

# 扶正化瘀组分复方抑制血管新生的抗肝纤维化作用机制

吕靖<sup>1</sup> 谭烨<sup>2</sup> 赵志敏<sup>3</sup> 黄恺<sup>3</sup> 沈丽<sup>2</sup> 陶艳艳<sup>2</sup> 刘平<sup>2</sup> 刘成海<sup>2,3,4,5</sup>

(1 上海中医药大学附属曙光医院·肝硬化科,上海,201203; 2 上海中医药大学附属曙光医院·肝病研究所,上海,201203; 3 上海市中医临床重点实验室,上海,201203; 4 上海高校中医内科学 E-研究院,上海,201203; 5 肝肾疾病病证教育部重点实验室,上海,201203)

**摘要** 目的:本研究旨在探讨扶正化瘀组分复方的抗肝纤维化作用及其作用机制。方法:采用 DMN 诱导小鼠肝纤维化模型,以扶正化瘀方为阳性对照。以天狼猩红染色和羟脯氨酸含量评估肝纤维化程度;肝脏微血管成像和 CD31 标记微血管密度评价肝脏血管新生;western blot 法检测肝组织 VEGF-R2 表达;通过计数转基因斑马鱼功能性节间血管数和碱性磷酸酶活性验证药物对血管的影响。结果:扶正化瘀组分复方可显著改善纤维化小鼠血清肝功能( $P < 0.01$ );减少肝组织胶原沉积( $P < 0.01$ );减少肝脏微血管数量( $P < 0.01$ );下调 VEGFR2 蛋白表达( $P < 0.01$ );抑制斑马鱼碱性磷酸酶活性。结论:扶正化瘀组分复方具有抑制 DMN 诱导小鼠肝纤维化模型肝组织纤维化的作用,其作用机制可能与抑制血管新生有关。

**关键词** 肝纤维化;血管新生;扶正化瘀组分复方

## Fuzheng Huayu components formula exerted anti-liver fibrosis through inhibiting angiogenesis

Lyu Jing<sup>1</sup>, Tan Ye<sup>2</sup>, Zhao Zhimin<sup>3</sup>, Huang Kai<sup>3</sup>, Shen Li<sup>2</sup>, Tao Yanyan<sup>2</sup>, Liu Ping<sup>2</sup>, Liu Chenghai<sup>2,3,4,5</sup>

(1 Department of liver cirrhosis, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2 Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3 Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine(14ZD2273200), Shanghai 201203, China; 4 E-institute of Shanghai Municipal Education Committee, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China, Shanghai 2012; 5 Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases (Shanghai University of Traditional Chinese Medicine), Ministry of Education, Shanghai 201203, China)

**Abstract Objective:** The purpose of this study is to investigate the mechanism of Fuzheng Huayu Components formula against Liver Fibrosis relating to Angiogenesis. **Methods:** Using DMN-induced liver fibrosis model in mice, Fuzheng Huayu formula as positive control. Liver fibrosis was estimated by Sirius red staining and hydroxyproline content assay. Liver angiogenesis was evaluated by liver tissue microvascular imaging analysis and MVD labeled by CD31. VEGF-R2 expression was observed by western blot. Zebrafish functional intersegmental vessels count and alkaline phosphatase activity was to investigate angiogenesis. **Results:** Fuzheng Huayu Components formula can alleviate liver function in DMN mice ( $P < 0.01$ ). Liver collagen deposition and hydroxyproline content were reduced significantly ( $P < 0.01$ ). The hepatic microvasculature reduced ( $P < 0.01$ ) with the VEGFR2 protein expression down regulated accordingly ( $P < 0.01$ ). It also inhibited alkaline phosphatase activity in zebrafish. **Conclusion:** Fuzheng Huayu Components formula inhibited liver fibrosis in DMN-treated mice. Its mechanism may be related to inhibit angiogenesis.

**Key Words** Liver fibrosis; Angiogenesis; Fuzheng Huayu Components formula

中图分类号:R575.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.02.009

血管新生是一个广泛存在的病理生理过程,表现为芽生性血管新生和套叠性血管新生,在生长发育、伤口愈合、心肌梗死、脑中风、肿瘤等方面均扮演着重要角色。近年研究表明,不仅肝癌的发生发展与血管新生密切相关,肝纤维化、肝硬化的发生发展也与血管新生有重要关联<sup>[1-5]</sup>。肝癌靶向药物布立

尼布(Brivanib)、索拉非尼(Sorafenib)和舒尼替尼(Sunitinib)等小分子受体酪氨酸激酶抑制剂,已被证实可抑制血管新生、减轻肝纤维化和降低门脉高压<sup>[6-8]</sup>。血管新生成为肝纤维化形成与逆转的关键环节。

作为抗纤维化中药新药的扶正化瘀胶囊,经临

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81173405);上海市医学领军人才计划(编号:LJ10005);上海中医药大学预算内项目(编号:2014YSN40)

作者简介:吕靖(1982—),女,浙江,博士,研究方向:中医药防治慢性肝病

通信作者:刘成海(1965—),男,教授、博士生导师,电话:(021)20256521, E-mail:chenghailiu@hotmail.com

床证实其肝组织纤维化逆转率为 52%<sup>[9]</sup>。但因该方组成成分复杂、药理活性多样,成为发展瓶颈。以该方为基础,通过分析、提炼其有效成分,并根据其药理活性重组成新的组分成分复方,为新一代抗肝纤维化中药研发奠定基础,是我们“十一五”重大科技专项的主要任务之一。在既往工作中,我们构建了肝肾纤维化中药新药发现与评价平台,发现了扶正化癥方主要效应成分,并以多种细胞模型(人肝细胞 LO2 细胞系过氧化损伤模型、人肝星状细胞 LX2 细胞系活化增殖模型、人肝癌内皮细胞 SK-HEP-1 细胞系损伤和活化增殖模型)进行药效评价,据此优化组合为新的组分复方(丹参酮 II A:丹酚酸 B:虫草素:扁桃苷:槲皮素:原人参三醇:五味子乙 = 1:1:1:1:1:1:1)。本文旨在采用整体动物模型对该组分复方进行进一步药效评价,并探讨其部分作用机制。

## 1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠,雄性,5 周龄,(25 ± 1)g,SPF 级,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。所有小鼠饲养于上海中医药大学动物实验中心 SYXK(沪)2009-0069,自由饮食。

血管内皮生长因子受体 2-绿色荧光蛋白转基因斑马鱼(VEGFR2-GFP Transgenic Zebrafish Lines),源于山东省科学院生物研究所。

1.2 药品 扶正化癥方(FZHY)(国药准字 Z20050546),24 g/剂,含丹参 4 g,桃仁 2 g,绞股蓝 6 g,松花粉 2 g,虫草菌丝 8 g,五味子 2 g。其浸膏粉由上海现代中医药技术发展公司提供。PTK787,VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂,购自 Sigma。丹参酮 II A、丹酚酸 B、虫草素、扁桃苷、槲皮素、原人参三醇、五味子乙购自上海融禾医药科技发展有限公司。

## 2 方法

2.1 肝纤维化模型的制备 N-亚硝基二甲胺(N-Nitrosodimethylamine, NDMA)配制成 0.1% (V/V) NDMA 溶液,以 0.05 mL/10 g 腹腔注射,1 次/d,共 3 周。

2.2 分组与用药 ICR 小鼠,雄性,5 周龄,(25 ± 1)g,随机分为正常对照组 8 只,正常加组分复方对照组 8 只,模型对照组 12 只,扶正化癥方组 11 只,扶正化癥组分复方低、中、高剂量各组每组 12 只。自第 5 周开始灌,按 0.1 mL/10 g 计算,每日 2 次,共 3 周。其中扶正化癥方组以 48 mg/(10 g · d) 剂量灌胃,扶正化癥组分复方(丹参酮 II A:丹酚酸 B:虫草素:扁桃苷:槲皮素:原人参三醇:五味子乙 = 1:1:

1:1:1:1:1)低、中、高剂量组分别以(0.05 × 7) μmol/(10 g · d)、(0.1 × 7) μmol/(10 g · d)、(0.2 × 7) μmol/(10 g · d) 剂量灌胃,正常加组分复方组不建模,按组分复方高剂量给药。

2.3 血清肝功能检测 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)测定,赖式比色法;白蛋白(Alb)测定,溴甲酚绿比色法;乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AchE)测定,乙酰胆碱羟胺法;总胆固醇(Total Cholesterol, TC)测定,胆固醇酯氨基安替吡啉法。

2.4 肝组织病理染色 肝组织经 4% 甲醛液固定,石蜡包埋,4 μm 切片,二甲苯、多级乙醇脱蜡至水,天狼猩红染色,并用 Olympus IX70 倒置显微镜拍摄。

2.5 肝组织纤维化生化测定 组织羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)含量测定,参照 Jamall's 盐酸水解法<sup>[10]</sup>;组织单胺氧化酶(Monoamine Oxidases, MAO),茚胺环己烷法;组织脯氨酰羟化酶(Prolyl Hydroxylase, PH),免疫法。

2.6 同步辐射 X 线二维成像肝脏血管 每只鼠留取一整叶肝脏,经 4% 甲醛液固定,梯度乙醇脱水,采用 9 μm 探测器,X 线二维成像观察肝脏血管,实验于上海光源 X 线成像及生物医学应用光束(BL13W1)线站完成。图像重组,采用 image-pro plus 6.1 图像分析软件,在三级血管区域随机选取 3 个相同面积视野,对视野内血管长度进行求和,并求平均值。

2.7 免疫荧光染色及微血管密度计算 肝组织冰冻切片 7 μm,冰丙酮固定 10 min, PBS 洗涤 2 次,0.2% 小牛血清白蛋白室温封闭 1 h,一抗 37 °C 孵育 90 min, PBS 洗涤 3 次,相应的荧光二抗 37 °C 孵育 1 h, DAPI 染核 5 min, PBS 洗涤 3 次,抗荧光淬灭封片液封片,荧光显微镜下观察。参照 Weidner 等<sup>[11]</sup>的方法通过免疫荧光检测 CD31 蛋白表达计算微血管密度(Microvessel Density, MVD),低倍镜下观察整个切片,寻找血管密度最高的区域,然后高倍镜下每张切片随机选取 5 个视野,采用 image-pro plus 6.1 图像分析软件计算每个视野内染微血管数目,并求平均值。

2.8 转基因斑马鱼分组与用药 随机分为空白对照组、阳性对照 PTK787 组、扶正化癥方组、扶正化癥组分复方低、中、高剂量组。体式显微镜下挑选发育 24 h 的 VEGFR2-GFP 转基因斑马鱼胚胎,移入 96 孔板,每孔一个。样孔中已预先加入受试溶液,每 5 孔一组,让胚胎继续发育至 48 h,麻醉,荧光显微镜下观察,记录节间血管血流数。4% 多聚甲醛固定,

脱水,透化,碱性磷酸酶染色,显微镜下拍照。由山东省科学院生物研究所检测完成。

2.9 统计学处理 计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有数据均使用 SPSS 12.0 软件包进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 组分复方对肝纤维化小鼠肝功能的影响 与正常组比,模型组谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨

酶 (AST) 明显升高 ( $P < 0.01$ ),白蛋白 (Alb)、乙酰胆碱酯酶 (AchE)、总胆固醇 (TC) 显著下降 ( $P < 0.01$ );正常加组分复方组 TC 亦显著下降 ( $P < 0.01$ );与模型组比,扶正化癥方和组分复方各组 ALT、AST 显著下降,Alb、AchE、TC 显著升高 ( $P < 0.01$ );与扶正化癥方组相比,组分复方低剂量组 ALT 较高 ( $P < 0.01$ ),组分复方各组 AchE (中、高剂量)、TC 较低 ( $P < 0.05$ )。(见表 1)。

表 1 组分复方对 DMN 诱导肝纤维化小鼠肝肝功能的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 鼠数 | ALT(U/L)                  | AST(U/L)                 | Alb(g/L)                 | AchE(U/mL)              | TC(mmol/L)                 |
|---------|----|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 正常对照    | 8  | 24.2 ± 2.7                | 19.3 ± 0.5               | 35.3 ± 0.6               | 523 ± 19                | 4.14 ± 0.23                |
| 正常加组分复方 | 8  | 24.2 ± 1.6                | 19.5 ± 1.2               | 35.6 ± 0.5               | 518 ± 16                | 3.48 ± 0.17**              |
| 模型对照    | 12 | 67.9 ± 9.6**              | 53.4 ± 6.1**             | 26.5 ± 0.8**             | 381 ± 20**              | 1.48 ± 0.19**              |
| 扶正化癥方对照 | 11 | 45.6 ± 13.6 <sup>△△</sup> | 37.4 ± 3.8 <sup>△△</sup> | 37.9 ± 0.4 <sup>△△</sup> | 492 ± 22 <sup>△△</sup>  | 3.25 ± 0.20 <sup>△△</sup>  |
| 组分复方低剂量 | 12 | 66.0 ± 11.6 <sup>▲▲</sup> | 37.3 ± 4.7 <sup>△△</sup> | 38.8 ± 0.8 <sup>△△</sup> | 476 ± 11 <sup>△△</sup>  | 3.70 ± 0.18 <sup>△△▲</sup> |
| 组分复方中剂量 | 12 | 46.1 ± 10.5 <sup>△△</sup> | 37.8 ± 5.4 <sup>△△</sup> | 37.7 ± 0.4 <sup>△△</sup> | 466 ± 19 <sup>△△▲</sup> | 2.99 ± 0.14 <sup>△△▲</sup> |
| 组分复方高剂量 | 12 | 42.9 ± 11.4 <sup>△△</sup> | 38.6 ± 2.9 <sup>△△</sup> | 37.3 ± 0.8 <sup>△△</sup> | 460 ± 15 <sup>△△▲</sup> | 2.85 ± 0.15 <sup>△△▲</sup> |

注:\*\*与正常对照组比, $P < 0.01$ ;<sup>△△</sup>与模型对照组比, $P < 0.01$ ;<sup>▲▲</sup>与扶正化癥方组比, $P < 0.01$ ;<sup>▲</sup>与扶正化癥方组比, $P < 0.05$ 。

3.2 组分复方对肝纤维化小鼠肝组织胶原沉积的影响 天狼猩红染色结果显示:正常组和正常加组分复方对照组小鼠汇管区可见少量胶原沉积;与正常组比,模型组小叶结构破坏,汇管区胶原纤维沉积、延伸,相互交联形成多个假小叶结构;与模型组比,扶正化癥方和组分复方低、中、高剂量组胶原纤维沉积均不同程度地减轻(见图 1)。肝组织羟脯氨酸(Hyp)、组织单胺氧化酶(MAO)、组织脯氨酰羟化酶(PH)结果显示:与正常组相比,模型组 Hyp、MAO、PH 显著升高( $P < 0.01$ ),正常加组分复方组无统计学意义;与模型组比,扶正化癥组及组分复方治疗组 Hyp、MAO、PH 均有明显降低( $P < 0.01$ );与扶正化癥组比,组分复方高剂量组 MAO、PH 显著降低( $P < 0.05$ );组分复方各组随着药物剂量加大 Hyp、MAO、PH 检测值逐渐降低(见表 2)。

表 2 组分复方对 DMN 诱导肝纤维化小鼠肝组织 Hyp、MAO、PH 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 鼠数 | Hyp(mg/g)                   | MAO(U/g)                   | PH(U/g)                   |
|---------|----|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 正常对照    | 8  | 0.186 ± 0.020               | 21.9 ± 2.9                 | 30.5 ± 3.6                |
| 正常加组分复方 | 8  | 0.183 ± 0.017               | 21.6 ± 4.7                 | 30.0 ± 1.8                |
| 模型对照    | 12 | 0.299 ± 0.024**             | 63.8 ± 10.3**              | 50.3 ± 2.5**              |
| 扶正化癥方对照 | 11 | 0.246 ± 0.028 <sup>△△</sup> | 50.4 ± 6.3 <sup>△△</sup>   | 45.1 ± 2.4 <sup>△△</sup>  |
| 组分复方低剂量 | 12 | 0.254 ± 0.029 <sup>△△</sup> | 52.5 ± 9.3 <sup>△△</sup>   | 46.0 ± 2.5 <sup>△△</sup>  |
| 组分复方中剂量 | 12 | 0.253 ± 0.024 <sup>△△</sup> | 50.4 ± 9.0 <sup>△△</sup>   | 44.2 ± 2.0 <sup>△△</sup>  |
| 组分复方高剂量 | 12 | 0.252 ± 0.034 <sup>△△</sup> | 45.6 ± 10.2 <sup>△△▲</sup> | 41.1 ± 3.2 <sup>△△▲</sup> |

注:\*\*与正常对照组比, $P < 0.01$ ;<sup>△△</sup>与模型对照组比, $P < 0.01$ ;<sup>▲</sup>与扶正化癥方组比, $P < 0.05$ 。

3.3 组分复方对肝纤维化小鼠肝组织微血管的影响 同步辐射 X 线二维成像肝脏血管显示:正常组和正常加组分复方组肝血管各级支粗细适中边缘清楚;模型组肝血管各级分支明显增多伴走行杂乱呈网状,可见部分微血管扭曲,且全叶血管边缘粗糙;与模型组比,扶正化癥方组和组分复方低、中、高剂量组各级分支稍多,部分血管边缘粗糙,有所改善(图 2A)。图像分析软件结果显示:与正常组比,模型组相对血管长度明显增加( $P < 0.01$ ),正常加组分复方组无统计学意义;与模型组比,扶正化癥方组相对血管长度明显减少( $P < 0.01$ ),组分复方中、高剂量组相对血管长度有所减少( $P < 0.05$ )(图 2C)。CD31 标记肝脏血管并计算微血管密度(MVD)结果也证实上述结果。正常组和正常加组分复方组肝组织表达少量 CD31;与正常组比,模型组肝组织 CD31 阳染及 MVD 明显增加( $P < 0.01$ );与模型组比,扶正化癥方及组分复方各组 CD31 表达及 MVD 计数

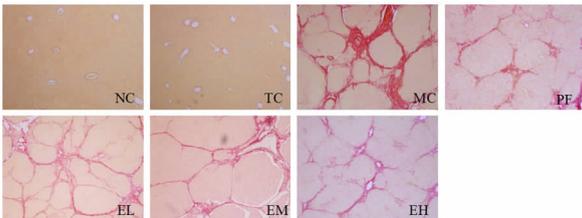


图 1 组分复方降低肝纤维化小鼠肝组织胶原沉积(sirius red 染色, × 200)

注:NC:正常对照组,TC:正常加组分复方对照组,MC:模型对照组,PF:扶正化癥方对照组,EL:组分复方低剂量组,EM:组分复方中剂量组,EH:组分复方高剂量组。下同。

明显减少 ( $P < 0.01$ ); 与扶正化癥方组相比, 各组分复方治疗组微血管密度无统计学意义 (图 2B) (图 2D)。

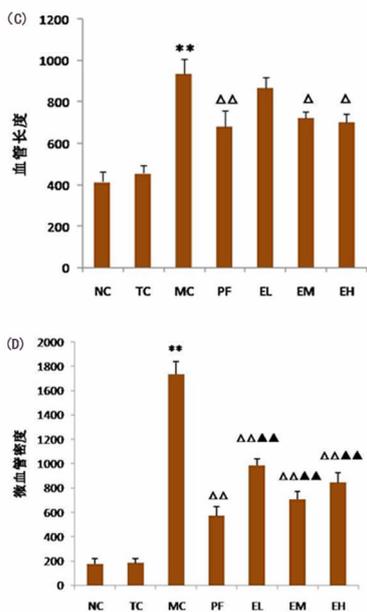
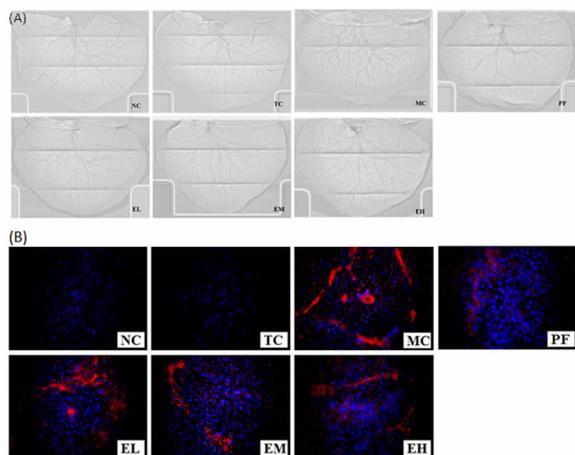


图 2 组分复方改善肝纤维化小鼠肝组织血管情况

注: (A) 同步辐射 X 线二维成像 (B) CD31 免疫荧光染色 (C) A 图血管长度半定量分析 (D) CD31 标记微血管密度计算. \*\*与正常对照组比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta\Delta$ 与模型对照组比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta$ 与模型对照组比,  $P < 0.05$ ;  $\Delta\Delta$ 与扶正化癥方组比,  $P < 0.01$ 。

3.4 组分复方对肝纤维化小鼠肝组织 VEGFR2 表达的影响 Western Blot 结果显示: 与正常组比, 模型组 VEGF-R2 表达上调 35.0% ( $P < 0.01$ ), 正常加组分复方组未见统计学意义; 与模型组比, 扶正化癥与组分复方各组 VEGF-R2 表达均可见不同程度的下调 ( $P < 0.01$ ); 与扶正化癥方组比, 各组分复方组 VEGF-R2 表达有所下降 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

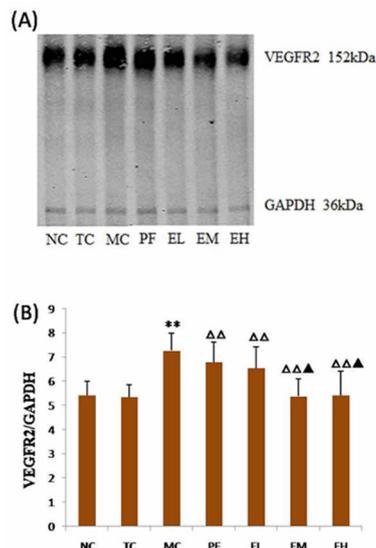


图 3 组分复方下调肝纤维化小鼠肝组织 VEGF-R2 表达

注: (A) VEGF-R2 蛋白表达, western blot 法; (B) VEGF-R2/GAPDH 光密度值分析, 实验重复 3 次, 以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示. \*\*与正常对照组比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta\Delta$ 与模型对照组比,  $P < 0.01$ ;  $\Delta$ 与模型对照组比,  $P < 0.05$ ;  $\Delta\Delta$ 与扶正化癥方组比,  $P < 0.01$ 。

3.5 组分复方对 VEGFR2-GFP 斑马鱼功能性节间血管计数和碱性磷酸酶活性的影响 与空白对照组比, 阳性对照 PTK787 组 (PP) 功能性节间血管数完全抑制 ( $P < 0.01$ ), 扶正化癥方组 (PF) 功能性节间血管数明显抑制 ( $P < 0.05$ ), 各组分复方组功能性节间血管数略有抑制趋势, 但无统计学意义; 各组分复方组相比, 随着剂量加大, 功能性节间血管数呈进一步减少趋势, 但无统计学意义。(见图 4A, 表 3)。与正常对照组相比, PP 组碱性磷酸酶活性完全降低, PF 组与各组分复方组碱性磷酸酶活性均有明显降低 (见图 4B)。

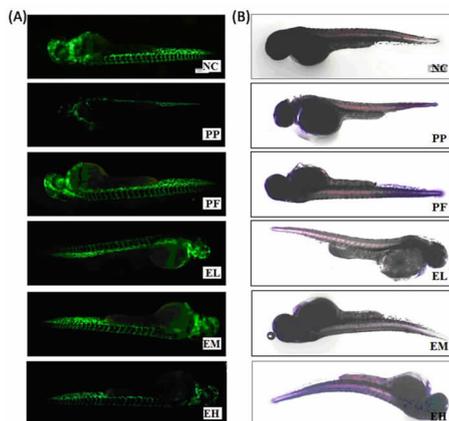


图 4 扶正化癥组分复方抑制斑马鱼血管生成减少功能性节间血管 (图 A), 降低碱性磷酸酶活性 (图 B)

表3 扶正化瘀组分复方对斑马鱼功能性节间血管计数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | 斑马鱼数 | 功能血管数         |
|----------|------|---------------|
| 空白对照组    | 5    | 26.67 ± 2.67  |
| PTK787组  | 5    | 0**           |
| 扶正化瘀方组   | 5    | 20.53 ± 1.52* |
| 组分复方低剂量组 | 5    | 25.25 ± 2.07  |
| 组分复方中剂量组 | 5    | 25.02 ± 2.49  |
| 组分复方高剂量组 | 5    | 24.55 ± 2.28  |

注: \* 与正常对照组相比,  $P < 0.05$ ; \*\* 与正常对照组相比,  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

肝纤维化是由不同病因所致的慢性肝病进展至肝硬化的必经过程, 积极防治肝纤维化具有重要意义<sup>[12-15]</sup>。在对肝纤维化的自然发展史及抗肝纤维化疗效的分析中, 我们认识到: 即使同一病因引起的肝硬化, 其发生发展速度也不同, 而且对同一干预药物的反应也不一致。除了宿主因素即机体的基因背景、饮食生活环境外, 肝纤维化自身特点也是一个重要因素。肝纤维化可分为静止性和活动性两类, 病理上活动性肝纤维化呈现纤维间隔中血管新生活跃的特点。此外, 目前研究证实, 肝血管新生与肝纤维化密切相关, 其既在纤维化之前发生, 又伴随纤维化的进展不断加重, 从而构成肝纤维化难以逆转及门脉高压的病理生理基础, 且为肝硬化并发症包括肝癌发生发展的重要因素, 而抑制肝血管新生可以逆转实验性肝纤维化。荧光血管造影术可见肝硬化大鼠肝脏显著的血管新生, 形成一个杂乱无章的血管网络, 与肝窦结构与功能异常有关<sup>[8]</sup>。使用受体酪氨酸激酶抑制剂 Brivanib<sup>[6]</sup>、Sorafenib<sup>[7]</sup> 或 Sunitinib<sup>[8]</sup> 干预血管新生, 可减轻肝纤维化。综上所述, 血管新生性肝纤维化是肝硬化发展的重要病理基础, 因此, 基于肝血管新生发现有效活性药物及其相应作用机制有重要意义。

本实验研究结果表明: 1) 扶正化瘀组分复方可减轻 DMN 诱导的肝纤维化模型小鼠肝组织纤维化: 肝组织 Hyp 含量、天狼猩红染色结果证实了这一点。2) 扶正化瘀组分复方可抑制血管新生: 一方面, 可改善肝纤维化小鼠肝组织微血管、降低 CD31 阳染微血管密度, 下调 VEGF-R2 蛋白表达; 另一方面, 可抑制 VEGFR2-GFP 斑马鱼碱性磷酸酶活性。

肝脏的血管新生不同于其他器官, 有其特殊性, 主要原因是存在两种不同的微血管结构: 大血管和肝窦, 前者是连续性血管内皮, 后者是具有窗孔结构的非连续性内皮。前者表现为 CD31、vWF 等连续

性血管内皮标志物表达增加, 也就是微血管密度增加; 而后者则不然, 主要表现为肝窦内皮细胞去分化。正常的肝窦内皮细胞 (LSEC) 在胚胎发育早期就失去了连续性内皮标志物 CD31, 分化形成大量筛状排列的窗孔结构, 利于肝细胞与血液之间进行活跃的物质交换。肝纤维化时, 肝窦微环境发生改变, LSEC 发生去分化 (失去窗孔结构, 重新表达连续性内皮标志物 CD31), 内皮下形成连续性基底膜, 从而使肝窦出现了毛细血管化的血管结构—肝窦毛细血管化。因此, 连续性血管内皮标志物表达增加是肝脏大血管和肝窦发生血管新生的共同表征。实验中我们看到 DMN 诱导的肝纤维化模型小鼠肝血管成像纹理粗糙、血管分支及微血管数增多、走行紊乱, 且肝组织连续性血管内皮标志物 CD31 表达增加, 而扶正化瘀组分复方具有改善肝血管纹理、减少 CD31 表达的作用。从血管新生的发生机理上看, 肝窦内皮细胞是肝脏血管新生的重要细胞学基础, 而 VEGF 信号通路是促血管新生的重要分子病理机制。肝纤维化时肝窦内皮细胞发生表型改变, CD31 表达增加, 同时针对肝纤维化缺血缺氧环境, 各种促血管生成因子如 VEGF、Angiopoietin-1、PDGF 等释放增加<sup>[16]</sup>。VEGF 与其受体 VEGFR2 结合, 通过丝裂原活化蛋白激酶/胞外信号调节激酶信号途径, 促进血管新生和纤维化<sup>[17]</sup>。

本动物实验结果表明, 扶正化瘀组分复方可具有抗 DMN 小鼠肝纤维化的作用, 其机制与抑制肝血管新生有关。与扶正化瘀全方相比疗效相当, 也一定程度证实了“组分复方源于原方、成分明确、疗效又可等同原方甚至高于原方”这一研究思路的可行性。

#### 参考文献

- [1] Thabut D, Shah V. Intra angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? [J]. J Hepatol, 2010, 53(5): 976-980.
- [2] Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, et al. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications [J]. Liver Int, 2011, 31(2): 146, 162.
- [3] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. Nature, 2011, 473(7347): 298-307.
- [4] Fernandez M, Semela D, Bruix J, et al. Angiogenesis in liver disease [J]. J Hepatol, 2009, 50(3): 604-620.
- [5] Zhang Z, Zhang F, Lu Y, et al. Update on implications and mechanisms of angiogenesis in liver fibrosis [J]. Hepatol Res, 2014, Sep 5. doi: 10.1111/hepr.12415.
- [6] Lin HC, Huang YT, Yang YY, et al. Beneficial effects of dual vascular endothelial growth factor receptor / fibroblast growth factor receptor inhibitor brivanib alaninate in cirrhotic portal hypertensive rats [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, 29(5): 1073-1082.

- [7] Meijas M, Garcia-Pras E, Tiani C, et al. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats[J]. *Hepatology*, 2009, 49(4): 1245 - 1256.
- [8] Tugues S, Fernandez-Varo G, Munoz-Luque J, et al. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats[J]. *Hepatology*, 2007, 46(6): 1919 - 1926.
- [9] Liu C, Hu Y, Xu L, et al. Effect of Fuzheng Huayu formula and its actions against liver fibrosis[J]. *Chin Med*, 2009, 4: 12.
- [10] Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues[J]. *Anal Biochem*, 1981, 112(1): 70 - 75.
- [11] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1 - 8.
- [12] Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis[J]. *Lancet*, 2014, 383(9930): 1749, 1761.
- [13] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 425, 456.
- [14] Friedman SL. Mechanisms of fibrogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655, 1669.
- [15] Popov Y, Schuppan D. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies[J]. *Hepatology*, 2009, 50(4): 1294 - 1306.
- [16] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 677 - 684.
- [17] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis[J]. *Gut*, 2003, 52(9): 1347 - 1354.

(2014 - 12 - 26 收稿 责任编辑: 洪志强)

## 经方专业委员会成立大会暨第一届学术年会在京召开

2014年12月13日,世界中医药学会联合会经方专业委员会成立大会在北京中医药大学隆重召开。世界中医药学会联合会徐春波副秘书长,国医大师、北京中医药大学王琦教授,北京中医药大学徐安龙校长,北京中医药大学原副校长王庆国教授,以及来自马来西亚、日本、中国香港、中国澳门、中国台湾等地的经方专家300余人出席了此次大会。

世界中联副秘书长徐春波教授代表世界中联致辞,学术部王晶副主任宣读了《关于同意召开世界中医药学会联合会经方专业委员会成立大会的批复》及经方专业委员会第一届理事会成员名单。王琦、梅国强、聂惠民为学术顾问,选举北京中医药大学原副校长王庆国教授为第一届理事会会长,李宇航等16人为副会长,理事会共计196人。

徐安龙校长对所有参会的海内外专家表示热烈欢迎。徐校长指出推动中医学术发展需要重视经典、倡导经方,学校也将从政策和资源上加大支持,从师资培养、教学改革等方面加强四大经典的考核力度;从科研方面支持学者从事经方研究,并提及自己也在做经方研究相关的课题。徐校长坚信:经方专业委员会将高举传承经典大旗,带领学术界、教育界走出一条发展现代中医的道路。

国医大师王琦教授从学术探讨的角度,以“经方应用抓住三个纲”为主题展开论述,通过经方临床应用的病例,强调三个原则;以葛根芩连汤治喘为例强调经方应用要“抓原著、抓原貌”;以有是证辨是方病案举例的方式强调经方应用要“抓住仲景的汤方辨证”;以表里同治、温燥同用等治法强调经方应用要“抓住经方的法度”,给人以深刻启发。

王庆国会长对各位专家为经方专业委员会成立做出的辛勤奉献和大力支持表示衷心的感谢,他指出经方具有悠久的历史,目前是中医教学、科研、临床应用等方面的重要载体。经方专业委员会一定会在世界中医药学会联合会的领导下,遵循宗旨,推进中医药在世界范围的传播,努力打造学术研究的平台、加强学术交流的平台、搭建学术推进的平台,将经方的影响拓展至全世界,相信在各位专家的支持下,经方专业委员会今后一定可以为经方的发展,为中医药事业的发展,为中医药在全球的推广写下光辉灿烂的一页。

开幕式结束后,举行了世界中联经方专业委员会第一届学术研讨会。王庆国、戴昭宇、温桂荣、姜德友、傅延龄、李宇航等海内外知名的仲景学术及经方运用的专家进行了8场精彩的学术报告。本次大会取得了圆满成功。