

大黄蛭虫丸对小鼠酒精性肝纤维化损伤的保护作用

钟伟超¹, 周楚莹², 高磊², 吕志平², 黄少慧²

(1. 深圳市中医院肝病科, 广东 深圳 518033; 2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 探讨大黄蛭虫丸(熟大黄、土鳖虫、水蛭, 等)对小鼠酒精性肝纤维化损伤的保护作用及机制。方法 以C57BL/6雄性小鼠为研究对象, 构建酒精性纤维化损伤模型, 用大黄蛭虫丸进行干预。检测血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白介素6(IL-6)、白介素10(IL-10)、干扰素 γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平, 取肝组织做I型胶原蛋白(COL-1)荧光染色、TUNEL染色和切割半胱天冬酶-3(CC3)表达的测定。结果 与模型组比较, 大黄蛭虫丸组小鼠血清中ALT、AST、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 水平均下降, IL-10水平升高。肝脏COL-1水平下降, 肝细胞凋亡减少和CC3表达降低。结论 大黄蛭虫丸通过调节炎症因子的水平, 减少COL-1的沉淀, 抑制肝细胞的凋亡, 从而对小鼠酒精性肝纤维化损伤产生保护作用。

关键词: 大黄蛭虫丸; 酒精性肝纤维化损伤; 保护作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)12-2475-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.12.006

Protective effects of Dahuang Zhechong Pills on mice with alcohol-induced liver fibrosis

ZHONG Wei-chao¹, ZHOU Chu-ying², GAO Lei², LÜ Zhi-ping², HUANG Shao-hui²

(1. Department of Liver Diseases, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518033, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the protective effects of Dahuang Zhechong (DHZC) Pills (*Rhei Radix et Rhizoma, Eupolyphaga seu Steleophaga, Hirudo, etc.*) against alcoholic liver fibrosis (ALF) injury in mice and to explore the underlying mechanisms. **METHODS** C57BL/6 male mice were used to build up ALF injury model, intervened with DHZC Pills. The serum of mice was examined for changes in alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Simultaneously, the deposit of collagen 1 (COL-1) and apoptotic cell death in liver tissues were analyzed by immunofluorescent and TUNEL assay, respectively. The expressions of cleaved caspase-3 (CC3) in livers were measured by Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, the levels of serum ALT, AST, IL-6, IFN- γ and TNF- α of mice in DHZC group were decreased significantly. And the level of serum IL-10 of mice in DHZC group was increased significantly. Mice in DHZC group had higher rates of COL-1 deposition and apoptotic cell death in liver tissues than those in the model group. Mice treated with DHZC Pills showed lower expression of CC3. **CONCLUSION** DHZC Pills confers protection against ALF injury in mice by inhibiting the generation of COL-1 and down-regulating apoptosis of liver cells death as a result of adjusting the levels of inflammatory factors.

KEY WORDS: Dahuang Zhechong Pills; alcoholic liver fibrosis injury; protective effect

收稿日期: 2017-08-15

基金项目: 国家青年科学基金 (81302948, 81603501)

作者简介: 钟伟超 (1989—), 男, 博士, 医师, 从事中西医结合肝病研究。Tel: 13902911810, E-mail: richardchung@hotmail.com

* 通信作者: 黄少慧 (1981—), 女, 博士, 讲师, 从事中西医结合肝病研究。Tel: 18613140381, E-mail: hshstem@126.com

酒精性肝病是由于长期大量饮酒导致的肝脏疾病。初期表现为酒精性脂肪肝,进而可发展成酒精性肝炎、肝纤维化和肝硬化^[1]。酒精性肝纤维化作为酒精性肝硬化的前期阶段,由于具有可逆性而成为该病研究的重点。大黄蛰虫丸出自张仲景《金匱要略》,由熟大黄、土鳖虫、水蛭、虻虫、蛭蟥、干漆、桃仁、炒苦杏仁、黄芩、地黄、白芍、甘草组成,具有疏通经络、破瘀生新、缓中补虚、清热润燥、滋阴养血之功效,是祛瘀生新的代表方剂。临床上用于治疗各种原因引起的肝纤维化、脂肪肝,以及高脂血症、肝硬化等具有良好的疗效^[2,4]。但大黄蛰虫丸对酒精性纤维化的影响,既往并无相关研究。因此,本实验研究旨在探讨大黄蛰虫丸对酒精性肝纤维化小鼠的影响,以揭示其抗酒精性肝纤维化的作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及药物

1.1.1 实验动物 6~8周龄 C57BL/6 雄性小鼠 40只, SPF级, 体质量(20±2)g, 由广东省医学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2013-0002, 饲养于广州中医药大学实验动物中心。

1.1.2 大黄蛰虫丸的制备 大黄蛰虫丸购自北京同仁堂(国药准字 Z11021241), 使用前 12 h 用双蒸水将大黄蛰虫丸研碎制成 2 g/mL 悬浊液。

1.1.3 阳性对照药的制备 阳性对照药选取秋水仙碱片, 购自云南昊邦制药有限公司(国药准字 H53021798), 使用前 12 h 研碎制成 0.01 mg/mL 悬浊液。

1.2 主要试剂 Lieber-DeCarli 标准型酒精液体模型饲料(南通特洛非饲料科技有限公司, 批号 TP4030D); 无水乙醇(SIGMA, 批号 34852); 四氯化碳溶液(SIGMA, 批号 1601168); ALT 检测芯片(IDEXX, 批号 008309); 炎症因子蛋白芯片(RayBiotech, 批号 QAH-INF-1); TUNEL 试剂盒(Roche, 批号 11684817910); Anti-COL-1 抗体(cbcam, 批号 ab6308); Anti-CC3 抗体(CST, 批号 9664)。

1.3 酒精性肝纤维化模型制备及分组

1.3.1 Lieber-DeCarli 标准型酒精液体模型饲料的制备 (以配制 1 L 液体饲料为例) 酒精液体饲料 151.0 g, 加水 600 mL 左右, 搅拌完全溶解后, 加 95% 酒精 52.6 mL (或无水酒精 50 mL), 加水定容至 1 L, 立即封口混匀并于当日饲养完毕。

1.3.2 分组及给药 40 只雄性 C57BL/6 小鼠随机

分为 4 组, 即正常对照组、模型组、阳性对照药组和大黄蛰虫丸组, 各 10 只。Lieber-DeCarli 液态酒精饲料饲养期间全程禁食禁水, 适应性饲养 5 d, 酒精浓度每日梯度升高(即从第 1 天 0%、第 2 天 1%、第 3 天 2%、第 4 天 3%、第 5 天 4%), 随后造模期间每日给予 4% 酒精浓度的 Lieber-DeCarli 液态酒精饲料饲养, 共 8 周。饲养期间模型组、阳性对照药组和大黄蛰虫丸组小鼠以 25% CCl₄ 橄榄油溶液 1 mL/kg 腹腔注射, 每周注射 2 次, 共 8 周。正常对照组小鼠自由饮食。阳性对照药组及大黄蛰虫丸组小鼠造模第 5 周起分别以每次 0.2 mg/kg 秋水仙碱、1.23 g/kg 大黄蛰虫丸(相当于 1 倍成人临床等效剂量)灌胃给药, 1 次/d。8 周后, 麻醉小鼠后心脏取血, 分离血清并于 -80 °C 保存。各组小鼠取肝脏同一部位组织, 用于病理组织观察及存放 -80 °C 以备后续检测。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 血清 ALT、AST 利用 Catalyst Dx™ 生化分析仪检测血清 ALT、AST 活性。

1.4.2 血清炎症因子检测 按照试剂盒说明检测血清炎症因子 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-10 水平。

1.4.3 Western blot 法检测肝脏 CC3 蛋白含量 取冻存肝脏组织解液后匀浆, 离心取上清液。测定上清蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 11% SDS-PAGE 电泳, 转膜, 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4 °C 过夜孵育, 1×TBS 液洗涤 3 次, 二抗室温孵育 2 h, 1×TBS 液洗涤 3 次。ECL 化学发光试剂盒显色曝光, 分析。

1.4.4 TUNEL 染色检测肝细胞凋亡 组织切片 37 °C 烘烤 20 min, PBS 洗涤 10 min。滴加 50 μ L TUNEL 检测液, 37 °C 避光孵育 60 min, PBS 洗涤 3 次。滴加 DAPI 染液, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次。封片后荧光显微镜下观察。

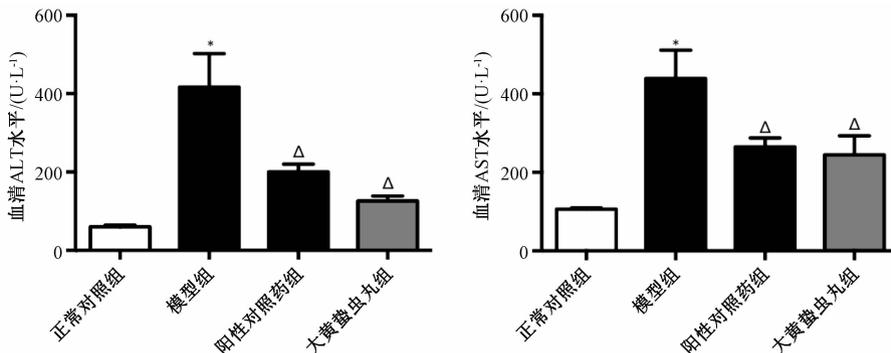
1.4.5 免疫荧光法检测肝脏 COL-1 表达 组织切片 37 °C 烘烤 20 min, PBS 洗涤 10 min。0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液中煮沸 15 min, 自然冷却; PBS 洗涤 3 次。3% H₂O₂ 室温避光孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次。一抗 4 °C 过夜孵育, PBS 洗涤 3 次; 滴加荧光二抗室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次。滴加 DAPI 染液, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次。封片后荧光显微镜下观察。

1.5 统计方法 采用 SPSS 22.0 软件统计分析, 正态分布计量资料以均数±标准误($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 并采用 Tukey 事

后检验法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 ALT 和 AST 检测结果 如图 1 显示, 与正常对照组比较, 模型组小鼠血清 ALT、AST 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较,



注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

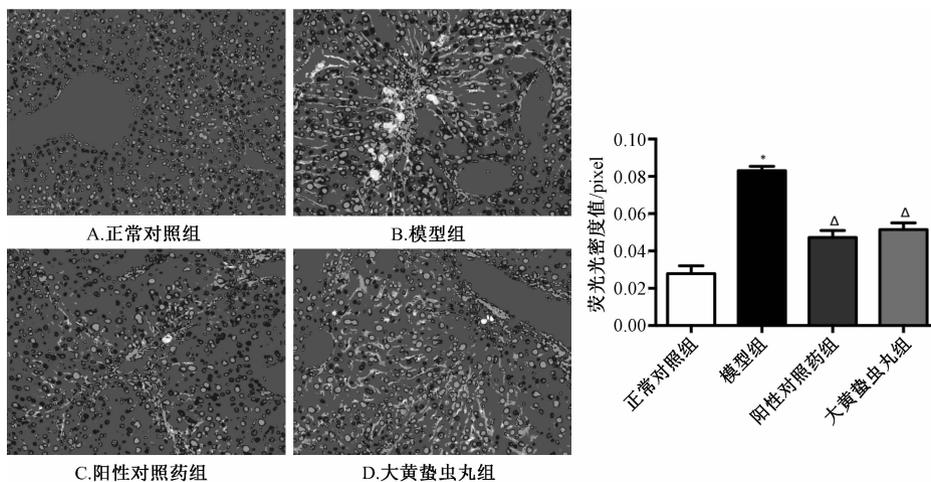
图 1 各组小鼠血清 ALT、AST 检测结果 ($n = 10$)

Fig. 1 ALT and AST levels in serum of each group ($n = 10$)

2.2 各组小鼠肝脏 COL-1 免疫荧光染色结果 如图 2 显示, 正常对照组小鼠肝脏小叶结构清晰, 无明显的荧光染色; 与正常对照组比较, 模型组小鼠肝脏汇管区可见大量假小叶形成, 可见 COL-1 (绿色) 显著增多 ($P < 0.05$), 主要表达于中央静脉、

阳性对照药组与大黄蛭虫丸组小鼠血清 ALT、AST 水平均显著降低 ($P < 0.05$)。这些结果表明, 小鼠在给予四氯化碳与液态酒精干预后, 肝脏受损, 肝功能出现明显变化, 提示模型成功; 同时, 大黄蛭虫丸能够有效改善酒精性肝纤维化小鼠的肝功能。

汇管区以及肝窦 Disse 间隙中。与模型组比较, 阳性对照药组和大黄蛭虫丸组小鼠肝脏 COL-1 染色显著减少 ($P < 0.05$)。说明大黄蛭虫丸能够减轻酒精性肝纤维化小鼠的胶原形成, 减轻肝纤维的病变。



注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

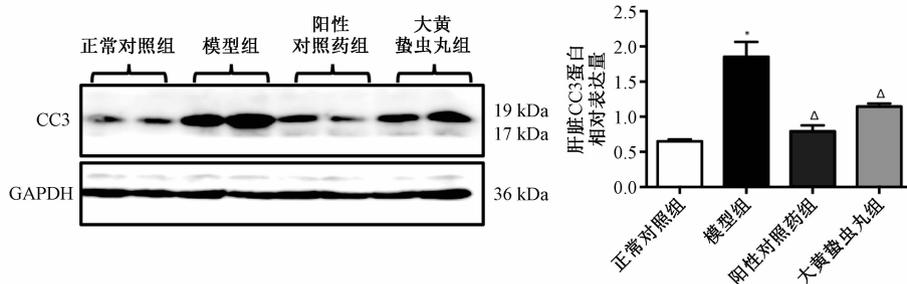
图 2 各组小鼠肝脏 COL-1 免疫荧光染色结果 ($200 \times$, $n = 3$)

Fig. 2 Expression of COL-1 in livers of each group by immunofluorescent analysis ($200 \times$, $n = 3$)

2.3 各组小鼠肝脏 CC3 检测结果 如图 3 显示, 与正常对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 CC3 蛋白表达明显增强 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性对照药组和大黄蛭虫丸组小鼠肝组织中 CC3 蛋白表达明显减弱 ($P < 0.05$); 阳性对照药组与大

黄蛭虫丸组小鼠肝组织中 CC3 蛋白表达无显著性差异 ($P > 0.05$)。小鼠在造模后肝脏细胞发生凋亡, 而大黄蛭虫丸能够改善肝细胞的凋亡, 从而减轻肝脏的纤维化病变程度。

2.4 各组小鼠肝脏 TUNEL 染色结果 TUNEL 染色



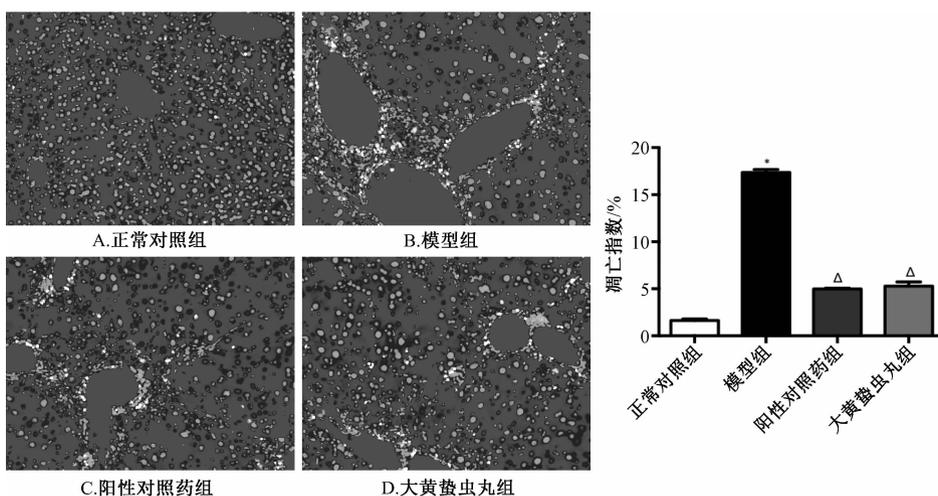
注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，^Δ $P < 0.05$

图3 各组小鼠肝脏CC3检测结果 ($n = 4$)

Fig. 3 Expression of cleaved caspase-3 in the livers of each group by Western blot ($n = 4$)

能够直观地反映组织中细胞凋亡的情况。如图4显示，与正常对照组比较，模型组小鼠肝细胞凋亡明

显增多($P < 0.05$)；与模型组比较，阳性对照药组和大黄蛭虫丸组小鼠肝细胞凋亡相对减少 ($P < 0.05$)。



注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，^Δ $P < 0.05$

图4 各组小鼠肝脏TUNEL染色结果 (200 ×, $n = 3$)

Fig. 4 TUNEL staining of the mice liver tissues (200 ×, $n = 3$)

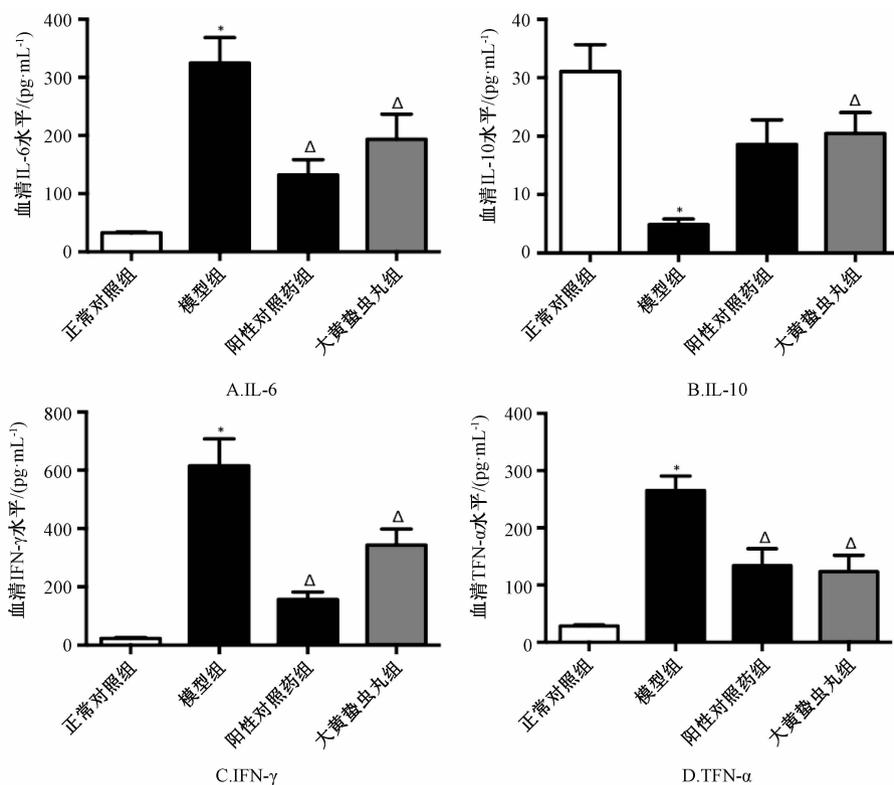
2.5 各组小鼠血清炎症因子检测结果 如图5显示，与正常对照组比较，模型组小鼠血清IL-6、IFN- γ 、TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.05$)，IL-10水平显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，大黄蛭虫丸组小鼠血清IL-6、IFN- γ 、TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.05$)，IL-10水平显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，阳性对照药组血清IL-6、IFN- γ 、TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.05$)，但IL-10水平无显著变化 ($P > 0.05$)。

3 讨论

酒精性肝病是一种由长期大量饮酒所导致的肝脏疾病，其病变肝组织常伴有纤维化和炎症反应。其中肝纤维化是多种慢性肝病发展的共同病理基础，是肝损伤向肝硬化过渡的关键环节。肝纤维化具有可逆性的这一特点对预防和阻止肝硬化进程，

提高患者生活质量、增加患者寿命具有重要意义。因此，寻找有效药物以延缓、阻断或逆转酒精性肝纤维化的发生和发展，在现实治疗中十分迫切。

中医认为酒精性肝纤维化属于“酒癖”范畴，其病因病机归纳为：湿热中阻，肝郁脾虚，痰瘀互结，治疗上多以清热养血、疏肝补脾、活血化痰为主要原则^[5]。本研究使用的大黄蛭虫丸出自东汉名医张景所著《金匱要略》的血痹虚劳篇，为扶正祛瘀之方，以祛瘀生新为主要治则。根据辨证，大黄蛭虫丸用于治疗酒精性肝纤维化切合其病机特点。有研究显示，大黄蛭虫丸可使肝纤维化大鼠病变程度明显减轻，假小叶的形成与胶原纤维的堆积减少，从而发挥抗肝纤维化的作用^[6]。另外，还有研究表明，大黄蛭虫丸灌胃给药，能使CCl₄复合因素致肝纤维化大鼠血清IL-6和TNF- α 水平



注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$

图5 各组小鼠血清炎症因子检测结果 ($n = 10$)

Fig. 5 Inflammatory factors levels in serum of each group ($n = 10$)

明显降低^[7]。

ALT 和 AST 作为临床上评价肝功能损伤的传统生化指标，当肝脏损伤达到一定程度后，血清 ALT 和 AST 升高。而 COL-1 作为肝细胞外基质的主要成分，其增生程序与肝纤维化进程密切相关^[8]。在本实验中，结合肝组织病理学检查和肝功能指标，综合评价药物对酒精肝纤维化的防治作用。首先通过喂饲酒精液体模型饲料予以 C57BL/6 雄性小鼠，造成小鼠肝脏汇管区形成大量假小叶以及胶原纤维沉淀，使小鼠肝脏发生形态学病理改变，血清 ALT 和 AST 水平升高，肝脏 COL-1 的表达增加，成功构建酒精肝纤维化小鼠模型。在大黄蛰虫丸干预后，与模型组相比，各给药组血清 ALT 和 AST 水平显著降低。免疫荧光染色结果显示肝脏 COL-1 沉积减少，肝脏的纤维间隔减少，纤维化程度和病理损伤减轻。为进一步了解酒精性肝纤维化中细胞凋亡诱导效应，本实验检测了凋亡相关蛋白 CC3 在肝脏中的表达情况。检测结果表明，模型组肝脏 CC3 的表达以及肝细胞凋亡率显著升高，肝细胞凋亡明显增多，而大黄蛰虫丸给药组能够明显改善肝细胞凋亡，减轻肝脏纤维化病变

程度。

炎症是肝纤维化发展过程中重要的病理因素。在肝脏受到致病因素的刺激下，致病源激活巨噬细胞，激活的巨噬细胞分泌大量的促炎症因子，进而激活肝星状细胞 (HSC)，启动纤维化级联反应^[9]。在众多炎症因子中，IL-6 和 TNF- α 与肝坏死及肝纤维化程度密切相关，在肝硬化的发生发展中参与肝脏的损伤-修复循环，最终引起肝脏大量细胞外基质 (ECM) 的合成和沉积，导致肝纤维化或肝硬化^[10]。活化的 HSC 也可产生大量 IL-6、TNF- α ，而 IL-6、TNF- α 反过来刺激 HSC 增殖和胶原合成，形成正反馈作用，使 HSC 呈持续活化状态^[11]，从而加重肝脏的损伤及纤维化的程度^[12]。IL-6 还可以通过 Fas 途径调节 HSC 凋亡，促进肝纤维化形成^[13]。另外，IFN- γ 能通过激活巨噬细胞并增强其吞噬能力，加重肝脏炎症的发生进一步引起肝纤维化。而 IL-10 则具有抑制肝纤维化发展的作用^[14]，其机制可能为 IL-10 不足时可上调 I 型胶原的合成并促进胶原蛋白酶基因表达重构 ECM，且与巨噬细胞 TNF- α 的分泌水平相关。从本实验结果可见，大黄蛰虫丸给药组血清中炎症因子 IL-

6、IFN- γ 和 TNF- α 水平均显著降低, IL-10 升高, 表明大黄蛭虫丸能够有效调节机体炎症因子水平, 提示药物可能通过调节各炎症因子, 阻断继发的炎症级联反应, 从而抑制肝星状细胞活化, 最终改善小鼠酒精性肝纤维化。

综上所述, 大黄蛭虫丸能够促进肝纤维化恢复, 减轻肝脏的损伤与凋亡, 改善肝脏的胶原沉淀, 对酒精性肝纤维化模型小鼠有明显的治疗作用。其抗肝纤维化作用可能与其通过调节炎症因子 IL-6、IFN- γ 、TNF- α 和 IL-10 的分泌, 最终实现抑制肝星状细胞的活化来发挥作用。

参考文献:

[1] 刘红云. 酒精性肝病的研究进展[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2010, 32(4): 301-304.

[2] 林佑武, 张诗军, 陈泽雄, 等. 大黄(庶虫)虫丸治疗非弥漫性脂肪肝疗效观察[J]. 中药材, 2003, 26(5): 388-389.

[3] 潘志恒, 程木华, 李 林, 等. 大黄蛭虫丸抗肝纤维化作用的临床研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2003, 11(4): 212-214.

[4] 陈开文, 谭 涌. 大黄蛭虫丸临床应用研究进展[J]. 中国药业, 2006, 15(20): 63-64.

[5] 詹宗颖, 孙明瑜. 酒精性肝病的中医治疗及研究进展[J]. 四川中医, 2014, 32(10): 182-186.

[6] 于 震, 杨 丽, 罗海燕, 等. 大黄蛭虫丸对肝纤维化大鼠肝 α -SMA 表达的动态观察[J]. 基层医学论坛, 2011,

15(16): 490-492.

[7] 王振常, 柳 明, 黄晶晶, 等. 应用模糊集理论对壮肝逐瘀煎抗肝纤维化的优化研究[J]. 中国医药导报, 2013, 10(29): 14-17.

[8] Iwaisako K, Brenner D A, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27(Suppl 2): 65-68.

[9] Hernandez-Gea V, Friedman S L. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 425-456.

[10] Shah S, Ma Y, Scherzer R, et al. Association of HIV, hepatitis C virus and liver fibrosis severity with interleukin-6 and C-reactive protein levels [J]. *AIDS*, 2015, 29(11): 1325-1333.

[11] Smart D E, Vincent K J, Arthur M J, et al. JunD regulates transcription of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and interleukin-6 genes in activated hepatic stellate cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(26): 24414-24421.

[12] Saile B, Matthes N, Neubauer K, et al. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells differ in CD95-mediated apoptosis and response to TNF-alpha[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283(2): G435-G444.

[13] Kwon H J, Won Y S, Park O, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 deficiency ameliorates alcoholic fatty liver but worsens liver inflammation and fibrosis in mice [J]. *Hepatology*, 2014, 60(1): 146-157.

[14] Huang Y H, Chen Y X, Zhang L J, et al. Hydrodynamics-based transfection of rat interleukin-10 gene attenuates porcine serum-induced liver fibrosis in rats by inhibiting the activation of hepatic stellate cells[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(3): 677-686.