

鳖甲煎丸对免疫性肝纤维化大鼠肝组织 HGF 表达的影响

李志毅¹, 崔莉芳², 张伶俐³, 程传浩¹, 谢世平^{1*}

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 河南省中医药研究院,
郑州 450004; 3. 郑州市卫生学校, 郑州 450005)

[摘要] **目的:**观察鳖甲煎丸对免疫性肝纤维化模型大鼠肝组织肝细胞生长因子(HGF)表达的影响,分析鳖甲煎丸抗肝纤维化的治疗作用并探讨其作用机制。**方法:**雄性 Wistar 大鼠 90 只,随机分为 6 组:正常对照组、模型组、秋水仙碱预防组、秋水仙碱治疗组、鳖甲煎丸预防组、鳖甲煎丸治疗组,采用猪血清诱导免疫损伤性肝纤维化模型。各组于 10 周后随机取 8 只大鼠断头处死,取血清,检测血清透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C);取肝组织,免疫组化染色,用图像分析法检测 HGF。**结果:**各预防组、治疗组血清 HA, LN, PCⅢ, Ⅳ-C 含量均明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),但以鳖甲煎丸预防组、治疗组降低最为明显;各预防组、治疗组大鼠肝脏组织 HGF 均有表达($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),鳖甲煎丸预防组、治疗组比秋水仙碱组的表达更为明显。**结论:**鳖甲煎丸能够抑制肝脏纤维化病理改变,增加 HGF 的表达,具有明显的抗肝纤维化作用。

[关键词] 鳖甲煎丸; 肝纤维化; 肝细胞生长因子; 免疫组织化学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)15-0192-04

Effect of Biejiajian Wan on Hepatocyte Growth Factor Expression in Rats with Immune Hepatic Fibrosis

LI Zhi-yi¹, CUI Li-fang², ZHANG Ling-li³, CHENG Chuan-hao¹, XIE Shi-ping^{1*}

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. Henan Province Chinese Medicine Research Institutud, Zhengzhou 450004, China;
3. Zhengzhou Health School, Zhengzhou 450005, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Biejiajian Wan (BJJW) on hepatocyte growth factor (HGF) expression in the rats with immune hepatic fibrosis, and analyze therapeutic functions of anti-hepatic fibrosis of BJJW and explore the mechanism. **Method:** Ninety male Wistar rats were randomly divided into six groups: normal control group, model control group, colchicine prevention group, colchicine treatment group, BJJW prevention group, BJJW treatment group. The rat liver fibrosis model was produced by porcine serum. After 10 weeks eight rats from each group were selected randomly. The hepatic tissues of the rats were taken and stained by immunohistochemistry, HGF of them was detected by image analysis. Hyaluronic acid (HA), laminin (LN), collagen type III (PCⅢ), type IV collagen (Ⅳ-C) in serum. **Result:** Compared with model group, the level of HA, LN, PCⅢ, Ⅳ-C was obviously decreased in preventive groups and therapeutic groups, but BJJW preventive groups and therapeutic groups decreased most significantly. The expression of HGF were obviously increased in preventive groups and therapeutic groups, but BJJW preventive and therapeutic groups increased most significantly. **Conclusion:** BJJW can inhibit the rat's pathological changes of hepatic fibrosis, significantly increase the

[收稿日期] 20111025(002)

[基金项目] 河南省科技攻关项目(2000360016)

[第一作者] 李志毅, 硕士, 讲师, 从事经方作用机制研究, Tel:0371-65926538, E-mail: zhiyi102@sina.com

[通讯作者] * 谢世平, 博士, 教授, 博士生导师, 从事经方作用机制研究, 中医药防治感染性疾病研究, Tel:0371-65926508, E-mail: xspzz@126.com

expression of HGF, which indicates the obvious function of anti-hepatic fibrosis.

[Key words] Biejiajian Wan; hepatic fibrosis; hepatocyte growth factor; immunohistochemistry

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是多种肝病发展过程中的重要病理环节,也是肝损伤向肝硬化发展的可逆阶段。随着分子生物学技术的不断发展,已证实有不少细胞因子与肝纤维化的形成密切相关。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是目前已知最强烈的肝细胞增殖刺激因子,可能是肝再生时启动肝细胞增殖的主要信号。研究认为, HGF 可抑制肝细胞的损害,具有抑制 HF 的作用,其机制可能是 HGF 直接作用于肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC),抑制其活化^[1]。HGF 可以逆转肝组织纤维化、诱导新血管形成、促进肝组织细胞再生,但对其作用机制的了解尚不充分。

阻止和延缓肝纤维化的形成是药物研究的一个重要环节。临床实践和实验研究表明,中药复方可通过多途径、多层次、多靶点的作用,来延缓、遏制肝纤维化甚至肝硬化这一复杂进程,其作用多为抗肝损伤、保护肝细胞、抑制细胞外基质(ECM)的合成、促进 ECM 降解^[2]。鳖甲煎丸(BJJW)是医圣张仲景所创,载于《金匱要略》,具有寒热并用、攻补兼施、行气化痰、软坚散结、利水祛湿、益气养血之功,攻补兼施,作用全面,应对肝纤维化的复杂病机,发挥了中药复方多途径抗肝纤维化的作用。研究表明,加味鳖甲煎丸对 CCl₄ 所致肝纤维化大鼠肝组织有一定的保护作用,可减轻肝纤维化病变程度^[3];可使白蛋白所致免疫性肝纤维化大鼠肝细胞损害及肝纤维化程度明显减轻,天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)、胶原 IV(IV-C)、层黏连蛋白(LN)、透明质酸(HA)明显降低^[4];在两种肝纤维化大鼠模型, BJJW 预防治疗使大鼠血清 IgG 含量明显降低^[5]。本课题前期研究表明,鳖甲煎丸可以通过抑制转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)及重组人血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)细胞因子的表达来减少 HSC 合成 I、III 型胶原等细胞外基质(ECM),从而起到防治肝纤维化的作用^[6]。为进一步研究该药抗肝纤维化过程中对 HGF 的影响,笔者应用猪血清诱导的免疫性肝纤维化模型进行研究,采用免疫组织化学技术和病理形态计量分析法检测模型大鼠肝组织中 HGF 含量,采用放射免疫法检测血清 HA、LN、III 型前胶原(procollagen type III, PC III)、IV-C,以观察其在肝纤维化过程中的影响。

1 材料

1.1 动物 普通级雄性 Wistar 大鼠 90 只,体重 180~200 g,由河南省实验动物中心提供(许可证号:0001432)。

1.2 药物 鳖甲煎丸由杭州胡庆余堂制药厂生产,批号 01041203;秋水仙碱片由西双版纳制药厂生产,批号 010218。

1.3 试剂与仪器 未灭活猪血清(批号 990419)购自郑州佰安生物工程公司,抗 HGF(批号 BA0911)、SABC 免疫组化染色试剂盒(批号 SA1025)、DAB 显色试剂盒(批号 AR1022)购自武汉博士德公司。层粘连蛋白放射免疫分析测定盒、IV 型胶原放射免疫分析测定盒、透明质酸放射免疫分析测定盒购自上海海军医学研究生物技术中心(批号 010705)。

SN-695B 型智能放免测量仪购自上海原子核研究所日环仪器一厂, HM440E 滑动式切片机购自德国 MICROM 公司, Olympus BX-41 显微摄像仪购自日本 Olympus 公司。HPLAS-1000 计算机彩色病理图文分析系统 9.0 版由同济大学千屏影像有限公司设计,河南省中医院病理室提供。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药 90 只雄性大鼠随机分为 6 组:正常对照组、病理模型组、鳖甲煎丸预防组、鳖甲煎丸治疗组、秋水仙碱预防组、秋水仙碱治疗组,每组 15 只。采用文献方法建立猪血清诱导的免疫损伤性肝纤维化模型^[7]。除正常对照组外,其余各组均采用未灭活猪血清腹腔注射,0.5 mL/只,每周 2 次,连续 10 周。各预防组于造模同时给药,1 次/d,鳖甲煎丸预防组给予鳖甲煎丸混悬液 1.6 g·kg⁻¹,秋水仙碱预防组给予秋水仙碱混悬液 0.3 mg·kg⁻¹,连续 10 周。鳖甲煎丸治疗组、秋水仙碱治疗组于造模第 6 周给药,方法及剂量同预防给药组,至第 10 周结束。

2.2 指标检测

2.2.1 血清 HA, LN, PC III, IV-C 测定 各组均于造模 10 周结束后随机取 8 只大鼠断头处死,采血,分离血清,HA, LN, PC III, IV-C 用放射免疫法(RIN)在 SN-695B 型智能放免测量仪上检测。

2.2.2 肝组织 HGF 免疫组化检测 在动物采血同时,取(0.3×0.5×0.5) cm³ 肝组织,各组取材部位基本一致,4% 多聚甲醛固定液固定。石蜡包

埋,载玻片经防脱片处理,选用 APES。常规切片,厚度 4 μm ,烤片,置切片盒备用。以 SABC 免疫组化法(IHC)检测细胞因子 HGF。操作程序:①切片经常规脱蜡至水,滴加 0.1% 胰蛋白酶(复合消化酶)5 ~ 30 min。蒸馏水洗 2 min \times 3 次。②滴加正常血清封闭液,室温 20 min,甩去多余液体。③滴加适当稀释的一抗,20 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 ~ 2 h,或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。0.1 mol \cdot L⁻¹ PBS 洗 2 min \times 3 次。④滴加二抗,20 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min。0.1 mol \cdot L⁻¹ PBS 洗 2 min \times 3 次。⑤ DAB 显色 20 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 5 ~ 30 min,镜下控制反应时间。蒸馏水洗涤。⑥滴加 SABC,20 ~ 37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min。0.1 mol \cdot L⁻¹ PBS 洗 5 min \times 4 次。(7)苏木素轻度复染,水洗。乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。用 HPLAS-1000 计算机彩色病理图文分析系统对 IHC 染色后的切片进行定量分析,视域数为 10。

2.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS 11.0 统计软件处理,组间计量资料采用 *t* 检验和方差分析。

表 1 各组大鼠血清 HA, LN, PC III, IV-C 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	HA	LN	PC III	IV-C
正常对照	-	265.98 \pm 51.56	17.53 \pm 3.57	2.58 \pm 0.69	8.60 \pm 2.14
模型	-	557.6 \pm 39.35	45.05 \pm 5.60	9.59 \pm 1.33	26.56 \pm 4.57
秋水仙碱预防	0.3	403.60 \pm 45.47 ¹⁾	36.58 \pm 4.29 ¹⁾	5.97 \pm 3.65	19.05 \pm 1.19 ²⁾
秋水仙碱治疗	0.3	438.40 \pm 42.86 ¹⁾	36.17 \pm 5.39 ¹⁾	6.41 \pm 1.29 ²⁾	21.28 \pm 2.07
鳖甲煎预防	1 600	307.04 \pm 28.04 ¹⁾	32.92 \pm 5.41 ¹⁾	3.30 \pm 1.41 ¹⁾	11.56 \pm 1.00 ¹⁾
鳖甲煎治疗	1 600	340.11 \pm 74.25 ¹⁾	22.88 \pm 3.54 ¹⁾	4.97 \pm 3.19 ²⁾	13.48 \pm 1.17 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01。

3.3 大鼠肝组织 HGF 表达比较 药物预防组、治疗组大鼠肝组织 HGF 均有大量表达(*P* < 0.01 或 *P* <

P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况 正常对照组皮毛光滑亮泽,体格健壮,饮食正常,喜活动,善打斗,体重增长正常,无死亡。模型组皮毛逐渐干枯稀疏,精神不振,反应迟钝,身体消瘦,进食、排便、活动减少,死亡 3 只,体重较造模前略有增加。鳖甲煎丸预防组和治疗组大鼠皮毛光泽度尚可,身体较壮,饮食较正常,活动力强,常有打斗,体重增加明显。鳖甲煎丸预防组死亡 2 只大鼠;鳖甲煎丸治疗组死亡 1 只大鼠。秋水仙碱预防组和治疗组皮毛缺少光泽,身体较壮,饮食不佳,活动力弱,偶有打斗,体重有所增加。秋水仙碱预防组死亡 3 只大鼠;秋水仙碱治疗组死亡 1 只大鼠。

3.2 各组大鼠血清 HA, LN, PC III, IV-C 比较 各药物预防组、治疗组均能明显降低血清 HA, LN, PC III, IV-C 含量(*P* < 0.01 或 *P* < 0.05),但以鳖甲煎丸预防组、治疗组降低最为明显。见表 1。

0.05),但鳖甲煎丸能在一定程度上增加细胞因子 HGF 的表达,而秋水仙碱的增加作用不明显。见表 2。

表 2 鳖甲煎丸对免疫性 HF 大鼠 HGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

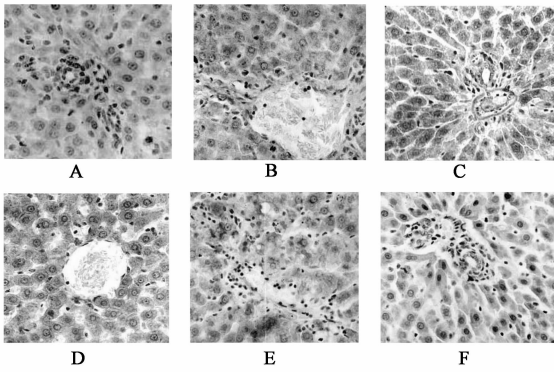
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	面密度	平均灰度	HGF 阳性表达/PU
正常对照	-	16.82 \pm 2.66 ¹⁾	252.50 \pm 10.23 ¹⁾	6.75 \pm 1.25 ¹⁾
模型	-	41.13 \pm 4.56 ^{3,5)}	175.69 \pm 10.29 ^{3,5)}	16.11 \pm 2.26 ^{3,5)}
秋水仙碱预防	0.3	49.73 \pm 3.73 ³⁾	147.28 \pm 6.38 ³⁾	20.68 \pm 2.22 ³⁾
秋水仙碱治疗	0.3	43.87 \pm 3.40 ³⁾	158.36 \pm 10.91 ³⁾	19.12 \pm 3.21 ³⁾
鳖甲煎预防	1 600	71.90 \pm 5.29 ^{1,3)}	110.58 \pm 9.46 ^{1,3)}	42.54 \pm 4.80 ^{1,3)}
鳖甲煎治疗	1 600	56.94 \pm 6.27 ¹⁾	126.94 \pm 4.63 ^{1,3,4)}	31.00 \pm 3.80 ^{1,3,4)}

注:与模型组相比¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01; 与正常对照组相比³⁾*P* < 0.05; 与秋水仙碱 0.3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 预防组相比⁴⁾*P* < 0.05; 与鳖甲煎 1 600 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 预防组相比⁵⁾*P* < 0.05; 面密度单位:靶目标面积 μm^2 /统计场总面积 $\mu\text{m}^2 \times 100$ 。

3.4 各组大鼠肝组织 IHC 染色图片比较 IHC 染色显示:HGF 表达于汇管区和中央静脉周围的肝细胞,阳性区域胞浆呈棕黄色。在正常对照组表达较弱;在模型组呈阳性;秋水仙各组表达呈强阳性;鳖甲煎各组表达亦呈强阳性,并强于秋水仙碱各组。见图 1。

4 讨论

在药物、病毒、乙醇、自身免疫等各种致病因素作用下所致的持续或反复的肝实质炎症、坏死,引起间质细胞及细胞间质增多,尤其是细胞外基质蛋白合成增加,而其降解活性相对或绝对不足,导致纤维



A. 正常对照组; B. 模型组; C. 秋水仙碱 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 预防组;
D. 秋水仙碱 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 治疗组; E. 鳖甲煎丸 $1600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
预防组; F. 鳖甲煎丸 $1600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 治疗组

图1 各组大鼠肝组织病理形态学改变(IHC染色, $\times 400$)

结缔组织大量增生,形成肝纤维化^[8]。肝纤维化的病理基础是ECM的过度沉积和异常分布。

HGF是一种多功能的糖蛋白二聚体,由间质细胞、上皮和内皮细胞合成并通过自分泌和旁分泌方式释放,具有刺激肝细胞再生、抑制肝细胞凋亡、促进肝组织重构的作用。HGF具有刺激肝细胞再生、抑制肝细胞凋亡、促进肝组织重构的作用。其生物学活性是由一个原癌基因c-Met编码的跨膜酪氨酸激酶受体的磷酸化实现的^[9]。HGF是肝细胞的一种有效促分裂剂,但在HSC转化为纤维母细胞后则丧失表达HGF的功能,这可能是慢性肝病时肝细胞再生能力低下的原因之一^[10]。研究表明,在 CCl_4 所致HF形成的同时给予抗HF中药预防,HGF mRNA表达增强,起到抑制肝损伤的作用^[11]。Ueki等发现,给已发生明显肝硬化的模型鼠肌肉注射脂质体表达载体(hemagglutination virus of Japan, HVJ),1周后模型鼠自身HGF表达增多,人类HGF也有明显表达。同时大鼠肝细胞增殖增加而凋亡减少。经HGF基因治疗的肝硬化大鼠,组织病理学检查显示,肝脏小叶及血管结构明显改善,门脉系统压力下降,生存率提高。提示HGF不仅能刺激肝细胞再生,还能阻止HF,重建肝脏组织结构^[12]。

目前认为HGF预防和改善HF的机制包括:①减少前胶原mRNA的表达水平;②抑制 $\text{TGF-}\beta_1$ mRNA的表达,抑制 $\text{TGF-}\beta_1$ 的分泌;③抑制肝星状细胞的活化;④促进肝再生^[13]。以上有限的资料提示,HGF具有抑制HF的作用,其机制可能是HGF直接作用于星状细胞,抑制其活化。上述研究结果预示着HGF的基因治疗对于HF和肝硬化,将具有划时代的重要价值。

本研究结果表明,鳖甲煎丸能明显降低HF模

型大鼠肝纤维化血清学指标HA, LN, PC III, IV-C的含量,提示其对模型大鼠肝组织有一定的保护作用,可减轻肝纤维化病变程度。HGF在肝细胞损伤后的模型大鼠肝脏大量表达,以刺激肝细胞的再生、保护肝组织。图像分析结果显示鳖甲煎丸能显著增加免疫性HF大鼠HGF的表达,提示鳖甲煎丸可通过促进HGF的表达来诱导ECM的降解,从而达到防治肝纤维化的目的,可为临床治疗提供药理学基础。

[参考文献]

- [1] 陈崇恒,李继强.肝细胞生长因子与肝纤维化[J].肝脏,1999,4(4):231.
- [2] 张媛辉,刘俊田.中药抗肝纤维化作用机制的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(6):66.
- [3] 任映,宋崇顺,尹军祥,等.加味鳖甲煎丸对四氯化碳所致肝纤维化大鼠肝组织的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(1):49.
- [4] 宋崇顺,任映,尹军祥,等.加味鳖甲煎丸对白蛋白所致大鼠免疫性肝纤维化的防治作用[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(10):51.
- [5] 孙海芸,任映,尹军祥,等.加味鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠血清IgG的影响[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(7):23.
- [6] 谢世平,司富春,赵君玫,等.鳖甲煎丸对免疫性肝纤维化大鼠胶原及相关细胞因子表达的影响[J].中国医药学报,2004,19(7):412.
- [7] 中野雅行,小型岳三郎.づた血清よろ肝硬变样纤维化の形态学の研究[J].日本病理学会会志,1982,71:319.
- [8] Bruck R, Shirin H, Aeed H, et al. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers[J]. J Hepatol,2001, 35:457.
- [9] Arends B, Spee B, Hoffmann G, et al. *In vitro* and *in vivo* bioactivity of recombinant canine hepatocyte growth factor[J]. Vete J,2008, 178(1):70.
- [10] 何德华,詹谿洲.肝胆病理学[M].上海:第二军医大学出版社,1998:301.
- [11] 彭彦辉,刘殿武.中药对 CCl_4 中毒性大鼠肝纤维化HGF表达量的影响[J].疾病控制杂志,2002,6(2):108.
- [12] Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats[J]. Nature Med,1999,5:226.
- [13] 龚浩.IGF-I和HGF与肝纤维化[J].国外医学:外科学分册,2001,28(6):346.

[责任编辑 聂淑琴]