

学校编码: 10384

分类号 密级

学号: 24520131153549

UDC

# 厦门大学

## 硕士学位论文

### 桃红四物汤对慢性肝病模型小鼠肝坏死性 炎症和纤维化的作用及机理研究

#### The effects of Tao-Hong-Si-Wu on hepatic necroinflammatory activity and fibrosis in murine model of chronic liver disease

史萌萌

指导教师姓名: 奚胜艳 副教授

专业名称: 中医内科学

论文提交日期: 2016年5月

论文答辩时间: 2016年5月

学位授予日期: 2016年6月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2016年6月

厦门大学博硕士论文摘要库

桃红四物汤对慢性肝病模型小鼠肝坏死性炎症和纤维化的作用及机理研究

史萌萌

指导教师

奚胜艳

副教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(国家自然科学基金 No.81202659:基于已知吸收成分调控病理血管生成-肝纤维化并与母方桃红四物汤疗效的比较)课题(组)的研究成果,获得课题(组)经费或实验室的资助,在(中医系)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

( )1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

## 摘要

背景：桃红四物汤原名加味四物汤，载于《医垒元戎》，录自《玉机微义》，是在四物汤的基础上加桃仁、红花而成，是活血养血之代表方。桃红四物汤在临床上应用广泛，诸多研究表明桃红四物汤对多种慢性肝病有一定的治疗作用。慢性肝损伤伴肝纤维化发展过程中存在明显的病理性血管生成与重构，阻碍了肝纤维化的逆转与恢复。通过桃红四物汤对病理性血管生成作用的研究，发现部分活血化瘀中药具有抑制病理性血管生成的作用，抗病理性血管生成可能是活血化瘀药的现代药理作用之一。因而从整体水平研究桃红四物汤对慢性肝损伤伴早期肝纤维化小鼠的治疗作用及作用机理可以为临床慢性肝损伤及早期肝纤维化的治疗提供实验依据。

目的：从整体水平研究复方桃红四物汤(Tao-Hong-Si-Wu Decoction, THSWD)对四氯化碳所致慢性肝损伤伴肝纤维化模型小鼠肝组织病理结构的变化、肝功能相关生化指标、血清中透明质酸和层粘连蛋白的含量、肝组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、含激酶插入区受体(kinase insert domain containing receptor, KDR)及 Flt-1 蛋白与 mRNA 表达的影响。

方法：昆明种小鼠 60 只，随机数字法分组为空白组、模型组、秋水仙碱对照组、桃红四物汤高中低(17.00g/kg、8.50g/kg、4.25g/kg)剂量组，采用左侧腹股沟处皮下注射四氯化碳花生油溶液建立小鼠慢性肝损伤伴纤维化模型；给药 6 周后，摘眼球取血，提取血清进行肝功能相关指标检测，固定肝组织，制作病理切片；并运用酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)肝组织 VEGF 蛋白含量；蛋白印迹法(Western blotting)测定小鼠肝脏 AKT、pAKT、KDR 和 Flt-1 蛋白的表达；逆转录 PCR(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)法测定小鼠肝组织 VEGF、KDR、Flt-1 及 AKT mRNA 表达。

结果：

1. 通过组织病理学观测和血清学检测，THSWD 中药复方组及秋水仙碱组

病理切片与模型组相比，肝组织病变明显较轻，肝小叶结构轻度紊乱，仅在少数区域见不完整的假小叶形成。肝细胞脂肪变性较轻，散在少量点状坏死。肝窦扩张不明显，汇管区稍扩大，仅见少量炎细胞浸润，纤维组织轻度增生，部分视野可见少量细纤维隔。肝脏慢性坏死性炎症及肝纤维化程度较模型组相对较轻。中药组与模型组相比肝功能相关生化指标有不同程度的降低。

2. 经 THSWD 治疗后，中药复方高、中剂量组肝组织 VEGF 蛋白表达量较模型组降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )，复方高、中剂量组及西药秋水仙碱组 AKT 蛋白表达量明显低于模型组 ( $P<0.01$ )。西药秋水仙碱组及 THSWD 高剂量组 pAKT 蛋白表达量明显低于模型组 ( $P<0.01$  或  $P<0.05$ )。中药高剂量组肝组织 KDR 与 Flt-1 蛋白表达较模型组降低 ( $P<0.05$ )，低剂量组较之无差异；而 THSWD 高中剂量组肝组织 VEGF、KDR 及 Flt-1 mRNA 表达较模型组、秋水仙碱组明显减少 ( $P<0.01$ )，并且呈现一定的量效正相关性。THSWD 高剂量组与模型组相比 AKT mRNA 表达降低 ( $P<0.05$ )。

结论：THSWD 能够改善小鼠肝功能，减轻肝脏炎性坏死及抑制肝纤维化的发展；THSWD 能够降低慢性肝损伤后肝脏病理血管生成相关因子的表达，减缓病理性微血管生成可能是其治疗肝损伤延缓肝纤维化的机制之一。

**关键词：**桃红四物汤；病理血管生成；慢性肝病；肝纤维化；血管内皮细胞生长因子

## Abstract

**Background:** Tao-Hong-Si-Wu decoction (THSWD) is a traditional Chinese herbal medicine that has been used for centuries in the treatment of Chinese patients with chronic liver disease. Recently, THSWD has been reported to alter vascular endothelial growth factor (VEGF) induced angiogenesis, raising the possibility that in addition to its anti-inflammatory properties; THSWD might also inhibit hepatic blood flow associated fibrosis.

**Objective:** To document the effects of THSWD on hepatic necroinflammatory disease activity, fibrosis and VEGF signaling in a murine model of chronic liver disease.

**Methods:** Sixty adult mice were equally divided into six study groups. Five groups were exposed to subcutaneous carbon tetrachloride (0.1 mL/10g BW) for six weeks. Three of the five groups were treated with different concentrations of THSWD (4.25, 8.50, 17.00 g/kg), one with 0.1 mg/kg of Colchicine (positive control), and one with physiologic saline (negative control). Mice in the sixth group were not exposed to CCl<sub>4</sub> and remained untreated (healthy controls). Liver enzymes/function tests, hyaluronic acid and laminin levels were measured in serum, and hepatic histology, VEGF, Flt-1 and kinase insert domaincontaining receptor (KDR), Akt and phosphorylated Akt (pAkt) expression were documented in liver tissue at the end of treatment.

**Results:** Hepatic necroinflammatory disease activity and fibrosis were significantly attenuated in THSWD treated mice in a dose dependent manner. These beneficial results were similar and often exceeded those achieved with colchicine. In addition, VEGF, Flt-1, KDR, Akt and pAkt mRNA and protein expression were reduced in THSWD treated mice. VEGF protein content in THSWD (17.00g/kg and 8.50g/kg) groups was lower than that in model group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); protein expression of liver tissue KDR and Flt-1 in THSWD (17.00g/kg) group was less than that in model group ( $P < 0.05$ ); mRNA expression of liver tissue VEGF, KDR and Flt-1 was significantly lower than that in both model and colchicine groups ( $P < 0.01$ ), which showed a certain positive correlation between dose and effect.

**Conclusion:** In this animal model of chronic liver disease, THSWD decreased hepatic necroinflammatory disease and fibrosis. Inhibition of VEGF expression and



downstream signaling were associated with these findings. Further studies with this and other TCMs as treatment for chronic liver disease are warranted.

**Keywords:** Tao-Hong-Si-Wu Decoction (THSWD); pathological angiogenesis; chronic liver disease; hepatic fibrosis; vascular endothelial growth factor

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
THSWD	Tao-Hong-Si-Wu Decoction	桃红四物汤
HF	Hepatic fibrosis	肝纤维化
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
MFB	Myofibroblast,	肌成纤维细胞
KM	Kunming	昆明种小鼠
CCL <sub>4</sub>	Carbon tetrachloride	四氯化碳
Colc	Colchicine Tablets	秋水仙碱片
ALT	Albumin	白蛋白
TBIL	Total bilirubin	血清总胆红素
ALT	Alanine aminotransferase	谷氨酸氨基转移酶
AST	Aspartate transaminase	天冬氨酸氨基转移酶
HA	Hyaluronan	透明质酸
LN	Laminin	层粘连蛋白
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
KDR	Kinase insert domain containing receptor	含激酶插入区受体
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
HE	Hematoxylin-eosin staining	苏木精-伊红染色法
OD	Optical density	光密度

# 目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略语表.....	V
目录.....	VI
Contents .....	VIII
第一章 前言 .....	1
第二章 桃红四物汤对慢性肝病模型小鼠肝组织病理形态学及血清肝 功能的影响 .....	5
1. 材料与方法.....	5
1.1 实验材料.....	5
1.2 实验方法.....	6
2. 结果.....	9
2.1 慢性肝病模型小鼠肝脏病理学改变.....	9
2.2 THSWD 对慢性肝病模型小鼠肝功能相关指标的影响 .....	12
3. 讨论.....	13
第三章 桃红四物汤对慢性肝病模型小鼠肝脏病理性血管生成相关因 子的影响.....	17
1. 材料与方法.....	17
1.1 实验材料.....	17
1.2 实验方法.....	18
2. 结果.....	21
2.1 桃红四物汤对慢性肝病模型小鼠肝组织 VEGF 蛋白含量的影响 ...	21
2.2 桃红四物汤对慢性肝病模型小鼠肝组织 VEGF、KDR、Flt-1 及 AKT mRNA 表达的影响 .....	23
2.3 桃红四物汤对慢性肝病模型小鼠 AKT、pAKT、KDR、Flt-1 蛋白 表达的影响.....	24
3. 讨论.....	26
参考文献.....	30
附录.....	34

1. 综述.....	34
2. 攻读硕士期间成果及参与课题.....	错误！未定义书签。
2.1 发表论文： .....	错误！未定义书签。
2.2 参编著作： .....	错误！未定义书签。
2.3 参与科研项目： .....	错误！未定义书签。
致谢.....	53

厦门大学博硕士论文摘要库

## Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbreviation</b> .....	<b>V</b>
<b>Contents in Chinese</b> .....	<b>VI</b>
<b>Contents in English</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapter 2 The effect of Tao-Hong-Si-Wu on histopathology and liver function in a murine model of chronic liver disease</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Materials and Equipment</b> .....	<b>5</b>
1.1 Experiment Materials.....	5
1.2 Experiment Methods.....	6
<b>2. Results</b> .....	<b>9</b>
2.1 Effects of THSWD on hepatic necroinflammation and fibrosis in a CCl <sub>4</sub> -induced liver injury model.....	9
2.2 Effect of THSWT on serum liver function of chronic liver disease mouse caused by CCl <sub>4</sub> .....	12
<b>3. Discussion</b> .....	<b>13</b>
<b>Chapter 3 Effects of Tao-Hong-Si-Wu Decoction on the expression of pathological angiogenesis correlation factors in a murine model of chronic liver disease</b> .....	<b>17</b>
<b>1. Materials and Equipment</b> .....	<b>17</b>
1.1 Experiment Materials.....	17
1.2 Experiment Methods.....	18
<b>2. Results</b> .....	<b>21</b>
2.1 Effect of THSWT on contents of VEGF protein in liver tissue of the liver injured mouse caused by CCl <sub>4</sub> .....	21
2.2 Effect of THSWT on mRNA expression of VEGF, Flt-1, KDR and Akt in liver tissue of the liver injured mouse caused by CCl <sub>4</sub> .....	23
2.3 Effect of THSWT on protein expression of Akt, pAkt, Flt-1 and KDR in liver tissue of the liver injured mouse caused by CCl <sub>4</sub> .....	24
<b>3. Discussion</b> .....	<b>26</b>
<b>References</b> .....	<b>30</b>

<b>Appendix</b> .....	<b>34</b>
<b>1. Reviews</b> .....	<b>34</b>
<b>2. Master Achievements</b> .....	<b>51</b>
2.1 Article: .....	51
2.2 Writing: .....	51
2.3 Scientific Research Project: .....	51
<b>Acknowledgement</b> .....	<b>53</b>

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 前言

慢性肝病是由于是由病毒、乙醇（酒精）、代谢综合征、自身免疫、化学毒物或药物等因素引起，以肝细胞炎症、坏死以及肝纤维化为主要病理改变的慢性疾病。各种致病因素不断损伤肝脏致使肝细胞发生炎症、肿大、渗出，肝细胞外基质增多，肝细胞膜（壁）表面大量纤维增生，包绕肝细胞表面进而细胞壁增厚“通透性”下降，导致肝细胞代谢障碍因而肝细胞进一步肿大，细胞与细胞之间的血流不畅，形成肝脏缺血性瘀滞、肝细胞坏死和纤维化。细胞坏死与纤维增生（汇管区）相交替，形成恶性循环，最终导致肝硬化、门脉高压、腹水、大出血、肝性脑病等不良后果。肝纤维化是机体对各种病因引起的慢性肝病损伤的修复过程，现代中西医结合肝病研究认为肝纤维化是一切慢性肝病的共同病理学基础，纤维化的发生速度是预测慢性肝病结局的良好指标。表现为炎性细胞的募集并诱发级联反应，肌成纤维细胞（myofibroblast, MFB）激活和再生，细胞外基质（ECM）成分特别是胶原等过度形成或沉积。多种细胞和分子通过各种方式作用于肝纤维化的不同环节，最终导致ECM合成和降解不平衡，是各种原因引起的慢性肝病向肝硬化发展所共有的病理改变和必经途径。过去学术界普遍认为肝纤维化不可逆，但随着研究的推进，近年来国内外专家对肝纤维化的可逆性已无异议。对于早期肝硬化的可逆性也逐渐认可<sup>[1-2]</sup>。肝细胞炎症性坏死和肝纤维化既是慢性肝病发展过程中的主要表现又是治疗的关键点，如果能够及时抑制肝损伤和肝纤维化的发展也就阻止了慢性肝病的进一步恶化，为临床治疗提供了巨大的帮助。不幸的是，并不是所有原因引起的慢性肝病都是可治的。在许多情况下可采用一些特殊的治疗方法但疗效欠佳<sup>[3]</sup>。在这种背景环境下，肝炎和肝纤维化的非特异性治疗是可靠的<sup>[4]</sup>。

血管新生或血管生成(angiogenesis)是慢性肝病进展中突出的病理表现，是导致慢性肝病进展的重要病理因素之一。如研究发现：慢性肝炎、肝硬化和原发性肝癌血管内皮生长因子VEGF水平较正常明显增高，并与肝损伤程度相关，新生血管主要位于门管区周围的纤维间隔中，伴有活动性炎症时有从门管区周围向实质深入的趋势，与纤维化发展一致<sup>[5]</sup>。血管生成是在原有血管基础

上芽生出新的血管，它广泛参与慢性炎症、损伤修复、肿瘤发生、局部缺血和免疫紊乱等病理过程。研究表明至少有30种生长因子与血管生成有关，其中最强烈、直接的促血管生成因子是VEGF<sup>[6]</sup>。肝损伤后自分泌和旁分泌VEGF等多种细胞因子，促进HSC向肌成纤维细胞转化。肝纤维化过程中，VEGF受体表达增加，VEGF通过靶细胞上受体，同时促进HSC和内皮细胞(EC)增殖，两者相互作用是肝纤维化进展的前提<sup>[7]</sup>。可见慢性肝损伤中表达上调的诸多细胞因子不仅促进血管新生，而且还促进肝星状细胞的活化增殖，从而产生过量胞外基质，加重肝纤维化的形成。另外，VEGF能诱发新生血管对血浆成分的高渗透性，间隙渗液通过TGF- $\beta$ 和整合素 $\alpha$ 1 $\beta$ 1介导的细胞信号，能诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞分化，细胞外胶原排列和成纤维细胞增殖，参与组织疤痕修复过程<sup>[8]</sup>。提示调控VEGF对阻抑肝纤维化具有重要作用；研究此环节有助于进一步阐明肝纤维化进展机制，亦为寻找有效治疗靶点和诊断标志提供新的视角。VEGF在血管内皮细胞上有两个高亲和力的受体Flt-1和KDR，均为酪氨酸激酶受体，其在胞内的N端是ATP结合部位，提供信号转导通路中蛋白磷酸化所需的磷酸基团。Flt-1主要介导细胞骨架重排，引起迁移，KDR主要介导内皮细胞增殖，并维持细胞存活。有研究表明，KDR在VEGF诱导的血管新生和血管通透性中起主要作用<sup>[9]</sup>。活化的KDR能激活磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)，发挥维持细胞存活效应。单独使用KDR抗体可抑制VEGF诱导的血管生成，其机制是阻断了KDR下游的酪氨酸激酶信号转导系统<sup>[10]</sup>。在受体酪氨酸激酶信号转导系统中，血管内皮细胞增殖分化后存活最主要依赖于PI3K-AKT信号途径，它是十分重要的“生存信号”传导通路；参与VEGF介导的内皮信号传递；PI3K通过与上游VEGFR-2(KDR)形成复合物活化→产生第二信使→激活磷酸肌醇脂依赖性蛋白激酶(PDK)→激活主要的下游信号分子AKT(丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶B)，产生细胞活化效应，并维持细胞存活<sup>[11-13]</sup>。因此，活化AKT(即磷酸化AKT, pAKT)的水平是代表该通路活性的重要指标。血管生成始动于内皮细胞激活；该通路如受到阻断，内皮细胞的活化会受到抑制，血管生成将减少。

美国著名肝病学家、国际肝病协会首任主席Hans Popper指出：“谁能阻止或延缓肝纤维化的发生，谁将治愈大多数慢性肝病。”然而遗憾的是，至今西医尚缺乏对其有效的治疗。而中医药历经几千年的发展，中药经过严格加工炮制，通过方剂的用药规律配伍，而辨证组方，其毒性会明显小于西药。因此开



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.