

# 芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠Ang-1、Ang-2/Tie-2的影响

刘绍能, 时磊, 李敏, 吕鑫霞, 阚杰, 马继征, 陈兰羽

刘绍能, 时磊, 李敏, 吕鑫霞, 阚杰, 马继征, 陈兰羽, 中国中医科学院广安门医院 北京市 100053

北京市自然科学基金资助项目, No. 7072068

作者贡献分布: 此课题由刘绍能与陈兰羽设计; 研究过程由李敏、吕鑫霞、时磊、阚杰及马继征操作完成; 研究用新试剂及分析工具由李敏提供; 数据分析由时磊完成; 本论文写作由刘绍能、李敏及时磊完成。

通讯作者: 刘绍能, 主任医师, 100053, 北京市, 中国中医科学院广安门医院. liushaoneng886@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-06-10 修回日期: 2009-07-30

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-28

## Effects of Qizhu granules on Ang-1, Ang-2/Tie-2 signal transduction pathways in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis rats

Shao-Neng Liu, Lei Shi, Min Li, Xin-Xia Lv, Jie Kan, Ji-Zheng Ma, Lan-Yu Chen

Shao-Neng Liu, Lei Shi, Min Li, Xin-Xia Lv, Jie Kan, Ji-Zheng Ma, Lan-Yu Chen, Guanganmen Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Supported by: the Beijing Municipal Natural Science Foundation, No. 7072068

Correspondence to: Shao-Neng Liu, Guanganmen Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China. liushaoneng886@yahoo.com.cn

Received: 2009-06-10 Revised: 2009-07-30

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-28

## Abstract

**AIM:** To observe the effects of Qizhu granules on Angiopoietin-1, Angiopoietin-2/Tie-2 signal transduction pathways in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis rats.

**METHODS:** The rats were randomly divided into blank, model, Qizhu granules and tablet of compound Biejia ruangan groups. Liver fibrosis rat models were replicated by CCl<sub>4</sub>, Qizhu granules and tablets of compound Biejia ruangan were given. And 4 weeks later, liver tissues of each rat were collected and the expression quantity of Angiopoietin-1 mRNA, Angiopoietin-2 mRNA and Tie-2 mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR.

**RESULTS:** The Ang-1 mRNA expression quantity of Qizhu granules was obviously lower than

that of the model group ( $0.32 \pm 0.11$  vs  $0.66 \pm 0.80$ ,  $P < 0.01$ ). The Ang-2 mRNA expression quantity was higher than that of the model group ( $0.27 \pm 0.34$  vs  $0.09 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expression quantity of Ang-1 mRNA, Ang-2 mRNA and Tie-2 mRNA between groups of Qizhu granules and compound Biejia ruangan.

**CONCLUSION:** Qizhu granules can alleviate liver fibrosis by intervening liver sinusoidal capillarization, and one of its mechanisms is to regulate the expression of Angiopoietin-1 mRNA, Angiopoietin-2 mRNA and Tie-2 mRNA.

**Key Words:** Qizhu granules; Angiopoietin-1; Angiopoietin-2; Soluble tyrosine kinase receptor-2; liver sinusoidal capillarization

Liu SN, Shi L, Li M, Lv XX, Kan J, Ma JZ, Chen LY. Effects of Qizhu granules on Ang-1, Ang-2/Tie-2 signal transduction pathways in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2495-2498

## 摘要

**目的:** 观察芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠肝组织Ang-1、Ang-2/Tie-2的影响。

**方法:** 应用CCl<sub>4</sub>复制大鼠肝纤维化模型, 同时给予芪术颗粒灌胃预防, 并设立空白对照组、模型对照组、鳖甲软肝片对照组, 分别于造模4 wk后取大鼠肝组织, 实时荧光定量PCR方法检测Ang-1、Ang-2/Tie-2 mRNA的表达量。

**结果:** 芪术颗粒组Ang-1 mRNA表达量明显低于模型组( $0.32 \pm 0.11$  vs  $0.66 \pm 0.80$ ,  $P < 0.01$ ), 而Ang-2 mRNA的表达量明显高于模型组( $0.27 \pm 0.34$  vs  $0.09 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。芪术颗粒组和鳖甲软肝片组比较, 二者对Ang-1、Ang-2及Tie-2 mRNA表达的影响无显著差异。

**结论:** 芪术颗粒通过调控Ang-1、Ang-2/Tie-2 mRNA的表达, 阻断肝窦毛细血管化的形成以减少肝纤维化的产生。

**关键词:** 芪术颗粒; 血管生成素-1; 血管生成素-2;

## ■背景资料

芪术颗粒由黄芪、莪术、丹参、柴胡等药物组成, 具有益气活血、化瘀通络之功效, 曾列为国家“九五”、“十五”攻关项目。临床与实验均证实了该药有很好的抗肝纤维化作用。本实验在前期研究的基础上, 运用RT-PCR法研究芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠Ang-1、Ang-2/Tie-2的影响, 以进一步阐明芪术颗粒抗肝纤维化的作用机制。

## ■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科; 党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

## ■研发前沿

肝窦毛细血管化对肝星状细胞活化、细胞外基质异常沉积均有着重要影响,是肝纤维化发生发展过程中的一个关键病理改变。

## 可溶性酪氨酸激酶受体-2; 肝窦毛细血管化

刘绍能, 时磊, 李敏, 吕鑫霞, 阙杰, 马继征, 陈兰羽. 芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠Ang-1、Ang-2/Tie-2的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2495-2498

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2495.asp>

## 0 引言

芪术颗粒是我院治疗肝纤维化的有效药物, 临床应用已有30余年. 以往实验研究证实, 该药对肝纤维化模型大鼠有良好的防治效果<sup>[1-3]</sup>. 在此基础上, 我们观察了芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠肝组织血管生成素-1、2/可溶性酪氨酸激酶受体-2(angiotensin 1, 2/soluble tyrosine kinase receptor-2, Ang1、2/Tie-2)的影响, 以进一步阐明该药治疗肝纤维化的作用机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠, 40只, 清洁II级, 体重150±20 g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 本院II级动物房饲养, 饲以标准的大鼠合成饲料, 自由饮用大鼠专用无菌水, 环境温度20±2℃, 相对湿度36%; 芪术颗粒由本院制剂室提供, 批号: 20080121; 复方鳖甲软肝片, 内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司生产, 批号: 20081001; CCl<sub>4</sub>: 分析纯, 由国药集团化学试剂有限公司提供, 批号: 20080522; 橄榄油: 分析纯, 北京化学试剂公司, 批号: 20080322. TRIzol(购自Invitrogen公司); 反转录试剂盒(购自Fermentas公司). PCR仪, 型号: GeneAmp 5700 Taq MAN, 美国Applied Biosystems公司生产; 凝胶图像分析仪, 型号: ImageMaster VDS, 美国Pharmacia Biotech公司生产; 高速冷冻离心机, 型号: Allagra.21R Centrifuge, 德国Beckman公司生产; 紫外线分光光度计, 型号: DU640, 德国Beckman公司生产; OYY-III-5型电泳仪, 北京六一仪器厂生产.

### 1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 大鼠随机分为空白对照、模型对照、芪术颗粒及鳖甲软肝片组, 每组10只, 并作相应造模处理. 其中空白对照组大鼠同等条件下饲养, 不造模. 模型对照、芪术颗粒及鳖甲软肝片组大鼠均使用10% CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液按3 mL/kg剂量腹腔注射, 每周2次, 共4 wk, 复制肝纤维化进展期模型.

1.2.2 给药: 造模同时各组按以下要求给药: 空白对照组: 同等条件下饲养, 不灌胃. 模型对照组:

等量大鼠专用无菌水灌胃, 灌胃剂量1 mL/100 g, 每天灌胃1次. 芪术颗粒组: 予芪术颗粒灌胃, 给药量为2 g/(kg·d), 每天灌胃1次. 复方鳖甲软肝片对照组: 予复方鳖甲软肝片灌胃, 灌胃剂量为0.7 g/(kg·d), 每天灌胃1次. 同时, 各组每周称体质量1次, 依体质量调整灌胃及造模药物剂量.

1.2.3 取材: 实验第4周, 处死各组大鼠, 取新鲜肝组织, 置于-80℃液氮中保存, 供实时荧光定量PCR检测用.

1.2.4 Ang-1、Ang-2/Tie-2检测: 取50-100 mg的标本应用TRIzol Reagent试剂盒, 按说明书要求提取总RNA, 测吸光度(A值)定量RNA浓度后, 置于-80℃冰箱保存待用. 20 μL反转录反应体系中经特异性下游引物反转录成cDNA后, 用EASY Dilution将cDNA液按10<sup>0</sup>、10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>梯度稀释, 各取2.0 μL稀释好的cDNA进行RT-PCR反应, 检测发现目的基因的扩增效率和管家基因的扩增效率一致, 可应用ΔΔCt方法进行相对定量.

取5.0 μg总RNA依照Revert Aid TM First Strand cDNA Synthesis Kit说明书合成cDNA. 之后, 取2.0 μL cDNA依照SYBR Green PCR Master Mix说明书要求进行PCR检测, 引物采用Primer Premier 5.0设计, 由赛百盛公司合成. β-actin(263 bp): 上游: 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3', 下游: 5'-AAT GTC ACG CAC GAT TTC CC-3'. Ang-1(256 bp): 上游: 5'-CTC CGT AAG GGC TTC CAT-3', 下游: 5'-CTG CGT CCT CTG TTG TCG-3'. Ang-2(329 bp): 上游: 5'-CAA GAC GGA ACA ACG AAC-3', 下游: 5'-CAC CGC TAA CCA ACC AAA-3'. Tie-2: (337 bp): 上游: 5'-ATG GAC TCT TTA GCC GGC TTA-3', 下游: 5'-CCT TAT AGC CTG TCC TCG AA-3'. 反转录条件: 42℃温浴60 min, 70℃温浴10 min. PCR循环参数: 95.0℃ 10 min, 1个循环; 95.0℃ 25 s、55.0℃ 25 s、72.0℃ 50 s, 40个循环; 72.0℃ 5 min, 1个循环.

1.2.5 定量分析: 以上反应设定均在与PCR仪相连的计算机上进行, 每个循环电脑自动记录反应管中的荧光信号值, 并描绘曲线. 反应结束由PE 5700软件分析结果, 自动计算定量数值. 定量结果:  $r < -0.980$ , 否则定量结果无效. 以达到阈值的最低循环数(Ct值)计算样本中mRNA拷贝数相对量. 每个样本的Ct值由目的基因和管家基因决定, 即 $\Delta Ct(\text{目的基因}) = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{管家基因})$ ,  $\Delta\Delta Ct(\text{目的基因}) = \Delta Ct(\text{目的基因}) - \Delta Ct(\text{标$

## ■相关报道

Ohmori *et al*认为肝纤维化过程中血管化程度明显加重, 且Kimura *et al*通过研究证实, Angs/Tie-2受体系统在部分肝切除后肝血窦的重建及大鼠肝坏死区域肝窦毛细血管化的形成中起重要作用.

表1 肝组织Ang-1、Ang-2/Tie-2 mRNA相对拷贝量比较 ( $n=10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	Ang-1	Ang-2	Tie-2
空白对照组	0.01 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.22
模型对照组	0.66 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>	0.09 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.08
芪术颗粒组	0.32 $\pm$ 0.11 <sup>bd</sup>	0.27 $\pm$ 0.34 <sup>bc</sup>	0.24 $\pm$ 0.21
鳖甲软肝片组	0.37 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>ac</sup>	0.28 $\pm$ 0.66

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 空白对照组; <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 模型对照组。

准值)。样品中目的基因的相对拷贝量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

**统计学处理** 采用SPSS13.0软件进行统计处理, 结果用mean  $\pm$  SD表示, 多组均数比较采用单因素方差分析。组间各指标mRNA表达量比较采用LSD检验,  $P<0.05$ 表示存在统计学意义。

## 2 结果

模型组Ang-1 mRNA表达量较空白对照组明显增加( $P<0.01$ , 表1, 图1), 而Tie-2、Ang-2 mRNA的表达量有所增加, 但无统计学意义( $P>0.05$ , 表1, 图2)。芪术颗粒组Ang-1 mRNA表达量明显低于模型组, 而Ang-2 mRNA的表达量明显高于模型组( $P<0.05$ , 表1, 图2)。芪术颗粒组和鳖甲软肝片组比较, 二者对Ang-1、Ang-2及Tie-2 mRNA表达的影响无显著差异(表1, 图1-2)。

## 3 讨论

肝窦毛细血管化在肝纤维化的发展过程中起着重要作用。目前已有文献报道, 肝纤维化过程中血管化程度明显加重<sup>[4-5]</sup>, 且通过使用血管生成抑制剂, 可实现实验动物的肝纤维化逆转。肝窦毛细血管化直接阻碍了肝细胞与血液之间氧和营养物质的交换, 引起肝窦塌陷和肝细胞萎缩、坏死, 从而加速肝纤维化的进程并促使其向肝硬化转变<sup>[6]</sup>, 因此, 肝窦毛细血管化的逆转是关系到肝纤维化能否逆转的重大问题。

Angs家族对于血管生成、成熟、重塑和维持起着重要作用。Angs是一组分泌型的细胞因子, 包括Ang-1、2、3、4 4位成员, 其中Ang-1、2已被证明和血管生成关系密切。Angs/Tie-2系统在早期人胚肝发育过程中对肝窦等有着重要的影响作用, 主要是通过对肝窦内皮细胞的作用来促进血管的形成和肝脏的发育<sup>[7]</sup>。Kimura *et al*<sup>[8]</sup>通过研究证实, Angs/Tie2受体系统在部分肝切除后肝血窦的重建及大鼠肝坏死区域肝窦

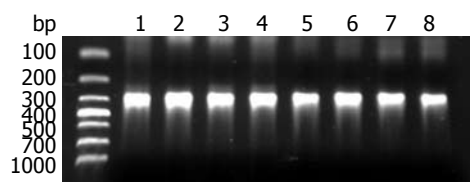


图1  $\beta$ -actin、Ang-1 mRNA的RT-PCR产物电泳结果。1-4:  $\beta$ -actin(263 bp)的表达; 1: 空白组; 2: 模型组; 3: 芪术颗粒组; 4: 鳖甲软肝片组; 5-8: Ang-1 mRNA(256 bp)的表达; 5: 空白组; 6: 模型组; 7: 芪术颗粒组; 8: 鳖甲软肝片组。

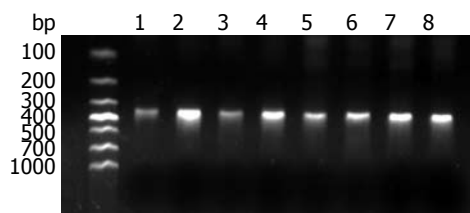


图2 Tie-2及Ang-2 mRNA的RT-PCR产物电泳结果。1-4: Tie-2(337 bp)的表达; 1: 空白组; 2: 模型组; 3: 芪术颗粒组; 4: 鳖甲软肝片组; 5-8: Ang-2 mRNA(329 bp)的表达; 5: 空白组; 6: 模型组; 7: 芪术颗粒组; 8: 鳖甲软肝片组。

毛细血管化的形成中起重要作用, 同时研究发现, CCl<sub>4</sub>肝损伤的大鼠, 其肝组织Ang-1 mRNA的表达较正常大鼠增加10倍。Ishikawa *et al*<sup>[9]</sup>研究认为, 肝窦毛细血管化发生是通过坏死区域的血管内皮细胞与活化的肝星状细胞的相互作用而形成, 而活化的肝星状细胞可表达Angs。所以, Angs/Tie-2受体系统在肝窦毛细血管化中起着重要的作用。Ang-1主要由血管旁支持细胞包括周细胞、血管平滑肌细胞等合成, 通过旁分泌作用, 与附近内皮细胞膜上的Tie-2受体特异性结合, 引起其受体磷酸化和随后的信号传递, 从而抑制内皮细胞凋亡, 减少血管的萎缩和退化。而Ang-2作为Ang-1的拮抗剂则可以促进新生血管的消退<sup>[10-12]</sup>。

芪术颗粒由黄芪、莪术、丹参、柴胡等药物组成, 具有益气活血、化瘀通络之功效, 主要用于肝纤维化的治疗。从本研究结果来看, 芪术颗粒干预后的大鼠, 肝组织Ang-1、Tie-2 mRNA的表达量较模型组明显减少, 而Ang-2 mRNA的表达量相对较多, 这有利于减少新生血管的形成。由此我们可以推断, 芪术颗粒可通过调控Ang-1、Ang-2/Tie-2 mRNA的表达, 阻断肝窦毛细血管化的形成以减少肝纤维化的产生。

## 4 参考文献

- 刘绍能, 姚乃礼, 殷海波, 王勒渝, 解荣庆. 芪术颗粒对I、Ⅲ、Ⅳ型胶原影响的免疫组化研究. 中药药理与

### ■应用要点

芪术颗粒通过调控Ang-1、Ang-2/Tie-2 mRNA的表达, 阻断肝窦毛细血管化的形成以减少肝纤维化的产生。

### ■名词解释

肝窦毛细血管化: 胶原在狄氏间隙和肝静脉根部、中央静脉沉积, 将有许多窦孔高通过性的肝窦变为与其他器官内一样的连续毛细血管床的病理改变过程。

## ■同行评价

本研究设计比较合理,结果可靠,研究内容具有实际意义.

- 2 刘绍能,姚乃礼,殷海波,王勒渝,解荣庆. 芪术颗粒对大鼠肝纤维化模型TGF- $\beta$ 1、EGF表达的影响. 中药药理与临床 2001; 17: 24-25
- 3 刘绍能,姚乃礼,殷海波. 芪术颗粒对大鼠肝纤维化模型的治疗作用. 中药新药与临床药理 2002; 13: 216-218
- 4 Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, Sakai T, Fujikawa K, Wagayama H, Takase K, Nakano T. High expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated chronic liver diseases. *Hum Pathol* 2001; 32: 1363-1370
- 5 Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35: 1010-1021
- 6 张永,韩宁,尹常健. 柔肝抑纤饮抗DMN肝纤维化大鼠肝窦毛细血管化的实验研究. 中华中医药学刊 2009; 27: 97-99
- 7 姜红心,魏志新,齐安东,李翠花,王簪,李磊. VEGF和Angiopoietin家族在早期人胚肝发育过程中的作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 336-340
- 8 Kimura H, Mochida S, Inao M, Matsui A, Fujiwara K. Angiopoietin/tie receptors system may play a role during reconstruction and capillarization of the hepatic sinusoids after partial hepatectomy and liver necrosis in rats. *Hepatol Res* 2004; 29: 51-59
- 9 Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, Shibuya M, Fujiwara K. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 587-593
- 10 Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998; 83: 233-240
- 11 王彪,鲁开化,赵亚南,庄福连,林文雄. Ang/Tie2体系与VEGF、bFGF在血管瘤增生退化过程中的协同作用. 中国美容医学 2006; 15: 1227-1230
- 12 van der Heijden M, van Nieuw Amerongen GP, Chedamni S, van Hinsbergh VW, Johan Groeneveld AB. The angiopoietin-Tie2 system as a therapeutic target in sepsis and acute lung injury. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13: 39-53

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology)》,是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志,旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章,使其成为一种公众资源,同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文,了解其领域的所有的关键的进展,更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务,为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

除了公开存取之外,《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾,即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲,包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价.

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤,食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学,以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术.

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章,为内科学、外科学、感染病学、中医中药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台,更新知识,为患者康复服务. (科学编辑:李军亮 2009-08-28)