

虫草菌丝在大鼠肝硬化过程中对 TGF- β_1 和 VEGF 表达影响研究

赵延龙¹ 杨柳明^{1△} 周宇² 孙相钊¹ 罗少媚¹

(1 广东省廉江市人民医院消化内科 广东 廉江 524400 2 广东医学院附属医院消化内科 广东 湛江 524001)

摘要 目的:研究虫草菌丝在大鼠肝硬化中对 TGF- β_1 和 VEGF 的影响,探讨虫草菌丝在大鼠肝硬化治疗中的作用机制。方法:取健康成年雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为 3 组:正常组(A 组)、急性 CCL4 肝硬化模型组(B 组)、虫草菌丝组(C 组),12 周后比较分析 3 组 TGF- β_1 和 VEGF 表达。结果:治疗后,C 组 TGF- β_1 、VEGF 和 B 组比较有统计学意义 ($P<0.05$)。结论:虫草菌丝在大鼠肝硬化治疗中具有明显的效果,可能与抑制 TGF- β_1 和 VEGF 表达有关。

关键词 虫草菌丝;大鼠;肝硬化;血清转化生长因子;血管内皮生长因子

中图分类号 Q95-33 R575.2 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)27-5248-03

Effects of Cordyceps Sinensis Berk. Sacc on Expression of TGF- β_1 and VEGF in Liver Fibrosis

ZHAO Yan-long¹, YANG Liu-ming^{1△}, ZHOU Yu², SUN Xiang-zhao¹, LUO Shao-mei¹

(1 The departments of gastroenterology, People's Hospital of Lianjiang, Lianjiang, 524400, China;

2 The departments of gastroenterology affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong, 524001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of cordyceps sinensis berk. sacc on expression of TGF- β_1 and VEGF in liver fibrosis. **Methods:** Sixty male adult SD rats were randomly divided into three groups (n=20 each), control group (A group), acute CCL4hepatic injury model group (B group), cordyceps sinensis berk. sacc group (C group). The expression of TGF- β_1 and VEGF were evaluated after 12weeks. **Results:** After treatment, the expression of TGF- β_1 and VEGF of B group was higher significantly difference with C group, ($P<0.05$). **Conclusion:** Cordyceps sinensis berk. sacc may alleviate liver fibrosis in rats, it was possibly through decreasing the expression of TGF- β_1 and VEGF.

Key words: Cordyceps sinensis(berk).sacc; SD rats; Liver fibrosis; TGF- β_1 ;VEGF

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, R575.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)27-5248-03

现代医学研究发现虫草菌丝具有缓解肝纤维化过程的作用^[1],但其具体作用机制尚不完全清楚。肝细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度增生、异常沉积是肝硬化的实质,在肝硬化患者血清中 TGF- β_1 和 VEGF 高度表达。本实验应用 CCL4 建立大鼠肝硬化模型,应用虫草菌丝治疗后,检测血清中 TGF- β_1 和 VEGF 的表达以及虫草菌丝对其表达的影响,进一步探讨虫草菌丝对肝硬化的治疗作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物和分组

选取雄性健康成年 SD 大鼠 60 只,清洁级,体重 250~300 g,由广东医学院附属医院实验动物中心提供。随机分为正常组(A 组)、急性 CCL4 肝硬化模型组(B 组)、虫草菌丝组(C 组),每组 20 只。

1.2 动物模型制备

参照郑敏等^[2]的方法制作大鼠肝硬化动物模型,C 组在实验开始时就采用常规水煎发酵虫草菌丝干预治疗^[3],发酵虫草菌丝购自深圳市汇康生物科技有限公司。

12 周后用 2%硫喷妥钠 50 mg/kg 腹腔内注射麻醉^[4],断头

取血后切取部分肝右叶做病理组织学检查。

1.3 检测指标

1.3.1 组织病理学检查 石蜡切片脱蜡至水,蒸馏水清洗,焦油紫染液置于 37℃温箱内浸染 1~3 h,冷却后蒸馏水冲洗,用 95%乙醇迅速分化脱水、透明中性树胶封片。肝纤维化分级^[5] 0 级:正常肝脏;1 级:胶原增多而无间隔形成;2 级:不完全间隔形成;3 级:完全间隔形成(假小叶形成),但间隔较细;4 级:较厚的完全间隔形成,假小叶明显。

1.3.2 TGF- β_1 和 VEGF 用酶联免疫法检测^[6] 喂养 12w 时腹腔麻醉后,断头取血,离心后置血清于 -70℃保存,集中检测 TGF- β_1 和 VEGF。

1.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法,频数资料以频数和%表示,采用卡方检验,等级资料采用非参数秩和 Kruskal-Wallis H 检验, $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 三组肝纤维化程度组织病理学评分比较

A 组 HE 染色显示正常大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列,B 组可见中-重度纤维化,纤

作者简介:赵延龙(1973-),男,硕士,副主任医师,研究方向:炎症性肠病,电话:13367366145 E-mail: 664178651@qq.com

(收稿日期:2012-03-05 接受日期:2012-03-29)

维间隔粗厚,假小叶形成明显,肝细胞不同程度变性坏死,胞质疏松,并有大量透明脂肪液滴分布,肝细胞脂肪变性小叶 2/3 以上,C 组可见轻-中度肝纤维化,纤维间隔不完全形成,可见透明脂肪滴形成,亦可见正常肝组织结构分布。结果表明,C 组较 B 组在肝纤维化等方面有不同程度改善,其组织病理学评分差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组肝纤维化程度治疗前后比较
Table 1 Comparison of liver fibrosis degree of the two groups before and after treatment

组别 Group	例数 Number	0 级 0level	1 级 1level	2 级 2level	3 级 3level	4 级 4level
A 组 A group	20	19	1	0	0	0
B 组 B group	20	0	0	3	7	10
C 组 C group	20	0	4	12	3	1

注:B、C 组治疗后肝纤维化程度比较有统计学意义 ($P<0.05$)。
Note: B, C groups after treating liver fibrosis is statistically significant extent, ($P < 0.05$).

2.2 三组肝纤维化过程中 TGF-β1 和 VEGF 比较
治疗 12w 后,A、B 两组 TGF-β1 和 VEGF 比较有统计学意义 ($P<0.05$);A、C 两组 TGF-β1 和 VEGF 比较有统计学意义 ($P<0.05$);B、C 两组 TGF-β1 和 VEGF 比较有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。

表 2 三组肝纤维化过程中 TGF-β1 和 VEGF 治疗前后比较
Table 2 Comparison of TGF-β 1 and VEGF in the process of liver fibrosis of the three groups before and after treatment

组别 Group	例数 Number	TGF-β1	VEGF
A 组 A group	20	4.92± 0.83	7.34± 1.03
B 组 B group	20	13.03± 1.21	17.4± 1.67
C 组 C group	20	9.14± 1.01	11.36± 1.36

注:A、B、C 三组治疗后肝纤维化程度两两比较均有统计学意义 ($P<0.05$)。
Note: A, B and C three groups after treating liver fibrosis degree is all have two statistical significance, ($P < 0.05$).

3 讨论

虫草菌丝是利用少量的虫草菌丝体,应用现代栽培技术,经人工培养的具有类似冬虫夏草功效的药材^[7]。虽然,没有补肾、抗肿瘤等方面的药用价值,但是现代医学研究发现,其具有很高的抗肝纤维化等功效^[8],其保肝作用机制可能为抑制超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)表达^[9],抑制库普弗细胞、肿瘤坏死因子、肝星状细胞活化^[10],抑制 MMP-2、MMP-4^[11],抑制细胞外基质 ECM 过度增生、异常沉积^[12],减少胶原沉积^[13],抑制肝糖原合成^[14]等有关。

本实验采用 HE 染色观察大鼠肝脏组织切片,实验发现,B 组经 CCL4 损伤,出现中-重度的肝硬化的病理改变,而 C 组在 CCL4 损伤的同时,应用虫草菌丝,虽然较 A 组出现了轻-中度肝硬化表现,但是较 B 组,其肝硬化程度明显减轻,这也就进一步证实了虫草菌丝能减轻 CCL4 所致的肝纤维化损伤,和穆静等^[15]学者研究结论一致。

肝纤维化的实质就是肝细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM)过度增生、异常沉积,最终导致肝脏组织结构或(和)功能异常的病理过程^[16],在肝纤维化过程中,多种细胞因子参与,其中 TGF-β₁ 为最重要因子之一,而且 TGF-β₁ 的表达与肝纤维化程度有密切的关系^[17],本实验中,在 A 组中 TGF-β₁ 呈低表达,而 B 组其表达明显升高,虽然 C 组也较 A 组升高,但和 B 组比较,其表达水平明显降低,与郭艳萍等^[18]结果一致。

血管内皮生长因子(VEGF)是已知的最重要的作用于血管

内皮,促使血管内皮细胞生长的细胞因子,在血管再生过程中发挥重要作用^[19]。本实验中,B 组随着肝纤维化的加重,其表达明显增高,而 C 组,表达水平仅较正常组 A 组增高,这和李树龙等人的结果一致^[20]。其发生的机制可能为:肝纤维化过程中,局部病变肝组织存在不同程度的缺血、缺氧,从而刺激、活化肝星状细胞,并且通过自分泌、旁分泌等途径释放多种细胞因子,这其中就包括 VEGF。

因此,通过本实验,我们认为虫草菌丝能有效减轻大鼠肝纤维化过程,其作用机制可能通过抑制 TGF-β₁ 和 VEGF 表达有关。

参 考 文 献(References)

[1] 李风华,刘平,熊伟国,等.冬虫草菌丝对二甲亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化的作用[J].中西医结合学报,2006,4(5):514
Li Feng-hua, Liu Ping, Xiong Wei-guo, et al. Effects of Cordyceps sinensis on dimethylnitrosamine induced liver fibrosis in rats [J]. Journal of Chinese Integrative Medicine, 2006, 4(5): 514
[2] 郑敏,陈聪,赵雅萍,等.探讨大鼠肝硬化动物模型的建立方法[J].肝胆外科杂志,2006,12(2):136-138
Zheng Min, Cheng Cong, Zhao Ya-ping, et al. Study on the Method of Inducing Cirrhosis Model in Rats [J]. Journal of Hepatobiliary Surgery, 2006, 12(2): 136-138
[3] 王宪波,刘平,唐志鹏.虫草菌丝提取物抗二甲亚硝胺诱导大鼠肝硬化肝窦毛细血管化作用机制的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 9(2): 810-815

- Wang Xian-bo, Liu Ping, Tang Zhi-peng. Acting Mechanism of Cordyceps mycelia Extract for Antagonizing Hepatic Sinusoidal Capillarization in Rats with Dimethylnitrosamine Induced Liver Cirrhosis [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2009,9(2):810-815
- [4] 汤志刚,纪涛,邱陆军,等. TNF- α 抑制剂对重型急性胰腺炎大鼠肾损伤的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2009,18(3):220-223
- Tang Zhi-gang, Ji Tao, Qiu Lu-jun, et al. Influence of tumor necrosis factor- α inhibitor in rats with SAP-associated kidney injury [J]. Chinese Journal of General Surgery, 2009,18(3):220-223
- [5] 谭国胜, 向贤宏, 王于, 等. 脂肪间质干细胞移植对大鼠肝硬化模型的治疗作用[J]. 世界华人消化杂志, 2009,17(11):1074-1078
- Tan Guo-Sheng, Xiang Xian-hong, Wang Yu, et al. Therapeutic effect of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplantation for rat model of hepatic cirrhosis [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009,17(11):1074-1078
- [6] 章幼亦, 邹美银, 吴月平, 等. 失代偿性肝硬化患者血清 VEGF、TGF- β 1、TNF- α 检测及临床意义 [J]. 南通大学学报 (医学版), 2009,29(4):378-380
- Zhang You-yi, Zou Mei-yin, Wu Yue-ping, et al. Detection and significance of serum VEGF, TGF- β 1, TNF- α in patients with decompensated liver cirrhosis [J]. Nantong university academic journal (medical sciences), 2009,29(4):378-380
- [7] 林群英, 李泰辉, 黄浩, 等. 广东虫草人工栽培的光温条件研究[J]. 华南农业大学学报, 2009,1(3):218-219
- Lin Qun-ying, Li Tai-hui, Huang Hao, et al. studies on light and temperature conditions for Cultivation of cordyceps guangdongensis [J]. Journal of South China Agricultural University, 2009,1(3):218-219
- [8] 孙保木, 宣红萍, 李风华, 等. 虫草菌丝提取物对大鼠脂肪性肝炎与肝纤维化的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2008,27(1):102-104
- Sun Bao-mu, Xuan Hong-ping, Li Feng-hua, et al. Effects of Cordyceps mycelium extract on steatohepatitis and liver fibrosis in rats [J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies, 2008,27(1):102-104
- [9] 陆艳艳, 邱细敏, 刘湘军, 等. 人工虫草多糖对小鼠 CCL4 肝损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2011,32(07):319-321
- Lu Yan-yan, Qiu Xi-min, Liu Xiang-jun, et al. Protective Effect of Polysaccharides from Different Parts of Cultured Cordyceps sinensis on CCL4 induced Liver Damage in Mice [J]. Food science, 2011,32(07):319-321
- [10] 李风华, 刘平, 熊伟国, 等. 虫草多糖逆转 DMN 诱导大鼠肝纤维化的作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2006,31(12):1968-1969
- Li Feng-hua, Liu Ping, Xiong Wei-guo, et al. Effects of corydyceps polysaccharide on liver fibrosis induced by DMN in rats [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2006,31(12):1968-1969
- [11] 李风华, 刘平, 王春树. 虫草菌丝逆转二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化的有效组分及其作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(9):108-112
- Li Feng-hua, Liu Ping, Wang Chun-shu. Actions of cordyceps sinensis Berk.Sacc and its effective components on reversing liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rats [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011,17(9):108-112
- [12] Zhang Yong-hua, Liu Yi-hui. Influence of TCM therapy for supplementing Pi and nourishing Shen on dendritic cell function in patients with chronic hepatitis B treated by lamivudine [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2009,15(1):60-62
- [13] 金博, 廖丹, 孙涛, 等. 人工虫草菌丝及锌减少肝纤维化大鼠肝脏胶原的沉积[J]. 天津医药, 2007,35(10):761-763
- Jin Bo, Liao Dan, Sun Tao, et al. Gliocladium and Zinc Decrease Liver Collagen Accumulation in Fibrotic Rat Model [J]. Tianjin Medical Journal, 2007,35(10):761-763
- [14] 张霞, 吴小翎, 刘玉侃, 等. 虫草菌丝对实验性肝纤维化大鼠肝糖原影响的动态观察[J]. 重庆医科大学学报, 2003,28(1):57-59
- Zhang Xia, Wu Xiao-yu, Liu Yu-kan, et al. The dynamical influence of Cordyceps sinensis on the hepatic glycogen level of experimental hepatic fibrosis in rats [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2003,28(1):57-59
- [15] 穆静, 刘平, 王宪波. 虫草菌丝提取物抗 DMN 大鼠肝纤维化的作用及其机制的研究[J]. 宁夏医学杂志, 2007,29(2):101-103
- Mu Jing, Liu Ping, Wang Xian-bo. A study on action and mechanism of cordyceps sinensis extract on liver fibrosis induced by dimethylnitrosamin in rats [J]. Ningxia Medical Journal, 2007,29(2):101-103
- [16] 李晓虹, 杨蒲芳, 戚红霞, 等. 血清 TGF- β 1 及 VEGF 在慢性乙肝、肝纤维化、肝硬化患者的临床变化及意义 [J]. 临床消化杂志, 2011,23(3):144-146
- Li Xiao-hong, Yang Pu-fang, Qi Hong-xia, et al. The Changes and Significance of Serum TGF- β 1, VEGF in Patients with Chronic Hepatitis B, Liver Fibrosis and Liver Cirrhosis [J]. Chinese Journal of Clinical Gastroenterology, 2011,23(3):144-146
- [17] Greessner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenesis concepts of liver fibrosis suggest satellite cells and TGF- β 1 as major players and therapeutic targets [J]. J Cell Mol Med, 2006,10(2):76
- [18] 郭艳萍, 杨广英, 王建君, 等. 转化生长因子- β 1 及 VEGF 在肝纤维化中的表达[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2008,3(10):279-281
- Guo Yan-ping, Yang Guang-ying, Wang Jian-jun, et al. Expression of TGF- β 1 and VEGF in forming course of hepatic fibrosis [J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2008,3(10):279-281
- [19] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis [J]. Gut, 2003,52(9):1347
- [20] 李树龙, 刘新, 魏来, 等. 乙型肝炎纤维化分级相关血浆蛋白标志物的定量蛋白质组筛选[J]. 中国科学, 2011,41(3):178-186
- Li SL, Liu X, Wei L, et al. Plasma biomarkers screening for liver fibrosis with N-terminal isotope tagging strategy [J]. Sci China Life Sci, 2011,41(3):178-186