

黄芪多糖对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的保护作用

张晨¹ 黄进² 詹菲¹ 张进¹

(1 广州中医药大学基础医学院, 广州, 510006; 2 广州中医药大学门诊部, 广州, 510405)

摘要 目的:观察黄芪多糖(APS)对四氯化碳(CCl_4)致大鼠肝纤维化的治疗作用。方法:采用 CCl_4 诱导大鼠肝纤维化模型,造模成功后,取大鼠血清和肝组织进行检测。测定血清肝纤维化四项、肝脏组织中羟脯氨酸(HYP)含量;HE 染色比较炎症及肝纤维化程度;免疫组织化学法分析肝组织中 I 型胶原(Col-I)、平滑肌肌动蛋白 α (α -SMA)表达量。结果:与模型组相比,APS 中、高剂量组的肝纤四项水平、炎症及肝纤维化程度明显降低($P < 0.05$);APS 中、高剂量组肝脏组织中 HYP 含量显著降低($P < 0.01$);APS 中剂量组 Col-I、 α -SMA 表达显著减少($P < 0.01$);APS 高剂量组 Col-I、 α -SMA 表达明显减少($P < 0.05$)。结论:APS 对大鼠肝纤维化具有一定的防治作用,作用机制可能与其抑制 Col-I、 α -SMA 表达有关。

关键词 肝纤维化;黄芪多糖;四氯化碳

Protective Effect of Astragalus Polysaccharide on Liver Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats

Zhang Chen¹, Huang Jin², Zhan Fei¹, Zhang Jin¹

(1 Basic Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2 Guangzhou University of Chinese Medicine clinics, Guangzhou 510405, China)

Abstract Objective: To study the protective effect of the Astragalus polysaccharides (APS) on liver fibrosis in rats caused by carbon tetrachloride (CCl_4). **Methods:** CCl_4 was used to induce rat liver fibrosis model. After making the model successfully, rat serum and liver tissue were collected to test. The serum liver fiber four and hydroxyproline (HYP) content in the liver tissue was tested; HE staining of liver tissue was used to compare inflammation and degree of liver fibrosis; expression of Col-I and α -SMA with immunohistochemical method was analyzed. **Results:** Compared with the model group, four levels of liver fibrosis, inflammation and liver fibrosis of APS high and medium groups were obviously lower ($P < 0.05$); HYP content of APS high and medium groups were significantly lower ($P < 0.01$); Col-I and α -SMA expression of APS medium group was significantly lower ($P < 0.01$); Col-I and α -SMA expression of APS high group was obviously lower ($P < 0.05$). **Conclusion:** The APS is effective to some extent in preventing liver fibrosis of rat, the functional mechanism may be related to limiting the expression of Col-I and α -SMA.

Key Words Liver fibrosis; Astragalus polysaccharides; Carbon tetrachloride

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.06.022

近年来,中医药抗肝纤维化基础与临床研究成为医学界关注的焦点之一,其中作用机制的研究更是备受关注^[1-3]。在抗肝纤维化的众多药物中,中药黄芪及其复方制剂是一类有很大发展潜力的药物。黄芪能够减少免疫损伤所致肝内胶原成分的异常沉积和调节相关信号通路转导^[4-6],对实验性肝纤维化有明显的治疗作用。黄芪多糖(APS)是黄芪主要生物活性成分。大量体内外实验及临床研究表明,APS 具有增强机体免疫力、降压、降血糖、抗应激、抗肿瘤、抗病毒、抗辐射和抗氧化等多种药理功效^[7]。本实验基于 CCl_4 诱导大鼠肝纤维化模型,使用 APS 进行干预,以探究该药物对大鼠肝纤维化的

防治作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 50 只,雄性,体重 180~220 g,购自广州中医药大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(粤)2013-0020。

1.2 主要试剂和仪器 黄芪多糖(南京泽朗医药科技有限公司);四氯化碳(天津富宇精细化工有限公司);羟脯氨酸检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140605);山羊血清封闭液(武汉博士德,批号:AR0009);Col-I、 α -SMA 一抗(Abcam 公司,批号:ab34710、ab5694);二抗(基因科技公司,批号:GK600505);智能生物组织脱水机(益迪 YD-129);

基金项目:广州中医药大学高等学校博士学科点专项科研基金项目(编号:20114425120015)

作者简介:张晨,男,陕西安康人,硕士研究生,研究方向:主要从事药效研究工作,E-mail:zhangchenak1990@126.com

通信作者:黄进(1981—),女,医学博士,主治医师,研究方向:主要从事药效研究工作,E-mail:huangjin2010@gzucm.edu.cn

石蜡包埋冷冻机(益迪 YD-6L);石蜡切片机(益迪 YD-AB);光学显微镜(OLYMPUS CX31)。

2 方法

2.1 模型制备和给药 SD 大鼠 50 只按体重随机分成正常组、模型组、APS 组(低、中、高)5 组,每组 10 只。参考文献^[8],除正常组皮下注射花生油溶液外,其他各组大鼠由皮下注射 60% CC1₄ 花生油溶液,首次注射 5 mL/kg,以后以 3 mL/kg 每隔 3 d 注射 1 次,连续注射 8 周建立大鼠肝纤维化模型。APS 组每天给予 APS 灌胃 1 次,低、中、高组剂量分别为 0.2 g/kg、0.4 g/kg、0.8 g/kg,正常组和模型组给予等体积的生理盐水。末次给药 1 h 后,水合氯醛麻醉大鼠,收集腹主动脉血和肝脏组织。

2.2 观察指标和检测

2.2.1 血清学指标分析 大鼠麻醉后腹主动脉取血约 5 mL,3000 r/min 离心 15 min 取血清,-20 ℃ 保存备用。全自动生化分析仪常规检测各组血清样本的肝纤维化指标:血清透明质酸(HA),层黏蛋白(LN),Ⅲ型前胶原(PCⅢ),Ⅳ型胶原(CⅣ)。

2.2.2 肝组织中 HYP 含量测定 称取肝脏湿重约 50 mg,准确加水解液 1 mL,混匀。严格按照羟脯氨酸检测试剂盒说明测定各管的 OD 值,根据计算公式:HYP 含量(μg/mg) = (测定 OD 值 - 空白 OD 值) ÷ (标准 OD 值 - 空白 OD 值) × 标准品含量(5 μg/mL) × 水解液总体(10 mL) ÷ 组织湿重(mg),计算肝组织中的 HYP 含量。

2.2.3 HE 染色 取大小约为 1 cm × 1 cm × 1 cm 肝组织,保存于 10% 甲醛溶液中。24 h 后,开始脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片,行常规 HE 染色。光镜下观察肝组织病理改变,随机选取 10 个 100 倍视野,观察并比较炎症及肝纤维化程度。

2.2.4 免疫组织化学染色分析肝组织中 Col-I、α-SMA 表达量 大鼠处死之后,取同一部位肝组织,大小为 1 cm × 1 cm × 1 cm。组织样本处理:1)依次进行甲醛固定、不同浓度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡封片、切片、烤片;2)染色:二甲苯脱蜡 15 min,重复 3 次,依次经乙醇(100%、95%、85%、70%、50%)脱水各 5 min。3% H₂O₂、纯水漂洗各 3 min。柠檬酸盐缓冲液修复,正常山羊血清封闭 30 min,一抗 4 ℃ 孵育过夜,正常对照组以 PBS 代替一抗,平衡盐漂洗。二抗 37 ℃ 孵育 30 min,平衡盐漂洗。DAB 染色,苏木精复染,去离子水迅速冲洗,0.1% 盐酸酒精分化 20 s。最后依次冲洗、脱色、透明、封片、干燥。染色结果以组织出现黄色或黄褐色为阳性。用

已知阳性片作阳性对照,普通光学显微镜低倍镜确定阳性表达位置,移至高倍镜(×200)下拍摄病变组织 5 个视野照片,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件,计算平均灰度值。

2.3 统计学分析 各组数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据处理采用 SPSS 17.0 统计软件分析。组间均数比较采用单因素方差分析,方差齐时用 LSD 法,方差不齐时采用 Dunnett, T3 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 模型制备及大鼠死亡情况 本次实验在第 12、15 周每组各处死 1 只大鼠用于 HE 染色,用于判定模型建立是否成功。实验期间大鼠共死亡 5 只,其中模型组 2 只,APS(低、中、高)组各死 1 只。大鼠死亡前活动度明显降低,进食减少,体重减轻,消瘦,考虑为 CC1₄ 慢性中毒而死。

3.2 各组大鼠血清中肝纤维化四项含量变化 与正常组比较,模型组大鼠血清肝纤维化四项水平显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,APS 中、高剂量明显降低大鼠血清中肝纤维化四项水平($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 肝组织中 HYP 含量变化 与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织 HYP 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,APS 中、高剂量显著降低大鼠肝组织中 HYP 水平($P < 0.01$)。见表 1。

3.4 各组大鼠肝脏组织 HE 染色 正常组大鼠肝小叶结构清晰、完整,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列,中央静脉汇管区动静脉和胆管结构正常,未见肝窦扩张,无胶原纤维,未见炎细胞浸润与胶原纤维增生;模型组大鼠肝组织正常肝小叶紊乱无序,肝细胞结构完全被破坏,可见纤维结缔组织明显增生,大部分肝细胞表现为片状坏死,形成大小不一的典型的假小叶结构,假小叶内以充斥着脂肪变的肝细胞为主,汇管区明显扩大,坏死细胞增多;APS 组大鼠表现均轻于模型组,肝小叶样结构较模型组正常,未见假小叶形成,胶原纤维增生不典型。见图 1。

3.5 各组大鼠肝脏组织中 Col-I、α-SMA 表达量的差别 正常组多呈低水平表达,染色淡,局部表达不明显;模型组多呈高水平表达,染色呈强阳性,染色多为棕黄色,广泛分布;APS 中、高剂量组表达介于正常组与模型组之间,表达面积和强度较模型组显著为弱,纤维间隔染色淡。APS 低剂量组阳性表达面积高于中、高剂量组,染色较深且广泛。将染色

结果按照换算为显色指数,比较各组对肝组织 Col - I、 α - SMA 表达的影响。与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织中 Col - I、 α - SMA 表达量显著升高 ($P <$

0.01);与模型组相比,APS 中、高剂量组大鼠肝脏组织中 Col - I、 α - SMA 表达量显著降低 ($P <$ 0.01, $P <$ 0.05)。见表 2,图 2、3。

表 1 血清 HA、LN、PCⅢ、CⅣ 含量 (ng/mL) 和肝组织中 HYP (μg/mg 湿重) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HA	LN	CⅣ	PCⅢ	HYP (μg/mg)
正常组	10	42.06 ± 13.53	24.54 ± 9.14	9.61 ± 2.38	5.98 ± 2.09	0.258 ± 0.032
模型组	8	349.35 ± 56.85 *	97.32 ± 13.46 *	22.80 ± 4.58 *	23.75 ± 3.97 *	0.702 ± 0.027 *
APS 低剂量组	9	147.49 ± 18.29	81.71 ± 11.25	17.10 ± 1.71	17.81 ± 2.86	0.577 ± 0.03
APS 中剂量组	9	133.63 ± 18.39 ▲	70.26 ± 8.81 ▲	13.65 ± 2.07 ▲	14.68 ± 3.67 ▲	0.334 ± 0.024 ▲▲
APS 高剂量组	9	132.11 ± 26.95 ▲	72.68 ± 10.24 ▲	15.52 ± 2.70 ▲	14.82 ± 3.96 ▲	0.365 ± 0.034 ▲▲

注:与正常组比较, * $P <$ 0.01,与模型组比较, ▲ $P <$ 0.05, ▲▲ $P <$ 0.01。

表 2 肝脏组织中 Col - I、 α - SMA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Col - I	α - SMA
正常组	10	0.2261 ± 0.0196	0.2396 ± 0.0102
模型组	8	0.4033 ± 0.0123 *	0.4389 ± 0.0185 *
APS 低剂量组	9	0.3334 ± 0.0218	0.3471 ± 0.0504
APS 中剂量组	9	0.2653 ± 0.0148 ▲▲	0.2634 ± 0.0164 ▲▲
APS 高剂量组	9	0.2777 ± 0.0295 ▲	0.2830 ± 0.0438 ▲

注:与正常组比较, * $P <$ 0.01,与模型组比较, ▲ $P <$ 0.05, ▲▲ $P <$ 0.01。

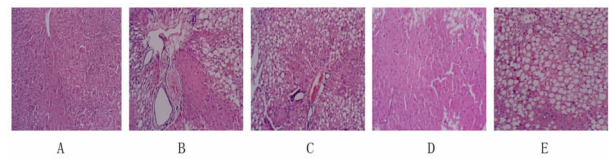


图 1 大鼠肝组织 HE 染色 (×100)

注:A:正常组;B:模型组;C:APS 低剂量组;D:APS 中剂量组;E:APS 高剂量组。

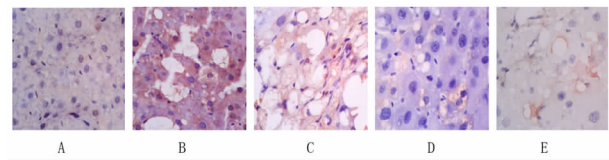


图 2 大鼠肝组织 Col - I 表达 (×200)

注:A:正常组;B:模型组;C:APS 低剂量组;D:APS 中剂量组;E:APS 高剂量组。

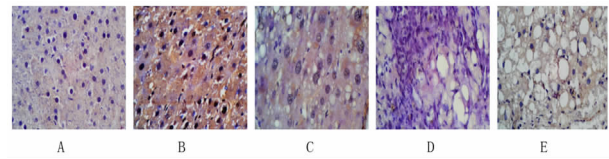


图 3 大鼠肝组织 α - SMA 表达 (×200)

注:A:正常组;B:模型组;C:APS 低剂量组;D:APS 中剂量组;E:APS 高剂量组。

4 讨论

肝纤维化是指肝脏内弥漫性细胞外基质 (ECM) 的过度沉积,是机体对慢性肝损伤的一种修复反应,也是各种急慢性肝病共同的病理过程。CCl₄ 皮下注射是建立肝纤维化模型的基本方法。本次实验大鼠皮下注射 60% CCl₄, 8 周后,造模大鼠

逐渐表现为精神萎靡,行动迟缓,毛色干枯蓬乱发黄,体重明显下降,通过血清肝纤四项及肝组织 HE 染色分析,提示肝纤维化大鼠模型造模成功。本结果显示,APS 各剂量组大鼠的肝纤四项、血清和肝组织中 HYP 含量以及病理纤维化程度均明显低于模型组,提示 APS 在一定程度上可抑制肝纤维化的进程。

肝脏中有多种蛋白,其中以 Col - I 为主。在正常肝脏中,胶原蛋白约占 5% ~ 10%,肝纤维化时胶原蛋白可占肝脏总蛋白的 50%^[9]。因此,Col - I 是肝纤维化过程中 ECM 的主要成分。胶原主要经过转录、翻译、翻译后修饰,去除端肽及交联等合成。则作用于胶原合成的任何一个环节均有可能减少胶原在肝脏细胞外间质的沉积^[10],提示 Col - I 在肝纤维化的发生中发挥重要作用。HYP 是一种非必需氨基酸,也是胶原代谢的重要产物。人体 HYP 占胶原蛋白比例最大,胶原蛋白是组织中胶原纤维的主要成分,胶原纤维广泛分布于人体各个组织。因此,胶原蛋白占人体蛋白质很大比例。我们根据 HYP 在胶原蛋白中含量最高这一属性,通过对肝组织中 HYP 的测定,可以了解肝脏中胶原蛋白的代谢情况,也可间接反映肝纤维化的程度和发展过程^[11-12]。当肝脏受到损伤因素的不断刺激时,多途径共同激活肝星状细胞转化为肌纤维母细胞,并促使表达大量的 α - SMA 蛋白,导致肝脏内的 ECM 合成增多,而降解减少,造成胶原大量沉积,于是肝纤维化逐渐形成。所以,大量的 α - SMA 蛋白表达,在肝纤维化的形成中起关键性作用^[13-14]。有报道显示^[15], α - SMA 阳性细胞主要集中在汇管区、纤维间隔内以及窦周间隙的间质细胞,随着肝纤维化的发展, α - SMA 阳性细胞数明显增多。因此,抑制 α - SMA 表达^[16]、促进 ECM 的降解^[17] 与否是促进肝纤维化逆转非常重要的靶点。

本实验结果显示,APS 中、高剂量明显抑制肝纤维化大鼠 Col-I 表达,且 APS 中、高剂量组大鼠肝脏组织中 α -SMA 表达量明显降低,表明 APS 抗肝纤维化的作用与其降低 Col-I、 α -SMA 表达有关。APS 可能是通过抑制 Col-I、 α -SMA 表达,来抑制 ECM 的生成并促进 ECM 的降解,从而发挥保护肝脏和抗肝纤维化的作用。

参考文献

- [1]江山,李芳.小柴胡汤对肝纤维化大鼠的抗肝纤维化作用[J].中药药理与临床,2013,29(1):17-19.
- [2]李小翠,洪鸿敏,李常青,等.甘草酸二铵对大鼠实验性肝纤维化的影响[J].中药材,2011,34(7):1097-1101.
- [3]王晓丽,张英博,李雪岩,等.大黄素对大鼠肝纤维化的影响及机理研究[J].中药药理与临床,2013,29(4):56-58.
- [4]何彪,白鹏飞,周涛,等.防己黄芪汤合五皮饮加味治疗肝硬化腹水 30 例临床观察[J].河北中医,2014,36(10):1487-1491.
- [5]Sun WY, Wang L, Liu H, et al. A standardized extract from *Paeonia lactiflora* and *Astragalus membranaceus* attenuates liver fibrosis induced by porcine serum in rats[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(3):491-498.
- [6]林红,蔡钢,杨百京,等.黄芪后处理对大鼠肝纤维化中的影响及 TGF- β 1/Smad2, p38MAPK 作用[J].世界科学技术-中医药现代化,2014,16(2):410-415.
- [7]何文涓,袁志坚,何晓升,等.黄芪多糖的药理作用研究进展[J].中国生化药物杂志,2012,33(5):692-694.
- [8]黄迪,古维立,胡志文,等.大鼠肝纤维化模型建立及肝纤维化的

检测[J].广州医药,2012,43(5):56-60.

- [9]Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins[J]. Semin Liver Dis, 1990, 10(1):1-10.
- [10]李季,叶军,薛冬英,等.桂枝茯苓丸抗大鼠肝纤维化作用及其机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):171-175.
- [11]Tao YY, Yan XC, Zhou T, et al. Fuzheng Huayu recipe alleviates hepatic fibrosis via inhibiting TNF- α induced hepatocyte apoptosis[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1):449.
- [12]Yuan Peng, Yanyan Tao, Qinglan Wang, et al. Ergosterol Is the Active Compound of Cultured Mycelium *Cordyceps sinensis* on Antiliver Fibrosis[J]. Vid Based Complement Alternat Med, 2014:1-12.
- [13]王玖恒,张园,李景强,等.白花丹提取物对肝纤维化大鼠的实验性研究[J].辽宁中医杂志,2012,39(12):2487-2489.
- [14]Atta H, El-Rehany M, Hammam O, et al. Mutant MMP-9 and HGF Gene Transfer Enhance Resolution of CCl₄-Induced Liver Fibrosis in Rats; Role of ASH1 and EZH2 Methyltransferases Repression[J]. PLoS One, 2014, 9(11):1-11.
- [15]郑亚江,周振华,任蒙,等.补肾柔肝方对肝纤维化大鼠肝组织病理学以及 α -SMA 蛋白表达的影响[J].现代中西医结合杂志,2014,23(34):3770-3773.
- [16]Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest, 2005, 115:209-218.
- [17]叶立红,王奎,杨莉,等.软肝化坚颗粒对肝纤维化模型 C57 小鼠肝组织 α -SMA、TGF β 1 表达和 I 型胶原水平的影响[J].临床肝胆病杂志,2012,28(9):685-688.

(2014-08-01 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 886 页)

- [6]周青.论中药的双向调节作用[J].亚太传统医药,2013,9(10):75-76.
- [7]金涛,金政鑫.浅谈中药的双向调节作用[J].求医问药,2013,11(11):157-158.
- [8]田红艳.浅析中药的双向调节作用[J].河北中医,2012,34(12):1700-1701.
- [9]张晓双,白黎明.论中药的双向调节作用[J].甘肃中医学院学报,2006,23(4):14.
- [10]李丽.大黄炮制前后物质基础变化规律研究[D].北京:中国中医药科学院,2011.

- [11]李燕,隋峰,刘亮亮,等.大黄各炮制品提取物泻下作用的比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,17(17):151-154.
- [12]张伟.大黄不同炮制品的功效研究与应用[J].长春中医药大学学报,2010,26(6):964-965.
- [13]戴作波.大黄炮制品与炮制方法对其主要化学成分的影响[J].临床合理用药,2012,5(9A):527.
- [14]沈海堡,张阳,王吉乐.大黄及其不同炮制品中蒽类衍生物的测定和比较[J].基层中药杂志,1996,10(2):40-41.
- [15]陈东东,李丽,张村等.提取温度和时间对大黄片主要蒽醌苷类成分的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,10(15):50-51.

(2014-08-03 收稿 责任编辑:张文婷)