

扶脾柔肝方配方颗粒对肝纤维化大鼠肝组织诱导型 一氧化氮合酶表达的影响

安祯祥, 何远利*, 王敏

(贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550001)

[摘要] **目的:**观察扶脾柔肝方配方颗粒对肝纤维化大鼠肝组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响,并探讨其作用机制。**方法:**SD大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、秋水仙碱($0.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、扶正化瘀($0.415\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、扶脾柔肝方配方颗粒高、中、低剂量($80,40,20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,采用四氯化碳复合乙醇诱导大鼠肝纤维化模型,造模8周成功后,分别给予相应药物 ig ,每日1次,连续4周,正常组、模型组 ig 等体积生理盐水。第12周末,检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),透明质酸(HA);苏木素伊红(HE)染色观察肝组织病理情况;采用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)及免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肝组织iNOS mRNA和蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠血清中ALT,AST,HA含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组、扶正化瘀组、扶脾柔肝方低、中剂量组血清中的ALT,AST含量均明显降低($P<0.05$),高剂量组ALT,AST含量显著降低($P<0.01$),秋水仙碱组、扶正化瘀组、扶脾柔肝方中剂量组血清中的HA含量明显降低($P<0.05$),扶脾柔肝方高剂量组HA含量显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,各药物干预组肝组织内纤维化程度均有不同程度减轻($P<0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠肝组织iNOS mRNA和蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各药物干预组大鼠肝组织iNOS mRNA和蛋白表达显著降低($P<0.01$),其中以扶脾柔肝方高剂量组最明显。**结论:**扶脾柔肝方配方颗粒下调纤维化肝组织iNOS mRNA和蛋白表达水平,可能是其抗肝纤维化作用机制之一。

[关键词] 扶脾柔肝方配方颗粒; 肝纤维化; 诱导型一氧化氮合酶; 丙氨酸氨基转移酶; 天门冬氨酸氨基转移酶; 透明质酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0100-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180100

Effect of Fupi Rougan Formula Granule on Liver Tissue iNOS Expression in Hepatic Fibrosis Rats

AN Zhen-xiang, HE Yuan-li*, WANG Min

(The First Affiliated Hospital of Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Fupi Rougan formula granule on liver tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in hepatic fibrosis rats and explore its action mechanism. **Method:** SD rats were randomly divided into normal group, model group, colchicine group ($0.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Fuzheng Huayu group ($0.415\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Fupi Rougan low-dose ($20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, Fupi Rougan middle-dose ($40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, and Fupi Rougan high-dose ($80\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group. SD rat models of hepatic fibrosis were induced by carbon tetrachloride composite ethanol (CCl_4). After 8 weeks, the rats in various groups were given with corresponding drug intervention respectively by intragastric administration, once daily for 4 weeks. The rats in normal group and model group were given with normal saline. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate

[收稿日期] 20160306(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460726);贵州省科技计划课题项目(黔科合SY字[2012]3146);贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合KY字[2012]041号)

[第一作者] 安祯祥,博士,副主任医师,从事中西医结合防治消化系统疾病的基础及临床研究,Tel:0851-85636327,E-mail:407206115@qq.com

[通讯作者] *何远利,主治医师,从事老年疾病的基础及临床研究,Tel:0851-85639375,E-mail:66587934@qq.com

aminotransferase (AST) and hyaluronic acid (HA) of rat serum were detected at the end of 12th week. HE staining was used to observe the pathological changes in liver tissue. Fluorescence Real-time PCR and Western blot assay were used to detect mRNA and protein expression levels of iNOS in rat liver tissues. **Result:** As compared with normal group, the contents of ALT, AST and HA in rat serum were significantly increased in model group ($P < 0.01$). As compared with model group, the contents of ALT and AST in colchicine group, Fuzheng Huayu group, Fupi Rougan low-dose group and Fupi Rougan middle-dose group were decreased ($P < 0.05$), the contents of ALT and AST in Fupi Rougan high-dose group were significantly increased ($P < 0.01$), the contents of HA in rat serum of colchicine group, Fuzheng Huayu group and Fupi Rougan middle-dose group were decreased ($P < 0.05$), the content of HA in Fupi Rougan high-dose group was significantly decreased ($P < 0.01$). As compared with model group, the liver tissues fibrosis was relieved in various degrees in each drug intervention group ($P < 0.05$). As compared with normal group, the mRNA and protein expression levels of the rat liver tissue iNOS were significantly increased in model group ($P < 0.01$). As compared with model group, the mRNA and protein expression levels of the rat liver tissue iNOS were significantly decreased ($P < 0.01$) in each drug intervention group, especially in Fupi Rougan high-dose group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The Fupi Rougan formula granule can reduce the mRNA and protein expression levels of the liver fibrosis tissue iNOS. It may be one of the anti-hepatic fibrosis mechanisms.

[**Key words**] Fupi Rougan formula granule; hepatic fibrosis; inducible nitric oxide synthase; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase; hyaluronic acid

肝纤维化(HF)是各种原因所引起的慢性肝病向肝硬化、肝癌发展的必经中间环节,其细胞学基础是肝星状细胞(HSC)活化增殖及表型转化,导致细胞外基质(ECM)的增生与降解失去平衡,肝脏内纤维组织异常沉积的病理过程。轻者称为肝纤维化,重者伴有肝小叶结构改建、假小叶及结节形成,称为肝硬化。目前仍无有效的抗肝纤维化药物,实验研究中常选择秋水仙碱作为对照药物。肝纤维化涉及多个病理途径与环节,单一作用环节的药物难以对复杂病理发挥综合效应。中医药多层次、多环节、多靶点的复合作用是中药复方抗纤维化的特色优势。一氧化氮(NO)是一种脂溶性的具有自由基性质的气体^[1],能够与活性氧反应生成活性氮,通过硝基酪氨酸的生成,导致细胞损伤,加重肝病,这个过程称为硝化应激^[2]。一氧化氮合酶(NOS)是NO生成的主要限速酶,正常情况下,NO主要是在内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的催化下生成,在病理因素的刺激下,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达大量上调和活化,持续催化产生大量NO,从而对肝脏产生毒性作用^[3]。低浓度的NO抑制HSC增生移行和促进凋亡^[4],下调HSC中I型胶原基因合成和蛋白表达^[5-6]。《肝纤维化中西医结合诊疗指南》明确提出肝纤维化病机为正虚血瘀,针对正虚血瘀的中成药扶正化瘀胶囊在临床广泛使用。贵阳中医学院第一附属医院名老中医孙定隆教授依据“见肝之

病,知肝传脾,当先实脾”的思想,通过多年的临床实践研究,自拟“扶脾柔肝汤”治疗慢性肝病,该方益气健脾助运,活血化瘀,运用10余年,取得了显著的临床疗效^[7-9]。为深入探讨其作用机制,本研究采用四氯化碳(CCl₄)复合乙醇诱导大鼠肝纤维化模型,设置秋水仙碱及扶正化瘀胶囊为对照,探讨扶脾柔肝汤配方颗粒抗肝纤维化的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD雄性大鼠70只,SPF级,体重160~200g,购自重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司,合格证号SCXK(军)2012-0011。饲养于贵阳中医学院实验动物中心,实验期间大鼠自由取食、饮水。

1.2 药物及试剂 扶脾柔肝方配方颗粒组成:黄芪7.5g(批号1504001w,7.5g相当于临床使用量30g),白术6g(批号1502001w,6g相当于临床使用量30g),苍术2.5g(批号1502001w,2.5g相当于临床使用量15g),薏苡仁6g(批号1502001s,6g相当于临床使用量30g),当归4.5g(批号1502002w,4.5g相当于临床使用量15g),牛膝6g(批号1502001w,6g相当于临床使用量15g),丹参4.5g(批号1503002s,4.5g相当于临床使用量30g),莪术1.5g(批号1503001w,1.5g相当于临床使用量15g),枳壳2.5g(批号1410001w,2.5g相当于临床使用量15g),所有中药饮片由华润三九医药股份有限公司制备为配方颗粒,由贵阳中医学院第一

附属医院颗粒药房分发。扶正化瘀胶囊(上海黄海制药有限责任公司,国药准字 Z200220073);秋水仙碱(滇虹药业集团玉溪生物制药有限公司,国药准字 H53021904); CCl_4 (天津市光复科技发展有限公司,批号 20120506);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基酸转移酶(AST)(贝克曼库尔特实验系统有限公司,批号分别为 2001-0367,2001-0367);血清透明质酸(HA,郑州安图生物技术有限公司,批号 20140709);蛋白抽提试剂盒,SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, β -肌动蛋白(β -actin)一抗,一步法 WB(HRP)快速二抗试剂盒,ECL 荧光显影剂(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为 CW0002, CW0022, CW0096A, CW2030, CW0048A);iNOS 一抗(Assay Biotech 公司,批号 P35228);Trizol 总 RNA 提取试剂[天根生化科技(北京)有限公司,批号 DP405-02]。引物由 Invitrogen 公司合成,iNOS(229 bp):上游 5'-CAGCATCCACGCCAAGAACG-3',下游 5'-CACAGTTTGGTCTGGCGAAG-3'。GAPDH(131 bp):上游 5'-CCTTCCGTGTTCCCTACCCC-3',下游 5'-GCCCAGGATGCCCTTTAGTG-3'。

1.3 仪器 ADVIA 2400 型全自动生化分析仪(德国西门子公司),ADCCLIA 400 型全自动化学发光免疫分析仪(烟台艾德康公司),164-5050 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),TGL-20M 型台式高速冷冻离心机(长沙湘仪贝克仪器仪表有限公司),ZS-2 型板式酶标仪(北京新风公司),Nanodrop 2000 型紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司),ABI7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 实验用 CCl_4 和乙醇复合诱导建立大鼠肝纤维化模型^[10]。大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组、扶正化瘀组、扶脾柔肝方低、中、高剂量组,各 10 只。除正常组外,其余各组用 50% CCl_4 橄榄油溶液($1.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)*ip* 造模,每周 2 次,并从实验第 2 周 *ig* 30% 乙醇($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),隔天 1 次造模。正常组采用等量橄榄油 *ip* 和生理盐水 *ig*。实验第 8 周,从造模动物中随机抽取 1 只大鼠及 1 只正常组大鼠处死,作肝纤维化病理学检查,按照《病毒性肝炎防治方案》^[11]肝纤维化分期标准来判断肝纤维化程度,直到有 2 期以上肝纤维化形成,即确定肝纤维化模型复制成功。

2.2 给药 造模 8 周经病理切片证实肝纤维化形成,从第 9 周起开始给药,各组大鼠按照 $10 \text{ mL} \cdot$

$\text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ *ig* 给药,持续 4 周。正常组及模型组给予相应剂量生理盐水 *ig*;秋水仙碱组 *ig* 秋水仙碱 $0.0002 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;扶正化瘀组 *ig* 扶正化瘀胶囊 $0.415 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;扶脾柔肝方高、中、低剂量组分别 *ig* 80,40,20 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 扶脾柔肝方配方颗粒,按照人与动物间体表面积折算计算大鼠扶脾柔肝方配方颗粒的等效剂量为 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,以之作为低剂量,等效剂量的 2,4 倍作为中、高剂量,将 1 剂药 195 g 溶于 48.75 mL 生理盐水中作为中剂量组,低、高剂量进行相应稀释与浓缩。大鼠每周称体重,并按体重改变调整药物剂量。给药至 12 周末。

2.3 取材 给药结束后,禁食 12 h,称重,腹主动脉采血,离心分离血清,采血后处死动物,剖取肝脏,提取肝组织做病理学检查和分子生物学指标检测。取各组肝脏右叶相同部位组织置于 4% 福尔马林固定,作常规石蜡切片,按照《病毒性肝炎防治方案》^[11]肝纤维化分期标准来判断肝纤维化程度,在光镜观察下观察肝内部结构、肝细胞炎症程度以及肝纤维化组织增生情况。其余标本 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.4 血清 ALT,AST,HA 测定 严格按试剂盒要求测定血清 ALT,AST,HA 的水平。

2.5 肝组织病理检测 肝组织常规甲醛固定,石蜡包埋,切片,石蜡切片苏木素伊红(HE)染色,光镜下观察肝组织病理学变化。

2.6 荧光定量 PCR 法检测肝组织 iNOS mRNA 表达 每组取 3 个标本,采用 Trizol 总 RNA 提取试剂进行样本 RNA 提取,测定 RNA 纯度及浓度。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录。用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus),ROX plus 进行扩增。扩增条件:95 $^\circ\text{C}$ 30 s,95 $^\circ\text{C}$ 5 s,60 $^\circ\text{C}$ 40 s,45 个循环。以 GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法来表示目的基因 mRNA 的相对含量。

2.7 免疫印迹法(Western blot)法检测肝组织 iNOS 蛋白表达 每组取 3 个标本,剪取一定量的肝脏组织,加入组织蛋白提取液,匀浆,冰浴 20 min,4 $^\circ\text{C}$ 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清,测定蛋白浓度,蛋白变性。蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,分离后转移到 PVDF 膜,室温封闭,一抗(1:500)4 $^\circ\text{C}$ 反应过夜,封闭,二抗(1:200)反应 5 min,封闭,洗涤,ECL 化学发光和曝光显影。以 β -actin 作为内参,用目的蛋白/ β -actin 表示该目的蛋白的相对表达。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件,实验数据

以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,等级资料比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 扶脾柔肝方配方颗粒对大鼠一般状态的影响 8 周末解剖正常组、造模组各 1 只大鼠,观察发现造模组纤维化已经形成,至第 12 周末处死大鼠,正常组无大鼠死亡,其余各组共死亡大鼠 14 只,死亡率约 20.6%。正常组大鼠状态良好,皮毛有光泽,行为正常,体重逐渐增加。模型组大鼠一般情况差,皮毛干涩,行为迟钝,活动和饮食减少,有扎堆现象,体

重增长缓慢。其余各组一般状态较模型组有所改善。

3.2 扶脾柔肝方配方颗粒对大鼠血清中 ALT, AST, HA 的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中 ALT, AST, HA 含量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组、扶正化瘀组、扶脾柔肝方低、中剂量组血清中的 ALT, AST 含量均明显降低 ($P < 0.05$),扶脾柔肝方高剂量组 ALT, AST 含量显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,秋水仙碱组、扶正化瘀组、扶脾柔肝方中剂量组大鼠血清中的 HA 含量均明显降低 ($P < 0.05$),扶脾柔肝方高剂量组 HA 含量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 扶脾柔肝方对肝纤维化大鼠 ALT, AST, HA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Fupi Rougan formula granule on serum ALT, AST and HA contents in hepatic fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	HA/μg·L ⁻¹
正常	-	9	61.5 ± 13.6	122.1 ± 25.6	207.0 ± 103.5
模型	-	8	96.5 ± 38.2 ¹⁾	183.1 ± 36.2 ¹⁾	403.6 ± 155.3 ¹⁾
秋水仙碱	0.000 2	7	72.7 ± 20.4 ²⁾	136.1 ± 24.0 ²⁾	254.4 ± 100.6 ²⁾
扶正化瘀	0.415	8	68.2 ± 22.5 ²⁾	138.4 ± 21.0 ²⁾	250.8 ± 111.8 ²⁾
扶脾柔肝方	20	8	72.7 ± 17.9 ²⁾	141.4 ± 32.2 ²⁾	297.2 ± 110.6
	40	7	67.6 ± 14.2 ²⁾	132.1 ± 30.2 ²⁾	266.0 ± 115.5 ²⁾
	80	7	63.2 ± 14.8 ³⁾	125.5 ± 23.9 ³⁾	241.0 ± 94.9 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 扶脾柔肝方配方颗粒对大鼠肝组织病理学变化的影响 正常组肝小叶结构完整,肝细胞索呈放射性规则排列,汇管区无纤维组织增生。模型组肝小叶结构破坏,正常肝细胞减少,纤维组织增生,形成大小不一的典型假小叶结构,伴炎性细胞浸润。各药物组与模型组比较有一定改善。肝纤维化 S4 期结果经 Kruskal-Wallis 检验,提示模型组的肝纤维化分期较其余组显著升高 ($P < 0.01$);与模型组的肝纤维化分期比较,秋水仙碱组、扶正化瘀组、扶脾柔肝方中、高剂量组 S4 期显著降低 ($P < 0.01$),扶脾柔肝 S4 低剂量组分期亦明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2,图 1。

表 2 扶脾柔肝方对大鼠肝纤维化分期的影响

Table 2 Effect of Fupi Rougan formula granule on stage of hepatic fibrosis model rats

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	S0 期	S1 期	S2 期	S3 期	S4 期
正常	-	9	9	0	0	0	0
模型	-	8	0	0	1	3	4 ¹⁾
秋水仙碱	0.000 2	7	1	2	4	0	0 ²⁾
扶正化瘀	0.415	8	2	4	2	0	0 ²⁾
扶脾柔肝方	20	8	0	3	3	1	1 ²⁾
	40	7	1	2	2	1	0 ³⁾
	80	7	2	3	2	0	0 ³⁾

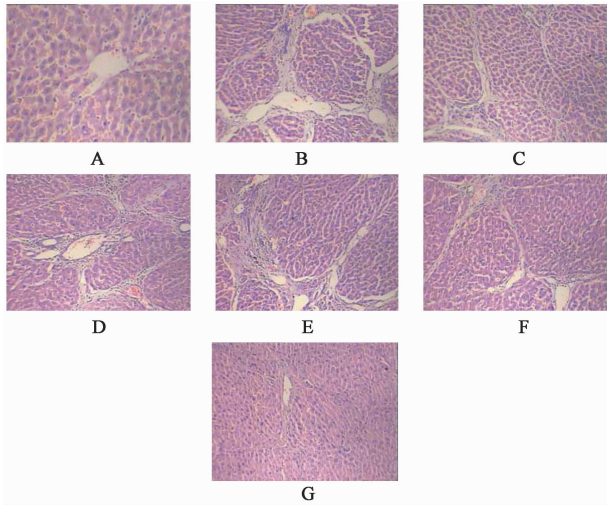
3.4 扶脾柔肝方配方颗粒对肝组织 iNOS mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 iNOS mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$)。与模型组比较,秋水仙碱组、扶正化瘀组、扶脾柔肝方低、中、高剂量组肝组织中 iNOS mRNA 表达显著下调 ($P < 0.01$)。见表 3。

秋水仙碱组、扶正化瘀组、扶脾柔肝方低、中、高剂量组肝组织 iNOS 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$);与秋水仙碱组比较,扶脾柔肝方低、中、高剂量组肝组织 iNOS 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$),扶正化瘀组 iNOS 蛋白表达亦有降低 ($P < 0.05$);与扶正化瘀组比较,扶脾柔肝方低、中、高剂量组肝组织 iNOS 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。见表 3,图 2。

3.5 扶脾柔肝方配方颗粒对肝组织 iNOS 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织 iNOS 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,秋

4 讨论

中医文献中并无“肝纤维化”病名以及对肝纤



A. 正常组; B. 模型组; C. 秋水仙碱 (0.000 2 g·kg⁻¹) 组; D. 扶正化瘀 (0.415 g·kg⁻¹) 组; E~G. 扶脾柔肝方 (20, 40, 80 g·kg⁻¹) 组 (图 2 同)

图 1 扶脾柔肝方对肝纤维化大鼠肝组织病理变化的影响 (HE, × 200)

Fig. 1 Effect of Fupi Rougan formula granule on pathological changes in liver tissues of hepatic fibrosis rats (HE, × 200)

表 3 扶脾柔肝方对大鼠肝组织中 iNOS mRNA 和蛋白相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Fupi Rougan formula granule on iNOS mRNA and protein expression levels in liver tissues ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	iNOS mRNA	iNOS 蛋白
正常	-	1.095 ± 0.598	0.626 ± 0.031
模型	-	3.970 ± 1.123 ¹⁾	1.785 ± 0.145 ¹⁾
秋水仙碱	0.000 2	1.440 ± 0.656 ²⁾	1.201 ± 0.114 ²⁾
扶正化瘀	0.415	1.139 ± 0.323 ²⁾	1.018 ± 0.157 ^{2,4)}
扶脾柔肝方	20	1.257 ± 0.315 ²⁾	0.595 ± 0.041 ^{2,3,5)}
	40	1.118 ± 0.260 ²⁾	0.619 ± 0.035 ^{2,3,5)}
	80	0.828 ± 0.477 ²⁾	0.022 ± 0.007 ^{2,3,5)}

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.01;与模型组比较²⁾ P < 0.01;与秋水仙碱组比较³⁾ P < 0.01,⁴⁾ P < 0.05;与扶正化瘀组比较⁵⁾ P < 0.01。

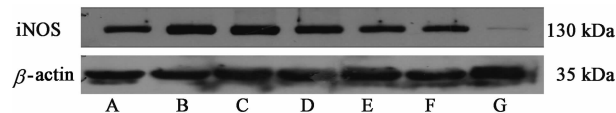


图 2 扶脾柔肝方对肝纤维化大鼠肝组织 iNOS 蛋白表达的影响
Fig. 2 Effect of Fupi Rougan formula granule on iNOS protein expression in liver tissues of hepatic fibrosis rats

维化的中医病因、病机的描述, HF 临床表现为胁肋胀痛、黄疸、肋下痞块等, 可将其归属于“胁痛、癥瘕、积聚、黄疸、鼓胀”等范畴。目前大多数医家认为, 肝纤维化基本证候是正虚血瘀, 正虚主要表现为

气虚, 血瘀则主要表现为瘀血阻络。其中血瘀是肝纤维化形成的基本病机, 也是各种肝病最根本、最重要的病理改变^[12]。扶脾柔肝方配方颗粒以扶正健脾助运, 活血化瘀为组方原则, 方中大剂量黄芪、白术、薏苡仁健脾助运, 3 药共为君药, 扶正健脾以治其本, 苍术、当归为臣药, 用苍术合积壳理气宽中, 以资化源, 当归、丹参、牛膝、莪术活血化瘀, 软化增生病变, 疏通血流, 缓解纤维化及结节的产生, 促进纤维化的逆转, 全方柔肝健脾, 标本同治, 改善肝纤维化。

肝脏假小叶反映肝脏纤维化程度, 研究发现模型组正常肝小叶结构破坏, 纤维组织增生, 形成大小不一的典型假小叶结构, 伴炎性细胞浸润, 表明造模成功。与模型组比较, 扶脾柔肝方配方颗粒各剂量组的肝纤维化分期明显降低, 说明该方具有一定的抗肝纤维化作用。ALT, AST 是反映肝细胞膜及细胞器损害的灵敏指标; HA 由肝星状细胞合成, 经血液循环到达肝血窦内皮细胞降解。肝脏受损时, HA 合成增多, 降解减少, HA 水平是反映肝纤维化最具价值的血清学指标^[13]。与正常组比较, 模型组大鼠血清中 ALT, AST, HA 含量明显升高, 结合病理, 提示肝细胞受损、肝纤维化; 与模型组比较, 扶脾柔肝方各剂量组血清中的 ALT, AST, HA 含量均降低, 说明扶脾柔肝方具有一定的保肝降酶、抗肝纤维化作用。

NO 是一种反应极强的自由基, 参与信息传递、介导炎症反应、引起血管扩张等^[14]。机体内多种细胞均能利用 L-精氨酸合成 NO, 其合成过程需要在特异性的 NOS 作用下完成^[15]。NOS 有 3 种亚型, 分神经元型 (nNOS), 内皮型 (eNOS) 和诱生型 (iNOS)。NO 在肝脏中所发挥的作用依赖催化其生成的 NOS 类型, 在肝脏中不同亚型 NOS 所起的作用也不同^[16]。肝脏内主要有 eNOS 和 iNOS 2 种, eNOS 表达于肝内血管和血窦内皮细胞, 生理状态下, 肝组织中主要表达 eNOS, 产生低浓度的 NO, 对组织器官起保护作用; iNOS 则存在于肝细胞, Kupffer 细胞和肝星状细胞, iNOS 生成不依赖 Ca²⁺ 浓度升高, 病理状态下, 在各种刺激因子作用下, iNOS 诱导性表达增加, 大量合成 NO, 介导广泛的毒性作用^[17-18]。在氧化应激造成的肝损伤中, iNOS 的表达与肝细胞坏死程度有关^[19]。在肝硬化患者或动物肝纤维化模型中, NO 生成量随病理损伤持续发展而增加, 呈高水平表达^[20]。肝纤维化模型中血清 NOS 浓度增高, 肝硬化患者肝组织中 iNOS mRNA

表达增高^[21-22]。抑制 iNOS 合成,能改善大鼠的肝纤维化程度^[23]。实验发现,与正常组比较,模型组大鼠肝组织 iNOS 基因和蛋白表达明显升高,提示 iNOS 可能参与肝纤维化的形成;与模型组比较,扶脾柔肝方明显降低大鼠肝组织 iNOS mRNA 和蛋白表达,其中以扶脾柔肝方高剂量组最明显,提示扶脾柔肝方抗肝纤维化的作用机制可能与抑制肝组织局部 iNOS 合成有关。

研究发现通过扶脾柔肝方配方颗粒干预实验性大鼠肝纤维化模型,发现该方具有较好的降低肝脏炎症、抗纤维化作用,揭示其机制可能与降低大鼠肝组织 iNOS mRNA 和蛋白表达,抑制肝组织局部 iNOS 合成有关。

[参考文献]

[1] Vogl S, Petermann H, Dargel R. Oxygen radical formation, proliferative activity and phagocytic capacity of cultivated macrophages from cirrhotic rat livers[J]. *Liver*, 1996, 16(5):313-320.

[2] 林琳,周俊英. 硝化应激在酒精性肝病中的作用[J]. *国际内科学杂志*, 2009, 36(5):264-267.

[3] Huang H C, Wang S S, Chan C Y, et al. Role of hepatic nitric oxide synthases in rats with thioacetamide-induced acute liver failure and encephalopathy[J]. *J Chin Med Assoc*, 2007, 70(1):16-23.

[4] 胡志伟,陈澍,张凯伦,等. 曲格列酮对凝血酶诱导的内皮细胞诱导型一氧化氮合酶和黏附分子表达的抑制作用[J]. *中国循环杂志*, 2007, 22(2):142-145.

[5] Deleve L D, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence [J]. *Hepatology*, 2008, 48: 920-930.

[6] Kawada N, Kuroki T, Uoya M, et al. Smooth muscle alphaactin expression in rat hepatic stellate cell is regulated by nitric oxide and cGMP production [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 229 (229): 238-242.

[7] 孙定隆. 自拟扶脾柔肝汤治疗肝硬化 33 例小结[J]. *贵阳中医学院学报*, 1998, 20(2):21-22.

[8] 陈颜,张东兰,杨景林,等. 自拟扶脾柔肝汤治疗肝硬化腹水的疗效观察[J]. *贵阳中医学院学报*, 2012, 34(4):31-34.

[9] 黄丹,孙定隆,王敏,等. 扶脾柔肝汤治疗肝硬化 40 例临床报道[J]. *贵阳中医学院学报*, 2015, 37(5): 51-53.

[10] 安祯祥,何远利,王敏. 四氯化碳不同给药途径复合

乙醇诱导大鼠肝纤维化模型的研究[J]. *贵州医药*, 2016, 40(1):6-8.

[11] 中华医学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6):324-329.

[12] 雷娜,郑仕中,陆茵. 活血化痰类中药防治肝纤维化的机制及研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(2):265-268.

[13] 陆伦根,曾德明. 肝纤维化的诊断和评估[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(8):603-604.

[14] Amaro M J, Bartolome J, Pardo M, et al. Decreased nitric oxide production in chronic viral hepatitis B and C[J]. *J Med Virol*, 1997, 51(4):326-331.

[15] Abrams G A, Trauner M, Nathanson M H, et al. Nitric oxide and liver disease [J]. *Gastroenterologist*, 1999, 3(3):220-233.

[16] Hon W M, Lee K H, Khoo H E. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 962:275-295.

[17] Chen T, Zamora R, Zuckerbraun B, et al. Role of nitric oxide in liver injury[J]. *Curr Mol Med*, 2003, 3(6):519-526.

[18] Nardo B, Puviani L, Caraceni P, et al. Successful treatment of CCl₄-induced acute liver failure with portal vein arterialization in the rat[J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(4):1187-1189.

[19] Gardner C R, Heck D E, Yang C S, et al. Role of nitric oxide in cetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat [J]. *Hepatology*, 1998, 27(3):748-754.

[20] 边城,李定国,蒋祖明,等. 肝纤维化过程中一氧化氮、一氧化氮合酶水平的动态变化[J]. *肝脏*, 2001, 6(4):247-248.

[21] Moreau R, Barriere E, Tazi K A, et al. Terlipressin inhibits *in vivo* aortic iNOS expression induced by lipopolysaccharide in rats with biliary cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2002, 36(5):1070-1078.

[22] Mcnaughton L, Puttagunta L, Radomski M W, et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26):17161-17166.

[23] Dogruabbasoglu S, Balkan J, Kanbagli O, et al. Aminoguanidine, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, plus N-acetylcysteine treatment reduce the lipopolysaccharide-augmented hepatotoxicity in rats with cirrhosis[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2002, 21(7):359-364.

[责任编辑 张丰丰]