

不同剂量虫草对肝纤维化小鼠肝脏 TGF- β_1 、Smad3 的影响

吴建良 王志勇 孙丽伟 郭 贇 付金龙 刘成海

摘 要 **目的** 明确不同剂量冬虫夏草对四氯化碳小鼠肝纤维化的作用及对 TGF- β_1 mRNA、Smad3 蛋白表达的影响。**方法** 四氯化碳(CCl_4)皮下注射复制 BALB/c 小鼠肝纤维化模型,虫草组在造模同时予以不同剂量虫草煎剂,直至造模结束。HE 染色观察肝组织炎症,天狼猩红染色观察肝脏胶原沉积,生化法测定肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量,免疫组化测定 Smad3 在肝脏内的表达,RT-PCR 测定 TGF- β_1 mRNA 在肝脏内的表达。**结果** 与正常小鼠比较,肝纤维化小鼠肝脏肝静脉与汇管区周围肝细胞明显脂肪变性,肝脏胶原沉积,可见纤维间隔形成,肝脏 Hyp 含量、TGF- β_1 mRNA、Smad3 蛋白表达量均显著增加。与模型组比较,虫草组肝脏炎症与胶原沉积减轻, TGF- β_1 mRNA、Smad3 蛋白表达量明显降低,以虫草高剂量组为明显。**结论** 肝纤维化 BALB/c 小鼠的肝脏 TGF- β_1 mRNA、Smad3 蛋白表达明显上升,虫草制剂有良好的抗肝纤维化作用,高剂量虫草有着更好的抗肝纤维化作用,其作用机制与下调 Smad3 蛋白及 TGF- β_1 mRNA 表达有关。

关键词 冬虫夏草 肝纤维化 Smads 转化生长因子

Effect of Different Dosage Cordyceps on Hepatic TGF- β_1 , Smad3 Expression in Mice with Liver Fibrosis. Wu Jianliang, Wang Zhiyong, Sun Liwei, Guo Yun, Fu Jinlong, Liu Chenhai. The Affiliated Hospital of Medical College Hangzhou Normal University, Zhejiang 310015, China

Abstract **Objective** To explore the anti-fibrosis effect of Cordyceps and study its effect on the expression of TGF- β_1 mRNA and Smad3. **Methods** BALB/c mice model of liver fibrosis was replicated by subcutaneous injection of CCl_4 . Large and small dosage of Cordyceps decoction was given to the mice in Cordyceps intervened group when modeling. Hepatic inflammation was observed by HE staining, while hepatic collagen deposition by Sirius red stain. Hepatic hydroxyproline (Hyp) were determined by biochemical method. Expression of Smad3 was observed by immunohistochemical method. TGF- β_1 mRNA was detected by RT-PCR. **Results** Compared with the normal mice, obvious fatty degeneration around hepatic veins and portal area was seen, hepatic collagen deposition and fibrosis septa were found. Hepatic Hyp content, TGF- β_1 mRNA and Smad3 protein expression were obviously increased. Compared with the model group, hepatic inflammation and collagen deposition were lessened, protein expression of TGF- β_1 mRNA and Smad3 was obviously decreased in Cordyceps intervened group. **Conclusion** Hepatic TGF- β_1 mRNA, Smad3 expression was obviously increased in liver fibrosis BALB/c mice. Cordyceps had superior anti-fibrosis. Anti-fibrosis effects of large dosage Cordyceps is better than that of small dosage Cordyceps. Its mechanism might be through down regulating the TGF- β_1 mRNA, Smad3 protein expression.

Key words Cordyceps; Hepatic fibrosis; Smads; TGF- β_1

冬虫夏草(cordyceps sinensis sacc,简称虫草),为麦角科真菌寄生在蝙蝠蛾科昆虫蝙蝠蛾上的干燥虫体。虫草有天然与人工培养之分,人工培养的虫草有虫草菌丝、蝙蝠拟青霉、中国拟青霉等多种类型,尽管人工虫草与天然虫草成分不尽一致,但研究表明两者有着相似的药理作用^[1]。近年来报道虫草具抗肝纤维化作用,但不同剂量虫草抗肝纤维化的效果如何,虫草抗肝纤维化的机制目前尚不清楚,本研究观察不

同剂量虫草对实验性肝纤维化小鼠的作用及对 TGF- β_1 、Smad3 表达的影响^[2]。

材料与方法

1. 材料:(1)实验动物:清洁级 BALB/c 小鼠 45 只,均为雄性,体重 25g 左右,购自中科院上海实验动物中心,所有小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心。(2)药物:虫草菌丝煎剂由本所药剂室制备,水提,虫草浓度为 150 毫克生药/毫升。(3)主要试剂:四氯化碳,分析纯,批号:20000312,上海华东试剂公司产品。辣根过氧化物标记驴抗鼠抗体(二抗), (anti-mouse Ig horseradish, peroxide linked whole antibody, from donkey), 批号: A934V1/93/01, Amersham life science 公司。Smad3 兔抗人多克隆抗体为英国 abcam 公司生产。大鼠 β -肌动蛋白(β -actin) cDNA 购自 Clontech 公司。随机引物标

作者单位:310015 杭州师范大学附属医院消化内科(吴建良、王志勇、孙丽伟、郭贇、付金龙);201203 上海中医药大学附属曙光医院/上海中医药研究院肝病研究所(刘成海)

记试剂盒,Amersham 公司,

2. 实验方法:(1)模型制备:参照 Kellen^[3]的方法,以 5%~20%的 CCl₄ 橄榄油溶液 4ml/kg 小鼠体重,皮下注射,每周 2 次,每次间隔 2~3 天,共 6 周。同时饲以 35mg/L 的苯巴比妥水,正常饲料喂养,共 6 周。(2)动物分组及给药方法:共 45 只 BALB/c 小鼠,随机分为 3 组,正常组:15 只;模型组:15 只;虫草低剂量组:15 只,虫草高剂量组 15 只。各组均予以 35mg/L 的苯巴比妥水。模型及虫草高、低剂量组均予以 CCl₄ 皮下注射及苯巴比妥饮水造模。造模同时虫草低剂量组以 75 毫克生药/毫升的虫草菌丝煎剂灌胃(相当于成人 60kg 体重 10 倍量),虫草高剂量组以 150 毫克生药/毫升的虫草菌丝煎剂灌胃,给药容积为 10ml/kg 小鼠体重。(3)动物取材:造模结束后,将各组小鼠眼眶取血后以颈椎脱臼法处死,剖开腹腔,取出肝脏,一部分用 10% 甲醛固定,24h 后逐级乙醇脱水,二甲苯透明,56℃ 石蜡包埋,4μm 厚切片,用于胶原和免疫组化染色,其余组织切碎后入液氮速冻,保存于 -70℃,用于测定羟脯氨酸、RNA 提取等。(4)肝羟脯氨酸测定:1)肝组织标本预处理:称取 100mg 湿肝,置于已加入 1ml 蒸馏水试管中,在低温下匀浆,将匀浆液装入安瓿瓶中,并用 1.5ml 蒸馏水冲洗,装入安瓿瓶中,加 2.5ml 12mol/L HCl,封瓶,置烘箱,105℃,水解 18h,过滤,取水解液 100μl,每个标本取 2 管,置烘箱,40℃,干燥后取出,待测。2)标本测定:样品管 + 1.2ml 50% 异丙醇 + 氯氨 - T 溶液 0.2ml,室温放置 10min,加入 ER 工作液 1ml,振荡混匀,温浴,50℃,90min,波长 558nm,蒸馏水调零,测定。依据标准曲线计算羟脯氨酸含量。(5)肝组织病理染色:取经中性甲醛溶液固定的大鼠肝组织,石蜡包埋,切片为 5μm 厚度,多级乙醇脱水,二甲苯透明,作 HE 染色,天狼猩红染色。(6)肝组织免疫组化染色:石蜡切片常规脱蜡至水,柠檬酸钠缓冲液(pH7.2)煮 10min,0.03% 过氧化氢甲醇,室温 10min,充分水洗,0.1% 胰酶 37℃,30min,充分水洗,PBS 洗 5min × 3 次,加一抗 37℃,30min,PBS 洗 5min × 3 次,辣根过氧化物酶标记抗兔抗体室温 30min,PBS 洗 5min × 3 次,DAB 显色 5min,水洗终止反应,苏木素 5min,水洗返蓝,烘干,中性树脂封片。(每组取 3 张免疫组化染色切片,随机选择 5 个不同视野,在 200 放大倍数下,测定标准测量窗口中肝窦壁 Smad3 的阳性染色面积在标准测量窗口所占的面积比。)(7)RT-PCR 检测方法:引物设计:从美国生物技术中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进入 Entrea Sequences 数据库,在 Genbank 中检索[转化生长因子 - β₁ (TGF - β₁)]、β - actin 的基因编码序列;以 primer3 引物设计程序设计引物,由上海生物工程公司合成。引物序列见表 1。(8)RT-PCR 主反应液:依次加入以下反应液:反应缓冲液 10μl;dNTP 混合物(dNTP mix),1μl;25mmol/L MgSO₄ 1μl;反转录酶(Reverse Transcriptase)1μl;DNA 聚合酶(DNA polymerase)1μl;无 RNA 酶水(nuclease-free water)29μl,下游引物(primer down)2μl;上游引物(primer up)2μl;RNA 2μl。第 1 链 cDNA 合成

表 1 TGF - β₁ 与 β - actin cDNA 扩增引物序列与及预期扩增片段长度

	引物	序列(5' → 3')	扩增
TGF - β ₁	上游	CAC GAT CAT GTT GGA CAA CTG CTC C	299bp
	下游	CTT CAG CTC CAC AGA GAA GAA CTG C	
β - actin	上游	ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC'	163bp
	下游	GGT ACC ACC ATG TAC CCA GG	

(反转录,48℃,45min),AMV RT 酶及 RNA/cDNA 引物变性(94℃,2min);第 2 链 cDNA 合成及 PCR 扩增,变性(94℃,30s),退火(72℃,6.5min),延伸(68℃,2min),40 循环,保存(4℃)。取扩增产物 10μl 或 PCR makers 5μl,按 5:1 的比例与 DNA 上样缓冲混匀。1.5% 琼脂糖凝胶预电泳 5min,关闭电泳仪上的电源,将样品及 Makers(5 微升/孔)注入凝胶孔中。电泳条件:50mV(4~5mV/cm),90min。电泳结束后照相,扫描,以 MPIAS - 1000 多媒体彩色病理图文分析系统做凝胶图像分析。

3. 统计学方法:计量资料每组样本数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *F* 检验或 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 模型小鼠肝组织胶原沉积变化与虫草影响: HE 染色可见模型组肝小叶结构紊乱,较多肝实质细胞气球样变,散见细胞点状坏死,并可见坏死片状区域,汇管区增宽,汇管区及坏死灶内可见单核细胞及淋巴细胞等炎性细胞的浸润。虫草高、低剂量组坏死间隔则减少,炎性细胞的浸润也较模型组减轻。胶原染色可见模型组小鼠肝组织胶原纤维增生显著,尤以汇管区为甚,大量纤维间隔向肝小叶内延伸,分割包绕肝组织,有假小叶形成,虫草高、低剂量组纤维则明显减少,见图 1。

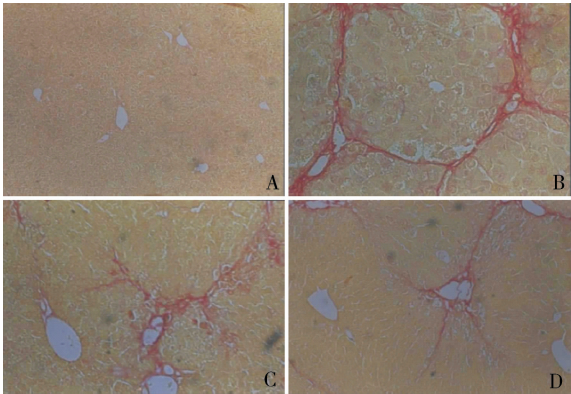


图 1 各组小鼠肝脏胶原纤维染色比较(×100)

A. 正常组;B. 模型组;C. 虫草低剂量组;D. 虫草高剂量组

2. 模型小鼠肝脏羟脯氨酸含量变化及虫草影响:模型组羟脯氨酸较正常组明显升高,虫草组肝羟脯氨

酸含量较模型组均显著降低,且虫草高剂量组较低剂量组明显降低,两组相比 $P < 0.05$,有显著差异,详见表 2。

表 2 肝纤维化模型小鼠肝脏羟脯氨酸的变化及虫草的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	羟脯氨酸 ($\mu\text{g/g}$ 肝组织)
正常组	14	$52.46 \pm 21.58^*$
模型组	14	303.40 ± 30.62
虫草低剂量组	14	$204.74 \pm 54.55^*$
虫草高剂量组	14	$137.15 \pm 44.08^{* \Delta}$

与模型组相比, $^* P < 0.01$,与虫草低剂量组相比, $^{\Delta} P < 0.05$

3. 模型小鼠肝脏 $\text{TGF} - \beta_1$ mRNA 表达变化及虫草影响:经 RT-PCR 扩增、图像半定量分析,结果模型组小鼠肝脏 $\text{TGF} - \beta_1$ mRNA 较正常对照组明显增高,虫草高、低剂量组对 $\text{TGF} - \beta_1$ mRNA 病理性表达增高有不同程度的抑制作用。详见表 3、图 2。

表 3 模型小鼠肝脏 $\text{TGF} - \beta_1$ mRNA 表达变化及其药物影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	$\text{TGF} - \beta_1$	$\beta - \text{actin}(\%)$
正常组	1058 ± 23	$1196 \pm 46(88 \pm 3)^*$
模型组	1087 ± 15	$1104 \pm 39(98 \pm 2)$
虫草低剂量组	1056 ± 21	$1135 \pm 8(93 \pm 2)^*$
虫草高剂量组	1035 ± 23	$1162 \pm 34(89 \pm 4)^*$

与模型组相比, $^* P < 0.05$

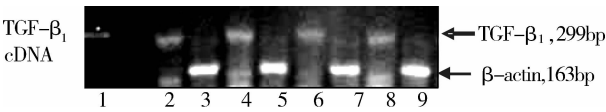


图 2 RT-PCR 扩增小鼠肝脏 $\text{TGF} - \beta_1$ 与 $\beta - \text{actin}$ cDNA 之凝胶电泳图

泳道 1. PCR 分子质量标准品;2,3. 正常组 ($\text{TGF} - \beta_1$ 与 $\beta - \text{actin}$,下同);4,5. 模型组;6,7. 虫草低剂量组;8,9. 虫草高剂量组

4. 模型小鼠 Smad3 表达及虫草影响:Smad3 阳性染色主要见于汇管区及纤维间隔中间质细胞,模型组肝脏 Smad3 染色较正常对照组加深,虫草高剂量及低剂量组 Smad3 染色较模型组明显减轻,且虫草高剂量组 Smad3 染色较虫草低剂量组减轻。

讨 论

肝纤维化是肝脏对多种慢性损伤的病理修复反应,以肝脏细胞外基质 (ECM) 过度增生沉积为特征,是大多数慢性肝病的共同病理特征,亦是慢性肝炎向

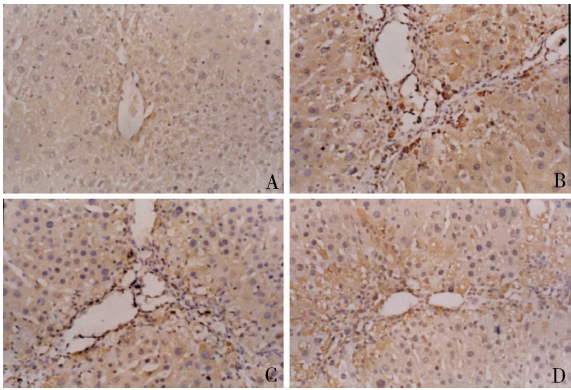


图 3 各组小鼠肝脏 Smad3 免疫组化染色表达比较 ($\times 200$)

A. 正常组;B. 模型组;C. 虫草低剂量组;D. 虫草高剂量组

表 4 各组动物肝组织 Smad3 染色阳性面积 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Smad3
正常组	$0.55 \pm 0.12^*$
模型组	1.76 ± 0.29
虫草低剂量组	$1.34 \pm 0.22^*$
虫草高剂量组	$1.12 \pm 0.18^*$

与模型组相比, $^* P < 0.01$

肝硬化发展的必经病理阶段^[4]。肝星状细胞 (HSC) 的活化、增殖、过度分泌是肝纤维化形成的中心环节。HSC 激活后转化为肌纤维母细胞 (MFb) 样细胞表型,合成大量 ECM 沉积于肝脏,最终导致纤维化的发生^[5]。ECM 的合成和降解过程很大程度上由 $\text{TGF} - \beta_1$ 控制,它可与 HSC 表面的受体结合,通过激活 Smad 通路,促进胶原等 ECM 的合成和分泌^[6]。近年来的研究表明 Smad3 蛋白是介导 $\text{TGF} - \beta_1$ 诱导的肝纤维化的关键分子,在肝纤维化的发病中起着重要的作用,Smad3 可以和作用靶基因的 $\text{TGF} - \beta_1$ 反应元件的 CAGA 序列结合, $\text{TGF} - \beta_1$ 激活的 HSC 主要表达 Smad3,而缺失了 Smad3 的肝星状细胞即使经 $\text{TGF} - \beta_1$ 激活也不能分泌 I 型胶原,并可抵抗四氯化碳等相关刺激因子引起的肝纤维化形成^[6-13]。

本研究采用四氯化碳制备小鼠肝纤维化模型,胶原染色可见模型组小鼠肝组织胶原纤维增生显著,尤以汇管区为甚,大量纤维间隔向肝小叶内延伸,分割包绕肝组织,有假小叶形成,模型组肝羟脯氨酸含量较正常组明显增高,虫草高低剂量组肝羟脯氨酸含量较模型组均显著降低 ($P < 0.01$),有显著意义,且与虫草剂量相关,两组肝羟脯氨酸含量相比 ($P < 0.05$),说明虫草尤其是高剂量虫草对四氯化碳所致小鼠肝纤维化有良好的抗肝纤维化作用。模型组肝

脏 TGF- β_1 mRNA 较正常对照组明显增高,虫草高低剂量组对 TGF- β_1 mRNA 病理性表达增高有不同程度的抑制作用,并与剂量相关。Smad3 阳性染色主要见于汇管区及纤维间隔中间质细胞,模型组肝脏 Smad3 染色较正常对照组加深,说明 Smad3 在小鼠纤维化肝脏中的表达增高,结果与国内外相关研究一致,虫草高低剂量组 Smad3 染色较模型组明显减轻,说明冬虫夏草可能通过下调 TGF- β_1 mRNA 及 Smad3 的表达抑制肝脏胶原的合成及分泌,从而抑制肝纤维化形成^[14,15]。表明下调 TGF- β_1 mRNA 及 Smad3 在肝脏内的表达可能是冬虫夏草抗肝纤维化的机制之一。另外本研究也表明虫草高剂量较低剂量组有着更好的抗肝纤维化作用,可能对今后临床用药有一定指导作用。

参考文献

- 1 吴建良,刘成海.冬虫夏草对肝纤维化的作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2001,11(6): 382-384
- 2 王宪波,刘平,唐志鹏.虫草菌丝提取物干预与治疗二甲基亚硝胺诱导大鼠肝硬化的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2008(7):617-622
- 3 Kellen K, Robert A, DeAngelis, *et al.* Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice[J]. Hepatology, 2000; 31(1): 149-159
- 4 刘成海.肝纤维化基础研究进展[J]. 中国中西医结合杂志 2006; 26(1):111-112
- 5 Dennler S, Huet S, Gauthier JM. A short aminoacid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3[J]. Oncogene, 1999, 18(8): 1643-1648
- 6 Masayuki UE, Scott S. Smad2 and Smad3 play different roles in rat

- hepatic stellate cell function and α -2 smooth muscle actin organization[J]. Mol Biol Cell,2005,16(9):4214-4224
- 7 Li Q, Ye F, Shi Y, *et al.* Nuclear translocation of Smad3 may enhance the TGF2 β /Smads pathway in high glucose circumstances[J]. Transpl Proc,2006,38(7):2158-2160
- 8 Cho IJ, Kim SH, Kim SG. Inhibition of TGF beta12mediated PAI21 induction by oltipraz through selective interruption of Smad3 activation[J]. Cytokine,2006,35(5-6):284-294
- 9 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury[J]. J Biol Chem, 2000,275(4): 2247-2250
- 10 Liu C, Gaca MD, Swenson ES, *et al.* Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor (TGF- β) in quiescent and activated hepatic stellate cells[J]. J Biol Chem, 2003,278(13): 11721-11728
- 11 Furukawa F. p38MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts[J]. Hepatology, 2003,38(4): 879-889
- 12 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, *et al.* The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation[J]. Hepatology, 2001,34(1): 89-100
- 13 Mishra B. Loss of cooperative function of transforming growth factor-beta signaling proteins, smad3 with embryonic liver fodrin, a beta-spectrin, in primary biliary cirrhosis[J]. Liver Int, 2004,24(6): 637-645
- 14 张国,王天才.唐望先,等. Smad3、Smad7 基因表达与肝纤维化发病关系研究[J]. 中华消化杂志, 2002,22(11):647-650
- 15 俞蕾敏,吕宾,李善高.大鼠肝硬化形成过程中肝组织 TGF- β_1 、Smad3、Smad7 水平动态的变化[J].世界华人消化杂志, 2007,15(30):3163-3167

(收稿:2011-08-07)

(修回:2011-09-08)

灯盏花素对糖尿病大鼠肾皮质糖基化终产物受体 mRNA 表达的影响

孙洁敏 马晓兰 沈建国 姚美芬 李璐璐 李琦

摘要 目的 探讨灯盏花素对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠肾皮质 RAGE 表达水平的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 27 只,随机分为 3 组。STZ 腹腔注射建立糖尿病模型后,糖尿病灯盏花素治疗组(DD 组)每日给予灯盏花素[20mg/(kg·d)]灌胃,8 周后取肾脏组织行半定量 RT-PCR 检测 RAGE mRNA 的表达水平,与正常对照组(C 组),糖尿病安慰剂组(D 组)比较。**结果** 成模 8 周时,糖尿病大鼠的体重、血糖与正常组相比有显著性差异($P < 0.01$),DD 组与 D 组的血糖及体重无显著性差异($P > 0.05$);DD 组、D 组和 C 组的 RAGE OD 值/ β -actin OD 值分别为 0.452 ± 0.208 , 0.769 ± 0.104 , 0.218 ± 0.032 , 各组间

作者单位:310013 浙江医院内分泌科(孙洁敏);浙江大学医学院附属第一医院内分泌科(马晓兰、沈建国、姚美芬、李璐璐、李琦)

通讯作者:沈建国,主任医师,电子信箱:jgshen@medmail.com.cn