

(收稿日期: 2016-04-09)

(本文编辑: 韩虹娟)

· 论著 ·

大黄廑虫丸加味对免疫性肝纤维化大鼠肝组织 PDGF 及 PDGFR 的影响

王金光 车念聪 李文新 杜宇琼 司远 刘晔 赵晖

【摘要】 目的 观察大黄廑虫丸配伍黄芪、水红花子汤剂对免疫性肝纤维化大鼠肝组织血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)及血小板源性生长因子受体(platelet derived growth factor receptor, PDGFR)的影响。**方法** 将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、中药组和秋水仙碱组。除了正常组外的 3 组均建立猪血清腹腔注射诱导的免疫性肝纤维化模型。灌胃治疗 6 周后,取大鼠肝脏进行病理 HE 染色及通过碱水解法检测羟脯氨酸含量,并通过蛋白免疫印迹法检测肝组织 PDGF-BB 蛋白及 PDGFR 蛋白的表达。**结果** 与正常组相比,模型组羟脯氨酸含量、PDGF-BB 蛋白及 PDGFR 蛋白的表达均明显增加($P < 0.01$);与模型组相比,中药组及秋水仙碱组羟脯氨酸含量减少($P < 0.05$),PDGF-BB 蛋白及 PDGFR 蛋白的表达明显减少($P < 0.01$);中药组与秋水仙碱组羟脯氨酸含量、PDGF-BB 蛋白及 PDGFR 蛋白的表达均未见明显差异($P > 0.05$)。**结论** 大黄廑虫丸配伍黄芪、水红花子能有效拮抗猪血清诱导的大鼠免疫性肝纤维化,其机制可能与抑制 PDGF-BB 及受体 PDGFR 蛋白的表达,进而抑制肝星状细胞的增殖活化有关。

【关键词】 大黄廑虫丸; 免疫性肝纤维化; 血小板源性生长因子; 血小板源性生长因子受体

【中图分类号】 R249 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.10.007

Influence of variation on Dahuang Zhechong pill on PDGF protein and PDGFR protein in liver of rats with immune hepatic fibrosis WANG Jin-guang, CHE Nian-cong, LI Wen-xin, 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 variation on Dahuang Zhechong pill combine with mikvetch root and prince's-feather fruit decoction on PDGF protein and PDGFR protein of rats with hepatic fibrosis. **Methods** SD rats were randomly divided into normal group, model group and western medicine, Chinese medicine group. Except the normal group, the other 3 groups were induced liver fibrosis model by intraperitoneal injection of porcine serum, after six weeks of treatment, pathology HE of rat liver was conducted and alkali hydrolysis method was used to delect hydroxyproline content, the expression of PDGF-BB protein and PDGFR protein was detected by protein immunoblot method. **Results** Compared with the normal group, hydroxyproline content, PDGF-BB proteins and PDGFR protein expression of model group was significantly increased ($P < 0.01$); Compared with model group, the hydroxyproline content in Chinese medicine group and colchicine group was decreased ($P < 0.05$), the expression of PDGF-BB protein and PDGFR protein was decreased significantly ($P < 0.01$); the hydroxyproline content, the

基金项目: 2015 年度首都中医药研究专项(15ZY01); 2015 年度首都医科大学校自然科学基金(2015ZR25)

作者单位: 100069 北京,首都医科大学中医药学院中医临床基础学系[王金光(硕士研究生)、车念聪、李文新(硕士研究生)、杜宇琼、司远(硕士研究生)、刘晔(硕士研究生)、赵晖]

作者简介: 王金光(1987-), 2014 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: jinguang1213@163.com

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

expression of PDGF-BB protein and PDGFR protein between Chinese medicine group and colchicine group had no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** variation on Dahuang Zhechong pill combine with mikvrtch root and prince's-feather fruit decoction can antagonism liver fibrosis induced by porcine serum, the mechanism may be related to the inhibition of PDGF-BB and PDGFR protein expression, and the inhibition of the hepatic stellate cell activation.

【Key words】 variation on Dahuang Zhechong pill; Immune hepatic fibrosis; PDGF; PDGFR

肝纤维化是指由于肝炎病毒、酒精、药物或其他因素导致肝脏的损害,肝脏内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成大于降解,并在肝脏内过度沉积的病理生理过程,是各种慢性肝病病情进展的重要病理阶段,也是形成肝硬化、肝癌的必经过程^[1]。肝脏发生损伤时,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是合成 ECM 的主要细胞。HSC 的激活和增殖对肝纤维化的发生发展起着至关重要的作用,而血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)是刺激 HSC 增殖和相关信号传导最为有效的有丝分裂因子,分为 AA、BB、AB、CC、DD 5 种亚型,其中 PDGF-BB 在促使 HSC 增殖活化从而促进胶原合成、抑制胶原降解中发挥最为重要的作用。有研究表明^[2], PDGF-BB 及其受体在慢性肝炎或肝硬化患者肝组织表达过度,并与胶原纤维沉积成正相关。本研究拟通过建立猪血清诱导的大鼠免疫性肝纤维化模型,观察经大黄廑虫丸加味汤剂干预后,肝组织 PDGF-BB 蛋白及 PDGFR 蛋白的变化,探讨大黄廑虫丸加味汤剂拮抗免疫性肝纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用雄性 SD 大鼠,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)2013-0004,共 28 只,饲养在首都医科大学实验动物科学部 SPF 级动物室。

1.2 试剂和仪器

大黄廑虫丸配伍黄芪、水红花子汤剂:大黄廑虫丸购自北京同仁堂药店(批号:15013317),从北京同仁堂选购标准中药材黄芪、水红花子。根据等效药量关系,按照每 100 g 大鼠每天灌胃 1 mL 的量,经过计算得出每 1 mL 中药汤剂中含有大黄廑虫丸 0.14 g、黄芪水红花子(黄芪:水红花子=3:1)生药量为 0.47 g,依此要求煎成汤剂备用。

猪血清(北京百代商贸技术有限公司,批号:150418);生理盐水(北京市普京康利科技有限公

司,批号:150526);秋水仙碱(北京市普京康利科技有限公司,批号:151008),使用时以蒸馏水调制药液成 0.025 g/L;羟脯氨酸测试盒(A030-2,南京建成生物科技有限公司,批号:20160112);蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),一抗:Anti-Collagen I antibody ab23914(美国 Abcam)、一抗:Anti-Collagen I antibody ab19481(美国 Abcam);蛋白质印迹法二抗:goat anti rabbit IgG(H+L),HRP(美国 Jackson 111-035-003)、二抗:goat anti mouse IgG(H+L),HRP(美国 Jackson 115-035-003)。

酶标仪(Thermo,美国)垂直电泳槽(Bio-Rad,美国);小型电泳仪(Tanon,美国);Odyssey 双色红外荧光成像系统(Li-Cor,美国);全波长分光光度计(上海菁华有限公司,UV2000);荧光显微镜(Nikon Eclipse 80i);恒温箱(Sanyo);高速搅拌机(Fluka,美国)。

1.3 造模

将 SD 大鼠适应性饲养 1 周,然后随机分成正常组、模型组、中药组和秋水仙碱组,每组各 7 只。正常组腹腔注射生理盐水每只 0.5 mL/天,其余 3 组大鼠腹腔注射猪血清每只 0.5 mL/天。每周两次,共注射 12 周。

1.4 治疗

腹腔注射 6 周后,在保持造模不变情况下,进行药物灌胃治疗,灌胃量为 1 mL/100 g 大鼠体质量。中药组给予大黄廑虫丸加味汤剂;正常组及模型组予生理盐水;秋水仙碱组予以秋水仙碱溶液。治疗 1 次/天,共 6 周。每周称量大鼠体质量,随体质量的变化更改造模及治疗的药量。

1.5 样本采集及处理

1.5.1 肝组织病理 HE 染色 治疗 6 周后,以 10% 水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,固定,打开腹腔并迅速分离出肝脏,切取左叶肝脏相同部位,常规脱水后用 3% 福尔马林溶液固定,石蜡包埋,4 μ m 切片。切片用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗;苏木素染色浸泡 2 ~ 5 分钟,自来水冲洗;盐酸乙醇分化 30 秒钟;自来水浸泡 15 分钟;0.5%

伊红染液浸泡 2 分钟,自来水冲洗;常规脱水,透明,封片。

1.5.2 碱水解法检测肝组织羟脯氨酸含量 每组随机选取 3 个肝脏样本(30 ~ 100 mg)放入试管中,加水解液,沸水浴 20 分钟,调 pH 至 6.0 ~ 6.8,取 3 ~ 4 mL 稀释的水解液加活性炭,混匀并离心 10 分钟,取上清液 1 mL 调至 550 nm 处、1 cm 光径,测试其吸光度(optical densith, OD),并根据以下公式进行羟脯氨酸含量的测定。羟脯氨酸含量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 湿重)=

$$\frac{\text{测定 OD 值}-\text{空白 OD 值}}{\text{标准 OD 值}-\text{空白 OD 值}} \times \text{标准品含量}(5 \mu\text{g}/\text{mL}) \times \frac{\text{水解液总体积}(10 \text{ mL})}{\text{组织湿重}(\text{mg})}。$$

1.5.3 蛋白免疫印迹法检测肝组织 PDGF-BB 蛋白及 PDGFR 蛋白的表达 每组随机选取 3 个样本肝脏 50 ~ 100 g,剪碎匀浆,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,采用软件 Image J2x 对图像进行灰度分析。

1.6 统计学处理

数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据符合正态分布,且方差齐,故组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义,以 $P < 0.01$ 为差异具有显著统计学意义。

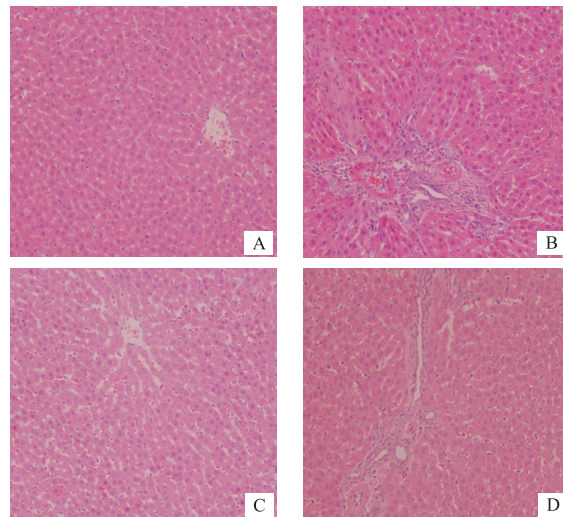
2 结果

2.1 各组大鼠肝组织病理染色比较

如图 1 所示,正常组大鼠肝组织肝小叶结构正常,肝细胞索排列整齐,以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞无变性、坏死,无胶原纤维增生;模型组大鼠肝小叶结构破坏,肝细胞排列紊乱,汇管区扩大伴炎性细胞浸润,伴有胶原纤维增粗增厚。中药组与秋水仙碱组肝细胞排列较为整齐,肝细胞结构异常少见,有少量胶原纤维增生沉积,肝脏炎症及纤维化程度较模型组有所减轻。

2.2 各组大鼠肝组织羟脯氨酸含量比较

与正常组相比,模型组、中药组、秋水仙碱组羟脯氨酸含量明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,中药组、秋水仙碱组羟脯氨酸含量下降($P < 0.05$),但中药组与秋水仙碱组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A:正常组;B:模型组;C:中药组;D:秋水仙碱组

图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色($\times 200$)

表 1 各组大鼠肝组织羟脯氨酸含量($\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{mL}$)

组别	<i>n</i>	Hyp 含量
正常组	3	1.91 \pm 0.32
模型组	3	3.74 \pm 0.69 ^a
中药组	3	3.15 \pm 0.45 ^{ab}
秋水仙碱组	3	3.14 \pm 0.39 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P < 0.01$;与模型组相比,^b $P < 0.05$ 。剔除造模失败大鼠,故每组选取 3 只。

2.3 各组大鼠肝组织 PDGF-BB 及受体 PDGFR 蛋白表达结果

与正常组相比,模型组、中药组、秋水仙碱组 PDGF-BB 及受体 PDGFR 蛋白表达有显著差异($P < 0.01$);与模型组相比,中药组、秋水仙碱组含量下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);中药组与秋水仙碱组组间比较无差异($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠 PDGF、PDGFR 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PDGF-BB	PDGFR
正常组	3	0.17 \pm 0.01	0.31 \pm 0.25
模型组	3	0.33 \pm 0.02 ^a	0.76 \pm 0.01 ^a
中药组	3	0.27 \pm 0.01 ^{ab}	0.53 \pm 0.01 ^{ab}
秋水仙碱组	3	0.26 \pm 0.02 ^{ab}	0.44 \pm 0.02 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P < 0.01$;与模型组相比,^b $P < 0.01$ 。剔除造模失败大鼠,故每组选取 3 只。

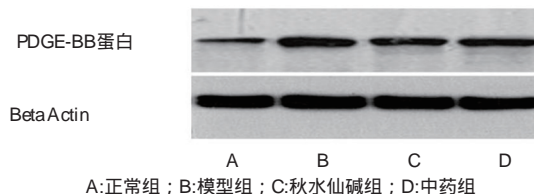


图 2 各组大鼠肝组织 PDGF-BB 蛋白的表达

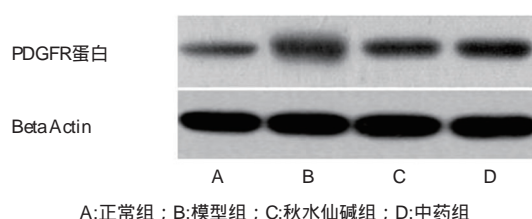


图 3 各组大鼠肝组织 PDGFR 蛋白的表达

3 讨论

大黄蟚蛄丸是《金匱要略》中的名方,见于《金匱·血痹虚劳》:“五劳虚极羸瘦,腹满不能饮食、食伤、忧伤、饮伤、房室伤、饥伤、劳伤、经络营卫气伤,内有干血,肌肤甲错,两目黯黑,缓中补虚,大黄蟚蛄丸主之。”本方由熟大黄、土鳖虫、虻虫、蛭虫、水蛭、苦杏仁、黄芩、生地黄、干漆、桃仁、白芍、甘草组成,全方共奏活血化瘀、清热润燥、滋阴养血之功效。据报道^[3],大黄蟚蛄丸临床运用较为广泛,涉及 40 余种疾病的治疗,常用于治疗慢性肝炎、肝硬化及肝硬化^[4,7],取得了不错的疗效。黄芪、水红花子是中医药治疗肝病的常用中药,本课题组在前期的实验研究中发现二者均能对免疫性肝纤维化大鼠的肝纤维化指标及肝脏病理都有不同程度的改善^[5-6]。本课题实验将经方大黄蟚蛄丸与黄芪、水红花子配伍结合使用,在临床经验取得一定疗效的基础上,探讨此中药复方对免疫性肝纤维化大鼠的拮抗作用机制。

中医学无免疫性肝纤维化这一病名,根据其临床特点及症状可参考“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^[7]。根据“久病入络”理论,免疫性肝纤维化的主要病机往往为正气虚弱,肝络瘀阻。大黄蟚蛄丸重在活血化瘀通络,配伍水红花子增强化瘀之力,然血行有赖于气的运行,气为血之帅,气行则血行,再配伍黄芪以益气通络,全方合用起到益气化瘀通络之功效。

现代研究表明,在免疫性肝纤维化发生、发展过程中,羟脯氨酸在肝脏中的含量能反映肝纤维化胶原代谢情况,作为肝星状细胞的强烈有丝分裂原的 PDGF,能够刺激 HSC 的增殖从而造成胶原纤维的增生和沉积,同时 PDGF 能以自分泌和旁分泌的方式发挥作用^[8]。在对肝纤维化患者的研究中发

现,对 HSC 增殖活化起重要作用的 PDGF 和其受体 PDGF-R 的表达均上调^[9]。本实验结果表明,模型组大鼠肝组织病理 HE 及羟脯氨酸含量增高显示肝纤维化模型成立;经大黄蟚蛄丸加味汤剂治疗后,肝脏病理反映肝纤维化程度的改善,肝组织羟脯氨酸含量较模型组减少,PDGF-BB 蛋白和 PDGFR 蛋白表达明显下降。笔者认为,大黄蟚蛄丸加味汤剂能降低肝组织羟脯氨酸含量,能抑制肝组织中 PDGF-BB 蛋白及 PDGFR 蛋白的表达,提示大黄蟚蛄丸加味黄芪、水红花子抗肝纤维化作用可能与其抑制肝星状细胞增殖活化,进而减少胶原沉积有关。现代药物抗肝纤维化的研究大部分仍处于临床前研究阶段^[10],中药复方制剂具有多层次、多途径、多靶点抗肝纤维化的整体治疗优势^[2]。本实验为阐释大黄蟚蛄丸配伍黄芪、水红花子对免疫性肝纤维化的拮抗作用机制提供了一定的实验数据,同时为临床上更好地使用大黄蟚蛄丸配伍黄芪、水红花子抗免疫性肝纤维化提供了理论依据和思路。

参 考 文 献

- [1] 刘瑶. 早期乙型肝炎肝硬化中医证素特征及其与血浆 CTGF、PDGF 的相关性研究[D]. 福州:福建中医药大学, 2014.
- [2] 李川, 吕文良. 常见中药复方制剂抗肝纤维化机制研究进展[J]. 环球中医药, 2013, 6(1): 70-73.
- [3] 李康, 党诚学. 大黄蟚蛄丸药理作用及临床应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(11): 1440.
- [4] 陈红. 中西医结合治疗肝硬化腹水近况[J]. 广西中医学院学报, 2005, 8(1): 65.
- [5] 杜宇琼, 车念聪. 黄芪对肝纤维化大鼠肝组织 TIMP-1 及 MMP-1 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(11): 775-778.
- [6] 杜宇琼, 车念聪. 水红花子对免疫肝纤维化大鼠肝组织及血清肝纤维化标志物的影响[J]. 中国中医急症, 2011, 20(9): 1433-1434.
- [7] 翟延君, 张淑荣, 郝宁. 水红花子研究概况[J]. 辽宁中医学院学报, 2005, 7(3): 226.
- [8] Nagashio Y, Ueno H, Imamura M. Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice[J]. Lab Invest, 2004, 84(12): 1610-1618.
- [9] Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(4): 255-273.
- [10] 白辰, 车念聪, 刘文兰. 一贯煎汤剂对肝纤维化大鼠肝脏 I 型胶原的影响[J]. 环球中医药, 2015, 8(8): 901-903.

(收稿日期: 2016-05-15)

(本文编辑: 韩虹娟)