

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.032.html>

◇ 药学研究 ◇

栀子柏皮汤不同配伍对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的治疗作用

钱正月^{1,2,3} 李俊^{1,2,3} 黄成^{1,2,3} 孟晓明^{1,2,3} 马陶陶^{1,2,3} 陈昭琳^{1,2,3}

摘要 目的 研究栀子柏皮汤不同配伍组合的抗肝纤维化药理作用。方法 采用四氯化碳(CCl_4)引起的肝纤维化小鼠模型观察栀子柏皮汤各配伍组的抗肝纤维化作用,同时给予不同配伍的栀子柏皮汤进行灌胃治疗。生化检测相关肝纤维化及炎症指标,运用 Masson 染色和 HE 染色检测肝纤维化的变化,Western blot 法检测 I 型胶原及 α -横纹肌肌节肌动蛋白(α -SMA)的表达水平。结果 栀子柏皮汤及各配伍组均可不同程度的降低小鼠血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、羟脯氨酸(Hyp)及透明质酸(HA)水平,改善肝脏的病理变化,其中栀子黄柏甘草配伍组抑制 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维化效果最佳($P < 0.01$),并能显著抑制肝组织中 I 型胶原和 α -SMA 的蛋白表达($P < 0.01$)。实验结果表明栀子柏皮汤亦可明显降低血清中转化生长因子 β (TGF- β)的表达水平。结论 栀子柏皮汤不同配伍组能不同程度改善小鼠肝纤维化,但栀子黄柏甘草配伍,即全汤组抗肝纤维化作用最明显,并且栀子柏皮汤的抗肝纤维化作用可能与降低 TGF- β 水平有关。

关键词 栀子柏皮汤;配伍;肝纤维化; α -平滑肌肌动蛋白

中图分类号 R 285

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0068-05

肝纤维化是因多种原因诱导所引起的慢性肝脏

类疾病,若不积极治疗,将发展为肝硬化甚至肝癌。此类疾病已引起越来越广泛的重视,但在临床工作中尚无有效的药物治疗方法,因而越来越多的人把目光转向了中药治疗。栀子柏皮汤源自汉代名医张仲景著的《伤寒论》,由栀子、黄柏和甘草按照君臣佐使的配伍原则以 10:6:3 的比例煎煮而成,主要用于治疗湿热黄疸、抗炎解热等^[1]。栀子柏皮汤在肝脏疾病治疗方面已见一些报道^[2-3],但其在肝纤维化小鼠模型的配伍方面研究较少。并且该研究采取的四氯化碳(CCl_4)诱导的小鼠肝纤维化模型用作抗肝纤维化药物的筛选和评价已见诸多报道^[4]。该研究探讨了栀子柏皮汤不同成分配伍对 CCl_4 诱导的肝纤维化小鼠的保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 ICR 小鼠 90 只,普通级,雄性, (20 ± 2) g,由安徽医科大学实验动物中心提供。小鼠饲养在笼中,隔天更换饲料饮水,自由饮水和摄食,保持室温 (22 ± 1) °C,相对湿度 40%~60%,常规饲养观察 1 周后用于实验。

1.2 药品与试剂 栀子柏皮汤的主要成分栀子、黄柏和甘草均购自安徽医科大学第一附属医院药剂科,由安徽医科大学药学院金涌教授鉴定为正品。谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)测定试剂盒、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)测定试剂盒、羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;透明质酸(hyaluronic acid, HA)测定试剂盒、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)购自上海源叶

2015-10-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81473526、81202978);高等学校博士学科点专项基金(编号:20123420120001);安徽省科技攻关计划(编号:1301042212);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH145)

作者单位:¹安徽医科大学药学院、²安徽天然药物活性研究省级实验室、³安徽创新药物产业共性研究院,合肥 230032

作者简介:钱正月,女,硕士研究生;

李俊,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: lj@ahmu.edu.cn

correspondingly. There was no statistically significant difference of labeled neuronal somas distribution, quantity and fluorescence intensity in TG between the two groups. **Conclusion** The neuronal somas of trigeminal nerve branches regional distributions on the ipsilateral side TG. The TN does not affect the number of neurons in TG and the projection. It may be associated with the change of trigeminal nerve function.

Key words trigeminal ganglia; trigeminal neuralgia; retrograde fluorescent tags; nerve bundle road tracking method

生物有限公司; I 型胶原购自美国 Southernbiotech 公司; α -横纹肌肌节肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA) 购自北京 Bioss 公司。

1.3 分组造模与药物制备 90 只小鼠随机分为 6 组: 正常组、模型组、栀子组、栀子 + 黄柏组、栀子 + 甘草组、栀子 + 黄柏 + 甘草组, 每组各 15 只。将小鼠皮下注射 20% CCl_4 (2 ml/kg, 用橄榄油 1:4 稀释) 每周 2 次, 持续 4 周, 形成稳定的肝纤维化动物模型。从注射第 3 周开始采用栀子柏皮汤各配伍组灌胃给药 14 d (每周 2 次, 持续 2 周), 正常组给予等体积的橄榄油, 直至 4 周实验结束时停止给药。各组均于 4 周后麻醉处死小鼠, 解剖后从腹主动脉取血, 4°C 保存及时检测, 并且收集肝脏标本, 生理盐水洗涤后一部分用 4% 多聚甲醛固定待用, 另一部分肝脏标本采用液氮速冻并置于 -80°C 保存备用。

称取栀子 50 g, 一煎加药材量的 8 倍水, 沸腾后煎 30 min, 20 层纱布过滤, 再煎加药材量的 8 倍水, 沸腾后再煎 20 min, 过滤, 两煎所得滤液混合后蒸馏浓缩至原生药量 1 g/ml, 4°C 保存待用, 此为栀子组。称取栀子 50 g、黄柏 30 g, 同以上方法煎煮, 制成约合原生药量 1 g/ml 浓缩液, 此为栀子 + 黄柏组。再次分别称取栀子 50 g、甘草 15 g, 以及栀子 50 g、黄柏 30 g、甘草 15 g, 浓缩所得分别为栀子 + 甘草组、栀子 + 黄柏 + 甘草组。

1.4 血清学肝功能测定以及肝纤维化指标、炎症指标的检测 取血后室温静置 1 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清。分别按试剂盒操作检测 ALT、AST、Hyp、HA 以及 TGF- β 。

1.5 Western blot 检测各组肝脏组织中 I 型胶原和 α -SMA 蛋白的表达 取适量肝组织置冰冷的裂解液中收取总蛋白, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量后, 蛋白样品与上样缓冲液共同煮沸 10 min。采用 5% 浓缩胶和 10% 分离胶, 用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳并转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 3 h。分别与 I 型胶原和 α -SMA 一抗 4°C 孵育过夜; 二抗 1:10 000, 内参采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)。ECL 发光试剂显影, 灰度成像软件测定光密度值以计算蛋白表达水平。

1.6 肝脏组织病理学检查 用 4% 多聚甲醛溶液固定的肝组织, 经常规脱水后, 石蜡包埋、切片, 进行

HE 染色和 Masson 染色, 在荧光显微镜下观察肝组织纤维化程度。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数比较采用方差分析, 组间差异的显著性采用 t 检验, $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 小鼠生存状态比较 正常组小鼠 4 周内反应灵活, 活动正常, 饮食饮水正常, 毛发无脱落受损。与正常组相比, 模型组随着造模时间延长, 反应迟钝, 厌食少动, 毛发散乱, 生活状态比正常组明显下降。但是与模型组相比, 加药组小鼠生活状态有所改善。

2.2 小鼠血清学肝功能指标的变化 与正常组比较, 模型组血清中 ALT、AST 活性显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 栀子柏皮汤组能显著降低小鼠血清 ALT、AST 的含量, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 栀子柏皮汤及其配伍组对肝纤维化模型小鼠血清 ALT、AST 水平的影响 (U/L, $n = 15$, $\bar{x} \pm s$)

组别	ALT	AST
正常	67.36 \pm 10.82	77.30 \pm 13.22
模型	263.79 \pm 48.59**	319.56 \pm 66.40**
栀子	193.41 \pm 22.69#	278.90 \pm 28.03
栀子 + 黄柏	158.34 \pm 19.55##	163.42 \pm 62.30##
栀子 + 甘草	126.24 \pm 21.64##	143.25 \pm 23.69##
栀子 + 黄柏 + 甘草	98.90 \pm 11.96##	103.76 \pm 12.29##

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.3 小鼠肝组织病理学变化的影响 组织病理学分析结果显示, 正常组小鼠肝组织结构正常, 肝细胞呈索状排列结构清晰, 肝细胞无明显坏死情况, 未见肝窦异常、脂肪变性和坏死。而模型组肝损伤较重, 间质明显增生, 肝细胞索状排列紊乱, 清晰可见肝细胞点状坏死以及炎性细胞浸润, 纤维间隔明显形成, 胶原明显沉积。但使用栀子柏皮汤不同配伍组治疗后, 肝细胞坏死以及炎性细胞浸润有所减少, 中央静脉和汇管区仅存在少许胶原纤维, 肝细胞坏死以及纤维组织增生情况明显改善, 见图 1。以上结果表明栀子柏皮汤各配伍组均可不同程度地改善 CCl_4 诱导的小鼠肝脏的病理损伤。

2.4 小鼠肝纤维化指标的变化 与正常组相比, 模

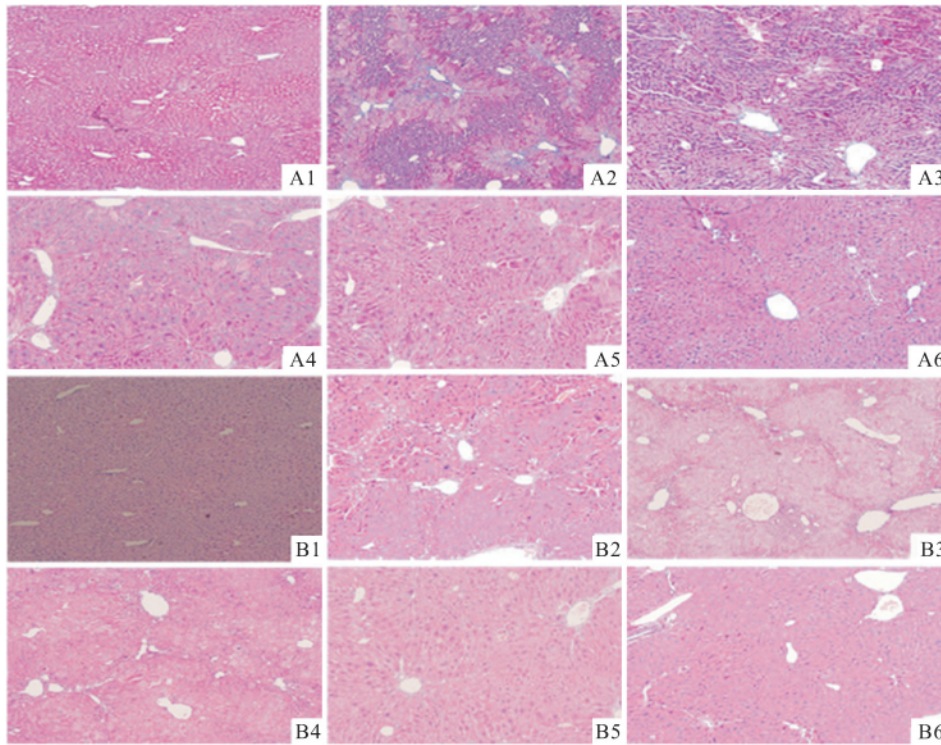


图1 栀子柏皮汤及其配伍组对 CCl₄ 致肝纤维化小鼠肝组织病理变化的影响 ×100

A: Masson 染色; B: HE 染色; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 栀子组; 4: 栀子 + 黄柏组; 5: 栀子 + 甘草组; 6: 栀子 + 黄柏 + 甘草组

型组小鼠血清 HA 和 Hyp 的含量显著增加 ($P < 0.05$) ,但是与模型组相比 ,加药组则明显降低 ,栀子 + 黄柏 + 甘草组降低更明显 ,但还未恢复到正常水平 ($P < 0.01$) 。以上结果表明 ,栀子柏皮汤各配伍组均可不同程度地降低 HA 和 Hyp 的血清含量 ,进一步提示栀子柏皮汤可能对纤维化的治疗有一定作用 ,见图 2。

2.5 小鼠肝组织 I 型胶原和 α -SMA 蛋白的表达变化 Western blot 检测结果显示 ,与正常组相比 ,模型组两种蛋白的相对密度值均显著升高 ($P < 0.05$) ;而与模型组相比 ,加药组明显下调两种蛋白的表达 ,栀子 + 黄柏 + 甘草组降低更明显 ,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ,见图 3。以上结果表明 ,栀子柏皮汤各配伍组可不同程度地降低肝纤维化相关蛋白 I 型胶原和 α -SMA 的表达 ,进一步证明了栀子柏皮汤可能对肝纤维化有一定程度的治疗作用。

2.6 小鼠血清中 TGF- β 活性的变化 用 ELISA 法检测小鼠血清中 TGF- β 的变化 ,模型组小鼠血清中 TGF- β 活性显著高于正常组 ($P < 0.01$) ,与模型组比较 ,栀子柏皮汤各配伍组能显著降低小鼠血清 TGF- β 的含量 ($P < 0.01$) ,提示栀子柏皮汤对肝纤维化的治疗作用可能与降低 TGF- β 的活性有关 ,见

图 4。

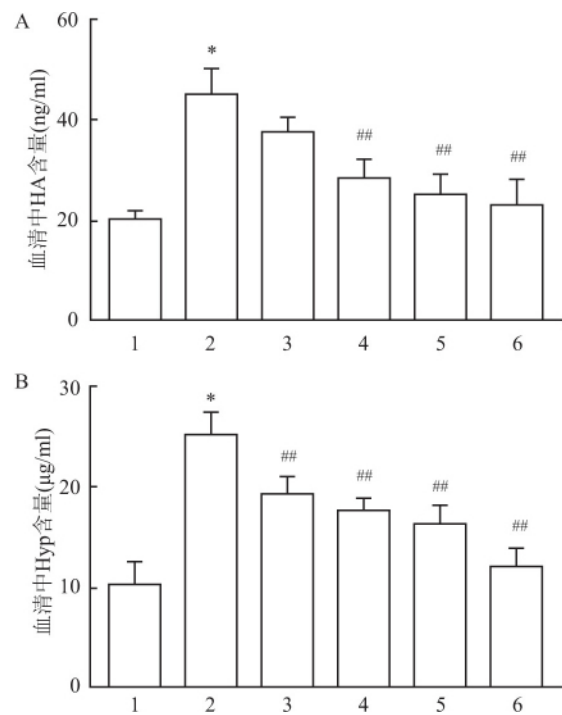


图2 栀子柏皮汤及其配伍组对肝纤维化模型小鼠血清 HA 以及 Hyp 水平的影响

A: 血清中 HA 含量; B: 血清中 Hyp 含量; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 栀子组; 4: 栀子 + 黄柏组; 5: 栀子 + 甘草组; 6: 栀子 + 黄柏 + 甘草组; 与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

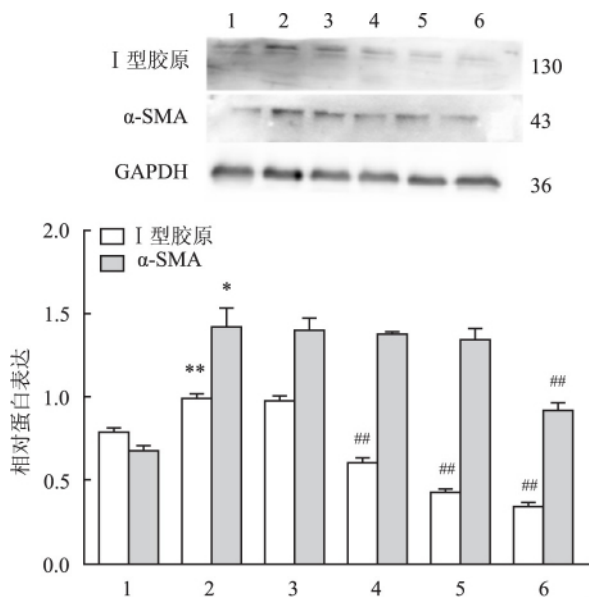


图3 梔子柏皮汤及其配伍组对 CCl₄ 致肝纤维化小鼠肝组织 I 型胶原和 α-SMA 蛋白变化的影响

1: 正常组; 2: 模型组; 3: 梔子组; 4: 梔子 + 黄柏组; 5: 梔子 + 甘草组; 6: 梔子 + 黄柏 + 甘草组; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

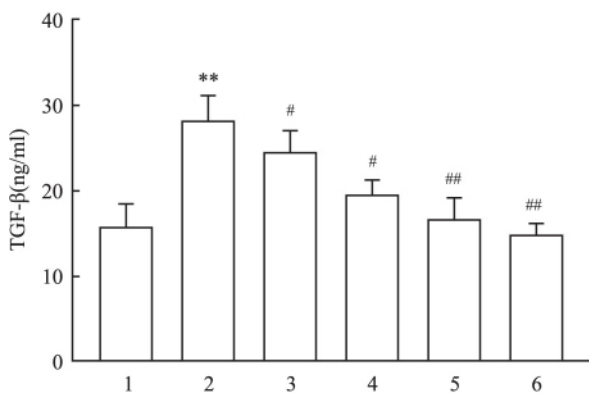


图4 梔子柏皮汤及其配伍组对肝纤维化模型小鼠血清 TGF-β 水平的影响

1: 正常组; 2: 模型组; 3: 梔子组; 4: 梔子 + 黄柏组; 5: 梔子 + 甘草组; 6: 梔子 + 黄柏 + 甘草组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

肝纤维化是由多种因素引起肝细胞坏死,纤维结缔组织沉积异常而导致的慢性肝脏损伤。而注射 CCl₄ 诱导的肝纤维化模型是最常用的肝纤维化模型^[5]。本实验结果表明,与正常组比较,模型组小鼠血清 ALT、AST 以及 HA、Hyp 水平明显升高,组织病理学分析结果显示,模型组小鼠肝损伤较重,并且

模型组 I 型胶原和 α-SMA 蛋白的表达水平也明显升高。以上结果说明 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化模型已成功复制。迄今为止,虽然治疗肝纤维化的药物繁多,但治疗效果并不理想,因而中药治疗成为研究和临床治疗的热点。梔子柏皮汤用于治疗肝脏类疾病历史悠久,但其在肝纤维化小鼠模型的配伍研究方面却鲜见报道,本实验主要从这些方面展开研究。

造模期间,模型组小鼠的行为习惯均异于正常组,表现出行动迟缓,毛发散乱,厌食少动,而加药组小鼠则表现得相对正常。当肝脏受到损害,肝功能发生改变,通过检测肝细胞内相关酶的变化可对肝细胞的受损程度进行评价,目前常用的检测指标有 ALT、AST 等^[6]。血清学研究结果表明,模型组小鼠 ALT、AST 水平均明显高于正常组,与模型组相比,加药组均可不同程度降低 ALT、AST 水平,并且梔子、黄柏和甘草三种药物的配伍组保护作用更明显,初步证明其对 CCl₄ 所致的小鼠肝纤维化可能有不同程度地保护作用。组织病理学分析结果进一步证实了以上结论,与正常组相比,模型组胶原沉积,纤维组织增生,肝小叶结构破坏严重。与模型组相比,加药组则趋向于正常,肝纤维化程度明显减轻。HA 和 Hyp 是目前肝纤维化的主要血清标志物,其升高程度与纤维化和炎症程度呈正相关^[7]。本研究显示与正常组相比,模型组小鼠血清 HA 和 Hyp 的含量显著增加,表明模型组肝纤维化的形成和炎症的产生,但是与模型组相比,加药组则明显降低,表明加药后小鼠的肝纤维化程度和炎症程度有所减轻。I 型胶原、α-SMA 的表达水平是反映药物对肝纤维化治疗效果的直接指标^[8]。而蛋白表达水平表明,与正常组相比,模型组蛋白表达明显升高,加药后,蛋白表达较模型组呈降低的趋势。上述结果说明,梔子柏皮汤能降低肝脏损伤的程度,抑制肝纤维化的进展。

TGF-β 被普遍认为是主要的促肝纤维化细胞因子,其表达水平可反映肝纤维化程度及组织炎症坏死程度^[9]。本研究中也发现,与正常组相比,模型组 TGF-β 的表达显著升高,而加药组其表达呈逐渐降低趋势,并且梔子、黄柏和甘草组作用最佳。因此,本研究认为梔子柏皮汤可能是通过调节小鼠肝脏 TGF-β 的表达来发挥其抗肝纤维化的作用。

本研究结果证明了在 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维

化模型中 梔子柏皮汤能够明显抑制肝脏纤维化的进展,减轻肝脏的损伤,并且在本实验中,梔子、黄柏、甘草的配伍组合治疗效果最佳,进一步证实了传统汤剂配伍的合理性。

参考文献

- [1] Song X J, Zhang W, Wang T C, et al. Geniposide plays an anti-inflammatory role *via* regulating TLR4 and downstream signaling pathways in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice [J]. *Inflammation* 2014, 37(5): 1588 – 98.
- [2] 肖旭,朱继孝,罗光明等. 梔子柏皮汤及其拆方保肝利胆作用实验研究[J]. *中药材* 2013, 36(7): 1132 – 5.
- [3] 曹璐,李俊,黄成等. 梔子柏皮汤对 α -萘异硫氰酸酯诱导的肝内胆汁淤积大鼠的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(3): 257 – 61.
- [4] 黄小丽,郭晓云,姜海行等. Th17 及 Th1 细胞在四氯化碳致肝纤维化小鼠模型中的表达及关系[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(13): 1826 – 33.
- [5] 邵志祥,汤伟. 抗纤胶囊对实验性大鼠肝纤维化的治疗作用[J]. *中国实验方剂学杂志* 2012, 18(11): 212 – 5.
- [6] 王蓉,王媛媛,王彧杰. 丹酚酸 A 对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的防治作用及机制研究[J]. *中南药学*, 2014, 12(11): 1083 – 7.
- [7] Sebastiani G, Castera L, Halfon P. The impact of liver disease aetiology and the stages of hepatic fibrosis on the performance of non-invasive fibrosis biomarkers: an international study of 2411 cases [J]. *Aliment Pharmacol Ther* 2011, 34(10): 1202 – 16.
- [8] 杨娟,徐胜南,王敏等. 阿魏酸钠对大鼠肝纤维化的作用[J]. *世界华人消化杂志* 2014, 22(12): 1676 – 81.
- [9] Presser L D, McRae S, Waris G. Activation of TGF- β 1 promoter by hepatitis C virus-induced AP-1 and Sp1: role of TGF- β 1 in hepatic stellate cell activation and invasion [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56367.

Therapeutical effects of Zhizi Bopi Decoction and its compatibility on CCl₄ induced hepatic fibrosis in mice

Qian Zhengyue^{1,2,3}, Li Jun^{1,2,3}, Huang Cheng^{1,2,3}, et al

(¹School of Pharmacy Anhui Medical University, ²Anhui Key Laboratory of Bioactivity of Natural Products, ³Anhui Institute of Innovative Drugs, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the anti-hepatofibrotic effects of Zhizi Bopi Decoction and its compatibility on liver fibrosis. **Methods** The model of mouse liver fibrosis which was induced by carbon tetrachloride (CCl₄) was used to investigate the effects of Zhizi Bopi Decoction and its compatibility by gavage. Indicators of hepatic fibrosis and inflammation were detected with automated biochemistry analyzer and liver fibrosis of the mice was assessed by Masson staining and HE staining. Meanwhile, the protein levels of collagen type I and α -smooth muscle actin (α -SMA) were evaluated by Western blot analysis. **Results** Zhizi Bopi Decoction and each different treatment group could evidently inhibit the increased serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), hydroxyproline (Hyp) and hyaluronic acid (HA) activities, and improve the pathological changes of mouse livers. Furthermore, the therapeutic effects on liver fibrosis induced by CCl₄ in mice were primarily ascribed to the synergic effect of *Gardenia jasminoides Ellis*, *Cortex phellodendri* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* ($P < 0.01$). And they could obviously reduce the protein expression levels of collagen type I and α -SMA in the liver ($P < 0.01$). In addition, Zhizi Bopi Decoction could also obviously reduce the contents of transforming growth factor- β (TGF- β). **Conclusion** Zhizi Bopi Decoction and its compatibility all perform significant anti-fibrotic effects on the liver in different degree, but the compatibility of *Gardenia jasminoides Ellis*, *Cortex phellodendri* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* exert the most distinctly anti-fibrotic effects among them, possibly by reducing the contents of TGF- β .

Key words Zhizi Bopi Decoction; compatibility; hepatic fibrosis; α -SMA