

蝙蝠葛酚性碱对大鼠肝纤维化的影响及其机制探讨

费洪新, 张英博*, 张晓杰, 柏青杨

(齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] 目的:观察蝙蝠葛酚性碱(PAMD)对四氯化碳(CCl_4)诱导大鼠肝纤维化的影响,并探讨其作用机制。方法:SD大鼠随机分成正常组,模型组,秋水仙碱组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),PAMD高、中、低剂量组($25, 12.5, 6.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。采用40% CCl_4 ($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) ip 诱导肝纤维化模型大鼠。所有大鼠给予等体积药物或生理盐水 ig,持续30 d。放射免疫法检测血清透明质酸(HA),层粘连蛋白(LN),Ⅲ型前胶原(PCⅢ)和Ⅳ型胶原(CⅣ)水平。生化分析法检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)水平。酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测肝脏中转化生长因子- β_1 ($\text{TGF-}\beta_1$)和肿瘤坏死因子- α ($\text{TNF-}\alpha$)水平。电子显微镜观察大鼠肝组织镜下形态结构,计算肝和脾脏脏器指数。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清HA, LN, PCⅢ, CIV, ALT和AST明显增加($P < 0.05$), TP和ALB明显降低($P < 0.05$),肝组织 $\text{TGF-}\beta_1$ 和 $\text{TNF-}\alpha$ 水平明显升高($P < 0.05$),肝脏病理纤维化大鼠明显加重,肝脏和脾脏脏器指数明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,PAMD高、中剂量组大鼠血清HA, LN, PCⅢ, CIV, ALT和AST明显降低($P < 0.05$), TP和ALB明显升高($P < 0.05$),肝组织 $\text{TGF-}\beta_1$ 和 $\text{TNF-}\alpha$ 水平明显降低($P < 0.05$),肝脏病理纤维化大鼠明显减轻,肝脏和脾脏脏器指数明显降低($P < 0.05$)。结论:PAMD能有效减轻 CCl_4 诱导肝纤维化大鼠的肝脏损伤,降低肝纤维化程度,其机制与抑制肝脏 $\text{TGF-}\beta_1$ 和 $\text{TNF-}\alpha$ 蛋白表达有关。

[关键词] 蝙蝠葛酚性碱; 肝纤维化; 四氯化碳; 转化生长因子- β_1 ; 肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0106-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180106

Effect of Phenolic Alkaloids of *Menispermum dauricum* on Hepatic Fibrosis in Rats and Their Mechanism

FEI Hong-xin, ZHANG Ying-bo*, ZHANG Xiao-jie, BAI Qing-yang

(Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum* (PAMD) on CCl_4 induce hepatic fibrosis in rats and investigate its action mechanism. **Method:** Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, model group, colchicine group ($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PAMD high-dose group ($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), PAMD medial-dose group ($12.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and PAMD low-dose group ($6.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Intraperitoneal injection of 40% CCl_4 ($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) was used to induce hepatic fibrosis models in the rats. All the rats received the same volume of drugs or normal saline by intragastric administration for 30 days. The radioimmunoassay was used to determine the levels of hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen III (PC III) and collagen IV (C IV) in serum. The biochemical analysis was used to determine the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein (TP) and album protein (ALB) in serum. The enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) was applied to detect the levels of transforming growth factor- β_1 ($\text{TGF-}\beta_1$) and tumor necrosis factor- α ($\text{TNF-}\alpha$) in the liver tissues. Morphology of liver tissues was

[收稿日期] 20160127(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173576);黑龙江省教育厅项目(12531788,12521624);黑龙江省自然科学基金项目(H201354);黑龙江省科技攻关项目(PC13506)

[第一作者] 费洪新,博士,讲师,从事肝纤维化、痴呆、肿瘤、痛风研究工作, Tel:13514641639, E-mail: feihongxin2008@163.com.

[通讯作者] *张英博,博士,副主任医师,从事肝纤维化、肿瘤、痴呆、痛风研究, Tel:13514641639, E-mail: zhangyingbo2090@163.com.

observed by optical electron microscopy, and the organ coefficients of liver and spleen were calculated then. **Result:** As compared with the normal group, the levels of HA, LN, PC III, CIV, ALT and AST in serum were significantly increased in the serum of model group ($P < 0.05$); levels of TP and ALB in serum were significantly decreased ($P < 0.05$); levels of TGF- β_1 and TNF- α in the liver tissues were significantly increased ($P < 0.05$); the liver pathological fibrosis was aggravated significantly; organ coefficients of liver and spleen were significantly increased ($P < 0.05$). As compared with the model group, the levels of HA, LN, PC-III, CIV, ALT and AST in serum were significantly decreased in PAMD high-dose group and PAMD medial-dose group ($P < 0.05$); the levels of TP and ALB in serum were significantly increased ($P < 0.05$); levels of TGF- β_1 and TNF- α in the liver tissues were significantly decreased ($P < 0.05$); the liver pathological fibrosis was obviously relieved; organ coefficients of liver and spleen were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** PAMD could attenuate the CCl₄-induced immunological liver injury and the fibrosis level in rats. The mechanisms possibly contribute to down-regulating the expression levels of TGF- β_1 and TNF- α proteins in liver tissues of rats.

[Key words] phenolic alkaloids of menispermum dauricum; hepatic fibrosis; carbon tetrachloride; transforming growth factor- β_1 ; tumor necrosis factor- α

肝纤维化是细胞外基质异常积聚形成的慢性肝脏疾病之一,倘若治疗不及时,可以诱发机体出现肝硬化、肝癌,严重危害着人们的健康,影响人们寿命。研究表明乙型肝炎病毒^[1]、日本血吸虫病感染^[2]、长期大量饮酒^[3]、非酒精性脂肪肝病^[4]、慢性丙型肝炎病毒^[5]、药物治疗、自身免疫攻击等均可以诱发机体出现肝纤维化。

北豆根具有清热、解毒、祛风、消炎、止痛的作用,可以治疗咽喉疼痛、肠炎痢疾以及风湿痹痛等病症。现代药理学研究表明,北豆根具有抑菌、清热、镇痛、消炎和抗心律失常等方面的作用。蝙蝠葛酚性碱(phenolic alkaloids of *Menispermum dauricum*, PAMD)是北豆根提取出来生物碱混合物,成分包括蝙蝠葛碱和蝙蝠葛苏林碱等^[6]。PAMD 具有抗脑缺血作用、抗脑缺血再灌注的作用、抗心律失常作用、抗心肌缺血作用、抗肿瘤作用、抗氧化作用等^[7]。基于 PAMD 抗肝纤维化的作用国内外尚无文献报道,因此,实验选择 PAMD 治疗肝纤维化,探索北豆根的治疗效果及作用机制。

目前开展肝纤维化研究所选用的模型种类很多,四氯化碳(CCl₄)诱导大鼠建立肝纤维化模型^[8-10],CCl₄诱导小鼠建立肝纤维化模型^[11],猪血清诱导建立肝纤维化模型^[12],硫代乙酰胺诱导建立肝纤维化模型^[13]等。基于 CCl₄ 建立肝纤维化模型较多且被国内外研究者认可,因此,本实验采用 CCl₄ 诱导建立肝纤维化大鼠模型。

采用 CCl₄ ip 大鼠建立肝纤维化大鼠模型,以 PAMD 为施加因素,检测肝纤维化 SD 大鼠模型血清透明质酸(HA),层粘连蛋白(LN),Ⅲ型前胶原(PC

Ⅲ),Ⅳ型胶原(CIV),丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)水平,肝组织转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平,肝组织形态结构,脾脏和肝脏脏器指数,以期为临床上治疗肝纤维化奠定理论基础。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性健康 SD 大鼠,体重(240 ± 30) g,黑龙江中医药大学实验动物中心提供,合格证书 SCXK(黑)2013-0004。

1.2 药物及试剂 秋水仙碱(西版纳版纳药业有限责任公司,批号 140808),北豆根(安国市燕兴中药饮片有限公司,批号 100826),PAMD(黑龙江中医药大学周忠光教授购买北豆根原材料并鉴定为防己科植物蝙蝠葛 *M. dauricum* 的干燥根茎,黑龙江中医药大学王栋教授从北豆根中提取 PAMD,纯度是 99.2%,PAMD 采用生理盐水溶解);血清 HA, LN, PC III 和 CIV 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20150110);ALT, AST, TP 和 ALB 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20150309);肝组织 TNF- α 和 TGF- β_1 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20140401);CCl₄ 及其他试剂均为国产分析纯,由齐齐哈尔医学院超微病理诊断中心提供。

1.3 仪器 HMIAS 型高清晰度彩色医学图文分析系统(武汉千屏影像技术有限公司),6100 型酶标仪(美国 RT 公司),CM1900 型冰冻切片仪(德国 Leica 公司),SW-CJ-2F 超净工作台(中国上海精密仪器仪表公司),ESK 型电子天平(沈阳龙腾电子称量仪

器有限公司)。

2 方法

2.1 肝纤维化大鼠模型复制 参考文献[8-10,14]制备肝纤维化大鼠模型,采用 40% CCl₄ (1 mL·kg⁻¹) ip 诱导肝纤维化模型大鼠,每周注射 2 次,共 8 周,通过大鼠尾静脉采血检验血清学指标,确认肝纤维化大鼠模型制备成功。正常组采用同样方法 ip 等量 100% 橄榄油。

2.2 分组及给药 SD 大鼠 48 只随机分成正常组,模型组,秋水仙碱组,PAMD 高、中、低剂量组,每组 8 只。正常组、模型组 ig 给予等量生理盐水,秋水仙碱组 ig 给予秋水仙碱 1 mg·kg⁻¹,PAMD 高、中、低剂量组 ig 给予 PAMD 25,12.5,6.25 mg·kg⁻¹,ig 时间 30 d。

2.3 检测血清 HA, LN, PC III 和 C IV 的含量 实验结束后,禁食 20 h,眼球采血,静置,分层,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,分装, -80 °C 冰箱保存备用。血清 HA, LN, PC III 和 C IV 按照试剂盒的说明书采用放射性免疫法进行检测,得到数据进行统计分析。

2.4 检测血清 ALT, AST, TP 和 ALB 的水平 实验结束后,采血方法同 2.3 项。血清生化指标 ALT, AST, TP 和 ALB 分别按照试剂盒说明书进行操作。

2.5 检测肝组织 TGF-β₁ 和 TNF-α 的水平 实验结束后,各组大鼠断头处死,迅速取肝组织,生理盐水洗涤,剪碎,匀浆,然后转入离心管,静置,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清,进行分装,低温保存。

450 nm 波长测定各孔吸光度 A,根据标准曲线求得肝脏组织 TGF-β₁ 和 TNF-α 的含量。

2.6 电镜观察肝组织结构 实验结束后将大鼠采用水合氯醛进行麻醉,固定大鼠四肢和头部,剪开皮肤,寻找心脏,剪开右心耳,输液针头扎入大鼠的左心室心尖处,缓慢匀速灌注生理盐水,冲刷大鼠循环系统,直到大鼠的肝脏变白后,停止输入生理盐水,改用 2.5% 戊二醛缓慢匀速灌注 100 mL,直到大鼠的四肢出现僵硬。取材肝脏组织同一部位,剪成 1~2 mm³ 小块,2.5% 戊二醛中预固定 2 h,四氧化钨固定、脱水、包埋、切片、染色、观察肝组织结构。

2.7 检测脏器指数 实验结束后,迅速断头处死各组 SD 大鼠,取材各组大鼠肝脏、脾脏器官,计算脏器指数。

$$\text{脏器指数}(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}) = \text{脏器质量}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

2.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肝纤维化大鼠血清 HA, LN, PC III 和 C IV 的影响 与正常组比较,模型组肝纤维化大鼠血清 HA, LN, PC III 和 C IV 含量明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,秋水仙碱组及 PAMD 高、中剂量组肝纤维化大鼠血清 HA, LN, PC III 和 C IV 含量明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 PAMD 对肝纤维化大鼠血清 HA, LN, PC III 和 C IV 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	HA	LN	PC III	C IV
正常	-	83.19 ± 9.08	111.73 ± 16.02	18.77 ± 3.96	73.92 ± 16.18
模型	-	123.63 ± 14.41 ¹⁾	148.82 ± 12.35 ¹⁾	27.31 ± 3.79 ¹⁾	114.69 ± 14.27 ¹⁾
秋水仙碱	1	89.31 ± 9.92 ²⁾	115.38 ± 21.18 ²⁾	21.27 ± 3.31 ²⁾	79.07 ± 13.19 ²⁾
PAMD	25	93.34 ± 9.24 ²⁾	122.13 ± 19.48 ²⁾	22.33 ± 2.93 ²⁾	82.69 ± 9.04 ²⁾
	12.5	95.57 ± 8.08 ²⁾	123.66 ± 21.60 ²⁾	23.51 ± 1.97 ²⁾	95.67 ± 17.00 ²⁾
	6.25	109.95 ± 27.92	144.70 ± 19.70	26.24 ± 3.16	108.21 ± 14.70

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.2 对肝纤维化大鼠 ALT, AST, TP 和 ALB 的影响 与正常组比较,模型组肝纤维化大鼠 ALT 和 AST 水平明显升高,TP 和 ALB 含量明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,秋水仙碱组及 PAMD 高、中剂量组肝纤维化大鼠 ALT 和 AST 水平明显降低,TP 和 ALB 含量明显升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对肝纤维化大鼠 TGF-β₁ 和 TNF-α 的影响 与正常组比较,模型组肝纤维化大鼠 TGF-β₁ 和 TNF-α 蛋白明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,秋水仙碱组及 PAMD 高、中剂量组肝纤维化大鼠 TGF-β₁ 和 TNF-α 蛋白明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 对肝纤维化大鼠模型肝组织的影响 电子显

表 2 PAMD 对肝纤维化大鼠血清 ALT,AST,TP 和 ALB 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of PAMD on ALT,AST,TP and ALB of serum in liver fibrosis rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹
正常	-	50.93 ± 11.92	149.49 ± 15.50	66.35 ± 4.38	32.96 ± 2.29
模型	-	73.72 ± 9.43 ¹⁾	190.58 ± 18.71 ¹⁾	51.54 ± 4.57 ¹⁾	24.53 ± 2.40 ¹⁾
秋水仙碱	1	53.36 ± 11.43 ²⁾	154.91 ± 12.01 ²⁾	65.20 ± 4.43 ²⁾	31.44 ± 2.69 ²⁾
PAMD	25	54.82 ± 12.47 ²⁾	158.24 ± 9.39 ²⁾	64.25 ± 4.61 ²⁾	30.68 ± 2.42 ²⁾
	12.5	57.53 ± 9.59 ²⁾	168.17 ± 11.82 ²⁾	63.94 ± 5.78 ²⁾	29.85 ± 1.56 ²⁾
	6.25	66.77 ± 12.78	176.14 ± 17.92	54.69 ± 6.65	25.95 ± 1.63

表 3 PAMD 对肝纤维化大鼠肝组织 TGF-β₁,TNF-α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of PAMD on TGF-β₁ and TNF-α of liver tissues in liver fibrosis rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

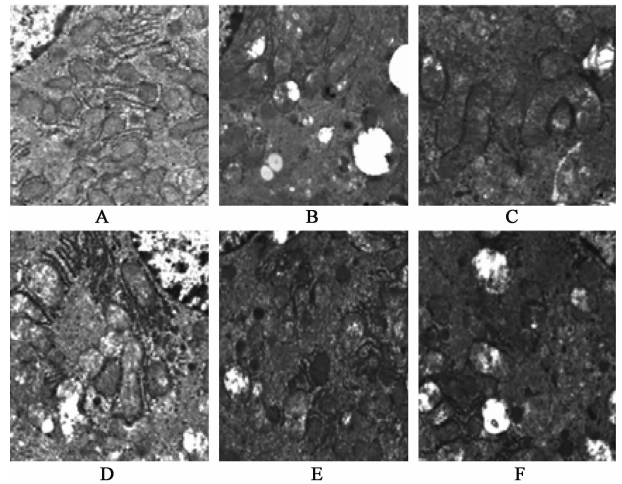
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TGF-β ₁ /μg·L ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹
正常	-	2.69 ± 0.56	18.08 ± 3.62
模型	-	3.76 ± 0.23 ¹⁾	25.75 ± 3.97 ¹⁾
秋水仙碱	1	2.79 ± 0.54 ²⁾	19.18 ± 3.78 ²⁾
PAMD	25	2.83 ± 0.45 ²⁾	19.99 ± 3.67 ²⁾
	12.5	2.89 ± 0.47 ²⁾	20.57 ± 4.12 ²⁾
	6.25	3.36 ± 0.49	22.48 ± 3.04

显微镜下可见正常组肝细胞形态规则,细胞质内细胞器丰富,线粒体形态正常,线粒体未见肿胀,溶酶体形态正常,肝细胞边界清楚,细胞核大;模型组肝细胞边界不清,细胞核较小,糖原减少,线粒体减少,细胞器的数量较少,脂滴较多;秋水仙碱组及 PAMD 高、中剂量组肝细胞的细胞器比较丰富,细胞中脂滴较少,细胞中线粒体较少;PAMD 低剂量组肝细胞糖原减少,线粒体减少,脂滴较多,细胞器的数量较少。见图 1。

3.5 对肝纤维化大鼠肝脏和脾脏脏器指数的影响
与正常组比较,模型组肝纤维化大鼠肝脏和脾脏脏器指数明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,秋水仙碱组及 PAMD 高、中剂量组肝纤维化大鼠肝脏和脾脏脏器指数明显降低($P < 0.05$)。见表 4。

4 讨论

肝纤维化的发病机制主要是指在众多病因的诱发下,肝细胞损伤坏死,肝巨噬细胞激活^[13]分泌多种细胞因子,如 TGF-β₁,TNF-α 等,随同血小板、肝窦内皮细胞和肝细胞等分泌的各种细胞因子以及某些化学介质共同作用于静息状态的肝星状细胞,使其激活并转化为肌成纤维细胞,合成和分泌大量细



A. 正常组;B. 模型组;C. 秋水仙碱组;D. PAMD 25 mg·kg⁻¹组;E. PAMD 12.5 mg·kg⁻¹组;F. PAMD 6.25 mg·kg⁻¹组

图 1 PAMD 对肝纤维化大鼠肝细胞质超微结构的影响(电镜,×16 500)

Fig. 1 Effects of PAMD on electron microscopy structure of liver cytosol in liver fibrosis rats(electron microscopy, ×16 500)

表 4 PAMD 对肝纤维化大鼠肝脏和脾脏脏器指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effects of PAMD on organ coefficients of liver and splenic organ in liver fibrosis rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肝脏脏器指数	脾脏脏器指数
正常	-	26.02 ± 1.23	2.71 ± 0.14
模型	-	31.52 ± 2.53 ¹⁾	3.32 ± 0.21 ¹⁾
秋水仙碱	1	26.38 ± 1.52 ²⁾	2.79 ± 0.17 ²⁾
PAMD	25	26.98 ± 2.06 ²⁾	2.82 ± 0.17 ²⁾
	12.5	27.93 ± 1.20 ²⁾	2.85 ± 0.13 ²⁾
	6.25	31.27 ± 2.69	3.20 ± 0.13

胞外基质,沉积于肝组织内^[15-18],最终形成肝纤维化。基于此,检测肝组织 TGF-β₁,TNF-α 蛋白尤为重要。

细胞外基质的过度沉积是肝纤维化形成的最终

因素, TGF- β_1 可以促进肝脏损伤后产生胶原组织的降解产物血清 HA, LN, PC III, C IV 等。参与构成细胞外基质的主要成分除了胶原蛋白之外, 还有非胶原性糖蛋白和蛋白多糖等, 而血清 HA 是细胞外基质蛋白多糖的主要成分, LN 是一种重要的结构性多糖成分^[19-20]。血清 HA, PC III 与肝纤维化的程度密切相关^[21]。肝纤维化伴有肝脏基本功能的降低, 诸多指标如 ALT, AST, TP, ALB 异常, 因此, 评价肝纤维化治疗效果有必要测定血清 HA, LN, PC III, C IV, ALT, AST, TP, ALB 水平。

肝纤维化的治疗药物种类很多, 包括 TGF- β_1 拮抗剂, TNF- α 拮抗剂、环氧化酶抑制剂、抗氧化剂、抗纤维化治疗剂等, 但是这些药物剂量过大往往会有副作用, 影响着机体的健康水平。中医药的特点是成分多、靶点多、多效应、毒副作用小, 在肝纤维化这种多因素、多病理靶点的复杂性疾病治疗中具有独特优势。

血清肝纤维化指标 HA, LN, PC III 和 C IV 是机体细胞外基质主要降解产物, 是评价肝纤维化的重要指标之一, 可以综合评价细胞外基质的变化水平。实验结果表明, 与正常组比较, 模型组血清 HA, LN, PC III 和 C IV 的含量明显升高, 说明肝细胞之间胶原纤维增加, 肝纤维化模型稳定, 可以开展后续的实验研究。与模型组比较, PAMD 高、中剂量组血清 HA, LN, PC III 和 C IV 含量明显降低, 说明 PAMD 高、中剂量可改善大鼠模型肝组织门管区及其肝血窦毛细血管肝纤维化程度, 减少肝细胞外的细胞外基质, 减少胶原的含量。以上综合显示 PAMD 高、中剂量治疗肝纤维化模型有效。

肝纤维化伴有肝脏基本功能低下, 存在肝细胞内部的酶类血清 ALT 和 AST 就会释放到血清中, 血清 TP 大部分是肝脏合成的, 其中 ALB 是肝细胞合成、分泌的重要来源, 通过检测 TP 和 ALB 含量可以直接反映肝脏合成功能及储备能力。基于此, 实验结束后测定肝纤维化 SD 大鼠模型血清 ALT, AST, TP 和 ALB 水平。实验结果表明, 与正常组比较, 模型组 ALT 和 AST 水平明显升高, 血清 TP 和 ALB 含量明显降低, 说明模型组大鼠肝细胞遭到破坏, 存在肝细胞内的大量因子通过破坏的肝细胞膜进入到血清中, 从而导致血清中与肝脏功能相关的生化指标增加, 同时肝脏的合成功能和储备功能下降, 显示模型组肝组织损伤严重。与模型组比较, PAMD 高、中剂量组血清 ALT 和 AST 水平明显降低, TP 和 ALB 含量明显升高, 说明经过 PAMD 高、中剂量治疗后,

肝细胞膜的通透性下降, 肝细胞内部的相关因子 ALT, AST 释放减少, 至此血清 ALT, AST 水平下降, 同时肝细胞的合成功能得到恢复, 显示肝纤维化模型大鼠肝组织的基本功能恢复。以上表明通过 ALT, AST, TP 和 ALB 水平来进行评价, PAMD 对肝纤维化的治疗效果很好。

TGF- β_1 是促进肝纤维化的重要因子, 在促肝组织纤维化因子 TGF- β_1 作用下, 刺激成纤维细胞增生, 增加和合成肝细胞之间胶原纤维, 加速肝细胞之间的细胞外基质沉积, 最终引起肝组织的纤维化。TNF- α 是一种重要的内毒素, TNF- α 具有多种生物活性, 可以介导组织损伤, 刺激成纤维细胞及其间质细胞生长, 促进肝星状细胞的增殖, 在机体的肝纤维化发生发展中扮演重要的角色, 基于此实验测定了 TGF- β_1 和 TNF- α 。实验结果表明, 与正常组比较, 模型组肝纤维化 SD 大鼠 TGF- β_1 和 TNF- α 蛋白明显升高, 说明模型组成纤维细胞数量增加, 肝细胞之间的细胞外基质增加, 肝星状细胞大量增殖, 提示肝纤维化大鼠模型稳定。与模型组比较, PAMD 高、中剂量组肝纤维化 SD 大鼠 TGF- β_1 和 TNF- α 蛋白明显降低, 说明 PAMD 高、中剂量可以改善促进大鼠肝纤维化因子生成, 干扰成纤维细胞生成, 减少肝星状细胞的增殖, 减少肝细胞之间细胞外基质含量, 减轻大鼠肝纤维化程度。以上显示 PAMD 通过下调 TGF- β_1 和 TNF- α 蛋白表达来发挥对肝纤维化治疗作用。

电子显微镜下可见正常组肝细胞形态规则, 肝细胞排列成放射状, 肝板清晰, 细胞质内细胞器丰富, 线粒体形态正常, 线粒体未见肿胀, 溶酶体形态正常, 肝细胞边界清楚, 核大, 显示肝细胞正常, 说明肝组织结构正常。模型组肝细胞边界不清, 糖原减少, 脂滴较多, 线粒体减少, 细胞器的数量较少, 显示细胞的功能低下, 防御和解毒的能力较弱, 模型稳定。秋水仙碱组, PAMD 高、中剂量组肝细胞的细胞器比较丰富, 细胞中脂滴较少, 细胞中线粒体较少, 说明 PAMD 可以改善肝纤维化大鼠模型的组织病变。PAMD 低剂量组肝细胞线粒体不清晰, 糖原减少, 线粒体减少, 脂滴较多, 细胞器的数量较少, 说明低剂量 PAMD 对肝纤维化模型影响不明显。以上综合显示 PAMD 治疗肝纤维化大鼠模型有效。

脏器指数是脏器质量与体重的比值, 此比值增加显示机体出现相应脏器的充血, 损伤, 代偿性增生等, 而此比值降低显示相应的脏器出现萎缩, 生长受到阻碍等。因此实验结束后测定了肝纤维化大鼠模

型的肝脏和脾脏脏器指数,评价肝纤维化大鼠模型的脾脏淤血、肝脏损伤。实验结果表明,与正常组比较,模型组肝脏和脾脏脏器指数明显升高,说明肝纤维化模型大鼠脾脏质量和肝脏质量增加,提示肝纤维化模型大鼠肝组织损伤明显,出现肝组织代偿性增生,脾脏出现淤血。与模型组比较,PAMD 高、中剂量组肝纤维化大鼠肝脏和脾脏脏器指数明显降低,说明肝脏质量和脾脏质量减轻,提示 PAMD 高、中剂量可以增加对肝脏的保护作用,减轻脾脏淤血的程度。

综上所述,PAMD 可以改善肝纤维化 SD 大鼠肝纤维化指标及其肝功能指标,改善肝脏和脾脏指数,改善肝组织形态结构,其抗肝纤维化的机制主要是通过下调 TNF- α 和 TGF- β_1 蛋白表达来实现的。

[参考文献]

[1] Li Y, Zhang Z, Shi J, et al. Risk factors for naturally-occurring early-onset hepatocellular carcinoma in patients with HBV-associated liver cirrhosis in China [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(1):1205-1212.

[2] Xiang J J, Cheng B J, Tian F, et al. Perforation of small bowel caused by *Schistosoma japonicum*; a case report [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(9):2862-2864.

[3] Wang Q, Dai X, Yang W, et al. Caffeine protects against alcohol-induced liver fibrosis by dampening the cAMP/PKA/CREB pathway in rat hepatic stellate cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 25(2):340-352.

[4] Iloon Kashkooli R, Najafi S S, Sharif F, et al. The effect of berberis vulgaris extract on transaminase activities in non-alcoholic Fatty liver disease [J]. *Hepat Mon*, 2015, 15(2):e25067.

[5] Boulière M, Bronowicki J P, Ledinghen V, et al. Ledipasvir-sofosbuvir with or without ribavirin to treat patients with HCV genotype 1 infection and cirrhosis non-responsive to previous protease-inhibitor therapy: a randomised, double-blind, phase 2 trial (SIRIUS) [J]. *Lancet Infect Dis*, 2015, 15(4):397-404.

[6] 鲁美君, 苏云明. 蝙蝠葛酚性碱的药理作用研究进展 [J]. *中医药信息*, 2013, 30(3):150-152.

[7] 苏云明, 沈越, 秦鹏飞, 等. 蝙蝠葛酚性碱药理作用研究现状 [J]. *中医药信息*, 2014, 31(1):113-114.

[8] Yu F, Ji S, Su L, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells inhibit activation of hepatic stellate cells *in vitro* and ameliorate rat liver fibrosis *in vivo* [J]. *J Formos Med Assoc*, 2015, 114(2):130-138.

[9] Gao T J, Dong L, Shi H T, et al. Effect of alcohol extract

of *Plumula nelumbini* on carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis: an experimental study [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2014, 34(12):1476-1480.

[10] 曹雯, 廖明, 周燕, 等. 牛磺酸、表没食子儿茶素没食子酸酯和三羟基异黄酮联合用药对肝纤维化大鼠的治疗作用及机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(4):107-111.

[11] Mazagova M, Wang L, Anfora A T, et al. Commensal microbiota is hepatoprotective and prevents liver fibrosis in mice [J]. *FASEB J*, 2015, 29(3):1043-1055.

[12] Ping J, Gao A M, Xu D, et al. Therapeutic effect of indole-3-carbinol on pig serum-induced hepatic fibrosis in rats [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2011, 46(8):915-921.

[13] Jang Y, Kim M, Cho M, et al. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model [J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14(1):198.

[14] Tao Q, Sun M Y, Feng Q. Syndrome identification of CCl₄ induced liver fibrosis model rats based on syndrome detecting from recipe used [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2009, 29(3):246-250.

[15] Xu J, Liu X, Koyama Y, et al. The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies [J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5:167.

[16] Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2014, 3(6):344-363.

[17] Foo N P, Lin S H, Lee Y H, et al. α -Lipoic acid inhibits liver fibrosis through the attenuation of ROS-triggered signaling in hepatic stellate cells activated by PDGF and TGF- β_1 [J]. *Toxicology*, 2011, 282(1):39-46.

[18] Friedman S L. Liver fibrosis-from bench to bedside [J]. *J Hepatol*, 2003, 38(1):S38-S53.

[19] Huang Y, Huang C, Li J. Effect of cytokines secreted from Kupffer cell on HSC proliferation, apoptosis in hepatic fibrosis process [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010, 26(1):9-13.

[20] Plebai M, Burlina A. Biochemical marker of fibrosis [J]. *Clin Biochem*, 1991, 24(3):219-239.

[21] Li H, Hu Y, Li N, et al. Liver fibrosis and five year survival of hepatocellular cancer cases undergoing transcatheter arterial chemo embolization using small doses [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(4):1589-1593.

[责任编辑 周冰冰]