



# 补肾柔肝方对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的预防作用及其机制研究

张斌<sup>1</sup>, 王灵台<sup>2</sup>

1. 上海中医药大学普陀医院肿瘤科, 上海 200062

2. 上海中医药大学曙光医院肝病科, 上海 200021

**目的:**探讨补肾柔肝方对二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱导大鼠肝纤维化的预防作用及初步机制。

**方法:**雄性 Wistar 大鼠 40 只,随机分为正常对照组( $n=10$ )、模型组( $n=15$ )及补肾柔肝方预防组( $n=15$ )。模型组和补肾柔肝方预防组以 10 mg/kg DMN 腹腔注射,1 次/d,每周连续 3 d,共 4 周。模型组在造模同时给予生理盐水灌胃,补肾柔肝方预防组在造模同时给予补肾柔肝方灌胃,共 4 周;第 4 周末处死全部大鼠,留取血清及肝组织标本。采用全自动生化分析仪检测血清总胆红素(total bilirubin, Tbil)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、白蛋白等;应用逆转录聚合酶链式反应法检测肝组织结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)和 I 型胶原 mRNA 的表达。

**结果:**补肾柔肝方预防组大鼠一般状态明显好于模型组;模型组大鼠死亡率为 13.33%(2/15),补肾柔肝方预防组死亡率为 6.67%(1/15);模型组大鼠腹水发生率为 46.67%(7/15),补肾柔肝方预防组大鼠腹水发生率为 20%(3/15),两组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ );补肾柔肝方组肝功能较模型组有显著改善( $P<0.01$ )。模型组肝组织 CTGF 和 I 型胶原 mRNA 表达明显增强,补肾柔肝方预防组与模型组相比明显减弱( $P<0.01$ )。

**结论:**补肾柔肝方可通过抑制大鼠肝组织 CTGF 和 I 型胶原 mRNA 的表达,达到抗肝纤维化的作用。

**关键词:** 补肾柔肝方; 肝纤维化; 二甲基亚硝胺; 结缔组织生长因子; I 型胶原; 大鼠

**中图分类号:** R285.5, R575.2; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1672-1977(2008)09-0934-05

Zhang B, Wang LT. *J Chin Integr Med / Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2008; 6(9): 934-938.

Received May 18, 2008; published online September 15, 2008.

Free full text (PDF) is available at [www.jcimjournal.com](http://www.jcimjournal.com).

Indexed/abstracted in and full text link-out at PubMed.

Forward linking and reference linking via CrossRef.

DOI: 10.3736/jcim20080911

Open Access

## Bushen Rougan Recipe in prevention of hepatic fibrosis in rats induced by dimethylnitrosamine: a study on its preliminary mechanism

Bin ZHANG<sup>1</sup>, Ling-tai WANG<sup>2</sup>

1. Department of Oncology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

2. Department of Liver Diseases, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China

**Objective:** To study the effects of Bushen Rougan Recipe (BSRGR), a compound traditional Chinese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats induced by dimethylnitrosamine (DMN), and to explore its preliminary mechanism.

**Methods:** A total of 40 male Wistar rats were randomly divided into normal control group ( $n=10$ ), untreated group ( $n=15$ ), and BSRGR group ( $n=15$ ). Except for the rats in normal control group, hepatic fibrosis in

rats was induced by peritoneal injection of DMN for 4 weeks. And the rats in the BSRGR group were also intragastrically administered BSRGR within the 4-week course. At the end of the 4-week course, rats were all sacrificed. The liver functions were determined by automatic biochemistry analyzer, including serum total bilirubin (Tbil), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and albumin. Expressions of connective tissue growth factor (CTGF) and collagen type I mRNA in liver tissue were detected by reverse transcription polymerase chain reaction.

**Results:** It was found that the serum Tbil level and the activities of AST, ALT were declined in the BSRGR group as compared with those in the untreated group ( $P < 0.01$ ). The serum albumin content in the BSRGR group was increased as compared with that in the untreated group ( $P < 0.01$ ). The expressions of collagen type I and CTGF mRNAs in the untreated group were higher than those in the BSRGR group ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** BSRGR can decrease the expressions of collagen type I and CTGF mRNAs in the rats with hepatic fibrosis, which may be one of possible mechanisms in treating hepatic fibrosis.

**Keywords:** Bushen Rougan Recipe; hepatic fibrosis; dimethylnitrosamine; collagen type I; connective tissue growth factor; rats

慢性肝病是比较常见的疾病,如不能及时诊断和治疗,容易发展为肝硬化,甚至肝癌。其一旦发展为肝硬化往往很难逆转,但早期的肝纤维化经过有效治疗后是可以逆转的,因而国内外许多专家非常重视肝纤维化的研究。有关肝纤维化发病机制的研究报道很多,其中结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)和 I 型胶原的表达与肝纤维化的关系较为密切,已受到人们的重视<sup>[1-4]</sup>。本研究运用二甲基亚硝酸胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱导大鼠肝纤维化模型,运用补肾柔肝方(Bushen Rougan Recipe, BSRGR)进行预防,以观察中药复方抗肝纤维化的效果,同时观察补肾柔肝方对肝组织 I 型胶原和 CTGF mRNA 表达水平的影响。

## 1 材料和方法

1.1 实验材料 雄性 Wistar 大鼠 40 只,清洁级,体质量(150±10)g,购于中国科学院上海实验动物中心。补肾柔肝方(仙灵脾 9 g、炙鳖甲 12 g、黄芪 12 g、枸杞 15 g、白术 12 g、丹参 15 g 等),由上海中医药大学曙光医院制剂室提供,制备成含生药 1.6 g/ml 的流浸膏灌胃液;DMN 购自日本东京化成工业株式会社;7020 型自动生化分析仪购自日本 Hitachi 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 造模及分组 将大鼠随机分为正常对照组( $n=10$ )、模型组( $n=15$ )及补肾柔肝方预防组( $n=15$ )。用生理盐水将 DMN 稀释为 0.5%DMN 溶液(v/v),模型组和中药预防组大鼠以 10 mg/(kg·d) DMN 腹腔注射,每周连续 3 d,共 4 周<sup>[5]</sup>。补肾柔肝方预防组在造模同时给予补肾柔肝方 10 ml/(kg·d)灌胃,共用药 4 周;正常对照组和模型组每天给予生理盐水灌胃(参考等体质量的

DMN 毫升量使用)。实验过程中观察大鼠一般情况,于 4 周末下腔静脉采血,离心分离血清,并留取大鼠肝组织标本。

1.2.2 生化指标检测 采用全自动生化分析仪检测血清总胆红素(total bilirubin, Tbil)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、白蛋白含量。

1.2.3 逆转录聚合酶链式反应检测肝组织 CTGF 和 I 型胶原 mRNA 的表达 分别取正常对照组、模型组和补肾柔肝方预防组各 3 只大鼠的肝组织进行研究,CTGF 引物序列(产物 383 bp):上游引物为 5'-CTA AGA CCT GTG GAA TGG GC-3';下游引物为 5'-CTC AAA GAT GTC ATT GTC CCC-3'。I 型胶原引物(产物 225 bp):上游引物为 5'-CTT TGC TTC CCA GAT GTC C-3';下游引物为 5'-TCC CCA TCA TCT CCG TTC-3'; $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)引物(内参照物,产物 300 bp):上游引物为 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3';下游引物为 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3'。所有引物均由国家南方基因中心设计合成。TRIzol 抽提肝组织 RNA,进行逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增。PCR 反应体系为 20  $\mu$ l。扩增条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,54  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 复性 30 s,共 30~35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。每次 PCR 反应均以无菌双蒸水代替 cDNA 模板作为阴性对照。取 7  $\mu$ l PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳,紫外线下观察结果,并在凝胶电泳分析系统下拍照。求出每条带的光密度值,以  $\beta$ -actin PCR 产物作为内参照。求出每条目的条带与  $\beta$ -actin 条带光密度值的比值,进行统计学处理。

1.3 统计学方法 所有实验数据采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用卡方检验、*t* 检验和单因素方差分析。

### 2 结果

2.1 大鼠一般情况观察 正常对照组大鼠生长状态良好,体质量增加显著,皮毛光滑,大小便正常;模型组大鼠活动少,精神萎靡,胡须下垂,喜睡少动,体质量无明显增加,皮毛欠光滑,尿色黄,有腹泻;补肾柔肝方预防组大鼠一般状态明显好于模型组。正常大鼠无死亡,而模型大鼠死亡率为 13.33%(2/15),补肾柔肝方预防组死亡率为 6.67%(1/15)。正常大鼠无腹水,模型组大鼠腹水发生率为 46.67%(7/15),补肾柔肝方预防组大鼠腹水发生率为 20%(3/15),两组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

2.2 补肾柔肝方对大鼠肝功能的影响 模型组大鼠血清酶学水平高于正常对照组( $P < 0.01$ ),血清白蛋白水平下降明显( $P < 0.01$ ),补肾柔肝方预防组血清酶学水平低于模型组( $P < 0.01$ ),同时白蛋白水平高于模型组( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.3 补肾柔肝方对肝组织 CTGF 和 I 型胶原 mRNA 表达的影响 模型组 CTGF/ $\beta$ -actin、I 型胶原/ $\beta$ -actin 的比值分别为  $1.08 \pm 0.17$  和  $0.84 \pm 0.08$ ,补肾柔肝方预防组分别为  $0.76 \pm 0.10$  和  $0.62 \pm 0.04$ ,两组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),而正常对照组分别为  $0.28 \pm 0.03$  和  $0.50 \pm 0.04$ ,与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。CTGF 和 I 型胶原 mRNA 基因扩增电泳结果如图 1 和图 2 所示。

表 1 各组大鼠血清 ALT、AST 活性和 Tbil、白蛋白水平

Table 1 Serum ALT, AST activities and albumin, Tbil levels in different groups

Group	<i>n</i>	Tbil ( $\mu\text{mol/L}$ )	ALT (U/L)	AST (U/L)	Albumin (g/L)
Normal control	10	$1.49 \pm 0.15$	$34.10 \pm 5.65$	$125.70 \pm 13.91$	$38.75 \pm 5.08$
Untreated	13	$35.46 \pm 4.59^{**}$	$94.46 \pm 10.71^{**}$	$284.38 \pm 38.86^{**}$	$25.42 \pm 2.52^{**}$
BSRGR	14	$22.14 \pm 5.71^{\Delta\Delta}$	$74.92 \pm 7.71^{\Delta\Delta}$	$224.01 \pm 13.19^{\Delta\Delta}$	$28.64 \pm 3.78^{\Delta\Delta}$

\*\*  $P < 0.01$ ,  $\tau\text{s}$  normal control group;  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$ ,  $\tau\text{s}$  untreated group.

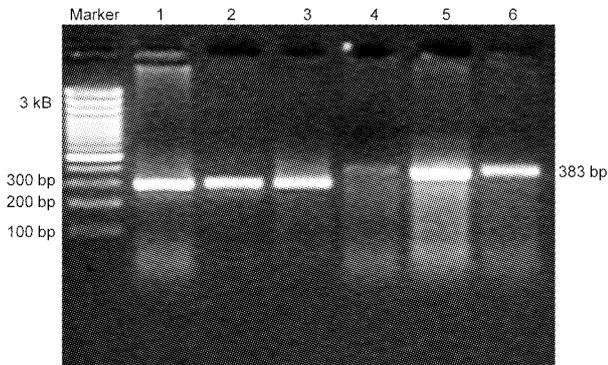


图 1 CTGF mRNA 基因扩增电泳图谱

Figure 1 Expression of CTGF mRNA in liver tissue of rats in different groups

Lane 1-3: Amplified products of  $\beta$ -actin (300 bp); Lane 4-6: Amplified products of CTGF mRNA in normal control group, untreated group and BSRGR group, respectively (383 bp).

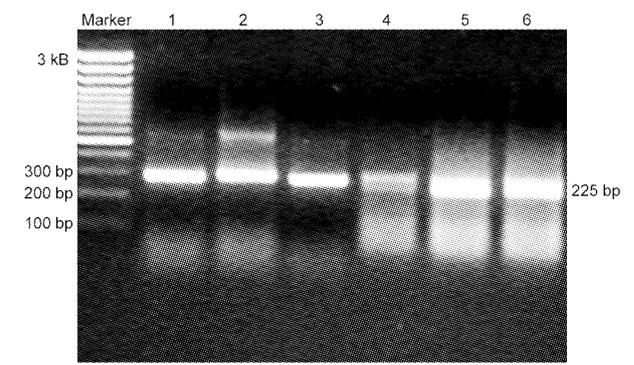


图 2 I 型胶原 mRNA 基因扩增电泳图谱

Figure 2 Expression of collagen type I mRNA in liver tissue of rats in different groups

Lane 1-3: Amplified products of  $\beta$ -actin (300 bp); Lane 4-6: Amplified products of collagen type I mRNA in normal control group, untreated group and BSRGR group, respectively (225 bp).

### 3 讨论

中医药防治肝胆疾病(如黄疸、臌胀、胁痛等),已有悠久的历史,大量临床实践也证实其疗效。补肾柔肝方攻补兼施,攻而不破,补而不腻,攻补力量

较为平均,其以仙灵脾、枸杞和鳖甲等以补肾而软坚散结;黄芪、白术健脾,以益气生血;丹参补血活血。诸药合用,共奏补肾健脾活血软坚之功,是预防和治疗慢性肝病肝纤维化脾肾亏虚、瘀血内阻的安全、有效的中药处方。其独到之处在于注重肾在肝病发病

过程中的作用,认为肝纤维化发生与机体正气亏虚有关,提出从肾治肝、扶助正气的治肝观点,符合中医基础理论中的“肝肾同源”的原理,在先前的研究中也证实具有良好的抗肝纤维化作用<sup>[6, 7]</sup>。本研究表明,补肾柔肝方可以使 ALT、AST、Tbil 不同程度地改善,同时显著提高白蛋白水平,显示补肾柔肝方能有效改善肝纤维化大鼠的肝功能。

目前认为肝纤维化是肝损伤持续存在,使肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活,造成肝脏组织发生修复过程中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成、降解与沉积不平衡而引起,是涉及复杂的细胞及分子机制的动态过程,受到多种信号转导的调控<sup>[8, 9]</sup>。正常肝内 ECM 占肝湿重的 0.5%,可分为细胞间基质、间质基质和基底膜基质。ECM 的成分包括胶原、非胶原糖蛋白、蛋白多糖及弹性硬蛋白等,其中胶原是结缔组织的主要成分,其中主要为 I 型和 III 型(各占 33%),可见 I 型胶原的表达情况与肝纤维化的程度关系比较密切,可以作为肝纤维化进展程度判断的依据之一<sup>[1]</sup>。我们在本研究中也发现,模型组大鼠 I 型胶原的表达明显增强,而正常大鼠表达较少,模型大鼠经过中药预防后有显著改善的趋势,表明补肾柔肝方具有良好的抗肝纤维作用。细胞因子作为促进肝纤维化的重要调节因子的作用已较明确,尤其是转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、组织金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 和血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等在肝纤维化形成过程中的作用比较明确<sup>[10-12]</sup>。尽管如此,人们对肝纤维化的发病机制还不清楚。目前许多其他细胞因子的作用也引起人们的高度重视,其中 CTGF 与肝纤维化的关系也受到很多学者的关注。CTGF 是高度保守的 CCN 多肽家族成员之一,分子量 38 D,含 349 个氨基酸,富含半胱氨酸,具有明显的丝裂原性和趋化性,能诱导成纤维细胞增殖和分泌细胞外基质,参与调节细胞增生、分化、胚胎发育以及伤口愈合。Li 等<sup>[13]</sup>认为 CTGF 具有促进炎症和纤维化形成的作用。George 等<sup>[14]</sup>运用 DMN 诱导大鼠肝纤维化后发现,肝组织的 CTGF 和 TGF- $\beta$  表达均显著提高,运用针对 CTGF 的小干扰 RNA (siRNA) 进行干预,可以下调 CTGF 和 TGF- $\beta$  的表达,有抑制肝纤维化的形成和发展的作用。Weng 等<sup>[15]</sup>认为,CTGF 具有上调 TGF- $\beta$  活性的作用,从而促进肝纤维化的形成和发展,其机制可能与纤维化发生过程中的细胞信号转导激活有关,其中 Smad3、Smad7 等信号蛋白参与其发病的过

程。Hora 等<sup>[16]</sup>发现,在丙型肝炎患者,CTGF 是促进肝纤维化的炎症介质,可能是通过提高瘦素水平来实现的。本研究结果显示,补肾柔肝方可以显著减少肝组织 CTGF mRNA 表达水平。提示补肾柔肝方对肝纤维化具有较好的预防作用,其抗肝纤维化的分子机制可能与下调 CTGF 和 I 型胶原的表达有关,可以使 HSC 的活化得到抑制,从而减少肝纤维化的发生和发展。有关其抗肝纤维化的机制仍需要做进一步研究。

## REFERENCES

- 1 Attallah AM, Mosa TE, Omran MM, *et al.* Immunodetection of collagen types I, II, III, and IV for differentiation of liver fibrosis stages in patients with chronic HCV. *J Immunoassay Immunochem.* 2007; 28(2): 155-168.
- 2 Zhang C, Zhu Y, Wan J, *et al.* Effects of Ginkgo biloba extract on cell proliferation, cytokines and extracellular matrix of hepatic stellate cells. *Liver Int.* 2006; 26(10): 1283-1290.
- 3 Rachfal AW, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res.* 2003; 26(1): 1-9.
- 4 Gressner AM, Yagmur E, Lahme B, *et al.* Connective tissue growth factor in serum as a new candidate test for assessment of hepatic fibrosis. *Clin Chem.* 2006; 52(9): 1815-1817.
- 5 Sakaida I, Hironaka K, Terai S, *et al.* Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci.* 2003; 72(8): 943-959.
- 6 Zhang B, Wan MB, Wang LT. Expression of IV-C and TGF- $\beta$ 1 protein in rat with hepatic fibrosis induced by DMN and the therapeutic effects of Chinese traditional medicine. *Zhong Yi Yao Xue Bao.* 2005; 33(4): 25-27. Chinese with abstract in English.  
张斌, 万谟彬, 王灵台. 中药复方对 DMN 诱导的肝纤维化大鼠 IV 型胶原和 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达的影响. *中医药学报.* 2005; 33(4): 25-27.
- 7 Zhang B, Wan MB, Wang LT. Therapeutic effect of Bushen Rougan Recipe on hepatic fibrosis in rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 2005; 3(2): 132-135. Chinese with abstract in English.  
张斌, 万谟彬, 王灵台. 补肾柔肝方治疗大鼠肝纤维化的实验研究. *中西医结合学报.* 2005; 3(2): 132-135.
- 8 Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol*

- Hepatol. 2007; 22 (Suppl 1): S79-S84.
- 9 Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. J Gastroenterol Hepatol. 2007; 22 (Suppl 1): S73-S78.
- 10 Brocks B, Kraft S, Zahn S, *et al.* Generation and optimization of human antagonistic antibodies against TIMP-1 as potential therapeutic agents in fibrotic diseases. Hum Antibodies. 2006; 15(4): 115-124.
- 11 Senties-Gómez MD, Gélvez-Gastilum FJ, Meza-García E, *et al.* Hepatic fibrosis: role of matrix metalloproteases and TGFbeta. Gac Med Mex. 2005; 141(1): 315-322.
- 12 Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, *et al.* Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(9): 3389-3394.
- 13 Li G, Xie Q, Shi Y, *et al.* Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. J Gene Med. 2006; 8(7): 889-900.
- 14 George J, Tsutsumi M. siRNA-mediated knockdown of connective tissue growth factor prevents N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. Gene Ther. 2007; 14(10): 790-803.
- 15 Weng HL, Ciucan L, Liu Y, *et al.* Profibrogenic transforming growth factor-beta/activin receptor-like kinase 5 signaling via connective tissue growth factor expression in hepatocytes. Hepatology. 2007; 46(4): 1257-1270.
- 16 Hora C, Negro F, Leandro G, *et al.* Connective tissue growth factor, steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. Liver Int. 2008; 28(3): 370-376.

## 第十六届全国中西医结合骨伤科学术研讨会通知

第十六届全国中西医结合骨伤科学术研讨会由中国中西医结合学会骨伤科专业委员会和第二军医大学长海医院主办,上海市中西医结合学会骨伤科专业委员会和上海沐阳医院承办,定于 2008 年 10 月 24~26 日在上海召开。

**1 会议形式** (1)3 个会场。为满足参会代表的不同需求,本次大会特设 3 个会场:以保守治疗为主的中医骨伤、针灸、康复分会场,并有现场演示;以手术治疗为主的西医分会场;中西医结合分会场。(2)首届全国中西医结合骨伤科中青年论文大赛。为了更好地培养中西医结合骨伤科中青年专家,经会议组委会讨论决定,在本次会议中增加全国中青年论文大赛专场。参赛要求:年龄在 28~40 周岁;比赛论文须为未公开发表的全文;投稿时请注明青年大赛。统一投稿后召开各评审会确定入围名单,本次大赛设特等奖 1 名,一等奖 3 名,二等奖 6 名,三等奖 10 名。(3)灾害医学专场。在本次会议征文中增加抗震救灾相关的救治方面的经验总结,凡是与地震救治相关的临床体会均可投稿。为了给各位参加抗震救灾的同志们足够的时间整理救治体会,特将征文时间推迟至 2008 年 9 月 20 日。

**2 征文要求** (1)符合会议议题,具有科学性、先进性、实用性的论文。(2)文章全文不超过 4 000 字(须附 400 字以内的摘要,包括目的、方法、结果和结论)。(3)注明论文题目,作者姓名、单位及邮政编码、联系电话和电子邮箱地址。(4)投稿须采用 Word 文档格式,以电子邮件发出,并于发出后 72 h 内确认是否被收到。无法发电子邮件的作者,可邮寄稿件电子版的光盘或 U 盘。恕不接收纸质打印稿,请自留底稿。(5)截稿日期为 2008 年 9 月 20 日 18 时。光盘请寄至:上海市徐汇区中山南二路 555-5 号上海沐阳医院;邮政编码:200032;收信人:杜宁;电话:13901634240;E-mail:duning@vip.163.com。或寄至:上海市杨浦区长海路 168 号上海长海医院;邮政编码:200433;收信人:苏佳灿;电话:021-25072003;E-mail:sujiacan@yahoo.com.cn。会议网址为 <http://m287.meeting163.com>。欢迎网上报名,网上投稿。

**3 相关事项** (1)参会者将被授予国家级继续教育学分 18 分;(2)为了适应国内中西医结合骨伤科学术发展的需要,将于 10 月 24 日下午 3 时召开全国中西医结合骨伤科专业委员会全委扩大会议,讨论增选全国委员等事宜;(3)在年会前后 10 月 21~24 日和 27~29 日举办中西医结合手法治疗骨伤科疾病新进展学习班,10 月 20 日报到。