

# 一贯煎汤剂对肝纤维化大鼠肝脏 I 型胶原的影响

白辰 车念聪 刘文兰 赵晖 司远

**【摘要】 目的** 观察一贯煎汤剂对肝纤维化大鼠肝脏 I 型胶原的影响。**方法** 将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、西药组、中药组。除正常组外,其余 3 组均建立 CCl<sub>4</sub> 四氯化碳诱导的肝纤维化模型。造模后,中药组以一贯煎汤剂灌胃、西药组以秋水仙碱溶液灌胃、正常组和模型组以生理盐水灌胃,灌胃次数为 1 次/天。灌胃 4 周后,通过蛋白电泳法检测 I 型胶原纤维蛋白的表达,通过免疫组化法检测大鼠肝组织细胞外 I 型胶原的沉积,分别以灰度值和积分光密度评价。**结果** 与正常组相比,模型组肝组织细胞外 I 型胶原蛋白明显增加。与模型组相比,中药组及西药组肝组织细胞外 I 型胶原蛋白明显减少。**结论** 一贯煎汤剂可减轻四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠的肝组织 I 型胶原的表达及其在肝细胞外的沉积。

**【关键词】** 一贯煎; 肝纤维化; I 型胶原

**【中图分类号】** R657.3+1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.08.002

**Influence of Yiguanjian decoction on type I collagen in liver of rats with hepatic fibrosis** BAI Chen, CHE Nian-cong, LIU Wen-lan, et al. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: CHE Nian-cong, E-mail: cnc088@sohu.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the influence of Yiguanjian decoction on type I collagen in liver of rats with hepatic fibrosis. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, western medicine group and Chinese medicine group. All the rats were used to establish hepatic fibrosis rat models in addition to rats in control group by using carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). After rat model establishment, rats in Chinese medicine group received gavage administration with Yiguanjian decoction, rats in western medicine group received gavage administration with colchicine solution, and rats in control and model groups received gavage administration with normal saline. After treatment for 4 weeks, protein electrophoresis method was used to test the expression of type I collagen protein. Immunohistochemistry method was used to observe the extracellular deposition of type I collagen protein in hepatic tissue, and the deposition was evaluated by gray value and integral optical density. **Results** Compared with control group, type I collagen protein of extracellular in hepatic tissue of rats in model group was increased significantly. Compared with model group, extracellular deposition of type I collagen protein in hepatic tissue of rats in Chinese medicine and western medicine groups was decreased significantly. **Conclusion** Yiguanjian decoction could relieve the expression of type I collagen protein and extracellular deposition of type I collagen protein in hepatic tissue of rats with hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>.

**【Key words】** Yiguanjian decoction; Hepatic fibrosis; Type I collagen protein

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是指以胶原纤维 为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝

基金项目: 国家自然科学基金(81273668)

作者单位: 100069 首都医科大学中医药学院[白辰(硕士研究生)、车念聪、刘文兰、赵晖、司远(硕士研究生)]

作者简介: 白辰(1988-), 2012 级在读硕士研究生。研究方向: 中医肝病的证治规律研究。E-mail: tembai@hotmail.com

通讯作者: 车念聪(1957-), 本科, 教授, 主任医师。研究方向: 中医肝病。E-mail: cnc088@sohu.com

内大量沉积的病理过程<sup>[1]</sup>。与拮抗纤维化的西药相比,中药复方在对病人个体治疗方面具有一定优势。滋阴疏肝的时方一贯煎为临床常用治疗肝纤维化的方剂。本课题组前期实验研究表明<sup>[2]</sup>,一贯煎汤剂能有效降低血清转氨酶含量,减轻肝脏炎症程度。本研究拟通过建立 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化模型,观察经一贯煎汤剂干预后,肝组织细胞外 I 型胶原沉积情况的变化,探讨一贯煎汤剂对降解细胞外 I 型胶原沉积是否有促进作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试剂

选用健康 Sprague-Dawley 大鼠,雄性,体质量 180~200 g,鼠龄 8 周,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 28 只,饲养在首都医科大学实验动物科学部 SPF 级动物室。

一贯煎:根据原方药物剂量和比例<sup>[3]</sup>,选取北京同仁堂药店的标准中药材北沙参 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,煎煮为汤剂。按照体表面积计算,大鼠每 100 g 体质量所需生药为 0.65 g,将一贯煎汤剂按照 100 g 大鼠灌胃 1 mL 的体积配成相应浓缩液备用。

CCl<sub>4</sub>(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),橄榄油(阿果萨特级初榨橄榄油,最大酸度 0.4%,批号:14001952),秋水仙碱(西双版纳版纳药业有限责任公司生产,批号:120412),生理盐水(石家庄四药有限公司,批号:20729509),蛋白定量试剂盒(北京蒂诺奥生物科技有限公司),一抗:Anti-Collagen I antibody ab34710(美国 abcam)、蛋白质印迹法二抗:Dylight 800-goat anti-rabbit IgG(美国 Earthox LLC),二抗:Polink-2 plus@ Polymer HRP Detection System(北京中杉金桥生物技术有限公司,PV-9001)。

### 1.2 仪器设备

酶标仪(Bio-Rad, Model680,美国)垂直电泳槽(Bio-Rad,美国),小型电泳仪(Bio-Rad,美国),Odyssey 双色红外荧光成像系统(Li-Cor,美国),荧光显微镜(Nikon Eclipse 80i),恒温箱(Sanyo)。

### 1.3 造模

适应性饲养 1 周后,随机分为正常组,模型组,西药组,中药组。除正常组外,其余 3 组大鼠腹腔注

射 50% CCl<sub>4</sub> 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 CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液,每周 2 次,共 2 周;接着腹腔注射 0.05 mL/100 g 的 CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液,每周 2 次,共 2 周。正常组大鼠以同样方式等剂量腹腔注射橄榄油溶液。

### 1.4 治疗

从第 7 周开始,停止腹腔注射,中药组予一贯煎浓缩液 1 mL/100 g 灌胃,西药组给予秋水仙碱灌胃,0.25 mg/kg(相当于成人用量的 30 倍)<sup>[4]</sup>。正常组和模型组予等量生理盐水灌胃。每天 1 次,连续 4 周。

### 1.5 采集及处理样品

治疗 4 周后,所有大鼠以 10% 水合氯醛按 0.35 mL/100 g 剂量腹腔注射麻醉。取肝左叶同一部分,常规脱水、石蜡包埋,4 μm 连续切片。常规脱蜡至水,自来水洗 5 分钟,蒸馏水洗 5 分钟。抗原修复后,滴入适当一抗(1:800),37 度孵育 90 分钟,磷酸盐缓冲液(pH 7.2~7.6)洗 3 次,每次 2 分钟。滴入适当二抗,37℃孵育 20 分钟,pbs 洗 3 次,每次 3 分钟,室温显色。苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,光镜观察。采用 NIS-Elements BR 3.2 采集图像,进行积分光密度分析。每组随机选取 3 个样本,取肝右叶 50~100 g,剪碎匀浆后蛋白定量,5%浓缩胶 80 V 电泳约 30 分钟,10%分离胶 120 V 电泳至溴酚蓝到底。60 mA 冰浴过夜转膜,封闭后一抗(1:10000)室温摇床孵育 1 小时,洗膜后二抗(1:10000)室温摇床孵育 1 小时,洗膜后扫描成像,采用 ImageJ2x 分析蛋白电泳灰度值。

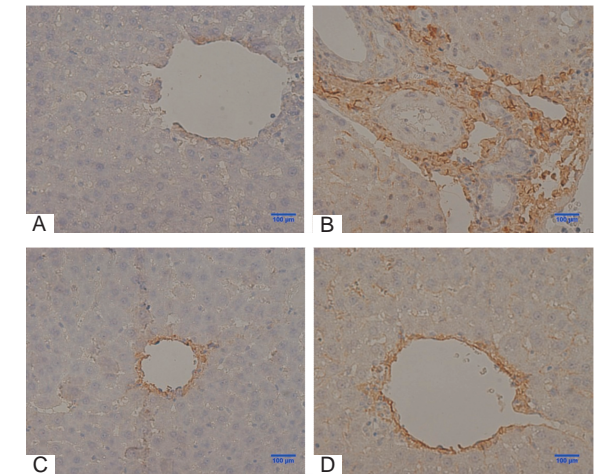
### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 进行统计处理,各组计量数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。以  $P < 0.05$  视为差异具有统计学意义, $P < 0.01$  视为差异具有显著的统计学意义。采用 Origin 8 绘制统计图。

## 2 结果

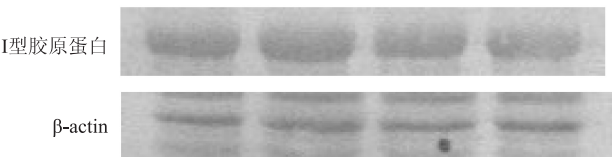
正常组大鼠肝组织仅在中央静脉及汇管区周围可见极少量 I 型胶原沉积。与正常组相比,模型组大鼠 I 型胶原蛋白表达增加,在肝组织中央静脉及汇管区周围、桥接结构中可见大量 I 型胶原沉积,且散见于小叶各处。与模型组相比,西药组与中药组 I 型胶原表达减少,肝组织细胞外 I 型胶原沉积

明显减少,在中央静脉及汇管区周围有部分 I 型胶原沉积。见图 1、图 2、表 1。



A: 正常组;B: 模型组;C: 西药组;D: 中药组

图 1 各组大鼠肝组织 I 型胶原免疫组化染色(×400)



A: 正常组;B: 模型组;C: 西药组;D: 中药组

图 2 各组大鼠肝组织 I 型胶原蛋白表达

表 1 各组大鼠肝组织 I 型胶原情况( $\bar{x} \pm s$ )

组别	积分光密度	灰度值
正常组	1.49±0.26	2.21±0.07
模型组	24.77±6.53 <sup>b</sup>	2.71±0.1
西药组	12.44±1.77 <sup>bc</sup>	2.4±0.1
中药组	8.18±0.93 <sup>ac</sup>	2.3±0.05

注:与正常组相比<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>c</sup> $P<0.01$ 。

3 讨论

一贯煎始载自清·魏玉璜所著《续名医类案》,由生地黄、沙参、当归、枸杞、麦冬、川楝子组成,功擅滋阴疏肝,临床常用于治疗肝肾阴虚、肝郁气滞所致胁痛、口干、腰膝酸软等症状。根据 HF 的临床表现和病症特点,中医学可参考“胁痛”、“肝积”“臌胀”“黄疸”等病证范畴。其病因多为饮食失节、情志失常、劳伤虚损、感染虫毒等,致湿热邪毒内蕴,伤阴耗气,痰凝血瘀,损伤肝络,发为此病<sup>[5]</sup>。因肝肾二脏母子相及,乙癸同源,故肝纤维化病变后期往往出现肝肾阴虚的证候<sup>[6-7]</sup>。一贯煎方中重用生地黄为君药,滋阴养血,补益肝肾;以沙参、当归、枸杞、麦冬 4 药共为臣药,滋阴柔肝;同时少佐川楝子

疏肝泄热,诸药合用,既滋补肝肾之阴又疏理肝气,使肝阴得养,肝气得舒。

包括蛋白多糖、胶原蛋白和黏连蛋白<sup>[8]</sup>在内的 ECM 代谢紊乱会导致肝脏结构和功能出现异常,其中 I 型胶原蛋白变化幅度最大<sup>[9]</sup>,可作为肝脏内胶原代谢变化的参考。正常肝组织细胞外间质的 I 型胶原主要分布在汇管区和中央静脉周围,研究表明<sup>[10-11]</sup>,I 型胶原由激活的肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)合成及分泌,受基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)/金属蛋白酶抑制因子(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases,TIMPs)调节。本实验结果表明,模型大鼠肝组织 I 型胶原蛋白表达增加,在肝组织细胞外沉积增多,反映出 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化过程中出现 I 型胶原代谢紊乱,过度沉积。经一贯煎汤剂治疗后,肝组织内沉积的 I 型胶原明显减少。前期研究表明,I 型胶原减少的原因考虑与调节肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)信号通路凋亡细胞抑制剂(cellular inhibitors of apoptosis,cIAP1)蛋白<sup>[12]</sup>,促进骨髓间充质干细胞募集到肝脏<sup>[2]</sup>,调节 MMP-1/TIMP-1 有关。目前抗肝纤维化的现代药物研究主要集中于逆转纤维化的多种靶点,包括 MMPs/TIMPs、TGF-β 细胞因子、Toll 样受体(Toll-like receptor,TLR)4、内源性大麻素(endogenous cannabinoids,EC)及其受体、整合素 αV、微小 RNA-29 在内的多种潜在靶点,大部分仍处于临床前研究阶段<sup>[13]</sup>,应用一贯煎汤剂等中药复方拮抗肝纤维化的研究可为肝纤维化的治疗提供新的思路。

本实验结果提示:一贯煎汤剂能降低 I 型胶原在肝细胞外的沉积;同时提示一贯煎疏肝理气的功用可能与其减少肝组织内 I 型胶原,进而改善脏器结构有关。本实验为阐释一贯煎对肝纤维化的拮抗作用提供了一定的数据支持,为临床合理应用一贯煎治疗相关疾病起到一定的指导作用。

参 考 文 献

[1] 杨新疆,齐翠花,郑勇,等. SB203580 对肝纤维化大鼠肝脏 I、Ⅲ型胶原蛋白表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2014,22(3):310-318.

[2] 刘文兰,油红捷,车念聪,等. 一贯煎促进骨髓间充质干细胞逆转肝纤维化的实验研究[J]. 环球中医药,2014,7(6):401-405.

[3] 谢鸣,周然. 方剂学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2012:201-202.

[4] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9

- (9):1069-1072.
- [5] 黄长乐,赵文霞. 中医药治疗肝纤维化进展[J]. 中医临床研究,2014,6(2):146-147.
- [6] 刘绍能,陶夏平,王融冰,等. 慢性乙型肝炎中医证候演变规律研究[J]. 中国中医药科技,2008,15(3):161-163.
- [7] 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.
- [8] 法振鹏,车念聪,季巍巍,等. 乙肝系列中成药对免疫性肝纤维化大鼠肝功能和肝纤维化指标的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(5):1449-1451.
- [9] Das SK, Vasudev an DM. Genesis of hepatic fibrosis and its biochemical markers[J]. Scand J Clin Lab Invest,2008,68(4):260-269.
- [10] Benyo n RC,Ar thur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells[J]. Semin Liver Dis,2001,21(3):373-384.
- [11] Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Ro eb E. Ex pression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis-a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies[J]. J H epatol,2007,46(5):955- 975.
- [12] 刘文兰,油红捷,张红月,等. 一贯煎治疗肝炎药理机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,(5):192-194.
- [13] 赵双双,邵荣光,何红伟. 抗肝纤维化的潜在作用靶点[J]. 药学报,2014,(10):1365-1371.

(收稿日期:2014-12-24)

(本文编辑:董历华)