

鳖甲煎丸抗肝纤维化作用机制的研究进展

孙悦¹, 刘莹¹, 王磊¹, 蔡嵘¹, 董林毅^{2*}

1. 天津市第五中心医院生态城医院 药剂科, 天津 300467

2. 天津医科大学 药学院, 天津 300070

摘要: 肝纤维化是肝脏对于各种病因所致的慢性肝损伤而引发自身愈合修复的一种反应。目前尚无治疗肝纤维化、肝硬化的有效手段和药物。鳖甲煎丸临床上主要用于病毒性肝炎后肝纤维化和代谢相关脂肪性肝病纤维化治疗。鳖甲煎丸可调节免疫、调控相关因子、调控相关信号通路、调控细胞周期, 发挥抗肝纤维化作用。总结了鳖甲煎丸抗肝纤维化作用机制的研究进展, 以期为鳖甲煎丸今后的研究方向和临床应用提供参考。

关键词: 鳖甲煎丸; 抗肝纤维化; 调节免疫; 信号通路; 细胞周期; 作用机制

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)02-0522-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.02.043

Research progress on mechanism of Biejia Decoction Pills against hepatic fibrosis

SUN Yue¹, LIU Ying¹, WANG Lei¹, CAI Rong¹, DONG Linyi²

1. Department of Pharmacy, The Eco-city Hospital of Tianjin Fifth Central Hospital, Tianjin 300467, China

2. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Liver fibrosis is a response of the liver to chronic liver injury caused by various etiologies, leading to self-healing repair. At present, there are no effective methods or drugs for treating liver fibrosis and cirrhosis. Biejia Decoction Pills are mainly used in clinical practice for treatment of post viral hepatitis liver fibrosis and metabolic related fatty liver disease fibrosis. Biejia Decoction Pills can exert its anti-liver fibrosis effect by regulating immunity, related factors, related signaling pathways, and cell cycle. This article summarizes the research progress on mechanism of anti-liver fibrosis effect of Biejia Decoction Pills, in order to provide reference for further in-depth research and clinical applications of Biejia Decoction Pills in the future.

Key words: Biejia Decoction Pills; anti-hepatic fibrosis; regulate immunity; signaling pathway; cell cycle; mechanism

肝脏疾病已成为危及人类健康的普遍疾病, 全世界与肝硬化相关的死亡人数逐年增加, 且造成严重的经济负担^[1]。目前认为, 肝纤维化是肝脏对于各种病因(病毒性肝炎、酒精或药物性肝损伤、代谢相关脂肪性肝病、自身免疫性肝病、胆汁淤积性肝病、肝内寄生虫感染等)所致的慢性肝损伤而引发自身愈合修复的一种反应, 是慢性肝脏疾病向肝硬化进展的共同病理过程。其主要病理机制是肝星状细胞的激活, 导致细胞外基质的异常增生和沉积, 造成胶原蛋白降解失衡, 最终形成纤维性瘢痕。若不及时治疗, 则会发展为肝硬化, 甚至肝癌。目前尚无治疗肝纤维化、肝硬化的有效手段和药物,

仍需进一步研究和开发。但已有部分中药经循证医学证实具有减轻和改善肝纤维化的作用。鳖甲煎丸出自东汉著名医家张仲景《金匮要略·疟病脉证并治第四》, 为治疗疟病的经典方剂, 主要由鳖甲胶、射干、黄芩、柴胡、鼠妇虫、干姜、大黄、白芍(炒)、桂枝、葶苈子、石韦、姜厚朴、牡丹皮、瞿麦、凌霄花、姜半夏、党参、土鳖虫(炒)、阿胶、蜂房(炒)、硝石(精制)、蜣螂、桃仁共 23 味中药组成, 《中国药典》1977 年版记载该方具有活血化瘀、软坚散结之功效, 可用于治疗腹部肿块, 肝脾肿大。2020 年《鳖甲煎丸治疗肝纤维化临床应用专家共识》中推荐并给出病毒性肝炎后肝纤维化和代谢相关脂肪

收稿日期: 2023-12-11

基金项目: 天津市教委科研计划项目(2022ZD053)

作者简介: 孙悦(1988—), 女, 天津人, 硕士研究生。E-mail: 837901319@qq.com

*通信作者: 董林毅(1982—), 男, 副教授, 硕士生导师。E-mail: donglinyi@tjmu.edu.cn

性肝病纤维化治疗的用法用量^[2]。鳖甲煎丸可调节免疫、调控相关因子、调控相关信号通路、调控细胞周期,发挥抗肝纤维化作用。因此本文总结了鳖甲煎丸抗肝纤维化作用机制的研究进展,以期对鳖甲煎丸今后的研究方向和临床应用提供参考。

1 调节免疫

1.1 巨噬细胞

各种病因导致肝脏损伤后,体内的免疫细胞(巨噬细胞、T 淋巴细胞等)被激活并募集,产生免疫应答,并释放细胞因子、趋化因子等,调控肝纤维化进展。巨噬细胞在肝内微环境的刺激下,一般分为经典的促炎表型(M1 型)和抗炎表型(M2 型)^[3-4]。促炎型巨噬细胞表达一系列促炎因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 等,参与机体的炎症反应和吞噬杀灭病原微生物。抗炎型巨噬细胞可分泌抗炎因子(如 IL-10),促进组织修复和免疫调节^[5]。研究表明,调控肝脏巨噬细胞的极化有可能成为逆转肝纤维化的潜在靶点^[6]。刘洋等^[7]采用 CoCl₂ 刺激建立小鼠巨噬细胞体外缺氧模型,将细胞随机分为鳖甲煎丸 0.55、1.1、2.2 g/kg 组培养 24 h,采用 Western blotting 和 RT-PCR 检测发现,鳖甲煎丸可下调 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎因子的表达,上调 CD163、IL-10 抗炎因子的表达,促进巨噬细胞从 M1 促炎型向 M2 抗炎型转化,起到消除炎症、促进组织修复、减轻肝纤维化的作用。

1.2 T 淋巴细胞

T 淋巴细胞中 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞是最主要的两类 T 细胞亚群。CD4⁺ T 细胞可识别抗原,激活 B 细胞和巨噬细胞,促进免疫反应。CD4⁺ T 可分为不同亚型,并分泌不同细胞因子。其中 Th17 亚型分泌的 IL-17A 为强促纤维化因子^[8],可刺激 TNF- α 、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 分泌,激活肝星状细胞,进一步上调 Th17 表达形成正反馈,促进纤维化持续进展。陈松林等^[9]对 60 例瘀血阻络型慢性乙肝患者的外周血中 Th17 细胞水平进行研究,治疗组早晚服用鳖甲煎丸水煎剂(1 剂/d),对照组皮下注射 IFN- α 2a (600 万单位,3 次/周),连续治疗 24 周,结果采用鳖甲煎丸治疗后,外周血中 Th17 细胞水平明显降低,且优于对照组,患者的症状体征、肝功能具有明显改善。CD8⁺ T 细胞是慢性肝病免疫激活的主要参与者,可以靶向受损的肝细胞释放细胞毒,导致肝细胞凋亡,还可以直接激活肝星

状细胞^[10]。孟晨鑫等^[11]对 110 名慢性乙型肝炎肝纤维化患者进行临床研究,对照组肌肉注射重组人干扰素 α -2b (500 万 IU, 1 次/d),观察组给予重组人干扰素 α -2b 联合口服鳖甲煎丸(3 g/次,2 次/d),连续治疗 24 周,结果发现,观察组在改善肝功能、肝纤维化指标方面明显优于对照组,联合应用鳖甲煎丸可明显降低 CD8⁺,升高 CD4⁺,提高 CD4⁺/CD8⁺ 水平,改善细胞免疫状态,表明鳖甲煎丸可通过调节细胞免疫功能达到改善肝功能、减轻肝纤维化作用。

2 调控相关因子

2.1 基质金属蛋白酶-基质金属蛋白酶组织抑制剂(MMP/TIMP)

MMP 是参与细胞外基质降解的主要蛋白酶,TIMP 可以抑制组织中 MMP 的蛋白水解活性,MMP/TIMP 构成细胞外基质降解的主要分子系统,成为治疗肝脏疾病的重要靶点之一^[12]。MMP 在正常肝脏组织通常活性较低,当组织受损或存在炎症时表达升高。TIMP 的过度表达会抑制 MMP-1、MMP-2、MMP-9 等多个 MMP 的活性,阻碍纤维化基质的降解,导致间质细胞外基质广泛积累^[13]。因此,选择性的增加 MMP 的表达和降低 TIMP 的过度表达可能会改善肝纤维化程度^[14]。李风华^[15]以 CCl₄ 橄榄油诱导的肝纤维化大鼠为实验对象,分别 ig 给予秋水仙碱(0.1 mg/kg)、鳖甲煎丸 0.55、1.1、2.2 g/kg,连续 11 周,通过 RT-PCR 检测发现鳖甲煎丸可升高 MMP-9 mRNA 表达,降低 TIMP-1 mRNA 表达,调节 MMP-9/TIMP-1 比例,纠正细胞外基质的合成和降解失衡,且 2.2 g/kg 组优于秋水仙碱组。程传浩等^[16]以猪血清诱导免疫损伤性肝纤维化大鼠作为模型,ig 给予鳖甲煎丸(1.6 g/kg)和秋水仙碱(0.3 mg/kg),观察发现两种药物对 MMP-1 的影响无统计学意义,但均可降低 TIMP-1 表达,且鳖甲煎丸的效果明显优于秋水仙碱。临床研究发现,在慢性乙型肝炎合并肝硬化患者的治疗中,鳖甲煎丸与抗病毒药联用可更有效地降低患者血清中炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-2 水平,减轻肝纤维化进展,促进肝功能恢复^[17-18]。

2.2 瘦素

瘦素是白色脂肪细胞分泌的一种激素,可促进肝星状细胞活化和肝纤维化进展^[19]。瘦素可影响肝星状细胞活化的多条相关信号通路,如 Janus 激酶 2 (JAK2)/信号传导转录激活因子 3 (STAT3) 信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)

信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、刺猬蛋白 (Hedgehog) 信号通路、转化生长因子- β (TGF- β) /Smads 信号通路、Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路^[20]。文彬等^[21]研究证实,在肝纤维化大鼠的肝脏组织中瘦素及其受体表达明显增加,且与炎性细胞数量、纤维量呈正相关。给予鳖甲煎丸 1.1、2.2 g/kg 治疗 6 周,采用免疫组化法测定瘦素及其受体的表达水平,结果显示鳖甲煎丸可抑制瘦素表达,但对瘦素受体表达无明显影响。可见鳖甲煎丸对瘦素的抑制作用也可能是其抗肝纤维化的作用机制之一。

3 调控相关信号通路

3.1 TGF- β /Smad 信号通路

TGF- β /Smad 信号通路在肝星状细胞的激活和肝纤维化过程中起到十分重要的作用。TGF- β 1 是最重要的促纤因子,可通过 Smad 依赖和 Smad 非依赖通路 (如 MARK、PI3K 等) 介导基质生成^[22]。TGF- β /Smad 信号通路的激活会直接刺激 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达,导致肝星状细胞的增殖、分化和胶原合成。孙玉凤等^[23]将 CCl₄ 造模肝纤维化大鼠分别给予秋水仙碱 (0.1 mg/kg)、鳖甲煎丸 (0.55、1.1、2.2 g/kg) 治疗 11 周。采用免疫组化法和 RT-PCR 法测定肝组织中 α -SMA 蛋白、TGF- β 1、Smad3 mRNA 的表达,结果发现鳖甲煎丸可以抑制 α -SMA 蛋白表达,下调 TGF- β 1、Smad3 mRNA 的表达水平,2.2 g/kg 组效果更显著。由此可见鳖甲煎丸可通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路传导,抑制肝星状细胞激活,发挥抗纤维化作用。张建伟等^[24]研究同样证实了该观点,并进一步发现鳖甲煎丸在抑制 TGF- β 1 和 Smad3 表达的同时可提高 Smad7 表达,调节 Smad3 和 Smad7 表达失衡,减慢肝纤维化进展。结缔组织生长因子 (CTGF) /CCN2 基因被认为是 TGF- β 1 的下游分子,是一种强的促纤维化因子^[25]。在肝星状细胞中,CTGF/CCN2 在 TGF- β 1 的介导下,转录表达增多,进而促进肝星状细胞的黏附、增殖、迁移和胶原沉积^[26]。在 CCl₄ 造模的肝纤维化大鼠模型的研究中发现,在肝纤维化大鼠肝脏组织中 CTGF mRNA 表达水平明显增高,与肝纤维化程度呈正相关。鳖甲煎丸可抑制大鼠肝组织中 TGF- β 1、CTGF 等促纤维化因子的表达,减轻大鼠肝纤维化程度^[15, 27]。

3.2 核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路

NF- κ B 信号通路是非常重要的细胞信号传导途

径,参与免疫应答、炎症反应、细胞增殖和凋亡等多个生物过程。NF- κ B 信号通路与肝星状细胞的活化、增殖密切相关,参与肝纤维化的进展过程^[28]。因此,阻断 NF- κ B 信号通路传导可能具有抗肝纤维化作用。陈冠新等^[29]以 CCl₄ 造模的肝纤维化大鼠为模型,分别给予 0.55、1.1、2.2 g/kg 鳖甲煎丸治疗 8 周,通过免疫组化和 Western blotting 分析发现,鳖甲煎丸可下调大鼠肝组织中 p65 蛋白水平,提高 NF- κ B 抑制蛋白 α (IkBa) 表达,阻断 NF- κ B 信号传导,进而抑制下游靶基因 TGF- β 1 表达,发挥抗纤维化作用。此外,多种刺激均可导致 NF- κ B 信号通路激活,如脂多糖 (LPS)、氧化应激、肝内微环境改变等。庞杰等^[30]进行体外细胞实验发现,0.55、1.1、2.2 g/kg 鳖甲煎丸含药血清作用于血小板衍生生长因子 (PDGF) 诱导肝星状细胞培养 24 h,采用 MTT 和 EdU 检测肝星状细胞增殖,结果表明鳖甲煎丸可显著抑制肝星状细胞增殖。通过 Western blotting 测定 TLR-4/NF- κ B 信号通路中相关蛋白的表达,结果发现鳖甲煎丸可降低 TLR4、p-IKK 表达,升高 p-IkBa 表达,对 TLR4/NF- κ B 信号通路产生抑制作用,且浓度与抑制作用呈正相关。该实验证实了鳖甲煎丸可通过影响 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制肝星状细胞增殖,产生抗肝纤维化作用。刘洋等^[7]建立小鼠巨噬细胞体外缺氧模型,将 0.55、1.1、2.2 g/kg 鳖甲煎丸含药血清和 0.56 g/kg 扶正化瘀胶囊含药血清作用于巨噬细胞 RAW264.7 培养 24 h,采用 Western blotting 法和细胞免疫荧光法测定 HIF-1 α /NF- κ B 信号通路上相关蛋白的表达和分布发现,鳖甲煎丸可以减少缺氧导致的巨噬细胞中 HIF-1 α 堆积,降低 NF- κ B p65 的富集和 NF- κ B p65、IKK、IkBa 的磷酸化,阻止 HIF-1 α /NF- κ B 信号通路的激活,进而抑制下游炎症因子的释放。因此鳖甲煎丸对 NF- κ B 信号通路具有阻断作用,产生抗肝纤维化作用。

3.3 Wnt/ β -catenin 信号通路

Wnt/ β -catenin 信号通路在维持肝脏生理功能、肝组织的修复和再生以及保持肝内稳态发挥重要作用^[31]。在肝脏受到刺激或损伤后,Wnt 信号被激活, β -catenin 积聚入核,调控下游靶基因,促进肝脏修复或导致疾病进展^[32]。Wnt/ β -catenin 激活可刺激肝星状细胞活化和纤维化^[33]。文彬等^[34]证实了鳖甲煎丸通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路传导而发挥抗肝纤维化作用。将 0.45、0.9、1.8 g/kg 鳖甲煎

丸含药血清作用于大鼠肝星状细胞(HSC-T6)培养 24 h 后,采用 Western blotting 和 ELISA 检测 Wnt/ β -catenin 信号通路中相关蛋白的表达,结果表明鳖甲煎丸通过抑制 β -catenin、p-GSK-3 β 蛋白表达,阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路的传导,进而抑制下游 TIMP-1 表达,1.8 g/kg 组还可上调 MMP-2、MMP-9 表达。孙海涛等^[35]证实了鳖甲煎丸可通过下调 β -catenin 表达调控 NF- κ B 信号通路。将 0.45、0.9、1.8 g/kg 鳖甲煎丸含药血清和 0.2 mg/kg 秋水仙碱含药血清作用于 HSC-T6 培养 24 h,采用 qPCR 和免疫荧光检测 β -catenin 表达,发现鳖甲煎丸可降低 β -catenin 表达水平。采用 Western blotting 法测定 p65、p50 表达,发现鳖甲煎丸抑制 p65 表达,对 p50 无明显影响,推测鳖甲煎丸可通过下调 β -catenin 表达而抑制 NF- κ B 信号通路活化。陈冠新^[36]进一步证实了在 CCl₄ 诱导的肝纤维化小鼠模型中, Wnt/ β -catenin 与 NF- κ B 两条信号通路同时被激活,且存在交互串扰。鳖甲寡肽 I-C-F-6 作为鳖甲煎丸中主要活性成分,0.12、0.24 mg/kg 经皮下注射治疗肝纤维化大鼠,共 8 周。结果发现 β -catenin 和 p65 的表达均被抑制,说明鳖甲寡肽 I-C-F-6 可通过同时影响 Wnt/ β -catenin 和 NF- κ B 两条信号通路而抑制肝星状细胞的活化、增殖和下游靶基因的表达,发挥抗肝纤维化的作用。

3.4 Notch 信号通路

Notch 信号通路参与胚胎发育、组织形态建立、干细胞自我更新等多个生物过程,对维持机体正常再生和损伤修复的稳态起到至关重要的作用。在肝脏再生过程中,Notch 信号可以诱导成熟细胞的分化和转化,促进损伤修复^[37]。温智稀等^[38]探讨了鳖甲煎丸对大鼠骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的干预作用,通过提取大鼠骨髓间充质干细胞并进行体外培养,对比了肝细胞生长因子联合成纤维生长因子-4、鳖甲煎丸(1.1 g/kg)、肝细胞生长因子加成纤维生长因子-4 联合鳖甲煎丸对骨髓间充质干细胞的干预作用,发现鳖甲煎丸可促进骨髓间充质干细胞向肝细胞分化,合成白蛋白能力增加。采用免疫组化和 RT-PCR 检测证实鳖甲煎丸可上调 Notch-1 蛋白和 mRNA 表达,通过激活 Notch 信号通路而促进骨髓间充质干细胞分化为肝样细胞,产生抗肝纤维化作用。黄晶晶等^[39]研究证实鳖甲煎丸还可促进干细胞归巢,以 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠为模型,部分给予 CXC 趋化因子受体 4(CXCR4)拮抗剂,

观察干细胞移植组、鳖甲煎丸组(1.1 g/kg)、干细胞移植联合鳖甲煎丸组对肝功能和病理组织的改善情况,结果表明鳖甲煎丸联合干细胞移植改善肝纤维化效果最佳,可通过影响基质细胞衍生因子-1(SDF-1)/CXCR4 轴促进干细胞归巢,改善肝纤维化。因此,鳖甲煎丸联合骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化可能是通过激活 Notch 信号通路和影响 SDF-1/CXCR4 轴共同促进干细胞迁移、归巢、分化,发挥抗肝纤维化作用。

3.5 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路

MAPK 信号通路是一种重要的细胞信号传导机制,参与调控细胞生长、增殖、分化、凋亡等多个生物过程。MAPK 信号通路家族包括细胞外调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、p38MAPK 等几个主要分支。研究表明,TGF- β 受体通过激活下游 ERK MAPK、p38 MAPK、PI3K 通路触发上皮细胞间充质转化激活^[40-41]。阻断 MAPK 相关信号通路对于肝纤维化、肝癌的发展或许可能成为潜在的治疗靶点。张艺凡等^[42]对 CCl₄ 造模的肝纤维化大鼠给予 0.55、1.1、2.2 g/kg 的鳖甲煎丸治疗 11 周,采用免疫组化和 RT-PCR 法检测,发现鳖甲煎丸可降低 PDGF、Ras、ERK1 蛋白的表达,且剂量越大抑制作用越明显。该实验证实鳖甲煎丸可通过作用于 PDGF 介导的 Ras/ERK 信号通路发挥抗纤维化作用。p38 MAPK 具有激活肝星状细胞、介导炎症反应和影响胶原基因表达的作用。p38 MAPK 可调控 α 1(I) 型胶原基因的表达,提高 α 1(I) 型胶原 mRNA 的稳定性,增加 I 型胶原的合成和沉积^[43]。李风华^[15]以 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠为研究对象,分别给予鳖甲煎丸,连续 11 周,采用免疫组化法测定,结果发现鳖甲煎丸可降低 p38 蛋白表达,且与剂量相关,提示其可通过抑制 p38 MAPK 信号的传导阻断肝纤维化过程。

3.6 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)、核因子 E2 相关因子(Nrf2)

PPAR- γ 是一种核受体,调控肝星状细胞活化、炎症反应、氧化应激、脂肪代谢紊乱、衰老等导致的肝纤维化,具有保护肝脏作用^[44-45]。Nrf2 是抗氧化、代谢和细胞保护基因的主要转录调控因子,Nrf2 的激活可促进肝细胞增殖、抑制炎症信号和改善代谢,促进肝脏再生,减轻肝纤维化等作用^[46-47]。卜夏威^[48]以猪血清诱导的肝纤维化大鼠为模型,分别给予维生素 E(100 mg/kg)、依那普利(10 mg/kg)、

鳖甲煎丸 (10、20 g/kg) 进行预防和治疗 5 周, 采用 Western blotting 法测定, 发现鳖甲煎丸可以上调 PPAR- γ 、I κ B α 、Nrf2 表达, 抑制 NF- κ B、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1) 表达, 且早期预防效果更佳。该实验揭示鳖甲煎丸通过抑制 NF- κ B 信号传导提高 PPAR- γ 、Nrf2 信号表达, 抑制肝星状细胞活化和增殖, 提高机体抗炎抗氧化能力而阻止肝纤维化进展。王慧等^[49]对 CCL₄ 造模的小鼠给予鳖甲煎丸 (0.55、1.1、2.2 g/kg) 治疗 4 周, 采用 Western blotting 法测定 PPAR- γ 蛋白表达, 发现鳖甲煎丸可升高 PPAR- γ 蛋白水平, 且呈剂量相关性。采用 BSP 法检测小鼠肝脏 PPAR- γ 启动子甲基化状态, 发现鳖甲煎丸可通过减少 PPAR- γ 启动子甲基化, 促进 PPAR- γ 表达, 从而抑制肝星状细胞活化、增殖, 达到减轻肝纤维化作用。

3.7 肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS)

RAAS 是一种主要调节体液平衡和血压的激素系统, 它通过一系列的反馈机制控制机体生理过程。当肝脏受损时, RAAS 系统被激活, AngII 过度产生可直接刺激肝星状细胞活化、TGF- β 1 等促炎促纤维因子的释放、促进细胞外基质合成、诱导活性氧的产生, 导致肝纤维化进展。在肝脏纤维化过程中, RAAS 系统具有双向调节的作用, ACE-AngII-AT1R 促进肝纤维化, ACE2-Ang (1-7) -Mas 抑制肝纤维化进展^[50]。因此, 靶向 RAAS 系统、恢复 ACE-AngII-AT1R/ACE2-Ang (1-7) -Mas 轴平衡可作为肝纤维化治疗的靶点。已有大量研究证实 RAS 抑制剂在慢性肝脏疾病和肝细胞癌的治疗作用和价值^[51-52]。ACEI/ARB 类药物的使用可以显著降低代偿性肝硬化患者肝脏相关事件 (肝癌、肝移植、腹水、肝性脑病、静脉曲张出血等) 发生的风险^[53]。Li 等^[54]研究证实, 对 CCL₄ 诱导的肝纤维化大鼠分别给予维生素 E (100 mg/kg)、依那普利 (10 mg/kg)、鳖甲煎丸 (10、20 g/kg) 治疗 6 周, 采用 ELISA、免疫组化、RT-PCR 法对 RAAS 系统中各成分进行检测, 结果表明鳖甲煎丸可以清除肝损伤大鼠体内产生的过多的氧自由基, 抑制 ACE-AngII-AT1R 轴上各成分的表达, 减少 AngII 产生, 促进 ACE2-Ang (1-7) -Mas 轴表达, 逆转轴失衡, 改善肝纤维化进展。冯振清等^[17]将 72 例慢性乙型肝炎合并肝硬化患者随机分为两组, 分别给予阿德福韦酯以及阿德福韦酯联合鳖甲煎丸治疗 2 个月, 结果联合鳖甲煎丸可有效改善肝功能, 减少炎症因子释放, 降低患者血

清 AngII 水平, 改善疗效, 阻止纤维化进展。

4 调控细胞周期

细胞周期共分为 4 个连续阶段, 分别为 G₁ 期 (DNA 合成前期)、S 期 (DNA 复制期)、G₂ 期 (有丝分裂前期)、M 期 (有丝分裂期)。之后, 细胞进入了休眠状态 G₀ 期, 维持细胞的稳定和功能, 在某些刺激下会重新激活进入 G₁ 期。细胞周期在 G₀/G₁ 期和 G₂/M 期若发生改变, 将影响有丝分裂的进行, 导致细胞增殖和分化异常。肝星状细胞的活化、增殖、凋亡与细胞周期有密切关系^[55]。樊尔艳等^[56]将不同浓度的鳖甲煎丸含药血清作用于 HSC-T6 细胞进行培养, 采用 CCK 法和流式细胞术检测 HSC-T6 的增殖、凋亡和各细胞周期细胞数变化。研究发现鳖甲煎丸可使 HSC-T6 细胞停滞在 G₁ 期, 阻止其进入 S 期而抑制 HSC-T6 增殖, 并诱导其凋亡, 凋亡程度与剂量具有相关性。采用 Western blotting 法测定凋亡蛋白表达, 结果发现鳖甲煎丸可上调促凋亡蛋白 Bax 表达水平, 对抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达无明显影响。因此, 鳖甲煎丸通过调控细胞周期抑制肝星状细胞增殖, 并诱导凋亡而发挥抗肝纤维化作用。

5 结语与展望

鳖甲煎丸是由 23 味中药组成的复方制剂, 具有活血化瘀、软坚散结之功效, 临床上主要用于病毒性肝炎后肝纤维化和代谢相关脂肪性肝病纤维化的治疗。大量临床研究和荟萃分析证实, 鳖甲煎丸可改善患者肝功能和肝纤维化指标、减轻肝脾肿大、改善脾静脉和门静脉内径、联合核苷 (酸) 类药物治疗病毒性肝炎后肝纤维化可提高临床治疗的有效率等^[57]。目前对于鳖甲煎丸治疗肝纤维化的临床研究仍存在局限性, 对于其他病因 (如胆汁淤积性、自身免疫性等) 所致的肝纤维化、肝硬化的临床疗效, 仍有待更多动物实验和临床研究去验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Huang D Q, Terrault N A, Tacke F, et al. Global epidemiology of cirrhosis-aetiology, trends and predictions [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(6): 388-398.
- [2] 中华中医药学会肝胆病学分会. 鳖甲煎丸治疗肝纤维化临床应用专家共识 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2020, 30(6): 577-578.
- [3] Cheng D, Chai J, Wang H, et al. Hepatic macrophages: Key players in the development and progression of liver

- fibrosis [J]. *Liver Int*, 2021, 41(10): 2279-2294.
- [4] Dou L, Shi X, He X, *et al*. Macrophage phenotype and function in liver disorder [J]. *Front Immunol*, 2020, 10: 3112.
- [5] Martinez F O, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment [J]. *F1000Prime Rep*, 2014, 6: 13.
- [6] Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(5): 306-321.
- [7] 刘洋, 何春雨, 李彤, 等. 鳖甲煎丸通过 HIF-1 α /NF- κ B 信号通路调控巨噬细胞极化的机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(19): 9-16.
- [8] Yang F, Li H, Li Y, *et al*. Crosstalk between hepatic stellate cells and surrounding cells in hepatic fibrosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 108051.
- [9] 陈松林, 林英辉, 杨德芬, 等. 鳖甲煎丸对瘀血阻络型慢性乙型肝炎患者外周血 Th17 细胞表达水平的影响 [J]. 中医药导报, 2016, 22(4): 24-26.
- [10] Breuer D A, Pacheco M C, Washington M K, *et al*. CD8⁺T cells regulate liver injury in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2020, 318(2): G211-G224.
- [11] 孟晨鑫, 丁宁, 张学峰, 等. 鳖甲煎丸与重组人干扰素 α -2b 联合用药对慢性乙肝肝纤维化患者的疗效及对病毒学指标、T 细胞亚群指标的影响 [J]. 中药材, 2020, 43(10): 2573-2576.
- [12] Shan L, Wang F, Zhai D, *et al*. Matrix metalloproteinases induce extracellular matrix degradation through various pathways to alleviate hepatic fibrosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161: 114472.
- [13] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse [J]. *Hepatology*, 2002, 36(4 Pt 1): 850-860.
- [14] Lachowski D, Cortes E, Rice A, *et al*. Matrix stiffness modulates the activity of MMP-9 and TIMP-1 in hepatic stellate cells to perpetuate fibrosis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7299.
- [15] 李风华. 鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠的治疗作用及其对细胞因子 p38、CTGF、TIMP-1 及 MMP-9 表达的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [16] 程传浩, 谢世平, 王勇, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠 MMP-1、TIMP-1 的影响 [J]. 中医研究, 2010, 23(3): 22-24.
- [17] 冯振清, 杨立英, 董德河. 阿德福韦酯联合鳖甲煎丸治疗慢性乙型肝炎合并肝硬化临床疗效及对患者血清炎症因子 MMP-2 Ang-II 水平的影响 [J]. 临床心身疾病杂志, 2023, 29(1): 73-77.
- [18] 徐玉玲, 罗宏伟, 丁沛. 鳖甲煎丸对慢性乙型肝炎早期肝硬化患者肿瘤坏死因子- α 和基质金属蛋白酶-2 的影响 [J]. 世界中医药, 2017, 12(9): 2077-2079.
- [19] Petrescu A D, Grant S, Williams E, *et al*. Leptin enhances hepatic fibrosis and inflammation in a mouse model of cholestasis [J]. *Am J Pathol*, 2022, 192(3): 484-502.
- [20] 王琼, 詹江华. 瘦素对肝星状细胞活化的调控及其在肝纤维化进展中的作用 [J]. 天津医药, 2022, 50(1): 25-29.
- [21] 文彬, 贺松其, 庞杰, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠作用机制研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2013, 21(11): 572-575.
- [22] Xu F, Liu C, Zhou D, *et al*. TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis [J]. *J Histochem Cytochem*, 2016, 64(3): 157-167.
- [23] 孙玉凤, 李媛, 李风华, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3364-3367.
- [24] 张建伟, 李培潮, 苏东毅, 等. 基于转化生长因子- β /Smads 信号传导通路研究鳖甲煎丸防治肝纤维化的作用机制 [J]. 甘肃中医学院学报, 2015, 32(1): 6-9.
- [25] Arnott J A, Nuglozeh E, Rico M C, *et al*. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is a downstream mediator for TGF-beta1-induced extracellular matrix production in osteoblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210(3): 843-852.
- [26] Rachfal A W, Brigstock D R. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis [J]. *Hepatol Res*, 2003, 26(1): 1-9.
- [27] 贺松其, 文彬, 陈育尧, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化模型大鼠结缔组织生长因子的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2005(12): 1334-1335.
- [28] Luedde T, Schwabe R F. NF- κ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(2): 108-118.
- [29] 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.
- [30] 庞杰, 贺松其, 李健薇, 等. 鳖甲煎丸含药血清通过调控 TLR4-NF- κ B 通路抑制血小板衍生生长因子诱导的肝星状细胞激活 [J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(4): 440-446.
- [31] Russell J O, Monga S P. Wnt/ β -catenin signaling in liver development, homeostasis, and pathobiology [J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13: 351-378.
- [32] Monga S P. β -Catenin signaling and roles in liver homeostasis, injury, and tumorigenesis [J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(7): 1294-310.
- [33] Chen Y, Chen X, Ji Y R, *et al.* PLK1 regulates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis through Wnt/ β -catenin signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7405-7416.
- [34] 文彬, 孙海涛, 贺松其, 等. 鳖甲煎丸对肝星状细胞中 Wnt 信号通路信号分子 β -catenin、GSK-3 β 及下游蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(9): 3997-4000.
- [35] 孙海涛, 贺松其, 文彬, 等. 鳖甲煎丸对肝星状细胞中 β -catenin 及 NF- κ B 信号通路活化的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 2-6.
- [36] 陈冠新. Wnt/ β -catenin 与 NF- κ B 信号通路交互串话调控 HSC 活化的分子机制研究及鳖甲寡肽 I-C-F-6 的干预作用 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [37] Minnis-Lyons S E, Ferreira-González S, Aleksieva N, *et al.* Notch-IGF1 signaling during liver regeneration drives biliary epithelial cell expansion and inhibits hepatocyte differentiation [J]. *Sci Signal*, 2021, 14(688): eaay9185.
- [38] 温智稀, 王振常, 黄晶晶, 等. Notch 信号系统对骨髓间充质干细胞定向分化的影响及鳖甲煎丸的干预作用 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(12): 2847-2849.
- [39] 黄晶晶, 黄鸿娜, 王振常, 等. 鳖甲煎丸干预 SDF-1/CXCR4 信号通路对骨髓间充质干细胞移植治疗肝纤维化的影响研究 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(7): 1565-1567.
- [40] Yu L, Høbert M C, Zhang Y E. TGF- β receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- β responses [J]. *EMBO J*, 2002, 21(14): 3749-3759.
- [41] Lamouille S, Derynck R. Emergence of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin axis in transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cells Tissues Organs*, 2011, 193(1-2): 8-22.
- [42] 张艺凡, 王飞, 李风华, 等. 化瘀通络中药鳖甲煎丸对肝纤维化大鼠 PDGF 及 Ras 信号转导通路的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(27): 4060-4067.
- [43] Parsons C J, Takashima M, Rippe R A. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(Suppl 1): S79-S84.
- [44] Han X, Wu Y, Yang Q, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors in the pathogenesis and therapies of liver fibrosis [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107791.
- [45] Ni X X, Ji P X, Chen Y X, *et al.* Regulation of the macrophage-hepatic stellate cell interaction by targeting macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma to prevent non-alcoholic steatohepatitis progression in mice [J]. *Liver Int*, 2022, 42(12): 2696-2712.
- [46] Yang J J, Tao H, Huang C, *et al.* Nuclear erythroid 2-related factor 2: A novel potential therapeutic target for liver fibrosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59: 421-427.
- [47] Chan B K, Elmasry M, Forootan S S, *et al.* Pharmacological activation of Nrf2 enhances functional liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2021, 74(2): 973-986.
- [48] 卜夏威. ROS-RAAS 在肝纤维化形成中的作用及鳖甲煎口服液的干预机制 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2015.
- [49] 王慧, 魏睦新. 鳖甲煎丸对肝纤维化小鼠肝脏 PPAR γ 表达的影响 [J]. 中医药导报, 2023, 29(7): 19-23.
- [50] Zhang H F, Gao X, Wang X, *et al.* The mechanisms of renin-angiotensin system in hepatocellular carcinoma: From the perspective of liver fibrosis, HCC cell proliferation, metastasis and angiogenesis, and corresponding protection measures [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111868.
- [51] Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, *et al.* Renin-angiotensin system inhibitors as therapeutic alternatives in the treatment of chronic liver diseases [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(26): 2749-2754.
- [52] Barone M, Viggiani M T, Losurdo G, *et al.* Systematic review: Renin-angiotensin system inhibitors in chemoprevention of hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(20): 2524-2538.
- [53] Elhence H, Dodge J L, Lee B P. Association of renin-angiotensin system inhibition with liver-related events and mortality in compensated cirrhosis [J]. *Clin Gastroenterol*

- Hepatology*, 2023; S1542-3565(23)00570-0.
- [54] Li X Y, Peng Y, Bu X W, *et al.* Balancing effect of Biejiajian Oral Liquid on ACE-Ang II-AT1R axis and ACE2-Ang-(1-7)-Mas axis in rats with CCl₄-induced hepatic fibrosis [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(11): 853-859.
- [55] Chen Y W, Wu J X, Li D G. Hepatic stellate cell activation and cell cycle regulation [J]. *Int J Dig Dis*, 2005, 25(1): 11-14.
- [56] 樊尔艳, 贺松其, 文彬, 等. 鳖甲煎丸对大鼠肝星状细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(8): 960-966.
- [57] Zhang T, Yang Y, Wang B, *et al.* Meta-analysis of influences of Biejiajian Pill combined with entecavir on serum liver fibrosis markers of compensatory period of hepatitis B cirrhosis: Protocol of systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine* (Baltimore), 2019, 98(51): e18458.

【责任编辑 解学星】