>2</sup>, ZHANG Yi-fan<sup>2</sup>, ZHANG Yu<sup>2</sup>, REN Rong<sup>2</sup>

1. Department of Gastroenterology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

2. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

**Abstract: Objective** To observe the anti-fibrotic mechanism of Biejiajian Pill. **Methods** SD rats were randomly divided into six groups: control, model, colchicina (0.1 mg/kg, positive), Biejiajian Pill (0.55, 1.1, and 2.2 g/kg) groups. Except for the control group, the rats in the other groups were sc injected with 40% CCl<sub>4</sub> olive oil solution twice a week for consecutive six weeks to establish the models of liver fibrosis. At the same time, drugs were ig administrated at a volume of 10 mL/kg in each group, once daily for consecutive 11 weeks. At the end of the week 11, all rats were sacrificed. The immunohistochemical technique was applied to analyzing the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in liver tissue, RT-PCR was applied to analyzing the expression of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) protein and smad 3 gene in liver tissue. **Results** Compared with the control group, the expression levels of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta_1$ , and smad 3 gene increased significantly ( $P < 0.05$ ) in the model group. Compared with the model group, Biejiajian Pill and colchicina decreased the expression of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta_1$  and smad 3 gene, the efficacy of high-dose Biejiajian Pill group was more significantly. **Conclusion** The antifibrotic mechanism of Biejiajian Pill may be through lowering the TGF- $\beta_1$ /smad 3 signaling pathways and inhibiting hepatic stellate cells activation and proliferation.

**Key words:** Biejiajian Pill; liver fibrosis; transforming growth factor- $\beta_1$ ; smad3;  $\alpha$ -smooth muscle actin; hepatic stellate cells

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段,目前临床上缺乏抗纤维化的有效药物,鳖甲煎丸主要由鳖甲、黄芩、柴胡等组成,具有活血化瘀、软坚散结、补益虚损、清热祛痰、除湿等功效,用

于治疗肝硬化、慢性肝炎疗效显著<sup>[1-2]</sup>。本实验鳖甲煎丸作用于CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化模型大鼠,观察其对TGF- $\beta_1$ /smad信号通路的影响,探讨其抗纤维化作用的机制。

收稿日期: 2013-05-11

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(C2009001143)

作者简介: 孙玉凤(1964—),女,河北南皮人,主任医师,博士,主要从事消化系统疾病的中西医结合临床及基础研究。

Tel: (0311)66002301 E-mail: sunyf789@yahoo.com

\*通信作者 李媛 E-mail: luny2008@163.com

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

鳖甲煎丸, 50 g/瓶, 批号 101201, 武汉中联药业集团股份有限公司; 秋水仙碱片, 0.5 mg/片, 批号 101015, 西双版纳药业有限责任公司; 兔抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 多克隆抗体, 北京博奥森公司; 免疫组化染色试剂盒, 北京中杉金桥公司; PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司鉴定并合成; 反转录及 PT-PCR 扩增试剂盒, TaKaRa 宝生物公司。

### 1.2 动物

清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 (370±40) g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 合格证号为 1104167。

## 2 方法

### 2.1 模型制备

大鼠随机分为对照组 (8 只), 模型组 (9 只), 秋水仙碱 (0.1 mg/kg) 阳性对照组 (9 只), 鳖甲煎丸 (0.55、1.1、2.2 mg/kg) 组 (各 9 只)。除对照组外, 其他各组大鼠背部 sc 40%  $\text{CCl}_4$  橄榄油溶液, 首次 5 mL/kg, 以后每次 3 mL/kg, 每周 2 次, 连续 6 周。

### 2.2 给药及样本采集

秋水仙碱和鳖甲煎丸用蒸馏水配制成混悬液。各给药组大鼠均于造模当日起每天 ig 相应药物 1 次, 给药体积 10 mL/kg, 连续给药 11 周; 对照组和模型组大鼠 ig 同体积蒸馏水。

### 2.3 样本采集

给药第 11 周末, 大鼠禁食 12 h, 4%水合氯醛腹腔麻醉, 取大鼠肝脏, 留取肝左叶, 置于 4%多聚甲醛溶液中固定, 用于免疫组化分析。将肝右叶迅速置于液氮中, 速冻后取出, 冻存于 -80 °C 冰箱内保存, 用于制备组织匀浆、提取 RNA 标本等。

### 2.4 检测指标

**2.4.1 大鼠一般状况观察** 实验期间观察大鼠精神状态、体质量、饮食和饮水量、毛色、活动灵敏度等状况。

**2.4.2 免疫组化法检测肝组织中  $\alpha$ -SMA 表达** 取“2.3”项下肝组织, 石蜡切片, 常规脱蜡至水, 用柠檬酸盐缓冲液对组织抗原进行相应的修复, 滴加 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 室温孵育 10 min 以灭活内源性过氧化物酶。孵育后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗浸泡 3 次, 每次 3 min; 滴加正常山羊血清封闭液, 室温孵育 15 min, 倾去多余液体, 不洗; 滴加以适当比例稀释的一抗, 37 °C 孵育 2~3 h 或于 4 °C 冰箱过夜,

PBS 冲洗浸泡 3 次, 每次 3 min; 滴加生物素化山羊抗大鼠免疫球蛋白 G (IgG), 室温 20 min, PBS 冲洗浸泡 3 次, 每次 3 min; 滴加辣根酶标记链霉卵白素, PBS 冲洗浸泡 3 次, 每次 3 min; DAB 显色, 自来水充分冲洗, 根据需要可进行复染、脱水、透明; 封片, 染色。

**2.4.3 RT-PCR 检测肝组织中转化生长因子 (TGF- $\beta_1$ ) 和 smad 3 基因的表达** 按 Triozi 试剂盒操作说明提取大鼠肝组织总 RNA, 紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度及浓度,  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8~2.0 者可用于反转录。引物序列: TGF- $\beta_1$  正向引物 5'-TGGACCGCAACAACGCAATCTATGACAAAA-CC-3', 反向引物 5'-TGGAGCTGAAGCAGTAGTTGGTATCCAGGGCT-3', 扩增片段为 525 bp; smad 3 正向引物 5'-TGACAGTGCTATTTTCGTCCAGTCT-3', 反向引物 5'-CGATCCCTTACTCCCA-GTGTCT-3', 扩增片段为 375 bp; GAPDH (内参) 正向引物 5'-CCTTCATTGAC-CTCAACTAC-3', 反向引物 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3', 扩增片段为 594 bp。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PCR 缓冲液 2 M1、dNTPs 各 2  $\mu\text{L}$ 、Oligo dT Primer 各 0.5  $\mu\text{L}$ 、cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 、Taq Polymerase 0.2  $\mu\text{L}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  1.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94 °C、3 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C (TGF- $\beta_1$  和 smad 3) 或 59 °C (GAPDH) 退火 50 s, 72 °C 延伸 90 s, 扩增 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物在 1%琼脂糖凝胶 (含 GV 核酸染料) 内电泳, 采用 Quantity One 凝胶图像分析软件对目的电泳带进行分析, 以相应内参条带为参照, 结果以两者积分吸光度的比值来表示。

### 2.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 所有计量资料符合正态分布者, 采用  $\bar{x} \pm s$  表示。多个样本均数比较应采用完全随机设计的单因素方差分析, 多个样本均数两两比较采用 SNK- $q$  检验。

## 3 结果

### 3.1 对大鼠一般状况的影响

对照组大鼠体质量自然增加, 反应灵敏, 皮毛密集而有光泽。模型组大鼠一般状况差, 皮毛发潮湿成缕, 体形消瘦, 反应迟钝, 烦躁易激惹。鳖甲煎丸组大鼠的一般状况好于模型组。由于  $\text{CCl}_4$  注射部位感染或者 ig 损伤等原因, 模型组大鼠死亡 2 只, 秋水仙碱组、鳖甲煎丸各剂量组大鼠各死亡 1 只。

### 3.2 对肝纤维化大鼠 $\alpha$ -SMA 表达的影响

对照组  $\alpha$ -SMA 只表达于小动脉及小静脉，在胆管无表达。模型组  $\alpha$ -SMA 表达明显上调；阳性染色程度增加，主要见于汇管区及纤维间隔，呈长椭圆形或梭形。秋水仙碱组、鳖甲煎丸各剂量组阳性染色程度较模型组明显减轻 ( $P < 0.05$ )，其中鳖甲煎丸 2.2 mg/kg 组阳性染色程度显著低于其他给药组 ( $P < 0.05$ )。结果见表 1。

### 3.3 对肝纤维化大鼠 TGF- $\beta_1$ 及 smad 3 基因表达的影响

与对照组比较，模型组大鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$  及 smad 3 基因表达明显上调 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较，鳖甲煎丸各组及秋水仙碱组大鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$ 、smad 3 基因不同程度地降低 ( $P < 0.05$ )，其中鳖甲煎丸 2.2 mg/kg 的效果最显著。结果见表 2 和图 1。

表 1 鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠肝组织  $\alpha$ -SMA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of Biejiajian Pill on  $\alpha$ -SMA expression in liver tissue of rats with liver fibrosis ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 / (mg·kg <sup>-1</sup> )	动物 / 只	$\alpha$ -SMA
对照	—	8	0.155 0 ± 0.025 0
模型	—	7	0.748 0 ± 0.027 8*
秋水仙碱	0.10	8	0.470 0 ± 0.043 9 <sup>▲#</sup>
鳖甲煎丸	0.55	8	0.558 0 ± 0.036 3 <sup>▲#</sup>
	1.10	8	0.478 0 ± 0.056 0 <sup>▲#</sup>
	2.20	8	0.335 0 ± 0.027 5 <sup>▲</sup>

与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$ ;

与鳖甲煎丸高剂量组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ , 下表同

\* $P < 0.05$  vs control group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs model group

<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs high dose Biejiajian Pill group; same as below

表 2 鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠 TGF- $\beta_1$  及 smad 3 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of Biejiajian Pill on expression of TGF- $\beta_1$  and smad 3 mRNA in liver tissue of rats with liver fibrosis ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 / (mg·kg <sup>-1</sup> )	动物 / 只	TGF- $\beta_1$	smad 3
对照	—	8	0.165 0 ± 0.002 0	0.158 0 ± 0.005 2
模型	—	7	0.416 0 ± 0.002 1*	0.610 0 ± 0.008 3*
秋水仙碱	0.10	8	0.247 0 ± 0.002 8 <sup>▲#</sup>	0.356 0 ± 0.003 4 <sup>▲#</sup>
鳖甲煎丸	0.55	8	0.267 0 ± 0.003 8 <sup>▲#</sup>	0.489 0 ± 0.004 5 <sup>▲#</sup>
	1.10	8	0.244 0 ± 0.002 9 <sup>▲#</sup>	0.351 0 ± 0.005 5 <sup>▲#</sup>
	2.20	8	0.185 0 ± 0.002 8 <sup>▲</sup>	0.248 0 ± 0.004 1 <sup>▲</sup>

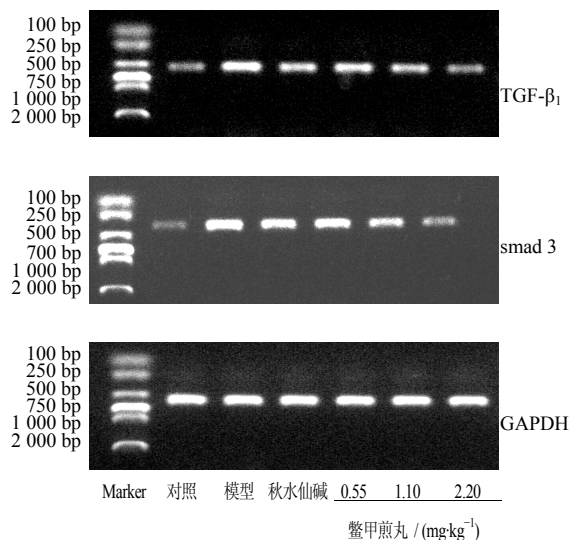


图 1 鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠 TGF- $\beta_1$  与 smad 3 基因表达的影响

Fig. 1 Effect of Biejiajian Pill on expression of TGF- $\beta_1$  and smad 3 mRNA in liver tissue of rats with liver fibrosis

## 4 讨论

TGF- $\beta_1$  是一类具有多种生物活性的细胞因子，是导致肝纤维化形成的最强催化剂，在人星状细胞 (HSC) 激活的“早期启动阶段”和“激活持久化阶段”，TGF- $\beta_1$  都起到重要作用，是肝损伤后全面诱发肝纤维化形成的一个关键细胞因子<sup>[3]</sup>。TGF- $\beta_1$  受体的胞内激酶底物是 smad 蛋白，它将 TGF- $\beta_1$  与受体作用的信号由胞浆传导至胞核，从而介导 TGF- $\beta_1$  在细胞内的信号转导<sup>[4]</sup>。TGF- $\beta_1$ /smad 信号传导通路是肝纤维化主要的信息传导途径<sup>[5-6]</sup>。肝纤维化时，TGF- $\beta_1$  与细胞膜表面的 II 型受体 (T $\beta$ R II) 识别并结合形成异源二聚体，T $\beta$ R II 的胞内段 Ser/ Thr 激酶即被活化，进而与 T $\beta$ R I 组成受体异聚体复合物，该复合物与 R-smad 结合 (smad 2 和 smad 3)，从而激活 smad 2 和 smad 3 羧基末端的 SSXS 序列，这是 TGF- $\beta_1$  信号传导很关键的一步<sup>[7]</sup>。然后再与 co-smad (smad 4) 结合形成异源寡聚体而转位入胞核，调节目基因转录。由此可见，TGF- $\beta_1$  能够刺

激 HSC 活化与增殖, smad 3 可将 TGF- $\beta_1$  信号由胞浆传递至胞核内调控目的基因表达, 促进肝纤维化发生发展。

在肝纤维化发生发展过程中, HSC 的活化与增殖是中心环节, TGF- $\beta_1$  能够激活 HSC 转化为肌成纤维细胞, 表达  $\alpha$ -SMA, 并合成大量细胞外基质 (ECM) 沉积于肝脏, 最终导致纤维化的发生<sup>[8-9]</sup>。因此,  $\alpha$ -SMA 是 HSC 活化的标志性蛋白, 与肝纤维化程度、HSC 增殖呈正相关,  $\alpha$ -SMA 的表达量可直接反映活化的肝星状细胞的数量<sup>[10]</sup>。

肝纤维化属于中医的癥瘕、胁痛、积聚等病证范畴, 中医认为肝纤维化演变过程可以归结为“由实到虚、由轻到重、由表及里、由气入血、由聚至积”, 病机为“虚实夹杂”, 正虚以脾肾亏虚为主, 邪实以气滞血瘀为主。临床上中医治疗肝纤维化方法主要是活血化瘀、软坚散结、舒肝解郁、益气健脾、清热利湿、滋养肾阴、柔润肝体。鳖甲煎丸收载于《伤寒杂病论》, 其治疗肝硬化、慢性肝炎疗效确切。本实验 sc 40% CCl<sub>4</sub> 橄榄油, 诱导大鼠肝纤维化模型, 造模同时给予化瘀通络中药鳖甲煎丸, 结果模型组大鼠肝组织  $\alpha$ -SMA 蛋白、TGF- $\beta_1$  及 smad 3 基因的表达显著高于对照组; 而给予鳖甲煎丸治疗后, 大鼠肝纤维化结构得到改善, 肝组织  $\alpha$ -SMA 蛋白、TGF- $\beta_1$  与 smad 3 基因的表达明显下调, 尤以其高剂量疗效最好。鳖甲煎丸抗纤维化机制可能与调控 TGF- $\beta$ /smad 信号转导通路, 抑制 HSC 活化与增殖有关。近年来, 中药防治肝纤维化的作用日益受到重视, 且已显现良好的应用前景<sup>[11-14]</sup>。中药抗肝纤维化的作用机制为多靶点、多环节、多途径, 并涉及多种细胞因子及信号分子网络。鳖甲煎丸能够调控 TGF- $\beta_1$ /smad 3 信号转导通路, 然而其抗纤维化机制是否还涉及其他信号通路或细胞因子生物学活性, 有待于进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 周红燕, 胡敏涛, 蒋红梅. 鳖甲煎丸对肝纤维化的影响 [J]. 中华医学写作杂志, 2002, 9(3): 198.
- [2] 赵治友, 姚真敏, 钟庆平, 等. 中药鳖甲煎丸抗肝纤维化作用的临床研究 [J]. 中国中西医结合肝病杂志, 2001, 11(3): 136-138.
- [3] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenesis, concepts of liver fibrosis suggest satellite cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 8(10): 76-99.
- [4] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling [J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 577-584.
- [5] Breitkopf K, Godoy P, Ciucan L, et al. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver [J]. *Z Gastroenterol*, 2006, 44(1): 57-66.
- [6] 沈波, 杨大明, 孟宪镛. 肝纤维化中肝星状细胞内主要信号转导通路 [J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(8): 456-459.
- [7] Kremer M, Perry A W, Milton R J, et al. Pivotal role of Smad 3 in a mouse model of T cell mediated hepatitis [J]. *Hepatology*, 2008, 47(1): 113-126.
- [8] Oyaizu T, Shikata N, Senzaki H, et al. Studies on the mechanism of dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in mice [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 1997, 49(5): 375-380.
- [9] Kusters S, Tiegs G, Alexopoulou L, et al. In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis [J]. *Eur J Immunol*, 1997, 27(11): 2870-2875.
- [10] Carpino G, Morini S, Ginanni S C, et al. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation [J]. *Dig Liver Dis* [J]. 2005, 35: 349-356.
- [11] Zou Y H, Yang Y, Li J, et al. Potential therapeutic effects of a traditional Chinese formulation, BJ-JN, on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 120(3): 452-457.
- [12] 倪春艳, 郑仕中, 陆茵, 等. 以瘦素为靶点中药单体成分防治肝纤维化研究策略及进展 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1837-1841.
- [13] Yuan L P, Chen F H, Ling L, et al. Protective effects of total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2008, 60(10): 1393-14.
- [14] 刘兆凤, 胡金芳, 马洁, 等. 丹参滴丸对 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化的影响及其作用机制 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1991-1996.