

益气活血化痰法对酒精性肝纤维化大鼠 转化生长因子- $\beta 1$ /Smads 信号通路的影响

吴凌康^{1*} 史亮亮¹ 陈春梅¹ 单国栋² 吴峰²

(1. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江省杭州市潮王路 318 号, 310005; 2. 浙江大学医学院附属第一医院)

* 通讯作者: wulingkang@163.com, 15268590858

[摘要] **目的** 探讨益气活血化痰法对大鼠酒精性肝纤维化的影响及机制。 **方法** 将 120 只 SD 大鼠随机分成对照组、模型组、秋水仙碱组、小剂量中药组、中剂量中药组、大剂量中药组各 20 只。除对照组外, 其余各组大鼠均用 56°酒精灌胃 [15ml/(kg·d)] 致肝纤维化。同时, 各小、中、大剂量中药组分别以 10g/(kg·d)⁻¹、20g/(kg·d)⁻¹、40g/(kg·d)⁻¹ 益气活血化痰法中药组方灌胃, 秋水仙碱组以秋水仙碱灌胃 [2mg/(kg·d)⁻¹], 模型组予等量生理盐水灌胃。6 个月后处死取肝, 采用 HE 染色考察各组大鼠肝脏的纤维化程度, 免疫组化法检测肝组织转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 蛋白表达, 用 RT-PCR 法检测各组大鼠肝组织中 TGF- $\beta 1$ 和 Smads3、Smads4、Smads7 的核酸水平表达。 **结果** 不同剂量中药组及秋水仙碱组的纤维化分期均与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 各中药组及秋水仙碱组的 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$), 且大剂量中药组较秋水仙碱组 TGF- $\beta 1$ 蛋白显著降低 ($P < 0.01$); 不同剂量与治疗组 TGF- $\beta 1$ 、Smad3、Smad4、Smad7 各核酸分子的表达水平均有相关性。 **结论** 益气活血化痰法能下调酒精性肝纤维化大鼠 TGF- $\beta 1$ 、Smad3、Smad4 mRNA 表达水平并上调 smad7 mRNA 表达水平, 干预了 Smads 信号通路的表达。

[关键词] 酒精性肝纤维化; 益气活血化痰; 转化生长因子- $\beta 1$; Smads 信号通路

Effect of Yiqi Huoxue Huatan Method on the Transformation Growth Factor- $\beta 1$ /Smads Signal Pathway of Rats with Alcoholic Liver Fibrosis

WU Ling kang¹, SHI Liang liang¹, CHEN Chun mei¹, SHAN Guo dong², WU Feng²

(1. The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou 310005; 2. The First Affiliated Hospital of Medical College, Zhejiang University)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect and mechanism of Yiqi Huoxue Huatan Method (treatment of reinforcing qi, activating blood, and dissolving phlegm) on alcoholic liver fibrosis rats. **Methods** Totally 120 SD rats were randomized into control group, model group, colchicin group, and small-dosage, medium-dosage, and large-dosage Chinese medicine groups, with 20 in each. Except the control group, the other groups were all treated with alcohol intragastric feeding [15ml/(kg·d)] to induce liver fibrosis. Meanwhile, the small-dosage, medium-dosage, and large-dosage Chinese medicine groups were given intragastric feeding with herbal decoction made by Yiqi Huoxue Huatan medicines, 10g/(kg·d)⁻¹, 20g/(kg·d)⁻¹, and 40g/(kg·d)⁻¹ respectively. The colchicin group was administered colchicin [2mg/(kg·d)⁻¹] by intragastric feeding. And the model group was applied equal amount of normal saline for intragastric feeding. Six months later, the rats were killed and their livers were obtained for observation. The severity of fibrosis was determined by using the HE dyeing. The transformation growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) expression and distribution in the liver tissues of all groups were detected with the immunohistochemical method. And the expression of TGF- $\beta 1$ and Smads3, Smads4, and Smads7 nucleic acid in liver tissues of all groups was tested with RT-PCR method. **Results** The stage of fibrosis in the different dosage Chinese medicine groups and colchicin group was all different from that of the model group with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of TGF- $\beta 1$ in all Chinese medicine groups and colchicin group was significantly decreased ($P < 0.01$), and the decrease in the large-dosage Chinese medicine group was more significant than that of the colchicin group ($P < 0.01$). The dosage of Chinese medicine was correlated with the expression level of TGF- $\beta 1$, Smad3, Smad4, and Smad7 nucleic acid molecules after treatment. **Conclusion** Yiqi Huoxue Huatan method is effective to down-regulate the expression of TGF- $\beta 1$, Smad3, and Smad4 mRNA and up-regulate the expression of smad7 mRNA.

Key Words (alcoholic liver fibrosis; Yiqi Huoxue Huatan Method (treatment of reinforcing qi, activating blood, and dissolving phlegm); transformation growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$); Smads signal pathway

肝纤维化属中医“积聚”等症范畴,以气滞血瘀、痰瘀互结者为多见,临床上以益气活血化痰法治疗常取得良好疗效。转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)是一种多功能细胞因子,它能调节细胞的增殖、分化、凋亡、迁移、黏附及胞外基质的产生^[1],其过度表达在纤维化机制中起关键作用,从而也多作为治疗纤维化病变的靶目标^[2]。研究发现^[3-4],在TGF- β_1 下游存在一个复杂的Smads信息传导网络,而TGF- β_1 /smads信号通路是肝纤维化的重要调控路径。本研究以酒精灌胃制作大鼠酒精性肝纤维化模型,观察肝纤维化和TGF- β_1 /Smads信号通路的变化,探讨益气活血化痰法治疗大鼠酒精性肝纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取健康性成熟一级质量标准的SD大鼠150只,雌雄各半,体重180~210g,分笼喂养。由浙江中医药大学动物中心提供[实验动物许可证号:SCXK(沪)2009-0009],浙江中医药大学动物中心清洁二级喂养。

1.2 主要仪器与试剂

HE染色试剂,PCR仪(96孔,上海朗赋实业有限公司提供),电泳及紫外凝胶成像系统(上海百维生物科技有限公司提供),兔抗大鼠TGF- β_1 多抗(一抗,批号:BA02900),辣根过氧化物酶标记羊抗兔多抗(二抗,批号:BA1054)均购自武汉博士德生物工程有限公司,Trizol试剂(批号:308W),M-MLV逆转录酶(批号:00063966),Tag酶(批号:1208Z10),10mM/LdNTP(批号:312K1011)均购自生工生物工程(上海)有限公司。

1.3 药物

益气活血化痰法中药组方:黄芪30g、麦冬20g、川芎20g、当归20g、山药20g、赤芍15g、半夏20g、桑白皮30g、桑叶15g等组成,浙江中医药大学附属第一医院中药房提供制剂,水煎浓缩至生药含量为2g/ml,每袋150ml;秋水仙碱片1mg/片,20片(批号:H5321534),昆明制药股份公司生产。

1.4 模型制备与分组

将150只SD大鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组、秋水仙碱组、小剂量中药组、中剂量中药组、大剂量中药组6组,每组25只。

酒精性肝纤维化大鼠造模方法参考文献^[3]。除对照组外,其余各组均予以56°白酒灌胃(15ml/(kg·d)⁻¹)。灌胃的同时,小、中、大剂量中药组分

别以10g/(kg·d)⁻¹、20g/(kg·d)⁻¹、40g/(kg·d)⁻¹予益气活血化痰方灌胃,秋水仙碱组以秋水仙碱2mg/(kg·d)⁻¹灌胃,模型组则予相同剂量生理盐水灌胃,各组分别灌胃6个月。

造模过程中各组因饲养不当或造模不耐受而发生死亡,其中,成功造模对照组23只、模型组21只、秋水仙碱组22只、小剂量中药组22只、中剂量中药组21只、大剂量中药组21只。各组采用随机数字表法随机抽取20只,共120只,处死,取肝脏标本,部分浸泡于10%甲醛中留于HE染色和免疫组化检查,部分置于液氮中保存于-80℃冰箱中用于RT-PCR检测。

1.5 HE染色方法

参考文献^[4]进行,步骤如下:取材—固定—脱水—透明—浸蜡—包埋—切片—贴片—烤片—染色—封片—镜检。

根据1995年修改的《病毒性肝炎防治方案》^[5]病理诊断标准的分期标准,肝纤维化分期标准:S0级为正常肝组织;S1级为有胶原纤维增生,中央静脉和门脉区有少量星状胶原纤维束放射,但无间隔形成;S2级为有胶原纤维增生,中央静脉和门脉区结缔组织变厚,由此向四周伸出纤维索,形成不完全间隔;S3级为胶原纤维大量增生,有个别菲薄的完全间隔形成,或较厚的不完全间隔即将形成假小叶;S4级为完全间隔较厚,假小叶大量形成。

1.6 TGF- β_1 蛋白检测方法

用免疫组化法探测肝组织中TGF- β_1 蛋白的分布和表达强度。以动物羊血清代替一抗制作阴性对照。结果判定:镜下组织切片出现棕黄色染色则判为阳性。着色深度与TGF- β_1 表达强度成正比。将免疫组化染色切片,经显微镜输入MPIAS-500多媒体彩色病理图文分析系统,进行半定量分析。

1.7 TGF- β_1 、Smad3、Smad4、Smad7的mRNA表达水平检测

使用RT-PCR方法:①引物设计:从基因BANK检索和TGF- β_1 和Smad3、4、7基因的全序列,采用Primer3设计,委托上海生物工程有限公司合成。②总RNA提取:从-80℃冰箱里取黄豆大小酒精肝组织,加液氮用研钵研磨,加1ml Trizol试剂,再加氯仿提取总RNA,无水乙醇沉淀,溶解于DEPC水处理过的蒸馏水中,提取的RNA经过分光光度计测定OD值,要求OD260/OD280>2。③逆转录参照生工生物工程(上海)有限公司 MMLV

逆转录试剂盒说明书,合成 cDNA,取总 RNA 稀释至浓度为 50 μ g/ μ l,取 10 μ l 总 RNA 加入 1 μ l oligodT 放入 70 $^{\circ}$ C 水浴,5min 后冰置,加入 4 μ l 5 $\times$ 缓冲液 2 μ l 4dNTPMix 2 μ l 用双蒸水加至 19 μ l,37 $^{\circ}$ C 5min 后再加入 200U MMLV (1 μ l)42 $^{\circ}$ C 孵育 60min 后转入 70 $^{\circ}$ C 水浴,获得 cDNA 低温冰箱保存。④ PCR 反应模板 cDNA 2 μ l 各引物 1 μ l Tag 酶 0.2 μ l 加入 4 μ l PCRMIX (含 10mM4dNTP0.8 μ l, 25mmol/LMgCL21.2 μ l, 10 $\times$ buffer 2 μ l)加水至 20 μ l 反应体系。按程序 48 $^{\circ}$ C 45min, 95 $^{\circ}$ C min, 35cycles(95 $^{\circ}$ C 1min—61 $^{\circ}$ C 1min—72 $^{\circ}$ C 2min), 72 $^{\circ}$ C 10min 扩增。⑤取 10 μ l PCR 反应产物与 2 μ l 溴酚兰混合加样于电泳槽以 5v/cm 进行电泳,行荧光扫描。⑥经荧光扫描获得两组各个标本的目的基因与 GAPDH 强度比值。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理,多组计量资料间比较采用单因素方差分析,计量资料两组间比较采用两独立样本资料 *t* 检验,等级资料两组间比较采用两独立样本资料秩和检验,等级资料相关性分析采用 Spearman 分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肝组织病理切片纤维化分级观察结果

模型组肝小叶失去正常结构,胶原纤维沿界板破坏处向肝小叶内延伸形成假小叶,肝细胞普遍变性;秋水仙碱组胶原纤维大量增生,有较厚的不完全间隔形成,肝细胞排列紊乱,汇管区有炎症细胞浸润;大剂量中药组可见胶原纤维增生,但无假小叶形成,大部分肝细胞排列整齐,有少量炎症细胞浸润;中剂量中药组与秋水仙碱组病变程度大致相当;小剂量中药组可见汇管区大量纤维沉积,部分形成假小叶,肝细胞排列紊乱,有大量炎症细胞浸润。

表 1 示,模型组纤维化分期与对照组差异有统计学意义($P<0.01$),而小、中、大剂量中药组及秋水仙碱组的纤维化分期与模型组比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Spearman 相关性分析表明,中药剂量与治疗后肝纤维化分期呈负相关($r=-0.472$, $P<0.01$)。

2.2 TGF- β 1 免疫组化检测结果

模型组所有组织切片中多区域明显染为棕黄色,说明这些区域中 TGF- β 1 表达强度较高,这些区域主要是汇管区非实质细胞,肝小叶周围,窦壁周围,纤维间隔。对照组少许区域弱棕黄色染色,说明

表 1 各组大鼠肝组织病理切片纤维化分期观察结果(只)

组别	鼠数	S0	S1	S2	S3	S4
对照组	20	16	4	0	0	0
模型组*	20	0	0	0	6	14
秋水仙碱组 $\Delta\Delta$	20	4	6	4	4	2
小剂量中药组 Δ	20	2	4	4	4	6
中剂量中药组 $\Delta\Delta$	20	4	6	6	2	2
大剂量中药组 $\Delta\Delta$	20	12	2	4	2	0

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

该组标本 TGF- β 1 弱表达。其余各组肝脏标本均有不同程度的 TGF- β 1 表达。免疫组化图像经显微镜传入 MPIAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统,测量染色区光密度值进行分析。

表 2 示,与对照组比较,模型组 TGF- β 1 蛋白显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各中药组及秋水仙碱组的 TGF- β 1 蛋白表达均显著降低($P<0.01$),且大剂量中药组较秋水仙碱组 TGF- β 1 蛋白显著降低($P<0.01$)。Spearman 相关性分析表明,中药剂量与 TGF- β 1 的表达水平呈负相关($r=-0.679$, $P<0.01$)。

表 2 各组大鼠 TGF- β 1 免疫组化检测结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	OD 值
对照组	20	0.200 $\pm$ 0.010
模型组	20	0.253 $\pm$ 0.009*
秋水仙碱组	20	0.229 $\pm$ 0.008 Δ
小剂量中药组	20	0.230 $\pm$ 0.002 Δ
中剂量中药组	20	0.227 $\pm$ 0.008 Δ
大剂量中药组	20	0.219 $\pm$ 0.005 $\Delta\#$

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$;与秋水仙碱组比较, $\# P<0.01$

2.3 TGF- β 1/Smads RT-PCR 扩增结果

表 3 示,不同组间 TGF- β 1/Smad347 核酸分子的表达水平均有差异($P<0.01$)。与对照组比较,模型组的 TGF- β 1、Smad3、Smad4 mRNA 水平明显上调而 Smad7 mRNA 明显下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,中、大剂量中药组的 TGF- β 1、Smad3、Smad4 mRNA 水平均不同程度地下调而 Smad7 mRNA 上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与秋水仙碱组比较,大剂量中药组的 TGF- β 1、Smad3、Smad4 水平亦存在一定的下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Spearman 相关性分析表明,中药剂量与治疗 TGF- β 1 和 Smad3、4、7 各核酸分子的表达水平均有相关性($r=-0.33$, $P<0.05$, $r=-0.379$, $P<0.05$, $r=-0.346$, $P<0.05$, $r=0.4$, $P<0.05$)。

表 3 各组大鼠 TGF-β1/Smads RT-PCR 扩增结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TGF-β1	Smad3	Smad4	Smad7
对照组	20	0.22±0.10	0.37±0.22	0.89±0.35	1.40±0.82
模型组	20	2.04±1.02**	1.69±1.01**	2.66±1.48**	0.76±0.29*
秋水仙碱组	20	1.27±0.76	1.40±0.78	1.67±0.68	1.17±0.56
小剂量中药组	20	1.68±0.93	1.57±0.70	2.47±0.99#	0.81±0.40
中等剂量中药	20	1.29±0.55	1.24±0.75	1.45±0.67△	1.39±0.37△△
大剂量中药组	20	0.38±0.14△△##	0.62±0.24△△#	0.88±0.57△△#	1.56±0.32△△

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与秋水仙碱组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

3 讨论

酒精肝按病理过程可以分为酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化、酒精性肝硬化 4 个类型。其中酒精肝晚期的酒精性肝纤维化、肝硬化的基本病理改变是出现胶原纤维大量增生。目前认为,肝星状细胞(HSC)的激活和持续活化是肝纤维化的关键,HSC 转化为肌成纤维细胞(MFB),分泌大量细胞外基质(ECM),使 ECM 的合成大于降解而致肝纤维化^[6]。TGF-β1 是该病理过程中的一个极重要的启动因子,TGF-β1 的信号通过 Smad 家族实现对基因的调控。TGF-β1 直接结合 TBRII 或通过 B-多聚糖间接结合 TBRII,形成 TGF-β1/TBRII 复合物并迅速导致 TBRI 的磷酸化,磷酸化的 TBRI 可以活化受体特异性 Smad(Smad² 或 Smad³)使其磷酸化,并与通用型 Smad(Smad⁴)结合形成异源复合物,转位到核内,调节靶基因的转录。不同类型的细胞 TGF-β1 诱导产生的生物学效应不同,可刺激或抑制细胞生长,产生一个广泛的生物学效应^[7]。实验表明,TGF-β1 参与了肝纤维化过程中胶原的增生^[8-9],Smad 蛋白是 TGF-β1 受体复合物体下游一类非常重要的信号分子,同时具有转录活化功能,可将 TGF-β1 超家族的信号直接从细胞膜转入细胞核,与纤维化基因表达相偶连。

组方中重用黄芪为君药,味甘微温,入脾肺经,补中益气。麦冬、当归为臣,益阴养血而柔肝,配合黄芪以补肝体。半夏辛温性燥,尤善燥湿化痰,川芎活血行气。佐以山药补益脾阴、滋肾固阴,赤芍活血化痰通血脉,加入具有清热润燥作用的桑白皮、桑叶以防气盛化阳而伤阴。诸药合用共奏益气活血化痰之功效。

经 6 个月的 56°酒精灌胃,模型组 SD 大鼠形成了比较典型的酒精性肝纤维化;而在益气活血化痰法中药的干预下,各中药组的肝纤维化得到了一定程度的抑制,这种抑制作用与秋水仙碱具有可比性,而且这种治疗作用在实验范围内与中药剂量成

正相关;进一步分析发现,益气活血化痰法对 TGF-β1、Smad3、Smad4 均有下调作用,而对 Smad7 表达有上调作用,而且在实验范围内这种调整作用与中药剂量呈显著相关性。提示益气活血化痰法能通过调整 TGF-β1/Smads 信号通路而发挥抗肝纤维化作用。

参考文献

[1]Blobe G,Schiemann W,Lodish HF·Role of transforming growth factor beta in human disease[J]·N England J Med,2000,342(18):1350-1358.

[2]Galvez-Gastelum FJ, Sandoval-Rodriguez AS, Armen-dariz-Borunda J· Transforming growth factor-beta as a therapeutic target [J]· Salud Publica Mex, 2004, 46(4): 341-350.

[3]欧阳宏,厉有名,秦月花,等·慢性酒精性肝病大鼠肝脏白细胞介素 10 的表达及茶多酚的影响 [J]·中华肝脏杂志,2005,13(7):551-552.

[4]任成林,田勇,梁淑珍·动物组织 HE 染色石蜡切片技术的改进[J]·河北北方学院学报(自然科学版),2007,23(2):41-45.

[5]病毒性肝炎防治方案(试行) [J]·中华内科杂志,1995,34(11):788-791.

[6]Bataller R, Brenner DA· Liver fibrosis [J]· J Clin Invest, 2005, 115(2):209-218.

[7]Miyazono K·TGF-beta/SMAD signaling and its involvement in tumor progression [J]· Biol Pharm Bull, 2000, 23(10):1125-1130.

[8]Roulot D, Sevcsik AM, Coste T, et al· Role of transforming growth factor beta type 2 receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats [J]· Hepatology, 1999, 29(6):1730-1738.

[9]Takiya S, Tagaya T, Takahashi K, et al· Role of transformation growth factor beta 1 on hepatic regeneration and apoptosis in liver diseases [J]· J Clin Pathol, 1995, 48(12):1093-1097.