

鳖甲煎丸对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化模型中 NF-κB 信号通路的影响

陈冠新¹, 文彬², 孙海涛¹, 孙嘉玲¹, 杨雪梅¹, 陈炜聪¹, 冯文林¹, 腊蕾³, 贺松其^{1*}

(1. 南方医科大学 中医药学院, 广州 510515; 2. 中国人民解放军 第四五八医院, 广州 510602;

3. 南方医科大学 南方医院药学部, 广州 510515)

【摘要】 目的:通过研究鳖甲煎丸对四氯化碳(CCl₄)致大鼠肝纤维化的抑制作用及其对核转录因子-κB(NF-κB)信号通路信号分子及靶基因的影响,探讨鳖甲煎丸抗肝纤维化的作用机制。方法:使用 CCl₄ 复制肝纤维化大鼠模型,鳖甲煎丸药物溶液灌胃,8 周末腹主动脉采血,留肝组织检测指标。苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏病理形态学改变;酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠血清中肝纤维化 4 项,基质金属蛋白酶(MMP)-2, MMP-9, 组织基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)的表达;免疫组化法检测大鼠肝组织中 p65, 转化生长因子-β₁(TGF-β₁)的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肝组织中 p65, NF-κB 抑制蛋白(IκB)α, IκB 激酶(IKK)α/β, TGF-β₁ 的表达。结果:病理学结果显示模型组肝小叶被破坏,纤维组织增生严重,而鳖甲煎丸治疗组肝细胞坏死减少,纤维组织增生明显减少,纤维间隔薄;与模型组比较,鳖甲煎丸治疗组大鼠肝纤维化 4 项指标, TIMP-1 含量明显降低(P<0.05), 而 MMP-2, MMP-9 含量明显上升(P<0.05);免疫组化结果显示鳖甲煎丸治疗组肝组织 p65, TGF-β₁ 表达较模型组明显降低, Western blot 检测结果显示与模型组比较, 鳖甲煎丸治疗组肝组织中 p65, TGF-β₁ 蛋白表达明显减少(P<0.05), IκBα 蛋白表达明显增加(P<0.05), 而 IKKα/β 则无显著变化。结论:鳖甲煎丸能够显著减轻四氯化碳致大鼠肝纤维化的程度,减缓其发展,主要与鳖甲煎丸能够抑制 p65 的表达,从而阻断 NF-κB 信号通路,减少其下游靶基因 TIMP-1, TGF-β₁ 的合成,上调 MMP-2, MMP-9 的表达,从而加快细胞外基质的降解有关。

【关键词】 鳖甲煎丸; 大鼠肝纤维化模型; 核转录因子-κB; 信号分子; 靶基因

【中图分类号】 R22; R24; R285.5; R256.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2018)10-0161-07

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20180834

【网络出版地址】 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180123.1526.013.html>

【网络出版时间】 2018-01-25 10:07

Effect of Biejiajian Wan on NF-κB Signaling Pathway in Rat Hepatic Fibrosis Model Induced by CCl₄

CHEN Guan-xin¹, WEN Bin², SUN Hai-tao¹, SUN Jia-ling¹, YANG Xue-mei¹,

CHEN Wei-cong¹, FENG Wen-lin¹, LA Lei³, HE Song-qi^{1*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. No. 458 Hospital of PLA, Guangzhou 510602, China;

3. Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 **Objective:** To study the inhibitory effects of Biejiajian Wan on carbon tetrachloride (CCl₄) - induced hepatic fibrosis in rats and its effect on nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling pathway modules and target genes, in order to discuss the mechanism of Biejiajian Wan's anti-hepatic fibrosis. **Method:** CCl₄ was used to duplicate the rat model of hepatic fibrosis. Biejiajian Wan solution was administered by gavage. At the end of 8

【收稿日期】 20171025(001)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81373807)

【第一作者】 陈冠新,在读博士,从事肝病证的临床与实验研究, E-mail:164515260@qq.com

【通信作者】 *贺松其,博士,教授,主任医师,博士生导师,从事肝病证的临床与实验研究, Tel:020-61648247, E-mail:hesongqijz@126.com

weeks, blood sampling was collected from aorta abdominalis. Hepatic tissues were taken for detecting indexes. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the changes of livers' pathomorphology; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect four indicators of hepatic fibrosis, matrix metalloproteinases (MMP) -2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) -1 expressions in rat serum. Immunohistochemistry was applied to measure p65 and transforming growth factor (TGF) $-\beta_1$ expressions. Western blot was used to detect p65, inhibitor of NF- κ B (I κ B) α , inhibitor of NF- κ B kinase (IKK) α/β and TGF- β_1 expressions. **Result:** Pathological results showed that the hepatic lobule in the model group was destroyed, with serious proliferation of fibrous tissues. In the treatment group of Biejiajian Wan, both necrocytosis and proliferation of fibrous tissues were obviously reduced, while fibrous septum was thin. Compared with the model group, four indicators of hepatic fibrosis and TIMP-1 contents in the treatment group of Biejiajian Wan were significantly reduced ($P < 0.05$), while MMP-2 and MMP-9 contents were obviously increased ($P < 0.05$). Immunohistochemical results indicated that p65 and TGF- β_1 expressions of hepatic tissues in the treatment group of Biejiajian Wan were obviously reduced compared with those of the model group. According to Western blot results, compared with the model group, p65 and TGF- β_1 protein expressions of hepatic tissues in the treatment group of Biejiajian Wan were significantly decreased ($P < 0.05$), while I κ B α protein expression was obviously increased ($P < 0.05$). IKK α/β had no significant changes. **Conclusion:** Biejiajian Wan can significantly alleviate rat hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride and retard the development. Biejiajian Wan can inhibit p65 expressions, so as to block NF- κ B signaling pathway, reduce synthesis of downstream target genes TIMP-1 and TGF- β_1 , up-regulate MMP-2 and MMP-9 expressions, and further accelerate degradation of extracellular matrix.

[**Key words**] Biejiajian Wan; rat hepatic fibrosis model; nuclear factor-kappa B (NF- κ B); signaling molecule; target gene

肝纤维化是各种致病因子作用下引起肝脏损伤时的一种修复反应,是慢性肝病导致肝硬化的共同病理基础,目前已经成为危害健康的重要问题之一。细胞信号转导通路与肝纤维化密切相关,其中核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路调控免疫应答、创伤愈合反应并参与多种炎症因子的转录,在肝纤维化的发生、发展中具有关键的作用^[1]。

早期的肝纤维化治疗对逆转肝纤维化过程具有重要的意义。近年来对祖国传统医学的深入学习显示中医药抗肝纤维化具有较大的潜力。鳖甲煎丸出自东汉张仲景《金匮要略》,具有益气扶正、活血化瘀、软坚散结等功效,正切中医认为的肝纤维化“正虚血瘀”病机。笔者前期研究表明,鳖甲煎丸在肝纤维化治疗中有较好的作用^[2-3],且通过实验证明了鳖甲煎丸药物血清能够抑制肝星状细胞中NF- κ B信号通路的激活从而减少相关靶基因的表达^[4]。为进一步解释鳖甲煎丸体内抗肝纤维化的分子机制,本研究以四氯化碳致大鼠肝纤维化为研究对象,研究鳖甲煎丸对大鼠肝纤维化的抑制作用及其对NF- κ B信号通路信号分子NF- κ B, NF- κ B抑制蛋白(I κ B)和下游靶基因的影响,为鳖甲煎丸的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性Wistar大鼠48只,体质量(200 ± 20)g,SPF级,由南方医科大学实验动物中心提供,许可证号SYXK(粤)2016-0167。实验操作遵循《南方医科大学实验动物伦理和使用指南》进行(伦理审查号L2016038)。

1.2 药物 鳖甲煎丸(武汉中联药业集团股份有限公司,国药准字Z42020772),鳖甲煎丸药物组成为鳖甲胶、阿胶、蜂房(炒)、土鳖虫(炒)、鼠妇虫、蜣螂、大黄、桃仁、牡丹皮、射干、黄芩、柴胡、干姜、白芍(炒)、桂枝、葶苈子、石韦、厚朴(姜制)、瞿麦、姜半夏、硝石(精制)、党参。秋水仙碱(西双版纳药业有限公司,国药准字H53021369)。

1.3 试剂 四氯化碳(广州浩玛生物科技有限公司,批号C112044);透明质酸(HA),四型胶原(COL4),层粘连蛋白(LN),Ⅲ型前胶原(PCⅢ),基质金属蛋白酶-2(MMP-2),MMP-9,基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(武汉基因美科技有限公司,批号分别为JYM0401Ra, JYM0384Ra, JYM0846Ra, JYM0844Ra, JYM0505Ra, JYM0434Ra, JYM0435Ra);免疫组化试剂盒(福州迈新生物科技有限公司,批号KIT-

5001); p65, I κ B α , I κ B 激酶 (IKK) α/β , 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab16502, ab32518, ab178870, ab92486); 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (杭州贤至生物科技有限公司, 批号 AB-P-R001); BCA 法蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司, 批号 23225); 预染蛋白 marker (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 P0063)。

1.4 仪器 Multiskan FC 型酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); Mini-Protein 型电泳槽、转模仪, PowerPac 3000 型电泳电源 (美国 Bio-Rad 公司); PVDF 膜 (广州浩玛生物科技有限公司); Image Station 2000MM 成像系统 (美国 Kodak 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备^[5]及给药 48 只 Wistar 大鼠, 在 SPF 环境中饲养, 昼夜各半, 温度 2 $^{\circ}$ C, 相对湿度 50% ~ 60%, 普通饲料喂养并自由饮水。所有大鼠随机分为空白组, 模型组, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组, 秋水仙碱组, 每组 8 只。鳖甲煎丸低、中、高剂量组剂量为人剂量的 3.5, 7, 14 倍 (含生药 0.55, 1.1, 2.2 $g \cdot kg^{-1}$), 秋水仙碱组用量 0.11 $mg \cdot kg^{-1}$ 。除空白组注射等量花生油外, 其余各组大鼠首次皮下注射 40% 体积分数 CCl₄ 花生油 3 $mL \cdot kg^{-1}$, 以后每 3 d 注射 2 $mL \cdot kg^{-1}$, 共 8 周。首次注射后第 2 天开始给药, 给药方式为灌胃, 每 3 d 称质量 1 次以调整药量, 空白组灌服等量生理盐水, 共 8 周。第 8 周末次给药后, 使用 2% 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉采血, 4 $^{\circ}$ C 静置 4 h, 3 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 20 min, 分离血清, -80 $^{\circ}$ C 冷藏备用。取肝左叶, 一部分 10% 甲醛固定, 一部分 -80 $^{\circ}$ C 分装冷藏备用。

2.2 肝组织病理学观察 取肝组织石蜡切片行常规苏木素-伊红 (HE) 染色。切片常规脱蜡至水后, 染色严格按照说明书步骤操作。梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 在光学显微镜下观察组织损伤情况。

2.3 免疫组织化学法检测大鼠肝脏 p65, TGF- β_1 的表达水平 采用免疫组化 SP 法测定肝组织中 p65, TGF- β_1 的表达水平。石蜡切片脱蜡和水化后, PBS 冲洗 3 次, 将切片放入 0.01 $mol \cdot L^{-1}$ 柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中, 于微波炉内加热进行抗原修复, 自然冷却后, 按照说明书步骤进行阻断内源性过氧化物酶活性、封闭、滴加一抗 [p65 (1:200), TGF- β_1 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜] 及二抗, DAB 染色、苏木素复染、自来水冲洗返蓝, 梯度乙醇脱水, 二甲苯

透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察肝脏组织中 p65, TGF- β_1 的表达情况。采用 ImageJ 软件进行分析。

2.4 ELISA 检测大鼠血清中肝纤维化 4 项 (HA, CoL4, LN, PC III), MMP-2, MMP-9, TIMP-1 的表达水平 取大鼠分离血清, 严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行检测。将特异性抗原与固相载体联结形成固相抗原, 加稀释的受检血清, 保温反应, 血清中的特异抗体与固相抗原结合, 形成固相抗原-抗体复合物, 加入酶促反应底物, 发生显色反应, 测吸光度 A, 制作标准曲线以计算血清内所测因子含量。

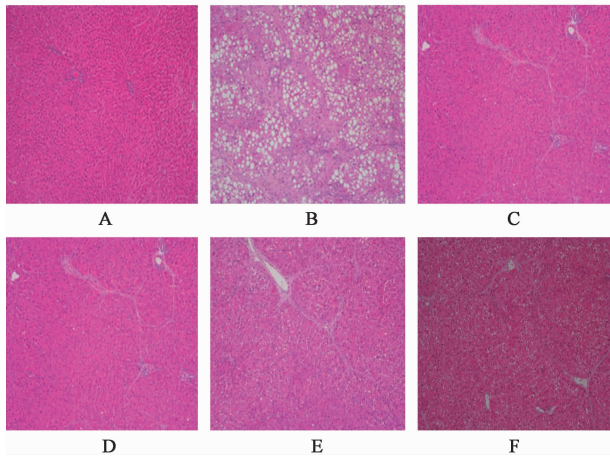
2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 p65, TGF- β_1 , I κ B α , IKK α/β 蛋白的表达水平 取大鼠肝组织, 按照蛋白提取试剂盒说明书提取总蛋白。BCA 蛋白定量法 (按照说明书进行) 测各组蛋白浓度。用细胞裂解液将各组蛋白稀释至等浓度, 与 5 \times 上样缓冲液按 4:1 混合, 98 $^{\circ}$ C 变性 5 min。每组取蛋白 60 μg , 12% SDS-PAGE 凝胶电泳 (90 V, 100 min), 转膜以恒流 90 mA, 转移 90 min 至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉室温摇床上封闭 1 h, 孵一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 封闭液稀释二抗 (1:2 000) 后, 常温下孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, ECL 发光试剂盒在曝光仪中进行曝光, 以内参 GAPDH 为对照, 采用 Image J 软件进行灰度分析。

2.6 统计学方法 实验于同一条件下进行检测, 应用 SPSS 19.0 分析数据, 数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 鳖甲煎丸对大鼠肝组织纤维化病理学的影响 正常组大鼠肝组织肝小叶结构完整, 肝细胞以中央静脉为中心呈条索状放射排列, 无炎性细胞浸润; 模型组大鼠肝组织肝小叶结构消失, 肝细胞肿胀坏死, 脂肪变性使得细胞呈空泡状, 可见假小叶形成; 鳖甲煎丸及秋水仙碱治疗组, 各组肝小叶结构较清晰, 纤维增生较模型减轻, 肝细胞坏死及炎性细胞浸润减少。见图 1。

3.2 鳖甲煎丸对大鼠血清中 HA, COL4, LN, PC III 表达水平的影响 与空白组比较, 各组血清中 HA, LN, PC III 表达水平明显上升 ($P < 0.05$), 模型组、鳖甲煎丸低、中剂量组 COL4 表达水平明显上升, 而鳖甲煎丸高剂量、秋水仙碱组则无差异。与模型组比较, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组及秋水仙碱组血清



A. 空白组; B. 模型组; C~E. 鳖甲煎丸低、中、高剂量组; F. 秋水仙碱组(图 2,3 同)

图 1 鳖甲煎丸对大鼠肝纤维化病理学的影响(HE, ×100)

Fig. 1 Effect of Biejiajian Wan on pathology of hepatic fibrosis (HE, ×100)

表 1 鳖甲煎丸对大鼠血清中 HA, COL4, LN, PCⅢ水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Biejiajian Wan on expression levels of HA, COL4, LN, PCⅢ in rat serum ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

ng · L⁻¹

组别	剂量/g · kg ⁻¹	HA	COL4	LN	PCⅢ
空白	-	48.32 ± 5.01	11.77 ± 1.65	45.74 ± 6.33	6.24 ± 1.56
模型	-	301.51 ± 26.53 ¹⁾	26.53 ± 3.00 ¹⁾	141.83 ± 9.40 ¹⁾	27.79 ± 4.54 ¹⁾
鳖甲煎丸	0.55	215.08 ± 14.38 ^{1,2)}	18.58 ± 1.48 ^{1,2)}	98.00 ± 10.04 ^{1,2)}	20.64 ± 2.96 ^{1,2)}
	1.1	166.78 ± 9.25 ^{1,2)}	14.52 ± 1.24 ^{1,2)}	81.15 ± 17.89 ^{1,2)}	13.73 ± 2.21 ^{1,2)}
	2.2	105.38 ± 13.32 ^{1,2)}	12.31 ± 1.10 ²⁾	57.86 ± 8.94 ^{1,2)}	8.04 ± 1.74 ^{1,2)}
秋水仙碱	0.000 11	100.93 ± 12.66 ^{1,2)}	12.68 ± 1.00 ²⁾	65.63 ± 18.07 ^{1,2)}	9.07 ± 2.01 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

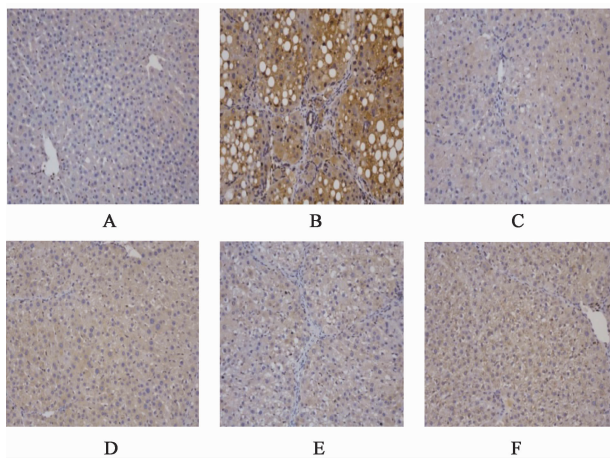


图 2 鳖甲煎丸对肝组织 p65 表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of Biejiajian Wan on expression of p65 in liver tissue (IHC, ×200)

($P < 0.05$), 鳖甲煎丸中、高剂量、秋水仙碱组明显降低($P < 0.05$), 而鳖甲煎丸低剂量组无明显变化; 模型组、鳖甲煎丸低、高剂量组 IκBα 表达明显上升

中 HA, COL4, LN, PCⅢ 的表达水平均明显降低($P < 0.05$), 表明鳖甲煎丸能够明显下调肝纤维化大鼠血清中 HA, COL4, LN, PCⅢ 的表达。见表 1。

3.3 鳖甲煎丸对大鼠肝组织 p65, TGF-β₁ 蛋白表达的影响 免疫组化结果显示, p65, TGF-β₁ 主要分布在细胞质中, 空白组大鼠肝组织中仅有少量 p65, TGF-β₁ 表达, 而模型组大鼠肝组织 p65, TGF-β₁ 表达明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组及秋水仙碱组其 p65, TGF-β₁ 的表达明显减少($P < 0.05$), 结果表明鳖甲煎丸能够降低肝纤维化大鼠肝组织内 p65, TGF-β₁ 蛋白的表达。见图 2, 图 3, 表 2。

3.4 鳖甲煎丸对大鼠肝组织中相关蛋白表达的影响 与空白组比较, 各组 IKKα/β, p65 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$); 模型组 TGF-β₁ 明显升高

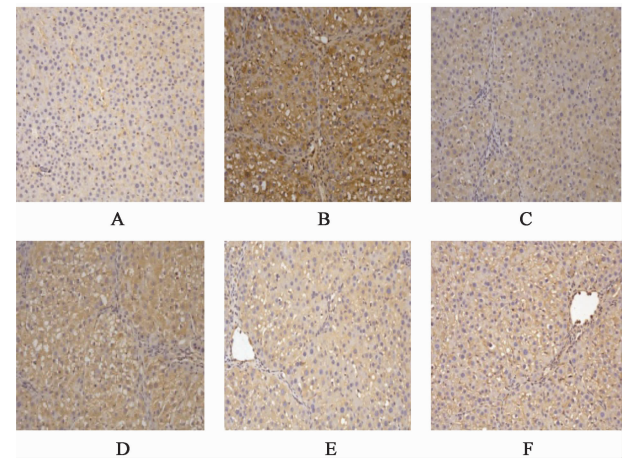


图 3 鳖甲煎丸对肝组织 TGF-β₁ 蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Effect of Biejiajian Wan on expression of TGF-β₁ in liver tissue

($P < 0.05$), 秋水仙碱组明显下降($P < 0.05$), 而鳖甲煎丸中剂量组无明显变化。与模型组比较, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组及秋水仙碱组 p65, TGF-β₁

表 2 鳖甲煎丸对肝组织 p65, TGF-β₁ 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Effect of Biejiajian Wan on expression of p65, TGF-β₁ in liver tissue($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	p65	TGF-β ₁
空白	-	17.35 ± 2.01	18.88 ± 3.21
模型	-	60.58 ± 7.64 ¹⁾	53.84 ± 4.64 ¹⁾
鳖甲煎丸	0.55	19.75 ± 2.48 ^{1,2)}	23.83 ± 1.62 ^{1,2)}
	1.1	22.89 ± 2.25 ^{1,2)}	43.52 ± 5.22 ^{1,2)}
	2.2	20.18 ± 2.32 ^{1,2)}	31.75 ± 3.99 ^{1,2)}
秋水仙碱	0.000 11	32.51 ± 3.66 ^{1,2)}	35.08 ± 3.41 ^{1,2)}

蛋白的表达明显减少($P < 0.05$), IκBα 蛋白的表达增加($P < 0.05$), 而 IKKα/β 蛋白的表达则无明显变化, 表明鳖甲煎丸能下调肝纤维化大鼠肝组织内

表 3 鳖甲煎丸对肝组织 IKKα/β, p65, TGF-β₁, IκBα 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Biejiajian Wan on expression of IKKα/β, p65, TGF-β₁, IκBα in liver tissue($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IKKα/β/GAPDH	p65/GAPDH	TGF-β ₁ /GAPDH	IκBα/GAPDH
空白	-	0.20 ± 0.02 ²⁾	0.41 ± 0.04 ²⁾	0.46 ± 0.08 ²⁾	0.26 ± 0.04 ²⁾
模型	-	0.52 ± 0.03 ¹⁾	0.78 ± 0.14 ¹⁾	1.02 ± 0.09 ¹⁾	0.11 ± 0.02 ¹⁾
鳖甲煎丸	0.55	0.54 ± 0.06 ¹⁾	0.59 ± 0.04 ^{1,2)}	0.42 ± 0.06 ²⁾	0.37 ± 0.03 ^{1,2)}
	1.1	0.53 ± 0.04 ¹⁾	0.50 ± 0.03 ^{1,2)}	0.29 ± 0.02 ^{1,2)}	0.29 ± 0.03 ²⁾
	2.2	0.52 ± 0.04 ¹⁾	0.26 ± 0.05 ^{1,2)}	0.25 ± 0.02 ^{1,2)}	0.40 ± 0.04 ^{1,2)}
秋水仙碱	0.000 11	0.58 ± 0.03 ¹⁾	0.53 ± 0.03 ^{1,2)}	0.20 ± 0.05 ^{1,2)}	0.17 ± 0.04 ^{1,2)}

3.5 鳖甲煎丸对大鼠血清中 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 表达水平的影响 与空白组比较, 各组大鼠血清中 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 表达水平均明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸中、高剂量组及秋水仙碱组 MMP-2 的表达明显上升($P < 0.05$), 而鳖甲煎丸低剂量组则无明显变化; 与模型

表 4 鳖甲煎丸对大鼠血清中 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Biejiajian Wan on expression levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 in rat serum($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MMP-2	MMP-9	TIMP-1
空白	-	19.66 ± 0.96 ²⁾	808.36 ± 22.35 ²⁾	0.30 ± 0.11 ²⁾
模型	-	2.75 ± 0.16 ¹⁾	116.73 ± 16.02 ¹⁾	1.84 ± 0.13 ¹⁾
鳖甲煎丸	0.55	3.49 ± 0.66 ¹⁾	114.53 ± 25.84 ^{1,2)}	1.57 ± 0.17 ^{1,2)}
	1.1	8.03 ± 0.41 ^{1,2)}	328.61 ± 26.93 ^{1,2)}	0.79 ± 0.09 ^{1,2)}
	2.2	13.94 ± 1.86 ^{1,2)}	414.43 ± 17.94 ^{1,2)}	0.47 ± 0.08 ^{1,2)}
秋水仙碱	0.000 11	13.87 ± 1.65 ^{1,2)}	459.65 ± 61.44 ^{1,2)}	0.80 ± 0.08 ^{1,2)}

4 讨论

肝纤维化是肝脏受到各种慢性炎症损伤时, 肝

p65, TGF-β₁ 蛋白的表达, 同时上调 IκBα 蛋白的表达, 而对 IKKα/β 蛋白的改变则不明显。见图 4, 表 3。

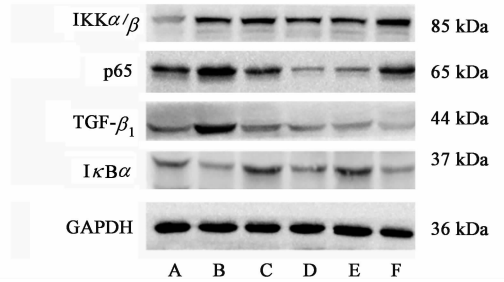


图 4 各组大鼠肝组织 IKKα/β, p65, TGF-β₁, IκBα 的表达

Fig. 4 Expression of IKKα/β, p65, TGF-β₁, IκBα in liver tissue of each group

组比较, 鳖甲煎丸中、高剂量组及秋水仙碱组 MMP-9 的表达明显上升($P < 0.05$), 鳖甲煎丸低剂量组虽有差异, 但趋势不如其他药物组明显; 与模型组比较, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组及 TIMP-1 的表达明显减少($P < 0.05$), 表明鳖甲煎丸能够下调 TIMP-1 的表达同时上调 MMP-2, MMP-9 的表达。见表 4。

细胞外基质异常分泌并沉积的可逆性创伤修复过程。本次实验当中, 使用 CCl₄ 进行大鼠肝纤维化造

模, CCl_4 进入肝脏 15 min 即可引起肝脏损伤, 且 48 h 内达到峰值, 随后进入肝脏修复过程^[5]。本次实验造模间隔为 3 d, 符合损伤-修复-损伤的过程, 且病理组织结果显示模型组肝小叶结构被破坏, 纤维组织增生严重, 说明造模成功。

研究表明, 秋水仙碱能够降低实验性肝纤维化大鼠血清中 TNF- α 及干扰素 (IFN)- γ 的浓度, 并且能减轻肝纤维化大鼠程度^[6], 因此选为本研究的阳性对照药。临床常用的肝纤维化指标有 4 项, 即 HA, PCⅢ, COL4, LN。研究表明, 血清 HA 的变化趋势与肝纤维化病理变化结果相一致^[7], 在放射性肝纤维化的研究上血清 HA 与其严重程度相关性最高^[8]。COL4 是基底膜的重要组成部分, 主要在肝内合成及代谢, 可作为抗肝纤维化疗效和观察的指标^[9]。LN 作为基底膜中特有非胶原糖蛋白, 其升高程度与肝纤维化及肝病严重程度呈正相关^[10]。本次实验当中, 鳖甲煎丸治疗组能够显著降低肝纤维化大鼠血清中 HA, PCⅢ, COL4, LN 的含量, 且结合肝脏病理组织切片观察, 鳖甲煎丸治疗组纤维化程度明显减轻, 表明鳖甲煎丸能够显著减缓大鼠肝纤维化的进程。

NF- κ B 信号通路是参与炎症反应的一条重要通路, 在调控免疫反应、抗细胞凋亡具有重要作用。NF- κ B 家族包括 5 个成员为 p50/p105, p52/p100, RelA (p65), RelB 和 c-Rel^[11], 其中 p65/p50 是经典 NF- κ B 信号通路起主要激活作用的二聚体, 且 p65 是最强的启动子^[12]。非激活状态下, NF- κ B 与 I κ B 组成无活性三聚体, 其中 I κ B α 是起主要作用的成员^[13]。多种刺激如脂多糖 LPS, 微环境产物、氧化应激反应均能激活 NF- κ B 信号通路, 细胞接受刺激之后 IKK (由 IKK γ , IKK α 和 IKK β 组成) 复合物被激活, 随后磷酸化 I κ B, 其后 p65/p50 富集并核内移, 最终激活 NF- κ B 信号通路, 启动一系列细胞因子的转录。本次实验当中, 模型组 p65, IKK 较空白组明显上升, I κ B α 明显减少, 表明肝纤维化发展进程当中, NF- κ B 信号通路活化增强, 加重炎症损伤, 且研究表明, NF- κ B 信号通路与肝纤维化的发生、发展密切相关, NF- κ B 信号通路参与了肝星状细胞 HSC 的活化、增殖^[14-15], 表明阻断 NF- κ B 信号通路能够达到抗肝纤维化的目的。鳖甲煎丸能够显著下调 p65 的表达, 上调 I κ B α 的表达, 而对 IKK α/β 则无显著效应, 表明鳖甲煎丸的抗肝纤维化的作用机制可能与阻断 NF- κ B 信号通路有关, 鳖甲煎丸阻断 NF- κ B 信号通路使其调控 HSC 活化、增殖的效应消

失, HSC 生长受到抑制, 从而达到抗肝纤维化的目的。

转化生长因子 TGF- β_1 是促肝纤维化的主要细胞因子之一^[16], 正常肝组织中 TGF- β_1 表达极低。肝损伤后, 大量炎症因子分泌促进了 NF- κ B 激活, 加速了 TGF- β_1 的合成, TGF- β_1 的上调又促进了 NF- κ B mRNA 的升高^[17], 加速了肝纤维化的发生发展。MMP-2, MMP-9 属于明胶酶类, 其主要作用是降解细胞外基质 (ECM)^[18], TIMP-1 是 MMPs 的抑制剂, 其可消除 MMP-2 降解 ECM 效果的同时阻止 HSC 的凋亡, 加重肝纤维化的程度^[19-20]。本次实验当中, 鳖甲煎丸能够降低肝纤维化大鼠肝组织中 TGF- β_1 , TIMP-1 的表达, 且上调 MMP-2, MMP-9 的表达, 这表明鳖甲煎丸通过阻断 NF- κ B 信号通路抑制了下游靶基因 TGF- β_1 , TIMP-1 的表达; 结合病理组织切片结果, 鳖甲煎丸用药组纤维增生明显减少, ECM 沉积减少, 这种效应与鳖甲煎丸能够降低 TIMP-1 的表达, 上调 MMP-2, MMP-9 的表达从而加快 ECM 的降解有关。

鳖甲煎丸由鳖甲为主药的 23 味中药组成, 原治于疟疾日久不愈结成疟母以及胁下癥结, 具有益气扶正、活血化瘀、软坚散结等功效, 现代多用于抗肝纤维化的治疗, 而且费用低廉, 用药方便, 具有较好的临床应用价值。本次实验研究表明鳖甲煎丸能够明显减轻 CCl_4 致大鼠肝纤维化的程度, 降低肝纤维化大鼠血清中 HA, PCⅢ, COL4, LN 的含量, 而且能够减轻肝组织中 ECM 的沉积, 这主要是因为鳖甲煎丸能够抑制 TIMP-1 的生成, 上调 MMP-2, MMP-9, 正符合其“软坚散结”的功效。鳖甲煎丸抗肝纤维化的作用机制可能与下调 p65 的表达, 上调 I κ B α 的表达, 从而阻断 NF- κ B 信号通路, 抑制下游靶基因 TGF- β_1 , TIMP-1 的表达有关。

[参考文献]

- [1] WENG T C, SHEN C C, CHIU Y T, et al. Effects of artemisinin against hepatic fibrosis induced by thioacetamide in rats[J]. *Phytother Res*, 2012, 26(3): 344-353.
- [2] 陈瑞玉, 贺松其, 程旸, 等. 鳖甲煎丸治疗慢性乙型肝炎肝纤维化疗效观察[J]. *新中医*, 2011, 43(3): 34-35.
- [3] 姚飞龙, 贺松其, 吕志平, 等. 鳖甲煎丸联合阿德福韦酯治疗乙型肝炎后肝硬化 50 例疗效观察[J]. *新中医*, 2011, 43(4): 31-32.
- [4] 陈冠新, 文彬, 孙海涛, 等. 鳖甲煎丸对大鼠肝星状细

- 胞中 NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中成药, 2017, 39(7):1355-1360.
- [5] 郑君, 林晓春, 胡建兰, 等. 四氯化碳致大鼠肝纤维化模型的建立[J]. 安徽医学, 2014, 35(5):553-555.
- [6] 孙嘉临, 王先化. 秋水仙碱对实验性大鼠肝纤维化的影响[J]. 中国现代医生, 2012, 50(14):1-2.
- [7] 陈江, 陈玉满, 夏勇, 等. 大鼠肝纤维化复合模型的建立及动态观察[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(3):547-550.
- [8] 肖蕾, 王云莲, 艾力江·吐尔逊, 等. 血清透明质酸, IV型胶原、层粘连蛋白与小鼠放射性肝纤维化的相关性研究[J]. 中华全科医学, 2015, 13(1):18-20.
- [9] DING X C, MA L N, LI Y F, et al. Association between serum platelet-derived growth factor BB and degree of liver damage, fibrosis and hepatitis B e antigen (HBeAg) status in CHB patients[J]. Hepatogastroenterol, 2012, 59(120):2357-2360.
- [10] 王军, 赵权, 路颖, 等. 血清层粘连蛋白水平检测对肝病患者肝纤维化的诊断意义[J]. 实用医药杂志, 2011, 28(2):106-107.
- [11] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFkappaB system[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2016, 8(3):227-241.
- [12] LI Q, Verma I M. NF-kappa B regulation in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(10):725-734.
- [13] Luedde T, Robert F. Schwabe. NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(2):108-118.
- [14] Flohe L, Brigelius F R, Saliou C. Reox regulation of NF kappa B activation[J]. Free Radic Biol Med, 1997, 22(6):1115-1126.
- [15] PING J, GAO A M, QIN H Q, et al. Indole-3-carbinol enhances the resolution of rat liver fibrosis and stimulates hepatic stellate cell apoptosis by blocking the inhibitor of κ B kinase α /inhibitor of κ B- α /nuclearfactor- κ B pathway[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2011, 339(2):694-703.
- [16] YANG J W, Hien T T, Lim S C, et al. Pin1 induction in the fibrotic liver and its roles in TGF- β_1 expression and Smad2/3 phosphorylation[J]. J Hepatol, 2014, 60(6):1235-1241.
- [17] 刘雪萍, 韦啟球, 李振明, 等. 排钱草对食蟹猴肝纤维化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24):133-140
- [18] Kurzepa J, Mađro A, Czechowska G, et al. Role of MMP-2 and MMP-9 and their natural inhibitors in liver fibrosis, chronic pancreatitis and non-specific inflammatory bowel diseases[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2014, 13(6):570-579.
- [19] Leroy V, Monier F, Bottari S, et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with P III NP and hyaluronic acid[J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99(2):271-279.
- [20] Consolo M, Amoroso A, Spandidos D A, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease[J]. Int J Mol Med, 2009, 24(2):143-152.

[责任编辑 全燕]