

注射用丹参多酚酸对 CCl₄ 诱导的大鼠肝损伤保护作用

施阳扬¹, 李 智², 王 昕¹, 万梅绪^{3,4}, 张燕欣^{3,4}, 李 智^{3,4}, 原 景^{3,4}, 郭 虹¹, 李德坤^{3,4*}, 鞠爱春^{3,4*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010107

3. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

4. 天津市中药注射剂安全性评价重点实验室, 天津 300410

摘要: **目的** 探讨注射用丹参多酚酸 (SAFI) 对 CCl₄ 所致大鼠肝损伤的改善情况。**方法** 将 50 只 ip 20% CCl₄ 造成化学性肝损伤模型的 SD 大鼠随机分为模型组 (ig 0.9% 氯化钠注射液 + 尾 iv 0.9% 氯化钠注射液)、水飞蓟宾胶囊 (SFJ, 阳性药, 37.8 mg·kg⁻¹, ig 给药 + 尾 iv 0.9% 氯化钠注射液) 组和 SAFI 低、中、高剂量 (5.805、11.610、23.220 mg·kg⁻¹, 尾 iv 给药 + ig 0.9% 氯化钠注射液) 组, 每组 10 只, 另取 10 只大鼠作为对照组 (ig 0.9% 氯化钠注射液 + 尾 iv 0.9% 氯化钠注射液)。每天给药 1 次, 连续给药 14 d。每天给药后观察各组大鼠生存状态; 给药结束后处死取材, 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒检测大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、白蛋白 (ALB) 水平, 以及大鼠肝组织中基质金属蛋白酶 (MMP)、层黏蛋白 (LN)、透明质酸 (HA)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1β (IL-1β)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA)、白细胞介素 10 (IL-10)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、I 型胶原蛋白 (COLI)、III 型胶原蛋白 (COLIII) 水平; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠肝组织中 α-SMA、COLI、COLIII 的表达; 取肝组织进行 HE 染色观察病理变化。**结果** 与模型组相比, 各给药组大鼠精神状态明显好转, SFJ 组和 SAFI 中、高剂量组肝指数显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01); 各给药组血清中 ALT、AST 水平显著降低, ALB 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 肝组织中肝损伤指标 MMP 水平显著升高, HA、LN 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 胶原蛋白相关因子 α-SMA、COLI、COLIII 水平显著降低, 炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平显著降低, IL-10 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); Western blotting 结果显示, 与模型组比较, SFJ 组和 SAFI 中剂量组 α-SMA、COLI、COLIII 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); HE 染色显示, 各给药组与模型组相比, 炎症细胞浸润情况有所缓解, 病理损害情况明显减轻。**结论** SAFI 通过抗脂质过氧化反应、有效改善细胞外基质 (ECM) 沉积、积极促进胶原蛋白降解、抑制结缔组织增生, 同时可以缓解大鼠炎症反应, 从而改善肝损伤, 降低肝纤维化的风险。

关键词: 注射用丹参多酚酸; CCl₄; 肝损伤; 炎症; 胶原蛋白; 脂质过氧化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)02-0345-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.02.008

Protection of Salvianolic Acids for Injection on CCl₄-induced liver injury in rats

SHI Yangyang¹, LI Zhi², WANG Xin¹, WAN Meixu^{3,4}, ZHANG Yanxin^{3,4}, LI Zhi^{3,4}, YUAN Jing^{3,4}, GUO Hong¹, LI Dekun^{3,4}, JU Aichun^{3,4}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010107, China

3. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

4. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of TCM Injections, Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Salvianolic Acids for Injection (SAFI) on CCl₄-induced liver injury in rats. **Methods** Fifty SD rats with chemical liver injury induced by intraperitoneal injection of 20% CCl₄ were randomly divided into model group (ig

收稿日期: 2024-06-27

基金项目: 天津市制造业高质量发展专项资金—天津天士力之骄药业有限公司技术中心创新能力建设 (ZZY20232088)

作者简介: 施阳扬, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: sy0169799@163.com

***通信作者:** 李德坤, 男, 正高级工程师, 主要从事中药工艺、质量控制、中药药理及药物警戒研究。E-mail: lidekun@tasly.com

鞠爱春, 男, 正高级工程师, 主要从事中药注射剂工艺及质量控制研究。E-mail: juach@tasly.com

0.9% sodium chloride injection + tail iv 0.9 % sodium chloride injection), SAFI-low, medium, high dose group (5.805, 11.610, and 23.22 mg·kg⁻¹, tail iv + ig 0.9 % sodium chloride injection), Shuifeijibin capsule (SFJ) group (37.8 mg·kg⁻¹, ig + tail iv 0.9% sodium chloride injection). Another 10 SD rats were taken as the normal group (tail iv + ig 0.9 % sodium chloride injection). After continuous administration for 14 days, the survival status of rats in each group was observed after daily administration. After the end of administration, the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB) in serum and matrix metalloproteinase (MMP), laminin (LN), hyaluronic acid (HA), interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α), α -smooth muscle actin (α -SMA), interleukin 10 (IL-10), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), type I collagen (COLI), type III collagen (COLIII) in liver tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The expression of α -SMA, COLI and COLIII in liver tissue of rats in each group was detected by Western blotting. The pathological changes of liver tissue were observed by HE staining. **Results** Compared with the model group, the mental state of rats in each drug administration group was significantly improved. The liver index of the SFJ group and the medium and high-dose SAFI groups decreased significantly ($P < 0.05, 0.01$). The levels of ALT and AST in the serum of each drug administration group decreased significantly, and the level of ALB increased significantly ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The level of MMP in liver tissue was significantly increased, and the levels of HA and LN were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). The levels of collagen-related factors α -SMA, COLI and COLIII were significantly decreased, and the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-6, and IL-1 β decreased significantly, while the level of IL-10 increased significantly ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Western blotting results showed that compared with the model group, the protein expressions of α -SMA, COLI, and COLIII in the SFJ group and the medium-dose SAFI group decreased significantly ($P < 0.01, 0.001$). HE staining showed that compared with the model group, the infiltration of inflammatory cells in each drug administration group was alleviated, and the pathological damage was significantly reduced. **Conclusion** SAFI can improve liver injury and reduce the risk of liver fibrosis by inhibiting lipid peroxidation, effectively improving extracellular matrix (ECM) deposition, actively promoting collagen degradation, inhibiting connective tissue proliferation, and alleviating inflammation in rats.

Key words: Salvianolic Acid for Injection; CCl₄; liver injury; inflammation; collagen; lipid peroxidation

肝损伤诱因众多, 长期肝损伤容易发展为肝纤维化、肝硬化、肝癌等肝病, 而肝脏自身修复功能强大, 在肝损伤发展至肝硬化前, 大多数肝病都是可逆的。因此, 解决前期肝损伤是遏制肝脏疾病病程的关键^[1]。在基础实验研究中, 肝损伤模型通常使用化学性、生物性、免疫性方法建立, 其中 ip CCl₄ 是经典肝损伤模型之一, 它具有重复性好、经济性高、造模稳定、操作简单等优点。

在中医理论体系中, 肝属木, 主疏泄, 具有藏血之功。疏泄与藏血, 相反相成, 共同维持平衡肝的贮藏血液与调节血量的作用, 故又有“肝主血海”之称^[2]。肝损伤在中医上被描述为“黄疸”“胁痛”“积聚”等, 即肝失疏泄, 脾不健运, 导致气滞血瘀, 气血亏虚。所以中医治疗肝损伤一般从瘀血入手, 施用活血化瘀、行气药^[3]。

丹参是唇形科植物丹参的根, 归心、肝经, 具有活血祛瘀、通经止痛等功效^[4]。注射用丹参多酚酸 (SAFI) 是在探明丹参对瘀血证具有确切效果后所研制的一种中药注射剂, 经过大量基础实验研究证实 SAFI 具有抗血栓、保护血脑屏障、改善脑循环等药理作用^[5-6]。基于 SAFI 可以破除瘀血阻滞之症, 与中医治疗肝损伤疾病机制相契合。

本研究以 CCl₄ 构建大鼠肝损伤模型, 探究 SAFI 对肝损伤大鼠的保护作用, 为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 药品及主要试剂

SAFI (天津天士力之骄药业有限公司, 批号 20211015, 每支装 0.13 g, 含丹参多酚酸 100 mg); 水飞蓟宾胶囊 (SFJ), (天津天士力圣特制药有限公司, 批号 35070634, 每盒 30 粒, 每粒含水飞蓟宾 35 mg)。四氯化碳 (CCl₄), (天津渤化化学试剂有限公司, 批号 20230619); 异氟烷 (EZVET 公司, 批号 G45880); α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体 (货号 ab5694)、I 型胶原蛋白 (COLI) 抗体 (货号 ab138492)、III 型胶原蛋白 (COLIII) 抗体 (货号 ab184993), 均购自美国 Abcam 公司; GAPDH 抗体 (货号 AF5009)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (货号 A0216)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (货号 A0208), 以上试剂均购自碧云天生物技术有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂盒 (货号 ml059335)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒 (货号 ml059334)、白蛋白 (ALB) 试剂盒 (货号 ml028495)、透明质酸 (HA) 试剂盒

(货号 ml819610)、层黏蛋白(LN)试剂盒(货号 ml102831)、基质金属蛋白酶(MMP)试剂盒(货号 ml059267)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)试剂盒(货号 ml002859)、白细胞介素(IL)-1 β 试剂盒(货号 ml003057)、IL-6 试剂盒(货号 ml064292)、IL-10 试剂盒(货号 ml037371)、 α -SMA 试剂盒(货号 ml038078)、COLI 试剂盒(货号 ml028325)、COLIII 试剂盒(货号 ml028345)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(货号 ml077379)、丙二醛(MDA)试剂盒(货号 ml077384),以上试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司。

1.2 仪器

T1000 电子天平,购自常熟市双杰测试仪器厂;VEM 型小动物麻醉机,购自上海赞德医疗器械有限公司;ST16R 高速冷冻离心机、902-ULTS -80 °C 冰箱,均购自美国 Thermo Fisher 公司;MASP300S 全自动脱水机、RM2235 轮转式切片机、EG1150 包埋机、H11220 烘片机、H11220 展片机,均购自德国 Leica 公司;RT-6100 酶标分析仪,购自深圳 Rayto 公司;80i 正置显微镜及图像分析系统,购自日本 Nikon 公司。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2021-0011;动物饲养于天津天士力之骄药业有限公司动物屏障系统,实验动物使用许可证号 SYXK(津)2022-0005,符合中国国家标准《实验动物环境及设施》(GB14925-2001)对屏障动物实验设施的有关标准,实验严格按照天士力动物管理及福利伦理委员会标准执行(伦理申请号:TSL-IACUC-2023-65)。实验开始前,所有大鼠适应性饲养 1 周,并进行统一的检疫工作,实验期间自由饮水、进食,隔日更换一次垫料。

2 方法

2.1 慢性肝损伤大鼠模型构建

按照张海燕等^[7]用 CCl₄ 诱导建立大鼠肝损伤模型:SD 大鼠适应性喂养 1 周,采用 ip 20% CCl₄ (CCl₄ 与玉米油按体积比 1:4 混合)的方法构建慢性肝损伤模型,每周干预 2 次,连续干预 6 周。

2.2 实验分组与给药

建模的大鼠随机分为模型组(ig 0.9%氯化钠注射液+尾 iv 0.9%氯化钠注射液)、SFJ(阳性药, 37.8 mg·kg⁻¹, ig 给药+尾 iv 0.9%氯化钠注

射液)组和 SAFI 低、中、高剂量(5.805、11.610、23.220 mg·kg⁻¹, 尾 iv 给药+ig 0.9%氯化钠注射液)组,每组 10 只,另取 10 只大鼠作为对照组(ig 0.9%氯化钠注射液+尾 iv 0.9%氯化钠注射液)。每天给药 1 次,连续给药治疗 14 d。

2.3 大鼠状态观察

每天观察各组大鼠生存状态,包括皮肤、毛发、脾气、饮食状态等。称量大鼠体质量,用于计算肝指数。

2.4 样本处理以及肝指数计算

各组大鼠经异氟烷麻醉后,经腹主动脉取血,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上层血清作为样本,分装冻存在 -80 °C 冰箱中待用。取各组大鼠肝脏,用生理盐水清洗,滤纸吸干水分,称量肝组织质量。各组肝脏均切取肝右叶放置在 4% 多聚甲醛中进行固定,用于染色进行病理观察,余下肝组织吸干水分后立即匀浆,分装冻存在 -80 °C 冰箱备用。

2.5 肝功能指标检测

通过 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中 ALT、AST、ALB 水平。

2.6 肝损伤生化指标检测

2.6.1 组织中 MMP、HA、LN 水平 通过 ELISA 试剂盒检测大鼠组织中 MMP、HA、LN 水平。

2.6.2 肝组织 α -SMA、COLI、COLIII 水平检测 分别用 ELISA 试剂盒、Western blotting 法检测大鼠肝组织中 α -SMA、COLI、COLIII 水平。称取部分冷冻肝组织,解冻后加入适量裂解液进行匀浆破碎,4 °C、5 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清分装成 2 份备用。一份上清液按照 ELISA 试剂盒说明书进行检测。另一份上清液用 BCA 法测定总蛋白浓度,加入 loading buffer 定量,胶板插入电泳槽中固定好,加入电泳液,上样量为每孔 10 μ L。电泳结束后冰上转膜,并用 5% BSA 溶液浸泡聚偏氟乙烯(PVDF)膜于脱色摇床上室温封闭 1 h,封闭结束后 4 °C 孵育一抗 α -SMA、COLI、COLIII、GAPDH (1:1 000) 过夜,次日用 TBST 洗涤后孵育二抗 (1:1 000),1:1 混合 ECL 发光液,滴加到膜上进行曝光显影。蛋白条带灰度值用 Image J 进行分析。

2.7 炎症和氧化应激指标检测

通过 ELISA 试剂盒检测大鼠肝组织中的 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、SOD、MDA 水平。

2.8 肝组织苏木素-伊红 (HE) 染色

取用 4%多聚甲醛固定好的肝脏组织, 选择固定位置。切成边长约为 1 mm 的正方体组织块, 流动水冲洗 6 h 左右, 随后利用脱水机梯度脱水 10 h、二甲苯透明处理、浸蜡、包埋, 得到石蜡组织块, 经过切片、脱蜡水化、脱水封片处理后, 进行 HE 染色操作, 在光学显微镜下采集图像。

2.9 统计分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均采用 GraPhPad 9.5 软件进行分析, 多组间计量资料采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 SAFI 对慢性肝损伤大鼠状态及肝指数影响

造模组大鼠造模后均出现毛发枯燥偏黄, 甚至脱毛现象, 脾气暴躁, 体态消瘦。分组给药后, 模型组大鼠状态未见明显改变, 各给药组大鼠活力状态明显有所改善, 毛发柔顺, 脱毛现象消失、进食排泄情况等明显优于模型组。如表 1 所示, 与对照组相比, 模型组体重显著降低, 肝指数显著升高 ($P < 0.01$); 相较于模型组, 各给药组体重有所增加, 但并无显著差异。SFJ 组、SAFI 中、高剂量组肝指数与模型组相比下降显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

表 1 各组大鼠体重以及肝指数结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Results of body weight and liver weight index of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g	肝指数/%
对照	—	359.43±10.11	2.63±0.05
模型	—	314.23±27.54**	2.97±0.13**
SFJ	37.8	356.45±22.17	2.64±0.58##
SAFI	5.805	320.33±22.45	2.81±0.34
	11.610	350.67±20.49	2.71±0.10##
	23.220	332.67±39.78	2.79±0.05#

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

3.2 SAFI 对慢性肝损伤大鼠肝脏形态的影响

如图 1 所示, 对照组大鼠肝脏形态正常, 表面红润光滑, 边缘锐利, 整体柔软; 模型组大鼠肝脏整体形态异常, 与对照组相比有明显差异, 外形肿大, 各组织间黏连现象严重, 外部有白色筋膜包裹, 边缘厚钝不规整, 质感较硬。SFJ 组肝脏形态与对照组接近, 表面光滑, 色泽恢复红润, 局部组织仍有轻微凸起肿大, 与模型组相比边缘较锐, 质地较软, 组织黏连情况大有改善。SAFI 组大鼠肝脏形态与模型组相比有所改善, 肝脏下缘角锐利且光滑, 呈红褐色, 但局部肝组织表面仍有肿大凸起, 质地

软而韧, 其中 SAFI 中剂量组肝脏较 SAFI 低、高剂量组肝脏损伤较轻, 恢复状况较好, 但不及 SFJ 组。

3.3 SAFI 对慢性肝损伤大鼠肝功能指标的影响

如表 2 所示, 与对照组相比, 模型组 ALT、AST 水平极显著升高 ($P < 0.001$), ALB 水平极显著降低 ($P < 0.001$), 说明造模成功。与模型组相比, 各给药组 ALT、AST 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), ALB 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结果表明, SFJ 和 SAFI 能够不同程度地改善肝损伤大鼠肝功能指标, 其中 SAFI 中剂量组较低、高剂量组效果好。

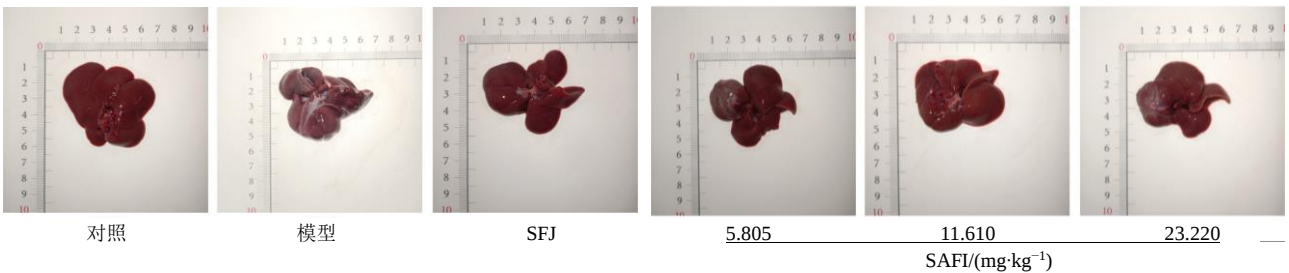


图 1 各组大鼠肝脏形态

Fig. 1 Liver morphology of rats in each group

表 2 各组大鼠血清 ALT、AST、ALB 检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 2 Results of serum ALT, AST and ALB in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(ng·mL ⁻¹)	AST/(ng·mL ⁻¹)	ALB/(mg·mL ⁻¹)
对照	—	30.89±3.01	20.87±3.44	68.56±5.99
模型	—	45.77±3.55***	33.54±0.57***	40.59±5.01***
SFJ	37.8	33.85±3.50###	24.08±1.96###	59.76±5.99###
SAFI	5.805	38.59±0.98##	28.44±0.81##	46.04±0.73#
	11.610	34.44±1.32###	25.07±0.82###	58.01±2.21###
	23.220	37.47±1.4##	27.63±1.06##	53.12±4.55##

与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

3.4 肝组织肝损伤指标检测结果

3.4.1 SAFI 对慢性肝损伤大鼠肝组织中 MMP、HA、LN 水平的影响 如表 3 所示,与对照组相比,模型组大鼠肝组织中 MMP 水平显著降低 ($P<0.001$), HA、LN 水平均显著升高 ($P<0.001$); 与模型组相比,各给药组大鼠肝组织中的 MMP 水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001), HA、LN 水平均显著下降 ($P<0.01$ 、 0.001)。结果表明, SFJ 和 SAFI 可

以通过改善细胞外基质 (ECM) 中大分子蛋白的沉积来缓解大鼠肝损伤情况。

3.4.2 SAFI 对慢性肝损伤大鼠肝组织中 α -SMA、COLI、COLIII 的影响 如表 4 所示,与对照组相比,模型组肝组织中 α -SMA、COLI、COLIII 水平显著升高 ($P<0.001$); 各给药组与模型组相比, α -SMA、COLI、COLIII 水平显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 其中 SAFI 中剂量组较低、高剂量组效果好。结果

表 3 各组大鼠肝组织中 MMP、HA、LN 检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 3 Results of MMP, HA and LN in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MMP/(ng·mL ⁻¹)	HA/(ng·mL ⁻¹)	LN/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	89.65±8.59	212.41±10.14	308.09±43.05
模型	—	46.23±10.33***	448.77±41.04***	682.19±56.36***
SFJ	37.8	75.96±9.37###	242.29±22.15###	376.04±67.62###
SAFI	5.805	64.11±2.97##	368.69±4.18##	495.84±17.12###
	11.610	75.62±6.51###	317.76±18.62###	382.13±26.8###
	23.220	62.91±3.21##	297.84±3.77###	358.01±4.24###

与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

表 4 各组大鼠肝组织中 α -SMA、COLI、COLIII 的检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 4 Results of α -SMA, COLI and COLIII in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	α -SMA/(pg·g ⁻¹)	COLI/(ng·g ⁻¹)	COLIII/(ng·g ⁻¹)
对照	—	158.95±30.59	38.08±3.37	10.16±1.24
模型	—	326.11±38.48***	60.67±3.73***	20.03±1.18***
SFJ	37.8	208.76±32.97###	38.97±4.21###	12.72±1.53###
SAFI	5.805	258.93±7.20#	52.77±4.43#	17.03±0.82##
	11.610	200.35±9.10###	38.39±0.98###	12.91±0.86###
	23.220	231.67±4.37##	46.66±2.75###	15.08±1.70###

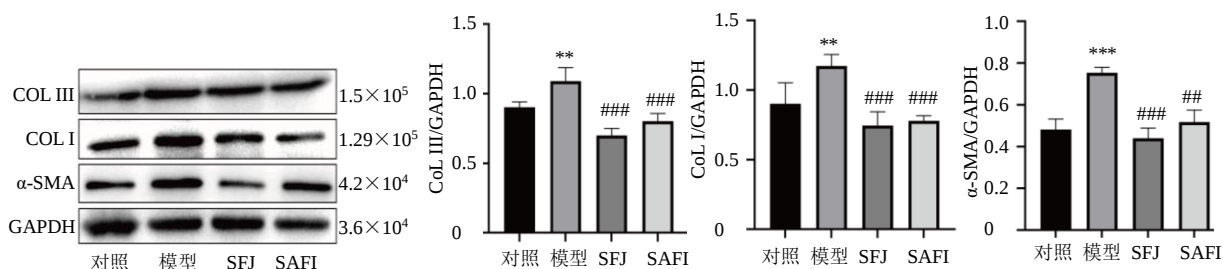
与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

表明 SFJ 和 SAFI 可通过改善胶原蛋白沉积情况间接缓解大鼠肝损伤。

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组 α -SMA、

COLI、COLIII 蛋白水平显著上升 ($P<0.05$ 、 0.001); 与模型组相比, SFJ 组、SAFI 中剂量组 α -SMA、COLI、COLIII 蛋白水平显著下降 ($P<0.01$ 、 0.001)。



与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。
** $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs control group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

图 2 各组大鼠肝组织中 α -SMA、COLI、COLIII 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 2 Expression of α -SMA、COLI、COLIII proteins in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3.5 SAFI 对慢性肝损伤大鼠炎症和氧化应激指标的影响

如表 5 所示, 与对照组相比, 模型组肝组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平显著升高, IL-10 水平显著降低 ($P<0.001$)。与模型组相比, SFJ 组和 SAFI 组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), IL-10 水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001)。

结果表明, SFJ 和 SAFI 可以改善肝损伤大鼠体内炎症因子的表达。

如表 6 所示, 与对照组相比, 模型组肝组织中 SOD 水平显著降低 ($P<0.01$), MDA 水平显著升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, 各给药组肝组织中 MDA 水平显著降低 ($P<0.001$), SOD 水平极显著升高 ($P<0.001$)。

表 5 各组大鼠肝组织中炎症因子的检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 5 Results of inflammatory factors in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·g ⁻¹)	IL-6/(pg·g ⁻¹)	IL-1 β /(pg·g ⁻¹)	IL-10/(pg·g ⁻¹)
对照	—	310.35±48.49	134.78±32.74	24.06±8.32	101.57±8.69
模型	—	519.51±47.75***	253.12±24.39***	69.51±7.86***	54.89±9.83***
SFJ	37.8	329.22±48.90###	141.24±31.87###	33.30±8.87###	80.14±4.91###
SAFI	5.805	402.50±36.01##	194.11±6.40#	53.05±3.77#	74.64±4.12##
	11.610	351.15±14.70###	160.65±16.37###	38.63±3.98###	89.90±2.74###
	23.220	407.62±6.63##	187.85±13.27##	45.73±3.36###	78.01±2.68###

与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group.

表 6 各组大鼠肝组织中 MDA、SOD 的检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 6 Results of MDA and SOD in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(ng·g ⁻¹)	MDA/(nmol·g ⁻¹)
对照	—	13.80±1.37	3.31±0.11
模型	—	6.42±1.15**	5.69±0.42***
SFJ	37.8	13.78±1.32###	3.41±0.22###
SAFI	5.805	9.57±0.71###	4.36±0.05###
	11.610	13.56±0.52###	3.80±0.15###
	23.220	12.08±1.48###	4.20±0.10###

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: ### $P<0.001$ 。

** $P<0.05$ *** $P<0.001$ vs control group; ### $P<0.001$ vs model group.

3.6 SAFI 对慢性肝损伤大鼠肝组织病理改变的影响

如图 3 所示, HE 染色结果表明, 对照组大鼠肝组织肝细胞大小形态正常, 细胞核大而圆, 结构清晰可见, 肝细胞索以中央静脉为中心呈放射状排列; 模型组大鼠肝组织肝细胞排列紊乱, 大部分肝

细胞呈现不同程度固缩(蓝色箭头), 核仁模糊, 肝窦内可见大量红细胞沉积(黑色箭头); 与模型组相比, 各给药组肝脏组织病理学情况明显恢复, 肝细胞形态接近对照组, 细胞圆润, 核仁清晰饱满, 排列相对紧密, 出血点明显减少。其中 SFJ 组和 SAFI 中剂量组恢复效果最好。

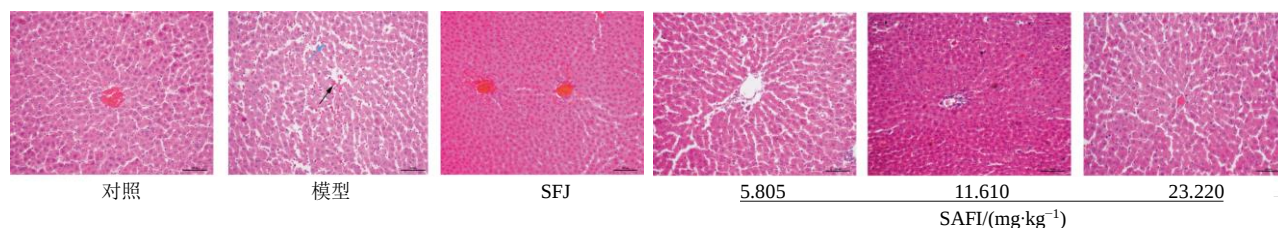


图 3 各组大鼠肝组织 HE 染色结果 (×200)

Fig. 3 HE staining results of liver tissue of rats in each group (×200)

4 讨论

肝脏是体内重要的代谢器官, 它负责分解代谢进入体内的外源性物质, 以此保护机体不受外界有毒物质侵害。肝细胞遭受破坏后, 肝脏会启动再生功能, 恢复肝细胞数量及其功能, 若是慢性损伤, 肝脏就会反复启动再生功能^[8], 机体合成的 ECM 积累增生, 导致肝脏出现瘢痕以及纤维化的现象^[9]。而肝损伤情况以及后期恢复情况可以通过各项肝功能指标进行评价。本实验结果显示 SFJ 和低、中、高剂量的 SAFI 对肝功能经典指标 ALT、AST、ALB 均具有不同程度的调节作用, 说明 SAFI 对大鼠肝损伤具有改善效果。

ECM 由多种大分子组成, 主要成分有胶原蛋白、非胶原蛋白、弹性蛋白、蛋白聚糖、氨基聚糖。它能够调控组织细胞机械性和生理性的行为, 包括细胞凋亡、再生、分化等。因此 ECM 还是一个动态的微环境, 始终保持着重塑活动, 尤其是在受到损害刺激时, 为了使伤口的愈合再生, 重塑活动就更加强烈^[10]。肝组织中的 ECM 与肝纤维化有着重大联系, ECM 通过蛋白沉积来对抗持续性肝损伤, 沉积得不到及时的降解, 就会造成增生情况, 加重肝纤维化, 甚至发展成肝硬化, 因此肝组织中 ECM 的大分子物质如 HA、LN、COLI、COLIII 等的含量可以作为标志物间接反映肝脏病变情况^[11]。本实验通过 ELISA 和 Western blotting 电泳实验对胶原蛋白进行双重验证, 结果显示, SAFI 低、中、高剂量以及 SFJ 可不同程度地降低肝损伤大鼠 COLI、COLIII 的水平, 表明 SFJ 和 SAFI 可以抑制胶原蛋

白合成, 促进胶原纤维蛋白的降解, 缓解沉积情况, 从蛋白大分子水平间接改善大鼠肝损伤。

MMP 是由多种组织和细胞产生, 具备可以降解 ECM 中几乎所有蛋白成分的能力, 对肝损伤进程中沉积的 ECM 以及胶原蛋白的降解发挥着重要作用^[12]。 α -SMA 被认为是肝星状细胞(HSC)处于活化状态时的标志性蛋白, 与肝损伤存在高度关联性, 故抑制 HSC 活化是遏制早期肝损伤的重要环节^[13]。当肝脏受到外部刺激损伤时, HSC 转为肝星状活化细胞, 表型转化为肌成纤维细胞, 会分泌基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP)来抑制 MMP 的活性, 正常状态下 MMP 和 TIMP 互相制衡, 维持 ECM 合成和降解的动态平衡, MMP 一旦被抑制, ECM 沉积便无法降解, 对肝脏造成更严重的伤害^[14]。本实验结果显示, SAFI、SFJ 可不同程度地调节肝损伤大鼠 MMP、 α -SMA 的水平, 表明 SAFI 可以通过抑制 HSC 的增殖及活化, 减少 α -SMA 的表达, 抑制 TIMP 合成从而促进 MMP 合成, 降解 ECM 从而缓解肝损伤情况。

肝脏受损时, 肝细胞发生破损、坏死、凋亡, 巨噬细胞会诱导各类促炎因子的释放, 例如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β , 促使炎症的产生, 同时也会有大量炎症介质随之释放, 加剧炎症反应, 进一步激活肝活化细胞以及 Kuppfer 细胞, 使得肝损伤发展为肝纤维化甚至更严重^[15]。本实验结果表明 SFJ 和不同剂量的 SAFI 可以通过缓解炎症细胞浸润, 改善炎症从而缓解肝损伤情况。

氧化应激是自由基在体内的一种负面作用, 是

氧化与抗氧化作用失衡的表现,也是导致初期肝损伤的重要机制之一。SOD 是体内一种抗氧化酶,可以有效清除体内活性氧自由基(ROS),保持机体氧化和抗氧化的动态平衡。一旦 ROS 激增得不到及时清理,就会发生脂质过氧化分解产生 MDA 攻击膜蛋白,加重损害情况^[1]。本实验结果表明,不同剂量 SAFI 以及 SFJ 可以升高 SOD 水平,下调 MDA 表达,表明 SAFI 可以通过抑制 CCL₄ 影响肝脏产生的自由基、抗脂质过氧化反应从而缓解肝损伤。

造模剂 CCL₄ 作为一种具有选择性的肝毒性药物,常用于诱导动物急性或慢性肝病,重复性较好,可引起肝功能衰竭,影响肝细胞形态以及代谢功能^[16]。目前大量研究证实 CCL₄ 的肝毒性与脂质过氧化反应有关,自由基的形成及其引发的链式过氧化反应是其主要损伤机制^[17]。已有大量研究证明 SAFI 具有抗氧化、抗炎、再生和保护组织等活性^[5],和遏制肝损伤前期病症有共同之处。

本实验证明 SAFI 可以改善大鼠肝损伤,调节大鼠体内各项肝功能指标,抑制胶原蛋白合成,有助于降解 ECM 沉积,在一定程度上修复肝功能,发挥肝保护作用。本实验并未探究 SAFI 对肝损伤大鼠的治疗作用具体的作用机制通路以及不同给药途径是否有不同疗效,后续实验会进一步围绕这些研究方向进行更深层次的探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 吕东霞,张帆,秦佳琪,等. 中草药相关肝损伤诊断的现状与进展 [J]. 中草药, 2024, 55(5): 1761-1769.
LV D X, ZHANG F, QIN J Q, et al. Current status and advance of diagnosis of herb-induced liver injury [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(5): 1761-1769.
- [2] 耿晓萱,卢秉久. 从“肝藏泄一体观”论治代谢相关脂肪性肝病 [J]. 环球中医药, 2024, 17(9): 1781-1784.
Geng X X, Lu B J. Treatment of metabolic-related fatty liver disease from the perspective of “the integration of liver storage and drainage” [J]. Glob Tradit Chin Med, 2024, 17(9): 1781-1784.
- [3] 张晓晨. 清代名医沈金鳌治疗肝胆系病证学术经验整理与研究 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2023.
Zhang X C. Research on the academic experience of Shen Jin 'ao, a famous doctor in Qing Dynasty, in treating hepatobiliary diseases [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2023.
- [4] 杨荣来,王凤荣. 丹参及其制剂治疗冠心病的药理及机制研究新进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(11): 164-169.
Yang R L, Wang F R. New progress on pharmacological research and mechanism of Danshen (*Salviae Miltiorrhizae* Radix et rhizoma) and its preparations in treatment of coronary heart disease [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2024, 42(11): 164-169.
- [5] 李德坤,苏志刚,万梅绪,等. 注射用丹参多酚酸药理作用及临床应用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(2): 353-361.
Li D K, Su Z G, Wan M X, et al. Research progress on pharmacological effects and clinical application of Salvianolic Acids for Injection [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(2): 353-361.
- [6] 陈宗军,陈政雄,蔡杨靖. 丹参多酚酸对脑梗死小鼠血管微循环的影响 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(4): 761-766.
CHEN Z J, CHEN Z X, CAI Y J. Effect of salvianolic acid on vascular microcirculation in cerebral infarction mice [J]. Drugs Clinic, 2023, 38(4): 761-766.
- [7] 张海燕,温韬,卢静,等. 四氯化碳诱导大鼠慢性肝损伤模型方法的探讨 [J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12 (3): 161-163, 224.
- [8] 张显彬,于眉,李玲,等. 药物性肝损伤研究进展 [J]. 中国现代医药杂志, 2024, 26(1): 107-110.
Zhang X B, Yu M, Li L, et al. Research progress of drug-induced liver injury [J]. Mod Med J China, 2024, 26(1): 107-110.
- [9] Aydin M M, Akcali K C. Liver fibrosis [J]. Turk J Gastroenterol, 2018, 29(1): 14-21.
- [10] Arriazu E, Ruiz de Galarreta M, Cubero F J, et al. Extracellular matrix and liver disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(7): 1078-1097.
- [11] 蔡秀华,董岸莺,张荣华,等. 沉默 CTGF 对肝星状细胞凋亡及胞外基质表达的影响 [J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(2): 147-154. DOI:10.16016/j.2097-0927.202308057.
Cai X H, Dong A Y, Zhang R H, et al. Effects of silencing CTGF on apoptosis and expression of extracellular matrix proteins in rat hepatic stellate T6 cells [J]. J Army Med Univ, 2024, 46(2): 147-154. DOI:10.16016/j.2097-0927.202308057.
- [12] 戈宏焱,张仕华. 基质金属蛋白酶与肝纤维化关系的研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(3): 563-566.
Ge H Y, Zhang S H. Research advances in association between matrix metalloproteinases and liver fibrosis [J]. Chin J Clin Hepatol, 2017, 33(3): 563-566.
- [13] 金星,尹明实. 糜酶抑制剂对肝纤维化大鼠肝组织 α -平

- 滑肌肌动蛋白和I型胶原蛋白表达的抑制作用[J]. 延边大学医学学报, 2020, 43(03): 162-164.
- Jin X, Yin M S. Inhibitory effect of chymase inhibitor on the expression of α -smooth muscle actin and type I collagen in liver tissue of rats with hepatic fibrosis [J]. J Med Sci Yanbian Univ, 2020, 43(03): 162-164.
- [14] Murphy F R, Issa R, Zhou X Y, et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: Implications for reversibility of liver fibrosis [J]. J Biol Chem, 2002, 277(13): 11069-11076.
- [15] 李婷, 刘华宝, 胡文艳, 等. 炎症在肝纤维化中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(10): 2368-2372.
- Li T, Liu H B, Hu W Y, et al. Role of inflammation in hepatic fibrosis [J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(10): 2368-2372.
- [16] 刘赴平, 师玲玲. 四氯化碳造成急性肝损伤大鼠模型的实验研究 [J]. 中国输血杂志, 2012, 25(5): 446-448.
- Liu F P, Shi L L. CCl₄ causing acute liver injury in a rat model [J]. Chin J Blood Transfus, 2012, 25(5): 446-448.
- [17] 陈伟. 木蹄复方水提物对四氯化碳肝损伤的保护作用及其机制 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- Chen W. Protective effect and mechanism of water extract of Muti compound on liver injury induced by carbon tetrachloride [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2013.

[责任编辑 兰新新]