

维吾尔药小茴香对肝纤维化大鼠转化生长因子- β 1 的影响

吴小川^{1,2}, 马秀敏^{1,2}, 薛志琴², 朱玥洁², 马骏³, 侯敏^{1,2}, 薛洁¹, 丁剑冰^{1,2}

1. 新疆医科大学新疆中维药药学重点实验室, 乌鲁木齐 830011

2. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011

3. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000

摘要 观察维吾尔药小茴香对实验性大鼠肝纤维化转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 的影响, 探讨其抗肝纤维化作用及其机制。选取健康 Wistar 大鼠 48 只, 随机分为正常对照组、肝纤维化模型组、维吾尔药小茴香组、秋水仙碱组, 共 4 组, 每组 12 只。除正常对照组外, 其他各组均腹腔注射 40% 的四氯化碳油造模剂 2mL/kg, 药物干预组造模, 同时分别给予维吾尔药小茴香 100mg/kg 和秋水仙碱 0.2mg/kg, 持续 6 周。各组大鼠留取肝组织进行病理学观察和 TGF- β 1 免疫组化染色。结果显示, 小茴香可显著降低给药组大鼠 TGF- β 1 表达水平 ($P < 0.01$), 小茴香组大鼠肝纤维化程度较模型组明显改善, 表明维吾尔药小茴香具有明显的抗肝纤维化作用, 并可降低实验性大鼠 TGF- β 1 水平。

关键词 肝纤维化; 维吾尔药小茴香; 转化生长因子- β 1

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)09-0084-05

Effect of Uygur *Foeniculum Vulgare* Mill on Transfer Growth Factor- β 1 of Experimental Hepatic Fibrosis Rats

WU Xiaochuan^{1,2}, MA Xiumin^{1,2}, XUE Zhiqin², ZHU Yuejie², MA Jun³, HOU Min^{1,2}, XUE Jie¹, DING Jianbing^{1,2}

1. Xinjiang Pharmacology Lab of Traditional Chinese and Uygur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. College of Pre-clinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

3. Traditional Chinese Medical Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Abstract To study the effect of Uygur *Foeniculum vulgare* Mill on Transfer Growth Factor - β 1 (TGF- β 1) of experimental hepatic fibrosis rats, 48 Wistar rats were divided into 4 groups randomly, i.e., the normal control group, the model group, the colchicines group, and the Uygur *Foeniculum vulgare* Mill group. All rats except for those in the normal control group were induced with 2mL/kg carbon tetrachloride. Uygur *Foeniculum vulgare* Mill group and colchicines group were treated with 100mg/kg Uygur *Foeniculum vulgare* Mill and 0.2mg/kg colchicines, respectively, for 6 weeks. Live tissue of hepatic fibrosis was extirpated for pathologic examination with Hematoxylin-Eosin (HE) stains and expression of TGF- β 1 with immunohistochemistry stain. The results show that the degree of hepatic fibrosis in the *Foeniculum vulgare* Mill preventive group was improved significantly as seen from staining of HE. The expression of TGF- β 1 in the model group was in a higher level than that in the normal group ($P < 0.01$). But the expression level of TGF- β 1 in the *Foeniculum vulgare* Mill group was lower than that in the model group. It is inferred that *Foeniculum vulgare* Mill can be used to prevent rat hepatic fibrosis by reducing expression of TGF- β 1 and to improve hepatic functions.

Keywords hepatic fibrosis; Uygur *Foeniculum vulgare* Mill; TGF- β 1

收稿日期: 2009-11-23

基金项目: 新疆维吾尔自治区教育厅重点项目(XJED2008I17); 新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划项目(PT0708)

作者简介: 吴小川, 实验师, 研究方向为病理学, 电子信箱: xiaocuanwu2006@163.com; 丁剑冰(通信作者), 教授, 研究方向为中药及维吾尔药的免疫功能, 电子信箱: djbing002@sina.com

0 引言

肝纤维化的主要成因是肝细胞坏死和慢性炎症损伤引起的肝细胞外基质 (Extra Cellular Matrix, ECM) 的增生和降解失去平衡。在中国,慢性肝损伤的主要原因是病毒性肝炎、酗酒和药物滥用^[1-2]。肝纤维化是一切慢性肝病发展的共同途径,其主要表现为大量的纤维组织在肝脏内堆积^[3]。大量纤维组织在肝脏中的堆积造成肝功能紊乱、门静脉高压,最终发展成肝硬化^[4]。在细胞学水平,肝纤维化是以肝星型细胞 (Hepatic Satellite Cell, HSC) 激活为特征的, HSC 激活后进一步转化为肌成纤维样细胞,分泌大量的 ECM^[2,5]。肝纤维化的治疗旨在抑制 HSC 的激活、抑制胶原的增生、促进胶原的降解等减轻纤维化程度,延缓其发展,乃至逆转其病理进程^[6-7]。鉴于肝纤维化可以逆转,将抗肝纤维化作为治疗慢性肝病的一个环节具有重要意义。

西药秋水仙碱、干扰素- γ 、核苷类似物等虽可抑制肝纤维化,但因其价格、疗效、作用靶点单一及有副作用等因素,临床应用受到限制^[8]。中药具有多成分、多环节的作用特点,对病理复杂的疾病可发挥其综合优势。中医药如丹参、冬虫夏草、银杏叶提取物等在抗肝纤维化中具有良好的作用^[9-10]。伞形科植物小茴香 (*Foeniculum vulgare* Mill) 为维吾尔医常用药材,具有抗菌、消炎、镇痛、祛风的作用^[11-13],民间有应用小茴香作为偏方治疗肝纤维化的案例,但有关维吾尔药抗肝纤维化研究报道极少。本课题组应用维吾尔药小茴香对四氯化碳 (Carbon Tetrachloride, CCl_4) 诱导的肝纤维化大鼠模型进行预防性治疗,与已知具有治疗肝纤维化作用的秋水仙碱进行对比,发现维吾尔药小茴香具有一定的抗肝纤维化作用。在此基础上,本研究分析维药小茴香对肝纤维化大鼠模型的转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 表达的影响,探讨维吾尔药小茴香抗肝纤维化的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 大鼠 48 只,雄性,体重 (200 ± 20) g,购于新疆医科大学实验动物中心。大鼠分笼饲养,自由饮水,室温和湿度适宜,自然采光,实验前适应环境 1 周,给予常规大鼠饲料喂养。

1.2 试剂

维吾尔药小茴香购自新疆维吾尔自治区医院,常规方法制成煎剂并浓缩成 1 mL 中含小茴香 1 g;秋水仙碱粉剂 (Fluka 产品);四氯化碳分析纯 (天津市北方天医化学试剂厂,批号 20070321);液体石蜡 (天津市福晨化学试剂厂);大鼠 TGF- $\beta 1$ 检测试剂盒 (北京晶美生物工程有限公司);大鼠 TGF- $\beta 1$ 单克隆抗体 (Santa Cruz 生物技术有限公司);免疫组织化学染色试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司)。

1.3 方法

将 48 只大鼠随机分为 4 组:① 小茴香组:12 只,用 CCl_4 与花生油 1:1 的混合物 2 mL/(kg $\cdot$ d⁻¹),2 次/周,10% 酒精 5 mL/(kg $\cdot$ d⁻¹) 灌胃,同时给予小茴香 100 mg/(kg $\cdot$ d⁻¹),持续 6

周;② 正常对照组:12 只,以花生油 2 mL/kg,2 次/周,灌胃,以与小茴香组等体积蒸馏水灌胃,1 次/d,持续 6 周;③ 肝纤维化模型组:12 只,用 CCl_4 与花生油 1:1 的混合物 2 mL/kg,2 次/周,10% 酒精 5 mL/(kg $\cdot$ d⁻¹),灌胃,同时以与小茴香组等体积蒸馏水灌胃,1 次/d,持续 6 周;④ 秋水仙碱组:12 只,用 CCl_4 与花生油 1:1 混合物 2 mL/kg,2 次/周,10% 酒精 5 mL/(kg $\cdot$ d⁻¹) 灌胃,同时给予秋水仙碱 0.2 mg/(kg $\cdot$ d⁻¹),持续 6 周。

1.4 取材

大鼠处死前禁食 24 h,称取体重,用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (1.5 mL/kg),腹主动脉取血 4 mL,分离血清, -80℃ 冰箱保存待测。然后处死动物,迅速切取肝脏标本置于冰盐水中充分洗涤,称取脾重。留取肝左叶组织置于 10% 中性甲醛中固定待检。

1.5 指标及方法

1.5.1 肝脏指数、脾脏指数测定

称 Wistar 大鼠体重,处死动物,剥离肝脏、脾脏,分别称重,结果以肝脏指数 (肝重/体重 $\times 100$)、脾脏指数 (脾重/体重 $\times 100$) 表示。

1.5.2 肝脏病理学观察

将固定好的肝组织用石蜡包埋、切片、常规 HE 组织学染色,光镜下观察病理变化。

1.5.3 免疫组化染色

肝组织 TGF- $\beta 1$ 的表达采用免疫组化染色法测定。石蜡切片脱蜡和水化后,用 PBS 冲洗 3 次;氧化物酶阻断液 (试剂 A) 室温下孵育 20 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性;枸橼酸修复液进行高压抗原修复;每张切片加 50 μ L (1:100 稀释) 第一抗体,4℃ 过夜;PBS 冲洗,每张切片加 50 μ L 酶二抗聚合物,4℃ 过夜;PBS 冲洗;每张切片加 50 μ L 新鲜配制的 DAB,水冲洗,苏木素复染,中性树胶封固,显微镜下观察。对照染色:PBS 替代一抗作阴性对照。染色结果:TGF- $\beta 1$ 以胞浆内出现棕色颗粒为阳性表达。染色结果判断:于切片的 4 个角及中央部分,分别选取 5 个观测视野 (避开边缘效应),并要求每个观测视野包含 1 个汇管区加 1 个肝小叶或 1 条纤维间隔。计数 TGF- $\beta 1$ 阳性表达细胞数。

1.5.4 肝功能指标

谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLB) 检测按照试剂盒说明书加样后,全自动生化分析仪自动检测并计算结果。

1.6 统计学处理

正态性数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态性数据用平均秩和表示。统计学处理用 SPSS 13.0 和 PEIMS 3.0 统计软件对多组正态性资料进行方差分析,对非正态性资料进行等级资料的秩和检验。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

各组 Wistar 大鼠实验前一般状况良好。正常组一般状态

的肝细胞,明显减轻其肝细胞损伤,减少肝纤维化发生的始动因素,保护肝细胞免于进一步受损及纤维化的发展。

血清白蛋白是肝细胞特异分泌的功能性蛋白,反应肝细胞功能受损情况。肝细胞受损时白蛋白分泌量下降。肝脏疾病在白蛋白下降的同时一般都伴有球蛋白升高,白球蛋白比例下降,反应了肝功能的变化。与模型组比较,小茴香预防治疗后明显升高血清白蛋白含量和白球蛋白比例,表明小茴香对 CCl_4 诱发实验性肝纤维化大鼠肝脏功能具有明显的改善作用,可以通过进一步的动物治疗实验研究其功效,为今后的临床用药提供实验依据。

4 结论

抑制细胞因子表达,可能是小茴香预防肝纤维化作用的机制之一。研究结果表明,维吾尔药小茴香具有明显的抗肝纤维化作用,可能是通过降低 $\text{TGF-}\beta 1$ 表达,最终阻止肝纤维化。

参考文献 (References)

- [1] Wang X Z, Zhang L Y. Effect of transmitters and interleukin-10 on rat hepatic induced by CCl_4 [J]. *Journal of World Gastroenterol*, 2003, 9(3): 539-543.
- [2] 谢渭芬, 林勇. 肝纤维化治疗进展 [J]. *实用临床医药杂志*, 2005, 9(7): 14-17.
Xie Weifen, Lin Yong. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, 2005, 9(7): 14-17.
- [3] 彭彦辉, 刘殿武, 郝玉斌, 等. 中药方剂对肝纤维化大鼠肝脏 ALR 基因表达的影响[J]. *疾病控制杂志*, 2006, 10(4): 335-338.
Peng Yanhui, Liu Dianwu, Hao Yubin, et al. *Journal of Disease Control & Prevention*, 2006, 10(4): 335-338.
- [4] 张丰, 曹苇, 王玮, 等. 肝硬化大鼠模型及合并感染时 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-6 的基因表达[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2006, 12(4): 285-286.
Zhang Feng, Cao Wei, Wang Wei, et al. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*, 2006, 12(4): 285-286.
- [5] Meng X W, Chi B R, Chen L G, et al. Expression of interferon- α beta receptor protein in liver of patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease [J]. *The Journal of World Gastroenterol*, 2005, 11(25): 3962-3965.
- [6] 于建国. 肝纤维化和肝硬化防治研究进展 [J]. *实用肝病杂志*, 2004, 7(4): 245-247.
Yu Jianguo. *Journal of Clinical Hepatology*, 2004, 7(4): 245-247.
- [7] 梁扩寰, 李绍白. 肝脏病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 796-798.
Liang Kuohuan, Li Shaobai. *Hepatology* [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2003: 796-798.
- [8] 曹民德. 肝纤维化治疗对策[J]. *中华肝病杂志*, 2001, 9(2): 68-69.
Cao Minde. *Chinese Journal of Hepatology*, 2001, 9(2): 68-69.
- [9] 张杰, 徐列明. 中医药治疗实验性肝纤维化作用机制研究进展 [J]. *中西医结合学报*, 2003, 1(2): 142-145.
Zhang Jie, Xu Lieming. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2003, 1(2): 142-145.
- [10] 时昭红, 张介眉. 银杏叶提取物对实验性大鼠肝纤维化的逆转作用 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2005, 13(3): 148-151.
Shi Zhaohong, Zhang Jiemei. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion*, 2005, 13(3): 148-151.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 32.
State Committee of Pharmacopeia. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (First division)*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 32.
- [12] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 第2版. 上海: 上海科技出版社, 2006: 347-349.
Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. *Dictionary of Traditional Chinese Medicine*[M]. 2nd ed. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2006: 347-349.
- [13] 阿不都·热依木. 小茴香和洋茴香对多种活性氧的清除作用研究[J]. *维吾尔医药*, 1998, 1: 38-40.
Reyimu Abudu. *Uygur Medicine*, 1998(1): 1-38.
- [14] 陈旭军. 肝纤维化动物模型的选择及评介[J]. *湖南中医药导报*, 2002, 8(12): 785.
Chen Xujun. *Hunan Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology*, 2002, 8(12): 785.
- [15] Ueberham E, Low R, Ueberham U, et al. Conditional tetracycline-regulated expression of $\text{TGF-}\beta$ in the liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis[J]. *Hepatology*, 2003, 37: 1067-1078.
- [16] 金峰, 张捷, 张志坚, 等. 四氯化碳诱导大鼠肝硬化模型方法的研究 [J]. *中华实用医学*, 2003, 5(16): 43-44.
Jin Feng, Zhang Jie, Zhang Zhijian, et al. *Journal of Chinese Practical Medicine*, 2003, 5(16): 43-44.
- [17] Zhang Lijuan, Yu Jieping, Li Dan, et al. Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats [J]. *World Journal of Gastroenterol*, 2004, 10(1): 77-81.
- [18] Gressner A M, Weisirchen R. Modern pathogenic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and $\text{TGF-}\beta$ as major players and therapeutic targets [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2006, 10(1): 76-99.
- [19] 刘君炎, 邓长生, 时绍红. 银杏叶提取物抗大鼠肝纤维化的实验研究 [J]. *临床消化病杂志*, 2004, 16(1): 15-18.
Liu Junyan, Deng Changsheng, Shi Shaohong. *Chinese Journal of Clinical Gastroenterology*, 2004, 16(1): 15-18.
- [20] 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣, 等. 金三戟对实验性大鼠 $\text{TGF-}\beta 1$ 、 Smad3 、 Smad7 及 CTGF 表达的影响[J]. *天津中医药*, 2004, 21(1): 62-64.
Song Shiling, Gong Zuojiong, Zhang Quanrong, et al. *Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2004, 21(1): 62-64.
- [21] Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, et al. Anti- $\text{TGF-}\beta$ strategies for the treatment of chronic liver disease [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2005, 29: 1215-1315.
- [22] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and $\text{TGF-}\beta$ as major players and therapeutic targets[J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10: 76-99.

(责任编辑 李慧政)