

排钱草对食蟹猴肝纤维化的影响

刘雪萍^{1*}, 韦啟球¹, 李振明², 杨继红³

(1. 广西科技大学 医学院, 广西 柳州 545005; 2. 广西玮美生物科技有限公司, 南宁 530105;
3. 昆明医科大学 药学院, 暨省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500)

[摘要] 目的:探讨排钱草对四氯化碳(CCl_4)诱导的食蟹猴肝纤维化的防治作用及其机制。方法:雄性食蟹猴 30 例,随机分为正常组、模型组、排钱草高、低剂量组($4.0, 2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和秋水仙碱组($0.08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组 6 例。除正常组外,其余各组灌胃 40% CCl_4 橄榄油混合液 $1.6 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,每周 2 次,建立 CCl_4 肝纤维化模型。第四周开始,给药组分别灌胃给药 12 周。每 4 周称 1 次体重,采血检测肝功能,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中透明质酸(HA),层粘连蛋白(LN),基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)含量。第 8,16 周进行肝脏 B 超检查,在 B 超下进行肝脏穿刺活检,活检组织进行苏木素-伊红(HE)染色和 Van-Gieson 胶原纤维染色病理检查,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏平滑肌肌动蛋白- α (α -SMA)和转化生长因子- β_1 ($\text{TGF-}\beta_1$)表达水平。结果:造模 8 周,与正常组和造模前比较,模型组、秋水仙碱组、排钱草高剂量组和排钱草低剂量组血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆红素(TBIL),碱性磷酸酶(ALP),HA 和 LN 水平显著升高,总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)水平显著下降($P < 0.05, P < 0.01$);造模 12 周,与正常组比较,模型组、秋水仙碱组、排钱草高剂量组和排钱草低剂量组血清 TIMP-1 水平显著升高($P < 0.05$);造模 16 周,B 超显示,模型组肝脏光点增粗,回声增强,HE 染色显示肝细胞坏死、成纤维细胞增生, Van-Gieson 染色显示胶原纤维含量增加,肝脏 α -SMA 和 $\text{TGF-}\beta_1$ 表达水平显著升高($P < 0.05$)。给药 8 周后,排钱草高剂量组和秋水仙碱组均显著降低血清 ALT, AST, TBIL, ALP 和 HA 水平,升高 TP 水平($P < 0.05, P < 0.01$);给药 12 周后,排钱草高剂量组和秋水仙碱组能显著降低血清 LN 和 TIMP-1 水平显著($P < 0.05$),升高血清 ALB 水平($P < 0.05$);B 超和病理结果均显示排钱草高剂量组和秋水仙碱组肝细胞坏死减少、肝脏纤维化程度降低;Western blot 显示排钱草高剂量组和秋水仙碱组肝脏 α -SMA 和 $\text{TGF-}\beta_1$ 表达水平显著下降($P < 0.05$)。结论:排钱草($4.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)对 CCl_4 诱导的食蟹猴肝纤维化有较好的治疗作用,能明显改善肝功能,降低纤维化程度,治疗作用与其降低肝细胞损伤和抑制纤维化有关。

[关键词] 排钱草; 药效学; 食蟹猴肝纤维化; 四氯化碳; 肝功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0133-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240133

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1147.082.html>

[网络出版时间] 2017-09-26 11:47

Effect of Phyllodii Pulchelli Radix on Hepatic Fibrosis of Cynomolgus Monkeys

LIU Xue-ping^{1*}, WEI Qi-qiu¹, LI Zhen-ming², YANG Ji-hong³

(1. School of Medicine, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545005, China;

2. Guangxi Weimei Biological Technology Co. Ltd, Nanning 530105, China; 3. School of

Pharmaceutical Science, Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products,

Kunming Medical University, Kunming 650050, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Phyllodii Pulchelli Radix on carbon tetrachloride CCl_4 -induced hepatic fibrosis of cynomolgus monkeys and the underlying mechanism. **Method:** The 30 male cynomolgus

[收稿日期] 20170730(018)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09307-303-02);国家自然科学基金项目(81660042);广西科技基础条件平台建设项目(10-108-21)

[通讯作者] * 刘雪萍, 博士, 讲师, 从事药理学研究, Tel:0772-2056019, E-mail:100000774@gxust.edu.cn

monkeys were randomly divided into 5 groups, namely normal group, model group, colchicine group ($0.08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Phyllodii Pulchelli Radix high and low dose groups ($4.0, 2.4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 6 monkeys in each group. Except the monkeys in normal group, CCl_4 -induced hepatic fibrosis models were established by intragastrical administration of 40% carbon tetrachloride (CCl_4) olive oil mixture at dose of $1.6 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ in other animals, 2 times a week. From week 4, intragastrical administration was given for 12 weeks in various treatment groups. They were weighed every 4 weeks, and blood was taken to detect liver function. The levels of hyaluronic acid (HA), laminin (LN), metal matrix proteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in serum were detected by using ELISA. At week 8 and week 16, livers of all animals were detected by B ultrasound, then aspiration biopsy was conducted under B ultrasound. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Van-Gienson staining were conducted on the aspiration biopsy samples, and transforming growth factor- β_1 ($\text{TGF-}\beta_1$) and smooth muscle actin- α ($\alpha\text{-SMA}$) in liver were also detected in the samples by Western blot. **Result:** After administration of CCl_4 for 8 weeks, the levels of alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), total bilirubin (TBIL), alkaline phosphatase (ALP), HA and LN in serum were increased in model group, colchicines group, and Phyllodii Pulchelli Radix high and low dose groups as compared with control group and before modeling before, while total protein (TP) and albumin (ALB) in serum were decreased significantly ($P < 0.05, P < 0.01$). After modeling for 12 weeks, TIMP-1 was increased significantly in model group and all treatment groups as compared with the normal group ($P < 0.05$). After modeling for 16 weeks, the strong echo was enhanced in liver of model group in detecting by B ultrasound, and HE staining showed hepatocyte necrosis and fibroblast proliferation; Van-Gieson staining showed that the content of collagen fiber was increased, and the expression levels of $\text{TGF-}\beta_1$ and $\alpha\text{-SMA}$ in liver were increased significantly in model group ($P < 0.05$). After administration of colchicines or Phyllodii Pulchelli Radix for 8 weeks, the levels of AST, ALT, TBIL, ALP and HA in serum were decreased significantly in colchicines group and high dose Phyllodii Pulchelli Radix group as compared with model group, while the level of TP was increased differently ($P < 0.05, P < 0.01$). After administration of colchicines or Phyllodii Pulchelli Radix for 12 weeks, the levels of LN and TIMP-1 were decreased significantly in colchicines group and high dose Phyllodii Pulchelli Radix group ($P < 0.05$), while the level of ALB was increased ($P < 0.05$). The results from B ultrasound and pathological examination showed that the fibrosis in liver was relieved in colchicines group and high dose Phyllodii Pulchelli Radix group, and the levels of $\text{TGF-}\beta_1$ and $\alpha\text{-SMA}$ in liver were also decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Administration of Phyllodii Pulchelli Radix at dose of $4.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ showed significant efficacy for liver fibrosis of cynomolgus monkeys, could obviously improve the liver function and reduce the degree of fibrosis. The underlying mechanism may be correlated with reduction of liver cell damage and prevention of collagen fiber formation.

[**Key words**] Phyllodii Pulchelli Radix; pharmacodynamics; hepatic fibrosis of cynomolgus monkey; CCl_4 ; liver function

肝纤维化是在病毒、细菌、药物或化学物质等损伤因素的长期作用下,受损肝脏发生修复反应,在修复过程中肌成纤维细胞等大量间质细胞增生,伴随着胶原纤维等细胞外基质分泌增加以及基质金属蛋白酶分解能力的下降,最终导致肝细胞逐渐被纤维组织替代^[1-2]。肝纤维化若得不到有效治疗,将进一步发展为肝硬化,产生严重并发症。目前肝纤维化的治疗包括抑制肝纤维化的产生,逆转肝纤维化,阻止肝纤维化的进一步发展^[3]。治疗药物包括靶向性治疗药物、免疫调节剂、抑制炎症反应等,以减

少肝脏损伤、抑制细胞外基质的形成和逆转肝纤维化,中草药有久远的用药历史,在抗肝纤维化治疗中具有较好的综合疗效,具备进一步开发的潜质^[4-6]。

排钱草是壮族民间常用药,在民间有悠久的用药史,主要用于治疗急慢性肝炎、肝脾肿大、感冒发热、风湿性关节炎等,具有确切疗效^[7]。已有文献报道排钱草抗肝纤维化成分分析以及排钱草在改善大鼠肝纤维化中的作用,并探索排钱草总碱抗肝纤维化的机制^[8-10]。目前研究表明,肝纤维化是一个缓慢迁延的过程,疾病进展机制和使用的治疗药物

往往因疾病所处的阶段不同而有差异。大鼠、小鼠等啮齿类肝纤维化模型,因其在物种起源上与人类相差甚远,仅能从某个单一的方面阐述肝纤维化发展变化的过程,对肝纤维化发病机制和抗纤维化药物的评价均有局限性^[11]。同时,目前用于诊断和评价肝纤维化的方法包括血清学、病理学和影像学等都因啮齿类肝纤维化模型的限制,无法在模型上充分的使用,限制了研究的开展。本实验拟建立与人类肝纤维化进程最接近的四氯化碳(CCl_4)诱导的食蟹猴肝纤维化模型,在模型上充分利用目前的多种检查手段,实时、动态研究排钱草抗肝纤维化作用,为充分开发民间传统壮族药排钱草用于治疗肝纤维化,提供更客观、科学的依据。

1 材料

1.1 动物 食蟹猴,年龄 6~8 岁,体重 8.0~10.0 kg,由广西玮美生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(桂)2012-0004。所有动物均饲养在不锈钢单笼中,笼具尺寸 700 mm×800 mm×900 mm(W×D×H),自由饮水,每天饲喂颗粒饲料 4 次,每天饲喂苹果半个。环境温度控制在 16~26℃,湿度 40%~80%,光照时间为 12 h/12 h。项目在广西玮美生物科技有限公司实验部完成[使用许可证号 SCXK(桂)2012-0003],获得广西玮美生物科技有限公司动物伦理委员会批准(审批号 WMK201201)。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.2 药物及试剂 排钱草,由广西民族医药研究院提供,由广西壮族自治区民族医院研究院戴斌主任药师鉴定为豆科植物排钱草 *Phyllodium pulchellum* 的根部(分别以 10,8 倍量的 50% 乙醇回流提取 1 次,2 h/次,合并提取液,滤过;回收滤液中的乙醇至 1:1 左右,以乙酸乙酯萃取,用蒸馏水配制成含生药 0.5 g·mL 药液);秋水仙碱片(西双版纳药业有限责任公司,批号 120707)。

1.3 试剂 CCl_4 (汕头市西陇化工厂,批号 12020);丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆红素(TBIL),总蛋白(TP),白蛋白(ALB)和碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号分别为 151121,150471,150513,150926,150323,150107);血清透明质酸(HA),层粘连蛋白(LN),基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)试剂盒(伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为 AK0016MAY11011,AK0016MAY11012,AK0016AUGO-

05014,AK0016AUGO05015);转化生长因子- β_1 ($\text{TGF-}\beta_1$)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA1590); α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(美国 Bioworld 公司,批号 BS70000);内参 tubulin 抗体(美国 Sigma 公司,批号 T6199)。

1.4 仪器 M7 型便携式超声仪(深圳迈瑞公司);CX4 型血生化仪(美国贝克曼公司);MICROS-60 型血球仪(法国 ABX 公司);MG1522 型枪式活检枪,18G 一次性肝穿针[巴德医疗器械(北京)有限公司];EPS-600 型电泳仪,VE186 型电转移(上海天能科技有限公司);c300 型凝胶成像系统(美国 Azure Biosystems 公司);Flexstation 3 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

2 方法

2.1 肝纤维化模型的制备 食蟹猴经适应性饲养 14 d,检测血液学、凝血功能、肝脏生化功能等指标,B 超检查肝脏均未见异常。随机分为排钱草高、低剂量组、秋水仙碱组、模型组和正常组,每组动物 6 例。除正常组外,各组均以 40% CCl_4 橄榄油混合液 1.6 mL·kg⁻¹(首剂加倍)灌胃,每周 2 次,连续 16 周;正常组灌胃等体积橄榄油^[12]。造模第 5 周开始,排钱草高、低剂量组每日下午分别灌胃相当于含生药 4.0,2.4 g·kg⁻¹的排钱草醇提物 8 mL·kg⁻¹,秋水仙碱组灌胃质量浓度为 0.01 g·L⁻¹的秋水仙碱溶液 8 mL·kg⁻¹,模型组和正常组灌胃生理盐水(剂量 8 mL·kg⁻¹),共给药 12 周。

2.2 检测指标

2.2.1 一般情况观察及体重称量 每天观察动物饮食、大小便、毛发及活动情况。于造模第 4 周起,每 4 周称量体重 1 次,并根据体重变化调整给药量。

2.2.2 肝功能检测 采血前一晚开始禁食,次日上午 9 点前采集后肢静脉血,分离血清,采用全自动生化仪,按照试剂盒操作说明检测血清中 ALT,AST,ALB,TP,ALP 和 TBIL 水平。加入相应抗原包被,4℃过夜,洗涤 3 次、抛干;加入血清,37℃孵育 2 h,洗涤 3 次、抛干;加入相应酶标抗体 37℃孵育 2 h,洗涤 3 次、抛干;加入底物液,37℃孵育 30 min,最后加入终止液,酶标仪测定吸光度 A。每 4 周检测 1 次。

2.2.3 纤维指标检测 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 HA, LN, MMP-1, TIMP-1 含量,按操作说明书进行。每 4 周检测 1 次。

2.2.4 影像学检查 于造模第 8,16 周,食蟹猴禁食 12 h,禁饮 2 h,予肌注剂量为 3 mg·kg⁻¹氯胺酮,

动物进入基础麻醉状态后,通过留置针静脉推注剂量为 $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 丙泊酚维持麻醉,将动物进行仰卧位固定于自制的固定装置内。在 B 超探头频率 $5 \sim 10 \text{ MHz}$ 下进行肝脏检查。

2.2.5 肝穿病理组织活检 于第 8,16 周,无痛麻醉下,通过 B 超引导进行肝脏穿刺活检。活检组织按步骤进行 10% 中性甲醛液固定 24 h,石蜡包埋,切片,分别进行常规苏木素-伊红 (HE) 和 Van-Gieson 胶原染色,光学显微镜下观察肝细胞损伤程度和纤维增生情况。

2.2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 α -SMA 和 $\text{TGF-}\beta_1$ 肝脏表达水平 造模第 16 周,B 超引导下肝穿活检组织 100 mg,加入 RIPA 细胞裂解液,提取总蛋白。SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,分别孵育一抗 (1:1 000),二抗 (1:5 000),洗膜后进行 ECL 发光液化学发光,显影,通过凝胶成像系统扫描分析定影后测定各条带灰度值。并采用 GraphPad Prism 5.0 软件分析计算每个蛋白条带灰度值与内参 tubulin 的灰度值的比值,以蛋白相对表达量进行表示。

表 1 排钱草对食蟹猴体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Phyllodii Pulchelli Radix on body weight in cynomolgus monkeys ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	8.96 ± 0.25	8.95 ± 0.32	9.25 ± 0.35	$9.60 \pm 0.32^{5)}$	$10.03 \pm 0.35^{4,5)}$
模型	-	8.99 ± 0.32	8.70 ± 0.43	8.31 ± 0.26	$7.70 \pm 0.42^{2,5)}$	$6.79 \pm 0.38^{2,6)}$
秋水仙碱	8×10^{-5}	9.03 ± 0.22	8.72 ± 0.16	8.58 ± 0.28	$8.99 \pm 0.28^{3)}$	$9.54 \pm 0.12^{4)}$
排钱草	4	8.95 ± 0.28	8.60 ± 0.19	8.85 ± 0.12	$9.84 \pm 0.11^{4,5)}$	$10.62 \pm 0.23^{4,5)}$
	2.4	9.00 ± 0.25	8.72 ± 0.26	8.32 ± 0.32	$7.82 \pm 0.29^{2,6)}$	$7.26 \pm 0.29^{2,6)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与同组造模前比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 排钱草对食蟹猴肝功能的影响 造模 8 周,与正常组和造模前比较,模型组、秋水仙碱组、排钱草高剂量组、排钱草低剂量组血清 ALT,AST,TBIL 和 ALP 水平显著升高,TP 和 ALB 水平显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。排钱草高剂量组和秋水仙碱组给药 8 周后,与模型组比较,能显著降低血清 ALT,AST,TBIL 和 ALP 水平显著,升高 TP 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$),给药 12 周能显著升高血清 ALB 水平 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 排钱草对食蟹猴血清纤维化指标的影响 造模 8 周,与正常组和造模前比较,模型组、秋水仙碱组、排钱草高剂量组、排钱草低剂量组血清 HA 和 LN 水平显著升高 ($P < 0.05$);造模 12 周,与正常组比较,模型组、秋水仙碱组、排钱草高剂量组、排钱草低剂量组血清 TIMP-1 水平显著升高 ($P < 0.05$)。排钱草高剂

2.3 统计学处理 计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学分析,各组间比较和同组不同造模周期比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 排钱草对食蟹猴一般情况及体重的影响 造模期间,未发生动物死亡现象。正常组动物活动正常,毛发有光泽,饮食正常;模型组和排钱草低剂量组动物活动减少,有不同程度脱毛现象,摄食量下降;与模型组比较,排钱草高剂量组和秋水仙碱组动物脱毛现象有所改善,动物活动正常。

随着造模时间延长,模型组和排钱草低剂量组,体重显著下降,第 12 周体重显著低于正常组和造模前 ($P < 0.01$)。正常组和排钱草高剂量组体重逐渐增长,第 12 周体重显著高于模型组 ($P < 0.01$),同时比造模前显著增加 ($P < 0.05$)。秋水仙碱组前 8 周体重呈现下降趋势,第 12 周后体重逐渐增加,第 16 周体重高于模型组,同时体重较造模前显著增加 ($P < 0.05$)。见表 1。

量组和秋水仙碱组给药 8 周后,与模型组比较,能显著降低血清 HA 水平显著,给药 12 周能显著降低血清 LN 和 TIMP-1 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。实验期间,血清 MMP-1 水平无明显变化。见表 3。

3.4 排钱草对食蟹猴肝脏形态学的影响 实验期间,各组动物肝脏大体形态未见明显变化,肝脏右叶斜径无明显改变,门静脉直径无明显改变,脾脏大小无明显改变。第 16 周,与正常正常组比较,模型组和排钱草低剂量组动物肝脏光点均粗糙,并显示强光回声团;排钱草高剂量组和秋水仙碱组粗糙光点较少,少见强回声团。见图 1。

3.5 排钱草对食蟹猴肝脏组织学的影响 第 16 周,HE 染色下,正常组食蟹猴肝细胞排列整齐,肝小叶完整,肝细胞围绕中央静脉呈条索状排列;模型组食蟹猴肝组织中大量单核细胞细胞浸润,并

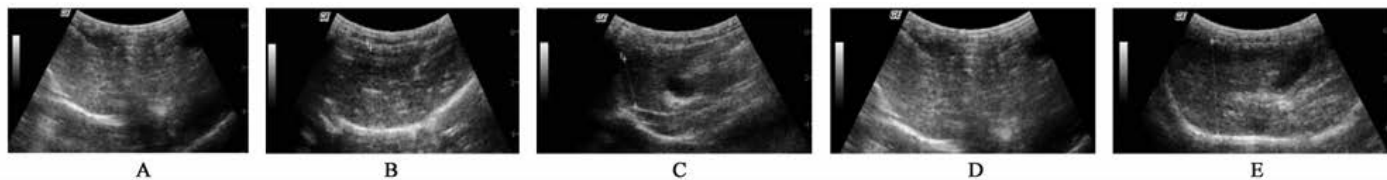
表 2 排钱草对食蟹猴血清 ALT, AST, TBIL, ALP, ALB, TP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Phyllodii Pulchelli Radix on serum ALT, AST, TBIL, ALP, ALB, TP in cynomolgus monkeys ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹				
		给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	29.50 ± 4.95	38.00 ± 2.83	37.50 ± 2.12	41.00 ± 2.83	38.00 ± 8.49
模型	-	38.00 ± 2.83	84.50 ± 17.68	146.50 ± 37.48 ^{2,5)}	184.00 ± 53.74 ^{2,6)}	259.50 ± 71.42 ^{2,6)}
秋水仙碱	8 × 10 ⁻⁵	28.50 ± 10.61	70.50 ± 2.12	72.50 ± 4.95 ^{1,3,6)}	49.50 ± 2.12 ⁴⁾	30.00 ± 5.66 ⁴⁾
排钱草	4	33.50 ± 6.36	80.50 ± 7.78	80.50 ± 3.54 ^{1,3,5)}	58.00 ± 4.24 ⁴⁾	39.00 ± 4.24 ⁴⁾
	2.4	29.00 ± 8.49	65.50 ± 0.71	129.50 ± 17.68 ^{2,5)}	196.00 ± 9.90 ^{2,6)}	283.50 ± 20.51 ^{2,6)}
组别	剂量/g·kg ⁻¹	AST/U·L ⁻¹				
		给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	48.00 ± 2.83	40.00 ± 2.83	49.50 ± 9.19	40.00 ± 11.31	34.00 ± 11.31
模型	-	41.00 ± 8.49	87.50 ± 6.36	199.50 ± 2.12 ^{2,6)}	286.00 ± 11.31 ^{2,6)}	332.50 ± 13.44 ^{2,6)}
秋水仙碱	8 × 10 ⁻⁵	30.50 ± 6.36	84.50 ± 10.61	109.00 ± 8.49 ^{1,3,6)}	102.00 ± 9.90 ^{1,3)}	90.00 ± 11.31 ^{1,4)}
排钱草	4	49.00 ± 9.90	90.50 ± 3.54	109.50 ± 7.78 ^{1,3,5)}	92.00 ± 1.41 ^{1,4)}	72.00 ± 4.24 ⁴⁾
	2.4	50.50 ± 10.61	89.00 ± 5.66	191.50 ± 3.54 ^{1,6)}	276.50 ± 12.02 ^{1,6)}	295.50 ± 12.02 ^{1,6)}
组别	剂量/g·kg ⁻¹	TBIL/μmol·L ⁻¹				
		给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	0.41 ± 0.24	0.37 ± 0.19	0.73 ± 0.15	0.46 ± 0.23	0.52 ± 0.28
模型	-	0.36 ± 0.19	1.04 ± 0.67	1.66 ± 0.52 ^{1,5)}	2.26 ± 0.38 ^{1,5)}	3.28 ± 0.75 ^{2,6)}
秋水仙碱	8 × 10 ⁻⁵	0.51 ± 0.37	1.05 ± 0.51	1.26 ± 0.42 ^{1,5)}	1.05 ± 0.33 ³⁾	0.98 ± 0.28 ⁴⁾
排钱草	4	0.46 ± 0.23	1.03 ± 0.42	1.29 ± 0.51 ^{1,5)}	1.08 ± 0.34 ³⁾	0.85 ± 0.31 ⁴⁾
	2.4	0.52 ± 0.33	1.07 ± 0.51	1.82 ± 0.49 ^{1,5)}	2.37 ± 0.56 ^{2,5)}	3.21 ± 0.68 ^{2,6)}
组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹				
		给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	173.51 ± 51.23	215.14 ± 67.36	203.23 ± 69.14	199.16 ± 72.16	221.65 ± 84.53
模型	-	185.36 ± 68.92	261.28 ± 58.13	314.35 ± 109.46 ^{1,5)}	382.64 ± 110.33 ^{2,6)}	468.31 ± 108.43 ^{2,6)}
秋水仙碱	8 × 10 ⁻⁵	178.16 ± 52.36	259.21 ± 73.21	311.32 ± 97.84 ^{1,5)}	302.56 ± 90.53 ^{1,3,5)}	295.64 ± 82.06 ^{3,5)}
排钱草	4	174.48 ± 55.03	212.21 ± 62.03	330.28 ± 112.06 ^{1,5)}	293.19 ± 89.03 ^{1,3,5)}	281.77 ± 87.52 ^{4,5)}
	2.4	158.33 ± 45.78	225.34 ± 66.52	381.17 ± 115.05 ^{1,6)}	427.15 ± 135.02 ^{2,5)}	498.04 ± 147.06 ^{2,6)}
组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹				
		给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	44.71 ± 2.31	41.45 ± 1.67	45.03 ± 2.56	41.56 ± 3.02	42.12 ± 2.43
模型	-	42.23 ± 2.02	36.33 ± 1.02	31.02 ± 1.23 ^{1,5)}	27.83 ± 0.85 ^{1,5)}	24.05 ± 0.93 ^{1,6)}
秋水仙碱	8 × 10 ⁻⁵	41.65 ± 1.87	36.75 ± 0.87	29.04 ± 1.04 ^{1,5)}	33.06 ± 1.21 ^{1,5)}	38.92 ± 1.82 ³⁾
排钱草	4	40.75 ± 0.96	37.43 ± 0.96	28.55 ± 0.93 ^{1,5)}	34.78 ± 1.45 ^{1,5)}	38.89 ± 1.75 ³⁾
	2.4	40.61 ± 0.84	38.04 ± 1.03	29.43 ± 1.09 ^{1,5)}	28.01 ± 0.67 ^{1,5)}	27.15 ± 1.04 ^{2,6)}
组别	剂量/g·kg ⁻¹	TP/g·L ⁻¹				
		给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	84.88 ± 7.02	82.33 ± 6.34	83.23 ± 7.11	82.36 ± 6.78	86.12 ± 6.09
模型	-	86.42 ± 6.83	75.66 ± 4.21	73.21 ± 4.32 ^{1,5)}	66.42 ± 3.45 ^{1,5)}	62.33 ± 3.32 ^{1,6)}
秋水仙碱	8 × 10 ⁻⁵	84.68 ± 6.51	78.72 ± 4.55	70.56 ± 5.01 ^{1,5)}	77.32 ± 5.67 ^{1,3,5)}	80.24 ± 3.45 ³⁾
排钱草	4	85.02 ± 7.13	76.53 ± 3.89	73.06 ± 5.23 ^{1,5)}	77.15 ± 4.32 ^{1,3,5)}	81.02 ± 4.32 ³⁾
	2.4	83.55 ± 5.12	76.82 ± 4.02	72.15 ± 3.98 ^{1,5)}	67.53 ± 3.43 ^{1,6)}	60.54 ± 2.89 ^{2,6)}

表 3 排钱草对食蟹猴血清 HA, LN, MMP-1, TIMP-1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

		$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$				
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	HA				
		给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	74.52 ± 5.13	77.13 ± 4.31	73.24 ± 4.17	75.38 ± 4.53	76.52 ± 4.09
模型	-	76.35 ± 5.82	95.46 ± 8.24	179.29 ± 14.22 ^{1,5)}	266.32 ± 23.45 ^{2,5)}	332.33 ± 3.32 ^{2,6)}
秋水仙碱	8×10^{-5}	74.98 ± 4.52	97.54 ± 9.35	176.56 ± 15.05 ^{1,5)}	207.41 ± 25.67 ^{1,3,5)}	189.27 ± 3.45 ^{1,3,5)}
排钱草	4	75.62 ± 4.15	96.53 ± 9.59	183.23 ± 13.29 ^{1,5)}	198.35 ± 18.32 ^{1,3,5)}	181.02 ± 4.32 ^{1,3,5)}
	2.4	73.15 ± 3.16	97.02 ± 9.62	192.13 ± 14.98 ^{1,5)}	235.54 ± 23.53 ^{2,6)}	326.58 ± 22.89 ^{2,6)}
		LN				
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	LN				
		给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	92.37 ± 7.84	96.18 ± 9.33	95.28 ± 9.24	97.34 ± 8.59	86.59 ± 7.49
模型	-	97.33 ± 9.81	105.44 ± 10.25	137.24 ± 12.32 ^{1,5)}	156.35 ± 14.42 ^{1,5)}	202.37 ± 19.36 ^{2,6)}
秋水仙碱	8×10^{-5}	96.43 ± 9.25	117.57 ± 9.27	146.34 ± 13.26 ^{1,5)}	167.44 ± 15.68 ^{1,5)}	142.21 ± 13.05 ^{1,3,5)}
排钱草	4	93.57 ± 8.18	106.55 ± 10.34	133.28 ± 11.22 ^{1,5)}	148.35 ± 12.36 ^{1,5)}	131.05 ± 9.38 ^{1,3,5)}
	2.4	89.17 ± 7.23	112.05 ± 9.54	142.15 ± 14.08 ^{1,5)}	165.59 ± 13.58 ^{1,5)}	196.27 ± 19.84 ^{2,6)}
		MMP-1				
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	MMP-1				
		给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	63.32 ± 6.53	65.14 ± 5.32	70.08 ± 7.01	67.32 ± 5.51	72.33 ± 7.09
模型	-	67.25 ± 4.82	65.42 ± 6.23	67.31 ± 9.25	56.35 ± 8.52	52.37 ± 9.18
秋水仙碱	8×10^{-5}	71.21 ± 5.21	62.51 ± 6.07	71.37 ± 10.22	77.23 ± 7.26	81.05 ± 13.05
排钱草	4	73.38 ± 6.12	64.52 ± 7.32	62.08 ± 8.28	78.43 ± 9.32	82.24 ± 7.32
	2.4	69.07 ± 3.27	62.07 ± 6.55	64.18 ± 7.12	61.02 ± 8.55	56.36 ± 8.17
		TIMP-1				
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TIMP-1				
		给药前	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
正常	-	72.13 ± 7.02	74.15 ± 6.16	77.02 ± 6.54	74.37 ± 5.43	78.37 ± 6.24
模型	-	75.28 ± 4.83	82.22 ± 6.28	86.32 ± 4.55	98.85 ± 8.57 ¹⁾	112.34 ± 9.13 ^{1,5)}
秋水仙碱	8×10^{-5}	73.56 ± 7.11	81.59 ± 4.13	83.32 ± 5.11	99.27 ± 7.26 ¹⁾	71.05 ± 6.057 ^{1,3)}
排钱草	4	79.42 ± 5.17	87.05 ± 7.38	91.03 ± 4.23	99.03 ± 8.31 ¹⁾	68.28 ± 4.31 ^{1,3)}
	2.4	76.09 ± 4.29	81.07 ± 3.54	84.08 ± 4.19	101.02 ± 9.15 ¹⁾	127.39 ± 8.47 ^{1,5)}



A. 正常组; B. 模型组; C. 秋水仙碱组; D. 排钱草(4.0 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组; E. 排钱草(2.4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组(图 2~4 同)

图 1 排钱草对食蟹猴肝脏形态学的影响

Fig. 1 Effect of Phyllodii Pulchelli Radix on hepatic morphology of cynomolgus monkeys

出现少量巨噬细胞,肝细胞呈现点状或片状坏死,有部分成纤维细胞向肝细胞间延伸;排钱草高剂量组和秋水仙碱组肝细胞坏死较轻,未见明显成纤维细胞增生。Van-Gieson 染色下,模型组和排钱草低剂量组食蟹猴肝脏汇管区大量组织红染,胶原纤维增生,但尚未形成典型假小叶;排钱草高剂

量组和秋水仙碱组肝脏染红胶原纤维形成较少。见图 2,3。

3.6 排钱草对肝脏 TGF- β_1 和 α -SMA 蛋白表达水平影响 第 16 周,模型组和排钱草低剂量组肝脏 TGF- β_1 和 α -SMA 蛋白表达水平较正常组显著升高 ($P < 0.05$);排钱草高剂量组和秋水仙碱组肝脏

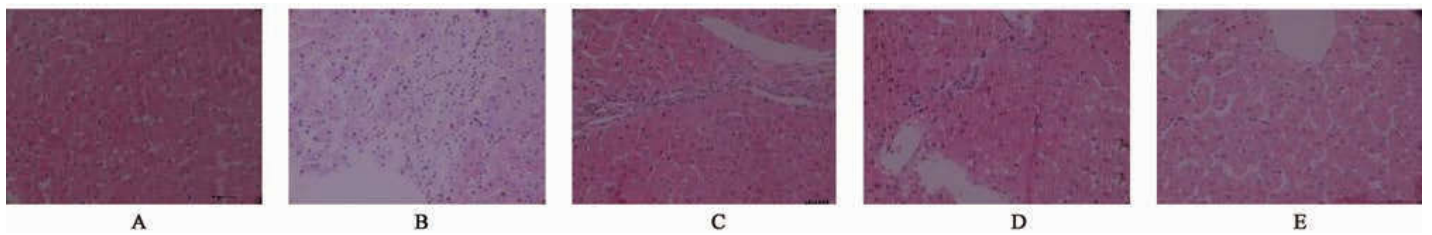


图 2 排钱草对食蟹猴肝脏组织学的影响 (HE, ×200)

Fig. 2 Effect of Phyllodii Pulchelli Radix on liver tissue of cynomolgus monkeys(HE, ×200)

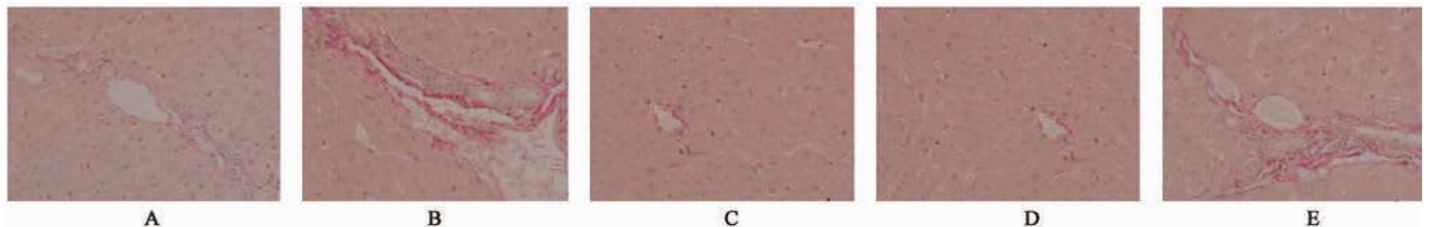
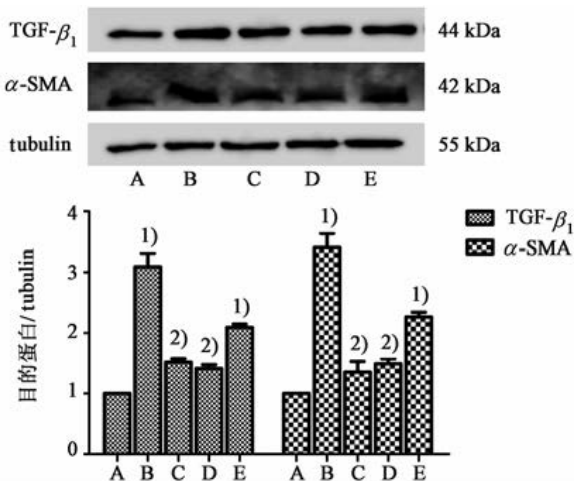


图 3 排钱草对食蟹猴肝脏组织学的影响 (Van-Gieson, ×200)

Fig. 3 Effect of Phyllodii Pulchelli Radix on liver tissue of cynomolgus monkeys(Van-Gieson, ×200)

TGF-β₁ 和 α-SMA 蛋白表达水平比模型组显著下降 (P < 0.05)。见图 4。



与正常组比较¹⁾ P < 0.05; 与模型组比较²⁾ P < 0.05

图 4 排钱草对食蟹猴肝脏 TGF-β₁ 和 α-SMA 表达水平的影响 (x̄ ± s, n = 6)

Fig. 4 Effect of Phyllodii Pulchelli Radix on liver levels of TGF-β₁ and α-SMA in cynomolgus monkeys(x̄ ± s, n = 6)

4 讨论

肝纤维化是慢性肝病向肝硬化发展的必经之路,是多种慢性肝脏疾病的表现形式。目前认为,包括肝星状细胞(HSC)的激活^[2]、免疫调节反应^[2]以及 DNA 甲基化和组蛋白修饰^[13]等为代表的表观遗传学改变等多种因素综合作用下,一方面使细胞外基质形成增加,另一方面则是细胞外基质降解减少,共同促进肝纤维化向肝硬化迁延发展。在促进细胞外基质形成增加的主要原因中,HSC 在损伤因素作用下的激活被认为是纤维化发生、发展的关键环节,活化的 HSC 转化为肌纤维母细胞,功能发生改变,

分泌大量细胞外基质^[14]。同时,在损伤因素作用下,肝细胞,Kupff 细胞等分泌大量细胞因子,TGF-β₁ 在肝纤维化中起中心作用,也是 HSC 激活的重要标志,其通过诱导肝细胞凋亡、增加细胞外基质合成、抑制细胞外基质降解等促进肝纤维的进一步发展^[15-16]。细胞外基质降解的减少,与肝脏中 MMP, TIMP 的平衡失调密切相关^[17]。在肝纤维化进展早期,MMP 活性有一定程度的增加,TIMP 无明显变化,细胞外基质尚能维持平衡;随着肝纤维化的发展,细胞外基质的增加,MMP 活性减弱,TIMP 含量不断增高,导致了 MMP 和 TIMP 的平衡失调,细胞外基质大量堆积^[18]。肝纤维化进展过程中存在肝细胞的损伤和细胞外基质的不断形成,因此,抗肝纤维化药物治疗应在减少肝细胞损伤、抑制纤维形成以及降解细胞外基质中发挥作用^[3]。

实验研究中发现,高剂量排钱草(4.0 g · kg⁻¹) 在给药 8 周后,能迅速减少肝细胞损伤,血清 ALT, AST, TBIL 和 ALP 水平显著下降,TP 和 ALB 水平则显著升高。随着给药的时间延长至 12 周,血清 HA 水平显著下降,TIMP 活性下降,肝脏中的 TGF-β₁ 表达量下降,表明排钱草能够同时减少细胞外基质的生成,调节 MMP 和 TIMP 平衡的失调,增加细胞外基质的降解,影像学 and 病理活检结果进一步验证了排钱草改善肝纤维化的作用。通过血清学、影像学 and 病理学等手段的动态观察发现,肝细胞损伤减少后,细胞外基质生成减少,降解增加。在食蟹猴肝纤维化模型上,不仅纤维化的发生、发展过程与人类最接近,表现为肝细胞大量损伤,细胞外基质生成增加,TIMP 含量的逐渐升高等。同时,在肝纤维化进

展的过程中能够通过多次采集血样标本、应用 B 超等影像学检查以及肝纤维化诊断的“金标准”病理活检等手段,全方位、多角度观察纤维化的发展以及药物的作用,在食蟹猴肝纤维化模型提供的良好平台中,充分体现了排钱草作为抗肝纤维化的潜质药物。

综上所述,排钱草在食蟹猴肝纤维模型中具有抗肝纤维化作用,表现为减少肝细胞损伤、抑制细胞外基质形成、促进细胞外基质降解等,但是,对排钱草抗肝纤维化的具体机制以及其成药性上缺乏深入探索。在今后的研究中,将充分利用食蟹猴肝纤维化模型的良好平台,进一步探索排钱草在肝纤维化不同阶段中的作用,并充分评估其成药性,为开发民间抗纤维化药方排钱草提供可靠依据。

致谢:广西民族医药研究院钟鸣教授为本实验研究提供排钱草醇提物以及参与方案讨论。

[参考文献]

[1] Böttcher K, Pinzani M. Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 409(17):30072-30078.

[2] 张伟,贾继东. 肝纤维化的发病机制及治疗新靶点[J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(3):409-412.

[3] 马振增,陆伦根. 肝纤维化药物治疗的新进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(6):1183-1187.

[4] 肖丽萍,宋洋洋,周彦希,等. 赶黄草抗非酒精性脂肪肝的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(10):125-129.

[5] 莫菁莲,王政. 肝苏颗粒对慢性乙型肝炎患者 IL-21 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(8):284-286.

[6] 章圣朋,何勇,徐涛,等. 夏枯草总三萜调控 ERK, TGF- β_1 /Smad 通路对肝纤维化大鼠的保护作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(2):261-266.

[7] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:2091-2092.

[8] 王超,钟鸣,张宝璟,等. 壮药排钱草根的抗肝纤维化成分研究[J]. *中药材*, 2014, 37(3):424-427.

[9] 黄洁玲,钟鸣,余胜民,等. 排钱草总生物碱对人肝星状细胞增殖及肝纤维化相关胶原蛋白、细胞因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(13):283-286.

[10] 钟鸣,余胜民,杨增艳,等. 排钱草总生物碱对免疫性肝纤维化大鼠 I, III, IV 型胶原及 TGF- β_1 表达的影响[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2005, 15(1):38-40.

[11] 侯艳锋,李晖,梁颖丹,等. 肝纤维化动物模型研究进展[J]. *武汉大学学报:医学版*, 2015, 36(1):155-158.

[12] 庞荣清,刘建昆,何占龙,等. 猕猴肝纤维化模型建立与评价[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 13(16):1956-1958.

[13] Moran-Salvador E, Mann J. Epigenetics and liver fibrosis[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017, 4(1):125-134.

[14] 陈应康,余福强,刘大腾,等. 水飞蓟宾葡甲胺盐对大鼠肝纤维化的疗效和可能机制[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(3):360-364.

[15] TU X L, ZHANG Y Y, ZHENG X X, et al. TGF- β -induced hepatocyte lincRNA-p21 contributes to liver fibrosis in mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):2957-2971.

[16] 张家富,姜辉,高家荣,等. 肝乐胶囊对肝纤维化大鼠 TGF- β_1 /Smad 信号通路的调控作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(6):169-174.

[17] 任俊杰,刘立新. MMPs/TIMPs 介导的纤维消融平衡与肝纤维化的研究新进展[J]. *中华消化病与影像杂志:电子版*, 2016, 6(4):175-179.

[18] 谢君,谢晓芳,代良平,等. 肝苏颗粒对四氯化碳致肝纤维化大鼠肝功能和病理损伤的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(8):117-123.

[责任编辑 邹晓翠]