

复方 861 抑制四氯化碳大鼠肝纤维化模型 I、III 型胶原 mRNA 表达的研究

□ 马雪梅 赵新颜 阴赅宏 朱跃科 王宝恩

(首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心 北京 100050)

摘要 目的：观察复方 861 对四氯化碳大鼠肝纤维化模型 I、III 型胶原 mRNA 表达的影响。方法：实验分为对照组（20 只）、四氯化碳模型组（20 只）、复方 861 干预组（20 只）3 组，实验 8 周，处死大鼠，取肝组织，应用 RT-PCR 检测肝组织 I 型胶原、III 型胶原表达和病理组织特殊染色。结果：表明与模型组（ 0.90 ± 0.03 、 0.9 ± 0.05 ）比较，复方 861 组 I、III 型胶原 mRNA 水平分别为 0.77 ± 0.06 、 0.75 ± 0.05 ，差异具有显著性（ $P < 0.01$ ）。结论：复方中药 861 能够抑制 I、II 型胶原的基因水平，减少细胞外基质的沉积，是其抗肝纤维化的作用机理之一。

关键词 四氯化碳 肝纤维化 复方 861 胶原

肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化的共同病理基础，其核心为肝内细胞外基质合成与降解比例失衡，导致细胞外基质在肝脏内过度沉积，最终导致肝硬化。本研究采用经典的四氯化碳诱导的肝纤维化及早期肝硬化模型，观察复方 861 对四氯化碳大鼠肝纤维化模型 I、III 型胶原 mRNA 表达的影响。

1 材料

1.1 实验动物 选用 Wistar 雄性大鼠 60 只（购自中国医学科学院动物所，清洁级），体重 120 - 140 克，标准配方杆状饲料喂养，自由进水。

1.2 试剂 四氯化碳（ CCl_4 ）、橄榄油购自上海化学试剂公司。总 RNA 提取试剂盒（Trizol）、RNA 酶

抑制剂均为 GIBCO 公司产品。M-MLV 逆转录酶、4xdNTP、Oligo（dT）15Primers、TaqDNA 聚合酶、PCR Marker、琼脂糖均为 Promega 公司产品。

1.3 仪器设备 美国 PERKIN ELMER CETUS 公司 DNA 扩增仪，Bio-Rad 公司凝胶成像系统（Quantity One）。

2 方法

2.1 动物分组 将 60 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组 20 只，病理模型组 20 只，复方 861 组 20 只。

2.1.1 模型组 饮用含苯巴比妥钠水（100ml 水中含苯巴比妥钠 30mg）一周诱导混合功能氧化酶活性。采用 CCl_4 ：橄榄油（体积比 2:5）混合均匀，20℃ 避

光保存备用。首次皮下注射 40% CCl₄ 油剂 0.5 ml/100 克，以后每次皮下注射 40% CCl₄ 油剂 0.2 ml/100g，每周两次。每周称重 1 次，根据体重调整 CCl₄ 油剂用量，共注射 8 周。

2.1.2 复方 861 干预组 以同样方式造模，自四氯化碳皮下注射之日起，即予复方 861 灌胃。复方 861 由我研究室自行配制，由丹参、黄芪、鸡血藤等组成，单味中药购自江阴天江制药公司生产的单味中药浓缩颗粒剂，用蒸馏水配制成，每毫升溶液含复方 861 0.3 克。每 100 克体重灌胃 1ml，每日一次。每周称重一次，根据体重的变化情况相应增加或减少药物的剂量。连续 8 周。

2.1.3 正常对照组 正常对照组大鼠给予橄榄油皮下注射，方法同四氯化碳组。

2.2 检测指标 实验 8 周处死大鼠，留取大鼠血清、肝组织进行以下检测。

2.2.1 肝功能测定采用美国 OLYMPUS 全自动生化分析仪。检测指标包括：ALT、AST、ALB、IBIL、DBIL。

2.2.2 以 RT-PCR 方法观察 CCl₄ 大鼠肝纤维化肝组织 I、Ⅲ型胶原的 mRNA 表达及复方中药对其的干预作用。

2.2.3 病理组织切片、HE、Masson 三重染色。

2.3 RT-PCR 方法

2.3.1 肝组织总 RNA 的提取 采用美国 GIBCO 公司生产的一步法总 RNA 提取试剂盒，TRIZOL 试剂。称取 100mg 肝组织，加入 1ml TRIZOL 试剂充分匀浆，加入 0.2 ml 氯仿液相分离，取上清。利用异丙醇沉淀 RNA，75% 乙醇清洗，简单干燥，用 DEPC 水溶解 RNA。应用紫外分光光度计测定提取的总 mRNA 含量和纯度，OD260/280 值在 1.8 ~ 2.0 之间，表明有效提取肝组织 RNA。

2.3.2 逆转录为 cDNA 采用 100μl 的逆转录反应体系，内含 5xbuffer (20μl)、dNTP (1mmol/L, 4μl)、Oligo (dT) 15Primer (5ng/μl, 1μl)、MML-V (800U, 8U/μl)、RNA 酶抑制剂 (1.6 U/μl, 4μl)、RNA 量为 8μg (0.08 μg/μl)，42℃ 反应 1 小时，92℃ 加热 5 分钟，灭活逆转录酶。

2.3.3 扩增半定量多聚酶链反应 引物由我中心设计，六合通公司合成，详见表 1。反应体系为 50μl，包括目的基因片段引物一对、内对照 GAPDH 一对 (各 1μmol/L)、dNTP (0.4 mmol/L)、Tag 酶 (0.03 U/L)、氯化镁 2 mmol/L、10xBuffer5μl、cDNA5μl DEPC 水 14.95 μl 等。反应条件：94℃ 变性 2 分钟，94℃ 变性 30 秒，55℃ 退火 30 秒，72℃ 延伸 30 秒，30 个循环，72℃ 后延伸 6 分钟。

表 1 引物序列表

引 物	序 列	长度 (bp)
COL-I	上游 5'-GGT TTG GAG AGA GCA TGA CC -3' (3941-3960)	514
	下游 5'-TTT GGG GAA ATT GAG TTT GG -3' (4454-4435)	
COL-III	上游 5'-ATG GGG GAA ATT GAG TTT GC -3' (3941-3960)	425
	下游 5'-TGG GGT TTC AGA GAG TTT GG -3' (4454-4435)	
GAPDH	上游 5'-GAG GAC CAG GTT GTC TCC TG -3' (856-875)	300
	下游 5'-GGA TGG AAT TGT GAG GGA GA -3' (1155-1136)	
GAPDH	上游 5'-CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATG G -3' (175-197)	209
	下游 5'-CAT GGT GGT GAA GAC GCC AG -3'	

2.3.4 扩增产物的定量分析 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统进行定量分析和照相，以目的基因条带光密度值与内对照 GAPDH 条带光密度值的比表示目的基因相对表达量。

与正常对照组比较，模型组血清 AST、ALT、DBIL、IBIL、ALB 明显升高，复方 861 治疗组上述指标明显降低，见表 2。

3 实验结果

3.1 血清生化指标的变化

表 2 血清生化指标的变化

	AST	ALT	DBIL	IBIL	ALB
正常组	204.1 ± 55.7	52.1 ± 23.6	0.02 ± 0.008	0.04 ± 0.01	3.1 ± 0.1
模型组	1477 ± 240.4 ^{▲▲}	614.1 ± 224.3 ^{▲▲}	0.6 ± 0.3 ^{▲▲}	0.6 ± 0.3 ^{▲▲}	2.0 ± 0.4 [▲]
861 组	482.0 ± 249.3 ^{**}	248.9 ± 110.1 ^{**}	0.2 ± 0.1 ^{**}	0.3 ± 0.1 ^{**}	2.4 ± 0.3 [*]

注 :与正常组比较 ,^{▲▲} $P < 0.01$;与正常组比较 ,[▲] $P < 0.05$;与模型组比较 ,^{**} $P < 0.01$ 。与模型组比较 ,^{*} $P < 0.05$ 。

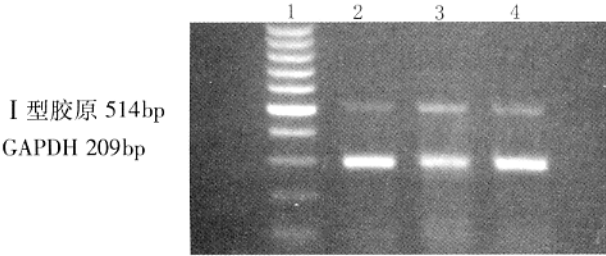
3.2 肝组织 I、Ⅲ型胶原 mRNA 表达水平比较

与正常对照组比较,模型组 I、Ⅲ型胶原 mRNA 表达水平明显增加 ($P < 0.01$),复方 861 能显著降低肝组织 I、Ⅲ型胶原 mRNA 表达 ($P < 0.01$),见表 3、图 1~2。

表 3 肝组织 I、Ⅲ的 mRNA 表达水平的变化

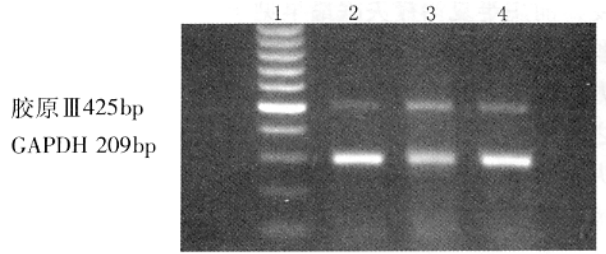
	I 型	Ⅲ型
正常组	0.62 ± 0.06	0.58 ± 0.03
模型组	0.9 ± 0.03 ^{▲▲}	0.90 ± 0.05 ^{▲▲}
861 组	0.77 ± 0.06 ^{**}	0.75 ± 0.05 ^{**}

注 :^{▲▲}与正常组比较 $P < 0.01$;^{**}与模型组比较 $P < 0.01$ 。



泳道 1 :DNA Marker ,泳道 2 :正常组 ,泳道 3 :模型组 ,泳道 4 :复方 861 组 ,

图 1 I 型胶原 mRNA 表达水平



泳道 1 :DNA Marker ,泳道 2 :正常组 ,泳道 3 :模型组 ,泳道 4 :复方 861 组 ,

图 2 Ⅲ型胶原 mRNA 表达水平

3.3 肝脏 HE、Masson 染色 HE、Masson 染色,模型组表现为肝小叶失去正常结构,肝板排列紊乱,均
万方数据

呈现小结节性肝硬化,假小叶边缘带肝细胞明显肿胀变性(可能与四氯化碳引起的过氧化损伤有关);复方中药 861 以单纯脂肪变性(大泡脂变)为主,纤维组织增生不明显。

4 讨 论

目前,大量研究表明,肝纤维化甚至肝硬化是动态的、双向的、发展的过程,即除细胞外基质合成(胶原蛋白包括 I、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ型)外,这一病理过程还包括细胞外基质的降解^[1]。肝纤维化及肝硬化的发生是由于以上平衡被打破,最终形成胶原的净沉积所致。

四氯化碳在混合功能氧化酶作用下转变为自由基-CCl₃,使细胞膜磷脂不饱和脂肪酸氧化而引起脂质的过氧化,且可与巯基蛋白反应造成肝细胞膜损伤。损伤因子持续存在,损伤——修复不断进行,导致纤维化进展。四氯化碳诱导的肝纤维化模型,在损伤因子停止攻击后,纤维化可以自发逆转^[2]。

复方 861 是治疗肝纤维化的有效药物^[1,3],本研究应用经典的四氯化碳肝纤维化模型研究表明,复方中药 861 能够抑制 I、Ⅲ型胶原的基因水平,减少细胞外基质的沉积,是其抗肝纤维化的作用机理之一。

参考文献

[1] 王惠吉,王宝恩. 中药复方丹参(861 冲剂)治疗肝纤维化远期疗效观察. 中西医结合肝病杂志,1995,5(2):4-5.
[2] Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. BMJ. 2003 Jul 19;327(7407):143-147.
[3] 阴赓宏,马红,马雪梅,等. 胆管阻塞性大鼠肝纤维化模型肝组织 TIMP1mRNA 表达及复方 861 抑制作用的研究. 中医药通报. 2002,1(4):20-22.