

• 基础研究 •

基于内源性大麻素探讨康氏抗纤方治疗
肝纤维化大鼠的作用机制张绍良¹ 陈少东¹ 赖鹏华¹ 许诗霖¹ 周志佳¹ 吴耀南²
郑晓婷³ 蒋晓倩³ 高凉琴⁴ 梁惠卿²

摘要 **目的** 研究康氏抗纤方对肝纤维化大鼠的药理效应及对内源性大麻素的作用机制。**方法** 将 40 只 Wistar 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、康氏抗纤方组和安络化纤丸组,每组 10 只。造模 8 周期间,正常组给予普通饲料喂养,模型组、康氏抗纤方组和安络化纤丸组给予四氯化碳(CCl_4)腹腔注射复制肝纤维化模型。从第 5 周开始,康氏抗纤方组、安络化纤丸组分别给予康氏抗纤方、安络化纤丸灌胃治疗 4 周。检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性;ELISA 检测肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量;HE 染色法观察大鼠肝组织的病理变化;采用高效液相色谱-质谱联用法(LC/MS)检测肝组织内源性大麻素 N-花生四烯酸氨基乙醇(AEA)、2-花生四烯酸甘油(2-AG)含量变化;通过 real-time PCR 法检测大鼠肝组织内源性大麻素水解酶脂肪酰胺水解酶(FAAH)和单酰基甘油酯酶(MGL) m-RNA 表达水平变化。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠的肝组织内出现明显肝纤维化状态,血清 ALT、AST 活性及肝组织 Hyp、AEA、2-AG 含量升高($P<0.01$),FAAH、MGL m-RNA 表达降低($P<0.01$)。治疗 4 周后,与模型组比较,康氏抗纤方组、安络化纤丸组肝细胞炎症坏死及胶原纤维增生明显减轻,血清 ALT、AST 活性、肝组织 Hyp 含量均显著降低($P<0.01$),康氏抗纤方组、安络化纤丸组血清大麻素 AEA、2-AG 含量明显降低($P<0.01, P<0.05$),FAAH、MGL 的 m-RNA 表达显著升高($P<0.01, P<0.05$)。**结论** 康氏抗纤方对肝纤维化具有良好的治疗作用,其作用机制与抑制内源性大麻素密切相关。

关键词 康氏抗纤方;肝纤维化;内源性大麻素

Study on the Mechanism of Kangshi Kangxian Recipe in Treatment of Liver Fibrosis Based on Endogenous Cannabinoid ZHANG Shao-liang¹, CHEN Shao-dong¹, LAI Peng-hua¹, XU Shi-lin¹, ZHOU Zhi-jia¹, WU Yao-nan², ZHENG Xiao-ting³, JIANG Xiao-qian³, GAO Liang-qin⁴, and LIANG Hui-qing^{2*}
1 Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Xiamen University, Fujian (361102); 2 Liver Disease Center, Xiamen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fujian (361009); 3 Department of Traditional Chinese Medicine, School of Traditional Chinese Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian (351003); 4 Department of Traditional Chinese Medicine, Hospital of Xiamen University, Fujian (361005)

ABSTRACT Objective To study the pharmacological effect of Kangshi Kangxian Recipe (KSKXR) on hepatic fibrosis rats and its mechanism of action on endogenous cannabinoid. **Methods** Forty Wistar male rats were randomly divided into normal group, model group, KSKXR group, and Anluo Huaxian Pill (ALHXP), 10 rats in each group. During the 8 weeks of modeling, rats in the normal group were fed with common diet, while those in the rest three groups were intraperitoneally injected with carbon tetrachloride

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81673660, No. 81873242);厦门市科技计划项目(No. 3502Z20174028);厦门市重要重大疾病联合攻关项目(No. 3502Z20179047);福建省卫生计生医学创新科研人才培养项目(No. 2018-CXB-28);厦门康氏肝病学术流派传承工作室;全国第六批老中医药专家学术经验继承工作(2017 年)

作者单位:1. 厦门大学医学院(福建 361102);2. 厦门市中医院肝病中心(福建 361009);3. 福建中医药大学中医学院中医系(福建 351003);4. 厦门大学医学院中医科(福建 361005)

通讯作者:梁惠卿, Tel: 0592-5582101, E-mail: 13850005898@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200908. 337

(CCl₄) to replicate the liver fibrosis model. Starting from the 5th week, KSKXR and ALHXP were respectively administered to rats in the KSKXR group and ALHXP group for 4 successive weeks. Activities of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), hepatic hydroxyproline (Hyp) were detected. Pathological changes of liver tissue were observed by HE staining. Contents of endogenous cannabinoid N-arachidonic acid aminoethanol (AEA) and 2-arachidonylglycerol (2-AG) in liver tissue were detected by LC/MS. m-RNA expressions of endogenous cannabinoid fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MGL) were detected by Real-time PCR. **Results** Compared with the normal group, obvious liver fibrosis occurred, serum activities of ALT and AST significantly increased ($P < 0.01$), the contents of Hyp in liver tissue increased ($P < 0.01$), the contents of AEA and 2-AG in liver tissue significantly increased ($P < 0.01$), and m-RNA expressions of FAAH and MGL decreased ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group after 4 weeks treatment, inflammation and necrosis of hepatocytes and the proliferation of collagen fibers were significantly alleviated, and serum activities of ALT and AST, hepatic Hyp content decreased significantly in the KSKXR group and the ALHXP group ($P < 0.01$). Contents of AEA and 2-AG decreased obviously in the KSKXR group and the ALHXP group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). m-RNA expressions of FAAH and MGL increased obviously ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** KSKXR had good therapeutic effect on hepatic fibrosis, and its mechanism was closely related to inhibiting endogenous cannabinoid.

KEYWORDS Kangshi Kangxian Recipe; liver fibrosis; endogenous cannabinoid

肝纤维化是肝脏受到慢性损伤的一种修复反应,是多种慢性肝病共有的病理改变,可最终发展为肝硬化、肝癌,严重影响着人们的健康^[1]。作为肝硬化、肝癌发展的中间阶段,肝纤维化存在可逆性,因此,加强抗肝纤维化治疗的研究,及时阻止肝纤维化的进展是治疗慢性肝病的关键,具有重要的社会意义与经济意义^[2]。现代医学多采用皮质类固醇、马洛替酯、秋水仙碱等治疗肝纤维化,虽有一定的治疗作用,但因其效果不甚理想、毒副反应大,临床应用常常受到限制^[3]。中药复方因其多途径、多环节的作用特点成为防治肝纤维化的研究热点,前期研究工作已证实康氏抗纤方治疗肝纤维化作用显著^[4,5]。近期研究表明,内源性大麻素系统在肝纤维化发病机制中起着重要作用,在疾病状态下,内源性大麻素(endocannabinoid system, eCBs)被激活, eCBs 经旁分泌刺激肝内大麻素受体(cannabinoid receptor, CBR),导致肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的持续激活,促进肝纤维化的发生发展^[6]。故本研究以内源性大麻素系统为切入点,探讨康氏抗纤方对肝纤维化大鼠的治疗作用及其作用机制。

材料与方法

1 动物 Wistar 雄性大鼠 40 只,清洁级,体重(220±10 g, 10)周龄,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK 2012-0002。实验动物饲养于厦门大学医学院实验动物中心,自由饮水,饲养温度

控制在 20~22 ℃,相对湿度 65%~70%。本实验方案通过厦门大学实验动物伦理委员会审查(No.XMU-LAC20120020)。

2 药物 康氏抗纤方组成:黄芪 20 g 炒白术 15 g 鳖甲 10 g 太子参 15 g 龟板 10 g 石斛 10 g 郁金 10 g 柴胡 10 g 佛手 10 g 丹参 15 g 茜草 15 g 茵陈 15 g 白花蛇舌草 15 g 栀子根 15 g 败酱草 15 g 丹皮 10 g,购于北京同仁堂厦门市思明区禾祥中医门诊部,由厦门大学医学院中医系协助制备,制备药物浓度为 3.08 g/mL。安络化纤丸购自森隆药业有限公司(批号:1855500),制备药物浓度为 3.0 g/mL。

3 试剂 血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒(批号:20180402)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号:20180701)购自南京建成生物工程研究所;羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp) ELISA 检测试剂盒(批号:20180104)、分析纯 CCl₄(批号:20180402)购自上海晨曦生物科技有限公司。

4 仪器 ni-6K 微型离心机;CHOL-16M 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);M2000 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);HP 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);Qtrap 3200 质谱仪(美国 AB 公司);罗氏 LightCycler 480 II 荧光定量 PCR。

5 分组、造模及给药 40 只 Wistar 雄性大鼠按

随机数字表法分为正常组、模型组、康氏抗纤方组和安络化纤丸组,每组 10 只。模型组、康氏抗纤方组和安络化纤丸组按照 3 mL/kg 剂量腹腔注射 40% CCl₄ 玉米油溶液,每周 2 次,共 8 周,复制肝纤维化模型^[7];正常组,给予等量的生理盐水,腹腔注射,每周 2 次。康氏抗纤方组和安络化纤丸组自第 5 周起,按 1 mL/100 g 剂量分别给予康氏抗纤方、安络化纤丸溶液灌胃,按成人 60 kg 计算大鼠每日常规用药量,持续 4 周。实验结束后,各组大鼠经腹主动脉取血、收集肝脏组织并称重,将肝脏组织固定在 10% 多聚甲醛中用于组织病理学分析,将剩余的肝脏储存于 -80 ℃,用于生化分析。

6 指标检测及方法

6.1 肝组织病理检测 肝组织常规脱水、包埋、切片,分别行 HE 染色,光镜下观察肝组织的炎症、纤维化程度。

6.2 血清 ALT、AST 活性检测 采用比色法检测各组血清 ALT、AST 活性。

6.3 肝组织 Hyp 含量检测 采用 ELISA 法检测各组肝组织 Hyp 含量。

6.4 内源性大麻素 N-花生四烯酸氨基乙醇(anandamide, AEA)、2-花生四烯酸甘油(2-arachidonoylglycerol, 2-AG)含量检测 采用液相色谱-质谱联用法检测大鼠肝组织 AEA、2-AG 含量。

6.5 内源性大麻素水解酶水解酶脂肪酰胺水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)、单酰基甘油酯酶(monoacylglycerol lipase, MGL) mRNA 检测 采用 real-time PCR 检测肝组织 FAAH、MGL mRNA 表达。

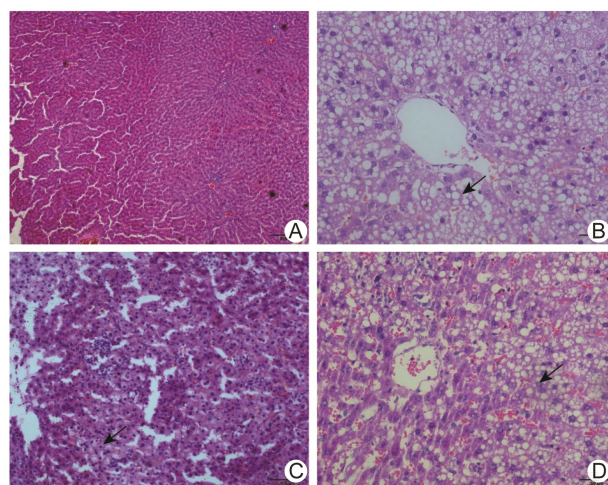
7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足正态性和方差齐性,采用单因素方差分析,组间比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

结 果

1 一般情况 正常组大鼠精神佳,动作敏捷,毛发光泽,食欲良好,大便色黑成形;模型组、药物组每次腹腔注射 CCl₄ 后 24 h 内大鼠有不同程度的烦躁,动作稍迟缓,食欲减退,便溏;而药物组大鼠精神逐渐恢复,食纳渐佳,活动灵敏。

2 各组大鼠肝组织病理改变(图 1) 正常组大鼠肝细胞以中央静脉为中心,呈放射状排列,未见肝细胞炎症坏死、胶原纤维增生;模型组大鼠肝细胞呈片状坏死,炎性细胞浸润明显,肝细胞索结构紊乱,并形成大量胶原纤维,纤维间隔形成,肝窦界限模糊,肝细胞

结构完全被破坏;康氏抗纤方组和安络化纤丸组大鼠病变明显轻于模型组,肝细胞坏死、炎性细胞浸润明显减少,胶原纤维增生明显减轻。



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为康氏抗纤方组;D 为安络化纤丸组;箭头所示为肝小叶结构破坏,纤维结缔组织增生

图 1 各组大鼠肝组织炎症变化 (HE 染色, ×200)

3 各组大鼠血清 ALT、AST 活性、肝组织 Hyp 含量比较(表 1) 与正常组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST 活性以及肝组织 Hyp 含量升高($P < 0.01$),而康氏抗纤方组、安络化纤丸组 ALT、AST 活性及 Hyp 含量均降低($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血清 ALT、AST 活性及肝组织 Hyp 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	Hyp(μmol/L)
正常	10	34.23±4.11	30.44±5.14	5.86±1.22
模型	10	89.56±10.23*	75.21±10.64*	15.35±3.43*
康氏抗纤方	10	61.63±7.11 ^Δ	59.33±9.12 ^Δ	9.81±2.62 ^Δ
安络化纤丸	10	69.21±8.24 ^Δ	63.73±8.38 ^Δ	12.72±3.13 ^Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,^Δ $P < 0.01$

4 各组大鼠肝组织内源性大麻素含量及水解酶 mRNA 表达比较(表 2) 与正常组比较,模型组肝组织 AEA、2-AG 含量增加($P < 0.01$),而大麻素水解酶 FAAH、MGL mRNA 表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,康氏抗纤方组 AEA、2-AG 含量降低、FAAH、MGL mRNA 表达水平增加($P < 0.01$),安络化纤丸组 AEA、2-AG 含量降低,FAAH、MGL mRNA 表达水平增加($P < 0.05$)。康氏抗纤方组与安络化纤丸组比较 AEA、2-AG 含量升高,FAAH、MGL mRNA 表达水平降低($P < 0.05$)。

讨 论

肝纤维化是各种慢性肝脏疾病的病理结构改变,

表 2 各组大鼠肝组织内源性大麻素含量及水解酶 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AEA (pmol/g)	2-AG (pmol/g)	FAAH mRNA	MGL mRNA
正常	10	40.22±8.11	50.21±10.09	1.56±0.28	1.59±0.27
模型	10	97.68±18.23 [*]	108.68±20.18 [*]	0.43±0.12 [*]	0.45±0.15 [*]
康氏抗纤方	10	67.34±16.11 ^{△△}	70.43±15.12 ^{△△}	0.81±0.22 ^{△△}	0.82±0.33 ^{△△}
安络化纤丸	10	89.93±20.34 ^{△▲}	93.15±20.24 ^{△▲}	0.56±0.31 ^{△▲}	0.57±0.24 ^{△▲}

注:与正常组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与康氏抗纤方组比较,[▲] $P < 0.05$

当肝脏受到病毒感染、酒精、药物等生化因素损伤时,在多种细胞因子共同作用下肝星状细胞活化,并转变为肌成纤维细胞,同时合成过多胶原蛋白,使大量细胞外基质在肝脏内堆积,从而引发肝纤维化,最终演变为肝硬化^[8]。由于肝纤维化存在逆转可能,实现对这一阶段的调控对于肝硬化及其并发症的防治具有极为重要的临床意义。

肝脏是 eCBs 作用的重要靶点之一。研究已经证明 eCBs 通过其受体介导通过脂质代谢的调节参与各种肝脏疾病过程,在肝脏炎症损伤、肝纤维化中起重要作用^[9,10]。目前已被证实的 eCBs 主要有 AEA、2-AG^[11],而 MAGL、FAAH 作为 2-AG、AEA 的降解酶,对其起到调控分解的作用^[12]。在肝纤维化患者中,内源性大麻素系统被激活,外周血 2-AG、AEA 水平增高,并与肝功能受损的程度相关^[13],而 MAGL、FAAH 表达升高,则能有效地抑制 2-AG、AEA 异常升高^[14]。

福建名医康良石教授认为肝纤维化病机乃湿热留著肝脏,气机阻遏,气滞血瘀,日久气阴两虚而成。以疏肝活血、益气养阴立法,创制康氏抗纤方。方中以黄芪、炒白术、鳖甲、太子参、龟板、石斛益气养阴,配以茵陈、栀子根、白花蛇舌草、败酱草清热利湿,酌用柴胡、佛手、郁金以疏肝理气,伍以丹参、茜草活血化瘀,诸药相配共奏扶正祛邪、化瘀通滞之功。实验研究结果表明康氏抗纤方可以通过减少活化的肝星状细胞来减少肝纤维化面积,并具有改善肝脏炎症、抗肝纤维化的临床疗效^[15]。

本实验结果显示,康氏抗纤方与阳性对照药安络化纤丸均能使肝细胞炎症坏死明显减少,胶原纤维增生明显减轻,降低 ALT、AST 活性以及 Hyp 含量,表明该方具有显著抗炎、治疗肝纤维化的药理效应。值得注意的是,LC-MS 结果显示,康氏抗纤方较安络化纤丸更能显著降低大鼠肝组织 AEA、2-AG 含量,这可能是其治疗肝纤维化的作用机制之一。通过降低 AEA、2-AG 含量,进而减少下游因子生物效应。本实验 real-time PCR 结果提示,康氏抗纤方较安络化纤丸更能明显升高内源性大麻素的 FAAH、MGL 两种水

解酶的表达,从而加速 2-AG、AEA 的水解、进一步发挥其抗肝纤维化作用特点。

上述实验结果表明康氏抗纤方通过调控内源性大麻素进而改善肝纤维化病理状态,其作用机制可能与通过降低内源性大麻素含量,增加内源性大麻素水解酶表达有关。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Campana L, Iredale JP. Regression of liver fibrosis [J]. Semin Liver Dis, 2017, 37(1): 1-10.
- [2] Poillil Surendran S, George Thomas R, Moon MJ, et al. Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 20(12): 6997-7006.
- [3] Rambaldi A, Gluud C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis and cirrhosis [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2005, 18(2): 21-48.
- [4] 章亭,陈扬荣. 康氏抗纤颗粒抗肝纤维化大鼠疗效及机理的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 6(11): 431-432.
- [5] 陈少东,张利敏,王瑶瑶,等. 康氏抗纤方治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(10): 1185-1190.
- [6] Wang M, Meng N, Chang Y, Tang W. Endocannabinoids signaling: Molecular mechanisms of liver regulation and diseases [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2016, 21: 1488-501.
- [7] 许建明,徐叔云,张运芳,等. 四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(3): 339-341.
- [8] Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury [J]. J Biol Chem, 2000, 275(4): 2247-2250.
- [9] Li H, Quinn MA, Frampton GA, et al. Recent advances in the understanding of the role of the endocannabinoid system in liver diseases [J]. Digest Liver Dis, 2011, 43(3): 188-193.
- [10] A Mallat, F Teixeira-Clerc, V Deveaux, et al. The endocannabinoid system as a key medi-

- atorduring liver diseases: newinsights and therapeutic openings [J]. Br J Pharmacol, 2011, 163(7): 1432-1440.
- [11] Cinar R, Iyer MR, Liu Z, et al. Hybrid inhibitor of peripheral cannabinoid-1 receptors and inducible nitric oxide synthase mitigatesliver fibrosis [J]. JCI Insight, 2016, 21(11): 816-825.
- [12] Gamelin FX, Aucouturier J, Iannotti FA, et al. Effects of chronic exercise on the endocannabinoid system in Wistar rats with high-fat diet-induced obesity [J]. J Physiol Biochem, 2016, 72(2): 183-199.
- [13] Luchicchi A, Pistis M. Anandamide and 2-arachidonoylglycerol: pharmacological properties, functional features, and emerging specificities of the two major endocannabinoids [J]. Mol Neurobiol, 2012, 46(2): 374-392.
- [14] Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice [J]. J Clin Invest, 2008, 118(9): 3160-3169.
- [15] 林立, 蔡虹, 张如棉, 等. 康氏抗纤方加减联合 α 干扰素治疗慢性乙型肝炎 30 例疗效观察 [J]. 福建中医药, 2012, 43(6): 19-21.
- (收稿: 2019-11-01 在线: 2020-09-17)
- 责任编辑: 李焕荣
英文责编: 张晶晶

《中国中西医结合杂志》第八届编委会名单

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 王文健 史大卓 吕爱平 肖培根 吴伟康 沈自尹 雷 燕

顾 问 王永炎 邓铁涛 吴咸中 辛育龄 张伯礼 陈香美 陈凯先 陈维养 唐由之
黄璐琦 曹洪欣 屠呦呦 韩济生

编辑委员

于德泉 王一涛 王卫霞 王宁生 王 伟 王 阶 王拥军(上海) 王拥军(北京) 王昌恩
王学美 王硕仁 王 舒 卞兆祥 方邦江 方敬爱 邓跃毅 叶文才 田金洲 史载祥 白彦萍
吕志平 吕维柏 朱 兵 朱明军 危北海 庄曾渊 刘干中 刘瓦利 刘龙涛 刘 平 刘 良
刘建平 刘建勋 刘保廷 刘鲁明 齐清会 阮新民 孙汉董 孙 燕 阳 晓 花宝金 苏 励
李乃卿 李大金 李廷谦 李军祥 李连达 李国栋 李国勤 李 恩 李 涛 李焕荣 杨任民
杨宇飞 杨秀伟 连 方 时毓民 吴大嵘 吴万垠 吴泰相 吴根诚 吴 烈 邱 峰 张大钊
张卫东 张允岭 张永贤 张永祥 张荣华 张俊华 张亭栋 张家庆 张敏州 张敏建 陆付耳
陈士奎 陈小野 范吉平 范维琥 林志彬 林 谦 林瑞超 郁仁存 果德安 季 光 周 俊
周霭祥 郑国庆 赵一鸣 赵伟康 赵芳芳 赵健雄 胡义扬 胡晓梅 胡镜清 侯凡凡 饶向荣
洪传岳 栗原 博(日本) 夏城东 顾振纶 徐凤芹 徐 浩 殷惠军 凌昌全 高瑞兰 郭 军
郭 艳 郭赛珊 唐旭东 黄光英 黄 熙 梅之南 曹小定 崔 红 麻 柔 梁 春 梁挺雄
梁晓春 梁繁荣 董竞成 董福慧 谢竹藩 谢明村 谢 恬 蔡定芳 裴正学 廖福龙 衡先培
戴瑞鸿 Yung-chi CHENG(美国) Sheng-xing MA(美国) Qun-hao ZHANG(美国)

(以上名单按姓氏笔画为序,编委工作单位信息在本刊网站首页“下载专区”公布,网址: <http://www.cjim.cn/zxyjhc/zxyjhc/ch/index.aspx>)