

· 研究报告 ·

## 紫草素对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠 TGF- $\beta$ 1 的影响

鲁明霞<sup>1</sup>, 王红岗<sup>1</sup>, 胡仁标<sup>2</sup> (1. 金华市人民医院, 浙江 金华 321000; 2. 宁德市人民医院, 福建 宁德 352000)

**[摘要]** **目的** 观察紫草素对肝纤维化大鼠肝组织病理学改变及转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)含量的影响,探讨其对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠抗肝纤维化作用及可能的机制。**方法** 将40只SD大鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组、紫草素组。除空白组外,各组大鼠腹腔注射40%四氯化碳橄榄油溶液建立肝纤维化模型。造模同时,空白组与模型组予蒸馏水灌胃,阳性对照组予复方鳖甲软肝片水溶液灌胃,紫草素组予腹腔注射紫草素溶液,共干预10周。观察肝组织病理学变化;采用ELISA法测定层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原含量,采用全自动生化仪分析ALT、AST含量,免疫组织化学法检测纤维化肝组织中TGF- $\beta$ 1的表达。**结果** 与空白组比较,模型组可见明显肝纤维化病理改变,AST、ALT水平升高( $P < 0.05$ ),层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原含量增高( $P < 0.05$ );与模型组比较,紫草素组肝纤维化程度较轻,血清ALT、AST水平较低( $P < 0.05$ ),层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原含量下降( $P < 0.05$ ),肝组织TGF- $\beta$ 1含量下降( $P < 0.05$ );与阳性对照组比较,紫草素组肝组织TGF- $\beta$ 1含量下降( $P < 0.05$ )。**结论** 紫草提取物紫草素可通过下调四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠肝组织中TGF- $\beta$ 1的表达,从而抑制大鼠肝纤维化。

**[关键词]** 紫草素;肝纤维化;转化生长因子- $\beta$ 1

**[中图分类号]** R743.32 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)05-0453-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.016

## Effect of shikonin on expression of TGF- $\beta$ 1 in liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in rats

LU Mingxia<sup>1</sup>, WANG Honggang<sup>1</sup>, HU Renbiao<sup>2</sup> (1. JinHua People's Hospital, Jinhua 321000, China; 2. NingDe People's Hospital, Ningde 352000, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the influence of shikonin on pathological changes of liver tissue, expression of TGF- $\beta$ 1 in liver fibrosis in rats and to explore the possible mechanism of shikonin on rats' liver fibrosis. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into four groups: normal group, model group, positive controlled group and shikonin group. Except normal group, the liver fibrosis models were introduced by subcutaneously injecting CCl<sub>4</sub>. Meanwhile, The normal group and the model group were intragastrically given the distilled water. The positive controlled group was intragastrically given Compound Biejiaruangan Troche solution. The treatments lasted for ten weeks. After treatments, pathological changes were observed. The alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) of serum were determined by automatic biochemical analyzer. The serum contents of laminin, procollagen type III were assayed by ELISA. Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) index level was determined by immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal group, liver fibrosis was detected in the model group. The serum levels of ALT, AST and the serum contents of laminin and procollagen type III in the model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the degree of liver fibrosis was less severe in shikonin group. The serum levels of ALT, AST, laminin, procollagen type III and the expression of TGF- $\beta$ 1 in liver tissue were all decreased ( $P < 0.05$ ) in shikonin group. Compared with the positive controlled group, the expression of TGF- $\beta$ 1 in liver tissue was reduced in the shikonin group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** In SD rats, shikonin could inhibit the rats liver fibrosis induced with CCl<sub>4</sub> by accommodating TGF- $\beta$ 1 expression in liver tissue.

**[Key words]** shikonin; liver fibrosis; TGF- $\beta$ 1

据《中华人民共和国药典》记载<sup>[1]</sup>,紫草(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)是紫草科

(Boraginaceae)植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle)Johnst.或内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge 的干燥根。紫草可用于治疗血热毒盛、尿血、血淋、血痢、热结便秘等<sup>[2]</sup>病症,紫草主要成分为紫草素<sup>[3]</sup>(shikonin),紫草素常被作为肝胆疾病辅助用药,主

**[作者简介]** 鲁明霞,本科,主治医师,研究方向:中西医结合防治肝炎、肝纤维化,Email: lumingxia131420@163.com

要用于急性黄疸型或无黄疸型肝炎、慢性肝炎、扁平疣等的治疗,对肝硬变(腹水)、寻常疣也有疗效<sup>[4]</sup>。

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)的形成是肝脏对各种病因所致慢性肝损伤的修复反应,肝脏持续受到损害引发病情进展最终发展为肝硬化、肝癌,严重威胁人类健康和生存<sup>[5-7]</sup>。目前为止,临床缺乏疗效确切的抗肝纤维化西药,中医药研究在治疗肝纤维化方面具有优势,中医药治疗肝纤维化更是成为当前研究热点。目前,抗肝纤维化药物研究主要集中于:①保护肝实质细胞,减少其损伤;②作用于各种影响细胞外基质含量的细胞因子和酶;③作用于肝非实质细胞;④肝细胞凋亡与基因调控剂。研究显示紫草素可作用于肝细胞外基质含量的细胞因子,也可干扰肝细胞凋亡,对肝损伤具有一定的修复作用。笔者在临床工作中,采用中药加/减紫草辩证治疗肝炎及肝纤维化,取得了较好的疗效,在此基础上,本实验采用四氯化碳注射法制作肝纤维化大鼠模型,通过紫草素对模型进行药物干预,观察紫草素对肝纤维化模型的影响,从而揭示紫草素在治疗肝纤维化方面的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物与试剂

健康清洁级 SD 大鼠 40 只,雌雄各 20 只,体重 220~260 g,购自浙江中医药大学实验动物中心(实验动物许可证号:SCXK-2014-0003)。紫草素(南京康满林化工实业有限公司,批号:1504882),四氯化碳(天津市富宇精细化工有限公司,批号:130316);大鼠 TGF- $\beta$ 1 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物公司,批号:142017)。

#### 1.1.2 主要仪器

电子天平(瑞士 METTER AE100 型),显微镜(美国 moticom3000 显微摄影成像系统),医用微波炉(浙江临安爱迪仪器厂),电热恒温箱(上海一恒公司),切片机(德国莱卡 2135 型切片机)。

## 2 方法

### 1.2.1 分组与造模

40 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、阳性药组、紫草素组,每组 10 只。除空白组外,其余组大鼠腹腔注射 40% 四氯化碳橄榄油溶液 2 ml/kg,每周 2 次,持续造模 7 周<sup>[8-10]</sup>。

### 1.2.2 给药

自造模当天开始,空白组与模型组给予蒸馏水

灌胃,大鼠灌胃容积 10 ml/kg,1 次/d,连续灌胃 10 周,紫草素组给予腹腔注射 25 mg/kg 紫草素,1 次/d,连续 10 周,阳性对照组予 50% 复方鳖甲软肝片水溶液 1.2 ml/kg 灌胃,1 次/d,连续 10 周。

### 1.2.3 标本采集与指标检测

在灌胃及腹腔注射干预的第 10 周末,末次给药后,大鼠禁食 12 h,眼眶采血,以 12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,分离血清,检测血清中肝纤维化指标;采用全自动生化仪检测血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性,Elisa 法检测层粘连蛋白、III 型前胶原含量;处死大鼠,剖取肝脏,称重,计算肝脏系数(肝脏系数=脏器重量/体重 $\times$ 100)。取大鼠肝右叶相同部位组织,0.9% 氯化钠溶液清洗干净,观察肝脏形态,然后用 10% 甲醛固定 12 h,石蜡包埋并切片备检,切片常规方法进行 HE 和 Masson 染色,观察肝组织病理改变,部分肝组织采用免疫组织化学检测 TGF- $\beta$ 1 含量。

### 1.2.4 统计学分析

所有数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据统计处理分析,采用单因素方差分析检验差异的显著性,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝脏形态与肝脏系数

空白组大鼠肝脏质地软,表面光滑,无斑点。模型组大鼠肝脏肿大,质地较硬,暗红无光,表面有黄白色不规则斑点。阳性对照组以及紫草素组大鼠肝脏质地较模型组软,表面斑点少。与模型组比较,紫草素组肝脏系数下降,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );但与阳性对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 各组实验大鼠肝脏系数比值( $\bar{x} \pm s, n=10, \%$ )

组别	肝脏系数
空白组	4.104 $\pm$ 0.231
模型组	4.715 $\pm$ 0.356
阳性对照组	4.336 $\pm$ 0.313
紫草素组	4.287 $\pm$ 0.207*

\*  $P < 0.05$ ,与模型组比较

### 2.2 紫草素组对肝纤维化大鼠生化指标的影响

与空白组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST 水平均升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,阳性对照组大鼠血清 ALT、AST 水平均下降( $P < 0.05$ ),紫草

素组 ALT、AST 水平明显下降,与阳性对照组相比,紫草素组 ALT 水平下降、AST 水平升高,但差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 2。

表 2 各组实验大鼠血清转氨酶检测结果( $\bar{x}\pm s, n=10, U/L$ )

组别	AST	ALT
空白组	32.21±11.05	47.83±5.62
模型组	58.42±6.28*	106.75±9.02*
阳性对照组	33.60±10.17#	65.83±8.84#
紫草素组	36.25±4.86	62.32±5.20

\*  $P<0.05$ ,与空白组比较;#  $P<0.05$ ,与模型组比较

### 2.3 紫草素对肝纤维化大鼠血清层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原水平的影响

模型组大鼠血清中层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原平均高于空白组( $P<0.05$ ),表明造模成功。与模型组比较,阳性对照组和紫草素组层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原水平均降低( $P<0.05$ ),紫草素组层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原含量下降程度大于阳性对照组,但其差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 3。

表 3 各组大鼠血清层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原检测结果( $\bar{x}\pm s, n=10, ng/ml$ )

组别	层粘连蛋白	Ⅲ型前胶原
空白组	196.82±32.11	31.65±8.92
模型组	428.32±41.21*	78.44±6.20*
阳性对照组	360.58±17.76#	45.78±3.34#
紫草素组	347.36±12.04 <sup>△</sup>	41.91±2.05 <sup>△</sup>

\*  $P<0.05$ ,与空白组比较;#  $P<0.05$ ,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,与模型组比较

### 2.4 紫草素对肝纤维化大鼠肝组织 TGF-β1 含量的影响

模型组大鼠肝组织中 TGF-β1 水平高于空白组( $P<0.05$ )。与模型组比较,阳性对照组和紫草素组 TGF-β1 含量均降低( $P<0.05$ ),紫草素组 TGF-β1 含量下降程度大于阳性对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4。

表 4 紫草素对肝纤维化大鼠肝组织 TGF-β1 表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=10, ng/ml$ )

组别	TGF-β1
空白组	29.51±3.18
模型组	75.45±2.46*
阳性对照组	49.33±6.21#
紫草素组	34.12±1.17 <sup>△▲</sup>

\*  $P<0.05$ ,与空白组比较;#  $P<0.05$ ,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,与模型组比较;<sup>▲</sup> $P<0.05$ ,与阳性对照组比较

## 3 结论

大量研究认为,肝纤维化的形成中细胞外基质(ECM)的过度产生和沉积是一个关键过程,而这一过程受多种细胞因子尤其是 TGF-β1<sup>[11,12]</sup>的影响,TGF-β1 可上调肝星状细胞(HSC)对 I、Ⅲ、Ⅳ型胶原及纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白的表达和促进分泌,增加 FN 与蛋白多糖的合成,并促进 FN 和胶原在 ECM 中的沉积。HSC 可通过自分泌促进 TGF-β1 自身的表达,这种自分泌的正反馈机制,使 TGF-β1 对 HSC 合成胶原的作用更加明显,这是肝纤维化持续发展的原因之一<sup>[13]</sup>。

紫草作为一种传统中草药具有清热解毒功效。紫草素作为紫草的一种提取物具有抗病毒、抗菌、抗肿瘤作用。研究显示紫草素具有抗菌、抗炎等多种功效,并能调节免疫功能及细胞因子的分泌<sup>[14]</sup>,本实验结果显示,通过紫草素干预四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠,可使大鼠肝脏系数下降,AST 及 ALT 均降低,这与紫草素具有抗炎、抗病毒作用有关,也说明紫草素对四氯化碳致大鼠肝纤维化具有一定的保护作用。此外,本实验结果还显示,与模型组比较,紫草素组大鼠血清层粘连蛋白及Ⅲ型前胶原含量下降,而两者在肝纤维化时含量均增多<sup>[15,16]</sup>,说明紫草素可降低肝纤维化大鼠血清中层粘连蛋白及Ⅲ型前胶原含量。紫草素组大鼠纤维化肝组织中 TGF-β1 含量低于模型组,与阳性对照组比较,也显示出较低的含量。由此推断,紫草素组可能通过下调肝纤维化中的关键因子 TGF-β1 的表达,从而达到抗肝纤维化的作用,但是,紫草素应用于抗肝纤维化研究较少,如何减少不良反应而使其广泛用于临床是课题组将来研究的方向。

## 【参考文献】

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部):2015年版[S].北京:中国医药科技出版社,2015:320.
- [2] 马琴国,李天庆.紫草化学成分及药理作用研究进展[J].甘肃中医学院学报,2013,30(2):78-80.
- [3] WU H, XIE J, PAN Q, et al. Anticancer agent shikonin is an incompetent inducer of cancer drug resistance[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e52706.
- [4] 徐佳,伍春莲.紫草素药理作用研究进展[J].药物生物技术,2015,22(1):87-90.
- [5] 谢宏晟,蔡丽敏,颜鸣鹤.恩替卡韦联合扶正化痰胶囊治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的效果观察[J].浙江医学,2016,38(8):555-557.
- [6] 陈红艳,杨光辉.恩替卡韦联合扶正化痰胶囊对慢性乙型肝炎肝纤维化治疗效果观察[J].徐州医学院学报,2015,35(5):

- 335-337.
- [7] 杨丽敏,李群,窦雯雯,等.卡托普利联合复方鳖甲软肝片用于肝纤维化的临床效果[J].山东医药,2016,56(24):53-54.
- [8] 张宁,方衡,王雪,等.逍遥散对实验性肝纤维化大鼠模型干预作用的代谢组学研究[J].药物分析杂志,2014,4(4):588-594.
- [9] 彭蕴茹,丁永芳,罗宇慧,等.藏药郎庆阿塔治疗肝纤维化的实验研究.中国实验方剂学杂志,2012,11(18):189-194.
- [10] 白辰,车念聪,刘文兰,等.一贯煎对大鼠肝纤维化拮抗作用的影响.中华中医药杂志,2015,30(3):815-817.
- [11] 罗瑞红,杨绍基.转化生长因子- $\beta$ 1与肝纤维化[J].国外医学(内科学分册),2000,27(8):348-350.
- [12] 陈洪,陆亚琴,刘顺英,等.地龙2号对大鼠肝纤维化 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、MMP13及TIMP-1蛋白表达的影响[J].胃肠病学和肝病杂志,2005,14(2):156-159.
- [13] 高萍,程留芳,杨云生.TGF $\beta$ 与肝纤维化关系研究进展[J].现代中西医结合杂志,2006,15(9):1272-1274.
- [14] 詹志来,胡峻,刘谈,等.紫草化学成分与药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(21):4127-4135.
- [15] 龙大碧,李晓兰,李远.肝纤维化无创诊断与监测技术研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2011,25(11):1045-1046.
- [16] 王继贵.肝纤维化生物标志物研究的进展[J].实验与检验医学,2011,29(2):138-141.
- [收稿日期] 2018-03-15 [修回日期] 2018-05-10  
[本文编辑] 李睿旻

(上接第388页)

- [18] RINKENBAUGH AL, BALDWIN AS. The NF- $\kappa$ B pathway and cancer stem cells[J]. Cells, 2016, 5(2): E12.
- [19] CHRISTIAN F, SMITH EL, CARMODY RJ. The Regulation of NF- $\kappa$ B Subunits by Phosphorylation[J]. Cells, 2016, 5(1): 12.
- [20] SUN W, YU Y, DOTTI G, et al. PPM1A and PPM1B act as IKK $\beta$  phosphatases to terminate TNF $\alpha$ -induced IKK $\beta$ -NF- $\kappa$ B activation[J]. Cell Signal, 2009, 21(1): 95-102.
- [21] AGARWAL NK, ZHU X, GAGEA M, et al. PHLPP2 suppresses the NF- $\kappa$ B pathway by inactivating IKK $\beta$  kinase[J]. Oncotarget, 2014, 5(3): 815-823.
- [22] MIN J, ZASLAVSKY A, FEDELE G, et al. An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor- $\kappa$ B [J]. Nat Med, 2010, 16(3): 286-294.
- [23] CHEN LF, GREENE WC. Shaping the nuclear action of NF- $\kappa$ B [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(5): 392-401.
- [24] LIU L, DAI Y, CHEN J, et al. Maelstrom promotes hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition by way of Akt/GSK-3 $\beta$ /snail signaling[J]. Hepatology, 2014, 59(2): 531-543.
- [25] SHEN XF, ZHAO Y, JIANG JP, et al. Phosphatase Wip1 in immunity: an overview and update [J]. Front Immunol, 2017, 8: 8.
- [26] LOWE JM, CHA H, YANG Q, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is a novel positive transcriptional regulator of the oncogenic Wip1 phosphatase [J]. J Biol Chem, 2010, 285(8): 5249-5257.
- [27] LIN X, DUAN X, LIANG YY, et al. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGF $\beta$  signaling [J]. Cell, 2016, 165(2): 498.
- [28] DAI F, SHEN T, LI Z, et al. PPM1A dephosphorylates RanBP3 to enable efficient nuclear export of Smad2 and Smad3 [J]. EMBO Rep, 2011, 12(11): 1175-1181.
- [29] WANG L, WANG X, CHEN J, et al. Activation of protein serine/threonine phosphatase PP2C $\alpha$  efficiently prevents liver fibrosis [J]. PLoS ONE, 2010, 5(12): e14230.
- [30] MIYAZONO K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer [J]. Phys Biol Sci, 2009, 85(8): 314-323.
- [31] GENG J, FAN J, OUYANG Q, et al. Loss of PPM1A expression enhances invasion and the epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer by activating the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway [J]. Oncotarget, 2014, 5(14): 5700-5711.
- [32] FURGASON JM, BAHASSI el M. Targeting DNA repair mechanisms in cancer [J]. Pharmacol Ther, 2013, 137(3): 298-308.
- [33] LEEM J, KIM JS, OH JS. WIPL phosphatase suppresses the DNA damage response during G2/prophase arrest in mouse oocytes [J]. Biol Reprod, 2018(Epub).
- [34] JAISWAL H, BENADA J, MÜLLERS E, et al. ATM/Wip1 activities at chromatin control Plk1 re-activation to determine G2 checkpoint duration [J]. EMBO J, 2017, 36(14): 2161-2176.
- [35] WANG ZP, TIAN Y, LIN J. Role of wild-type p53-induced phosphatase 1 in cancer [J]. Oncol Lett, 2017, 14(4): 3893-3898.
- [36] OLIVA-TRASTOY M, BERTHONAUD V, CHEVALIER A, et al. The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase [J]. Oncogene, 2006, 26(10): 1449-1458.
- [37] SLUSS HK, ARMATA H, GALLANT J, et al. Phosphorylation of serine 18 regulates distinct p53 functions in mice [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(3): 976-984.
- [38] GOLOUDINA AR, KOCHETKOVA EY, POSPELOVA TV, et al. Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways [J]. Oncotarget, 2016, 7(21): 31563-31571.
- [收稿日期] 2017-11-23 [修回日期] 2018-07-01  
[本文编辑] 李睿旻