

## 扶正化瘀胶囊对非酒精性脂肪性肝纤维化小鼠的影响

辛鑫<sup>1</sup>, 蔡蓓玉<sup>1</sup>, 陈成<sup>1</sup>, 王欣<sup>1</sup>, 安梓铭<sup>1</sup>, 赵长青<sup>1,2</sup>, 刘平<sup>1,2</sup>, 胡义扬<sup>1,2\*</sup>, 冯琴<sup>1,2\*</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学肝病研究所, 上海市中医临床重点实验室, 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

**[摘要]** 目的:探讨扶正化瘀胶囊对高反式脂肪酸高糖饮食诱导小鼠非酒精性脂肪性肝纤维化的治疗作用。方法:采用40只SPF级雄性C57/B6小鼠随机分成4组,分别为正常组、模型组、扶正化瘀胶囊组、扶正化瘀胶囊组,每组10只,除正常组10只外,余30只用高脂高糖饮食诱导小鼠非酒精性脂肪性肝纤维化模型24周。在造模第25周起,4组分别灌胃给药4周,1次/d,扶正化瘀胶囊组4.8 g·kg<sup>-1</sup>;奥贝胆酸组10 mg·kg<sup>-1</sup>;模型组、正常组同体积生理盐水灌胃。第28周结束后收集肝组织和血清样本。分别采用苏木素-伊红(HE)染色观察各组小鼠肝组织病理变化、天狼猩红染色观察肝纤维化程度、油红O染色观察脂质沉积程度,碱水解法测定肝组织羟脯氨酸(Hyp)含量,酶法检测肝组织甘油三酯(TG)含量的变化,试剂盒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)活性及空腹血糖(FBG),酶联免疫吸附测定(ELISA)技术检测空腹胰岛素(INS)水平,并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)的变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫组化检测肝纤维化相关mRNA与蛋白水平的变化。结果:与正常组比较,模型组肝组织出现显著的胶原纤维沉积,纤维化分期大多为F2-F3期,肝组织炎性灶数目增多、肝细胞气球样变和肝细胞脂肪变性明显,肝组织Hyp,TG含量显著升高( $P<0.01$ ),血清ALT,AST活性及FBG,INS,HOMA-IR水平显著升高( $P<0.01$ ),肝组织I型胶原蛋白(Col-I),Col-IV, $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA),转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )蛋白及mRNA表达水平明显升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。与模型组比较,扶正化瘀胶囊组小鼠肝组织胶原纤维沉积显著减轻,纤维化分期大多为F0-F1期,肝细胞气球样变显著改善,小叶内炎性灶数目明显减少( $P<0.05$ , $P<0.01$ );与模型组比较,扶正化瘀胶囊可显著降低小鼠肝组织Hyp含量、血清ALT,AST水平及Col-I,Col-IV, $\alpha$ -SMA,TGF- $\beta$  mRNA与蛋白表达( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结论:扶正化瘀胶囊对高反式脂肪酸高糖饮食诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝纤维化具有良好的治疗作用。

**[关键词]** 扶正化瘀胶囊; 肝纤维化; 非酒精性脂肪肝炎; 小鼠; 治疗作用

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)06-0037-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210202

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210121.1631.008.html>

**[网络出版日期]** 2021-1-22 8:17

### Effect of Fuzheng Huayu Capsule on Experimental Non-alcoholic Fatty Liver Fibrosis in Mice

XIN Xin<sup>1</sup>, CAI Bei-yu<sup>1</sup>, CHEN Cheng<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>, AN Zi-ming<sup>1</sup>, ZHAO Chang-qing<sup>1,2</sup>,  
LIU Ping<sup>1,2</sup>, HU Yi-yang<sup>1,2\*</sup>, FENG Qin<sup>1,2\*</sup>

(1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China; 2. Institute of Liver Diseases, Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases, Ministry of Education, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the therapeutic effect of Fuzheng Huayu capsule on nonalcoholic

**[收稿日期]** 20201020(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81673780);上海市卫健委名老中医学术经验研究工作室项目(SHGZS-2017029)

**[第一作者]** 辛鑫,博士,从事慢性肝病基础与临床研究,E-mail:xinxinliver@yeah.net

**[通信作者]** \*冯琴,博士,研究员,博士生导师,从事慢性肝病基础与临床研究,E-mail:fengqin1227@163.com;

\*胡义扬,博士,研究员,博士生导师,从事慢性肝病基础与临床研究,E-mail:yuhuliver@163.com

fatty liver fibrosis induced by high trans fatty acid and high sugar diet in mice. **Method:** Forty SPF male C57/B6 mice were randomly divided into 4 groups (normal group, model group, Obelcholinic acid group, and Fuzheng Huayu capsule group), with 10 mice in each group. Except 10 mice in the normal group, nonalcoholic fatty liver fibrosis was induced by high-fat and high-sugar diet for 24 weeks in the other 30 mice. From the 25th week of modeling, 4 groups received intragastric administration for 4 weeks, once a day: Fuzheng Huayu capsule group  $4.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Oxycholic acid group  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Model control group and normal group received the same volume of normal saline. Liver tissue and serum samples were collected at the end of the 28th week. The pathological changes of liver tissue of mice in each group were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, the degree of liver fibrosis was observed by Sirius red staining, the degree of lipid deposition was observed by oil red O staining, the content of hydroxypropylamine (Hyp) in liver tissue was determined by alkaline hydrolysis, and the change of triglyceride (TG) in liver tissue was detected by enzyme method. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) activities and fasting blood glucose (FBG) were detected by kit method, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect fasting Insulin (INS) level and calculate the changes of insulin resistance index (HOMA-IR), liver fibrosis related mRNA and proteins of were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), Western blot and Immunohistochemistry. **Result:** Compared with the normal group, the liver tissue in the model group showed significant collagen fiber deposition, at mostly F2-F3 fibrosis stages, with increased number of inflammatory foci in liver tissue, obvious balloon degeneration and fatty degeneration of liver cells, significantly increased contents of Hyp and TG in liver tissue ( $P < 0.01$ ), significantly increased activities of ALT and AST in serum and levels of FBG, INS and HOMA-IR ( $P < 0.01$ ), and increased type I collagen (Col- I), Col-IV,  $\alpha$ -smooth muscle agonist protein ( $\alpha$ -SMA) and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) protein and mRNA in liver tissue. Compared with the model group, the collagen fiber deposition in liver tissue of mice in Fuzheng Huayu capsule group was significantly reduced, at mostly F0-F1 fibrosis stages, with significantly improved balloon-like change of hepatocytes, and significantly reduced number of inflammatory foci in lobules ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, Fuzheng Huayu capsule can significantly reduce the content of Hyp in liver tissue, the levels of serum ALT and AST, and the expression of Col- I, Col-IV,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$  genes and proteins in mice ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Fuzheng Huayu capsule has a good therapeutic effect on nonalcoholic fatty liver fibrosis induced by high trans fatty acid and high sugar diet in mice.

[Key words] Fuzheng Huayu capsule; liver fibrosis; non-alcoholic steatohepatitis; mice; therapeutic effect

非酒精性脂肪性肝病(代谢相关脂肪性肝病, MAFLD)为临床常见的肝病,其疾病谱包括非酒精性单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)及其相关肝硬化和肝细胞癌<sup>[1]</sup>。其中NASH为该病发展的重要阶段,以肝细胞脂肪变伴坏死性炎症和/或纤维化为主要特征<sup>[2]</sup>。仅在中国,NASH人群到2030年预计会有48%的急剧增长,超过4 800万,其中由NASH导致的进展期肝纤维化约占16.5%。肝纤维化是影响NASH相关疾病预后的最重要的预测指标<sup>[3-4]</sup>,也是目前NASH组织学终点唯一可预测肝脏相关不良临床结果和全因死亡率的标志,这表明由NASH引起的进展性肝纤维化的治疗会成为该病新型治疗方法的关键。目前关于非酒精性脂

肪性肝纤维化的发病机制尚未完全明确,亦缺乏特异的治疗方法<sup>[5]</sup>。

扶正化瘀胶囊作为国家药品监督管理局(CFDA)批准以肝纤维化为适应证的中成药,由丹参、冬虫夏草菌丝、桃仁、绞股蓝、五味子及松花粉6味中药组成。其基于抗纤维化机制的传统中医药理论活血化瘀、扶正补气和清热解毒3种治法,在反复药理实验研究基础上研制而成。在临床使用过程中,扶正化瘀胶囊可以显著改善慢性乙型肝炎及丙型肝炎患者的肝功能及肝纤维化程度<sup>[6-7]</sup>。基础研究发现扶正化瘀方对二甲基亚硝胺、四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )及胆管结扎等诱导的多种实验性肝纤维模型具有良好的抗肝纤维化疗效<sup>[8-12]</sup>,但对西方饮食诱

导的非酒精性脂肪性肝纤维化是否具有保护作用,至今尚无报道。本研究旨在观察扶正化癥胶囊对高反式脂肪酸高糖饮食小鼠肝纤维化改变,明确扶正化癥胶囊对实验性非酒精性脂肪性肝纤维化的治疗作用。

## 1 材料

**1.1 动物** C57BL/6J 雄性小鼠, 8 周龄, 40 只, SPF 级, 购自上海斯莱克实验动物公司。许可证号 SYXK(沪)2014-0008。上海中医药大学实验动物中心 SPF 级饲养室饲养、造模与观察。动物实验部分经上海中医药大学动物实验伦理委员会批准(编号 SZY201710017)。

**1.2 药物与试剂** 扶正化癥胶囊干膏粉(批号 180208), 每剂含丹参 4 g, 桃仁 2 g, 绞股蓝 6 g, 松花粉 2 g, 冬虫夏草菌丝 8 g, 五味子 2 g; 其干膏粉由上海黄海制药有限责任公司(临床药物生产公司)提供, 质控符合标准(24 g 扶正化癥成药中丹参以丹酚酸 B 计, 应  $\geq 15.6$  mg, 以丹参素钠计, 应  $\geq 13.2$  mg; 虫草菌丝以腺苷计, 应  $\geq 4.8$  mg; 五味子以五味子乙素计, 应  $\geq 2.28$  mg), 主要制备工艺同文献[12]; 给药剂量按照临床给药剂量换算小鼠剂量,  $4.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  小鼠体重/只/天灌胃(扶正化癥方成人临床剂量为每次 5 粒, 每日 3 次, 共 15 粒; 每粒胶囊含生药 1.6 g, 正常成人每日服扶正化癥生药为  $1.6 \text{ g/粒} \times 15 \text{ 粒} = 24 \text{ g}$ , 按照 60 kg 成人质量计算, 正常成人每日服药剂量为  $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; 按照小鼠与人体表面积折算<sup>[13]</sup>, 动物实验小鼠给药剂量是 60 kg 成人的 12 倍, 故小鼠给予扶正化癥药物剂量为  $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \times 12 = 4.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ); 奥贝胆酸(美国 Biovison 公司, 批号 3J28B18980), 给药剂量  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[14]</sup>; 高反式脂肪酸饲料与对照饲料(美国 Research Diets 公司, 高脂饲料货号 D12331, 对照饲料货号 D12328); 配制糖水的糖粉购于南通特洛非饲料科技有限公司(果糖货号 F0001, 蔗糖货号 S0001); 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT), 血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST), 甘油三酯(TG), 羟脯氨酸(Hyp)(碱)试剂盒, 苏木素-伊红(HE), 天狼猩红染色剂, 油红 O 染色剂(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 C009-2, C010-2, A0-10017, A030-2, D006, D126, D027); RNA 柱式抽提试剂盒, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本 Takara 公司, 批号分别为 9767, AK7208); RNA 逆转录试剂盒, BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司, 批号分别为 K1622, NCI3225CH); 胰岛素(INS)酶联免疫吸附测定

(ELISA)试剂盒(美国 Crystal Chem 公司, 批号 90080); trizol 试剂[生工生物工程(上海)股份有限公司, 批号 B900044-1000]; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 见表 1; EZ Protein any KD PAGE 胶(上海李记公司); I 型胶原蛋白(Col-I),  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA), 转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ ), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab6308, ab32575, ab92486, ab181602)。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Col-I	上游 GCCTTGGAGGAACTTTGCTT	105
	下游 GGAGACCACGAGGACCAGAA	
$\alpha$ -SMA	上游 GGAGAAAATGACCCAGATTATG	117
	下游 GAGTCCAGCACAATACCAGTT	
Col-IV	上游 GATAGCCAAAGCCAAACCCA	82
	下游 ACGCAGAGCAGAAGCAAGAAG	
TGF- $\beta$	上游 CACCCACTTTTGGATCTCAGA	117
	下游 TTTGAGGTTGAGGGAGAAAAGC	
$\beta$ -actin	上游 CCTCTATGCCAACACAGT	155
	下游 AGCCACCAATCCACACAG	

**1.3 仪器** XFSTPRP-48 型全自动研磨仪(上海净信科技有限公司); 5415R 型高速低温离心机(日本 Olympus 公司); ALPHA14 型冷冻干燥仪(德国 Merein Christ 公司); F200PRO 型酶标仪(瑞士 Tecan 集团公司); VIA7 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司); 041BR127719 型电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); Odyssey CLX 双色红外荧光成像系统(美国 LI-COR Biosciences 公司); RM2035 型轮转切片机, ASP300 型自动脱水机, EG1160 型组织包埋机, SCN400 型数据扫描切片机(德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 模型制备** 采用 C57BL/6J 小鼠, 以高反式脂肪酸饲料(58% 能量来源于脂肪)加糖水(质量浓度  $42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 糖粉以 55% 果糖和 45% 蔗糖的比例混合溶解)喂养 28 周建立 NASH 伴肝纤维化模型, 正常组小鼠饲以对照饲料<sup>[15]</sup>。

**2.2 分组和给药** 雄性小鼠 40 只小鼠, 自造模之日起, 按照随机数字表格分为正常组 10 只, 造模组 30 只。造模第 25 周后, 将造模组小鼠随机分为模型组、扶正化癥胶囊组、奥贝胆酸组, 每组 10 只。各用

药组按  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重给予相应药物, 正常组与模型组小鼠以等体积饮用水灌胃, 共灌胃4周。

**2.3 标本留取** 第28周造模和用药周期完成, 禁食12 h后, 用2%戊巴比妥钠  $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射麻醉, 打开腹腔。经下腔静脉采血,  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心15 min后吸取血清,  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  低温保存。在同一肝叶和位置切取一小块组织, 置入10%中性多聚甲醛中固定, 另定位取肝组织分装于离心管中 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  低温保存。

#### 2.4 检测指标与方法

**2.4.1 基础指标** 在取材之前后, 通过称量得到最后体质量, 肝脏湿重。

**2.4.2 酶法检测肝组织TG含量** 2 mL离心管中加入丙酮  $750 \text{ } \mu\text{L}$  和无水乙醇  $750 \text{ } \mu\text{L}$ 。称取肝组织约100 mg加入。65 Hz匀浆60 s。 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  的冰箱静置过夜。将肝组织匀浆在室温下以  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心15 min, 取  $9 \text{ } \mu\text{L}$  上清液加入  $900 \text{ } \mu\text{L}$  检测液中。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$  的水浴中5 min。使用多功能酶标仪, 通过比色法在546 nm波长下读取每个试管的吸光度  $A$ , 按照说明书的方法计算肝组织的TG含量。

**2.4.3 碱水解法检测肝组织Hyp含量** 称取肝组织湿重50 mg加入水解液1 mL, 沸水中水浴水解20 min; 加入指示剂  $10 \text{ } \mu\text{L}$ , 摇匀, 调pH, 取经过上述稀释的水解液4 mL加入30 mg活性炭, 混匀,  $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心10 min, 并取1 mL上清做检测。参考试剂盒说明书加入试剂, 用酶标仪测定各管  $A$ 。按照试剂盒说明书计算Hyp含量。

**2.4.4 HE染色和天狼猩红染色观察肝脏组织学变化** 取肝脏大叶同一部位肝组织, 置于10%中性甲醛缓冲液固定, 自动脱水机脱水, 石蜡包埋, 切片。HE和天狼猩红染色, 将封好的片子使用数据扫描切片仪自动扫描, 观察肝细胞脂肪变性、损伤、炎症浸润、胶原纤维增生或沉积程度等。

**2.4.5 油红O染色观察肝脏脂质沉积程度** 在冷冻切片仪开启24 h后, 将 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中的冷冻OCT凝胶冷冻组织块置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中进行初步切片。将粘合剂载玻片自然粘附到切片上并置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  的冰箱中进行染色。用稀释剂[储备溶液-稀释度(5:2)]稀释试剂盒中的储备溶液将水性封固剂置于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中加热至液态。将待染色的冷冻切片置于室温约15 min, 然后置于稀释和过滤的储备溶液中20 min, 然后用双蒸水在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$  洗涤10 s。洗涤后, 在复染溶液中染色5 min, 洗涤40 s后, 将水性封固剂滴加到载玻片上。用显微镜观察。

**2.4.6 NASH活动度评分(NAS)对肝组织病理进行评分** NAS为半定量评分标准,  $\text{NAS} < 3$  分可排除NASH,  $\text{NAS} > 4$  分则可诊断NASH, 介于两者之间者为NASH可能。积分越高则病变活动性越强、肝脏脂肪变性程度越高。具体评分标准见表2。

表2 NASH活动度评分标准

Table 2 NASH activity score standard

项目	评分			
	0	1	2	3
肝细胞脂肪变	<5%	5%~33%	34%~66%	>66%
小叶内炎症(200倍)	无	<2个	2~4个	>4个
肝细胞气球样变	无	少见	多见	

**2.4.7 纤维化分期对肝组织纤维化程度进行分期** 纤维化(Fibrosis)分期为F0~F4期, F0.无纤维化; F1.肝腺泡3区(中央静脉周围)、窦周或门静脉周围纤维化; F2.肝腺泡3区窦周和门脉纤维化但无桥接形成; F3.桥接纤维化和结节; F4.肝硬化。

**2.4.8 试剂盒检测血清ALT和AST的活性** ALT和AST的测定参考生化试剂盒说明书首先准备标准曲线, 然后使用多功能酶标仪读取  $A$ , 然后输入标准曲线公式计算测量值。使用微孔板方法测量ALT和AST。

**2.4.9 小鼠空腹血糖(FBG), INS, 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)的测定** 实验结束后, 将小鼠禁食12 h, 并在处死前将血液  $3 \text{ } \mu\text{L}$  滴在血糖试纸上, 并通过血糖仪测量小鼠的FBG水平。24 h后取血清样品, 并用INS ELISA试剂盒测定。

**2.4.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织 $\alpha$ -SMA, Col- I 和TGF- $\beta$ 蛋白表达** 称取肝组织50 mg, 加RIPA蛋白裂解液1 mL, 使用全自动研磨仪在65 Hz匀浆3次, 每次1 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心30 min, 抽取上清液, 使用BCA蛋白定量并加上样缓冲液。制备10%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 转膜, 膜封闭及抗体反应,  $\alpha$ -SMA(1:1 000), GAPDH(1:1 000), 二抗(1:1万)。使用Odyssey红外图像系统检测, 采用Image J软件分析各条带灰度值。

**2.4.11 Real-time PCR检测肝组织 $\alpha$ -SMA, Col- I, Col-IV 和TGF- $\beta$  mRNA表达** 称取肝组织50 mg, 加trizol 1 mL对组织总RNA进行提取, 使用全自动研磨仪在65 Hz匀浆3次, 每次1 min, 转移匀浆  $800 \text{ } \mu\text{L}$  至新的离心管中, 加二氯甲烷  $200 \text{ } \mu\text{L}$  振荡,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心15 min抽取上清  $400 \text{ } \mu\text{L}$  至

1.5 mL离心管中,加异丙醇 600  $\mu$ L振荡,4  $^{\circ}$ C,12 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃液,加 75%乙醇 1 mL,4  $^{\circ}$ C,12 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃液,加无水乙醇 1 mL,离心,DEPC水复融既得到总 RNA。使用逆转录试剂盒对总 RNA 进行逆转录,进而得到 cDNA。用 Real-time PCR 检测肝组织中  $\alpha$ -SMA, Col- I, Col-IV 和 TGF- $\beta$  的表达水平,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算各 mRNA 相对表达量。

**2.4.12 免疫组化检测肝组织  $\alpha$ -SMA 蛋白表达** 石蜡切片脱蜡后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,使用柠檬酸钠缓冲液置于微波炉内 100  $^{\circ}$ C 8 min,60  $^{\circ}$ C 25 min 进行抗原修复,自然冷却至室温后,PBS 洗 3 次,3%过氧化氢对内源性过氧化物酶活性进行阻断,PBS 洗 3 次,10%山羊血清封闭 30 min,滴加一抗( $\alpha$ -SMA,1:1 000),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗 3 次,滴加二抗(1:1 万),PBS 洗 3 次,DAB 显色,苏木素染核,0.4%盐酸乙醇分化,自来水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封片,将封好的片子使用数据扫描切片仪自动扫描,并观察肝组织中  $\alpha$ -SMA 的表达情况,采用 Image J 软件统计  $\alpha$ -SMA 积分吸光度 IA。

**2.5 统计学方法** 使用 SPSS 21.0 软件包对数据进行统计学分析,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用非参数检验,组间多重比较分析采用 One-way ANOVA 结合最小显著性差异法 LSD 多重比较分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对脂肪性肝纤维化小鼠体质量、肝湿重的影响** 与正常组比较,模型组小鼠体质量、肝湿重显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,扶正化瘀胶囊组小鼠体质量、肝湿重差异无统计学意义,两药之间差异无统计学意义。见表 3。

表 3 扶正化瘀胶囊对脂肪性肝纤维化小鼠体质量、肝湿重的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Fuzheng Huayu capsule on body mass and liver wet weight in mice with fatty liver fibrosis (FLF) ( $\bar{x} \pm s, n=10$ ) g

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	体质量	肝湿重
正常		28.34±1.79	1.29±0.29
模型		55.62±3.67 <sup>2)</sup>	2.14±0.52 <sup>2)</sup>
扶正化瘀胶囊	4.8	50.02±4.23	1.89±0.52
奥贝胆酸	0.01	49.98±4.97	1.69±0.48

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ;与奥贝胆酸组比较<sup>5)</sup> $P < 0.01$ (表 4~10 同)。

**3.2 对脂肪性肝纤维化小鼠肝组织 Hyp, TG 含量的影响** 与正常组比较,模型组小鼠肝组织 Hyp, TG 含量显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,扶正化瘀胶囊组小鼠肝组织 Hyp 含量显著降低( $P < 0.01$ ),肝组织 TG 含量无统计学意义。两药之间差异无统计学意义。见表 4。

表 4 扶正化瘀胶囊对脂肪性肝纤维化小鼠肝组织 Hyp, TG 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of Fuzheng Huayu capsule on content of Hyp and TG in liver tissue of mice with FLF ( $\bar{x} \pm s, n=10$ ) mg·g<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Hyp	TG
正常		0.15±0.01	16.59±5.40
模型		0.18±0.01 <sup>2)</sup>	30.92±2.58 <sup>2)</sup>
扶正化瘀胶囊	4.8	0.15±0.02 <sup>4)</sup>	31.56±8.88
奥贝胆酸	0.01	0.15±0.02 <sup>4)</sup>	24.00±2.53 <sup>4)</sup>

**3.3 对脂肪性肝纤维化小鼠血清 ALT, AST 活性的影响** 与正常组比较,模型组小鼠的血清 ALT, AST 活性显著升高( $P < 0.01$ )。扶正化瘀胶囊组小鼠血清 ALT, AST 活性较模型组显著降低( $P < 0.01$ )。其中,扶正化瘀胶囊组血清 ALT, AST 活性均显著低于奥贝胆酸组( $P < 0.01$ )。见表 5。

表 5 扶正化瘀胶囊对脂肪性肝纤维化小鼠血清 ALT, AST 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 5 Effect of Fuzheng Huayu capsule on serum ALT and AST activity in mice with FLF ( $\bar{x} \pm s, n=10$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ALT	AST
正常		7.49±2.98	19.66±6.47
模型		74.33±35.01 <sup>2)</sup>	51.86±15.20 <sup>2)</sup>
扶正化瘀胶囊	4.8	10.31±5.52 <sup>4,5)</sup>	23.14±10.39 <sup>4,5)</sup>
奥贝胆酸	0.01	40.73±18.89 <sup>3)</sup>	42.41±10.34

**3.4 对脂肪性肝纤维化小鼠 FBG, INS 和 HOMA-IR 的影响** 与正常组比较,模型组小鼠的 FBG, INS, HOMA-IR 显著升高( $P < 0.01$ )。但与模型组比较,扶正化瘀胶囊组与奥贝胆酸组均差异无统计学意义。见表 6。

**3.5 对脂肪性肝纤维化小鼠肝组织病理变化的影响** HE 染色,油红 O 染色结果显示,模型组小鼠肝组织已出现重度大泡性与小泡性脂肪样变(范围 66%~99%),伴显著地肝细胞气球样变性及小叶内炎性灶,扶正化瘀胶囊组小鼠肝细胞气球样变减轻,小叶内炎性灶数目减少,但细胞浆内脂肪变性程度无显著改善,与正常组比较,模型组 NAS 评分显著降低( $P < 0.01$ ),与模型组比较,扶正化瘀胶囊组

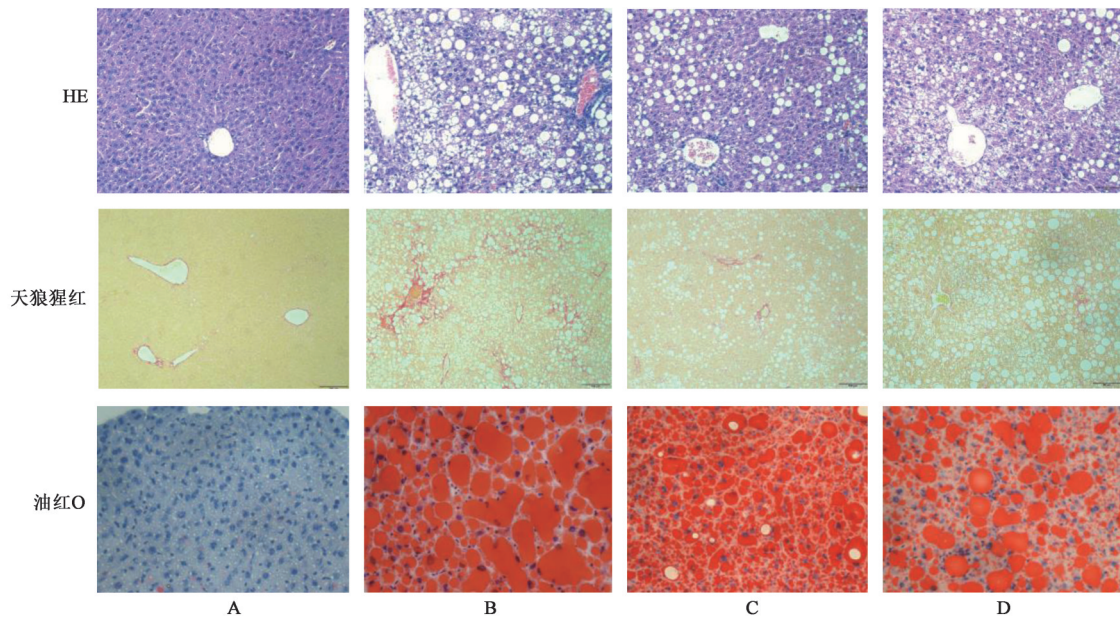
表 6 扶正化瘀胶囊对脂肪性肝纤维化小鼠 FBG, INS 和 HOMA-IR 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 6 Effect of Fuzheng Huayu capsule on FBG, INS and HOMA-IR in mice with FLF ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	FBG/mmol·L <sup>-1</sup>	INS/mmol·L <sup>-1</sup>	HOMA-IR
正常		6.20±1.14	0.21±0.07	0.05±0.01
模型		10.56±1.67 <sup>2)</sup>	0.67±0.18 <sup>2)</sup>	0.29±0.08 <sup>2)</sup>
扶正化瘀胶囊	4.8	9.50±0.56	0.53±0.22	0.25±0.05
奥贝胆酸	0.01	8.83±3.20	0.82±0.49	0.23±0.14

与奥贝胆酸组明显降低 NAS 评分 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 天狼猩红染色显示, 模型组小鼠肝组织窦周纤维化明显, 出现鸡笼样纤维化改变, 部分有桥接形成, 纤

维化分期超过半数为 F2-F3 期, 扶正化瘀胶囊组小鼠较模型小鼠肝纤维化程度减弱、桥接纤维化消失, 纤维化分期大多恢复为 F0-F1 期。见图 1 和表 7, 8。



A. 正常组; B. 模型组; C. 扶正化瘀胶囊组; D. 奥贝胆酸组 (图 2, 3 同)

图 1 扶正化瘀胶囊对脂肪性肝纤维化小鼠肝组织病理变化的影响 (HE, ×200; 天狼猩红, ×100; 油红 O, ×400)

Fig. 1 Effect of Fuzheng Huayu capsule on pathological changes of liver tissue in mice with FLF (HE, ×200; SR, ×100; oil red O, ×400)

表 7 扶正化瘀胶囊对脂肪性肝纤维化小鼠 NAS 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 7 Effect of Fuzheng Huayu capsule on NAS score of mice with FLF ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肝细胞脂肪变	小叶内炎症	肝细胞气球样变	总分
模型		2.75±0.16 <sup>2)</sup>	1.93±0.18 <sup>2)</sup>	2.00±0.00 <sup>2)</sup>	6.68±0.26 <sup>2)</sup>
扶正化瘀胶囊	4.8	2.25±0.25	1.13±0.23 <sup>3)</sup>	1.38±0.13 <sup>4)</sup>	5.25±0.37 <sup>3)</sup>
奥贝胆酸	0.01	1.38±0.18 <sup>4)</sup>	0.88±0.23 <sup>3)</sup>	1.13±0.23 <sup>4)</sup>	3.38±0.32 <sup>4)</sup>

注: 正常组中各指标 NAS 评分均为 0 分。

3.6 对脂肪性肝纤维化小鼠肝组织纤维化相关蛋白及 mRNA 表达的影响 Real-time PCR 结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织 Col- I, Col- IV,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  mRNA 表达明显升高 ( $P<0.05, P<0.01$ )。与模型组比较, 扶正化瘀胶囊组 Col- I, Col- IV,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  mRNA 表达均降低 ( $P<0.05, P<0.01$ )。Western blot 结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织 Col- I,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  蛋白表达显

著升高 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, 扶正化瘀胶囊组肝组织 Col- I,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  蛋白均显著降低 ( $P<0.01$ )。免疫组化结果显示, 模型组 Col- I,  $\alpha$ -SMA 蛋白表达量较正常组显升高 ( $P<0.01$ ), 多分布在肝细胞周围, 沿胶原纤维并行分布。扶正化瘀胶囊组 Col- I,  $\alpha$ -SMA 蛋白表达较模型组均显著降低 ( $P<0.01$ ), 差异有明显统计学意义。见图 2, 3 和表 9, 10。

表 8 扶正化瘀胶囊对脂肪性肝纤维化小鼠肝脏纤维化分期的影响 ( $n=10$ )

Table 8 Effect of Fuzheng Huayu capsule on liver fibrosis stages in mice with FLF ( $n=10$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	肝组织纤维化分期				Radit
		F0	F1	F2	F3	
正常		8	0	0	0	<sup>3)</sup>
模型		0	2	5	3	
扶正化瘀胶囊	4.8	3	5	2	0	<sup>3)</sup>
奥贝胆酸	0.01	2	5	3	0	<sup>3)</sup>

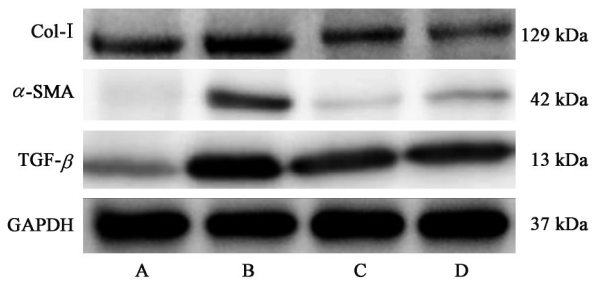


图 2 各组小鼠肝组织 Col-I,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  蛋白表达电泳  
Fig. 2 Electrophoresis of Col-I,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$  protein expression in liver tissue of mice with fatty liver fibrosis

#### 4 讨论

近年来由于生活习惯与饮食结构的改变,

NASH 发病率呈快速上升趋势。NASH 可向纤维化进展,肝纤维化的严重程度直接影响患者的生活质量和远期生存率。最新报告显示,约 40% 的 NASH 患者可发展为肝纤维化和肝硬化<sup>[16]</sup>。由于目前的 NASH 人群十分庞大,数十年后必然会导致 NASH 纤维化和肝硬化的高发病率。基于此,目前全球正在进行的 NASH 治疗药物临床试验,也将能否阻止肝纤维化进展作为判断药物疗效的最主要终点指标之一。积极治疗 NASH 伴肝纤维化,具有重要的社会和经济意义。

针对这一巨大的临床需求,基于各种新理论和新的靶点的 NASH 药物陆续进入新药研究,但由于目前人们对 NASH 肝纤维化复杂的发病机制尚不完全清晰,全球各大药企研发对其靶向药物靶点相对单一,且多处于临床实验阶段,尚无药物获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准。奥贝胆酸 (OCA) 作为最有希望治疗 NASH 肝纤维化的药物进入三期临床试验,但目前因治疗结果未达到预期以及不良反应等被 FDA 延期批准<sup>[17]</sup>。针对 NASH 合并肝纤维化复杂的发病机制,理想的治疗应该是针对多靶点进行综合治疗<sup>[18]</sup>。鉴于上述 NASH 的病理机制特点,以及中医整体观指导的阴阳平衡

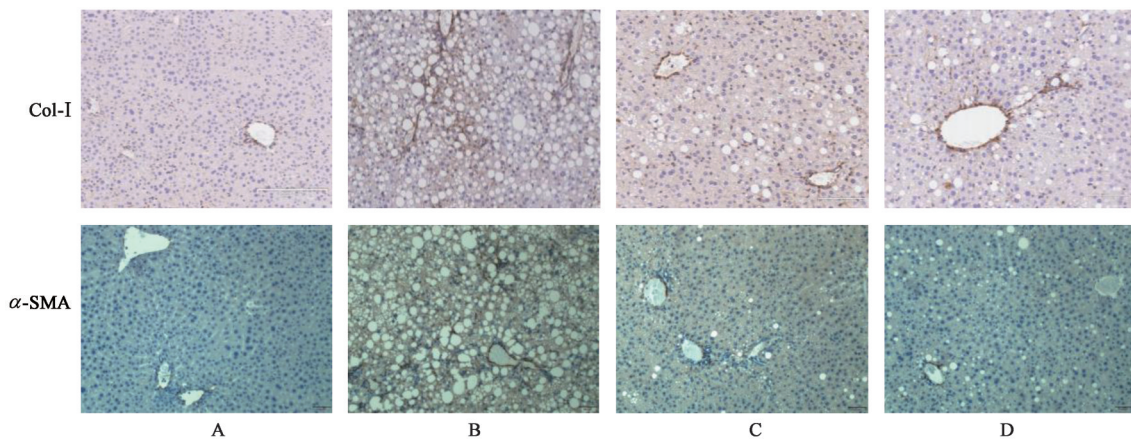


图 3 扶正化瘀胶囊对脂肪性肝纤维化小鼠肝组织 Col-I,  $\alpha$ -SMA 免疫组化的影响 (免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of Fuzheng Huayu capsule on immunohistochemistry of Col-I and  $\alpha$ -SMA in liver tissue of mice with FLF (IHC,  $\times 200$ )

表 9 扶正化瘀胶囊对脂肪性肝纤维化小鼠肝组织 Col-I, Col-IV,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  mRNA 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 9 Effect of Fuzheng Huayu capsule on mRNA expression of Col-I, Col-IV,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$  in liver tissue of mice with FLF ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Col-I	Col-IV	$\alpha$ -SMA	TGF- $\beta$
正常		1.00 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.10
模型		2.51 $\pm$ 0.80 <sup>1)</sup>	1.27 $\pm$ 0.23 <sup>1)</sup>	2.81 $\pm$ 1.17 <sup>2)</sup>	1.26 $\pm$ 0.17 <sup>1)</sup>
扶正化瘀胶囊	4.8	1.54 $\pm$ 0.73 <sup>3)</sup>	0.97 $\pm$ 0.15 <sup>4)</sup>	0.95 $\pm$ 0.26 <sup>4)</sup>	0.99 $\pm$ 0.11 <sup>3)</sup>
奥贝胆酸	0.01	1.06 $\pm$ 0.37 <sup>4)</sup>	0.67 $\pm$ 0.11 <sup>4)</sup>	0.78 $\pm$ 0.25 <sup>4)</sup>	0.79 $\pm$ 0.08 <sup>4)</sup>

表 10 扶正化癥胶囊对脂肪性肝纤维化小鼠肝组织 Col- I ,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 10 Effect of Fuzheng Huayu capsule on expression of Col- I ,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$  protein in liver tissue of mice with FLF ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Col- I /GAPDH	$\alpha$ -SMA/GAPDH	TGF- $\beta$ /GAPDH	Col- I 阳性面积/%	$\alpha$ -SMA 阳性面积/%
正常		0.53±0.14	0.14±0.15	0.34±0.11	5.75±1.69	11.41±2.47
模型		1.35±0.25 <sup>2)</sup>	1.15±0.13 <sup>2)</sup>	1.39±0.14 <sup>2)</sup>	28.78±2.11 <sup>2)</sup>	35.45±4.25 <sup>2)</sup>
扶正化癥胶囊	4.8	0.59±0.12 <sup>4)</sup>	0.19±0.11 <sup>4)</sup>	0.95±0.09 <sup>4)</sup>	10.41±3.23 <sup>4)</sup>	13.48±4.32 <sup>4)</sup>
奥贝胆酸	0.01	0.40±0.08 <sup>4)</sup>	0.23±0.10 <sup>4)</sup>	0.99±0.14 <sup>4)</sup>	12.75±2.42 <sup>4)</sup>	12.45±2.65 <sup>4)</sup>

理论和中药复方的多途径多靶点的药理作用特点, 中药必将体现出治疗这种复杂代谢疾病的特殊作用和特殊优势<sup>[19-21]</sup>。

扶正化癥胶囊是我国治疗乙肝后肝纤维化最常用的用药之一, 其针对慢性肝炎肝纤维化、肝硬化的“瘀血内结、正气虚弱”病机, 在反复药理实验研究基础上配伍组方而成的抗纤维化传统中药复方<sup>[11]</sup>, 由桃仁、丹参、绞股蓝、虫草菌丝、松花粉、五味子 6 味中草药组成, 方中丹参活血祛瘀为君药; 冬虫夏草补虚损、益精气, 桃仁助丹参活血化瘀, 共为臣药; 松花粉益气润燥, 绞股蓝清热解毒, 同为佐药; 五味子味酸为引经使药。既往研究该中药复方可有效改善慢性乙型肝炎患者的肝功能和血清学指标, 活检后发现肝脏纤维化逆转率达到近 60%, 并可有效降低 HBV 患者的门脉压力<sup>[22]</sup>。有学者对蛋氨酸胆碱缺乏饮食 (MCD) 诱导及高脂饮食复合 CCl<sub>4</sub> 诱导的非酒精性脂肪肝纤维化模型进行过扶正化癥胶囊干预, 治疗肝纤维化的效果显著<sup>[23-24]</sup>。虽然该模型在 NASH 中具有典型的组织病理变化, 但该模型伴随着体质量减轻, 代谢综合征的丧失等缺陷无法更好地模拟人类 NASH 发病机制中全身代谢紊乱的背景状态。“高脂饮食+CCl<sub>4</sub>”这种造模方法, 具有成模型时间短、纤维化程度相对重等优点, 但该模型表由化学毒物诱导, 与正常人类发病原因不符。另外, 其病理特征以门脉周围纤维化为主, 有别于以 NASH 纤维化以窦周纤维化为主的特征。作者研究团队前期已成功复制并改良的高反式脂肪酸高糖饮食造模方法可以成功诱导非酒精脂肪性肝纤维化动物模型, 该模型符合 NASH 发展的自然演变过, 具备代谢综合征、肝脏炎症和肝纤维化等主要疾病表型, 天狼猩红染色显示肝组织窦周纤维化明显, 出现鸡笼样纤维化改变, 多数小鼠纤维化分期为 F2~F3 级, 同时伴有明显的肥胖、胰岛素抵抗等代谢紊乱, 该模型与人类发病机制与病理表现更接近, 对药物的疗效评价及后期机制探讨亦更有意义<sup>[8]</sup>。因此本研究采用该模型, 从组织病理学、生

化学、分子生物学等方面观察扶正化癥胶囊在非酒精性脂肪性肝纤维化中的作用及机制。给药剂量确定方面, 扶正化癥胶囊作为本单位研制的临床治疗肝纤维化、早期肝硬化的常用药物<sup>[25-26]</sup>, 在临床使用前已在基础研究中进行了低中高剂量的反复探索, 最终确定扶正化癥胶囊治疗肝纤维化最佳成人临床剂量为每次 5 粒, 每日 3 次, 共 15 粒, 每粒胶囊含生药 1.6 g, 正常成人每日服用扶正化癥生药为 1.6 g/粒×15 粒=24 g, 故本研究给药剂量按照扶正化癥胶囊临床使用剂量换算。

本研究发现扶正化癥胶囊可显著降低该模型肝组织 Hyp 含量以及与肝纤维化相关蛋白和基因的表达, 并能显著减少肝组织胶原纤维的生成, 改善肝组织病理。从肝脏炎症损伤角度来看, 该方能显著降低血清 ALT, AST 活性, 减少肝脏炎性灶的生成, 降低肝脏 NAS 评分。但该方对该模型糖代谢指标 FBG, INS 及 HOMA-IR 未见显著改善, 肝脏脂肪代谢指标肝组织 TG 含量亦未见显著改善, 提示对纤维化的药理效应机制可能在于抑制炎症或者影响后期星状细胞活化、胶原的合成与降解过程。对照药奥贝胆酸在改善该模型肝纤维化程度、肝组织脂肪含量、肝酶活性及炎症指标均有显著治疗效果, 对糖代谢亦未见显著改善。扶正化癥胶囊与奥贝胆酸比较, 在改善肝脏损伤, 降低肝酶方面均有明显优势。本研究为该方今后应用于纤维化性 NASH 及 NASH 肝硬化疾病的治疗提供科学证据, 具体药理机制将会在未来研究中进一步探究。

#### [参考文献]

- [1] ESLAM M, SARIN S K, WONG V W, et al. The asian pacific association for the study of the liver clinical practice guidelines for the diagnosis and management of metabolic associated fatty liver disease[J]. Hepatol Int, 2020, doi:10.1007/s12072-020-10094-2.
- [2] YU J, SHEN J, SUN T T, et al. Obesity, insulin resistance, NASH and hepatocellular carcinoma [J]. Semin Cancer Biol, 2013, 23(6 Pt B):483-491.

- [ 3 ] EKSTEDT M, HAGSTRÖM H, NASR P, et al. Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up[J]. *Hepatology*, 2015, 61(5):1547-1554.
- [ 4 ] HAGSTRÖM H, NASR P, EKSTEDT M, et al. Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(6):1265-1273.
- [ 5 ] MURAG S, AHMED A, KIM D. Recent epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Gut Liver*, 2020, doi:10.5009/gnl20127.
- [ 6 ] 刘平, 胡义扬, 刘成, 等. 扶正化瘀胶囊干预慢性乙型肝炎肝纤维化作用的多中心临床研究[J]. *中西医结合学报*, 2003, 1(2):89-98, 102.
- [ 7 ] TAREK H, TERRY D, MYRON J, et al. A phase II, randomized, placebo-controlled, double-blind, multi-center study to assess the antifibrotic activity of fuzheng huayu in chronic hepatitis c patients with hepatic fibrosis (S-USIIT-01) [J]. *Gastroenterology*, 2014, doi:10.1016/S0016-5085(14)60921-5.
- [ 8 ] LIU C, HU Y, XU L, et al. Effect of Fuzheng Huayu formula and its actions against liver fibrosis[J]. *Chin Med*, 2009, doi:10.1186/1749-8546-4-12.
- [ 9 ] 吴硕, 马兴彬, 周成军, 等. 扶正化瘀方对肝纤维化小鼠肝细胞中Nrf2表达的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2014, 22(8):609-615.
- [ 10 ] ZHAO C Q. Curative effects of Fuzheng Huayu capsules on hepatic fibrosis and the functional mechanisms: a review [J]. *J Chin Integ Med*, 2006, 4(5):467-472.
- [ 11 ] LIU P, HU Y Y, LIU C, et al. Multicenter clinical study on Fuzhenghuayu capsule against liver fibrosis due to chronic hepatitis B [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(19):2892-2899.
- [ 12 ] 谭焯, 刘志强, 吕靖, 等. 扶正化瘀方对骨髓细胞在纤维化肝脏中迁移与分化的干预作用[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2013, 21(4):169-174.
- [ 13 ] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9):1069-1072.
- [ 14 ] RODRIGUES P M, AFONSO M B, SIMÃO A L, et al. miR-21 ablation and obeticholic acid ameliorate nonalcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Cell Death Dis*, 2017, doi:10.1038/cddis.2017.172.
- [ 15 ] XIN X, CAI B Y, CHEN C, et al. High-trans fatty acid and high-sugar diets can cause mice with non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis and potential pathogenesis [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2020, doi:10.1186/s12986-020-00462-y.
- [ 16 ] DIEHL A M, DAY C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(21):2063-2072.
- [ 17 ] NEUSCHWANDER-TETRI B A, LOOMBA R, SANYAL A J, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2015, 385(9972):956-965.
- [ 18 ] YOUNOSSE Z, TACKE F, ARRESE M, et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Hepatology*, 2019, 69(6):2672-2682.
- [ 19 ] FENG Q, LIU W, BAKER S S, et al. Multi-targeting therapeutic mechanisms of the Chinese herbal medicine QHD in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(17):27820-27838.
- [ 20 ] 胡菲菲, 郝占霞, 张少波, 等. 生、制何首乌水提物改善MCD饲料诱导小鼠非酒精性脂肪性肝炎的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(19):4732-4739.
- [ 21 ] 李聪, 刘小慧, 熊海容, 等. 竹节皂苷IVa调节miR-17-5p/MFN2信号通路改善非酒精性脂肪性肝炎 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(19):4725-4731.
- [ 22 ] CHEN Q L, LU Y Y, PENG J H, et al. Dynamical regulation analysis identifies molecular mechanisms of fuzheng-huayu formula against hepatitis B-caused liver cirrhosis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, doi:10.1155/2015/238495.
- [ 23 ] JIA Y H, WANG R Q, MI H M, et al. Fuzheng Huayu recipe prevents nutritional fibrosing steatohepatitis in mice [J]. *Lipids Health Dis*, 2012, doi:10.1186/1476-511X-11-45.
- [ 24 ] 宣红萍, 孙保木, 陶艳艳, 等. 扶正化瘀方对大鼠脂肪性肝炎与肝纤维化的作用 [J]. *药品评价*, 2007, 4(6):414-418.
- [ 25 ] 陆伦根, 尤红, 谢渭芬, 等. 肝纤维化诊断及治疗共识 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(10):2163-2172.
- [ 26 ] 董姝, 陈启龙, 冯琴, 等. 基于基因表达谱分析扶正化瘀方改善大鼠肝纤维化的分子机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(5):1812-1817.

[责任编辑 周冰冰]