【简报】

紫叶丹胶囊治疗二乙基亚硝胺诱导肝硬化模型大鼠的研究

郭 平，康 超，钟 云，蒿长英，黄 卉*
（北京汉典制药有限公司企业技术中心，北京 100020）

摘要：目的 探讨紫叶丹胶囊对二乙基亚硝胺诱导的肝硬化模型大鼠的干预作用。**方法** Wistar 大鼠随机分为治疗组、模型组和正常组，每组各 40 只。治疗组和模型组腹腔注射二乙基亚硝胺诱导大鼠肝硬化模型，治疗组给予紫叶丹胶囊（0.781 g/kg）灌胃，连续给药 16 周，模型组和正常组以等体积的纯水灌胃。观察各组第 4、8、12、16 周体质量变化、肝脏病变及肝组织中Ⅰ、Ⅲ型胶原和生长转化因子 -β_1（TGF-β_1）信使 RNA（mRNA）的表达。**结果** ①模型组与治疗组各时间点体质量均低于正常组（$P < 0.01$）；②第 12 周时治疗组的纤维化程度评分较模型组降低（$P < 0.05$）；③与模型组比较，治疗组第 4、8、12、16 周时Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 的表达均明显降低（$P < 0.01$），第 12、16 周时 TGF-β_1 mRNA 的表达明显降低（$P < 0.01$）。**结论** 紫叶丹胶囊具有抑制二乙基亚硝胺诱导大鼠肝硬化形成的作用，其机制可能与下调Ⅰ、Ⅲ 型胶原和 TGF-β_1 mRNA 的表达有关。

关键词：紫叶丹胶囊；肝硬化；肝纤维化；二乙基亚硝胺
中图分类号：R977.1^{+}5；R-33 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2018）07-0464-06
DOI：10.13683/j.wph.2018.07.006

Study on Ziyedan capsule in the treatment of diethylnitrosamine induced rat cirrhosis

GUO Ping, KANG Chao, ZHONG Yun, HAO Chang-ying, HUANG Hui*
(*Beijing Han Dian Pharmaceutical Co.,Ltd. Enterprise Technology Center, Beijing 100020,China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the effect of traditional Chinese medicine Ziyedan capsule on the rats cirrhosis induced by diethylnitrosamine（DEN）. ***Methods*** A total of 120 Wistar rats were randomly divided into treatment group, model group and normal group, with 40 rats in each group. The rats in the treatment group and the model group were injected with DEN, and the treatment group was administered with Ziyedan capsule (0.781 g/kg) for 16 weeks. The expression of type Ⅰ and Ⅲ collagen and transforming growth factor-β_1（TGF-β_1）mRNA in liver disease and liver tissue and body weight were observed at 4th, 8th, 12th and 16th week. ***Results*** ①Compared with the normal group, body weights in model group and treatment group were decreased（$P<0.01$）. ②Compared with the model group, the fibrosis score of the treatment group at 12th week was decreased（$P<0.01$）. ③Compared with the model group, the expressions of type Ⅰ and Ⅲ collagen mRNA in the treatment group at 4th, 8th, 12th and 16th week were significantly decreased（$P<0.01$）. The expression of TGF-β_1 mRNA was significantly decreased at 12th, and 16th week（$P<0.01$）. ***Conclusion*** Ziyedan capsule can inhibit the formation of cirrhosis induced by DEN in Wistar rats. Its mechanism may be related to the down-regulation of the expression of type Ⅰ, Ⅲ collagen and TGF-β_1 mRNA.

Key words: Ziyedan capsule; cirrhosis; fibrosis; diethylnitrosamine

---

收稿日期：2018-02-03；**修回日期：**2018-05-23
作者简介：郭 平，药理研究员，研究方向：中药防治代谢性疾病的基础与临床研究，专业特长：新药研发、体内外药效评价及机制研究。
通信作者：黄 卉，药理毒理室主任，研究方向：抗肿瘤药理研究、抗糖尿病药理研究，专业特长：新药研发、体内外药效评价及机制研究。
基金项目：中小企业创新基金（编号：09C26211100043）。

肝硬化为常见慢性肝脏疾病，是各种肝损伤共同的终末阶段，按病因可分为肝炎性、酒精性和胆汁性肝硬化等。我国主要以乙型和丙型病毒性肝炎为主要发病原因[1]。紫叶丹胶囊由叶下株、云芝、丹参和紫草组成，具有清肝解毒、活血化瘀之功效，临床用于治疗慢性乙型病毒性肝炎辨证属湿热内蕴兼气虚血瘀型患者。药理试验证明，紫叶丹胶囊可降低感染乙型病毒性肝炎病毒鸭血清中的鸭乙型肝炎病毒（DHBV）-DNA 水平，改善环磷酰胺所致免疫功能低下，并对四氯化碳所致的慢性肝损伤模型大鼠和短小棒状杆菌加脂多糖所致的免疫性肝损伤模型小鼠有保护作用。本研究使用二乙基亚硝胺诱导大鼠肝硬化模型，观察紫叶丹胶囊在大鼠由肝损伤到肝纤维化最终发展为肝硬化过程中的干预作用。

1　材料与方法

1.1　动物

6 周龄雄性 Wistar 大鼠，120 只，体质量约 200 g，购自斯贝福（北京）实验动物科技有限公司，生产许可证号：SCXK（京）20110004。

1.2　药品与试剂

紫叶丹胶囊（商品名：紫珠，北京汉典制药有限公司生产，生产批号：13040102，规格 0.5 g/ 粒）。二乙基亚硝胺（Sigma 公司生产，生产批号：049K1613V，比重 0.95 g/ml）。聚合酶链反应（PCR）引物（由北京奥科鼎盛生物科技公司合成）。

1.3　方法

Wistar 大鼠按体质量进行随机区组分组，分为治疗组、模型组和正常组，每组各 40 只。治疗组和模型组按 50 mg/kg 剂量腹腔注射二乙基亚硝胺，一周 2 次，连续 4 周，之后改为 50 mg/kg 剂量腹腔注射，一周 1 次，注射至 14 周后停止注射；正常组按等体积腹腔注射生理盐水；继续饲养至 16 周。治疗组给予紫叶丹胶囊灌胃，给药剂量为 0.781 g/kg，一日 1 次，灌胃给药连续 16 周，模型组和正常组以等体积的纯水灌胃。

1.4　观察指标

分别记录第 4、8、12 和 16 周时各组大鼠体质量。每组分别于第 4、8、12、16 周时各取 4 只大鼠，处死并摘取肝脏组织固定于 10% 甲醛溶液中，经梯度酒精脱水，石蜡包埋，切片厚度 4 μm，苏木精 - 伊红（HE）染色，光镜检查肝脏组织病理学变化记录肝纤维化评分情况。根据纤维化程度将肝脏组织病理学变化分级[2]：0 级：正常肝脏组织（记 0 分）；1 级：胶原纤维从中央静脉或汇管区向外延伸（记 1 分）；2 级：胶原纤维延伸明显，纤维间隔开始形成（记 2 分）；3 级：胶原纤维不全分隔包绕肝小叶（记 3 分）；4 级：胶原纤维包绕分隔肝小叶，以大方形假小叶为主（记 4 分）；5 级：肝小叶结构完全被破坏，假小叶形成大方形假小叶及小圆形肝小叶各占 50%（记 5 分）；6 级：肝内布满小圆形假小叶，假小叶间有粗大增生的胶原纤维（记 6 分）。

逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）法检测Ⅰ、Ⅲ型胶原、转化生长因子（TGF）-β_1 信使 RNA（mRNA）：Trizol 法提取肝脏组织总 RNA；逆转录反应条件为 30 ℃ 10 min、50 ℃ 30 min、99 ℃ 5 min 和 5 ℃ 5 min 合成互补 DNA。TGF-β_1 上游引物 5'-CCGCAACAACGCAATCTA-3'，下游引物 5'-AGCCACTCAGGCGTATCA-3'，扩增长度 243 bp；Ⅰ型胶原上游引物 5'-TGCCGTGACCTCAAGATG TG-3'，下游引物 5'-CACAAGCGTGCTGTAGGTGA-3'，扩增长度 462 bp；Ⅲ型胶原上游引物 5'-GAGCGGAGAATACTGGGT-3'，下游引物 5'-CAATGTCATAGGGTGCGAT-3'，扩增长度 530 bp；β-actin 上游引物 5'-CGCGAGTACAACCTTCTTGCAGCT-3'，下游引物 5'-ATGGGCACAGTGTGGGTGACCC-3'，扩增长度 554 bp。PCR 扩增：扩增条件为Ⅰ、Ⅲ型胶原和 β-actin：94 ℃ 2 min，1 个循环，94 ℃ 30 s，57 ℃（β-actin 为 60 ℃）30 s，72 ℃ 30 s，共 35 个循环，72 ℃ 5 min，1 个循环；TGF-β_1：94 ℃ 5 min，1 个循环，94 ℃ 30 s，50.7 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 30 个循环，72 ℃ 5 min，1 个循环。用凝胶成像系统观察并记录结果，获取各条带光密度值。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用 One-way ANOVA 分析，两组间比较采用最小显著差值法（LSD），以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量变化情况

正常组大鼠饮食、活动及精神状态均未见异常。与正常组大鼠比较，模型组与治疗组第 4、8、12、16 周时体质量明显降低（$P < 0.01$），而模型组与治疗组大鼠体质量组间比较差异无统计学意义（$P > 0.05$，表 1）。

2.2 肝脏组织病理学结果

正常组：各时间点肝脏组织结构正常，未见明显病变与坏死，未见水肿、出血与浸润。模型组：于第 4 周起肝细胞可见轻微细胞水肿和脂肪变性，以及纤维增生，肝脏纤维化程度多为 2 ～ 3 级，偶见细胞异型性改变，分化程度高，汇管区可见少量炎性细胞浸润；至第 8 周，肝细胞出现明显细胞水肿，表现为细胞体积较大，细胞质疏松，细胞浆着色较浅，部分细胞出现轻度的小脂滴样空泡变性，包膜、汇管区和 /（或）间质纤维增生、延伸，形成大小不等的假小叶结构，肝纤维化程度多为 4 ～ 5 级，偶见细胞异型性改变，分化程度较高，汇管区可见少量炎性细胞浸润；至第 12 周，肝细胞索排列紊乱，肝小叶结构破坏，细胞出现水肿和空泡变性，可见再生结节及假小叶形成，结节内大量细胞坏死，形成大小和数量不等的囊腔，再生结节和假小叶结构布满整个肝脏组织，其纤维化程度多为 5 ～ 6 级，间质炎性细胞浸润。实质细胞大小不等，并出现较为广泛的核异常，可见病理性核分裂象，细胞透明样变性、水变性、胞浆嗜碱变或嗜酸变；至第 16 周，肝小叶结构完全破坏，肝索排列紊乱，肝细胞增生结节增多，小叶塌陷，肝板消失，合并出血多见，结节内肝细胞异型性增生明显，胞质染色不均匀，核奇形怪状、深染、密度增加，可见嗜碱性或嗜酸性和透明肝细胞增生灶，有些细胞呈腺管状排列，间质内炎性细胞浸润，肝纤维化程度多为 5 ～ 6 级（图 1）。

表 2 显示，第 8 周后治疗组肝组织纤维化程度评分较模型组显著降低，其中第 12 周纤维化程度评分，治疗组与模型组比较差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。

2.3 RT-PCR 结果

与正常组比较，模型组第 4、8、12、16 周时，Ⅰ、Ⅲ 型胶原、TGF-β_1 mRNA 的表达均明显升高（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。与模型组比较，治疗组第 4、8、12、16 周时，Ⅰ、Ⅲ 型胶原 mRNA 的表达均明显降低（$P < 0.01$），第 12、16 周时 TGF-β_1 mRNA 的表达明显降低（$P < 0.01$）（表 3 ～ 5、图 2）。

3 讨论

肝硬化的形成是一个缓慢的动态过程。首先是由慢性病毒性肝炎等多种疾病引起肝损伤，继而在肝损伤的修复过程中，释放 TGF-β、血小板衍生生长因子（PDGF）、白介素 -1（IL-1）和肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）等大量细胞因子，使肝星状细胞（HSC）

表 1 各组体质量比较（$\bar{x}\pm s$，单位：g）

Table 1 Comparison of weight in each group（$\bar{x}\pm s$，unit: g）

组别	第 4 周（n=40）	第 8 周（n=36）	第 12 周（n=32）	第 16 周（n=28）
正常组	378.8±27.4	470.3±35.4	519.8±34.3	553.2±33.7
模型组	297.7±25.8**	323.8±49.1**	329.1±60.2**	344.1±60.5**
治疗组	301.4±31.4**	335.0±57.8**	337.0±54.5**	331.5±47.4**

与正常组比较，**P<0.01

vs normal group, **P<0.01

表 2　大鼠肝硬化形成过程中纤维化程度评分比较

（$\bar{x}\pm s$，$n=4$，单位：分）

Table 2　Comparison of fibrosis scores in cirrhosis rats

（$\bar{x}\pm s$，$n=4$，unit: score）

组别	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
模型组	2.3±0.5	4.8±0.5	5.8±0.5	5.5±0.8
治疗组	2.8±2.4	4.0±1.2	4.8±0.5$^{\triangle}$	4.8±1.3

与模型组比较，$^{\triangle}P<0.05$

vs model group, $^{\triangle}P<0.05$

活化、增殖、转型并大量分泌细胞外基质（ECM），导致肝纤维化的发生，而肝纤维化持续发展可进一步形成肝硬化[3-4]。其中，TGF-β 水平升高是纤维化患者的共性，其可激活 HSC 活化和增殖，而被激活的 HSC 又通过自分泌途径产生 TGF-β 进一步激活 HSC，形成恶性循环，同时 TGF-β 还具有增加 ECM

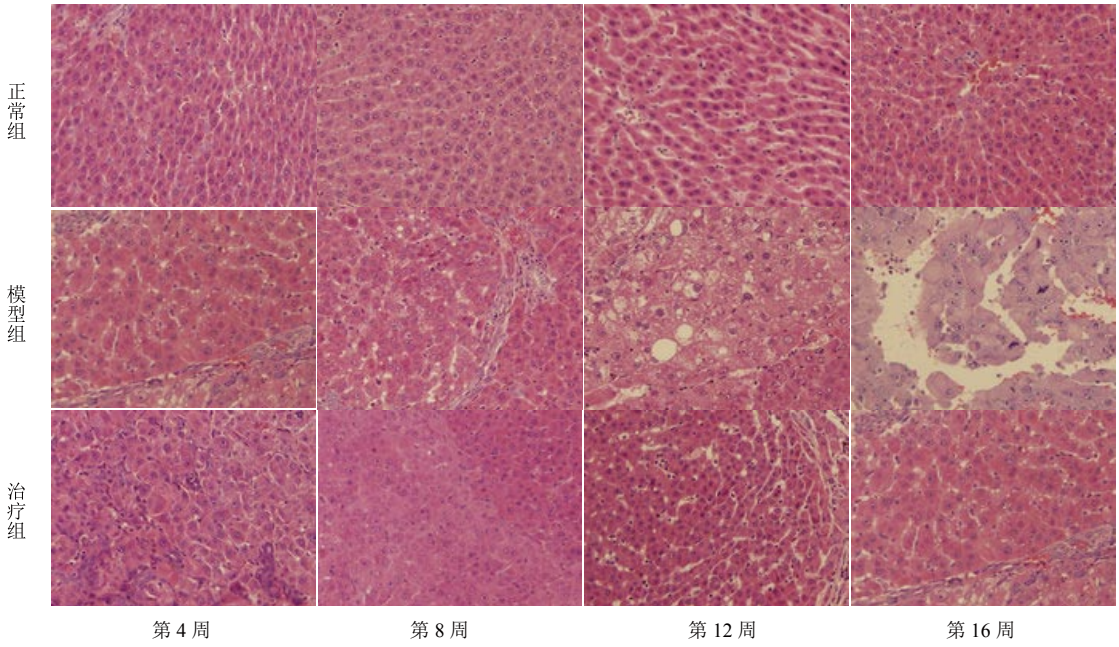


图 1　各组肝脏病变的 HE 显微照片（$n=4$，×200）

Figure 1　HE micrograph of liver lesions in each group（$n=4$，×200）

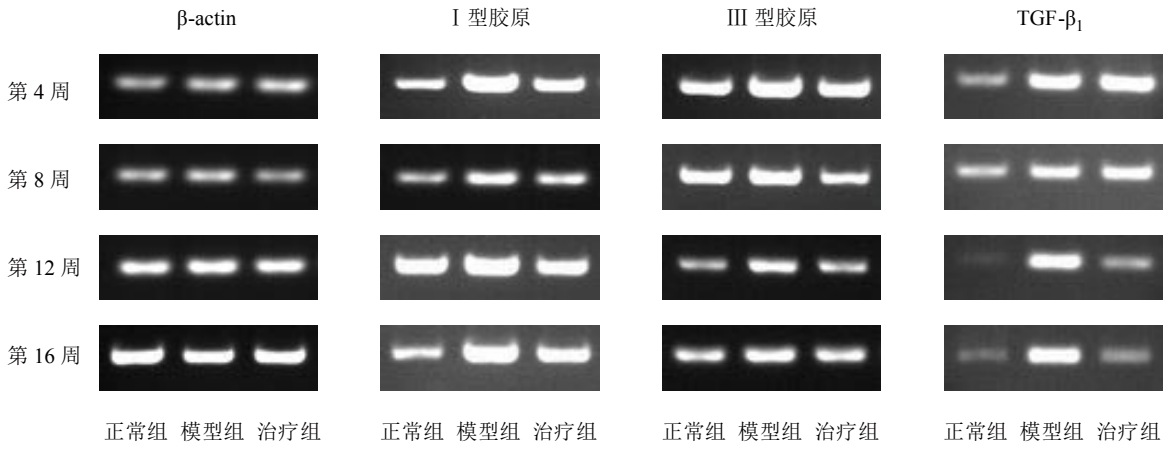


图 2　RT-PCR 电泳图

Figure 2　RT-PCR electrophoretic diagram

表 3 各组大鼠肝组织Ⅰ型胶原 mRNA 表达（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

Table 3 Expression of type Ⅰ collagen mRNA of rat liver tissue in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组别	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常组	1.084±0.056	0.69±0.074	0.753±0.020	0.201±0.040
模型组	1.599±0.049**	1.259±0.077**	0.975±0.021**	0.763±0.026**
治疗组	1.069±0.043△△	0.634±0.081△△	0.673±0.049**△△	0.508±0.046**△△

与正常组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，△△$P<0.01$

vs normal group, **$P<0.01$; *vs* model group, △△$P<0.01$

表 4 各组大鼠肝组织Ⅲ型胶原 mRNA 表达（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

Table 4 Expression of type Ⅲ collagen mRNA of rat liver tissue in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组别	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常组	0.435±0.051	0.915±0.053	0.505±0.055	0.834±0.062
模型组	0.992±0.056**	1.514±0.073**	0.659±0.069*	1.045±0.080**
治疗组	0.814±0.078**△△	1.095±0.041**△△	0.415±0.046△△	0.797±0.046△△

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

vs normal group, *$P<0.05$, **$P<0.01$; *vs* model group, △△$P<0.01$

表 5 各组大鼠肝组织 TGF-β_1 mRNA 表达（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

Table 5 Expression of TGF-β_1 mRNA of rat liver tissue in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组别	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常组	0.219±0.018	0.525±0.048	0.076±0.023	0.155±0.026
模型组	0.896±0.057**	0.837±0.048**	0.470±0.029**	0.782±0.034**
治疗组	0.877±0.080**	0.871±0.038	0.220±0.027**△△	0.182±0.015△△

与正常组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，△△$P<0.01$

vs normal group, **$P<0.01$; *vs* model group, △△$P<0.01$

合成并抑制 ECM 降解的作用[5]。ECM 包括胶原、非胶原糖蛋白及氨基多糖类等，胶原是 ECM 中最重要的成分，肝脏中主要有Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ型胶原，在肝纤维化过程中又以Ⅰ、Ⅲ型胶原含量变化为主[6]。本研究中，紫叶丹胶囊下调了Ⅰ、Ⅲ型胶原和 TGF-β_1 mRNA 的表达量，提示其作用机制可能是通过对Ⅰ、Ⅲ型胶原和 TGF-β_1 基因表达的调控来抑制 HSC 的活化、增殖、转型并减少 ECM 的合成，从而减缓从肝损伤到肝硬化的进程。正常组大鼠肝脏胶原 mRNA 出现进行性减少，原因可能是该研究取材后未立即检测，第 4 ～ 16 周的 PCR 检测也并非同时进行，所以可能在保存时间以及操作手法上影响了其表达量，但同一时间点同一检测指标的保存时间及操作手法可以保证具有一致性。

本研究对象紫叶丹胶囊为我国自主开发的抗乙型肝炎病毒中成药，由叶下株、云芝、丹参和紫草组成。现代药理学研究表明，君药叶下珠具有抗病毒、抗肿瘤、抗菌和内毒素、抗血栓形成、免疫调节、保肝、抗氧化和抑制 α- 淀粉酶等作用[7]，其提取物可通过减少促纤维化型细胞因子 IL-13 的分泌，下调脾细胞 GATA3 mRNA 的转录水平，从而抑制血吸虫病肝纤维化的形成与进展[8]；臣药云芝提取物能降低对乙酰氨基酚急性肝损伤小鼠血清谷丙转氨酶（ALT）和谷草转氨酶（AST）活性，并且提高对乙酰氨基酚致急性肝损伤小鼠肝脏组织匀浆内谷胱甘肽含量，减轻肝细胞坏死程度，从而具有保肝的作用[9]；丹参提取物可以通过降低 TGF-β_1、TNF-α 和 PDGF 等细胞分子的表达，阻滞钙离子通道，干预 c-Jun 氨基末端激酶、核转录因子（NF）-κB、细胞外调节蛋白激酶和内毒素等细胞内信号转导通路，从而抑制 HSC

的活化，最终达到抑制纤维化发展的目的[10]；紫草提取物具有显著抑制 D- 半乳糖胺诱导的肝损伤模型小鼠 ALT、AST 和丙二醛（MDA）的升高以及超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶的降低作用，且可能通过抑制 NF-κB 信号通路激活，进而减少一氧化氮合成，起到保护肝脏的作用[11-12]。由此可见，紫叶丹胶囊复方和组方中的各药物，在防止肝损伤至肝硬化的形成过程均具有重要的作用。本研究结果显示，紫叶丹胶囊治疗后大鼠纤维化程度显著减轻，与上述文献报道基本符合。总之，本研究探讨紫叶丹胶囊在大鼠由肝损伤到肝纤维化最终发展为肝硬化过程的干预作用，为增加新的临床适应证提供依据。

4　结论

紫叶丹胶囊具有抑制二乙基亚硝胺诱导大鼠肝硬化形成的作用，其机制可能与下调Ⅰ、Ⅲ型胶原和 TGF-β_1 mRNA 的表达有关。

参考文献：

[1]　陈奇. 中药药效研究思路与方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 511-511.
[2]　潘琳. 实验病理学技术图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 155-155.
[3]　王宏宾, 樊海宁, 邓勇. 肝星形细胞与肝纤维化的研究进展[J]. 青海医学院学报, 2008, 29(2): 133-137.
[4]　Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annu Rev Pathol, 2011, (6): 425-456.
[5]　王华, 魏伟. 肝纤维化与细胞因子的关系[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(2): 132-132.
[6]　李丝冰, 贾玉杰. 肝纤维化细胞外基质和星状细胞间的相互作用[J]. 生理科学进展, 2014, 45(6): 462-463.
[7]　程艳刚, 裴妙荣, 孔祥鹏, 等. 叶下珠化学成分和药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(4): 238-242.
[8]　黄艺芬. 叶下珠提取物对日本血吸虫感染所致小鼠肝纤维化的影响[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2011.
[9]　赵新湖, 包海鹰. 云芝对对乙酰氨基酚肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(7): 1633-1634.
[10]　董颖, 张翼宙. 丹参有效成分抗肝纤维化分子机制研究进展[J]. 山西中医学院学报, 2014, 15(2): 63-66.
[11]　买尔旦·马合木提, 刘燕, 尼加提·热合木. 新疆紫草提取物对 D- 氨基半乳糖致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1646-1649.
[12]　沈淼. 紫草素对刀豆蛋白 A 诱导的急性肝损伤的作用及初步机制[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(25): 1646-1649.

（责任编辑：雷　玲）

