

壮医方白花丹消蛊汤对 食蟹猴肝纤维化的干预作用及机制*

赵湘培^{1,2}, 陈少锋², 黄卫宣³, 苏华⁴, 阳明³, 余胜民², 覃子瑞³, 钟鸣^{2,4}

(1. 中央民族大学中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081; 2. 广西壮族自治区民族医药研究院, 南宁 530001; 3. 广西防城港市常春生物技术有限公司, 防城港 538000; 4. 广西中医药研究院, 南宁 530012)

摘要 **目的** 研究壮医方白花丹消蛊汤对食蟹猴肝纤维化的干预作用及其机制。**方法** 将食蟹猴随机分为4组, 除空白对照组外, 其余各组每周2次皮下注射60%四氯化碳(CCl_4)油剂 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 同时辅以高脂饲料喂养, 建立食蟹猴肝纤维化模型。造模6个月后, 各组相应给药, 白花丹消蛊汤小、大剂量组分别灌胃给予 $1.0, 4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (按处方生药量计算) 汤药, 空白对照组和模型对照组给予等体积纯化水。给药2个月后, 静脉采集食蟹猴血液样本, 检测各组食蟹猴血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (T-BiL) 含量, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测食蟹猴血清中转化生长因子- β ($\text{TGF-}\beta_1$)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、血清基质金属蛋白酶2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) 水平, 免疫组化观察肝组织 $\text{TGF-}\beta_1$ 的表达情况。**结果** 与模型对照组比较, 白花丹消蛊汤能降低肝纤维化食蟹猴血清 ALT、AST、T-BiL 含量, 能降低其血清中 α -SMA 及相关基质金属蛋白酶水平, 能调控肝纤维化食蟹猴肝组织 $\text{TGF-}\beta_1$ 的升高。**结论** 壮医方白花丹消蛊汤具有抗肝纤维化作用, 降低 $\text{TGF-}\beta_1$ 、 α -SMA 表达、调节肝脏细胞外基质的代谢是其发挥抗肝纤维化作用的部分机制。

关键词 白花丹消蛊汤; 壮医方药; 肝纤维化/食蟹猴

中图分类号 R285.5; R657.31

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2018)04-0434-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2018.04.006

Effect and Mechanism of Zhuang Medicine Baihuadan Xiaogu Decoction on Treating Experimental Liver Fibrosis in Macaca Fascicularis

ZHAO Xiangpei^{1,2}, CHEN Shaofeng², HUANG Weixuan³, SU Hua⁴, YANG Ming³, YU Shengmin², QIN Zirui³, ZHONG Min^{2,4} (1. Institute of Chinese Minority Traditional Medicine, Minzu University of China, Beijing 100081, China; 2. Guangxi Institute of Minority Medical, Nanning 530001, China; 3. Guangxi Fangchenggang Evergreen Biological Technology Development co., LTD, Fangchenggang 538000, China; 4. Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning 530012, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effect and mechanism of Baihuadan Xiaogu decoction (BHD) in liver fibrosis. **Methods** Macaca fascicularis were divided into four groups: the normal control group, the model control group, the BHD-L group and BHD-H group. Hepatic fibrosis models establish by CCl_4 ($0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) twice a week for 6 month, at the same time, high fat diet was feed. After six months, BHD-L and BHD-H ($1.0, 4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) were administered orally to groups respectively, whereas the normal control and model control groups were orally administered with pure water. Two months later, the blood sample was collected for the examination of alanine aminotransferase (ALT), glutamic oxalacetic transaminase (AST), and total bilirubin (T-BiL). The contents of transforming growth factor- β ($\text{TGF-}\beta$), α -smooth muscle actin (α -SMA), matrix metalloprotein (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in serum were analyzed by ELISA assay. The expression of $\text{TGF-}\beta_1$ in liver biopsy specimens was detected by immunohistochemical staining. **Results** Compared with model control group, both BHD groups can reduce the levels of Macaca fascicularis serum ALT, AST, T-BiL. It can reduce the levels of $\text{TGF-}\beta_1$, α -SMA and related matrix metalloprotein, regulatory effects on the expression of $\text{TGF-}\beta_1$. **Conclusion** BHD can prevent liver fibrosis in Macaca fascicularis by reducing the level of $\text{TGF-}\beta_1$, α -SMA and regulate the liver extracellular matrix metabolism.

KEY WORDS Baihuadan Xiaogu decoction; Traditional Zhuang medicine; Liver fibrosis/macaca fascicularis

肝纤维化是肝硬化的前趋阶段, 具有可逆转的特点, 发病机制非常复杂^[1]。以往的啮齿类肝纤维化模型, 虽然能模拟肝纤维化临床特征, 但都因其与人类遗传学上的相似性差距较大, 从疾病发生的种属性、疾病的诊断、疾病进展的了解及临床药物的筛选上均不能

满足要求, 得出的结论难以完全推广至人类, 从而无法满足研究的需要, 限制肝纤维化的研究^[2]。因此, 从人类近缘的动物模型上找到突破口具有重要的现实意义和必要性。食蟹猴属于哺乳纲灵长目猕猴属, 是目前国内外使用量最大的非人灵长类实验动物。食蟹猴

无论是在生理学、遗传学还是生物学特性上与人类都极相似,研究资料表明其许多疾病的机制和所表现出的临床症状也与人类极为相似,建立非人灵长类实验动物食蟹猴肝纤维化模型,为开展肝纤维化的发病进展、发病机制及抗肝纤维化药物研究工作,提供良好的研究工具^[3]。目前广西实验食蟹猴的存栏量和生产量均居全国首位,本课题组利用广西独特的食蟹猴资源优势,采用四氯化碳(CCl_4)复合高脂饮食诱导法建立食蟹猴肝纤维化模型,探讨壮医方白花丹消蛊汤对食蟹猴肝纤维化的干预作用及部分机制,为该方剂的临床使用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 20 只雄性食蟹猴来自于广西防城港市常春生物技术公司,年龄为 2~5 周岁,体质量 4~6 kg。所有试验用食蟹猴饲养于广西防城港市常春生物技术公司清洁级动物房,实验动物使用许可证号:SYXK(桂)2015-0001。动物均得到了妥善保护和关怀,并且得到动物伦理委员会的许可。

1.2 药物与试剂 白花丹消蛊汤由白花丹、排钱草、车前草、岗梅根、酸藤子、五爪金龙 6 味壮药组成。称取上述白花丹消蛊汤处方药材(上述药材均为课题组成员采集,并由广西民族医药研究院蓝日春主任药师鉴定)共 13 kg,加水 10~12 倍量,室温浸泡 1 h,加热煮沸 1 h,滤过。以上方法共提取 2 次,合并滤液,浓缩到 5 L。按照成人剂量 65 g/70 kg 换算,食蟹猴剂量应为 $0.975 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。结合预实验结果,本次实验设定白花丹消蛊汤小剂量组给药剂量为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、大剂量组为 $4.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(T-BiL)均为中国深圳迈瑞试剂盒,生产批号分别为 150116012, 150216009, 150616014。TGF- β_1 、 α -SMA、MMP-2、TIMP-1 ELISA 试剂盒均为 R&D 公司产品,生产批号均为 201602。

收稿日期 2017-01-06 修回日期 2017-05-05

基金项目 * 广西科学研究与技术开发计划课题(桂科能 14123006-6);广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项课题(GZBZ14-13);防城港市科学与技术开发课题(防科能 14024003)

作者简介 赵湘培(1986-),女,广西南宁人,助理研究员,在读博士,主要从事民族药药理学研究。电话:0771-3137645, E-mail: zhaoxiangpei@126.com。

通信作者 钟鸣(1964-),男,广西南宁人,研究员,主要从事民族药药理学研究。电话:0771-3137645, E-mail: gxmysz@126.com。

1.3 主要仪器 BS-350E 型全自动生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),18G L-130mm 型肝穿刺活检枪(日本 TSK 株式会社),EG1150H 型石蜡包埋机、RM2255 型组织切片机、DM2500 型光学显微镜均为 Leica 公司产品,V4.6 高清晰度彩色医学图文分析系统(LAS 公司),高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),Multiscan MK3 型酶标仪(赛默飞世尔上海仪器有限公司)。

1.4 肝纤维化食蟹猴模型的建立 采用 CCl_4 复合高脂饮食诱导法建立食蟹猴肝纤维化模型^[3-4]。具体造模方法如下:选取雄性食蟹猴 20 只,实验前均采集动物静脉血液,随机抽取 3 只作为空白对照组,除空白对照组外,其余动物均以 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 皮下注射 CCl_4 油剂(60% CCl_4 橄榄油剂)造模,每周 2 次,同时辅以高脂饲料(配方:基础饲料 69.3%、猪油 10%、甲硫氧嘧啶 0.2%、蛋黄粉 10%、胆固醇 10%、胆酸钠 0.5%)。造模前及造模后每隔 3 个月,所有动物进行快速穿刺肝活检并采集其静脉血液,根据相关血液指标及肝组织苏木精-伊红(HE)、Masson 染色结果判定成模情况^[5-8]。造模 6 个月后,动物肝穿组织均出现肝小叶结构破坏、纤维组织增生、胶原纤维沉积等现象,判定造模成功。造模的 17 只食蟹猴中,12 只被判定造模成功。

1.5 分组及给药 未造模的 3 只食蟹猴即为空白对照组,成模的食蟹猴按照肝纤维化程度的轻重分级,再随机分为 3 组,即模型对照组 3 只、白花丹消蛊汤小剂量组(BHD-L)3 只、白花丹消蛊汤大剂量组(BHD-H)3 只。空白对照组和模型对照组灌胃给予等体积纯化水,汤剂组分别给予相应的药物剂量。所有剂量组均给药每天 1 次,根据体质量连续给药 2 个月。

1.6 一般情况记录 从造模开始,每 1 个月记录实验动物体质量一次,根据体质量给予造模剂及相应药液,观察造模剂和药物对食蟹猴一般情况的影响。

1.7 血清学检测 于末次给药后采集外周血。采血前 1 天晚 21:00 开始禁食不禁水,次日上午 9:00 采集外周血 5 mL,于常温下放置 2 h, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ($r=3 \text{ cm}$) 分离血清。全自动生化分析仪检测血清中 ALT、AST、T-BiL 水平;按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作,测定 TGF- β_1 、 α -SMA、MMP-2、TIMP-1 水平。

1.8 肝组织 TGF- β_1 免疫组织化学染色 采集末次给药后肝穿组织标本,多聚甲醛溶液中浸泡固定,常规石蜡包埋,切片厚 $5 \mu\text{m}$ 。采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合法(SABC 法)对 TGF- β_1 蛋白表达进行检测。一抗分别采用 TGF- β_1 兔抗人多克隆抗体,苏木精进行复染,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,棕色颗

粒为阳性表达。免疫组化结果分析,根据细胞染色程度及染色细胞百分率进行分析评定:基本不着色为0分,着色淡黄为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;着色细胞占计数细胞百分率:5%以下为0分,>5%~25%为1分,>25%~50%为2分,>50%为3分。显色指数=整张切片染色程度得分×染色细胞百分率得分^[9-10]。

1.9 统计学方法 采用SPSS19.0版软件统计学分析。结果采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,所有的统计进行方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对肝纤维化食蟹猴体质量的影响 造模及药物干预对肝纤维化食蟹猴体质量的影响:随着造模时间的延长,食蟹猴食欲变差,活动减少,体质量增长较空白对照组缓慢,甚至体质量逐渐减轻。造模6个月后,从第7个月开始白花丹消蛊汤干预,药物组食蟹猴的体质量有所回升,但仍低于空白对照组。

2.2 对肝纤维化食蟹猴肝功能的影响 ALT和AST是反映肝细胞受损的指标,ALT和AST水平升高反映肝细胞受损,其增高程度越大,病变越严重^[11]。由表1可见,与空白对照组比较,模型对照组食蟹猴血清ALT、T-BiL水平显著性升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),AST水平高于空白对照组,但差异无统计学意义。应用白花丹消蛊汤治疗后,肝纤维化食蟹猴血清ALT水平($P<0.05$)及T-BiL水平($P<0.05$)显著降低。

表1 4组食蟹猴血清肝功能相关指标的比较
Tab.1 Comparison of serum index of liver function among four groups of Macaca fascicularis

组别	ALT	AST	T-BiL/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
	($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$)		
空白对照组	49.07±2.40	55.53±5.63	0.43±0.15
模型对照组	85.43±11.29 ^{*1}	67.40±9.67	2.17±0.15 ^{*2}
BHD-L组	55.63±5.83 ^{*3}	67.97±7.29	1.97±0.54 ^{*2}
BHD-H组	64.56±9.65	68.70±6.46	1.47±0.22 ^{*3}

与空白对照组比较,^{*1} $P<0.05$,^{*2} $P<0.01$;与模型对照组比较,^{*3} $P<0.05$

Compared with blank control group,^{*1} $P<0.05$,^{*2} $P<0.01$; compared with model control group,^{*3} $P<0.05$

2.3 对肝纤维化食蟹猴血清TGF-β₁、α-SMA、MMP-2、TIMP-2含量的影响 结果显示,与空白对照组比较,肝纤维化食蟹猴血清TGF-β₁、α-SMA、MMP-2、TIMP-1含量均有所升高,白花丹消蛊汤能不同程度降低TGF-β₁、α-SMA、MMP-2、TIMP-1水平升高。见表2。

表2 4组食蟹猴血清TGF-β₁、α-SMA、MMP-2、TIMP-1含量的比较

Tab.2 Comparion of the serum content of TGF-β₁, α-SMA, MMP-2 and TIMP-1 among four groups of Macaca fascicularis

组别	TGF-β ₁	α-SMA
空白对照组	12.22±0.22	24.37±0.30
模型对照组	17.99±5.40 ^{*1}	25.68±1.94 ^{*1}
BHD-L组	13.94±0.97 ^{*3}	27.08±1.49
BHD-H组	12.36±0.38 ^{*3}	24.09±0.77 ^{*3}

组别	MMP-2	TIMP-1
空白对照组	12.54±0.25	123.02±4.07
模型对照组	17.55±3.69 ^{*1}	159.42±30.53 ^{*2}
BHD-L组	14.60±10.58 ^{*3}	131.37±2.05 ^{*3}
BHD-H组	13.07±0.44 ^{*3}	121.26±4.58 ^{*3}

与空白对照组比较,^{*1} $P<0.05$,^{*2} $P<0.01$;与模型对照组比较,^{*3} $P<0.05$

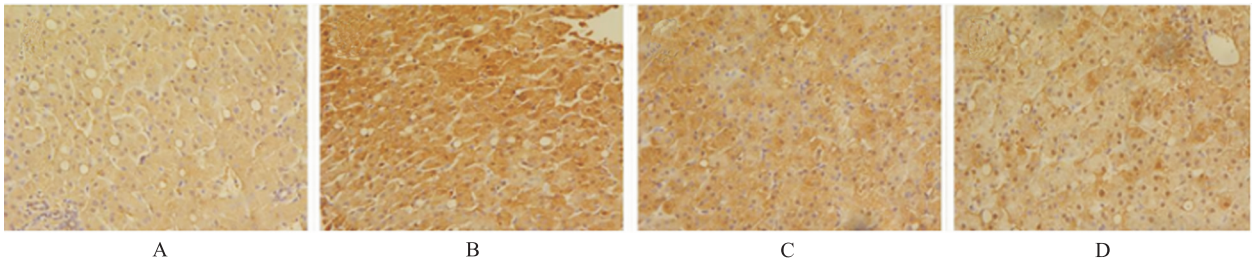
Compared with blank control group,^{*1} $P<0.05$,^{*2} $P<0.01$; compared with model control group,^{*3} $P<0.05$

2.4 对肝纤维化食蟹猴肝组织TGF-β₁表达的影响 TGF-β₁蛋白在肝纤维化食蟹猴肝组织中广泛分布,其表达以肝细胞细胞质为主,着色呈均匀的浅棕色至深棕色。空白对照组肝组织仅微弱表达TGF-β₁(1.00±0.33),显色极淡,计分较模型对照组显著降低;模型对照组肝组织细胞染色程度为棕褐色(5.67±2.03),阳性染色分布于变性的肝细胞、纤维化区等处,较空白对照组TGF-β₁阳性信号明显增强;BHD-L组肝组织细胞染色程度棕黄色(4.67±0.67),着色细胞百分率6%~25%;BHD-H组肝组织细胞染色程度棕褐色(3.33±0.67),着色细胞百分率>51%,TGF-β₁蛋白表达明显高于空白对照组,而低于模型对照组。见图1。

3 讨论

依据壮医理论,方中白花丹是通调龙路要药(龙路与火路是壮医对维持人体生机和反映疾病动态的两条极为重要的内封闭通路的命名,龙是制水的,龙路在人体内即是血液的通道,其功能主要是为内脏骨肉输送营养;火为触发之物,其性迅速,感之灼热,火路在人体内为传感之道),具有祛风毒、除湿毒、散瘀止痛等功用;排钱草是民间壮医治疗腹部结块的良药,具有祛风毒、清热毒、通龙路火路等功用^[12]。二药合用,通调龙路、除湿毒蛊毒之功效更著,共为主药、母药。车前草、岗梅根、酸藤子、五爪金龙等,加强除湿毒、清热毒之功,是为帮药、带药。全方主、帮、带三部分药物配合,药力雄厚,入经达灶,疗效显著^[13]。

笔者选用与人类亲缘关系较近、适合笼养、体型较



A.空白对照组;B.模型对照组;C.BHDH 组;D.BHDH 组

图 1 4 组食蟹猴 TGF- β_1 表达情况 ($\times 20$)

A. blank control group; B. model control group; C. BHDH group; D. BHDH group

Fig.1 TGF- β_1 expression in four groups of *Macaca fascicularis* ($\times 20$)

小、存栏量较高的实验动物食蟹猴,运用化学损伤混合高脂饮食方法建立能模拟人类肝纤维化发病特点的诱导型食蟹猴肝纤维化模型^[14-17]。考虑时间成本及人工成本,本次造模周期为 8 个月,造模前、造模后每 3 个月采集动物血液及快速肝穿刺活检,判定成模情况。造模 6 个月后,大部分动物均能成模。由于化学试剂的毒性,造模动物均出现不同程度的体质量降低现象。总体来说,CCl₄ 诱导混合高脂饮食方法建立食蟹猴肝纤维化模型是可靠的和可行的。

本次研究结果证明壮医方白花丹消蛊汤可改善 CCl₄ 诱导的食蟹猴纤维化。其抗纤维化作用与减低 TGF- β_1 、 α -SMA 表达、调节肝脏细胞外基质的代谢有关。本研究也为该方剂的临床应用提供更为可靠的实验依据。

参考文献

- [1] GRESSNER A M, WEISKIRCHEN R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and the therapeutic targets [J]. Cell Mol Med, 2006, 10 (1): 76-99.
- [2] 邵祥强, 肖华胜. 肝纤维化发病机制与临床诊断的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19 (3): 268-274.
- [3] 郭若涵, 白彬. 大型动物实验性肝纤维化及肝硬化模型的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21 (5): 421-426.
- [4] 刘辉梅, 庾俊雄, 丁可, 等. 食蟹猴肝纤维化不同阶段对丙泊酚代谢的影响[J]. 实用医学杂志, 2012, 28 (22): 3700-3702.
- [5] 赵湘培, 余胜民, 陈少锋, 等. 白花丹炮制前后对大鼠四氯化碳慢性肝损伤模型的影响[J]. 中南药学, 2015, 13 (3): 266-269.
- [6] 孙学华, 张鑫, 周振华, 等. 消胀方对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015,

21 (9): 102-107.

- [7] 翟巧利, 陈象青, 姜玲, 等. 归芍颗粒对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (7): 150-155.
- [8] 李季, 叶军, 薛冬英, 等. 桂枝茯苓丸抗大鼠肝纤维化作用及其机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (24): 171-175.
- [9] 方承康, 张一, 王志芳, 等. 土鳖四逆散对肝纤维化大鼠 TGF- β_1 和 α -SMA 表达及肝损伤的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9 (6): 176-178.
- [10] 吴国琳, 陈玖, 余国友, 等. 葛根素对酒精性肝损伤大鼠肝组织 TGF- β_1 和 α -SMA 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (19): 2245-2249.
- [11] 魏洁, 李开济, 骆广玲, 等. 姜黄素对实验性肝纤维化大鼠肝损伤的保护作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41 (2): 225-229.
- [12] 黄汉儒. 壮医理论体系概述[J]. 中国中医基础理论杂志, 1996, 2 (6): 3-7.
- [13] 钟鸣. 壮药理论的研究现状与述评[J]. 中国民族医药杂志, 2011, 4 (4): 65-67.
- [14] 李艳, 曹文富. 益气化痰痰养阴方剂对肝纤维化大鼠 TGF- β_1 表达的影响[J]. 中成药, 2012, 34 (8): 1437-1442.
- [15] 文彬, 彭齐荣, 贺松其, 等. 清香散对肝纤维化大鼠转化生长因子 β_1 及 Smad4 免疫组化的影响[J]. 江苏中医药, 2006, 27 (3): 55-57.
- [16] 王天才, 张国, 王波. 和络舒肝胶囊对大鼠慢性肝损伤的保护作用及分子机制研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2002, 31 (2): 171-173.
- [17] 闫训友, 薛冲, 刘志敏, 等. 基质金属蛋白酶及其组织抑制剂研究进展[J]. 生物技术通讯, 2004, 15 (3): 302-305.