

· 基础研究 ·

养肝澳平合剂对肝纤维化模型大鼠的实验研究

何晶^{1,2} 邵铭¹ 陆原¹ 刘丽娜² 陈沁磊¹ 袁征¹ 周珉¹

摘要 **目的** 探讨养肝澳平合剂(YGAPM)对肝纤维化模型大鼠的影响及机制。**方法** 将78只SD大鼠随机分为正常对照组(A组)、肝纤维化模型组(B组)、YGAPM高剂量组(C组)、YGAPM中剂量组(D组)、YGAPM低剂量组(E组)、秋水仙碱组(F组)。B、C、D、E、F组用CCl₄/橄榄油腹腔注射法制备肝纤维化大鼠模型,在造模成功后,C、D、E组灌胃不同剂量的YGAPM,F组灌胃秋水仙碱,药物干预8周后采集血清及肝组织。采用生化方法测定大鼠肝功能、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、羟脯氨酸(HYP)含量。免疫荧光法检测肝组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)。蛋白质印迹法检测TGF- β_1 、基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)表达。**结果** 与B组比较,各药物干预组肝功能水平均下降($P < 0.01$),C组肝功能各指标下降显著($P < 0.01$),与F组比较,差异亦有统计学意义($P < 0.05$);药物干预各组肝脏组织MDA、HYP含量明显降低($P < 0.01$),而SOD含量明显上升($P < 0.01$),C组较F组有统计学差异($P < 0.05, P < 0.01$)。与A组比较,B组肝组织纤维化面积比例、 α -SMA、TGF- β_1 、TIMP-1表达显著升高($P < 0.01$),各药物干预组表达均显著下降($P < 0.01$)。**结论** YGAPM能剂量依赖地降低肝脏损伤,改善肝纤维化,机制可能是通过抗炎、抗脂质过氧化从而减少肝细胞损伤,间接降低胶原蛋白含量;并通过直接或间接抑制肝星状细胞(HSC)活化过程中的TGF- β_1 信号通路,逆转肝纤维化。

关键词 养肝澳平合剂;肝纤维化;转化生长因子 β_1 ;基质金属蛋白酶抑制剂-1

Effect and Mechanism of Yanggan Aoping Mixture on Hepatic Fibrosis Model Rats HE Jing^{1,2}, SHAO Ming¹, LU Yuan¹, LIU Li-na², CHEN Qin-lei¹, YUAN Zheng¹, and ZHOU Min¹ 1 First Clinical Medical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210029); 2 Department of Infectious Diseases, Jiangsu Provincial Hospital of TCM, Nanjing (210029)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect and mechanism of Yanggan Aoping Mixture (YGAPM) on hepatic fibrosis model rats. **Methods** Totally 78 SD rats were randomly divided into the normal control group (group A), the model group (group B), the high dose YGAPM group (group C), the middle dose YGAPM group (group D), the low dose YGAPM group (group E), and the colchicine treated group (group F). Liver fibrosis rat model was induced by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride/olive oil in Group B, C, D, E, and F. After successful modeling YGAPM at various doses were administered to rats in Group C, D, and E. Colchicine was administered to rats in Group F. After 8 weeks of intervention serum and liver tissue of rats were collected. Liver function, activity of superoxide dismutase (SOD), contents of malondialdehyde (MDA) and hydroxyproline (HYP) were measured by biochemical method. The expressions of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) in liver and transforming growth factor beta1 (TGF- β_1) were detected by immunofluorescence method. The expressions of TGF- β_1 and tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were detected by Western blot. **Results** Compared with Group B, levels of liver function in each drug intervention group decreased ($P < 0.01$); they decreased significantly in Group C ($P < 0.01$). There was statistical difference in levels of liver function between each YG-

基金项目:江苏省中医药管理局课题(No. LZ13042);江苏省六大高峰人才培养项目(No. 2014 - WSN - 017)

作者单位:1.南京中医药大学第一临床医学院(南京 210029);2.江苏省中医院感染科(南京 210029)

通讯作者:周珉, Tel:025 - 86510061, E-mail:zhoumin1949@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20170420. 113

APM group and Group F ($P < 0.05$). The contents of MDA and HYP in liver tissue of rats in each YGAPM group was significantly decreased ($P < 0.01$), while the activity of SOD was obviously increased ($P < 0.01$). Significant difference existed between Group C and Group F ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Proportion of area of hepatic fibrosis, the expressions of α -SMA, TGF- β_1 , and TIMP-1 in hepatic tissue were significantly higher in Group B than in Group A ($P < 0.01$). After drug intervention, all indices significantly decreased ($P < 0.01$). Conclusion YGAPM could dose dependently lower liver injury and improve hepatic fibrosis. Its anti-fibrotic mechanism might be achieved by anti-inflammation and anti-lipid peroxidation, thus lessening liver cell injury, indirectly decreasing collagen content. YGAPM could reverse hepatic fibrosis in rats by directly or indirectly inhibiting TGF- β_1 signal pathway in activation process of hepatic stellate cells (HSCs).

KEYWORDS Yanggan Aoping Mixture; hepatic fibrosis; transforming growth factor beta1; tissue inhibitors of metalloproteinase-1

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是指由各种致病因子所致肝内结缔组织异常增生, 肝脏中细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成与降解失衡, 过度沉积的病理过程。肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 是产生 ECM 的主要细胞, HSC 活化和增殖是 HF 发生的中心环节, 受到多种细胞因子和信号通路的调控^[1,2]。目前认为慢性肝病在 HF 阶段的病理过程是可逆的, 通过药物干预, HF 状态能够得到缓解或者彻底改善。养肝澳平合剂 (YGAPM) 是江苏省中医院中西医结合专家俞荣青教授根据多年临床经验总结制方的院内制剂, 具有活血化瘀、清热利湿解毒的功效, 多年的临床应用发现 YGAPM 具有抗炎、抗病毒、逆转肝纤维化、增强免疫力等功效^[3,4]。本实验在前期临床试验的基础上, 对 YGAPM 抗肝纤维化作用及机制进一步研究。

材料与方 法

1 动物及分组 SD 大鼠 78 只, 鼠龄 6~8 周, 雌雄各半, 清洁级, 体重 (180 ± 20) g, 由扬州大学比较医学中心提供, 动物合格证号: SCXK-(苏)2012-0004。采用随机区组分为 6 组, 即正常对照组 (A 组) 12 只、模型对照组 (B 组) 18 只、YGAPM 高剂量组 (C 组) 12 只、YGAPM 中剂量组 (D 组) 12 只、YGAPM 低剂量组 (E 组) 12 只、秋水仙碱组 (F 组) 12 只。

2 药物 分析纯四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄), 批号: 13052910772, 使用时用橄榄油配制成 40% 的油溶液。甲醛溶液均购自南京化学试剂有限公司, 批号: 12042410659。养肝澳平合剂: 主要由茵陈、当归、赤芍、牡丹皮、丹参、茜草、紫草、凤尾草、白花蛇舌草等组成, 每瓶剂量 250 mL (含生药 298 g), 江苏

省中医院制剂室提供, 批号: Z04000376。C 组灌胃 YGAPM 原液, D 组取原液与等剂量蒸馏水混合后灌胃, E 组取 D 组灌胃液与等剂量蒸馏水混合后灌胃。秋水仙碱片: 每片 0.5 mg, 购自云南昊邦制药有限公司, 批号: H53021798, 每片与 5 mL 蒸馏水充分混合后备用。

3 试剂 T-SOD 测试盒, 货号: A001-1; MDA 测试盒, 货号: A003-1; HYP 测试盒, 货号: A030-2; 考马斯亮兰蛋白定量测试盒, 货号: A045-2, 均购自南京建成生物工程研究所。TGF- β_1 一抗, 批号: SC-398, 购自美国 Santa Cruz 公司。即用型快速免疫组化 MaxVision 试剂盒, 批号: KIT-5030; α -SMA 一抗, 货号: MAB-0001; DAB 显色试剂盒, 均购自福州迈新生物公司。兔抗大鼠 TGF- β_1 多克隆抗体, 批号: AP0248; TIMP-1 多克隆抗体, 批号: BS1697; 均购自 Bioworld 公司。过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自丹麦 Dako 公司, 批号: P044801。兔抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 批号: SC-25778。Rainbow Molecular Weight Markers、Western Blotting electrochemiluminescence (ECL) 及硝酸纤维素 (PVDF) 膜均购自 Amersham 公司。

4 主要仪器 TDL-80-2B 低速离心机购自上海安亭科学仪器厂。HH-2 数显恒温水浴锅购自国华电器有限公司。MODEL DS-671 电子秤购自上海寺冈电子有限公司。756PC 紫外线分光光度计购自上海光谱仪器有限公司。TP 1020 自动脱水机、RM2135 型石蜡切片机、DM-2000 光学显微镜均购自德国 Leica 公司。CS-VI 型摊片烤片机购自湖北孝感宏业医用仪器有限公司。Tissue-Tek TEL 组织包埋中心购自日本 SAKURA 公司。医用 X 光片购自 Kodak 公司。Power Pac Basic 电泳仪, 电转仪购自 Bio-Rad 公

司。HW-8B 型超级微量恒温器购自上海浦口分析仪器厂。DHG-9140 型电热恒温干燥箱购自上海精宏实验设备有限公司。

5 实验方法

5.1 模型建立及给药方法 参照许建明等^[5]的方法,制备肝纤维化模型:B、C、D、E、F 组用 40% 的 CCl₄/橄榄油腹腔注射,剂量为 1 mL/kg,每周 2 次,造模 8 周后,B 组随机选取 6 只大鼠处死,留取肝脏标本,10% 甲醛中固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色镜检,参照 Scheuer PJ^[6]的肝纤维化分期标准,评判肝纤维化程度:“-”无成纤维细胞增生;“+”汇管区扩大,有少量成纤维细胞增生;“++”汇管区成纤维细胞增生并向小叶内延伸,呈较窄较短的纤维素条;“+++”汇管区成纤维细胞大量增生并向小叶内明显延伸,形成纤维隔伴有小叶结构紊乱。6 只大鼠肝组织纤维化程度为 4 只 ++,2 只 +,造模成功。A 组与 B 组同时用蒸馏水灌胃 20 mL/kg 作为对照;其中 C、D、E 组灌胃剂量分别为每天 28、14、7 g/kg (分别按照 70 kg 成人体质量临床用量等体质量的 12、6、3 倍量^[7];F 组给药剂量为每天 1 mg/kg,给药体积均按 0.2 mL/kg 每天灌胃给药 1 次,连续 8 周^[8-11]。各组大鼠每周称量体重 1 次,观察每组动物体重变化有无差异,动物体重相差不到 20%,就可以按同一千克体重剂量用药;否则按校正系数进行相应调整^[7]。

5.2 样本采集 采集样本前,所有大鼠均禁食 12 h,大鼠在末次给药结束后 24 h 内股动脉取血,2 500 r/min 离心 10 min,取血清分装测肝功能用;断颈处死大鼠,剖取肝脏,观察大体标本的形态变化,并称取体重。

5.3 大鼠血清 ALT、AST、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰基转移酶(γ -glutamyl transferase, GGT)、总胆红素(total bilirubin, TBil)、直接胆红素(direct bilirubin, DBil)检测 采用全自动生化分析仪,按具体说明书操作。

5.4 肝脏纤维化测定 取肝脏第 4 叶组织,置 10% 甲醛中固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色、Masson 染色,每张切片随机选取 10 个视野,100 倍下采集图片。大鼠肝组织纤维化面积比例测定用 Image Pro Plus 6.0 分析软件进行图像分析,蓝色为增生的胶原纤维,对显示蓝色像素进行累加计算,肝组织纤维化面积百分比(%) = 胶原纤维像素累加值/肝组织总像素累加值 \times 100%。

5.5 肝组织超氧化物歧化酶(superoxide dis-

mutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量测定 取剩余部分肝脏组织,冰冷等渗盐水漂洗数次后,除去血液,滤纸吸干,称取 200 mg,放入小烧杯中。用移液管加入预冷的等渗盐水,等渗盐水体积总量是组织块重量的 9 倍,将小烧杯放入冰水中,用眼科小剪刀尽快剪碎组织块,用组织匀浆机 1 000 ~ 1 500 r/min 上下研磨成 10% 组织匀浆,3 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 15 ~ 20 min,取上清液,用分光光度计测定 SOD、MDA、HYP 含量。

5.6 肝组织 α -平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin- α , α -SMA)、转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 表达测定 采用免疫组化检测,石蜡切片脱蜡水化,微波中档抗原修复 10 min。自然冷却,用 PBS 液(0.01 mol/L, pH 7.4)冲洗 3 次 \times 2 min。正常山羊血清封闭,室温孵育 10 min。弃去血清,勿洗,一抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBS 冲洗,2 min \times 3 次。MaxVision 二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 ~ 15 min。PBS 冲洗,2 min \times 3 次。DAB 显色,显微镜下观察。自来水充分冲洗,苏木素复染,自来水冲洗返蓝。梯度酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封片。阳性细胞的胞质表达棕褐色颗粒,每张切片随机选取 200 个视野,100 倍下采集图片,用 Image Pro Plus 6.0 分析软件进行图像分析,大鼠肝组织 α -SMA、TGF- β_1 表达。

5.7 肝组织 TGF- β_1 、基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP-1) 蛋白表达 采用 Western blot 方法检测,将少量组织块置于匀浆器中球状部位,用干净的剪刀将组织块尽量剪碎,再加入适量细胞裂解液,高速离心分离细胞上清液,用 Bradford 法定量蛋白浓度。取 40 μ g 上述蛋白在 10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,电转至 PVDF 膜,封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗涤后二抗孵育 2 h,ECL 显色系统检测目的蛋白表达,以 GAPDH 为内参照。X 线片上的电泳条带经 Image J 软件处理,分析各实验组条带与对照组条带面积、灰度比值。

6 统计学方法 所有资料均使用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 整个实验过程中,共死亡 4 只大

鼠, B 组 2 只, F 组 2 只。造模前大鼠精神佳, 动作敏捷, 毛发光泽, 食欲良好, 大便色黑成形。每次腹腔注射 CCl₄/橄榄油后 24 h 内大鼠有不同程度的烦躁, 动作稍迟缓, 食欲减退, 便溏。8 周后各药物干预组精神逐渐恢复, 食纳渐佳, 活动灵敏; B 组精神状态仍较差, 毛发枯黄缺少光泽, 饮食减少, 体重减轻, 行动较迟缓, 部分出现便溏、弓背、烦躁易怒, 甚至死亡。

2 肝脏形态变化(图 1) A 组大鼠肝脏颜色深红, 表面光滑, 边缘锐利, 质地较软。B 组大鼠肝脏增大, 边缘钝、质地硬, 表面呈黄色粗颗粒状。各药物干预组大鼠肝脏表面情况相似, 色红略带黄色, 表面尚光滑有少量的细小颗粒, 肝脏边缘钝。

3 各组大鼠肝功能指标测定结果比较(表 1A、B) B 组肝功能各指标水平明显高于 A 组($P < 0.01$)。C、D、E、F 组各指标较 B 组明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。在 YGAPM 不同剂量组中, C 组肝功能水平下降显著($P < 0.01$), 与 F 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



图 1 各组肝脏形态

3 各组大鼠肝组织 SOD、MDA 及 HYP 含量比较(表 2) 使用 CCl₄/橄榄油造模后, 各组大鼠肝脏组织中 MDA、HYP 的含量明显升高, 而 SOD 的含量明显降低, 与 A 组比较, B 组差异有统计学意义($P < 0.01$); YGAPM 及秋水仙碱各治疗组大鼠肝脏组织 MDA、HYP 的含量明显降低, 而 SOD 的含量明显上升, 与 B 组比较, 差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。而 C 组与 E 组、F 组比较, 差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1A 各组大鼠血清 AST、ALT 及 ALP 水平比较 (U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST	ALT	ALP
A	12	264.89 ± 28.30	71.44 ± 6.95	133.44 ± 24.46
B	10	3 953.63 ± 211.51*	4 699.75 ± 165.70*	170.62 ± 33.10*
C	12	550.70 ± 72.52 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle\circ\circ$	684.30 ± 85.16 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle\circ\circ$	87.73 ± 13.12 $\Delta\Delta\Delta\blacktriangle\circ$
D	12	788.75 ± 85.61 $\Delta\Delta\circ\circ$	870.83 ± 92.75 $\Delta\Delta\circ\circ$	103.92 ± 26.16 $\Delta\Delta$
E	12	1 318.82 ± 94.33 $\Delta\circ\circ$	1 426.18 ± 196.35 Δ	140.80 ± 22.08 Δ
F	10	1500.40 ± 147.41 $\Delta\Delta$	1 439.40 ± 136.49 $\Delta\Delta$	103.50 ± 17.18 $\Delta\Delta$

注:与 A 组比较, * $P < 0.01$;与 B 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 E 组比较, $\blacktriangle P < 0.01$;与 F 组比较, $\circ P < 0.05$, $\circ\circ P < 0.01$;表 1B 同

表 1B 各组大鼠血清 GGT、TBil 及 DBil 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GGT (U/L)	TBil ($\mu\text{mol/L}$)	DBil ($\mu\text{mol/L}$)
A	12	33.56 ± 2.53	1.03 ± 0.09	0.50 ± 0.07
B	10	62.88 ± 6.85*	4.90 ± 0.28*	3.79 ± 0.14*
C	12	31.82 ± 2.28 $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle\circ\circ$	1.83 ± 0.11 $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle\circ\circ$	0.89 ± 0.03 $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle\circ\circ$
D	12	35.08 ± 3.84 $\Delta\Delta\circ\circ$	2.03 ± 0.29 $\Delta\Delta$	1.39 ± 0.07 $\Delta\Delta\circ\circ$
E	12	39.00 ± 2.27 $\Delta\Delta$	2.21 ± 0.34 $\Delta\Delta$	1.48 ± 0.09 $\Delta\Delta$
F	10	41.20 ± 4.31 $\Delta\Delta$	2.13 ± 0.26 $\Delta\Delta$	1.54 ± 0.12 $\Delta\Delta$

表 2 各组大鼠肝组织 SOD、MDA 及 HYP 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD (U/mg pro)	MDA (nmol/mg pro)	HYP ($\mu\text{g/mg}$)
A	12	18.66 ± 3.08	0.94 ± 0.22	0.09 ± 0.01
B	10	11.70 ± 2.05*	3.11 ± 0.81*	0.26 ± 0.04*
C	12	18.39 ± 2.78 $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle\circ$	1.10 ± 0.27 $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle\circ\circ$	0.12 ± 0.01 $\Delta\Delta\blacktriangle\blacktriangle\circ\circ$
D	12	16.33 ± 2.46 $\Delta\Delta$	1.63 ± 0.37 $\Delta\Delta$	0.13 ± 0.02 $\Delta\Delta$
E	12	15.58 ± 1.33 $\Delta\Delta$	2.17 ± 0.32 $\Delta\Delta$	0.15 ± 0.03 $\Delta\Delta$
F	10	16.01 ± 2.07 $\Delta\Delta$	2.72 ± 0.54	0.14 ± 0.02 $\Delta\Delta$

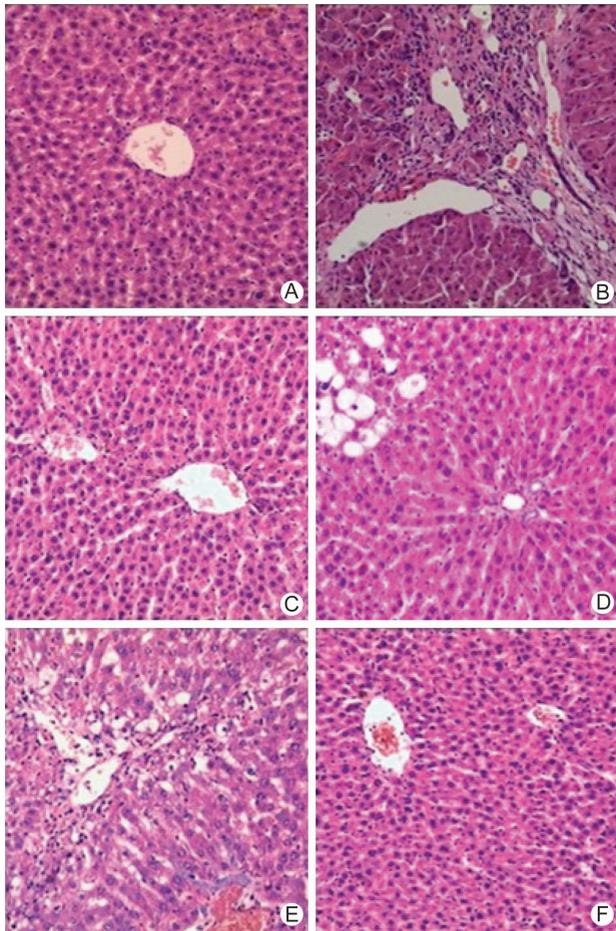
注:与 A 组比较, * $P < 0.05$;与 B 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 E 组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与 F 组比较, $\circ P < 0.05$, $\circ\circ P < 0.01$

4 各组大鼠肝脏组织学变化比较(图 2) 盲法阅片发现 A 组大鼠肝脏 HE 染色结果显示肝细胞形态结构正常,肝细胞索边界清楚,以中央静脉为中心呈放射状分布,肝小叶结构完整,汇管区无炎症和纤维结缔组织增生。B 组肝细胞肿大明显,广泛的肝细胞脂肪变性,肝窦及中央静脉明显扩张,肝细胞索排列紊乱,肝小叶内及汇管区可见明显的灶性淋巴细胞浸润,可见间质细胞增生,分隔包绕肝细胞,汇管区纤维结缔组织沉积明显,形成纤维结缔组织隔,将肝小叶分隔成大小不等的圆形或椭圆形肝细胞团,甚至形成假小叶;而经 YGAPM 治疗后,肝细胞脂肪变性表达减弱,仅见散在片断残留和炎性细胞浸润,可见少量点状淋巴细胞浸润,部分区域,可见少量胶原纤维组织沿炎症坏死区延伸,形成间断、薄的纤维间隔,无明显纤维结缔组织隔,无假小叶形成。其中 C 组脂肪变性表达减弱,细胞结构趋于正常,中央静脉周围细胞形态结构趋于正常,纤维化程度显著减轻。F 组炎症坏死及纤维组织增生程度与 C 组类似。经 YGAPM 干预后肝细胞坏死,

脂肪变性及炎性细胞浸润程度较 B 组减轻,其抗纤维化作用呈剂量依赖性。

5 各组大鼠肝组织纤维化面积及肝组织 α -SMA 表达比较(图 3、4,表 3) Masson 染色将胶原纤维染成蓝色,B 组大鼠肝组织纤维带较宽,汇管区可见较大的纤维瘢痕。YGAPM 干预后,各组肝窦胶原纤维面积减少,肝组织纤维化面积比例下降,C 组明显下降。与 A 组比较,B 组肝组织纤维化面积比例显著升高($P < 0.01$),药物干预后,各治疗组肝组织纤维化面积比例显著下降($P < 0.01$),C 组较 D、E 组下降明显($P < 0.01$)。免疫组织化学染色结果显示:A 组可见少量 α -SMA 阳性表达,肝组织结构正常;B 组大鼠肝组织 α -SMA 表达于增生的肌成纤维细胞,阳性染色更明显,可见肝窦、汇管区与炎症坏死区等较多表达。药物干预后,各组 α -SMA 表达均有所下调($P < 0.01$)。C 组较 E 组 α -SMA 表达下调显著($P < 0.01$)。

6 各组对肝组织 TGF- β_1 蛋白表达比较(图 5) A 组大鼠肝脏组织中 TGF- β_1 有少量表达;而在 B 组中,TGF- β_1 表达于肝细胞细胞浆,阳性细胞呈棕褐色,



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C、D、E 分别代表 YGAPM 高、中、低剂量组;F:秋水仙碱组;图 3-5 同

图 2 各组大鼠肝组织变化比较 (HE, $\times 100$)

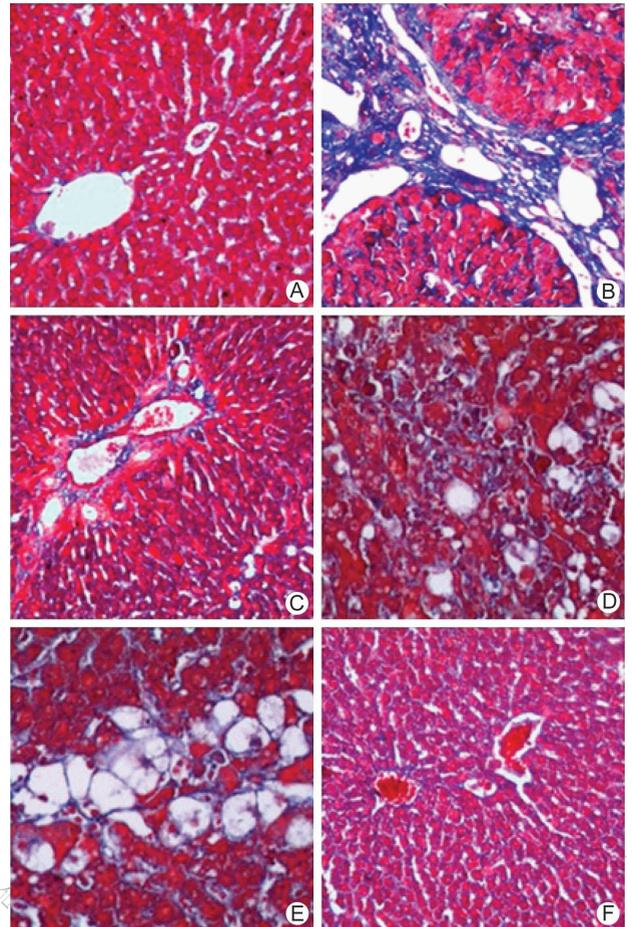


图 3 各组大鼠肝组织胶原纤维沉积的变化比较 (Masson, $\times 100$)

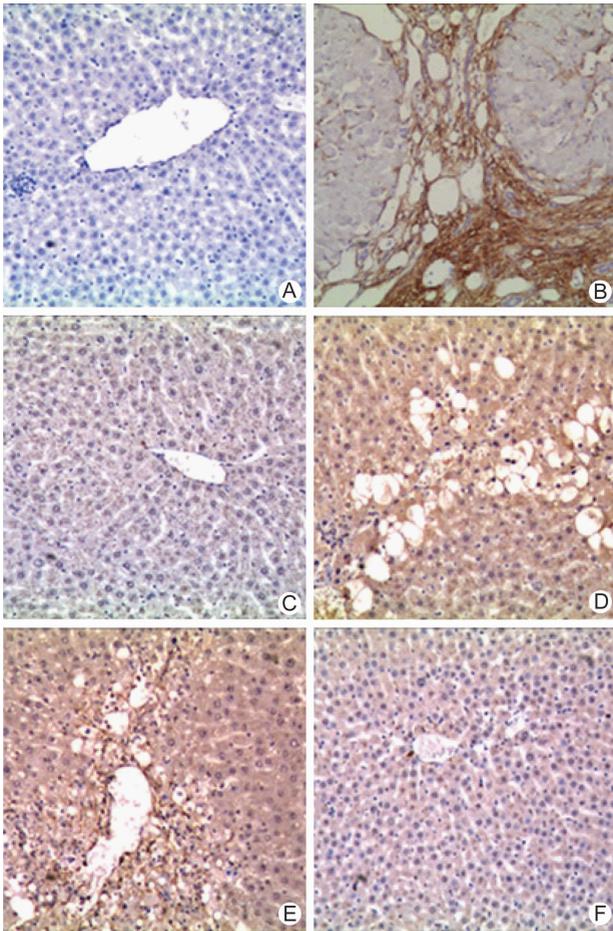


图 4 各组大鼠肝组织 α -SMA 表达的变化比较 (DAB, $\times 100$)

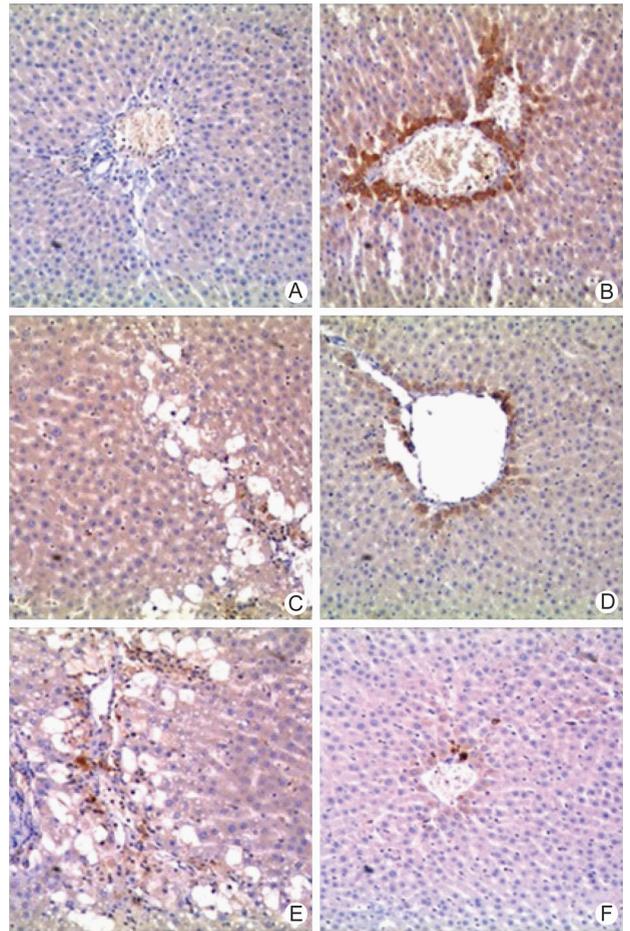


图 5 各组大鼠肝组织 TGF- β_1 蛋白表达比较 (DAB, $\times 100$)

表 3 各组大鼠肝组织 α -SMA 及纤维化面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	α -SMA (%)	纤维化面积 (%)
A	12	37.52 \pm 9.89	4.36 \pm 0.74
B	10	160.31 \pm 20.45*	20.53 \pm 2.96*
C	12	70.38 \pm 19.56 Δ \blacktriangle	10.73 \pm 1.45 Δ \blacktriangle
D	12	101.70 \pm 11.29 Δ	13.86 \pm 1.01 Δ
E	12	129.75 \pm 8.93 Δ	16.29 \pm 1.50 Δ
F	10	65.39 \pm 13.27 Δ	9.81 \pm 0.93 Δ

注:与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 E 组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

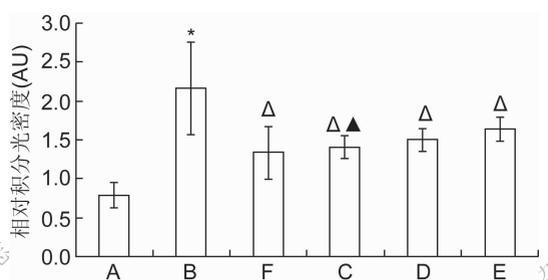


注:A 正常组;B 模型组;F 秋水仙碱组;C、D、E 组分别代表 YGAPM 高、中、低剂量组;GAPDH 为内参

图 6 各组中 TGF- β_1 、TIMP-1 蛋白的表达情况

数目较多,范围较广,主要分布于汇管区、炎性坏死区、纤维化区域及中央静脉周围,染色加深,各药物干预组阳性细胞数目较模型组数量减少,阳性细胞集中在中央静脉周围区域。

7 各组大鼠肝组织 TGF- β_1 、TIMP-1 蛋白表达比较 (图 6-8) A 组大鼠肝脏组织中 TGF- β_1 、TIMP-1 有少量表达;B 组 TGF- β_1 、TIMP-1 表达明显增多($P < 0.01$), 药物干预后,各治疗组肝组织 TGF- β_1 及 TIMP-1 表达均下降($P < 0.01$),C 组较 E 组下降明显($P < 0.01$)。TGF- β_1 蛋白表达情况免疫组化方法和蛋白质印迹法



注:与 A 比较, * $P < 0.01$; 与 B 比较, $\Delta P < 0.01$; 与 E 比较, $\blacktriangle P < 0.01$; 图 8 同

图 7 各组 TGF- β_1 蛋白表达比较

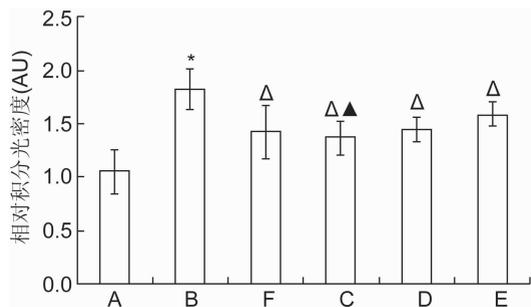


图 8 各组 TIMP-1 蛋白表达比较

检测结果相符。

讨 论

肝脏慢性炎症、脂质过氧化物、细胞因子——细胞——ECM 相互作用,参与了 HF 的形成^[12]。细胞因子中研究最多的就是 TGF- β ,是迄今为止发现的最重要的 ECM 沉淀促进剂,TGF- β 共有 3 种,TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 ,TGF- β_1 肝脏含量最高且具有生物活性,在肝纤维化过程中起着重要作用^[13]。 α -SMA 为活化的 HSC 特征标志物^[14]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase MMPs) 是参与 ECM 降解的主要酶家族,TIMPs 是一类最重要的调节细胞外 MMPs 活性的酶家族,能抑制 MMPs 的活性,减少 ECM 降解,在肝脏中仅发现 TIMP-1 和 TIMP-2 表达。肝脏受损后,氧化应激、脂质过氧化物等信号刺激,活化 TGF- β_1 ,激活 HSC 转化为肌成纤维细胞 (myofibroblast, MFB),表达大量 α -SMA,促进大量以胶原为主的 ECM 合成^[15,16],激活的 HSC 又能上调 TGF- β_1 的表达,加速恶性循环。此外,TGF- β_1 还能激活 TIMPs 抑制 MMPs 的活性,降低 ECM 的降解。TGF- β_1 主要通过活化 HSC 增加 ECM 合成,抑制 ECM 降解等途径诱发 HF。秋水仙碱是一种抗纤维化剂,能抑制微管介导转运前胶原^[17],提高胶原酶活性^[18]。在早期的临床试验中,曾用秋水仙碱来治疗原发性胆汁性肝硬化、酒精性肝硬化等肝脏疾病,因秋水仙碱治疗剂量范围窄,容易导致肝功能异常,肝内胆淤积,肝组织病变,限制了临床应用^[19]。

周珉等^[20]在 20 多年前提出“湿热瘀毒证”概念,认为 HF 的形成多因感受湿热疫毒之邪,病理特点为湿热疫毒之邪不仅在气,且大多深入血分,邪阻气郁热结血滞,邪瘀搏结发为本病。国医大师周仲瑛教授依据多年临证研究心得认为湿热瘀毒互结贯穿在慢性肝炎 HF 发展的始终,湿、热、毒、瘀相互影响,互为因果,是影响慢性肝病预后的一个重要因素^[21]。善于在

活血化瘀同时清热利湿解毒是周老治疗 HF 的一大治疗特色。湿热毒邪羁留不去,瘀滞肝络血分,肝络受伤,毒邪致瘀,血瘀不化又助湿生热,湿热毒瘀,积于肝络,迁延反复,是 HF 形成的外在条件和加重的主要因素^[22]。因此,湿热、邪毒是 HF 的两大致病因素,血瘀则是重要的病理产物及病机的关键环节。YGAPM 按照病毒性肝炎“湿热邪毒内存、血瘀于肝”病机组方,主要由茵陈、当归、赤芍、牡丹皮、丹参、茜草、紫草、凤尾草、白花蛇舌草、甘草组成。方中茵陈、紫草、茜草、凤尾草、白花蛇舌草均能清热利湿解毒,当归、赤芍、牡丹皮、丹参活血化瘀,其中赤芍、牡丹皮、茜草、紫草既清热又活血,全方配伍共奏清热利湿解毒、凉血化瘀之效,与 HF“瘀热”病机相吻合,使气血调畅,肝脾协调,辨证施治更符合临床实践。活血化瘀药,能增加肝血流量,促进坏死区肝细胞再生和修复,消退炎症渗出浸润,祛瘀生新的功能^[23]。方中当归、赤芍、牡丹皮、丹参、甘草具有不同程度抗 HF 的作用,丹参、当归、甘草可以清除氧自由基,抑制脂质过氧化^[23]。竺稽能等^[24]前期研究表明,单用活血化瘀药对 CCl₄ 所致大鼠 HF 有改善微循环障碍和抗 HF 作用,然而至实验后期保肝降酶作用不明显,病死率未改善。YGAPM 在活血化瘀药物基础上加用清热利湿解毒药物,干预 HF 大鼠后,各治疗组肝功能水平均明显改善,其保肝抗炎作用优于秋水仙碱,这与 Rambaldi A 等^[25]研究结果一致。YGAPM 干预后,可提高 SOD 活性,降低 MDA 和 HYP 的生成,下调 TGF- β_1 ,减少 HSC 活化,抑制 α -SMA 表达,降低 ECM 合成,下调 TIMP-1 的表达,促进 ECM 的降解,减少肝组织纤维化面积比例。

本研究发现 YGAPM 主要通过抗炎、保肝、抗脂质过氧化,减少肝细胞损伤,间接降低胶原蛋白含量,并直接或间接地抑制 HSC 活化过程中的 TGF- β_1 信号通路,抑制 HSC 活化,降低 ECM 合成,促进其降解,逆转 HF。YGAPM 抗纤维化作用呈剂量依赖性,高剂量组效果最佳,更适用于肝功能异常,肝脏炎症反应突出,脂质过氧化反应突出的 HF 及早期肝硬化患者。

本实验主要证实了 YGAPM 对 HF 中 TGF- β_1 的部分作用机制。在 HF 发生、发展过程中,细胞因子的作用极其复杂,并受多种因素的影响。而本方对 TGF- β_1 其他可能的作用机制值得进一步探索和研究。

参 考 文 献

- [1] Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis [J]. Gastroenterol Hepatol, 2007, 22 (Suppl 1):

73-78.

- [2] 潘金, 琚坚. JAK-STAT 信号转导通路在肝纤维化形成中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(5): 393-396.
- [3] 俞荣青, 毕建军, 王前山, 等. 养肝澳平合剂治疗慢性乙型肝炎的临床及实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(3): 155-158.
- [4] 车军勇, 邵铭. 养肝澳平合剂治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(12): 173-174.
- [5] 许建明, 徐叔云, 张运芳, 等. 四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2000, 16(3): 339-341.
- [6] Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment [J]. J Hepatol, 1991, 13(5): 372-375.
- [7] 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.
- [8] 高天娇, 董蕾史, 海涛, 等. 莲子心醇提物抗四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(12): 1476-1480.
- [9] 何雅军, 舒建昌, 吕霞, 等. 姜黄素预防肝纤维化作用与肝星状细胞的关系[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(5): 337-340.
- [10] 姜福义, 章广玲. 软肝冲剂抗大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 承德医学院学报, 2014, 31(3): 200-202.
- [11] 李寅超, 邓莉, 徐平华, 等. 十二味穿甲片原料抗 CCl₄ 所致大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(6): 432-436.
- [12] Rockey DC. Antifibrotic therapy in chronic liver disease[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005, 3(2): 95-107.
- [13] Inagki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis[J]. Gut, 2007, 56(2): 284-292.
- [14] Levy MT, McCaughan GW, Marinos G, et al. Intrahepatic expression of the hepatic stellate cell marker fibroblast activation protein correlates with the degree of fibrosis in hepatitis C virus infection[J]. Liver, 2002, 22(2): 93-101.
- [15] Wang H, Wei W, Wang NP, et al. Effects of total glucosides of peony on immunological hepatic fibrosis in rats [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(14): 2124-2129.
- [16] Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(1): 76-99.
- [17] Ehrlich HP, Bornstein P. Microtubules in transcellular movement of procollagen [J]. Nature (New Biol), 1972, 238(87): 257-260.
- [18] Harris ED, Krane SM. Effects of colchicine on collagenase in cultures of rheumatoid synovium [J]. Arthritis Rheum, 1971, 14(14): 669-684.
- [19] 宋金萍, 王涛, 陈雪梅, 等. 秋水仙碱肝损伤机制探讨[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(7): 1019-1023.
- [20] 周珉, 王耿. 慢性乙型活动性肝炎湿热瘀毒证的甲皱微循环观察[J]. 实用中西医结合杂志, 1995, 8(5): 257-258.
- [21] 叶放, 徐吉敏, 薛博瑜, 等. 慢性肝炎“湿热瘀毒互结”复合病机的形成机制探讨[J]. 中医杂志, 2011, 52(22): 1908-1910.
- [22] 薛博瑜. 清化瘀毒法治疗肝纤维化的体会[J]. 江苏中医药, 2007, 39(5): 5.
- [23] 武谦虎. 常用治疗肝病中药[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2014: 46-48, 251-253.
- [24] 竺稽能, 傅其黎, 严春海, 等. 活血化瘀药对实验性慢性肝炎和肝硬化防治作用的实验研究 [J]. 湖北卫生, 1977, 5(5): 29.
- [25] Rambaldi A, Glud C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis and cirrhosis [J]. Liver, 2000, 20(3): 262-266.

(收稿:2016-07-10 修回:2017-02-15)

责任编辑:段碧芳

英文责编:张晶晶