

柴竭抑肝纤对硫代乙酰胺诱导的大鼠肝纤维化的影响

郭会君¹, 蔡悦青¹, 魏炜¹, 余晓玲², 张志毕^{3*}, 姜莉云^{2*}

(1. 云南中医学院, 昆明 650500; 2. 昆明市中医医院, 昆明 650000;
3. 昆明医科大学 生物医学工程研究中心, 昆明 650500)

[摘要] 目的: 研究中药复方柴竭抑肝纤(Chaijie Yiganxian, CJYGX)对抗大鼠肝纤维化的作用及其机制。方法: 60 只 SD 大鼠随机分为正常组, 模型组, 阳性组(鳖甲煎丸), CJYGX 高、中、低剂量组。除正常组外, 其余 5 组通过腹腔注射硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)诱导建立肝纤维化模型。自造模第 4 周开始, 阳性组给予鳖甲煎丸 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, CJYGX 高、中、低剂量组分别给予 CJYGX $7.96, 3.98, 1.99 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 模型组灌服生理盐水, 每日灌胃 1 次, 共 5 周。于末次灌胃 24 h 后, 水合氯醛轻度麻醉大鼠, 留取血清及肝组织, 称肝脏湿重并计算肝脏指数; 全自动分析法检测大鼠肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST), 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP); 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测肝纤维化血清学标志物层粘连蛋白(laminin, LN), 透明质酸酶(hyaluronidase, HA), IV 型胶原(IV collagen, C IV), III 型前胶原(prococollagen III, PC III); 马松(Masson)染色观察肝脏纤维化程度; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肝脏组织转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1), Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 mRNA 表达; 免疫组化检测肝脏组织血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)和 TGF- β_1 蛋白表达水平; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏 TGF- β_1 和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)蛋白表达。结果: 与正常组比较, 模型组肝脏指数显著升高; 肝功能指标 ALP, AST, ALT 的含量显著升高; 肝纤维化指标 LN, HA, IV-C, PC III 和 HYP 显著升高; Masson 染色观察到肝纤维化程度显著增加; TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4 mRNA 表达显著升高, Smad7 mRNA 表达显著降低; TGF- β_1 , PDGF 和 α -SMA 蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 各剂量的 CJYGX 能不同程度的降低肝功能指标 ALP, AST, ALT 的水平; 肝纤维化指标 LN, HA, IV-C, PC III 和 HYP 都明显的降低; Masson 组织观察到肝纤维化程度显著减轻; TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4 mRNA 表达明显下调, Smad7 mRNA 表达明显上调; TGF- β_1 , PDGF 和 α -SMA 蛋白表达显著下调($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 中药复方“柴竭抑肝纤”可能通过干预 TGF- β_1 /Smad 信号通路, 保护 TAA 诱导的大鼠肝纤维化损伤。

[关键词] 柴竭抑肝纤; 肝纤维化; 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1); Smad

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)04-0109-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190404

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181101.1723.021.html>

[网络出版时间] 2018-11-06 11:58

Effect of Chaijie Yiganxian on Hepatic Fibrosis Induced by Thioacetamide in Rats

GUO Hui-jun¹, CAI Yue-qing¹, WEI Wei¹, YU Xiao-ling², ZHANG Zhi-bi^{3*}, JIANG Li-yun^{2*}

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Kunming 650500, China;

2. Kunming Hospital of TCM, Kunming 650000, China;

3. Kunming Medical University Biomedical Engineering Research Center, Kunming 650500, China)

[收稿日期] 20180730(010)

[基金项目] 云南省科技厅科技计划项目(2013FZ253)

[第一作者] 郭会君, 硕士, 从事中药学研究, E-mail: 1536572828@qq.com

[通信作者] * 张志毕, 实验师, 从事天然药物化学研究, E-mail: zhang_zhibi@163.com;

* 姜莉云, 主任医师, 硕士生导师, 从事中药学研究, E-mail: jean6895@163.com

[Abstract] Objective: To research the effect of traditional Chinese medicine compound Chaijie Yiganxian (CJYGX) on the hepatic fibrosis in rats and explore the mechanism. **Method:** Totally 60 SD rats were randomly divided into normal group, model group, positive group (Biejia Jianwan), and low, medium and high-dose CJYGX groups. Except for the normal group, the remaining five groups were involved in establishing the hepatic fibrosis model through the intraperitoneal injection of thioacetamide (TAA). Fourth weeks after modeling, the positive group was given Biejiajian pill ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and high, medium and low-dose CJYGX groups were given CJYGX ($7.96, 3.98, 1.99 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), respectively. The model group was given normal saline once a day for 5 weeks. 24 h after the last intragastric administration with chloral hydrate, the rats were anesthetized slightly. Serum and liver tissues were collected. The liver wet weight was weighed electronically, and the liver index was calculated. Liver function indexes [alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP)] and serum markers [laminin (LN), hyaluronidase (HA), IV collagen (CIV), procollagen III (PC III)] of hepatic fibrosis were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The degree of hepatic fibrosis by Masson stain, mRNA expressions of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and protein expression levels of platelet derived growth factor (PDGF), TGF- β_1 and α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected by immunohistochemical or Western blot. **Result:** Compared with the blank group, the model group liver index was significantly increased; the contents of ALP, AST and ALT were significantly increased; the liver fibrosis indexes LN, HA, IV-C, PC III and HYP were significantly increased; the degree of liver fibrosis was significantly increased in Masson tissue; the mRNA expressions of TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4 were significantly increased; and the Smad7 mRNA expression was significantly decreased. The protein expressions of TGF- β_1 , PDGF and α -SMA increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, different doses of CJYGX can reduce the concentrations of ALP, AST, ALT, and the hepatic fibrosis indexes (LN and HA, IV-C, PC III) and HYP also were significantly lower. Masson staining show that CJYGX can significantly reduce the degree of hepatic fibrosis. Real-time PCR show that CJYGX can significantly down-regulate mRNA expressions of TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4 and up-regulate mRNA expression of Smad7. Immunohistochemical and Western blot analysis show that, compared with model group, CJYGX could significantly reduce the protein expressions of TGF- β_1 , PDGF and α -SMA ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Traditional Chinese medicine compound CJYGX may protect TAA-induced hepatic fibrosis injury by interfering with TGF- β_1 /Smad signaling pathway.

[Key words] Chaijie Yiganxian; hepatic fibrosis; transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1); Smad

肝纤维化(HF)是由各种慢性非自限性肝损伤产生的一种以细胞外基质过量沉积为特征的损伤修复反应,其进一步发展会逐步恶化为肝硬化,现已成为全球具有较高的发病率和病死率的疾病^[1]。HF的发生与肝星状细胞(HSC)的激活密切相关,当肝组织和细胞发生变性坏死及各种炎症刺激时,HSC被激活,转变为肌成纤维细胞,并开始大量增殖,合成大量的细胞外基质(ECM),导致肝脏中胶原等细胞外基质的沉积与降解失去平衡,使肝内细胞外基质性纤维异常沉积^[2-3]。肝脏是人体重要的代谢器官,肝细胞外ECM的沉积影响了肝细胞的正常功能,导致肝脏分解代谢功能下降,从而引起机体一系列病变。HF是各种慢性肝病的共同病理基础,是发展到肝硬化的必经阶段,HF是可逆的,而肝硬化

是不可逆的,因此 HF 阶段的治疗是拯救肝脏的最后机会^[4]。

HF 相当于中医学的“胁痛”“黄疸”“鼓胀”“痞块”“积聚”“癥瘕”等概念,“湿热、疫毒、痰瘀、肝郁、正虚、血瘀”常被强调为其病因病机。故中医药抗 HF 方法多体现在活血化瘀、补益脏腑、清热祛湿、疏肝健脾上^[5]。本研究柴竭抑肝纤(Chaijie Yiganxian, CJYGX)是由昆明市中医医院姜莉云主任医师根据中医基础理论及 20 余年临床经验自主研发的保肝护肝经验方,由北柴胡、血竭、白芍、赤芍、当归等 13 味中药组成,临床研究发现其具有疏肝行气、益气健脾、活血化瘀的功效,疗效明显^[6]。前期研究发现 CJYGX 在体外能显著抑制大鼠肝星状细胞的增殖与活化^[7],但是其在体内的抗纤维化

作用机制尚不明确。故本研究通过硫代乙酰胺 (TAA) 诱导建立大鼠 HF 模型, 通过血清学和组织病理学评价 CJYGX 对大鼠 HF 的疗效, 并通过分子生物学技术探讨 CJYGX 对转化生长因子- β_1 /信号转到蛋白 (TGF- β_1 /Smad) 信号通路的调控机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 6 周龄, 雄性, 体质量 180 ~ 200 g, 购买于昆明医科大学实验动物学部, 生产合格证号 SCXK(滇)2015-0004。本研究取得了昆明医科大学实验动物伦理委员会的批准 (编号 KMMU-2017-012)。

1.2 药物 CJYGX 药物组成 (1 个处方量): 北柴胡 10 g, 血竭 5 g, 白芍 15 g, 赤芍 10 g, 当归 15 g, 桃仁 10 g, 红花 5 g, 佛手 15 g, 茵陈 50 g, 黄芪 30 g, 川芎 10 g, 北沙参 15 g, 甘草片 6 g。药物制备方法: 血竭打粉过 60 目筛备用, 其余药味用水煮提 2 次, 每次 8 倍量水, 煮提 1.0 h; 过滤, 合并 2 次滤液; 滤液浓缩至相对密度 1.30 ~ 1.35 (50 °C), 加入血竭粉 (60 目) 拌匀, 于烤箱中干燥 (80 ~ 90 °C) 制得。CJYGX 由昆明市中医药制剂中心 (GPP 认证, 滇: 2010009HZ) 制备, 为院内制剂。药材均由昆明市中医医院药剂科科长, 昆明市中医药制剂中心主任余晓玲鉴定均为正品。鳖甲煎丸 (国药集团中联药业有限公司, 批号 160400)。

1.3 试剂 丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天冬氨酸氨基转移酶 (AST), 碱性磷酸酶 (AKP), 羟脯氨酸 (HYP) 试剂 (南京建成生物工程有限公司, 批号分别为 20170104, 20170103, 20170103, 20170115); 层粘连蛋白 (LN), 透明质酸酶 (HA), IV 型胶原 (C IV), III 型前胶原 (PC III) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (武汉华美生物工程有限公司, 批号分别为 CSB-E04646r, CSB-E08120r, CSB-E08883r, CSB-E01581r); 血小板源性生长因子 (PDGF), TGF- β_1 , α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 兔抗一抗和兔抗二抗 (武汉华美生物工程有限公司, 批号分别为 189781AP, 551351AP, SA00001-2, CSB-MA000091); 马松 (Masson) 染色液 (南京森贝伽生物科技有限公司, 批号 20170216); TAA (美国 Sigma 公司, 批号 MKBK0572V); AxyPrep 总 RNA 提取试剂盒 (美国 Axygen 公司, 批号 12113KD1); RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司, 批号 00374359); 荧光定量试剂盒 [宝生生物工程 (大连) 有限公司, 批号 AK8603]; 引物合成 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。

1.4 仪器 S8APO 型光学显微镜, RM2235 型切片机, EG1160 型包埋机 (德国 Leica 公司); Synergy2 型多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); Centrifuge 5804R 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); ACCURI C6 型化学发光仪, GCZX3 型垂直电泳仪及转膜仪 (美国 BD 公司); QuantStudioTM 6 Flx 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 动物分组造模及给药方法 大鼠适应性饲养 1 周后, 大鼠随机分为 6 个组, 每组 10 只, 分别为正常组, 模型组, 阳性药组, CJYGX 高、中、低剂量组。模型制备参照参考文献 [8], TAA 用无菌生理盐水制备成 3% 浓度, 按剂量 160 mg·kg⁻¹, 隔天注射 1 次, 共 7 周。动物给药量依据成人 (60 kg) 临床每日用量计算, 换算出大鼠的等效用剂量。自造模第 4 周开始, 阳性组即予鳖甲煎丸 1 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃 [9-10], CJYGX 高、中、低剂量组分别给予 CJYGX 7.96, 3.98, 1.99 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃, 模型组灌服生理盐水, 每日灌胃 1 次, 共给药 5 周。

2.2 检测指标与方法

2.2.1 一般形态学观察 观察大鼠毛色、活动、饮食情况, 每周称量体质量 1 次, 根据体质量调整给药量。

2.2.2 标本采集 末次给药 12 h 后, 大鼠 4% 水合氯醛按 10 mL·kg⁻¹ 剂量腹腔注射, 麻醉后解剖腹腔, 腹主动脉采血, 1 万 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血清, -80 °C 冷冻保存备用。取出肝脏组织, 冰生理盐水漂洗, 吸水纸吸去附着的液体, 称质量。在肝脏左叶中间部位取部分肝脏置于 10% 甲醛溶液中保存。

2.2.3 肝脏指数计算 肝脏指数 = 肝脏质量/体质量 × 100%。

2.2.4 HF 组织学检查 固定好的肝脏组织进行常规 Masson 染色 [9], 在光镜下观察 HF 程度, 并进行拍照。每个样品选取 5 个不同的视野拍照, 然后用 IPP 6.0 软件统计发生 HF 的面积百分比。HF 面积百分比 = 纤维化面积/总面积 × 100%。

2.2.5 肝功能测定 根据试剂盒说明书, 使用全波长酶标仪, 检测大鼠血清中 ALT, AST, ALP 含量, 所有操作均按照试剂盒说明书进行。

2.2.6 HF 指标测定 ELISA 检测大鼠血清中 LN, HA, IV-C, PC III 含量, 酸水解法检测肝脏组织 HYP 含量, 所有操作均按照试剂盒说明书进行。

2.2.7 Real-time PCR 检测 TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 mRNA 表达 取小鼠肝脏 30 mg, 根

据 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 测定 RNA 浓度和纯度, 根据逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 用 TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 和内参 β -肌动蛋白 (β -actin)

引物进行 Real-time PCR 扩增, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。Real-time PCR 反应条件为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 反应总体积为 20 μ L。引物信息见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

名称	引物序列(5'-3')		产物长度/bp
	上游	下游	
TGF- β_1	CTTGCCCTCTACAACCAACA	CTTGCGACCCACGTAGTAGA	102
Smad2	AGTGTTTGCCGAGTGCCTAAGTG	GAGCAGCAAATCTTGTTGTTGA	146
Smad3	TAGCACAGGCTCTTTGGATG	GAAGCAGAGACTGGGTCCTC	93
Smad4	GTGGCTGGTCGGAAAGGAT	CCTGGGTAAGGATGGCTCT	273
Smad7	TGCTGTGCAAAGTGTTCAGGTG	CCATCGGGTATCTGGAGTAAGGA	177
β -actin	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTTC	150

2.2.8 免疫组化 SABC 法检测肝组织 PDGF 和 TGF- β_1 蛋白表达 固定好的肝组织石蜡切片, 经常规二甲苯脱蜡。用 3% H₂O₂ 除去内源性的过氧化氢酶, 并进行血清封闭。滴加一抗 (1:1 000), 4 °C 湿盒封闭过夜, 一抗孵育后 PBST 摇床漂洗 5 min, 4 次。滴加二抗 (1:5 000), 37 °C 湿盒封闭 30 min, 封闭后 PBST 漂洗 5 min, 3 次。DAB 染色, 苏木素液复染, 脱水、封片。镜下观察组织染色, 染色结果通过 IPP 6.0 软件分析各组表达变化。

2.2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肝组织 TGF- β_1 , α -SMA 蛋白表达 取肝组织 100 mg, 加入裂解液 RIPA, 超声匀浆, 冰上裂解 30 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清, BCA 法检测蛋白浓度。蛋白进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 (1:1 万), 4 °C 孵育过夜, 洗膜后加入辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1:1 万) 室温孵育 1 h, 洗膜后 ECL 化学发光检测, 以 β -actin 蛋白为内参, Image J 软件分析 TGF- β_1 和 α -SMA 蛋白灰度值相对表达量。

2.3 统计学方法 采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般形态学观察 正常组大鼠毛色顺滑, 饮水进食正常, 模型组大鼠毛发紊乱, 无光泽, 饮水和进食量减少, 体质量增量减少, 与文献报道相似^[10], 符

合 TAA 诱导 HF 模型特征。CJYGX 组大鼠上述症状有所改善。肝脏指数结果显示, 与正常组比较, 模型组肝脏指数显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, CJYGX 组肝脏指数都有一定程度的降低, 其中 CJYGX 高剂量组降低最明显, 但无显著差异。见表 2。

表 2 CJYGX 对 HF 大鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of CJYGX on liver index of HF rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝脏指数
正常	-	3.12 ± 0.33
模型	-	4.34 ± 0.33 ²⁾
鳖甲煎丸	1	4.12 ± 0.22
CJYGX	7.96	4.00 ± 0.37
	3.98	4.08 ± 0.42
	1.99	4.01 ± 0.39

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⁾ $P < 0.01$ (表 3~7 同)。

3.2 对 HF 大鼠血清 ALP, ALT, AST 水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清中 ALP, AST, ALT 水平均显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, CJYGX 组 ALP, AST, ALT 水平均明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

3.3 对 HF 大鼠肝脏纤维化血清标志物 LN, HA, IV-C, PCⅢ水平和肝脏组织 HYP 水平的影响 与正常组比较, 模型组 LN, HA, IV-C, PCⅢ均显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, CJYGX 组 LN, HA, IV-C, PCⅢ指标均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

表 3 CJYGX 对 HF 大鼠血清 ALP,ALT,AST 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

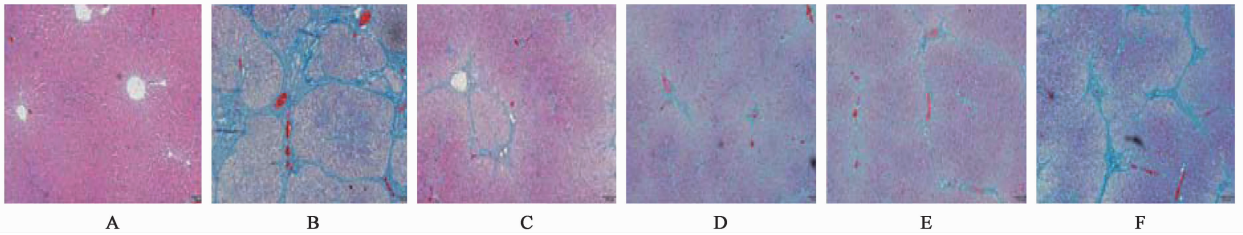
Table 3 Effect of CJYGX on serum ALP, ALT and AST levels in HF rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ALP /U·mL ⁻¹	AST /U·L ⁻¹	ALT /U·L ⁻¹
正常	-	0.16 ± 0.06	30.40 ± 6.75	55.99 ± 17.53
模型	-	0.30 ± 0.06 ²⁾	79.66 ± 16.31 ²⁾	192.36 ± 63.05 ²⁾
鳖甲煎丸	1	0.22 ± 0.04 ³⁾	47.93 ± 17.11 ³⁾	115.51 ± 31.38 ⁴⁾
CJYGX	7.96	0.18 ± 0.03 ⁴⁾	48.43 ± 12.92 ⁴⁾	112.21 ± 34.41 ⁴⁾
	3.98	0.22 ± 0.04 ⁴⁾	45.17 ± 17.81 ⁴⁾	104.70 ± 27.96 ⁴⁾
	1.99	0.22 ± 0.03 ³⁾	48.16 ± 13.84 ⁴⁾	120.90 ± 18.51 ⁴⁾

表 4 CJYGX 对 HF 大鼠肝脏纤维化标志物 LN,HA,IV-C,PCⅢ和 HYP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of CJYGX on concentrations of LN, HA, IV-C, PCⅢ and HYP in liver fibrosis markers of HF rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/g·kg ⁻¹	LN	HA	IV-C	PCⅢ	HYP
正常	-	217.59 ± 43.19	88.58 ± 11.36	44.74 ± 6.57	1.87 ± 0.23	195.34 ± 36.24
模型	-	439.18 ± 55.37 ²⁾	139.41 ± 15.62 ²⁾	84.92 ± 8.84 ²⁾	3.50 ± 0.31 ²⁾	402.35 ± 65.21 ²⁾
鳖甲煎丸	1	325.86 ± 38.38 ⁴⁾	116.87 ± 13.37 ³⁾	65.35 ± 9.89 ⁴⁾	2.80 ± 0.31 ⁴⁾	312.25 ± 56.30 ⁴⁾
CJYGX	7.96	310.18 ± 32.56 ⁴⁾	115.49 ± 14.32 ⁴⁾	61.36 ± 8.34 ⁴⁾	2.60 ± 0.34 ⁴⁾	308.11 ± 29.37 ⁴⁾
	3.98	338.00 ± 59.03 ⁴⁾	123.36 ± 11.25 ³⁾	61.61 ± 8.91 ⁴⁾	2.93 ± 0.31 ³⁾	341.26 ± 54.19 ⁴⁾
	1.99	363.20 ± 66.40	134.47 ± 21.65	80.14 ± 11.24	2.91 ± 0.26 ⁴⁾	362.19 ± 61.02 ³⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 鳖甲煎丸组; D. CJYGX 高剂量组; E. CJYGX 中剂量组; F. CJYGX 低剂量组 (图 2, 3 同)

图 1 CJYGX 对 HF 大鼠肝脏组织病理变化的影响 (Masson, × 100)

Fig. 1 Effect of CJYGX on pathological changes of liver tissue in HF rats (Masson, × 100)

表 5 CJYGX 对 HF 大鼠肝脏纤维化面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of CJYGX on liver fibrosis area in HF rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HF 面积/%
正常	-	-
模型	-	12.56 ± 1.46 ²⁾
鳖甲煎丸	1	4.26 ± 0.46 ⁴⁾
CJYGX	7.96	4.78 ± 0.45 ⁴⁾
	3.98	5.17 ± 0.74 ⁴⁾
	1.99	10.03 ± 0.88 ⁴⁾

3.5 对 HF 大鼠肝脏 TGF-β₁, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 mRNA 表达的影响 与正常组比较,

3.4 对 HF 大鼠肝脏组织病理变化的影响 Masson 染色结果显示,正常组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞及肝血窦以中央静脉为中心呈放射状排列,无纤维组织增生。模型组大鼠肝脏有大量的纤维组织增生,纤维间隔粗大,将肝小叶分割成大小不等的假小叶,肝细胞具有不同程度的水肿和坏死。CJYGX 低剂量组大鼠肝细胞变性、坏死及纤维间隔未见明显的减少。但鳖甲煎丸组,CJYGX 中、高剂量组肝细胞变性、纤维组织增生、纤维间隔程度得到显著缓解,肝脏组织发生纤维化的面积比率显著降低 ($P < 0.01$)。见图 1 和表 5。

模型组 TGF-β₁, Smad2, Smad3, Smad4 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$), Smad7 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,CJYGX 组 TGF-β₁, Smad2, Smad3, Smad4 mRNA 表达都有不同程度的降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), Smad7 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6。

3.6 对 HF 大鼠肝脏 TGF-β₁ 和 α-SMA 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 PDGF, TGF-β₁ 和 α-SMA 蛋白表达均显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,CJYGX 组 PDGF, TGF-β₁ 和 α-SMA 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 3 和表 7。

4 讨论

HF 是指当肝组织和细胞发生变性坏死及各种

表 6 CJYGX 对 HF 大鼠肝脏 TGF-β₁, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Effect of CJYGX on expression of TGF-β₁, Smad2, Smad3, Smad4 and Smad7 mRNA in HF rat liver ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF-β ₁	Smad2	Smad3	Smad4	Smad7
正常	-	1.01 ± 0.08	0.99 ± 0.11	1.01 ± 0.36	1.14 ± 0.41	1.33 ± 0.35
模型	-	2.12 ± 0.55 ²⁾	2.41 ± 0.62 ²⁾	1.95 ± 0.74 ²⁾	1.93 ± 0.51 ²⁾	1.71 ± 0.72 ²⁾
鳖甲煎丸	1	1.36 ± 0.34 ⁴⁾	1.68 ± 0.46 ⁴⁾	1.71 ± 0.49 ⁴⁾	1.52 ± 0.39 ⁴⁾	2.16 ± 0.88 ³⁾
CJYGX	7.96	1.32 ± 0.42 ⁴⁾	1.74 ± 0.57 ⁴⁾	1.77 ± 0.39 ³⁾	1.72 ± 0.67 ³⁾	2.49 ± 0.18 ⁴⁾
	3.98	1.40 ± 0.22 ⁴⁾	1.78 ± 0.55 ⁴⁾	1.84 ± 0.46 ³⁾	1.90 ± 0.37	2.23 ± 0.52 ⁴⁾
	1.99	1.56 ± 0.37 ⁴⁾	1.84 ± 0.62 ⁴⁾	1.87 ± 0.47 ³⁾	1.92 ± 0.27	2.16 ± 0.33 ³⁾

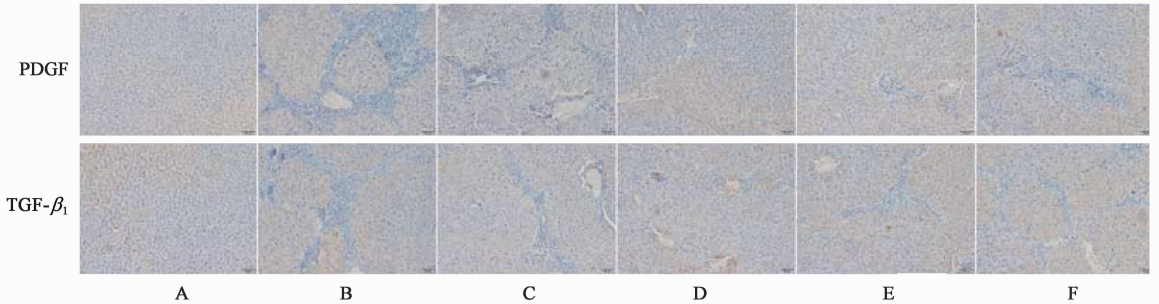


图 2 CJYGX 对 HF 大鼠肝脏 PDGF 和 TGF-β₁ 表达的影响 (免疫组化, ×100)

Fig 2 Effect of CJYGX on expression of PDGF and TGF-β₁ in HF rat liver (IHC, ×100)

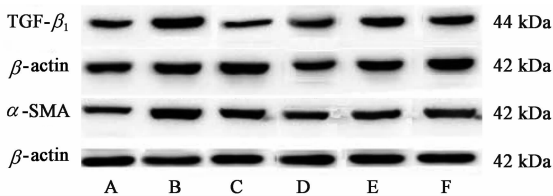


图 3 大鼠肝脏 TGF-β₁ 和 α-SMA 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of TGF-β₁ and α-SMA protein expression in rat liver

表 7 CJYGX 对 HF 大鼠肝脏 PDGF, TGF-β₁, α-SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of CJYGX on expression of PDGF, TGF-β₁ and α-SMA protein in HF rat liver ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IA		蛋白相对表达量	
		PDGF	TGF-β ₁	TGF-β ₁ /β-actin	α-SMA/β-actin
正常	-	4.69 ± 0.65	3.80 ± 0.16	52.31 ± 15.36	50.06 ± 9.58
模型	-	9.49 ± 0.98 ²⁾	7.38 ± 1.13 ²⁾	126.16 ± 16.35 ²⁾	146.35 ± 16.96 ²⁾
鳖甲煎丸	1	7.02 ± 0.94 ⁴⁾	4.96 ± 1.08 ⁴⁾	63.76 ± 11.46 ⁴⁾	98.12 ± 10.84 ⁴⁾
CJYGX	7.96	5.06 ± 0.46 ⁴⁾	4.40 ± 0.37 ⁴⁾	57.86 ± 12.06 ⁴⁾	98.69 ± 9.61 ⁴⁾
	3.98	5.08 ± 0.32 ⁴⁾	5.14 ± 1.20 ⁴⁾	67.14 ± 14.87 ⁴⁾	87.95 ± 16.49 ⁴⁾
	1.99	5.54 ± 0.97 ⁴⁾	5.94 ± 1.19 ³⁾	76.15 ± 14.59 ⁴⁾	108.16 ± 10.59 ⁴⁾

母细胞产生胶原,尤其是 I 型及 III 型胶原^[12]。TGF-β₁对 HSC 的激活、转化、分化及调节具有极其重要的作用,并促进 ECM 的产生及沉积,引起 HF^[13-15]。TGF-β₁促进纤维发生的作用主要是通过

炎症刺激时,肝脏中胶原等细胞外基质的沉积与降解失去平衡,致肝内细胞外基质性纤维异常沉积的病理过程。ECM 主要来源于 HSC,且 HSC 的激活是 HF 发生发展的中心环节^[11]。肝受损时,大量分泌的 PDGF 刺激激活 HSC,促进 HSC 转化为肌纤维样母细胞,并促使星形细胞迁移,聚集于受损区。而肌纤维样母细胞合成大量细胞外基质沉积于肝细胞间质,促进 HF 发生。PDGF 能够促进肌纤维

TGF-β₁/Smad信号通路来实现的^[16]。首先,TGF-β₁与细胞膜上的 I 型和 II 型受体(TβRI 和 TβRII)形成TGF-β-TβRI-TβRII复合物,该复合物能磷酸化细胞质中的受体 R-Smad(如 Smad2 和 Smad3),活化

后的 R-Smad 与 Smad4 形成复合物,由细胞质转入细胞核内,协同转录因子调控靶基因 mRNA 的表达,产生生物学效应。

中医学认为该病多由外感瘟毒、内伤七情、饮食劳倦等作用于肝,致肝失疏泄,肝郁气滞,肝郁脾虚,瘀血内停,湿热疫毒残留难尽的病理机制,是一个“由实转虚,由聚至积,由气入血及络”的动态病变过程^[17]。本研究用药 CJYGX 为纯中药制剂,由北柴胡、血竭、白芍、赤芍、当归、桃仁、红花、佛手、茵陈、黄芪、北沙参、川芎、甘草片共 13 味中药组成,方中柴胡疏肝解郁、升达清阳,血竭活血定痛、化瘀止血,二者共为君药;黄芪补气健脾,北沙参养阴清肺、益胃生津,红花活血化瘀止痛,当归养血益阴活血,以上四者共为臣药;佛手理气和中、燥湿化痰,茵陈清利湿热,桃仁破血行滞而润燥,白芍敛阴、柔肝止痛,赤芍、川芎活血祛瘀、理气行滞,使气行则血行而化瘀,六者共为佐药;甘草调和诸药,为使药。方中诸药共奏疏肝行气、益气健脾、活血化瘀的功效。

本实验采用 TAA 腹腔注射诱导的 HF 大鼠模型,研究不同剂量的 CJYGX 对 HF 大鼠的治疗作用及其机制。结果显示,CJYGX 能不同程度的降低 ALP,AST,ALT 的浓度,保护肝脏功能。结合血清 HF 4 项指标(LN,HA,Ⅳ-C,PCⅢ),肝脏 HYP 检测和肝脏 HF Masson 染色结果,显示 CJYGX 能有效逆转 TAA 导致的 HF 病变,减轻肝脏纤维化程度。进一步研究其作用机制,通过免疫组化分析研究发现,CJYGX 能显著降低 HF 发生的重要激活和促进因子 PDGF 和 TGF- β_1 的表达。 α -SMA 是 HSC 活化的主要标志物,与 HSC 的活化程度呈正比^[13],研究发现 CJYGX 能显著降低肝脏 α -SMA 的表达,表明 CJYGX 能通过抑制 HSC 的活化来减轻 HF 病变。

研究表明 CJYGX 可以明显抑制并减轻大鼠 HF 水平,降低肝脏指数、肝功能指标及 HF 指标,具有保护并改善肝脏的作用,其作用机制可能是通过调控 TGF- β_1 /Smad 信号通路,抑制 HSC 的激活和增殖,发挥抗肝脏纤维化的作用。

但是 HF 的发生是一个多因素作用的结果,本研究仅仅从动物实验的角度探讨 CJYGX 抗纤维化的作用,也仅探讨了 TAA 诱导的大鼠 HF 模型的保护作用,CJYGX 对其他病因引起的 HF 是否有保护作用以及其更深层次的作用机制尚不明确,有待今后进一步研究。

[参考文献]

- [1] GUO J, Friedman S L. Hepatic fibrogenesis[J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(4):413-426.
- [2] Asrani S K, Larson J J, Yawn B, et al. Underestimation of liver-related mortality in the United States[J]. Gastroenterology, 2013, 145(2):375-382.
- [3] 陈宵瑜,杨长青. 肝纤维化发病机制研究新进展[J]. 实用肝脏病杂志,2016,19(1):121-124.
- [4] Lieber C S. Prevention and treatment of liver fibrosis based on pathogenesis [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2010, 23(5):944-949.
- [5] 李光全,黄奕雪,尹萍,等. 中药复方抗肝纤维化药理作用研究进展[J]. 中药与临床,2016,7(2):95-98.
- [6] 郑玉,姜莉云,李焱,等. 自拟柴竭抑肝纤汤对慢性肝病患者肝纤维化指标的影响[J]. 云南中医中药杂志,2018,39(3):102.
- [7] 郭会君,张志毕,余晓玲,等. 柴竭抑肝纤对大鼠肝星状细胞增殖和 TGF- β_1 /Smad 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(13):100-104.
- [8] 刘煜,吕若芸,万博,等. 硫代乙酰胺诱导肝纤维化模型及其血清学诊断数学模型的构建[J]. 药物生物技术,2009,16(6):554-558.
- [9] 张再康,邓国兴,郑玉光. 鳖甲煎丸的临床和实验研究进展[J]. 中国中药杂志,2008,33(8):965-967.
- [10] 陈冠新,文彬,孙海涛,等. 鳖甲煎丸对 CCL₄ 致大鼠肝纤维化模型中 NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(10):161-167.
- [11] 高强,李旭光,樊莉,等. 肝纤维化发病机制的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2017,17(14):2780-2785.
- [12] Thieringer F, Maass T, Czochra P, et al. Spontaneous hepatic fibrosis in transgenic mice over expressing PDGF-A[J]. Gene, 2008, 423(1):23-28.
- [13] Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity [J]. BBA-Mol Cell Res, 2010, 1803(1):55-71.
- [14] Wynn T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis[J]. J Pathol, 2010, 214(2):199-210.
- [15] 张家富,姜辉,高家荣,等. 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠 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.
- [16] 黄进,张晨,詹菲,等. 黄芪多糖对肝纤维化大鼠 TGF- β_1 /Smads 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015,30(6):2184-2186.
- [17] 魏珂,赵慧玲,田年秀,等. 中医药治疗肝纤维化的研究进展[J]. 国际中医中药杂志,2014,36(11):1049-1053.

[责任编辑 周冰冰]