

# 氧化苦参碱对肝纤维化大鼠 Smad 基因表达的影响

曾维政, 吴晓玲, 蒋明德

曾维政, 蒋明德, 成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083  
吴晓玲, 重庆医科大学附属一院消化内科 重庆市 400016  
曾维政, 男, 1961-12-20 生, 湖南省邵阳市人, 汉族. 主任医师, 教授, 第三军医大学研究生导师. 主要从事肝纤维化防治的基础与临床研究.  
成都军区“十五”医药科研基金课题, NO. 01A009  
通讯作者: 曾维政, 610083, 四川省成都市天回镇, 成都军区总医院消化内科.  
zengweizheng@163.com  
电话: 028-83577558  
收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-03

## Effect of oxymatine on Smad gene expression in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in rats

Wei-Zheng Zeng, Xiao-Ling Wu, Ming-De Jiang

Wei-Zheng Zeng, Ming-De Jiang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China  
Xiao-Ling Wu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China  
Supported by Medical Scientific Foundation of Chengdu Command, NO.01A009  
Correspondence to: Wei-Zheng Zeng, General Hospital of Chinese PLA Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. zengweizheng@163.com  
Received: 2005-02-14 Accepted: 2005-03-03

### Abstract

**AIM:** To study the effect of oxymatine in the prevention of experimental hepatic fibrosis in rats induced by chronic administration of CCl<sub>4</sub>, to evaluate its effect on gene expression of Smad 4, Smad 7, and to explore its potential anti-fibrotic mechanism.

**METHODS:** Healthy male SD rats were randomly divided into three groups: the normal group ( $n=10$ ), the oxymatine treatment group ( $n=40$ ) and the fibrosis group ( $n=40$ ). Hepatic fibrosis was induced by subcutaneous injection of CCl<sub>4</sub> (300 mL/L, 3 mL/kg, twice per wk for 8 wks). The rats in the treatment group received celiac injection of oxymatine at 10 mg/kg twice a week. The deposition of collagen was examined with Masson staining. Gene expression of Smad 4 and Smad 7 was detected by *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IH), respectively. The data were analyzed with specific software.

**RESULTS:** Reduction of collagen deposition and rearrangement of the parenchyma were noted in oxymatine-treated rats. The semi-quantitative histological scores ( $1.9\pm 0.3$  vs

$3.6\pm 0.8$ ,  $P<0.05$ ) and average area of collagenous fibre [ $(94\pm 37)\mu\text{m}^2$  vs  $(691\pm 189)\mu\text{m}^2$ ,  $P<0.01$ ] in treatment group were decreased. The expression of Smad 7 was increased, whereas the expression of Smad 4 was decreased considerably in treated animals. The positive rate of Smad 4 mRNA ( $0.31\pm 0.12$  vs  $0.62\pm 0.23$ ,  $P<0.05$ ) and Smad 4 protein [ $(2.33\pm 1.64)\%$  vs  $(9.56\pm 1.34)\%$ ,  $P<0.05$ ] were lower in treatment group. In contrast, the positive rate of Smad 7 mRNA ( $0.26\pm 0.11$  vs  $0.16\pm 0.03$ ,  $P<0.05$ ) and Smad 7 protein [ $(4.27\pm 0.43)\%$  vs  $(2.86\pm 0.86)\%$ ,  $P<0.05$ ] were increased considerably in treated animals.

**CONCLUSION:** Oxymatine can promote the gene expression of Smad 7 and inhibit the expression of Smad 4.

**Key Words:** Oxymatine; Smad; Hepatic fibrosis; CCl<sub>4</sub>

Zeng WZ, Wu XL, Jiang MD. Effect of oxymatine on Smad gene expression in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(8):984-987

### 摘要

**目的:** 研究氧化苦参碱(oxymatine, 苦参素)对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠肝组织 Smad 基因表达的影响。

**方法:** SD 大鼠 90 只分为正常对照组(C 组)、模型组(M 组)和苦参素干预组(T 组)。CCl<sub>4</sub> sc 诱导大鼠肝纤维化, 干预组大鼠在造模的同时给予苦参素注射液 ip, 正常对照组给予液体石蜡 sc 和生理盐水 ip, 8 wk 实验结束时处死动物。HE 和 Masson 染色观察大鼠肝组织病理学变化和胶原沉积, 原位杂交和免疫组化检测 Smad 4, Smad 7 基因表达情况。

**结果:** 氧化苦参碱干预组大鼠肝半定量组织学积分( $1.9\pm 0.3$  vs  $3.6\pm 0.8$ ,  $P<0.05$ )和胶原面积( $94\pm 37$  vs  $691\pm 189 \mu\text{m}^2$ ,  $P<0.05$ )明显减少; Smad 7 蛋白表达阳性率增加 [ $(5.09\pm 0.68)\%$  vs  $(2.86\pm 0.86)\%$ ,  $P<0.05$ ]; Smad 4 蛋白表达阳性率减少 [ $(2.33\pm 1.64)\%$  vs  $(9.56\pm 1.34)\%$ ,  $P<0.05$ ]; Smad 4 mRNA 表达阳性率显著减少 ( $0.31\pm 0.12$  vs  $0.62\pm 0.23$ ,  $P<0.05$ ); Smad 7 mRNA 的表达则明显增加 ( $0.26\pm 0.11$  vs  $0.16\pm 0.03$ ,  $P<0.05$ )。

**结论:** 氧化苦参碱能抑制 Smad 4 基因表达, 促进 Smad 7 基因表达。

**关键词:** 氧化苦参碱; Smad; 肝纤维化; 四氯化碳

曾维政, 吴晓玲, 蒋明德. 氧化苦参碱对肝纤维化大鼠 Smad 基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(8):984-987  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/984.asp

## 0 引言

氧化苦参碱(苦参素, oxymatrine)是从苦参及同属(豆科槐属)植物如广豆根和苦豆子等植物中提取出来的主要活性成分, 具有保护肝细胞、抗乙肝病毒、调节免疫等多种功效<sup>[1]</sup>, 还具有良好的抗肝纤维化作用<sup>[2-5]</sup>, 是肝病用药中极具前途的临床药物. 观察氧化苦参碱对 CCl<sub>4</sub> 诱导纤维化大鼠肝脏 Smad 4, Smad 7 基因表达的影响, 从分子水平探讨氧化苦参碱干预实验性大鼠肝纤维化的分子机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 质量 150 ± 10 g 健康雄性 SD 大鼠购自华西医科大学实验动物中心. 化学纯 CCl<sub>4</sub> (成都联合化工试剂研究所), 氧化苦参碱注射液(商品名博尔泰力注射液, 100 mg/支, 宁夏绿谷药业有限公司生产), Smad4, Smad7 抗体及免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程公司), Smad4, Smad7 探针及原位杂交试剂盒(上海申能生物工程公司).

1.2 方法 健康雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组(C组)10只, 苦参素干预组(T组)40只, 模型对照组(M组)40只, 各组间暴露因素无差别( $P > 0.05$ ). 用 300 mL/L CCl<sub>4</sub> 石蜡油溶液, 3 mL/kg sc, 每 wk 2 次, 共 8 wk 诱导大鼠肝纤维化模型. 氧化苦参碱干预组在造模的同时给予 50 g/L 注射液, 10 mg/kg, ip, 每 wk 2 次, 共 8 wk, CCl<sub>4</sub> 模型组造模同时予生理盐水 ip, 正常对照组予等量石蜡油 sc 和生理盐水 ip 处理. 各组动物在最后一次 CCl<sub>4</sub> 注射后 48 h 处死, 取肝组织以中性甲醛溶液固定、石蜡包埋, 以多聚赖氨酸涂布的载玻片制作 3 μm 组织切片, 进行 HE 染色和 Masson 三重胶原染色作组织病理学检查; 免疫组织化学(SABC)方法检测 Smad 4, Smad7 蛋白表达水平, 原位杂交(*in situ* hybridization)法检测 Smad 4,

Smad 7 mRNA 表达水平, 检测步骤参考试剂说明书进行. Smad 4 mRNA 探针序列(5' → 3'): Biotin- GGT GGC GTT AGA CTC TGC CGG GGC TAA CAG(1035-1064 bp, GC% = 63.33), Smad 7 mRNA 探针序列(5' → 3'): Biotin-GAG CTG TCC GAG GCA AAA GCC ATT CCC CTG(2 310-2 339 bp, GC% = 60.00), 以生物素标记探针, 碱性磷酸酶搭桥, BCIP/NBT 显色反应, 光学显微镜下观察结果. 胶原纤维染色、Smad 蛋白及其 mRNA 表达结果均使用日本 Nikon TE2000-H 倒置显微镜采集图像, 美国 Image-Pro Plus 专业图像软件分析系统专进行数据采集.

**统计学处理** 胶原面积、IH, ISH 表达阳性率均以 mean ± SD 表示, Excel 2000 统计软件进行 *t* 检验分析.

## 2 结果

2.1 肝组织病理学改变 正常肝组织肝小叶结构清晰, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列; 肝纤维化模型大鼠肝细胞呈广泛脂肪变性、坏死, 炎性细胞浸润以汇管区及中央静脉周围为重, 肝小叶结构破坏; Masson 胶原染色见蓝色胶原纤维明显增多, 汇管区-中央静脉区纤维间隔宽大, 包绕分隔肝小叶, 部分形成假小叶, 肝纤维化组织学半定量积分为 3.6 ± 0.8; 苦参素干预性治疗组大鼠肝细胞变性、坏死较轻, 有少量纤维组织增生, 部分向小叶内伸展, 形成纤细的纤维间隔, 肝小叶结构基本完整, 肝纤维化组织学半定量积分为 1.9 ± 0.3; 计算机图像分析正常大鼠肝脏平均胶原面积为 56 ± 21 μm<sup>2</sup>, 模型组大鼠显著增加为 (691 ± 189) μm<sup>2</sup>, 二者差异非常显著 ( $P = 0.008$ ,  $P < 0.01$ ), 苦参素干预组肝脏胶原面积则减少为 (94 ± 37) μm<sup>2</sup>, 与模型组比较差异显著 ( $P = 0.042$ ,  $P < 0.05$ , 图 1 A-B).

2.2 大鼠肝组织 Smad 4 表达 免疫组化检测显示, 正常对照组大鼠肝脏仅有个别间质细胞显示 Smad 4 蛋白阳性染色, 模型组大鼠肝组织 Smad 4 蛋白表达明显增强, 阳性染色信号呈棕黄色颗粒状, 主要位于汇管区的间质细胞胞质, 其平均表达阳性率为 (9.56 ± 1.34)%, 苦

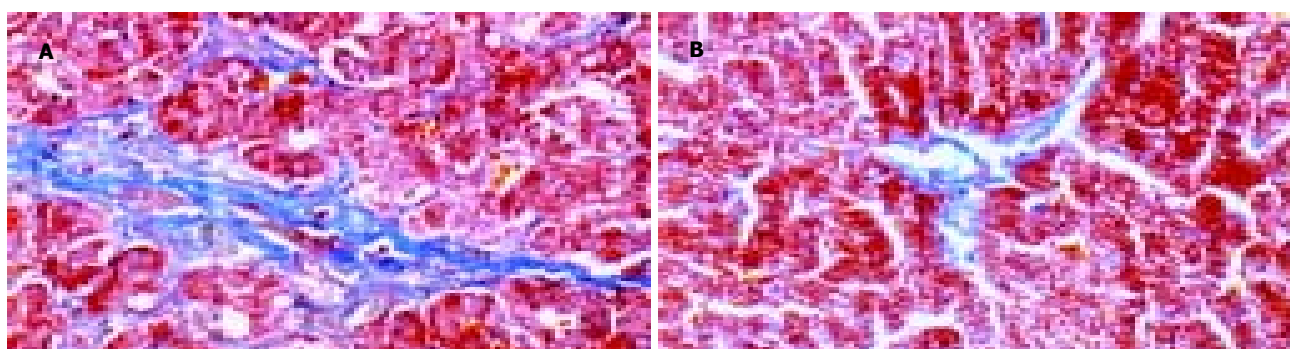


图1 大鼠肝脏胶原染色 Masson × 200. A: 模型组; B: 苦参素组.

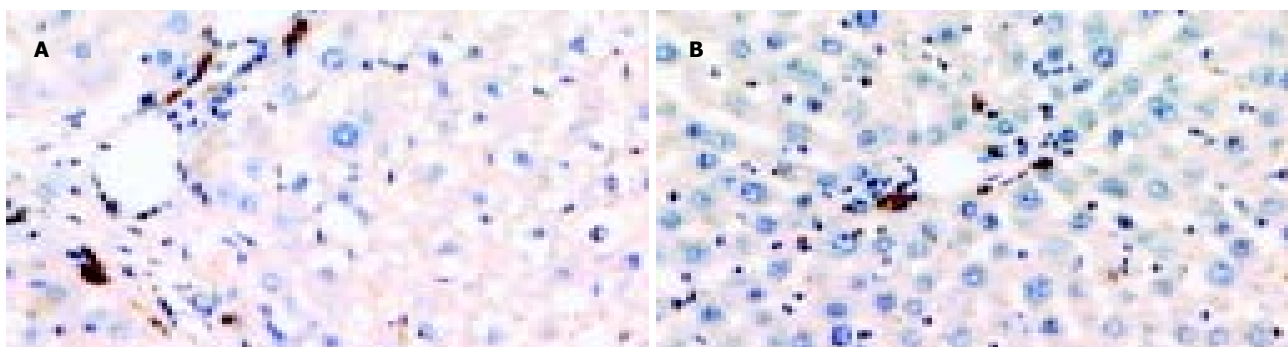


图2 大鼠肝脏 Smad 4 蛋白表达 SABC × 200. A: 模型组; B: 苦参素组.

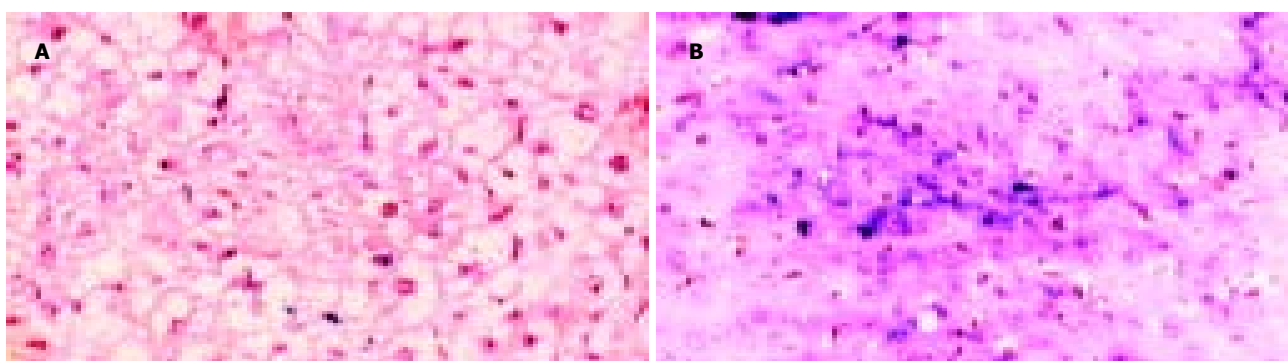


图3 大鼠肝脏 Smad 7 mRNA 表达 ISH × 200. A: 模型组; B: 苦参素组.

参素干预组 Smad 4 表达阳性率减少为  $(2.33 \pm 1.64)\%$  ( $P = 0.008, P < 0.01$ , 图 2 A-B). 原位杂交检测显示, Smad 4 mRNA 在正常对照组大鼠肝组织仅有少数间质细胞显示阳性结果, 为胞质细小的蓝紫色颗粒, 且表达强度微弱;  $CCl_4$  sc 使大鼠肝脏 Smad 4 mRNA 表达强度明显增加, 阳性信号显示为胞质蓝紫色颗粒, 且间质细胞和肝细胞均有表达, 其表达阳性率为  $0.62 \pm 0.23$ , 苦参素注射使其减少为  $0.31 \pm 0.12$ , 二者差异显著 ( $P < 0.05$ ).

**2.3 大鼠肝组织 Smad 7 表达** 免疫组化法于正常大鼠肝脏未检测出 Smad 7 阳性表达; 模型组大鼠肝脏 Smad 7 蛋白阳性表达稀少, 仅在汇管区见少数间质细胞显示阳性染色, 为细胞质棕黄色颗粒, 其平均表达阳性率为  $(3.19 \pm 1.09)\%$ , 与正常组无显著差异 ( $P = 0.068, P > 0.05$ , 图 3A). 苦参素干预组 Smad 7 蛋白阳性染色亦位于间质细胞, 其阳性率增加为  $(5.09 \pm 0.68)\%$ , 与模型组比较差异显著 ( $P = 0.026, P < 0.05$ , 图 3B). 原位杂交检测显示,  $CCl_4$  诱导的肝纤维化大鼠肝脏 Smad 7 mRNA 表达水平低下, 仅少许间质细胞显示阳性结果, 为胞质内蓝紫色颗粒沉着, 苦参素干预性治疗则使 Smad 7 mRNA 表达阳性率则由  $0.16 \pm 0.03$  增加为  $0.26 \pm 0.11$ , 与模型组比较差异显著 ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

TGFβ-Smad 信号传导通路是肝纤维化时主要的信号转

导途径<sup>[6-8]</sup>. Smads 是将 TGFβ 信号传导至细胞内发挥生物效应的关键分子, 目前发现有三个亚类: 受体激活 Smad (R-Smad), 共用 Smad (Co-Smad), 和抑制性 Smad (I-Smad). TGFβ 的生物效应非常广泛复杂, 其信号传导过程却比较简单<sup>[9]</sup>: TGFβ 配体与胞膜表面的 I, II 型受体结合后使 R-Smad (Smad 2, Smad 3) 磷酸化而活化, Smad 2, Smad 3 再和胞质中 Smad 4 (Co-Smad) 结合形成多聚体转位进入胞核, 与一系列转录辅激活蛋白、转录辅阻遏分子和转录因子共同结合于靶基因特定的 CAGAC 序列 (Smad-binding elements, SBEs, Smad 结合元件), 调节特定靶基因的表达. Smad 6, 7 (I-Smad) 则可抑制 Smads 多聚体形成或抑制 R-Smads 磷酸化而阻止该信号传导过程. 目前对 Smad 信号通路的信息传导过程及其关键分子的表达状况研究不断深入<sup>[10-17]</sup>, 不仅有助于进一步阐明肝纤维化的发病机制, 也为肝纤维化的防治提供了一个新的颇有希望的干预途径. Flanders<sup>[18]</sup> 认为, TGFβ 的大多数促纤维化效应是由 Smad 3 介导的, 因此, 促进抑制性分子 Smad 7 的过度表达或者用小分子物质 halofuginone 抑制 Smad 3 的功能将是非常有效的抗纤维化措施. 梁志清 *et al*<sup>[19]</sup> 经门静脉灌注将高滴度的反义 Smad 4 重组腺病毒载体导入大鼠纤维化肝脏, 结果转基因大鼠肝脏内源性 Smad 4 表达降低, 且肝脏 I 型胶原合成减少, 表明抑制 Smad 4 表达有潜在的抗纤维化价值. 目前许多中药研

究也开始关注对 TGF $\beta$ -Smad 信号传导通路的干预作用, 试图从分子水平探索中药抗肝纤维化的机制, 如张国 *et al*<sup>[20]</sup> 研究发现, 中药活血软坚方能够减少肝星状细胞合成 Smad 3; 宋仕玲 *et al*<sup>[21]</sup> 则观察到复方金三莪具有促进 Smad 7 表达、抑制 Smad 3 表达的作用. 这些研究表明, 调节关键的 Smad 分子表达水平是行之有效的抗纤维化措施, 也是有用的疗效判定指标.

苦参碱和氧化苦参碱(苦参素)是从苦参及其同属植物苦豆子等中提取、分离出来的主要活性成分, 大量实验表明<sup>[22-25]</sup>, 苦参碱及氧化苦参碱具有抑制成纤维细胞增生和 III 型前胶原 mRNA 表达作用, 还可通过抗炎、抗病毒、抑制免疫等环节抑制肝纤维化进程. 我们选择苦参素 ip 干预性治疗实验性大鼠肝纤维化, 观察苦参素对肝纤维化大鼠肝组织 Smads 表达的影响, 探讨其抗肝纤维化疗效及可能的分子机制, 结果表明苦参素注射使大鼠肝脏 Smad 4 蛋白表达阳性率由 9.56% 下降为 2.33% ( $P < 0.05$ ), 同时, 原位杂交法检测大鼠肝组织 Smad 4 mRNA 阳性率由 62% 减少为 31% ( $P < 0.05$ ); Smad 7 蛋白表达阳性率由 2.86% 增加为 5.09% ( $P < 0.05$ ), Smad 7 mRNA 阳性率则由 16% 增加为 26% ( $P < 0.05$ ), 肝组织 Smad 蛋白与 mRNA 表达水平变化规律一致. 显示氧化苦参碱干预性治疗能够有效地抑制实验性大鼠肝纤维化 TGF $\beta$ -Smad 信号转导通路中关键的信息传导分子的基因表达, 抑制 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝组织损害和肝脏胶原沉积, 使大鼠肝脏胶原平均面积由 (691  $\pm$  189)  $\mu\text{m}^2$  减少为 (94  $\pm$  37)  $\mu\text{m}^2$  ( $P < 0.01$ ), 这些作用可能是苦参素有效地抑制实验性大鼠肝纤维化的重要分子机制.

#### 4 参考文献

- 1 吴有莲. 苦参碱抗肝纤维化临床研究. *中药材* 2004;27:153-154
- 2 焦建中, 聂青和, 邱英锋, 赵夏夏. 苦参碱抗肝纤维化的临床研究. *肝脏* 2004;9:54-55
- 3 沈镭, 陆伦根, 曾民德, 李继强, 茅益民, 贾一韬, 杨文卓. 氧化苦参碱注射液对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化治疗作用. *肝脏* 2003;8:35-36
- 4 宋春辉, 万谟彬, 郭品娥, 朱伟. 复方苦参碱注射液对四氯化碳诱导大鼠肝脏纤维化的保护作用研究. *中医药学刊* 2003;21:1087-1089

- 5 卢清, 张清波, 张继明, 尹有宽, 郭祥惠. 氧化苦参碱对大鼠肝星状细胞旁分泌活化途径的抑制作用. *肝脏* 2004;9:31-33
- 6 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. TGF  $\beta$ -Smad 信号转导通路与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2003;11:1601-1605
- 7 Liu C, Gaca MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cells is TGF-beta-independent. *J Biol Chem* 2003; 278:11721-11728
- 8 Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002;35:49-61
- 9 Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- $\beta$ /Smad signaling system. *The EMBO J* 2000;19:1745-1754
- 10 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001;34:89-100
- 11 Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis in vivo and hepatic stellate cell line in vitro. *Pathol Int* 2003;53:18-26
- 12 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003;125:178-191
- 13 杨隽, 司书毅, 张月琴. Smad 在 TGF- $\beta$  超家族信号通路中的调控作用. *中国生物工程杂志* 2003;23:9-12
- 14 吴建新, 孟祥军, 陈源文, 程计林, 李定国, 陆汉明. Smad 7 与转化生长因子  $\beta$ 1 受体后信息调控. *中华肝脏病杂志* 2003;11:315-317
- 15 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. 实验性大鼠肝纤维化 TGF  $\beta$ 1 及其受体 mRNA 与 Smad3, 7 的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12:676-679
- 16 姚桢, 栾昌海. 肝纤维化的研究现状与进展. *日本医学介绍* 2003; 24:88-91
- 17 姜虹, 李定国. TGF- $\beta$ 1 与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2003; 11:326-329
- 18 Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 2004;85:47-64
- 19 梁志清, 徐新宝, 何振平. 反义 Smad 4 对大鼠纤维化肝脏金属蛋白酶及其抑制剂的调节. *重庆医学* 2004;33:716-717
- 20 张国, 张法灿, 王天才, 梁扩寰. 活血软坚方对肝星状细胞 Smad 信号的影响及意义. *中华肝脏病杂志* 2004;12:213-215
- 21 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. 金三莪对肝纤维化大鼠 TGF  $\beta$ 1 及其 I、II 型受体 mRNA 与 Smad 3、Smad 7 表达的影响. *中医药学刊* 2004;22:1044-1047
- 22 施光峰, 李谦, 翁心华, 郭祥惠. 苦参素对大鼠纤维化肝脏金属蛋白酶-1 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达的影响. *中华肝脏病杂志* 2004;12:56
- 23 蒋忠胜. 苦参碱联合复方鳖甲软肝片抗肝纤维化的疗效观察. *肝脏* 2004;9:143
- 24 李谦, 施光峰, 陈澍, 翁心华. 苦参素及联合维生素 E 的抗肝纤维化作用及机制. *中华传染病杂志* 2003;21:278-280
- 25 孙永年, 徐斌, 黄祝青, 黄长彤. 苦参素治疗对慢乙肝患者 TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、HA、PC III 水平的影响. *中国现代医学杂志* 2004;14:41-45

编辑 潘伯荣 审读 张海宁