

# 六味地黄丸抑制巨噬细胞激活抗肝纤维化作用机制研究

王学敏, 崔亚钦\*, 王静, 石炳焯, 李新菊

(河北大学附属医院, 河北 保定 071000)

**摘要:**目的 观察六味地黄丸对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)小鼠肝纤维化过程中巨噬细胞激活的影响。方法 每周 3 次腹腔注射 CCl<sub>4</sub> 共 6 周制备肝纤维化模型, 六味地黄丸在 CCl<sub>4</sub> 造模同时灌胃给药。免疫荧光检测  $\alpha$ -SMA 表达, 免疫组化检测巨噬细胞标志物 CD68 表达, qPCR 检测  $\alpha$ -SMA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1、CXCR3 表达, Western blot 检测  $\alpha$ -SMA、MCP1 和 CXCR3。结果 造模 6 周,  $\alpha$ -SMA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), 六味地黄丸显著抑制  $\alpha$ -SMA 表达 ( $P < 0.01$ ); CCl<sub>4</sub> 造模后 CD68 主要分布在纤维间隔呈强阳性表达; 与正常组相比, 模型组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1、CXCR3 表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 六味地黄丸显著降低 CD68 及促炎症因子、趋化因子的表达 ( $P < 0.01$ )。结论 六味地黄丸对 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化过程中的巨噬细胞激活有显著抑制作用。

**关键词:** 肝纤维化; 六味地黄丸; 巨噬细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2017)01-0065-04

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2016.0065

Liuwei Dihuang Pills Attenuates Liver Fibrosis by Inhibiting Macrophage Activation in CCl<sub>4</sub> Induced Liver Injury

WANG Xue-min, CUI Ya-qin\*, WANG Jing, SHI Bing-ye, LI Xin-ju

(The Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, 071000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the inhibitory effects of Liuwei Dihuang Pills(LWDHP) on macrophages activation in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. **METHODS** C57BL/6 mice were induced liver fibrosis by CCl<sub>4</sub> exposure and administered with LWDHP for 6 weeks simultaneously. Liver tissue was investigated by HE and Sirius red staining.  $\alpha$ -SMA was analyzed by immunofluorescence, qPCR and Western blot. Liver macrophages were observed by immunohistochemistry of CD68. The pro-inflammatory cytokines and chemokine such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCR3 and MCP1 were detected by qPCR or Western blot analysis. **RESULTS** After 6 weeks of CCl<sub>4</sub> administration, the expression of  $\alpha$ -SMA significantly increased, and LWDHP potently inhibited the  $\alpha$ -SMA expression. Immunohistochemistry showed that the expression of CD68 was very weak in normal group, CD68 was distributed mainly between fibrotic septa with strong positive expression in CCl<sub>4</sub> model group; Real-time quantitative PCR showed that TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 and CXCR3 expression significantly increased in model group compared with normal group. Compared with the model group, LWDHP significantly reduced the expression of CD68, inflammatory factors and chemotactic factors. **CONCLUSION** LWDHP shows a potent inhibition of macrophage activation in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis.

**KEY WORDS:** liver fibrosis; Liuwei Dihuang Pills; macrophage

六味地黄丸是中医养阴经典方剂, 肝肾阴虚是肝纤维化基本病机之一<sup>[1]</sup>, 然而, 六味地黄丸抗肝纤维化作用及机制则罕见报道。本研究以六味地黄丸为研究对象, 以 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化小鼠模型为载体, 以巨噬细胞激活为研究的切入点, 解析六味地黄丸对 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化巨噬细胞激活的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

C57BL/6 小鼠 24 只, 清洁级, 体质量 (18 ± 2) g, 购自河北省实验动物中心, 许可证号: SCXK(冀) 1400311。河北大学医学实验中心饲养, 自由饮食、造模和观察。

### 1.2 主要试剂和药物

CCl<sub>4</sub> 购自 Sigma; ECL 试剂盒及 NC 转移膜购自 Millipore; 预染蛋白 Marker 购自 New England Biolabs; Trizol、High-Capacity cDNA 反转录试剂

收稿日期: 2015-09-07; 修稿日期: 2016-01-21

基金项目: 河北大学附属医院课题(2014YJ016)

作者简介: 王学敏(1980-), 女, 河北保定人, 河北大学附属医院副主任医师。\* 通信作者: yaqincui1980@163.com

盒及 SYBR 荧光染料均购自 Life technology; SABC 试剂盒购自武汉博士德; Tris、SDS 等化学试剂均购自 AMRESCO; 六味地黄丸购自宛西制药, 批号: 2014021; 所用抗体如下:  $\alpha$ -SMA (Epitomics, 1184-1, 1: 400)、CD68 (Abcam, Ab955, 1: 100)、MCP-1 (Abcam, Ab7202, 1: 100)、CXCR3 (Santa Cruz, Sc-137140, 1: 100)、GAPDH (Kangchen, KC-5G4, 1: 5 000)。

### 1.3 方法

1.3.1 肝纤维化模型的制备 50% 的  $\text{CCl}_4$  玉米油溶液 1 mL/kg 剂量腹腔注射, 每周 3 次, 共 6 周<sup>[2]</sup>。  
1.3.2 分组与给药 造模开始小鼠随机分为正常组和  $\text{CCl}_4$  组, 正常组小鼠腹腔注射等量的玉米油。 $\text{CCl}_4$  组又随机分为模型组和六味地黄丸 (LWDHP) 组, LWDHP 组给予 70 kg 成人体质量 10 倍量 (0.617 1 g/kg) 灌胃给药, 模型组小鼠给予等量的生

理盐水灌胃。

### 1.4 观测指标

1.4.1 天狼星红染色观察肝脏组织学变化 常规脱蜡至水, 去离子水洗 3 遍, 每遍 2~3 min。滴加天狼星红染液-37 °C 孵育 25 min, 无水乙醇脱色, 二甲苯 1 min, 镜验, 封片。

1.4.2 肝组织 qPCR 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、CXCR3、MCP1 mRNA 表达 Trizol 法抽提肝脏总 RNA, 测 RNA 浓度, 统一稀释 RNA 浓度至 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 样本上样量 2  $\mu\text{g}$ , 随机引物法进行逆转录, 逆转录产物 10 倍稀释后进行 PCR 检测, 两步法 PCR 扩增, 95 °C 预变性 10 s, PCR 反应, 40 个循环, 95 °C, 5 s, 60 °C 20 s, 以 18 s 作为参照基因。采用双 delta Ct 法分析结果, 最终结果以正常组作对照。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	上游引物	下游引物
18S rRNA	5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
TNF- $\alpha$	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'
CXCR3	5'-TCTCGTTTTCCCATATAATCG-3'	5'-AGCCAAGCCATGTACCTTGA-3'
IL-1 $\beta$	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3'	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
MCP1	5'-AGGTGTCCCAAAGAAGCTGTA-3'	5'-ATGTCTGGACCCATTCTTCT-3'
$\alpha$ -SMA	5'-CGAGAGGACGTTGTTAGCATAGAG-3'	5'-GGGCATCCACGAAACCA-3'

1.4.3 免疫荧光染色检测  $\alpha$ -SMA 石蜡切片脱蜡至水, 柠檬酸钠微波修复, PBS 洗; 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  灭活内源性过氧化物酶, 5% BSA 封闭 30 min, 滴加一抗, 加 FITC 标记的绿色二抗, 37 °C 孵育 40 min, 封片, 镜验。

1.4.4 SABC 免疫组化检测 CD68 石蜡切片常规脱蜡至水, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , PBS 室温 5 min, 微波热修复, 一抗 37 °C 孵育 1 h, 辣根过氧化物酶标记的第二抗体 37 °C 孵育 30 min, SABC 37 °C 孵育 20 min、轻洗, DAB 显色, 苏木素复染, 封片。

1.4.5 Western blot 法检测肝组织  $\alpha$ -SMA、MCP1 以及 CXCR3 蛋白表达 匀浆肝组织提蛋白, 考马斯亮蓝检测蛋白浓度, 根据分子量制备 15% 或 12% 分离胶, 每泳道蛋白量为 50  $\mu\text{g}$ , SDS-PAGE 电泳。根据分子量确定半干转时间把蛋白转到 NC 膜上后封闭, 一抗 4 °C 过夜, 回收一抗, 加上相应的二抗置于摇床, 室温轻轻混匀孵育 1 h, 滴加 ECL 后混匀, 1 min 后置暗室、根据条带的荧光强度确定曝光时间。

### 1.5 统计学分析

计量资料以 SPSS11.5 中的 ANOVA 程序进行

单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝组织病理学

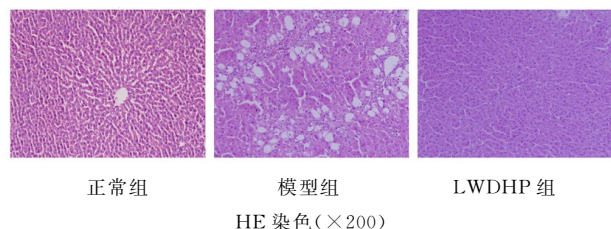
HE 染色: 正常小鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞索由中央静脉向四周放射排列, 中央静脉、汇管区动、静脉和胆管结构正常, 肝窦不扩张。造模 6 周, 正常肝小叶结构完全被破坏, 肝细胞脂肪变明显, 大量的纤维结缔组织增生, 形成大小不一的典型的假小叶结构, 间隔内可见大量的成纤维细胞和炎性细胞浸润, 胆管损害严重。结果见图 1。

天狼星红染色: 正常肝组织仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维。造模 6 周弥漫性增生的胶原纤维分割肝小叶形成较粗大的完全间隔, 肝小叶结构异常, 形成假小叶, 与模型对照组比较, LWDHP 组的胶原纤维增生显著减轻, 纤维间隔窄、疏松而不连续。结果见图 1。

### 2.2 肝组织 $\alpha$ -SMA 蛋白表达变化

免疫荧光结果显示  $\alpha$ -SMA 在正常小鼠血管内皮有表达; 造模 6 周小鼠的肝组织纤维间隔内表达和肝窦壁可见大量表达。qPCR 结果显示, 造模 6

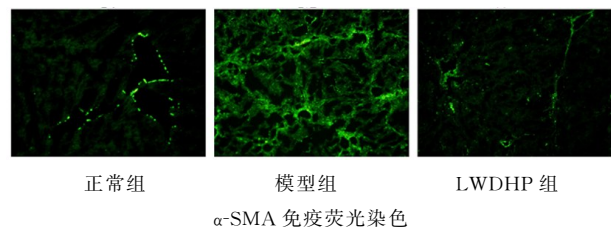
周,α-SMA 表达显著升高至正常组的 4 倍,六味地黄丸显著抑制 α-SMA mRNA 表达 ( $P < 0.01$ ); Western blot 法结果的变化趋势一致;与模型组比较,LWDHP 组 α-SMA 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.01$ )。结果见图 2。



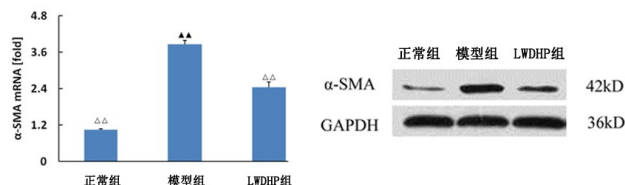
正常组 模型组 LWDHP 组  
HE 染色(×200)

正常组 模型组 LWDHP 组  
天狼星红染色(×100)

图 1 肝组织病理染色



正常组 模型组 LWDHP 组  
α-SMA 免疫荧光染色

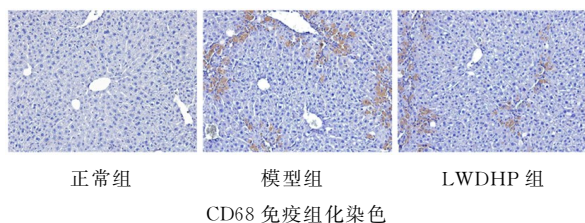


注:与正常组比较,△△ $P < 0.01$ ;与模型组相比,▲▲ $P < 0.01$ 。

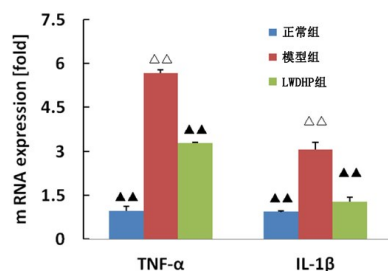
图 2 六味地黄丸对 α-SMA 抑制作用

### 2.3 肝组织 CD68 以及 TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达变化

正常小鼠 CD68 在肝窦弱阳性表达,造模 6 周小鼠肝组织 CD68 表达显著增强,主要分布在纤维间隔;qPCR 结果显示,TNF-α 表达较低,造模 6 周后 TNF-α 表达显著增强 ( $P < 0.01$ ),六味地黄丸处理后,TNF-α 表达显著下调 ( $P < 0.01$ )。IL-1β 基因表达与 TNF-α 表达结果一致。结果见图 3。



正常组 模型组 LWDHP 组  
CD68 免疫组化染色

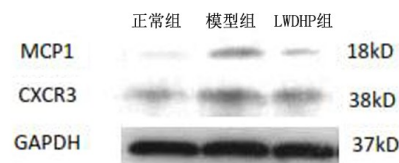
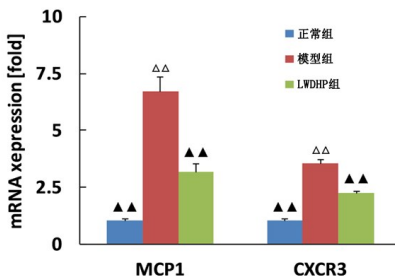


注:与正常组比较,△△ $P < 0.01$ ;与模型组比较,▲▲ $P < 0.01$ 。

图 3 六味地黄丸对巨噬细胞激活抑制作用

### 2.4 肝组织 MCP1 和 CXCR3 表达变化

qPCR 结果显示,造模 6 周 MCP1 和 CXCR3 表达显著升高 ( $P < 0.01$ ),分别升高 6.7 倍和 3.1 倍。六味地黄丸显著降低 MCP1 和 CXCR3 的 mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )。MCP1 和 CXCR3 蛋白表达与 mRNA 表达基本一致。结果见图 4。



注:与正常组比较,△△ $P < 0.01$ ;与模型组比较,▲▲ $P < 0.01$ 。

图 4 六味地黄丸对趋化因子抑制作用

## 3 讨论

CCl<sub>4</sub>是广泛使用的制备化学性肝纤维化模型的试剂。该模型具有稳定、容易复制、造模周期短等优点<sup>[3]</sup>。CCl<sub>4</sub>在肝细胞内质网中,经肝内的细胞色素激活后代谢产生的自由基可直接损伤质膜,启动脂质过氧化作用及炎症反应。炎症反应所产生的炎症因子刺激肝星状细胞激活,激活的肝星状细胞分泌细胞外基质,胞外基质合成和降解失衡,造成肝纤维化。由此可见,炎症反应是 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化模型的重要病理机制<sup>[4]</sup>。本实验采用 CCl<sub>4</sub> 腹腔注射 6 周诱导小鼠肝纤维化模型,造模 6 周正常肝小叶结构消失,增生的纤维包绕肝小叶,形成假小叶,提示造模成功。

六味地黄丸始见于宋代钱乙的《小儿药证直

诀》，由熟地黄、山茱萸、干山药、泽泻、茯苓、丹皮组成。前期结果表明六味地黄丸对单侧输尿管结扎诱导的肾纤维化具有较好的疗效，提示六味地黄丸对纤维化病变具有一定作用<sup>[5]</sup>。基于此，本课题组进一步利用 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化模型，探讨六味地黄丸的疗效，结果表明：六味地黄丸可显著抑制 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化形成。

巨噬细胞激活是肝纤维化形成的重要病理因素<sup>[6]</sup>，激活的巨噬细胞分泌大量的促炎症因子，炎症因子经过旁分泌途径刺激肝星状细胞，星状细胞激活后分泌胶原，形成纤维化<sup>[7]</sup>，故而，研究巨噬细胞激活具有重要病理意义。CD68 免疫组化结果显示在正常组表达呈弱阳性，而造模 6 周后，CD68 在纤维间隔呈强阳性表达，提示巨噬细胞充分激活。激活的巨噬细胞一个重要的功能就是分泌促炎症因子，本文接着对 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  进行检测，发现在正常组表达较低，而 CCl<sub>4</sub> 造模 6 周显著升高，这与 CD68 表达一致。六味地黄丸可显著抑制这些促炎症因子的表达。这与六味地黄丸可显著抑制 2 型糖尿病促炎症 TNF- $\alpha$  表达作用一致<sup>[8]</sup>；促炎症因子表达升高，进一步刺激肝星状细胞的激活。趋化因子是招募巨噬细胞聚集的重要因子，结果显示造模 6 周，MCP1 和 CXCR3 趋化因子显著升高，一方面提示巨噬细胞激活分泌大量趋化因子，另一方面趋化因子又招募更多的巨噬细胞刺激肝星状细胞激活，激活的巨噬细胞和星状细胞相互作用，促进肝纤维化的发展。

本文采用六味地黄丸对 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化进行干预治疗，结果表明六味地黄丸显著抑制肝纤维化形成，进一步的机制表明：六味地黄丸有效干预作用可能通过抑制巨噬细胞激活实现，为六味地黄丸用于肝纤维化临床应用提供基础依据。

#### 参考文献：

[1] 慕永平, 刘平, 刘莺, 等. 下瘀血汤对进展期大鼠肝纤维化的抑制

作用及其方证探讨[J]. 中医杂志, 2006, 47(3): 215-218.

MU YP, LIU P, LIU Y, et al. Inhibiting action of xiayuxue decoction on hepatic fibrosis at progressive stage in rats and study on the prescription and syndrome[J]. J Tradit Chin Med, 2006, 47(3): 215-218.

[2] ZHANG LJ, SUN MY, NING BB, et al. Xiayuxue Decoction (下瘀血汤) attenuates hepatic stellate cell activation and sinusoidal endothelium defenestration in CCl<sub>4</sub>-induced fibrotic liver of mice[J]. Chin J Integr Med, 2014, 20(7): 516-523.

[3] DENG YR, MA HD, TSUNAYAMA K, et al. STAT3-mediated attenuation of CCl<sub>4</sub>-induced mouse liver fibrosis by the protein kinase inhibitor sorafenib[J]. J Autoimmun, 2013, 46: 25-34.

[4] KOIKE K, UEDA S, YAMAGISHI S, et al. Protective role of JAK/STAT signaling against renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction[J]. Clin Immunol, 2014, 150(1): 78-87.

[5] 王学敏, 崔亚钦, 王静, 等. 六味地黄丸抑制巨噬细胞激活抗肾纤维化实验研究[J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31(4): 353-356.

WANG XM, CUI YQ, WANG J, et al. An experimental study of liuwei Dihuang Wan on inhibition of macrophage activation against renal fibrosis[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2015, 31(4): 353-356.

[6] LIU C, TAO Q, SUN M, et al. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats[J]. Lab Invest, 2010, 90(12): 1805-1816.

[7] 杜静静, 黄平. 六味地黄丸对 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达水平的影响及糖尿病肾病大鼠肾脏的保护机制研究[J]. 现代中医药, 2014, 34(1): 74-77.

DU JJ, HUANG P. Study of Liuwei Dihuang Pill protection mechanism of kidney expression levels and diabetic nephropathy rats on TNF- $\alpha$ , IL-6[J]. Mod Tradit Chin Med, 2014, 34(1): 74-77.

[8] 翁立元. 关于六味地黄丸加减治疗糖尿病的探究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4): 874-875.

WENG LY. Research of a medicamentum diversified from Liuwei Dihuang Wan for the treatment of diabetes[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2013, 24(4): 874-875.

(编辑: 杨巍敏)