论著

文章编号:1000-5404(2011)03-0274-04

鳖甲煎改良方对大鼠肝纤维化的作用及其机制研究

艾志波[1],张荣华[1],闫国和[2],粟永萍[2],艾国平[2] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院中西医结合科[1];军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

【摘要】 **目的** 探讨鳖甲煎改良方对大鼠肝纤维化(hepatic fibrosis,HF)的作用及其机制。**方法** SD雄性大鼠90只,随机分6组,每组15只,其中以40% CCl_4处理(3 ml/kg)8周复制中毒肝纤维化模型(模型组),复制模型的同时分别用鳖甲煎改良方高剂量组28.4 g/(kg·d)、中剂量组14.2 g/(kg·d)、低剂量组7.1 g/(kg·d)灌胃治疗并且以复方鳖甲软肝片灌胃0.6 g/(kg·d)作阳性对照组治疗6周。以复制模型同样方式与用量于右后腿皮下注射橄榄油及生理盐水灌胃(10 ml/kg·d)作空白对照组。苏木精-伊红(HE)染色观察各组8周后肝纤维化变化程度,RT-PCR检测其转化生长因子β1(transforming growth factor beta one,TGF-β1)、Smad3及Smad7变化,免疫组化(S-P法)观测TGF-β1、smad3、smad7表达情况。**结果** 8周后,与模型组比较,鳖甲煎改良方高、中、低剂量组和复方鳖甲软肝片组肝小叶结构破坏明显减轻,部分肝细胞脂肪变性,炎性细胞浸润与少量胶原纤维形成;肝组织TGF-β1与Smad3的mRNA及蛋白表达显著减少($P<0.01$),smad7 mRNA及蛋白表达明显增加($P<0.01$)且鳖甲煎改良方高、中、低剂量组和复方鳖甲软肝片组疗效并无显著差异。**结论** 鳖甲煎改良方能显著改善大鼠肝纤维化,其作用机制可能与鳖甲煎改良方调控TGF-β/smad信号通路有关。

【关键词】 鳖甲煎改良方;肝纤维化;TGF-β1;Smad3;Smad7
【中图法分类号】 R285.5;R289.5;R575.05 【文献标志码】 A

Effect of modified turtle shell decoction on hepatic fibrosis in rats and its mechanism

Ai Zhibo[1], Zhang Ronghua[1], Yan Guohe[2], Su Yongping[2], Ai Guoping[2] ([1]Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southwest Hospital, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the effect of modified turtle shell decoction (MPTSD) on hepatic fibrosis in rats and its mechanism. **Methods** Ninety male SD rats were randomly divided into 6 groups, 15 rats in each group. A toxic hepatic fibrosis of rats was reproduced with 40% carbon tetrachloride (CCl_4) (3 ml/kg) for 8 weeks. Fifteen rats were treated for 6 weeks with MPTSD at 28.4 g/(kg·d) as a high dose group, at 14.2 g/(kg·d) as a medium dose group, and at 7.1 g/(kg·d) as a low-dose group. Rats treated with compound MPTSD soft tablets at 0.6 g/(kg·d) served as a positive control group and those treated with olive oil at 10 ml/(kg·d) served as a blank control group. Changes of HF in different groups were observed with hematoxylin-eosin (HE) staining 8 weeks after treatment. Expression of transforming growth factor beta 1 (TGF-β1), Smad3 and Smad7 was detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry staining. **Results** Eight weeks after treatment, the destruction of hepatic lobules in high, medium and low dose MPTSD groups and positive control group were remarkably alleviated with, fatty degeneration of some liver cells, infiltration of inflammatory cells and formation of few collagen fibers. The mRNA and protein expression level of TGF-β1 and Smad3 was significantly lower while the expression level of Smad7 was remarkably higher in high, medium and low dose MPTSD groups and positive control group than in blank control group ($P<0.01$). No significant difference was observed in high, medium and low dose MPTSD groups and positive control group. **Conclusion** MPTSD can significantly improve CCl_4- induced hepatic fibrosis in rats by regulating the TGF-β/smad signal pathway.

【**Key words**】 modified turtle shell decoction; hepatic fibrosis; TGF-β1; smad3; smad7

Supported by the Program of Scientific Research of Traditional Chinese Medicine of Chongqing (2008-2-73);Corresponding author:Zhang Ronghua,Tel:86-23-68754636,E-mail:zhrhlggg@163.com

【基金项目】 重庆市中医药科研项目(2008-2-73)
【通信作者】 张荣华,电话:(023) 68754636,E-mail:zhrhlggg@163.com

肝纤维化(hepatic fibrosis,HF)是肝脏持续损伤组织发生、修复时因细胞外基质(extracellular matrix,ECM)合成、降解与沉积平衡破坏所致的病理过程,是慢性肝病的病理特征,也是慢性肝病进一步向肝硬化发展的主要环节。活化的肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)是ECM的主要来源,也是肝纤维化发生的关键环节。TGF-β1是促HF发展的最重要的细胞因子之一,能抑制肝细胞的增殖,并调节肝细胞的凋亡。Smad家族是TGF-β1细胞内传导的通道,因此,探讨TGF-β1在HF形成、发生及发展中的机制,对更有效、安全的以TGF-β1为靶标治疗HF具重要意义。

目前对HF的治疗有化学药物、生物制剂与基因等,但均疗效欠佳,理想的临床治疗肝纤维化的手段仍然缺乏。中医药对HF的治疗具多途径、多环节、多靶点、副作用少及价格低廉等特性,其综合作用已显示出明显优势和良好的前景。鳖甲煎改良方是在"鳖甲煎丸"基础上加减多味中药化裁而成,我们既往的研究表明,鳖甲煎改良方可抑制大鼠实验性肝纤维化,减轻大鼠肝纤维化模型肝细胞内脂滴形成、内质网增生、线粒体肿胀,减少Disse腔及肝星状细胞周围的胶原纤维,促进已形成的胶原的吸收。本实验采用CCl_4诱导大鼠HF,用鳖甲煎改良方予以治疗,探讨鳖甲煎改良方抗大鼠HF的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 中药剂的制备

鳖甲煎改良方主要为土鳖虫、鳖甲、柴胡、黄芩、半夏、茵陈、桂枝、桃仁、茯苓、黄芪及白芍等中药的配伍,用传统方法浸泡、煎煮、过滤、浓缩、制成煎剂,含生药量分别为2.84 g/ml、1.42 g/ml、0.71 g/ml。复方鳖甲软肝片(批号:20090107)购于内蒙福瑞中蒙药公司,用时配成含生药0.06 g/ml溶剂。分析纯四氯化碳(CCl_4,批号:20090115)为成都科龙化工厂产品。化学纯橄榄油购自四川天源橄榄油有限公司。

1.2 损伤动物模型制作、处理与观测

健康SPF级雄性SD大鼠(第三军医大学大坪医院实验动物中心)90只,体质量190~210 g,随机数字法分6组,每组15只。40% CCl_4与橄榄油油剂注射(首次5 ml/kg)于大鼠右后腿皮下,此后重复注射(3 ml/kg)每周2次,共8周,并用生理盐水灌胃10 ml/(kg·d),以此复制中毒HF模型。复制模型后的第2周,HE染色证实HF中度形成,再分别用鳖甲煎改良方不同浓度[28.4g/(kg·d)、14.2 g/(kg·d)、7.1 g/(kg·d)]组灌胃[其中中剂量含生药量1.42 g/ml,14.2 g/(kg·d),即10 ml/(kg·d),其余同比例]治疗为高、中、低剂量组,复方鳖甲煎丸灌胃[含生药0.06 g/ml,0.6 g/(kg·d),即10 ml/(kg·d)]作阳性对照,以复制模型同样方式与用量予右后腿皮下注射橄榄油及生理盐水灌胃作空白对照,治疗6周。

HE染色观察HF变化 8周后,各组动物禁食24和,3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(1 ml/kg)肝组织取材(1.0 cm×0.3 cm×0.5 cm)3份,其中一份作常规制片(4 μm),HE染色,光镜观察各组病变情况。另2份存于液氮备RT-PCR检测用。

免疫组化染色观察:各肝组织4 μm石蜡或6 μm冰冻切片,用TGF-β1、Smad3、Smad7单克隆抗体(北京中杉公司,1:400)以即用型检测试剂盒(SP-9002,北京中杉)分别对TGF-β1、Smad3、Smad7抗原染色,胃蛋白酶(北京中杉)消化以修复抗原,DAB显色试剂盒(北京中杉)显色,镜检其表达变化;每张切片在高倍视野(×400)下选取5个不重叠视野,用Image-pro Plus软件分析累计光密度值。

1.3 TGF-β1、Smad 3及Smad 7基因在各组肝组织中表达的检测

取各组动物肝组织50~100 mg,Trizol试剂分别提取其总RNA。分别根据TGF-β1、Smad 3及Smad 7基因编码序列,设计其特异性扩增引物(表1),经Invitrogen公司合成。采用RT-PCR二步法,以上述总RNA为模板扩增上述各基因cDNA,以Beta-actin基因作内参。反转录(RT)反应条件:30 ℃ 10 min;42 ℃ 30min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min,1个循环。PCR反应条件:94 ℃ 1 min;94 ℃ 30 s,62.8 ℃ 30 s,72℃ 1 min,35个循环。反应结束后,取PCR反应液(5 μl)行1%琼脂糖凝胶电泳,GoldView™核酸染料染色确认PCR反应产物。

表1 各基因引物序列、退火温度及产物大小

基因	引物序列	退火温度(℃)	产物大小(bp)
TGF-β1	上游5′-CCGCAACAACGCAATCTATG-3′	62.8	305
	下游5′-AGCCCTGTATTCCGTCTCCTT-3′		
Smad3	上游5′-GTACAAGGAAATGACAGCAGCA-3′	59.8	164
	下游5′-AGGTAGGACCCACAGTAGAGCC-3′		
	下游5′-GCCGCTTTGCTATCTGTG-3′		
Smad7	上游5′-TTTACAACCGCAGCATTACC-3′	57.7	273
	下游5′-AAGATGACCTCCAGCCAGC-3′		
β-actin	上游5′-CCGTGAAAAGATGACCCAGAT-3′		413
	下游5′-CATTGCCGATAGTGATGACCT-3′		

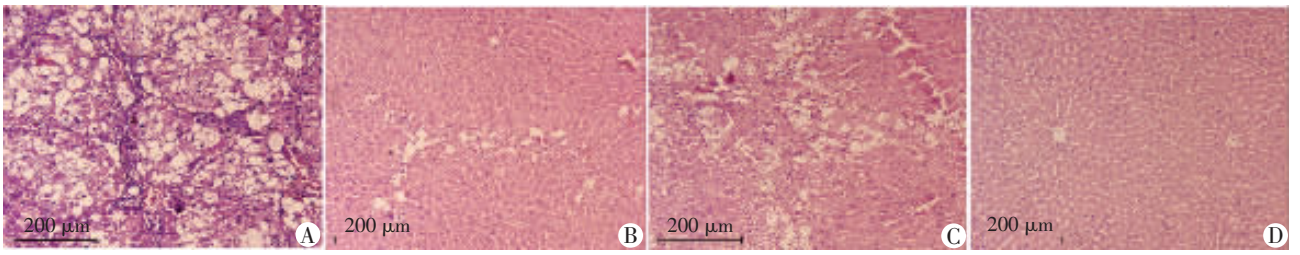
1.4 统计学分析

采用SPSS 12.0软件做组间方差分析,数据以$\bar{x} \pm s$表示。

2 结果

2.1 组织学观测

光镜观察:空白对照组肝小叶呈条索状向四周放射排列,结构清晰完整(图1A)。模型组大部分肝组织大片脂肪变性、坏死,呈空网状,仅残存少量肝细胞,粗大胶原纤维分割、包绕肝小叶,纤维间隔内大量炎细胞浸润,肝小叶结构破坏或消失(图1B)。与模型组相比,鳖甲煎改良方高、中、低剂量组和复方鳖甲软肝片组(阳性对照组)部分肝细胞脂肪变性,炎性细胞浸润与胶原纤维增生较少,肝小叶破坏明显减轻(图1C、D)。



A:中毒肝纤维化模型组;B:鳖甲煎改良方中剂量治疗组;C:阳性对照组;D:空白对照组

图1 各组大鼠肝病理变化 (HE)

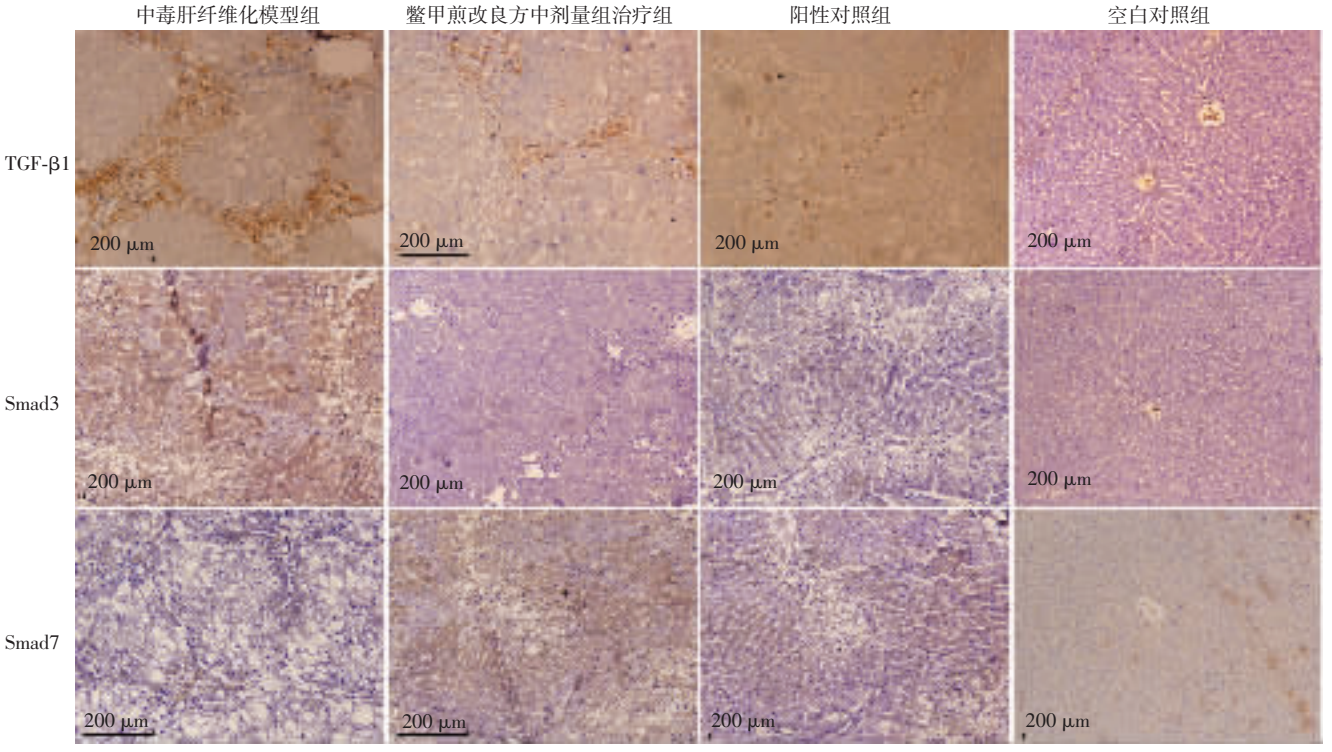


图2 免疫组化检测各组肝组织内 TGF-β1、Smad3、Smad7 的表达 (S-P)

2.2 免疫组化检测 TGF-β1、Smad3、Smad7 蛋白的表达

模型组中 TGF-β1、Smad3 表达显著升高,而 Smad7 表达量极少;鳖甲煎改良方高、中、低剂量组和复方鳖甲软肝片组中 TGF-β1、Smad3 表达很少,而 Smad7 的表达十分明显,与模型组比较具有显著性差异(表2),但4组间比较并无显著差异;空白对照组 TGF-β1、Smad3 和 Smad7 表达量均很少,与各组相比均具显著性差异($P<0.01$)(图2)。

表2 各组大鼠 TGF-β1、smad3、smad7 蛋白表达光密度值 ($n=15$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TGF-β1	smad3	smad7
模型组	0.213±0.031	0.759±0.215	0.106±0.213
高剂量组	0.042±0.051[a]	0.284±0.106[a]	0.624±0.065[a]
中剂量组	0.045±0.028[a]	0.275±0.213[a]	0.603±0.024[a]
低剂量组	0.044±0.071[a]	0.290±0.135[a]	0.597±0.058[a]
阳性对照组	0.040±0.058[a]	0.281±0.324[a]	0.587±0.043[a]

a:$P<0.01$,与模型组比较

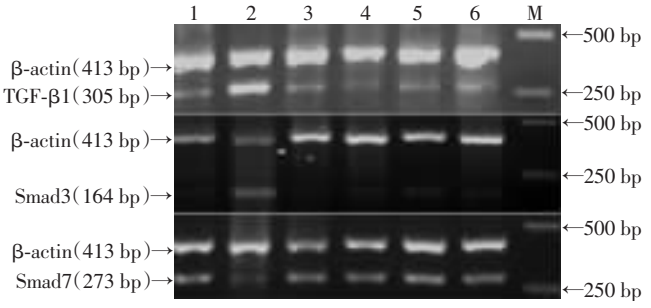
2.3 TGF-β1、Smad 3 及 Smad 7 基因在各组肝组织中表达的检测

与空白对照组比较,模型组 TGF-β1 与 Smad3 的 mRNA 表达明显增加($P<0.01$),Smad7 mRNA 表达显著减少($P<0.01$);与模型组比较,鳖甲煎改良方高、中、低剂量组和复方鳖甲软肝片组组 TGF-β1 与 Smad3 的 mRNA 表达则明显降低($P<0.01$),Smad7 mRNA 表达显著升高($P<0.01$);鳖甲煎改良方高、中、低剂量组和复方鳖甲软肝片组间比较 TGF-β1、Smad3 与 Smad7 mRNA 表达无统计学差异(表3、图3)。

表3 各组大鼠 TGF-β1、smad3、smad7mRNA 表达光密度值($n=15$, $\bar{x}\pm s$)

组别	TGF-β1	smad3	smad7
模型组	0.8761±0.0140[b]	0.8105±0.0070[b]	0.1166±0.0128[b]
高剂量组	0.3230±0.0039[ab]	0.1027±0.0043[ab]	0.5100±0.0009[ab]
中剂量组	0.3275±0.0057[ab]	0.0935±0.0046[ab]	0.5099±0.0070[ab]
低剂量组	0.3232±0.0035[ab]	0.1025±0.0019[ab]	0.5093±0.0023[ab]
阳性对照组	0.3665±0.0158[ab]	0.1257±0.0030[ab]	0.4979±0.0093[ab]
空白对照组	0.2161±0.0202[a]	0.0832±0.0018[a]	0.6388±0.0077[a]

a:$P<0.01$,与模型组比较;b:$P<0.01$,与空白对照组比较



1:空白对照组 2:模型组 3:高剂量组 4:中剂量组 5:低剂量组；6:阳性对照；M:标准

图 3　各组大鼠肝组织内 TGF-β1、Smad 3 及 Smad 7 基因表达

3　讨论

肝纤维化是慢性肝病共有的病变，其本质是肝组织 ECM 合成与降解失衡，是各种不同致病因子使 ECM 合成增多与降解的相对减少所致[1]。TGF-β1 是一类调节细胞生长和分化的多肽，是致 HF 最重要的细胞因子之一[2-3]，其具体机制为活化 HSC，调节 ECM 受体表达，增加 ECM 合成，抑制 ECM 降解[3-4]。肝脏肌成纤维细胞是 HSC 的激活形式，活化 HSC 是肝脏胶原产生和纤维化形成的中心环节[5]。

TGF-β1 生物效应的发挥必经特定的信号转导[6]。TGF-β1 胞外激活后，与其胞膜上特异受体 I 和 II 结合，继而主要由 Smads 介导胞内信号传导。Smads 蛋白是 TGF-β1/smad 信号通路的下游信号分子，参与调控细胞的增殖、转化与凋亡，ECM 的合成与分泌等。据 Smads 蛋白结构和功能特点，主要分为 3 类：调节性 Smads，如 Smad3，主要介导 TGF-β 和生物素的信号；公用性 Smads 在哺乳动物发现的有 Smad4；抑制性 Smads，如 Smad7，抑制其他二类 Smads 的活性。HSC 的激活主要与 Smad3 有关，针对 Smad3 的靶向治疗也取得显著疗效[7-8]。Smad7 具与其他信息分子不同的负调节作用，在抑制 HSC 细胞活化，调节 TGF-β1 信号转导及减轻肝损伤方面起重要作用[9-10]。调控 TGF-β1 信号途径是治疗 HF 的有效方法[11]。

根据慢性肝病的病因病机与临床表现，可将 HF 归属于中医的癥瘕、积聚、胁痛等范畴，中医认为 HF 多是湿、热、痰、毒、郁、瘀与虚等作用于肝，致正气不足，邪毒留于肝经，进而气机郁滞，脉络淤阻，临床以疏肝，活血化淤，软坚散结取得较好疗效。鳖甲煎改良方是我们经长期临床实践对鳖甲煎丸[12]进行改良的配方；“鳖甲煎丸”出自东汉医家张仲景所著《金匮要略》，为治疗疟母的主方，由鳖甲胶、阿胶、蜂房、硝石、蜣螂、鼠妇等 23 味药组成，其成药临床上用于治疗肝脾肿大、肝硬化、肝癌等，取得较满意疗效。其不足之处是药味多，方中部分药味有一定的毒副作用或获得困难，而限制了其临床应用。该方祛邪力强，但扶正之力不足，正气虚者不宜长期服用。鳖甲煎改良方是我们在多年实践中对该方不断优化，保留活血化淤、软坚散结等 8 味中药，减去气味厚重长期服用易伤正气和恋邪气之 15 味中药，加入黄芪、茯苓益气健脾，扶正以祛邪；茵陈为引经药，入肝经，具有保肝利胆功效。全方具活血化淤、软坚散结兼益气健脾之效，能显著改善患者肝功能、肝纤谱，以提高患者生活质量。

本实验证实，通过鳖甲煎改良方治疗 HF 大鼠，TGF-β1、Smad3 表达显著降低，而 Smad7 表达明显升高，其 HF 得到明显改善，其可能机制为调控 TGF-β/Smad 信号转导通路中各种成分的表达。HF 的形成是多细胞因子、多信号通路共同作用的结果，彼此间存在广泛联系。而 TGF-β1 具广泛生物效应，鳖甲煎改良方治疗可使其显著降低，是否影响其他生物学其他变化及鳖甲煎改良方是否对其他致 HF 的信号通路也有抑制作用，尚有待进一步研究。

参考文献：

[1] Tsukada S, Parsons C J, Rippe R A. Mechanisms of liver fibrosis[J]. Clin Chim Acta, 2006, 364(1/2): 33-60.

[2] Gressner A M, Weiskirchen R, Breitkopf K, *et al*. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis[J]. Front Biosci, 2002, 7: d793-d807.

[3] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(1): 76-99.

[4] Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(8/9): 1639-1642.

[5] Cheng J H, She H, Han Y P, *et al*. Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(1): G39-G49.

[6] Massague J. TGF-beta signal transduction[J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 753-791.

[7] Roberts A B, Tian F, Byfield S D, *et al*. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2006, 17(1/2): 19-27.

[8] Zhao Y, Geverd D A. Regulation of Smad3 expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis: a negative feedback loop of TGF-beta signaling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294(2): 319-323.

[9] Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, *et al*. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats[J]. Gastroenterology, 2003, 125(1): 178-191.

[10] Dooley S, Hamzavi J, Ciuclan L, *et al*. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage[J]. Gastroenterology, 2008, 135(2): 642-659.

[11] Liu X, Hu H, Yin J Q. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis[J]. Liver Int, 2006, 26(1): 8-22.

[12] 张秋英，张再康，金淑琴. 鳖甲煎丸的现代临床应用和实验研究进展[J]. 河北中医药学报，2006，21(1)：35-37.

（收稿：2010-09-20 修回：2010-10-29）
（编辑　邓强庭）