

一贯煎促进骨髓间充质干细胞逆转肝纤维化的实验研究

刘文兰 油红捷 车念聪 白辰 唐佐青

【摘要】 目的 该研究观察骨髓间充质干细胞对肝纤维化的逆转作用,了解一贯煎对该过程的作用,阐释一贯煎逆转肝纤维化的机制。**方法** 60 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为 5 组,即正常对照组、模型组、阳性对照组、骨髓间充质干细胞组、一贯煎加骨髓间充质干细胞组,每组 12 只。除正常对照组外,均建立肝纤维化恢复模型,分离、培养和标记骨髓间充质干细胞,在 CCl₄ 停止注射后 3 天,骨髓间充质干细胞组每只动物经尾静脉注射 5×10^6 mmol/L 浓度 1 mol 骨髓间充质干细胞;一贯煎加骨髓间充质干细胞组每只大鼠尾静脉注射等量的骨髓间充质干细胞外,给予一贯煎浓缩液 2 ml/200 g 灌胃,每天 1 次。阳性对照组给予秋水仙碱灌胃,0.25 mg/kg,每天 1 次。正常对照组和模型组按相同方法灌服等量生理盐水。阳性对照组、正常对照组和模型组经尾静脉注射等量生理盐水。4 周后,检测各组大鼠血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶等肝功能指标;通过 HE 染色评价肝脏炎症活动度(G)和纤维化程度(S);荧光显微镜下示踪肝组织中骨髓间充质干细胞。**结果** (1)骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组较模型组和阳性组在改善肝功能、减轻炎症、逆转肝纤维化的作用较好, $P < 0.05$ 。一贯煎加骨髓间充质干细胞组较骨髓间充质干细胞组在改善肝功能、逆转纤维化的作用更明显, $P < 0.05$ 。(2)骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组骨髓间充质干细胞在肝脏分布面积较模型组增大, $P < 0.05$;一贯煎加骨髓间充质干细胞组较其他组差异显著, $P < 0.05$ 。**结论** 骨髓间充质干细胞具有逆转肝纤维化的作用,一贯煎对该过程具有促进作用;一贯煎能够促进骨髓间充质干细胞募集到肝脏,从而发挥逆转肝纤维化的作用。

【关键词】 肝纤维化; 骨髓间充质干细胞; 肝损伤; 一贯煎; 肝肾阴虚

【中图分类号】 R256.4 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.06.001

The promotion of Yiguanjian on the recovery of liver fibrosis through mesenchymal stem cells: an experimental study LIU Wen-lan, YOU Hong-jie, CHE Nian-cong, et al. College of Traditional Chinese

Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: LIU Wen-lan, wenlanliu1900@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells on liver fibrosis reversal, understand the role of Yiguanjian on this process, and interpret the mechanism of Yiguanjian on the recovery of liver fibrosis. **Methods** we established liver fibrosis rat model. 60 male SD rats were divided into 5 groups: Normal group, model group, western medicine group, mesenchymal stem cells group and Yiguanjian combined with bone marrow mesenchymal stem cells group, There were 12 rats in each group. Except the normal group, hepatic fibrosis model was established. Isolation, culture and labeled bone marrow mesenchymal stem cells. On the third day after CCl₄ injection, each rat in mesenchymal stem cells group was given intravenous injection of 5×10^6 mmol/L 1 mol bone marrow mesenchymal stem cells. Except equal amounts of bone marrow mesenchymal stem cells, each rat in Yiguanjian combined with bone marrow mesenchymal stem cells group was given Yiguanjian(2 ml/200 g d)by intragastric administration. Western medicine group was given colchicine (0.25 mg/kg d) by intragastric administra-

基金项目:国家自然科学基金(81273668)

作者单位:100069 北京,首都医科大学中医药学院[刘文兰、车念聪、白辰(硕士研究生)],基础医学院(油红捷、唐佐青)

作者简介:刘文兰(1968-),女,博士,副教授,硕士生导师。研究方向:中医证候病理基础。E-mail: wenlanliu1900@126.com

tion. The normal group and model group were fed with same volume of saline daily. Western medicine group, normal group and model group was given intravenous injection of same volume of saline daily. After 4 weeks, the serum ALT and AST were tested, the HE staining were used to evaluate the degree of liver inflammation and fibrosis (G) (S), Bone marrow mesenchymal stem cells in liver tissue were observed under fluorescence microscop. **Results** Compared with the model group and western medicine group, mesenchymal stem cells group and Yiguanjian combined with bone marrow mesenchymal stem cells group had better effect in the improvement of liver function, reduce inflammation, reversing hepatic fibrosis, $P < 0.05$. Compared with the mesenchymal stem cells group, Yiguanjian combined with bone marrow mesenchymal stem cells group had better effect on improving the liver function, reversing hepatic fibrosis, $P < 0.05$. Compared with the model group, the area of bone marrow mesenchymal stem cells in liver was greater in mesenchymal stem cells group and Yiguanjian combined with bone marrow mesenchymal stem cells group, $P < 0.05$. Compared with the other groups, the area of bone marrow mesenchymal stem cells in liver was greater in Yiguanjian combined with bone marrow mesenchymal stem cells group, $P < 0.05$. **Conclusion** Bone marrow mesenchymal stem cells can reverse liver fibrosis, Yiguanjian can promote this process, Yiguanjian can promote bone marrow mesenchymal stem cell recruitment to the liver, thus play an effect of recovery of liver fibrosis.

【Keywords】 Liver fibrosis; Bone marrow mesenchymal stem cells; Hepatic injury; Yiguanjian; Yin deficiency of liver and kidney

进展期的肝纤维化在损伤因素去除或应用抗肝纤维化药物后,是可以部分或完全的逆转恢复。促进肝纤维化的逆转是阻断肝炎转变为肝硬化的关键环节。文献研究证实,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)能够明显减轻肝纤维化^[1-3],需要进一步证实的是:骨髓间充质干细胞是否能够逆转肝纤维化,滋补肝肾中药一贯煎对此过程是否有促进作用,本实验建立肝纤维化恢复模型,观察骨髓间充质干细胞对肝纤维化的逆转作用,探讨一贯煎对该过程是否有促进作用。

1 材料

1.1 实验动物

Sprague-Dawley 大鼠,雄性,体重 250 ~ 350 g, 2013 年 4 月 19 日购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001,共 60 只,饲养在首都医科大学实验动物科学部 SPF 级动物室。实验大鼠随机分为 5 组,即正常对照组、模型组、阳性对照组、骨髓间充质干细胞组、一贯煎加骨髓间充质干细胞组,每组 12 只。

1.2 药物及试剂

根据一贯煎原方药物剂量和比例,选取北京同仁堂药店的标准中药北沙参 9 g、麦冬 9 g、当归 9 g、生地黄 20 g、枸杞子 12 g、川楝子 4.5 g,将饮片置煎煮容器内,加相当于药材量 5 ~ 7 倍的冷水浸泡 1 ~ 2 小时,煮沸 30 分钟,过滤。药渣加 3 ~ 5 倍量水继续煎煮,煮沸 20 分钟,过滤。合并 2 次滤液,按照体

表面积计算,大鼠每 100 g 体质量所需生药为 0.65 g,将一贯煎浓缩液按照 100 g 大鼠灌胃 1 ml 的体积配成相应浓度,冷却装入灭菌药瓶,高温灭菌后,对 pH 值、比重、卫生学进行检测,置 4℃ 冰箱备用。

秋水仙碱,西双版纳版纳药业有限责任公司生产,批号 120412。根据成人(60 kg)的日用量为 1 mg,大鼠剂量为成人用量的 30 倍(即 0.25 mg/kg)。橄榄油:阿果萨特级初榨橄榄油,原产国:西班牙(原装进口),最大酸度 0.4%,批号:14001952。四氯化碳:四氯化碳分析纯专用试剂,纯度 ≥ 99.5%,北京现代东方精细化学品有限公司,批号:20060132。生理盐水:石家庄四药有限公司,批号:20729509。

1.3 仪器

组织包埋机(LEICA EG1140H,德国),石蜡切片机(LEICARM2135,德国)。正置荧光显微镜(Leica DM4000B,德国),冰冻切片机(LEICA CM3050s,德国),图像分析系统(Leica Qwin,德国)。

2 方法

2.1 制备 CCl₄ 诱导的肝纤维化恢复大鼠模型

适应性饲养 1 周后,制备 CCl₄ 诱导的肝纤维化恢复大鼠模型:大鼠腹腔注射 50% CCl₄ 橄榄油溶液(0.2 ml/100 g),每周 2 次,共 2 周;随后腹腔注射 0.1 ml/100 g 的 CCl₄ 橄榄油溶液,每周 2 次,共 2 周;接着腹腔注射 0.05 ml/100 g 的 CCl₄ 橄榄油溶液,每周 2 次,共 2 周;停止注射 CCl₄,自发逆转 8 周。

2.2 药物治疗及各组动物处理

模型组、阳性对照组、骨髓间充质干细胞组、一贯煎加骨髓间充质干细胞组每只动物均参照 CCl_4 诱导的肝纤维化恢复大鼠模型的建模方法进行造模,同时,正常对照组则以同样方法注射等量橄榄油。在 CCl_4 停止注射后 3 天,骨髓间充质干细胞组每只动物经尾静脉注射 5×10^6 mmol/L 浓度 1 mol 骨髓间充质干细胞;一贯煎加骨髓间充质干细胞组每只大鼠尾静脉注射等量的骨髓间充质干细胞外,给予一贯煎浓缩液 2 ml/200 g 灌胃,每天 1 次,连续 4 周。阳性对照组给予秋水仙碱灌胃,0.25 mg/kg,每天 1 次,连续 4 周。正常对照组和模型组按相同方法灌服等量生理盐水。阳性对照组、正常对照组和模型组经尾静脉注射等量生理盐水。灌胃结束后,各组实验大鼠的数量为:正常对照组 12 只、模型组 9 只、阳性对照组 9 只、骨髓间充质干细胞组 10 只、一贯煎加骨髓间充质干细胞组 10 只。

2.3 骨髓间充质干细胞的分离、培养和标记

取雄性 SPF 级 SD 大鼠 120 g 左右,脱颈处死后,无菌条件下分离下肢长骨,使用完全培养基反复冲洗骨髓腔,过滤,于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养,当细胞浓度达到 70% ~ 80% 时进行传代,取第 4 代骨髓间充质干细胞用 DAPI 进行荧光标记,温箱内孵育过夜。取出细胞,经胰酶消化后,调整细胞浓度为 5×10^6 mmol/L。

2.4 取材

在治疗 4 周末处死所有大鼠,收集血清进行肝功能检测,取肝左叶同一部位,10% 福尔马林固定,石蜡包埋,HE 染色。将右叶浸泡在多聚甲醛的 PBS (4%) 溶液中,进行冰冻切片后,立即于 430 nm 波长的正置荧光显微镜(Leica DM4000B)观察。

2.5 指标检测

2.5.1 血清谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)检测 使用 SXOUT II 半自动生化分析仪测定谷丙转氨酶、谷草转氨酶等肝功能指标。

2.5.2 肝组织病理检查 对石蜡包埋的组织切片进行 HE 染色,由同一位病理专家依据 2000 年第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议制定的慢性肝炎分级分期标准,对大鼠的肝脏炎症活动度(G)和纤维化程度(S)进行病理分级和分期诊断。

2.5.3 荧光显微镜下示踪肝组织中骨髓间充质干细胞 肝组织冰块置恒冷箱切片机冰冻切片,切片

厚度 4 μm 。在荧光显微镜下示踪 MSCs 细胞。使用 Leica DM4000B 正置荧光显微镜,观察肝组织冰冻切片上 MSCs 细胞,经 Leica QWin 图像分析系统处理,测量 20 倍物镜下 MSCs 细胞的分布面积。

2.6 统计学方法

计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 13.0 统计软件,各组资料经正态性检验($P > 0.05$),符合正态分布;方差齐性检验($P > 0.05$),具有方差齐性;满足方差分析的条件。两组间的均数比较采用单因素方差分析 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肝功能、肝脏病理组织炎症分级、纤维分期检测结果

各组数据采用单因素方差分析,并作组间两两比较。(1)ALT 结果比较:与模型组比较,骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组均显著性降低, $P < 0.05$;与阳性对照组比较,骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组均显著性降低, $P < 0.05$ 。与骨髓间充质干细胞组比较,一贯煎加骨髓间充质干细胞组显著性降低, $P < 0.05$ 。(2)AST 结果比较:与模型组比较,骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组均显著性降低, $P < 0.05$;与阳性对照组比较,骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组均显著性降低, $P < 0.05$;与骨髓间充质干细胞组比较,一贯煎加骨髓间充质干细胞组显著性降低, $P < 0.05$ 。(3)炎症分级结果比较:与模型组比较,骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组均显著性降低, $P < 0.05$;与阳性对照组比较,骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组均显著性降低, $P < 0.05$ 。(4)纤维化分期结果比较:与模型组比较,骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组均显著性降低, $P < 0.05$;与阳性对照组比较,骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组均显著性降低, $P < 0.05$;与骨髓间充质干细胞组比较,一贯煎加骨髓间充质干细胞组显著性降低, $P < 0.05$ 。骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组较模型组和阳性组在改善肝功能、减轻炎症、逆转肝纤维化的作用较好, $P < 0.05$ 。一贯煎加骨髓间充质干细胞组较骨髓间充质干细胞组在改善肝功能、逆转纤维化的作用更明显, $P < 0.05$ 。见表 1、图 1。

表 1 各组肝功能、炎症分级和纤维化分期的比较

分组	ALT	AST	炎症分级	纤维化分期
正常组 (n = 12)	50.64 ± 7.90	87.60 ± 8.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组 (n = 9)	69.22 ± 10.20	223.73 ± 20.79	3.33 ± 0.57	3.33 ± 0.57
阳性对照组 (n = 9)	61.57 ± 3.61	160.19 ± 10.38	3.33 ± 0.57	3.00 ± 0.00
骨髓间充质干细胞组 (n = 10)	52.63 ± 8.67 ^a	130.00 ± 13.77 ^a	2.33 ± 0.57 ^a	2.00 ± 0.00 ^a
一贯煎加骨髓间充质干细胞组 (n = 10)	43.60 ± 9.98 ^{ab}	82.91 ± 12.38 ^{ab}	1.66 ± 0.57 ^a	1.33 ± 0.57 ^{ab}

注：与模型组、阳性对照组相比，^a*P* < 0.05；与骨髓间充质干细胞组相比，^b*P* < 0.05

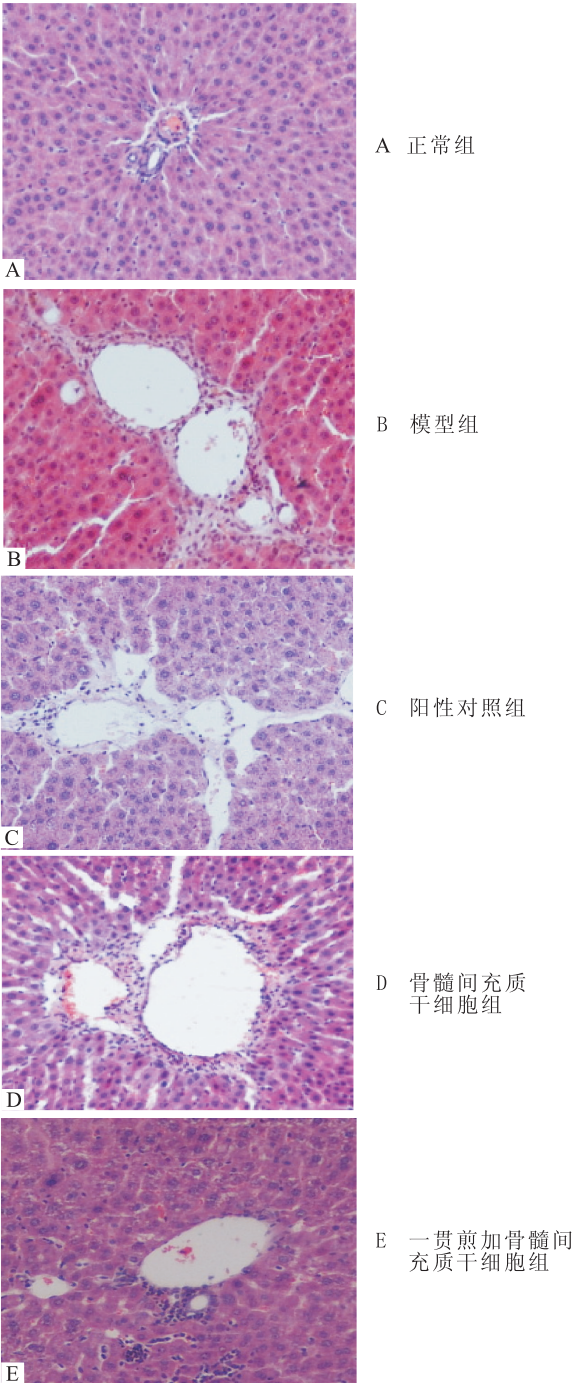


图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色比较 (×100)

3.2 肝组织中骨髓间充质干细胞的分布比较

各组数据采用单因素方差分析,并作组间两两比较。分布面积结果比较:与模型组比较,骨髓间充质干细胞组和一贯煎加骨髓间充质干细胞组均显著性增大,*P* < 0.05;与一贯煎加骨髓间充质干细胞组比较,正常组、模型组、阳性对照组和骨髓间充质干细胞组均显著性减小,*P* < 0.05。见表 2、图 2。

表 2 各组骨髓间充质干细胞在肝脏的分布面积比较

分组	分布面积(平方微米)
正常组 (n = 12)	0.00 ± 0.00 ^b
模型组 (n = 9)	174.33 ± 49.07 ^b
阳性对照组 (n = 9)	381.70 ± 208.80 ^b
骨髓间充质干细胞组 (n = 10)	764.02 ± 285.99 ^{ab}
一贯煎加骨髓间充质干细胞组 (n = 10)	1940.51 ± 747.99 ^a

注:与模型组相比,^a*P* < 0.05;与一贯煎加骨髓间充质干细胞组相比,^b*P* < 0.05

4 讨论

中医学并无“肝纤维化”一词,根据其临床表现属“痞积”、“臌胀”、“胁痛”、“肝积”等病证范畴。肝阴不足,湿热之邪乘虚入侵,留而不去,导致血行不利,脉络瘀阻,引起肝脏实质逐渐损坏等肝纤维化表现,正虚邪盛,湿、热、瘀、痰、毒等诸邪互结于肝,形成肝硬化、肝癌^[4]。由此可见,正虚是肝纤维化发生发展的重要病机。正如《灵枢·百病始生》所言:“壮人无积,虚人则有之。”正气不足,邪气容易侵袭;邪气侵袭后,正虚无力祛邪,日久形成正虚邪恋之势,使病情迁延难愈。在肝纤维化的病变过程中,邪热内蕴或肝郁化热,必伤津耗液;过用疏肝理气等辛燥药物易耗血伤津;病程漫长,邪必伤正,久病及肾;加之脾胃亏虚,津血化生不足等原因均可致肝肾阴虚,因此,肝肾阴虚是肝纤维化发生发展的重要病机。名老中医姚希贤等认为慢性肝炎后期具有明显肝纤维化者,多表现出肝肾阴虚证型

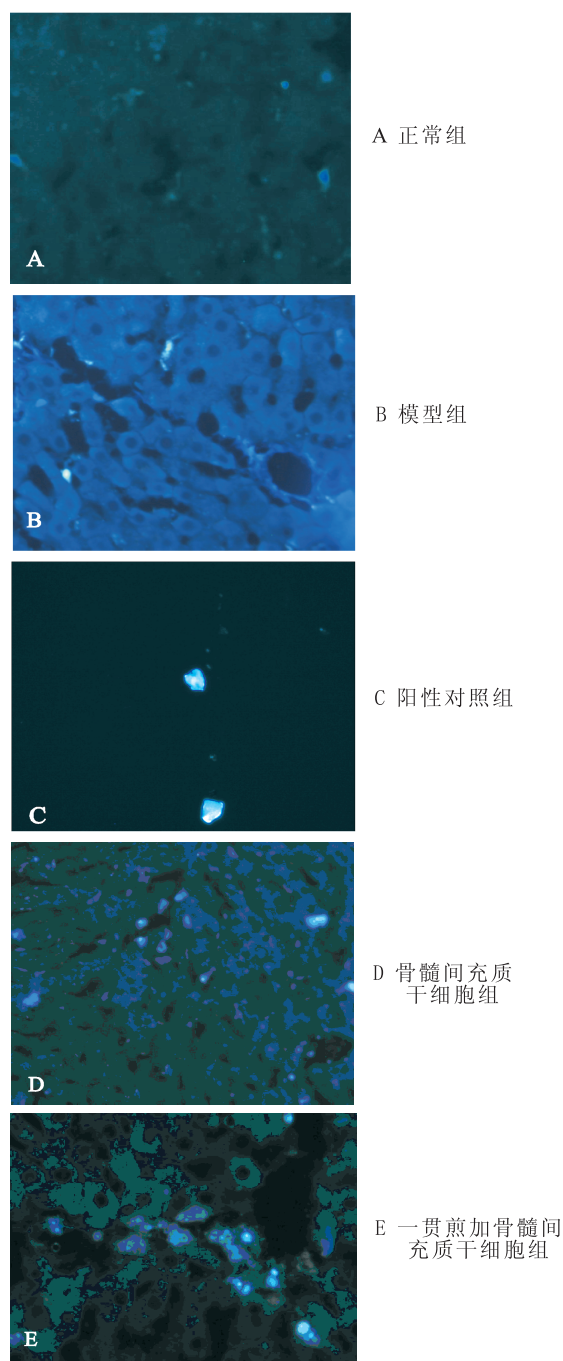


图2 各组大鼠肝组织骨髓间充质干细胞分布面积示踪比较(×200)

特点^[5],因此,针对肝肾阴虚这一核心病机进行积极治疗,对于逆转肝纤维化具有重要的意义。

一贯煎是清代名医魏玉横所创,见于《续名医类案》,用于治疗肝肾阴亏、肝失疏泄所致的胁肋隐痛,遇劳加重,口干咽燥,头晕目眩,腰膝酸软,舌红少津,脉弦细数等症,是滋阴疏肝的著名方剂。大量临床和实验研究证明,一贯煎确有良好的抗肝纤维化作用。一贯煎不但能改善患者症状体征、降低血清肝纤维化

指标,还能保护肝细胞、减轻肝损伤、调节肝组织胶原代谢从而达到抗肝纤维化的目的^[6-7]。

现代研究证实,在肝损伤时,骨髓间充质干细胞能够向损伤部位趋化并发挥修复肝损伤的作用。实验研究证明,来源于骨髓的间充质干细胞具有向肝系细胞分化的潜能,并可逆转肝纤维化的病程^[8]。进一步的研究提示,骨髓间充质干细胞能够分泌降解胶原的基质金属蛋白酶 MMP-9,从而减少肝纤维化胶原的沉积^[9]。实验研究发现,骨髓间充质干细胞在肝纤维化恢复模型肝损伤因素停止后向肝脏募集,骨髓间充质干细胞能够改善肝功能、减轻炎症、逆转肝纤维化,一贯煎能够提高骨髓间充质干细胞的这些作用, $P < 0.05$ 。总之,本实验提示,一贯煎逆转肝纤维化的作用机制之一是通过促进骨髓间充质干细胞募集到肝脏而发挥修复肝脏的作用。对于临床合理应用一贯煎起到一定的指导作用。

参考文献

- [1] Sakaida I, Terai S, Nishina H, et al. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis[J]. Med Mol Morphol, 2005, 38(4): 197-202.
- [2] Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis [J]. Clin Biochem, 2007, 40(12): 893-899.
- [3] Ishikawa T, Terai S, Urata Y, et al. Administration of fibroblast growth factor 2 in combination with bone marrow transplantation synergistically improves carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327(3): 463-470.
- [4] 刘树农. 刘树农医论选[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1987:292.
- [5] 岳煜,薛博瑜. 肝纤维化中医药研究进展[J]. 中医学报, 2010, 25(6):1243-1245.
- [6] 王昆,王凤洲,褚春薇,等. 一贯煎加味抗肝纤维化的实验性研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(1): 61-63.
- [7] 王晓柠,陶庆,冯琴,等. 一贯煎对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠肝组织胶原代谢的影响[J]. 中西医结合学报, 2011, 9(6): 651-657.
- [8] kummar M, Sarin SK. Is cirrhosis of the liver reversible[J]. Indian J Pediatr, 2007, 74(4): 393-399.
- [9] Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2007, 45(1): 213-222.

(收稿日期:2014-01-15)

(本文编辑:黄凡)