

· 基础研究 ·

清肝九味散对肝纤维化大鼠 Raf/MEK/ERK 信号通路的影响

戈宏焱^{1,2} 王安庆^{2,3}

摘要 **目的** 观察清肝九味散对肝纤维化大鼠的干预作用及其潜机制。**方法** 采用随机数字表法将 50 只 SD 大鼠分为正常组、模型组、阳性对照组、蒙药低剂量组及蒙药高剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组大鼠均通过腹腔注射四氯化碳 (CCl₄) 建立肝纤维化模型。造模成功后, 正常组大鼠给予蒸馏水灌胃, 阳性对照组灌服水飞蓟素 (SIL) 10 mg/kg; 蒙药低、高剂量组每日分别灌服清肝九味散水煎液 0.525、4.725 g/kg。各组均每天灌胃 1 次, 连续 8 周。采用全自动生化仪检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性水平; HE 染色法观察肝组织病理变化; 免疫组化法检测肝组织平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达; 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、I 型胶原 α (COL1 α)、基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP1) mRNA 水平; 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 检测肝组织 MMP2、TIMP1 蛋白表达及 Raf 蛋白激酶 1 (Raf-1)、丝裂原活化细胞外信号调节激酶 (MEK)、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 磷酸化水平的变化。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠明显消瘦、暴躁, 肝脏经 HE 染色后可见典型纤维化病理表现; 阳性对照组和蒙药低、高剂量组大鼠一般状态有明显改善, 肝脏病理损伤减轻, 血清 ALT、AST 水平较模型组显著下降 ($P<0.01$); RT-PCR 结果显示: 与正常组比较, 模型组 MMP2、COL1 α 、TIMP1 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组、蒙药低、高剂量组 MMP2 mRNA 表达明显升高, TIMP1、COL1 α mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$)。免疫组化结果显示: 与正常组比较, 模型组 α -SMA 蛋白阳性面积显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 蒙药低、高剂量组 α -SMA 蛋白表达均显著降低 ($P<0.01$)。Western Blot 结果显示: 与正常组比较, 模型组 MMP2、TIMP1、p-Raf、p-MEK、p-ERK 蛋白表达均显著升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组及蒙药高剂量组 MMP2 蛋白表达明显升高, 阳性对照组及蒙药各剂量组 TIMP1、p-Raf、p-MEK、p-ERK 蛋白表达明显下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且蒙药高剂量组较蒙药低剂量组下降更明显 ($P<0.01$)。**结论** 蒙药清肝九味散对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠一般状态有改善作用, 能减轻大鼠肝脏的纤维增生程度, 并通过调节 MMPs/TIMPs 体系促进细胞外基质 (ECM) 降解, 其抗肝纤维化机制可能与抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路有关。

关键词 清肝九味散; 肝纤维化; Raf/MEK/ERK 信号通路; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶抑制剂

Effect of Qinggan Jiuwei Powder on MMPs/TIMPs and Raf/MEK/ERK Signal Pathway in Liver Cirrhosis Rats

GE Hong-yan^{1,2} and WANG An-qing^{2,3} 1 Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for The Nationalities, Inner Mongolia (028000); 2 Medical college of Inner Mongolia University for The Nationalities, Inner Mongolia (028000); 3 School of Life Sciences, Northeast Normal University, Jilin (130024)

ABSTRACT Objective To observe the therapeutic actions and possible mechanisms of Qinggan Jiuwei Powder (QGJWP) against liver fibrosis rats. **Methods** Fifty SD rats were divided to normal group,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81760771); 内蒙古自治区自然科学基金项目 (No. 2019MS08171)

作者单位: 1. 内蒙古民族大学附属医院消化内科 (内蒙古 028000); 2. 内蒙古民族大学医学院 (内蒙古 028000); 3. 东北师范大学生命科学学院 (长春 130024)

通讯作者: 戈宏焱, Tel: 0475-8314244, E-mail: gehongyan_1999@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20210517. 312

model group, positive control group, and high and low dose QGJWP treatment groups, 10 in each group. Except the normal group, rats in the rest 4 groups were injected with 40% carbon tetrachloride olive oil solution intraperitoneally to induce liver fibrosis model. Rats in normal group were administered with distilled water by gastrogavage. After successful modeling rats in the positive control group were administered with Silymarin (SIL) 10 mg/kg by gastrogavage. Rats in high and low dose QGJWP treatment groups were administered with QGJWP 0.525 and 4.725 g/kg by gastrogavage. All administrations were performed once per day for 8 successive weeks. The activity levels of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected by automatic biochemical analyzer. Pathological changes of liver tissue were observed by HE staining. The expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in liver tissue was detected by immunohistochemistry. mRNA levels of matrix metalloproteinase 2 (MMP2), collagen type I α (COL1 α), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) were detected by Real-time PCR. Protein expressions of MMP2 and TIMP1, phosphorylation levels of Raf-1, mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK), extracellular regulated protein kinases (ERK) in liver tissue were detected by Western Blot. **Results** Compared with the normal group, rats in the model group were obviously emaciated and irritable. Typical pathological manifestations of fibrosis could be seen after HE staining. The general state was obviously alleviated, liver pathological injury was attenuated, serum levels of ALT and AST decreased significantly in the positive control group and high and low dose QGJWP treatment groups, as compared with the model group ($P < 0.01$). Results of Real-Time PCR showed: Compared with the normal group, mRNA expressions of MMP2, COL1 α , and TIMP1 significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, mRNA expressions of MMP2 significantly increased, mRNA expressions of COL1 α and TIMP1 significantly decreased in the positive control group and high and low dose QGJWP treatment groups ($P < 0.01$). Results of immunohistochemistry showed: Compared with the normal group, α -SMA positive area significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, α -SMA positive area significantly decreased in high and low dose QGJWP treatment groups ($P < 0.01$). Results of Western Blot showed: Compared with the normal group, protein expressions of MMP2, TIMP1, p-Raf, p-MEK, and p-ERK significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, MMP2 protein expression significantly increased, protein expressions of TIMP1, p-Raf, p-ERK, and p-MEK significantly decreased in positive control group and each dose QGJWP treatment group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). They decreased more obviously in high dose QGJWP treatment group than in low dose QGJWP treatment group ($P < 0.01$). **Conclusions** QGJWP improved the general state of rats with liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. It also attenuated the degree of hepatic fibrosis in rats. It promoted degradation of extracellular matrix (ECM) by regulating MMPs/TIMPs systems. Its anti-hepatic fibrosis mechanism might be related to inhibiting Raf/MEK/ERK signal pathways.

KEYWORDS Qinggan Jiuwei Powder; liver fibrosis; Raf/MEK/ERK signal pathway; matrix metalloproteinase; tissue inhibitor of metalloproteinase

肝纤维化是肝内弥漫性细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 异常增生、沉积的病理过程, 是慢性肝病向肝硬化发展的中间环节。在肝纤维化发生过程中多种信号通路及细胞因子发挥调控作用。Raf 蛋白激酶 (Raf protein kinase, Raf)、丝裂原活化细胞外信号调节激酶 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK)、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK) 信号级联通路是有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路的重要组成部分, 在肝纤维化的发展过程中起着重要作用, 该通

路由三级酶联激酶组成, 最终激活磷酸化 ERK, 调节下游转录因子如 c-Fos、c-Jun、c-Myc、Egr1 等的基因表达, 参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞凋亡、蛋白合成和受体表达等多种生物效应, 导致肝纤维化的发生和发展^[1]。

蒙药清肝九味散是蒙医临床常用于肝病的复方之一, 具有清肝、凉血的功效, 用于肝热、黄疸、肝损伤、肝“包日巴达干”等病, 经长期的临床观察, 证明其对肝纤维化患者有较好的疗效, 但作用机制仍未明确^[2]。本实验拟构建肝纤维化大鼠模型, 观察清肝九味散对肝纤维化大鼠一般状态及肝脏纤维增生程度

的影响,并探索其抗肝纤维化的机制。

材料与方法

1 动物 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体重(200±10)g,自由饮食,饲养温度控制在 20~22℃,相对湿度 65%~70%。购自北京维通利华实验动物中心,许可证号:SCXK(京)0231993。本实验通过内蒙古民族大学实验动物伦理委员会审查批准(No. NM-LL2019-03-05-15)。

2 药物 蒙药清肝九味散组成:牛黄 50 g 瞿麦 50 g 五灵脂 50 g 蓝盆花 25 g 木香 25 g 木鳖子 25 g 地格达 35 g 川木通 4.5 g 西红花 2.5 g,购于库仑蒙药厂(批号:9804-76),以上 9 味药物除牛黄外,其余 8 味粉碎成细粉,与牛黄细粉配研,过筛混匀,制成散剂。使用前以蒸馏水将清肝九味散稀释为 0.1 g/mL 浓度,煮沸后自然沉淀,以上清作为母液进行动物灌胃。水飞蓟素(silymarin, SIL;浓度为 98%,购自南京泽朗医药公司,批号:20090526),使用前以蒸馏水稀释为 1 g/mL 浓度。

3 试剂及仪器 Trizol 购自天根生化科技有限公司,批号:DP424;SYBR Green PCR master mix 购自瑞士 Roche 公司,批号:04913914001S;基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP2;批号:sc-13594);基质金属蛋白酶抑制剂 1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP1;批号:sc-21734);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH;批号:sc-365062)多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体及免疫组化试剂盒购自沈阳万类生物(批号:WL0250. WLA049b);兔抗 I 型胶原 α (collagen type1 α , COL1 α ,批号:91144)、MEK(批号:9124)、ERK(批号:L34F12)、p-MEK(批号:Thr286)及 p-ERK(批号:4370)购自美国 CST 公司;Raf(批号:ab181115)、p-Raf(批号:ab206686)购自 Abcam 公司;WD-2101A 免疫印迹电泳系统由北京六一公司生产;GelDocXR 全自动凝胶成像系统由美国 Bio-Rad 公司生产;X70 倒置光学显微镜由日本 Olympus 公司生产;ABI 7500 实时荧光定量聚合酶链反应(real time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)仪由美国 Thermo Fisher 公司生产。

4 方法

4.1 分组及模型建立 将 50 只 SD 大鼠,适应

性饲养 7 天后,按随机数字表法分为 5 组:正常组、模型组、阳性对照组、蒙药低剂量组及蒙药高剂量组,每组 10 只。正常组腹腔注射生理盐水 3 mL/kg,其余各组参照梁洁等^[3]方法诱导肝纤维化模型。大鼠腹腔注射 40% CCl₄ 橄榄油溶液 3 mL/kg,每周 2 次,持续 8 周,于第 6、8 周时分别从模型组随机选取 2 只大鼠,禁食不禁水 12 h,以 2% 的戊巴比妥钠溶 40 mg/kg 腹腔麻醉,麻醉开腹后,腹主动脉取血,并取下完整肝脏,将肝右叶标本常规固定、石蜡包埋、切片,厚度为 5 μ m,并进行 HE 染色及 METAVIR 评分,鉴定肝纤维化的程度。本次造模成功率为 100%。

4.2 给药方法 动物造模结束后,正常组、模型组大鼠每日灌胃蒸馏水 10 mL/kg,阳性对照组灌胃 SIL 50 mg/kg, SIL 剂量参照冯茵怡等^[4]方法;蒙药低、高剂量组灌胃清肝九味散水煎液,用量分别为 0.525、4.725 g/kg,蒙药低剂量组灌胃剂量由清肝九味散成人临床用量每天 5 g 经大鼠体表面积换算(大鼠用药剂量 = 5 g / 60 kg \times 6.3 = 0.525 g/kg)。各组大鼠均每天灌胃 1 次,连续 8 周,灌胃前禁食 12 h,其余时段自由进食。

4.3 样品采集和处理 灌胃结束后,动物禁食 12 h 后以 10% 水合氯醛腹腔麻醉,腹主动脉取血;取下肝脏,部分肝组织以 10% 甲醛溶液固定后石蜡,包埋切片厚度 5 μ m,并进行 HE 染色,显微镜下观察肝组织病理改变,并进行纤维化 METAVIR 评分(0 分:无纤维化;1 分:门静脉轻度增大,但无纤维间隔形成;2 分:门静脉管径明显增大,少见纤维间隔形成;3 分:大量纤维间隔形成;4 分:肝硬化。)^[5];其余肝组织以液氮快速冷冻后于 -80℃ 保存,备提取蛋白及 RNA。

4.4 血清生化指标的检测 分离血清后使用 Beckman AU5800 全自动生化分析仪测定血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)含量。

4.5 RT-PCR 检测肝组织 COL1 α 、MMP2 及 TIMP1 mRNA 表达 取冻存肝组织,以 Trizol 进行样本 RNA 提取,反转录合成 cDNA 后,以 SYBR Green PCR Master Mix 5 μ L,上下游引物各 0.3 μ L,模板 0.4 μ L,终体积 10 μ L 进行 RT-PCR 反应。反应条件:95℃ 30 s, (95℃ 5 s, 60℃ 40 s) \times 45 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行数据的相对定量分析,引物序列由上海生工公司合成(表 1)。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')	引物长度 (bp)
COL1 α	正向 CTCCTGGCAAGAACGGAGA	20
	反向 CCAGCTGTTCCAGGCAATC	20
MMP 2	正向 CAACGGTCGGGAATACAGCAG	21
	反向 CCAGGAAAGTGAAGGGGAAGA	21
TIMP 1	正向 GCCTCTGGCATCTCTTGTT	20
	反向 CCAGGTCCGAGTTGCAGAA	19
GAPDH	正向 GGGTGATGCTGGTGTGAGTATGT	25
	反向 AAGAATGGGAGTTGCTGTTGAAGT	24

4.6 免疫组化法检测肝组织 α -SMA 蛋白表达 取各组大鼠肝组织切片进行脱蜡、抗原修复、过氧化物酶结合、抗原封闭, 分别孵育一抗 (1:500) 及辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5 000), 使用 DAB 显色, 苏木素复染, 脱水、透明、封片后于显微镜下观察。

4.7 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 检测肝组织 MMP2、TIMP1、Raf、MEK、ERK 蛋白及相应磷酸化蛋白表达 提取肝组织总蛋白, 加入上样缓冲液后煮沸变性, SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 分别 4 $^{\circ}$ C 孵育相应一抗 (1:1 000) 过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h, ECL 试剂发光及显影。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定各个条带的灰度值, 以目的条带与 GAPDH 条带的灰度比值表示所测蛋白的相对表达水平。

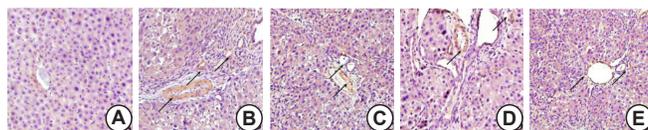
4.8 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 至治疗结束, 各组大鼠未发生死亡, 正常组大鼠状态良好, 皮毛光洁, 性情温和, 体重增长稳定, 解剖后可见肝脏体积正常, 表面细腻光滑。模型组大鼠皮毛蓬乱, 动作迟缓, 食欲下

降, 易恐慌、暴躁, 后期体重明显减轻。各治疗组大鼠较模型组毛发光滑整齐, 富有活力, 食欲及体重明显增高。

2 各组血清大鼠 ALT、AST 含量及 α -SMA 蛋白表达水平比较 (表 2, 图 1) 与正常组比较, 模型组血清 ALT、AST 含量及肝组织 α -SMA 蛋白表达水平明显升高 (P<0.01), α -SMA 阳性表达区域主要集中于汇管区及中央静脉、动脉血管壁 (图 1)。与模型组比较, 阳性对照组及蒙药高、低剂量组血清 ALT、AST 含量及肝组织 α -SMA 蛋白表达水平均显著下降, 其

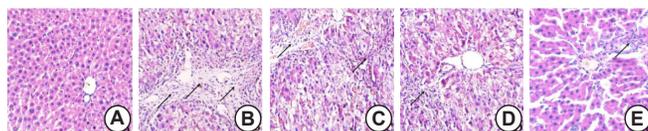


注: A 为正常组; B 为模型组; C 为阳性对照组; D 为蒙药低剂量组; E 为蒙药高剂量组; 箭头所示为 α -SMA 蛋白阳性表达区域

图 1 各组大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达的比较 (免疫组化, $\times 200$)

中蒙药高剂量组较低剂量组下降更为明显 (P<0.01)。

3 各组大鼠肝组织病理改变程度比较 (图 2, 表 3) 根据 METAVIR 评分系统对肝组织纤维化程度进行评分, 各组纤维化程度分布见表 3。HE 染色显示正常组肝小叶结构正常, 无纤维组织增生。CCl₄ 给药引起模型组肝脏汇管区扩大, 纤维组织增生, 炎细胞集聚浸润, 小叶结构紊乱, 可见桥接坏死及纤维间隔形成。阳性对照组、蒙药低、药高剂量组肝脏形态和结构明显改善, 汇管区炎性细胞浸润及坏死肝细胞减少, 纤维间隔区域面积下降, 其中蒙药高剂量组炎性细胞浸润及纤维间隔区域减少



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为阳性对照组; D 为蒙药低剂量组; E 为蒙药高剂量组; 箭头所示为纤维结缔组织增生, 炎细胞集聚浸润阳性表达区域

图 2 各组大鼠肝脏组织病理变化比较 (HE, $\times 200$)

表 2 各组大鼠血清 ALT、AST 含量及 α -SMA 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	α -SMA (%)
正常	10	27.12 \pm 3.10	56.65 \pm 7.18	5.13 \pm 1.40
模型	10	511.32 \pm 26.62*	315.25 \pm 14.25*	22.53 \pm 3.80*
阳性对照	10	369.40 \pm 29.89 Δ	249.21 \pm 63.40 Δ	13.72 \pm 1.60 Δ
蒙药低剂量	10	372.36 \pm 13.35 Δ	233.15 \pm 78.43 Δ	14.92 \pm 2.08 Δ
蒙药高剂量	10	280.80 \pm 49.16 $\Delta\Delta$	196.90 \pm 42.71 $\Delta\Delta$	8.36 \pm 0.63 $\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, *P<0.01; 与模型组比较, Δ P<0.01; 与蒙药低剂量组比较, $\Delta\Delta$ P<0.01

更明显。

4 各组大鼠肝组织 MMP2、TIMP1、COL1 α 、mRNA 表达水平比较 (表 4) 模型组肝脏 MMP2、TIMP1、COL1 α 、mRNA 表达较正常组显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组及蒙药低、高剂量组 MMP2 mRNA 表达明显升高, TIMP1、COL1 α mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$)。

5 各组大鼠肝组织 MMP2、TIMP1、p-Raf、

p-MEK、p-ERK 表达比较 (图 3, 表 5) 与正常组比较, 模型组 MMP2、TIMP1 蛋白表达及 p-Raf、p-MEK、p-ERK 水平均显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组及蒙药低、高剂量组 TIMP1 表达 p-Raf、p-MEK、p-ERK 水平均有所下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 蒙药高剂量组 MMP2 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), 且蒙药高剂量组较蒙药低剂量组下降更明显 ($P<0.01$)。

表 3 各组大鼠肝组织纤维化分布比较 (例)

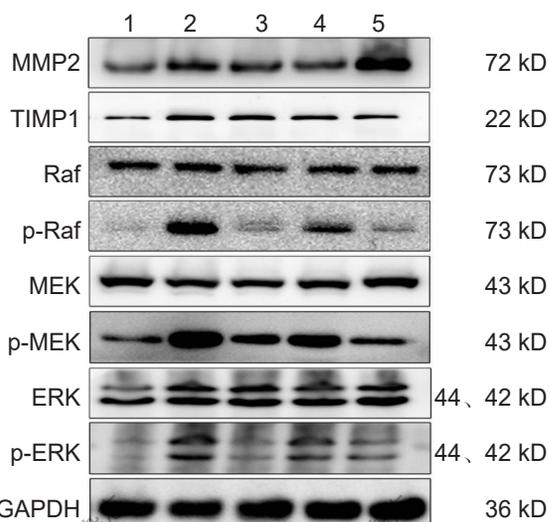
组别	n	F0	F1	F2	F3	F4
正常	10	10	0	0	0	0
模型	10	0	0	0	5	5
阳性对照	10	0	0	4	4	2
蒙药低剂量	10	0	0	3	5	2
蒙药高剂量	10	0	0	4	5	1

注: F0: 无纤维化; F1: 汇管区星状增大, 但无纤维间隔形成; F2: 汇管区增大伴少量纤维间隔形成; F3: 大量纤维间隔形成; F4: 肝硬化

表 4 各组大鼠肝组织 MMP2、TIMP1、COL1 α mRNA 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MMP2mRNA	TIMP1mRNA	COL1 α mRNA
正常	10	1.00	1.00	1.00
模型	10	4.46 \pm 0.22*	5.63 \pm 0.18*	5.61 \pm 0.19*
阳性对照	10	6.36 \pm 0.04 Δ	3.27 \pm 0.48 Δ	3.34 \pm 0.20 Δ
蒙药低剂量	10	7.06 \pm 0.13 Δ	3.61 \pm 0.23 Δ	2.44 \pm 0.15 Δ
蒙药高剂量	10	7.50 \pm 0.37 $\Delta\Delta$	2.54 \pm 0.53 $\Delta\Delta$	2.84 \pm 1.86 $\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.01$; 与蒙药低剂量组比较, $\Delta\Delta P<0.01$



注: 1 为正常组; 2 为模型组; 3 为阳性对照组; 4 为蒙药低剂量组; 5 为蒙药高剂量组

图 3 各组大鼠肝组织 MMP2、TIMP1、p-Raf、p-MEK、p-ERK 表达电泳图

讨 论

肝纤维化是一种病程较长的进行性疾病, 其病理变化包括炎症反应激活、肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 增殖及 ECM 过度沉积等。肝纤维化可进一步进展为肝硬化, 并为肝癌的发生提供有利条件 [6,7]。近年来, 病毒性肝炎和酒精所导致的肝纤维化患者人数呈明显增加的趋势, 预防和治疗肝纤维化已成为一项亟待解决的全球性挑战 [8]。

蒙药清肝九味散出自《医法海鉴》, 现已载入《中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册》[9]。该方具有多环节、多靶点抗纤维化的优势, 在其主要成分中, 牛黄、瞿麦、木鳖子、苦地丁具有清热解毒、凉肝之功效; 红花、五灵脂主活血、散瘀; 地格达清湿热、去黄疸; 木香行气、止痛。前期的临床研究中, 发现清肝九味散可有效改善患者血清肝功能指标, 降低血清纤维化指标水平, 如: 透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、Ⅲ型前胶原、Ⅳ型胶原及层粘连蛋白 (laminin, LN); 同时显著降低脾厚度、肝右叶斜径等影像学相关指标及肝脏硬度值 (liver stiffness measurement, LSM), 还可使患者 TIMP1 含量明显下降, 临床症状得到明显缓解 [10,11]。

肝脏具有很强的再生能力, 但过度的修复反应会导致 HSCs 等成纤维细胞增生活化, 活化的 H α SCs 特征性表达 α -SMA 蛋白, 并分泌大量 COL1 α 等 ECM 成分, 破坏肝脏结构, 形成肝纤维化 [12]。本次实验中, 首先利用反复注射 CCl $_4$ 模拟肝脏受到反复损害、修复的过程。模型组大鼠在连续 8 周腹腔注射 CCl $_4$ 后行动迟缓, 食欲下降, 暴躁易怒, 体重明显减轻, 解剖后可见肝脏体积增大, 表面粗糙并与周围组织发生粘连。研究表明, 不同的病因激活不同的成纤维细胞亚群, 其中 CCl $_4$ 优先激活 HSCs, 能够准确模拟临床肝纤维化 [13]。

SIL 是一种临床常用的保肝药物, 可用于早期肝纤维化的治疗, 取得了一定疗效, 研究证明该药物可以减轻炎症反应, 抑制 HSCs 的增殖, 因此被用作阳

表 5 各组大鼠肝组织 MMP2、TIMP1、p-Raf、p-MEK、p-ERK 蛋白磷酸化水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP2	TIMP1	p-Raf	p-MEK	p-ERK
正常	10	0.35 ± 0.02	0.13 ± 0.08	0.11 ± 0.04	0.35 ± 0.02	0.17 ± 0.03
模型	10	0.63 ± 0.03*	0.51 ± 0.02*	0.93 ± 0.12**	1.16 ± 0.11**	0.80 ± 0.03**
阳性对照	10	0.63 ± 0.05	0.42 ± 0.04 ^{△△}	0.27 ± 0.02 ^{△△}	0.71 ± 0.07 ^{△△}	0.25 ± 0.02 ^{△△}
蒙药低剂量	10	0.61 ± 0.02	0.38 ± 0.01 ^{△△}	0.69 ± 0.03 ^{△△}	0.84 ± 0.01 ^{△△}	0.71 ± 0.06 [△]
蒙药高剂量	10	1.07 ± 0.07 ^{△△△}	0.31 ± 0.02 ^{△△△}	0.29 ± 0.04 ^{△△△}	0.50 ± 0.03 ^{△△△}	0.26 ± 0.07 ^{△△△}

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与蒙药低剂量组比较,[△] $P < 0.01$

性对照药物^[14, 15]。

本实验中,首先证明了清肝九味散对肝脏的保护作用。转氨酶是评价肝脏损伤的有效生化指标,ALT 主要存在于肝细胞中,是肝细胞损害的最敏感标志。AST 主要存在于肝脏线粒体中,当病变持续及病情加重,肝细胞线粒体被破坏,AST 释放入血液^[16]。经过清肝九味散治疗后,大鼠血清 ALT、AST 显著下降,其中以蒙药高剂量组治疗效果最好,优于 SIL。同时,HE 染色可见肝脏形态和结构明显改善,炎性细胞浸润减轻,说明其对损伤的肝细胞具有保护作用。

Raf/MEK/ERK 信号通路能够将信号从膜传递到细胞内,进而调控细胞生长、发育、分裂等多种生理功能。研究发现,肝纤维化的发生和发展与 Raf/MEK/ERK 信号通路有密切的关系,若是抑制该通路的活性,可起到抑制 HSCs 的增殖、促进其凋亡的作用^[17]。本次实验中,证明了清肝九味散治疗抑制了大鼠肝脏 Raf、MEK、ERK 蛋白的磷酸化水平,这可能是该药物发挥抗纤维化作用的潜在机制之一。

Raf/MEK/ERK 信号通路还可以通过干预其下游的 MMPs 及 TIMPs 调节肝脏 ECM。MMPs/TIMPs 体系是保护肝脏内稳态的重要角色,其失衡引起 ECM 质和量的变化,导致肝纤维化的发生和发展^[18, 19]。MMPs 是一组锌离子依赖性蛋白水解酶,可降解 ECM 中的各种蛋白成分,并具有一定的底物特异性,其中 MMP2 可调节血管重塑并降解 I 型胶原蛋白^[20]。而 TIMPs 可与 MMPs 结合成复合体,抑制其活性。TIMP1 的表达上调,可导致 MMP2 活性受到抑制,阻碍 ECM 的降解,从而导致细胞外胶原纤维的聚集^[21, 22]。在肝纤维化的形成过程中,肝脏对 ECM 中蛋白的降解能力较正常肝脏显著升高,但在总体上,ECM 合成的总量高于其降解的总量,这种基质的合成增多与降解能力的同步增强的现象是肝纤维化动态变化的一个标志^[23]。本次实验也得到了相似结果:与正常组比较,模型组大鼠肝组织的 MMP2 表达明显升高;而与模型组比较,蒙药高剂量组 MMP2 升高更为明显,并且 TIMP1、COL1 α 表达水平及

α -SMA 阳性表达面积较模型组明显下降,这些变化表明清肝九味散通过恢复 MMPs 和 TIMPs 之间的平衡,至少在一定程度上促进了 ECM 的降解。

故蒙药清肝九味散能减轻 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维增生程度,保护肝细胞,并通过调节 MMPs/TIMPs 体系,促进 ECM 的降解,其抗肝纤维化作用机制可能与抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路有关。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Li Z, Ding Q, Ling LP, et al. Metformin attenuates motility, contraction, and fibrogenic response of hepatic stellate cells *in vivo* and *in vitro* by activating AMP-activated protein kinase[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24 (7): 819-832.
- [2] 戈宏焱,张仕华,赵百岁,等.蒙药清肝九味散治疗酒精性肝纤维化的效果观察[J].临床肝胆病杂志, 2017, 33 (12): 2316-2320.
- [3] 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.
- [4] 冯茵怡,严炯艺,夏星,等.荔枝核总黄酮对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的影响及作用机制和潜在 Q-marker 的预测[J].中国中药杂志, 2019, 45 (23): 5722-5731.
- [5] D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, et al. A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis[J]. Hepatology, 2012, 56 (2): 532-543.
- [6] Kwon OS, Choi SH, Kim JH. Inflammation and hepatic fibrosis, then hepatocellular carcinoma[J]. Kor J Gastroenterol, 2015, 66 (6): 320-324.
- [7] Wallace MC, Friedman SL. Hepatic fibrosis and the microenvironment: fertile soil for hepatocellular carcinoma development[J]. Gene Exp, 2014, 16 (2): 77-84.

- [8] 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 酒精性肝病防治指南(2018年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(5): 939-946.
- [9] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998: 168-169.
- [10] 戈宏焱, 姜浩. 蒙药清肝九味散对酒精性肝炎患者血清基质金属蛋白酶抑制剂-1水平的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(6): 720-721.
- [11] 戈宏焱, 张仕华, 赵百岁, 等. 蒙药清肝九味散治疗酒精性肝纤维化的效果观察[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(12): 2316-2320.
- [12] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Ann Rev Pathol Mechanisms Dis, 2011, 6(6): 425-456.
- [13] 金俊杰, 钟鸣, 余胜民, 等. 四氯化碳致肝纤维化大鼠模型药理实验方法学研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7): 1659-1661.
- [14] Saber S, Goda R, Tanbouly E, et al. Lisinopril inhibits nuclear transcription factor kappa B and augments sensitivity to silymarin in experimental liver fibrosis[J]. Int Immunopharmac, 2018, 64(10): 340-349.
- [15] Ezhilarasan D, Evraerts J, Sid B, et al. Silibinin induces hepatic stellate cell cycle arrest via enhancing p53/p27 and inhibiting Akt downstream signaling protein expression[J]. Hepatobil Pancreat Dis Int, 2017, 16(1): 80-87.
- [16] Liu T, Wang X, Karsdal MA, et al. Molecular serum markers of liver fibrosis[J]. Biomarker Insights, 2012, 7(7): 105-117.
- [17] Sun XM, Huang XK, Zhu XS, et al. HBOA ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis through inhibiting TGF- β / Smads, NF- κ B and ERK signaling pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 12(6): 115-116.
- [18] Iwaisako KK, Jiang CY, Zhang MJ, et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2014, 111(32): 3297-3305.
- [19] Afratis NA, Selman M, Pardo A, et al. Emerging insights into the role of matrix metalloproteases as therapeutic targets in fibrosis[J]. Matrix Biol, 2018, (68-69): 167-179.
- [20] Robert S, Gicquel T, Bodin A, et al. Characterization of the MMP/TIMP imbalance and collagen production induced by IL-1beta or TNF-alpha release from human hepatic stellate cells[J]. PLoS One, 2016, 11(4): 14.
- [21] Zhu Y, Miao Z, Gong L, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells expressing TIMP-1-shRNA improves hepatic fibrosis in CCl₄-treated rats[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(8): 8912.
- [22] Borkham-Kamphorst E, Alexi P, Tihaa L, et al. Platelet derived growth factor D modulates extracellular matrix homeostasis and remodeling through TIMP-1 induction and attenuation of MMP-2 and MMP-9 gelatinase activities[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 457(3): 307-313.
- [23] Martinet R. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis[J]. Matrix Biol, 2018, 68(4): 452-462.

(收稿: 2020-04-30 在线: 2021-07-01)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶