

## 中药软肝饮对CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化大鼠模型Smad3表达的影响

张国梁<sup>1</sup>, 林红<sup>2</sup>, 戴敏<sup>3</sup>, 陈益水<sup>1</sup> (1. 安徽中医学院第一附属医院 感染科, 合肥 230031; 2. 安徽中医学院中医2005级硕士研究生 内科, 合肥 230038; 3. 安徽中医学院药学院, 合肥 230038)

**摘要:** 目的 研究中药软肝饮对CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化模型Smad3表达的影响, 探讨其抗纤维化的作用机制。方法 40只Wistar大鼠, 随机分成正常对照组、模型组、软肝饮组和复方鳖甲软肝片组, 采用CCl<sub>4</sub>背部皮下注射构建肝纤维化模型, 进行HE和Van-Gieson染色, 光镜下观察肝组织纤维化程度。同时以免疫组化SABC法检测各组Smad3的表达。结果 与正常对照组相比, 模型组Smad3表达明显增强, 软肝饮组大鼠肝脏Smad3的表达显著下调 ( $0.279 \pm 0.085$  vs  $0.885 \pm 0.904$ ,  $P < 0.05$ )。另外, 软肝饮组大鼠肝脏纤维化病理变化显著改善。结论 软肝饮对CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化模型肝脏Smad3表达有明显的下调作用, 可能是其抗肝纤维化主要作用机制之一。

**关键词:** 软肝饮; Smad3; 肝纤维化

### Effects of traditional Chinese medicine Ruan Gan Yin on Smad3 expression in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis of rats

ZHANG Guo-liang<sup>1</sup>, LIN Hong<sup>2</sup>, DAI Min<sup>3</sup>, CHEN Yi-shui<sup>1</sup> (1. Department of Infectious Diseases, the First Hospital Affiliated to Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. Department of Internal Medicine, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 3. College of Pharmacy of Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

**Abstract : Objective** To study the effect of Ruan Gan Yin on Smad3 expression of the experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in rats, and to explore its anti-fibrotic molecular mechanism. **Methods** Forty healthy Wistar rats were randomly divided into normal control group, vacant control group, CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis group, and Ruan Gan Yin treatment group. Rats in normal group were treated with normal saline by intragastrical irrigation, and the other groups were subcutaneously injected with CCl<sub>4</sub> to establish hepatic fibrosis model. The histological changes of liver tissues were examined by pathological examination and protein expression of Smad3 was measured by immunohistochemical technique. **Results** Compared with normal control group, level of Smad3 in model group was elevated notably, but significantly decreased after treatment ( $0.279 \pm 0.085$  vs  $0.885 \pm 0.904$ ,  $P < 0.05$ ). The pathological changes of fibrosis liver tissues in Ruan Gan Yin group were also obviously alleviated. **Conclusions** Ruan Gan Yin has significant inhibitory effects on CCl<sub>4</sub> induced hepatic fibrosis in rats and the mechanism may be associated with the inhibition of Smad3 expression.

**Key words:** Ruan Gan Yin; Smad3; Hepatic fibrosis

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是多种原因引起的慢性肝损伤的共同病理改变, 其特征是纤维增生和降解不平衡, 纤维组织在肝脏过度沉积的结果<sup>[1]</sup>。TGF-β是促进肝纤维化发展的最重要的细胞因子之一, 它可与肝星状细胞表面的受体结

合, 通过激活Smad通路, 从而促进胶原等细胞外基质的合成和分泌<sup>[2]</sup>。中药软肝饮在既往的研究中, 有显著抗肝纤维化作用<sup>[3, 4]</sup>, 为了进一步研究其作用机制, 笔者观察了其对于CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化大鼠模型Smad3表达的影响, 现将有关研究报告如下。

通讯作者: 张国梁 Email: zhangguoliang61@sina.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 同一品系清洁级健康Wistar大鼠40只, 雄性, 质量(130~150 g), 普通饲料喂养, 均由安徽中医学院实验动物中心提供。

1.1.2 药品和主要试剂 ①软肝饮(组成: 鳖甲50 g、黄芪50 g、柴胡25 g、丹参50 g、川芎34 g和莪术34 g)由本院药剂科提供, 临用前用双蒸水稀释成不同浓度备用; ②CCl<sub>4</sub>购自南京建成生物有限公司; ③复方鳖甲软肝片由内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司生产(批号: 20061106), 研制成粉末, 双蒸水溶解成100 g/ml混悬液; ④Smad3免疫组织化学试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司; ⑤花生油购自超市。

### 1.2 方法

1.2.1 分组 将40只Wistar大鼠随机分成4组, 正常对照组10只, CCl<sub>4</sub>肝纤维化模型组10只, 软肝饮治疗组10只, 阳性药物(复方鳖甲软肝片)对照组10只。

1.2.2 动物模型制备 将CCl<sub>4</sub>与高压灭菌花生油按1:9比例配成10%油剂, 第1~4周, 除正常组外, 其他各组大鼠背部皮下注射10% CCl<sub>4</sub>花生油溶液(0.5 ml/100 g体重), 2次/周, 共注射5~13周, 正常组和CCl<sub>4</sub>肝纤维化模型组给予生理盐水; 软肝饮组每天给予软肝饮灌胃1次, 剂量为2.0 g/kg大鼠体重; 阳性药物对照组每天给与复方鳖甲软肝片(0.6 g/kg)灌胃1次。各组动物每周称重一次, 根据体重变化调整给药量。第13周末, 末次给药24小时后, 全部大鼠股动脉放血处死, 留取血液及全部肝脏, 每只大鼠取相同部位肝脏, 用10%中性甲醛固定, 剩余放置-80℃低温冰箱保存; 血液1500转/分钟离心后取血清置于-80℃低温冰箱保存。

1.2.3 肝脏纤维化与免疫组织化学半定量判断指标 ①肝脏纤维化判定标准: 动物处死后立即解剖, 取相同部位1 cm × 1 cm × 0.5 cm大小肝叶浸于10%中性甲醛缓冲液中固定24小时以上, 常规石蜡包埋切片行HE及Van-Gieson染色。光镜下观察肝脏病理变化, 纤维化程度判定方法按照王宝恩等方法进行<sup>[5]</sup>; ②免疫组织化学链酶亲和素-生物素-

酶复合物(Strept Avidin Biotin Complex, SABC)法检测: 切片常规脱蜡至水, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中放置10分钟后蒸馏水冲洗。用微波进行抗原修复后, 室温冷却。PBS洗5分钟×2次, 滴加5% BSA封闭液, 室温20分钟后甩去, 滴加兔源Smad3多克隆抗体(工作浓度1:20)4℃过夜。次日用PBS冲洗, 滴加生物素化山羊抗兔IgG 37℃孵育20分钟, PBS洗涤后滴加SABC 37℃孵育20分钟, PBS洗5分钟×4次, DAB显色后Smad3阳性表达处为棕黄色。同时, 以PBS替代一抗作空白对照。每张切片随机选取5个40倍视野, 计算各组显微镜下每40倍视野的阳性细胞百分率。结果判定: 采用Bresalier半定量公式稍加修改判断染色结果, 切片在10倍物镜视野下观察, 随机计数5个视野中各染色强度细胞数的百分比, 根据细胞染色强度分为四级并分别计分: 阴性, 细胞无着色(0分); 弱阳性, 细胞着色为浅黄色(1分); 中度阳性, 细胞着色为棕黄色(2分); 强阳性, 细胞着色为棕褐色(3分)。计算每种强度的视野数, 根据下列公式计算每张切片的平均染色强度: IS(intensity score) =  $\sum \{ (0 \times F_0) + (1 \times F_1) + (2 \times F_2) + (3 \times F_3) \}$ ,  $F_i = 10 \times \text{视野数} \% (i = 0, 1, 2, 3)$ <sup>[6]</sup>。

1.2.4 统计学处理 用SPSS 11.0软件包统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐用单因素方差分析(LSD法), 方差不齐用秩和检验, 多样本两两比较用Nemenyi法进行统计分析, 双侧 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准。

## 2 结果

2.1 病理组织学改变情况 正常组肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状排列, 结构正常; 模型组肝组织病理损害严重, 正常结构被破坏, 肝索排列紊乱, 肝细胞明显肿胀变性, 其中多为脂肪变性, 肝小叶中央区明显坏死; 间质内有炎性细胞浸润, 胶原增生显著, 增生结缔组织分割肝小叶, 接近形成假小叶。软肝饮治疗组与模型组相比, 肝组织结构破坏不明显, 肝细胞脂肪变性程度显著减轻, 可见少量炎性细胞浸润, 肝细胞坏死减轻, 少见纤维结缔组织增生(图1A和B)。

2.2 Smad3免疫组织化学结果 正常组肝组织可

见少量Smad3弱阳性表达,主要分布于血管壁;模型组Smad3强阳性表达,细胞数明显增多,主要分布于胶原沉积丰富的纤维化汇管区及纤维间隔中的梭型细胞间质和部分肝实质细胞胞质;软肝饮组与鳖甲软肝片组肝组织中仅见梭型细胞间质的Smad3呈中度阳性表达(图2A),其中模型组阳性表达细胞的平均染色强度积分明显高于软肝饮组与复方鳖甲软肝片组(图2B), $P$ 均 $<0.05$ ;各治疗组Smad3阳性表达细胞平均染色强度积分比较, $P>0.05$ ,二者无显著性差异(表1)。

表1 大鼠肝组织Smad3的表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	数量	Smad3染色强度
正常组	8	$0.248 \pm 0.042^a$
模型组	9	$0.885 \pm 0.904$
鳖甲组	8	$0.815 \pm 0.677^a$
软肝组	7	$0.279 \pm 0.085^a$

注:<sup>a</sup>与模型组比较 $P<0.05$

3 讨论

目前认为转化生长因子 $\beta_1$ (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )是影响HSC活化、促进胶原等细胞外基质合成并加剧纤维化形成的主要生物因子<sup>[7,8]</sup>,活化后的TGF- $\beta_1$ 结合特异性受体后进入信号转导途径,发挥其生物学作用<sup>[9,10]</sup>。迄今为止,Smad蛋白是TGF- $\beta_1$ 受体胞内激酶的唯一底物<sup>[11]</sup>,它既是胞内信号分子,又有转录激活作用,Smad蛋白家族是TGF- $\beta$ 受体后信息分子,参与调控细胞的增生、转化、合成、分泌和凋亡<sup>[12]</sup>。TGF- $\beta_1$ 信号转导通过Smad3介导<sup>[13]</sup>。研究表明,Smad3是HSC活化的重要媒介<sup>[14]</sup>,减少Smad3的激活被认为是调节下游I型胶原表达的关键步骤,TGF- $\beta_1$ 型受体(TGF $\beta$  receptor I,T $\beta$ R I)激活后,Smad3通过与T $\beta$ R I短暂结合而直接发生磷酸化,激活的Smad3和被T $\beta$ R I间接激活的Smad4聚集成共同复合物或形成数个异源二聚体。随后,Smad复合物进入细胞

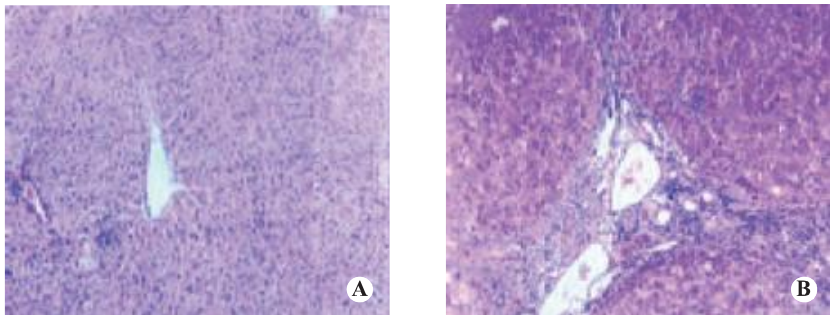


图1 治疗组与模型组肝脏病理学结果(HE染色,100 $\times$ )

A: 软肝饮治疗组; B: 大鼠CCl<sub>4</sub>所致肝损伤

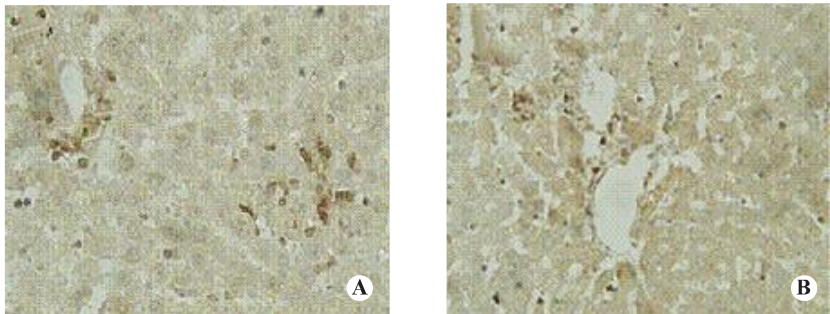


图2 治疗组与模型组肝脏免疫组织化学染色(SP染色,200 $\times$ )

A: CCl<sub>4</sub>所致肝损伤; B: 软肝饮治疗组

核内,与特异的DNA连结蛋白结合,使靶基因转录,产生细胞生物学效应<sup>[15-17]</sup>。因此,下调Smad3的活性可降低胶原在肝脏中过度合成而发挥抗肝纤维化作用。

笔者经过多年研究,认为气虚血瘀为肝纤维化之本,治疗以活血益气、软坚散结为要,在此基础上形成了由黄芪、丹参、莪术、鳖甲和柴胡等多味中药组成的、具有活血化瘀和益气散结功效的中药软肝饮。经过多年临床与实验研究表明软肝饮具有较好的抗肝纤维化作用。丹参是活血祛瘀的良药,主要成份是丹参酮,CCl<sub>4</sub>肝纤维化大鼠模型研究显示,肝内微循环障碍得以改善,同时肝内病理性增生的纤维明显减少,而丹参具有抑制肝内纤维增生的作用。丹参可抑制体外培养的成纤维细胞生长,可使肝细胞肿胀消退,肝窦显露,能提高纤溶活性,并可以激活胶原酶,促进胶原蛋白降解,改善肝脏血流,有利于肝损伤的修复,抑制肝内纤维增生,提示丹参是通过多种途径对抗肝纤维化<sup>[18]</sup>。刘成海等<sup>[19]</sup>发现丹酚酸B盐能明显抑制HSC增殖、抑制TGF- $\beta_1$ 刺激的I型胶原基因表达,继而可抑制HSC内Smad2和Smad3蛋白表达及Smad2的磷酸化,从而干预TGF- $\beta_1$ 细胞内信号转导,发挥抗肝纤维化作用;黄芪为临床常用补气药,可以增加肝糖原和血清白蛋白,有抗肝损伤的作用,可调整机体免疫,抑制全身免疫损伤,诱发干扰素产生,提高机体抗病毒能力,对阻断肝纤维化进程有确切作用<sup>[20]</sup>;鳖甲既为软坚散结之要药,又能滋阴清热,在肝纤维化的治疗中可以起到一物二用的效果;柴胡有疏肝解郁的功效,其主要成分柴胡皂苷对肝细胞具有保护作用,可使肝细胞内DNA含量上升,胶原蛋白总量及I、III和IV型胶原和纤维连接素含量及其合成受到抑制,从而抑制了肝细胞对肝细胞外基质的合成<sup>[21]</sup>;莪术有行气破瘀和消积止痛之功,具有抗大鼠免疫性和化学性肝纤维化作用<sup>[22,23]</sup>,江远等<sup>[24]</sup>通过实验发现以莪术醇(1.563 mg/L)作用HSC- $\beta_1$ 细胞12小时,可使基因TGF- $\beta_1$ 表达下调2~3倍,揭示了莪术醇可通过抑制TGF- $\beta_1$ 的表达,抑制ECM生成,发挥其抗肝纤维化作用。

本研究结果显示,软肝饮治疗组肝纤维化程度较模型组明显减轻,同时肝细胞中Smad3的表达也明显低于模型组,而与阴性对照组比较无显著差异,提示软肝饮抗肝纤维化的作用与其能显著下调胞内关键信号分子Smad3的表达,从而降低肝脏中胶原的合成有着十分重要的关系。

#### 参考文献

- [1] Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside [J]. *J Hepatol*,2003,38 Suppl 1:S38-53.
- [2] 张立煌,刘翠雪,姚航平,等. 转化生长因子- $\beta_1$ 及其受体的表达与小鼠肝纤维化关系的研究[J]. *浙江大学学报(医学版)*,2000,29:97-100.
- [3] 张梁,戴敏,许钊,等. 软肝饮对免疫性肝纤维化大鼠胶原代谢水平的影响[J]. *安徽医学院学报*,2005,24:17-19.
- [4] 张梁,戴敏,许钊,等. 软肝饮对免疫性肝纤维化大鼠细胞因子及肝细胞超微结构的影响[J]. *中医杂志*,2006,47:219-221.
- [5] 王宝恩,王志富. 实验性肝纤维化模型的研究[J]. *中华医学杂志*,1989,69:503-505.
- [6] Bresalier RS, Ho SB, Schoepner HL, et al. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis [J]. *Gastroenterology*,1996,110:1354-1367.
- [7] Kondou H, Mushiaki S, Etani Y, et al. A blocking peptide for transforming growth factor-beta1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo [J]. *J Hepatol*,2003,39:742-748.
- [8] Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, et al. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis [J]. *Front Biosci*,2002,7:d793-807.
- [9] Dooley S, Delvoux B, Lahme B, et al. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts [J]. *Hepatology*,2000,31:1094-1106.
- [10] Hernandez-Canaveral I, Gonzalez J, Lopez-Casillas F, et al. Amplified expression of dominant-negative transforming growth factor-beta type II receptor inhibits collagen type I production via reduced Smad-3 activity [J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2004,19:380-387.
- [11] Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system [J]. *EMBO J*,2000,19:1745-1754.
- [12] Ungefroren H, Lenschow W, Chen WB, et al. Regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta requires MKK6-p38 mitogen-activated protein Kinase signaling downstream of Smad signaling [J]. *J Biol Chem*,2003,278:11041-11049.
- [13] Mori S, Matsuzaki K, Yoshida K, et al. TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions [J]. *Oncogene*,2004,23:7416-7429.
- [14] Dooley S, Delvoux B, Lahme B, et al. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts [J]. *Hepatology*, 2000,31:1094-1106.
- [15] Roberts AB, Russo A, Felici A, et al. Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta [J]. *Ann NY*



- Acad Sci,2003,995:1-10.
- [16] Schnabl B, Kwcon YO, Frederick JP, et al. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation [J]. Hepatology,2001,34:89-100.
- [17] Lee DK, Park SH, Yi Y, et al. The hepatitis B virus encoded oncoprotein pX amplifies TGF-beta family signaling through direct interaction with Smad4: potential mechanism of hepatitis B virus-induced liver fibrosis [J]. Genes Dev,2001,15:455-466.
- [18] 李晶, 张剑宇, 丹参、黄芪、苦参对CCl4肝纤维化模型大鼠的影响及其交互作用的研究[J]. 山西中医,2005,21:38-41.
- [19] 刘成海, 刘平, 胡义扬, 等. 丹酚酸B对转化生长因子 $\beta$ 1刺激肝星状细胞活化与胞内信号转导的影响[J]. 中华医学杂志,2002,82:1267-1272.
- [20] 陈云焱, 袁利超, 党双锁. 黄芪多糖治疗慢性病毒性乙型肝炎[J]. 世界最新医学信息文摘,2004,3:1130-1131,1149.
- [21] 王胜春, 王玲. 柴胡及五灵丸对慢性肝损伤小鼠的影响[J]. 第四军医大学学报,2002,23:133-136.
- [22] 袁柱婷, 单长民, 姜学连, 等. 三棱、莪术抗大鼠免疫性肝纤维化研究[J]. 中国中药杂志,2002,27:929-932.
- [23] 杨玲, 钱伟, 侯晓华, 等. 莪术提取物对肝纤维化大鼠血管紧张素II及其I型受体的影响[J]. 中华肝脏病杂志,2006,14:303-305.
- [24] 江远, 李泽松, 江福生, 等. 莪术醇对肝星状细胞-T6细胞基因表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2005,13:144-147.

收稿日期: 2007-11-07

## • 消息 •

### 中华实验和临床感染病杂志(电子版)征稿启事

中华实验和临床感染病杂志(电子版)为中华医学会主办的感染病学专业学术电子期刊,是一本在载体形式上与纸媒体相互补充的多媒体光盘期刊(CD-ROM)。本刊以电子期刊特有的表现形式,运用影视语言和多媒体技术登载有关感染病的专业论著、专家讲坛、临床病理讨论及学术会议等,图文声像并茂,是广大感染病工作者了解当前学科前沿、掌握最新技术的有效工具。本刊内容主要包括各种感染病的病原学、流行病学、免疫学、临床诊断及预防的实践经验和研究成果,以及本领域新技术、新方法的重要进展。本刊常设的主要栏目有述评、专家讲座、基础研究、临床研究、继续教育园地、经验交流、病例报告、疑难病例分析、综述、临床病例荟萃、设备技术介绍、国内外学术动态等。

本刊特色栏目:

- (1) 继续教育园地(视频);
- (2) 临床病例荟萃(病例分析、典型图像分析、专家点评)。

本刊的办刊宗旨是:

贯彻党和国家的卫生工作方针政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的办刊方针,反映我国感染病临床和科研工作的重大进展,促进国内外感染病学学术交流。

目前,杂志的网络版已经开通,网址为<http://www.j-ditan.org.cn/>,欢迎您点击。您只需简单登陆,即可免费下载期刊的PDF版文章和视频讲座。

联系方式:

中华实验和临床感染病杂志(电子版)为季刊,16开,64页,逢季中月20日出版。定价每期28元,全年112元,编辑部常年办理邮购,邮发代号:80-729,欢迎订阅。

通讯地址:北京市朝阳区京顺东路8号 《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》编辑部

邮政编码:100015

电话:010-8432 2058

传真:010-8432 2059

Email: editor.ditan@gmail.com