

# 芪术颗粒对大鼠肝纤维化形成过程中VEGF表达的影响

时磊, 刘绍能, 李敏, 吕鑫霞, 阚杰, 马继征, 陈兰羽

时磊, 刘绍能, 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

时磊, 硕士, 主要从事肝病中医药防治研究.

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; 研究过程由时磊、李敏、吕鑫霞、阚杰及马继征操作完成; 研究所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、时磊及李敏完成.

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

电话: 010-88001136

收稿日期: 2009-10-31 修回日期: 2009-11-20

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

## Qizhu Granules downregulate the expression of vascular endothelial growth factor in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats

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

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

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

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

Received: 2009-10-31 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

## Abstract

**AIM:** To observe the effects of Qizhu Granules on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver fibrosis in rats.

**METHODS:** Rats were randomized into normal control group, model control group, Qizhu Granule treatment group and Compound Biejia Ruangan Tablet treatment group. After liver fibrosis was induced in rats by intraperitoneal injection of CCl<sub>4</sub>, Qizhu Granules and Compound Biejia Ruangan Tablets were given. Liver tissue samples were taken on days 1, 2 and 3 and at weeks 1, 2, 4, 8 and 12 for real-time fluorescence quantitative PCR detection of the expression of

VEGF mRNA.

**RESULTS:** The expression levels of VEGF mRNA in Qizhu Granule treatment group on days 1, 2 and 3 and at weeks 1, 2 and 12 were significantly lower than those in the model control group ( $0.37 \pm 0.33$  vs  $0.48 \pm 0.26$ ,  $0.24 \pm 0.20$  vs  $0.50 \pm 0.65$ ,  $0.36 \pm 0.24$  vs  $0.45 \pm 0.29$ ,  $0.25 \pm 0.14$  vs  $0.48 \pm 0.41$ ,  $0.18 \pm 0.60$  vs  $0.30 \pm 0.30$  and  $0.40 \pm 0.01$  vs  $0.51 \pm 0.74$ ; all  $P < 0.05$  or  $0.01$ ).

**CONCLUSION:** Qizhu Granules can prevent the progression of liver angiogenesis and alleviate liver fibrosis possibly by downregulating the expression of VEGF mRNA in rats.

**Key Words:** Qizhu Granules; Vascular endothelial growth factor; Angiogenesis

Shi L, Liu SN, Li M, Lv XX, Kan J, Ma JZ, Chen LY. Qizhu Granules downregulate the expression of vascular endothelial growth factor in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3675-3678

## 摘要

**目的:** 动态观察芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠肝组织血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响.

**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1、2、3 d及1、2、4、8、12 wk各组取大鼠肝组织. 实时荧光定量PCR方法检测VEGF mRNA的表达.

**结果:** 芪术颗粒组VEGF mRNA表达量在1、2、3 d及1、2、12 wk时较模型组低, 有统计学差异( $0.37 \pm 0.33$  vs  $0.48 \pm 0.26$ ,  $0.24 \pm 0.20$  vs  $0.50 \pm 0.65$ ,  $0.36 \pm 0.24$  vs  $0.45 \pm 0.29$ ,  $0.25 \pm 0.14$  vs  $0.48 \pm 0.41$ ,  $0.18 \pm 0.60$  vs  $0.30 \pm 0.30$ ,  $0.40 \pm 0.01$  vs  $0.51 \pm 0.74$ ,  $P < 0.05$ 或 $0.01$ ).

**结论:** 芪术颗粒可通过下调实验大鼠肝脏VEGF mRNA的表达来抑制肝纤维化的产生.

**关键词:** 芪术颗粒; 血管内皮生长因子; 血管新生

## ■背景资料

肝纤维化是慢性肝病发展至肝硬化的必经病理阶段, 如能对其进行积极有效的干预, 就有可能达到阻断甚至逆转多数慢性肝病向肝硬化发展. 我国传统医学在肝纤维化治疗领域有着显著的优势. 该课题组在前期研究的基础上, 通过运用RT-PCR法检测芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠VEGF表达的影响, 观察芪术颗粒对肝纤维化模型大鼠肝脏血管新生的影响, 以进一步阐明芪术颗粒通络作用的机制.

## ■同行评议者

陆伦根, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化科

## ■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Namisaki *et al*发现VEGF参与了肝纤维化的形成过程,并在肝纤维化向肝硬化的转化过程中起着一定的作用。

时磊, 刘绍能, 李敏, 吕鑫霞, 阚杰, 马继征, 陈兰羽. 芪术颗粒对大鼠肝纤维化形成过程中VEGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3675-3678

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3675.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. 既往的研究已经部分阐明了该药治疗肝纤维化的机制<sup>[1-5]</sup>,在此基础上,我们动态观察芪术颗粒对肝纤维化形成过程中大鼠肝组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的影响,以进一步阐明本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, 320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(Invitrogen); RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas); SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems). PCR仪, 型号: GeneAmp 5700 TaqMAN, 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Backman公司生产; 紫外线分光光度计, 型号: DU640, 德国Backman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80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12 wk, 复制肝纤维化进展期模型. 实验分3批进行。

1.2.2 干预: 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: 予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, 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: 分别在实验1、2、3 d及1、2、4、8、12 wk, 分批处死各组大鼠, 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。

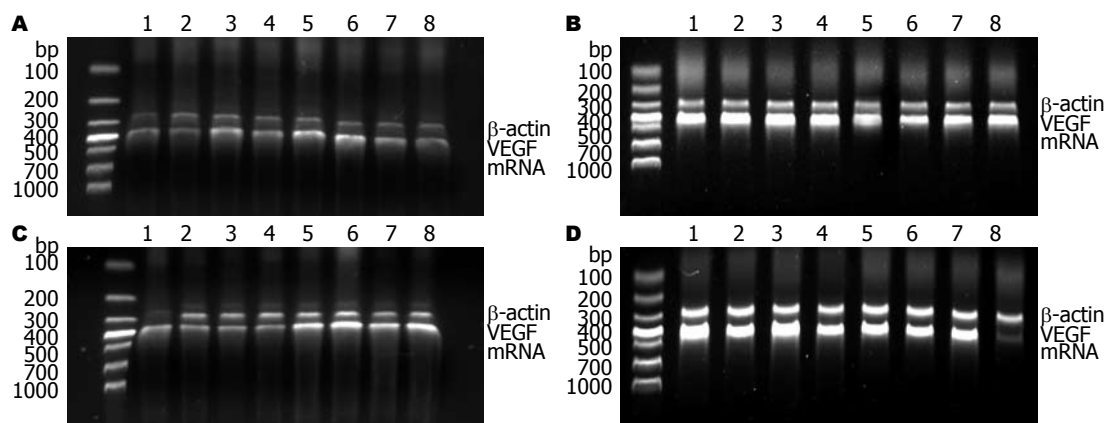
1.2.4 VEGF检测: 取50-100 mg的标本应用TRIzol Reagent试剂盒, 按说明书要求提取总RNA, 测A值以定量RNA浓度后, 置于-80℃冰箱保存待用. 20 μL反转录反应体系中经特异性下游引物反转录成cDNA后, 用EASY Dilution将cDNA液按1、1×10<sup>1</sup>、1×10<sup>2</sup>、1×10<sup>3</sup>梯度稀释后, 各取2 μL稀释好的cDNA进行RT-PCR反应, 检测发现目的基因的扩增效率和管家基因的扩增效率一致, 可应用ΔΔCt方法进行相对定量. 取5.0 μg总RNA依照RevertAid™ First 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PCT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'. VEGF(388 bp): 上游: 5'-GGC TTT GTT CTA TCT TTC TTT G-3', 下游: 5'-ACT GGA CCC TGG CTT TAC T-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。

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±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

在造模后第1天, 造模大鼠肝脏组织VEGF



## ■应用要点

本研究证实, 芪术颗粒可通过下调实验大鼠肝脏 VEGF mRNA 的表达来抑制肝纤维化的产生, 进一步证明传统中医学在肝纤维化治疗领域占有不可缺少的一席之地。

图 1 各组大鼠 VEGF mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图。A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: 芪术颗粒组; D: 鳖甲软肝片组。1: 1 d 组; 2: 2 d 组; 3: 3 d 组; 4: 1 wk 组; 5: 2 wk 组; 6: 4 wk 组; 7: 8 wk 组; 8: 12 wk 组。

表 1 各组大鼠肝组织 VEGF mRNA 的表达 ( $n = 10$ , mean  $\pm$  SD)

时间	空白对照组	模型对照组	芪术颗粒组	鳖甲软肝片组
1 d	0.01 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	0.37 $\pm$ 0.33 <sup>c</sup>	0.34 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>
2 d	0.01 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	0.24 $\pm$ 0.20 <sup>d</sup>	0.42 $\pm$ 0.01
3 d	0.01 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	0.36 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>	0.39 $\pm$ 0.31
1 wk	0.01 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	0.25 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	0.25 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>
2 wk	0.01 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.60 <sup>d</sup>	0.30 $\pm$ 0.81
4 wk	0.01 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.25 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.77
8 wk	0.03 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	0.59 $\pm$ 0.35	0.60 $\pm$ 0.80
12 wk	0.02 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.44 $\pm$ 0.41

<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。

mRNA 的表达量较空白组即有显著增加 ( $P < 0.01$ , 表 1, 图 1A-B)。且在第 4 周之前, 芪术颗粒组大鼠肝脏 VEGF mRNA 的表达量与模型组大鼠之间一直存在显著的差异 ( $P < 0.01$  或  $0.05$ , 表 1, 图 1A-C)。从第 4 周开始芪术颗粒及鳖甲软肝片组大鼠肝组织 VEGF mRNA 表达量与模型组大鼠间差异不再显著 (表 1, 图 1B-D)。芪术颗粒组和鳖甲软肝片组比较, 二者 VEGF mRNA 表达的变化相近, 无显著差异 (表 1, 图 1C-D)。

### 3 讨论

肝脏血管新生是肝损伤后肝纤维化发展过程中的一个重要病理改变。研究发现<sup>[6]</sup>肝脏血管新生对肝脏的再生有着重要的影响, 而在血管新生亦导致了肝窦毛细血管化的发生。研究发现<sup>[7]</sup>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。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>[7-8]</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。因此, 对肝脏损伤后血管新生的调控及肝窦毛细血管化的干预逆转是关系到肝纤维化能否逆转的重大问题。

VEGF 是在 1989 年由 Ferrara *et al* 在牛垂体滤泡星状细胞培养液中得到的一种糖蛋白, 他能够通过增加血管通透性, 刺激血管内皮细胞增殖来促进血管形成, 无论是在胚胎发育等生理状况, 还是在炎症、创伤修复、肿瘤生长等病理情况下, VEGF 对血管的生成均有密切的关系<sup>[8]</sup>。研究证实<sup>[9]</sup>, VEGF 能够通过促进血管的新生, 促进肝部分切除术后肝脏的再生。而在肝纤维化过程中, VEGF 参与了肝纤维化的形成过程, 并且在肝纤维化向肝硬化的转化过程中也起着一定的作用<sup>[10-11]</sup>。本研究也发现, 随着造模时间的延长, 模型对照组大鼠肝脏 VEGF mRNA 的表达量呈现明显的逐步增加趋势, 这也进一步证实了 VEGF 参与了肝脏损伤后血管新生的过程, 同时也会对肝窦毛细血管化的发生发展产生相应的影响作用。本研究还观察到, 第 4 周后 VEGF

## ■同行评价

本文研究了芪术颗粒对大鼠肝纤维化形成过程中VEGF表达的影响,有较好的学术价值和参考意义。

mRNA表达量各组之间的差异不再显著,这可能与肝窦毛细血管化已经形成有关,确切的机制有待今后进一步研究。

芪术颗粒由黄芪、白术、丹参、莪术、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,在2 wk内的各个时间点,芪术颗粒干预后的大鼠,肝组织VEGF mRNA的表达量均较模型组减少,由此我们可以推断,芪术颗粒调控VEGF mRNA的表达是其抗肝纤维化机制之一。

## 4 参考文献

- 1 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. 中药药理与临床 2001; 17: 27-29
- 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的治疗作用. 中药新药与临床药理 2002; 13: 216-218
- 3 刘绍能,王勒渝,殷海波,常志遂,姚乃礼,殷海波,解荣庆,李向红. 芪术颗粒预防肝纤维化作用的实验研究. 中国中医药科技 2000; 7: 303-304
- 4 刘绍能,姚乃礼,殷海波,王勒渝,谢荣庆. 芪术颗粒对

大鼠白蛋白肝纤维化模型的预防作用. 中药药理与临床 2001; 17: 26-27

- 5 刘绍能,时磊,李敏,吕鑫霞,阚杰,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: 2495-2498
- 6 Sato T, El-Assal ON, Ono T, Yamanoi A, Dhar DK, Nagasue N. Sinusoidal endothelial cell proliferation and expression of angiopoietin/Tie family in regenerating rat liver. *J Hepatol* 2001; 34: 690-698
- 7 李健,李澎涛,牛建昭. 酒精性肝病大鼠肝窦病理改变的形态学观察. 北京中医药大学学报 2006; 29: 679-681
- 8 张永,韩宁,尹长健. 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
- 9 Li JL, Harris AL. Crosstalk of VEGF and Notch pathways in tumour angiogenesis: therapeutic implications. *Front Biosci* 2009; 14: 3094-3110
- 10 Namisaki T, Yoshiji H, Kojima H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Sakurai S, Yanase K, Kitade M, Yamazaki M, Asada K, Uemura M, Nakamura M, Fukui H. Salvage effect of the vascular endothelial growth factor on chemically induced acute severe liver injury in rats. *J Hepatol* 2006; 44: 568-575
- 11 郭艳萍,杨广英,王建君,姜黄,李军. 转化生长因子- $\beta$ 1及VEGF在肝纤维化中的表达. 中华实用诊断与治疗杂志 2008; 22: 724-725

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》中文摘要要求

**本刊讯** 本刊中文摘要必须在350字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度,研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征,如研究对象是患者,应阐明其临床表现、诊断标准,如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 $P$ ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值)。(科学编辑:李军亮 2009-12-28)