

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.02.005

维生素 D 联合葛根素对四氯化碳致大鼠肝纤维化的作用及机制\*

韦斯军<sup>1</sup>, 黄干荣<sup>2△</sup>, 曾海生<sup>1</sup>, 周歧骥<sup>1</sup>, 莫昕莹<sup>1</sup>, 徐灵源<sup>1</sup>, 廖作庄<sup>1</sup>

(1. 右江民族医学院附属医院药剂科, 广西百色 533000; 2. 右江民族医学院桂西地区微生物感染研究重点实验室培育基地, 广西百色 533000)

**[摘要]** **目的** 探究维生素 D 联合葛根素对肝纤维化的保护作用及机制。**方法** 将大鼠分为正常对照组(C 组)、四氯化碳组(CCl<sub>4</sub> 组)及 CCl<sub>4</sub> 外加维生素 D 组(V 组)、葛根素组(P 组)及维生素 D 联合葛根素组(V+P 组)治疗组, 8 周后处死, 检测透明质酸(HA); 测量羟脯氨酸(Hyp); 制作肝脏石蜡切片并行天狼星红染色检查; 反转录 PCR 检测肝组织中胶原蛋白(Collagen) I、III mRNA 水平; Western blot 检测肝脏 NF-κB 和肿瘤坏死因子(TNF-α)水平。**结果** CCl<sub>4</sub> 组出现明显肝脏纤维化, V 组、P 组及 V+P 组均明显改善了纤维化程度, 降低了血中 HA 水平及肝脏中的 Hyp 水平, 肝脏 Collagen I、III mRNA 及 NF-κB 和 TNF-α 蛋白水平明显降低。其中 V+P 组肝纤维化程度改善最为明显(P<0.05)。**结论** 维生素 D 联合葛根素可以保护 CCl<sub>4</sub> 引起的大鼠肝脏纤维化, 其机制可能与降低肝脏星状细胞活化、减少胶原纤维分泌有关。

**[关键词]** 四氯化碳; 肝硬化; 维生素 D; 葛根素; 肝星状细胞

**[中图法分类号]** R915      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2018)02-0161-03

Effect and mechanism of vitamin D combined with puerarin on rat liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>\*

WEI Sijun<sup>1</sup>, HUANG Ganrong<sup>2△</sup>, ZENG Haisheng<sup>1</sup>, ZHOU Qiji<sup>1</sup>, MO Xinying<sup>1</sup>, XU Lingyuan<sup>1</sup>, LIAO Zuozhuang<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 2. Key Laboratory Breeding Base of Nature Anti-infective Drug Research, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the protective effect and mechanism of vitamin D combined with puerarin on liver fibrosis. **Methods** The rats were divided into normal control group(C), tetrachloromethone group(CCl<sub>4</sub>), vitamin D group(V), puerarin group(P) and vitamin D combined with puerarin group(V+P). After 8 weeks, the rats were sacrificed and blood and liver samples were collected. The level of blood hyaluronic acid(HA) was tested. The hydroxyproline(Hyp) level in the liver was measured. The liver paraffin sections were made and examined by the sirius red staining. The mRNA levels of collagen I and collagen III in the liver tissue were detected by RT-PCR, and the levels of NF-κB and TNF-α in the liver were detected by Western blot. **Results** The CCl<sub>4</sub> group appeared obvious liver fibrosis. The liver fibrosis degree was significantly improved in the group V, P and V+P, the blood HA level and liver Hyp level were reduced. The mRNA levels of collagen I and collagen III as well as the protein levels of NF-κB and TNF-α in the liver were significantly decreased. Among them, The liver fibrosis improvement degree in the V+P group was most significant. **Conclusion** Vitamin D combined with puerarin can protect rat liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> and its mechanism may be related with reducing the activation of hepatic stellate cells(HSC) and decreasing the collagenous fibers secretion.

**[Key words]** carbon tetrachloride; liver cirrhosis; vitamin D; puerarin; hepatic stellate cell

肝纤维化是各种慢性肝脏疾病的病理结构改变, 其实质是在各种致病因素的作用下, 肝脏星状细胞合成的细胞外基质明显增加, 超出了肝脏自身的降解能力<sup>[1-2]</sup>。四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)是一种十分经典的肝纤维化造模毒物, 大量应用于基础研究<sup>[3]</sup>。有研究从体内证实维生素 D 能降低肝脏纤维化, 从体外实验证实维生素 D 能减少肝脏星状细胞胶原纤维的分泌<sup>[4]</sup>。也有文献报道葛根素能改善肝纤维化, 其可能与下调 TNF-α 信号通路降低肝星状细胞活化有关<sup>[5-6]</sup>。可见, 维生素 D 与葛根素单独使用具有抑制纤维化的效果, 其作用机制有一定的交叉重叠, 均与抑制肝星状细胞的活化及其胶原纤维的分泌有关。但二者联合是否能增强抗肝纤维化的作用未有报道, 因此本研究用 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化大鼠模型, 探讨维生素 D 联合葛根素对肝纤维化的作用效果及其机制。

1 材料与方法

**1.1 材料** 清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 50 只, 周龄相近, 体质量 200 g 左右, 由右江民族医学院动物中心提供。CCl<sub>4</sub> 为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。维生素 D 与葛根素购于 Sigma 公司, 玉米油购于和光纯药工业株式会社, 天狼星红染色液购于北京雷根生物技术有限公司, 实时荧光定量 PCR 试剂盒购于瑞士 Roche 公司, 核因子-κB(NF-κB)和肿瘤坏死因子(TNF-α)抗体购于美国 Santa cruz 公司, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 序列见表 1。

**1.2 方法** 将 Wistar 大鼠 50 只分为 5 组。CCl<sub>4</sub> 组, 按照 3 mL/kg 的比例腹腔注射 45% CCl<sub>4</sub> 玉米油溶液, 每周 2 次; 正常对照组(C 组), 给予等量的生理盐水, 腹腔注射, 每周 2 次; 维生素 D 组(V 组)、葛根素组(P 组)及维生素 D 联合葛根素

\* 基金项目: 广西高校科学技术研究项目(YB2014294); 广西高校重点实验室培育基地(桂教科研[2014]6)。 作者简介: 韦斯军(1975—), 副主任药师, 硕士, 主要从事药物药理作用研究。 △ 通信作者, E-mail: hgryy@sohu.com。

组(V+P 组)为相应药物干预组,在 CCl<sub>4</sub> 玉米油溶液造模基础上分别按照维生素 D 2.0 μg/kg、葛根素 0.4 g/kg、维生素 D 2.0 μg/kg 与葛根素 0.4 g/kg 的比例灌胃,每周 2 次。每次灌喂之前禁食 1 h,C 组在实验中灌胃等量生理盐水。共 8 周,在实验结束的前 1 晚禁食过夜。第 2 天处死大鼠,取全血,室温静置 20 min,以 5 000 r/min 离心 15 min,取上清液,得到血清,用试剂盒检测血中透明质酸(HA)。取大鼠肝脏,用试剂盒检测肝脏中的羟脯氨酸(Hyp)。一部分肝脏用多聚甲醛溶液固定,常规制备石蜡切片,进行天狼星红染色,显微镜下观察肝脏组织切片的病理变化及纤维化的严重程度。通过实时荧光定量 PCR 检测胶原蛋白(Collagen) I、Ⅲ mRNA 及 Western blot 检测 NF-KB 和 TNF-α 蛋白水平。

表 1 引物名称及序列	
名称(大鼠)	序列
GAPDH	F:GGCATCCTGACCCCTCAAGTA
	R:GGGGTGTGTGAACCTCTCAAA
Collagen I	F:GGACACTACTGGATCGACCTAAC
	R:CTCACCTGTCTCCATGTTGCA
Collagen Ⅲ	F:CTACCTTGCTCAGTCCTATGAGTCTAGA
	R:TCCCGAGTCGCAGACACATAT
F:正向引物;R:反向引物	

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计

学意义。

### 2 结 果

#### 2.1 血和肝生化指标的测定结果

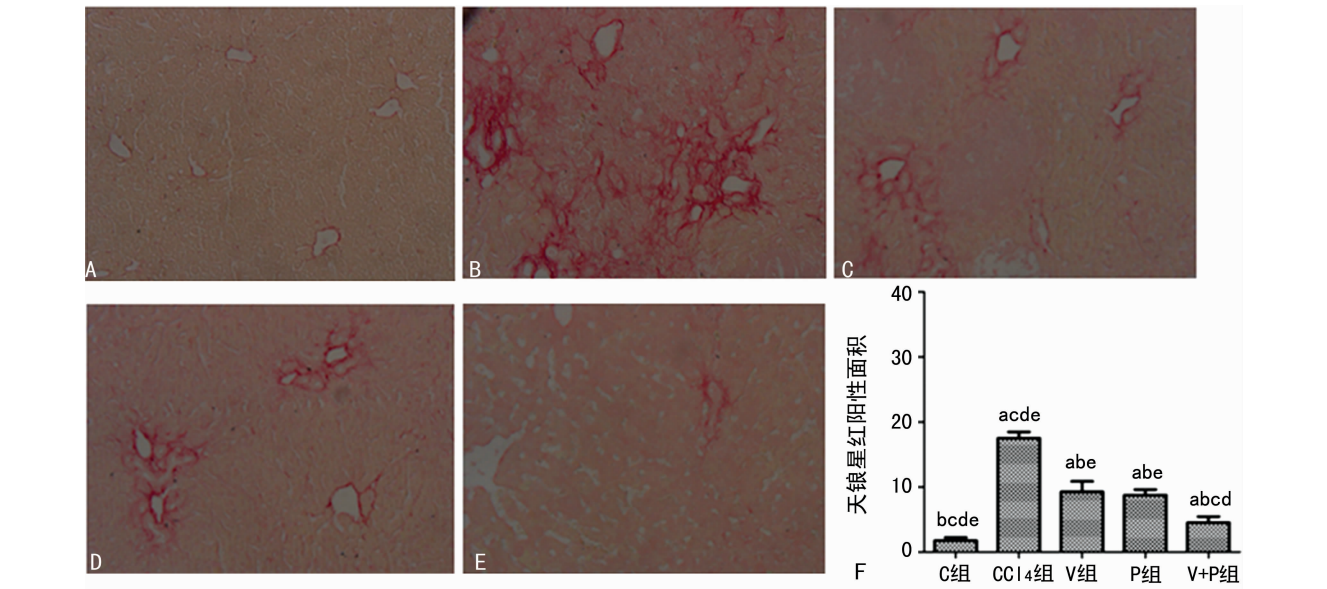
HA 是分布于肝细胞周围的一种蛋白多糖,肝纤维化时血中水平明显增加<sup>[7]</sup>。肝脏中的 Hyp 是肝脏胶原纤维的重要组成部分,纤维化发生时肝脏中水平也明显增加<sup>[8]</sup>。因此这两者是肝纤维的重要诊断指标。CCl<sub>4</sub> 组的 HA 和 Hyp 均明显高于 C 组,一定程度上表明肝纤维化模型建立成功。V 组、P 组及 V+P 组的 HA 和 Hyp 水平相对于 CCl<sub>4</sub> 组明显降低,而且 V+P 组降低得最为明显,见表 2。

表 2 血液与肝脏生化指标( $\bar{x} \pm s$ )		
组别	HA(μg/L)	Hyp(μg/g)
C 组	61.0 ± 20.6 <sup>bcde</sup>	195.6 ± 10.5 <sup>bcde</sup>
CCl <sub>4</sub> 组	157.3 ± 44.3 <sup>acde</sup>	503.0 ± 31.7 <sup>acde</sup>
V 组	70.2 ± 12.9 <sup>b</sup>	375.2 ± 26.9 <sup>ab</sup>
P 组	79.5 ± 11.6 <sup>b</sup>	361.3 ± 24.1 <sup>ab</sup>
V+P 组	65.0 ± 12.1 <sup>b</sup>	353.7 ± 21.6 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 C 组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与 CCl<sub>4</sub> 组比较;<sup>c</sup>:  $P < 0.05$ ,与 V 组比较;<sup>d</sup>:  $P < 0.05$ ,与 P 组比较;<sup>e</sup>:  $P < 0.05$ ,与 V+P 组比较

#### 2.2 肝脏组织病理切片观察结果

大鼠肝组织纤维化面积 CCl<sub>4</sub> 组最大,C 组最小( $P < 0.05$ ),各给药组中 V+P 组纤维化面积最小,见图 1。



A: C 组;B: CCl<sub>4</sub> 组;C: V 组;D: P 组;E: V+P 组;F: 天狼星红染色阳性面积统计图;<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 C 组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与 CCl<sub>4</sub> 组比较;<sup>c</sup>:  $P < 0.05$ ,与 V 组比较;<sup>d</sup>:  $P < 0.05$ ,与 P 组比较;<sup>e</sup>:  $P < 0.05$ ,与 V+P 组比较

图 1 天狼星红染色切片(×200)

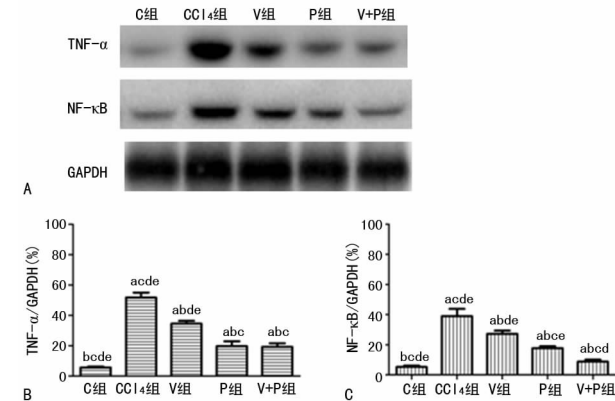
表 3 肝脏 Collagen I、Ⅲ mRNA 水平( $\bar{x} \pm s$ )		
组别	Collagen I	Collagen Ⅲ
C 组	1.17 ± 0.16 <sup>bcde</sup>	0.62 ± 0.15 <sup>bcde</sup>
CCl <sub>4</sub> 组	4.73 ± 0.76 <sup>acde</sup>	2.47 ± 1.12 <sup>acde</sup>
V 组	1.97 ± 0.31 <sup>b</sup>	1.29 ± 0.19 <sup>ab</sup>

续表 3 肝脏 Collagen I、Ⅲ mRNA 水平( $\bar{x} \pm s$ )		
组别	Collagen I	Collagen Ⅲ
P 组	1.75 ± 0.46 <sup>b</sup>	1.35 ± 0.17 <sup>ab</sup>
V+P 组	1.53 ± 0.12 <sup>abcd</sup>	1.03 ± 0.08 <sup>abcd</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与 C 组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与 CCl<sub>4</sub> 组比较;<sup>c</sup>:  $P < 0.05$ ,与 V 组比较;<sup>d</sup>:  $P < 0.05$ ,与 P 组比较;<sup>e</sup>:  $P < 0.05$ ,与 V+P 组比较

**2.3 肝脏 Collagen I、Ⅲ mRNA 水平** 大鼠肝脏 Collagen I、Ⅲ mRNA 水平,CCl<sub>4</sub> 组最高,C 组最低( $P<0.05$ ),各给药组中 V+P 组 Collagen I、Ⅲ mRNA 水平最低,见表 3。

**2.4 肝脏 TNF- $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 蛋白水平** 大鼠肝脏 TNF- $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 蛋白水平,CCl<sub>4</sub> 组最高,C 组最低( $P<0.05$ ),各给药组中 V+P 组 NF- $\kappa$ B 蛋白水平最低,P 组与 V+P 组 TNF- $\alpha$  比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 2。



A: Western blot 检测肝脏 TNF- $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 蛋白水平;B: TNF- $\alpha$  灰度分析;C: NF- $\kappa$ B 灰度分析。<sup>a</sup>:  $P<0.05$ ,与 C 组比较;<sup>b</sup>:  $P<0.05$ ,与 CCl<sub>4</sub> 组比较;<sup>c</sup>:  $P<0.05$ ,与 V 组比较;<sup>d</sup>:  $P<0.05$ ,与 P 组比较;<sup>e</sup>:  $P<0.05$ ,与 V+P 组比较

图 2 肝脏 TNF- $\alpha$  与 NF- $\kappa$ B 蛋白水平比较

3 讨 论

肝纤维化是慢性肝疾病在进程中不可避免的病理改变,若不阻断其进程,进一步发展就会演变为肝硬化。肝纤维化的致病因素十分多样,如病毒、寄生虫、酒精及其他一些毒物包括 CCl<sub>4</sub>。其实质可以归纳为肝实质细胞外的细胞外基质的生成与降解的平衡紊乱,这些细胞外基质在肝脏内不断积聚,其中最主要的成分就是胶原纤维<sup>[9]</sup>。而肝星状细胞是细胞外基质生成与降解的主要参与者,因此其活化是肝纤维化发生的中心环节。

维生素 D 大部分通过肝脏合成,而且肝脏本身也是其作用的靶器官之一。文献报道维生素 D 可以改善 CCl<sub>4</sub> 导致的大鼠纤维化,而且离体实验表明可能与其降低肝星状细胞活化与胶原纤维分泌减少有关。葛根素作为一种被大量应用于临床的黄酮类药物,有研究表明其也能降低 CCl<sub>4</sub> 导致的肝纤维化,其中 NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  信号通路是被抑制的,但葛根素与维生素 D 联用后该信号通路是否也被明显抑制未见报道。由于大量文献报道氧化应激与肝纤维化密切相关,且 NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  信号通路在肝星状细胞活化中起着十分重要的作用<sup>[10]</sup>,所以,无论是单用维生素 D 还是葛根素,在肝纤维化过程中保护肝脏都与抑制肝星状细胞的功能密切相关,这提示二者联用可能会发挥更大保护作用。

维生素 D 和葛根素均能明显降低大鼠 HA 及肝脏中的 Hyp 水平,使得大鼠肝脏胶原纤维明显降低。维生素 D 联合葛根素对各种损伤指标的降低及胶原纤维沉积的改善最为明显,从而证实了二者有协同作用,联用对肝纤维化的保护作用更明显。

肝脏纤维化的实质是肝脏细胞外基质的生成增加而降解减少。细胞外基质的主要成分是胶原纤维,而 Collagen I、Ⅲ 是胶原纤维的主要存在形式,大部分是由肝星状细胞合成<sup>[11]</sup>。在肝纤维化的进程中,NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  是重要的信号分子。TNF- $\alpha$  介导下游 NF- $\kappa$ B 的激活,而 NF- $\kappa$ B 在肝星状细胞的活

化过程中发挥极其重要的作用<sup>[12]</sup>。维生素 D 和葛根素均能降低这些分子的 mRNA 及蛋白水平,维生素 D 联合葛根素的降低作用同样最为明显。以上研究提示维生素 D 联合葛根素在肝纤维化过程的保护作用是降低肝星状细胞的活化及其胶原纤维的分泌。

本研究探讨了维生素 D 联合葛根素对 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠纤维化的保护作用,其联合用药比单独用药抗肝纤维化效果更好,并初步探究了其机制与 Collagen I、Ⅲ mRNA 及 NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  的蛋白水平增加有关,这对临床实践有一定的参考价值。但调控途径往往由多因子、多路径参与,其作用机制还有待进一步探究。

参考文献

[1] 马志刚,陈兰,詹灵凌,等. Wnt 信号通路调控肝星状细胞活化及增殖在肝纤维化治疗中的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2014,22(21):3048-3055.

[2] FRIEDMAN S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis,an integrated cellular response to tissue injury[J]. J Biol Chem,2000,275(4):2247-2250.

[3] 魏晓光,郭辉,陈永珍,等. 腹腔注射 CCl<sub>4</sub> 建立大鼠肝纤维化模型[J]. 实验室研究与探索,2015,34(11):34-37.

[4] ABRAMOVITCH S,DAHAN-BACHAR L,SHARVIT E A,et al. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats[J]. Gut,2011,60(12):1728-1737.

[5] LI R,XU L Y,LIANG T,et al. Puerarin mediates hepatoprotection against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis rats through attenuation of inflammation response and amelioration of metabolic function[J]. Food Chem Toxicol,2013,52(2):69-75.

[6] KAJI K,YOSHIJI H,IKENAKA Y,et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor attenuates hepatic fibrosis via suppression of activated hepatic stellate cell in rats[J]. J Gastroenterol,2014,49(3):481-491.

[7] 肖蕾,王云莲,艾力江·吐尔逊,等. 血清透明质酸、Ⅳ型胶原、层粘连蛋白与大鼠放射性肝纤维化的相关性研究[J]. 中华全科医学,2015,13(1):18-20.

[8] 王者令,刘中景,宋霆,等. 扶正活血不同组方对肝纤维化大鼠相关血清指标及肝组织羟脯氨酸的影响[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(6):611-613.

[9] LU J,CHEN B A,LI S L,et al. Tryptase inhibitor APC 366 prevents hepatic fibrosis by inhibiting collagen synthesis induced by tryptase/protease-activated receptor 2 interactions in hepatic stellate cells[J]. Int Immunopharmacol,2014,20(2):352-357.

[10] WANG Y,ZHAO Z,YAN Y,et al. Demethylenberberine protects against hepatic fibrosis in mice by modulating NF- $\kappa$ B signaling[J]. Int J Mol Sci,2016,17(7):1036.

[11] FRIEDMAN S L,BANSAL M B. Reversal of hepatic fibrosis:fact or fantasy? [J]. Hepatology,2006,43(1):82-88.

[12] 赵宗豪,梅俏,吴军,等. 核转录因子- $\kappa$ B 与大鼠肝纤维化关系的实验研究[J]. 安徽医学,2003,24(5):1-3.