

复方鳖甲软肝片减方对 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化的影响及机制研究

邓 莉^{1,2}, 申宝德², 刘 园², 刘 肖², 连王权², 李寅超^{1*}, 袁海龙^{2*}

1. 郑州大学, 河南 郑州 450001

2. 中国人民解放军空军总医院, 北京 100036

摘要: **目的** 探讨复方鳖甲软肝片(CBRP)减去处方中紫河车后(即复方鳖甲软肝片减方, MF-CBRP)对肝纤维化大鼠的保护作用及其机制。**方法** 将SD大鼠随机分为对照组, 模型组, 阳性对照组(秋水仙碱, 0.1 mg/kg), CBRP组(0.594 7 g/kg)和MF-CBRP高、低剂量(1.061 0、0.530 5 g/kg)组。除对照组外, 其余各组大鼠sc CCl₄大豆油溶液制备大鼠肝纤维化模型, 连续6周。造模结束后, 各给药组ig对应剂量的药物治疗6周。给药结束后, 检测大鼠血清生化指标、脂质过氧化指标以及纤维化因子、羟脯氨酸(Hyp)、血小板衍生因子- α (PDGF- α)和结缔组织生长因子(CTGF)量的变化; 观察肝组织HE染色和Masson染色的变化; 应用免疫组化和RT-PCR法检测大鼠肝组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)和基质金属蛋白酶抑制因子-1 (TIMP-1) mRNA表达水平。**结果** 与模型组比较, MF-CBRP可以使大鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(T-Bil)和碱性磷酸酶(ALP)水平降低($P<0.01$), AST/ALT、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)水平显著增高($P<0.05$ 、 0.01), 使超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)量升高($P<0.05$)、丙二醛(MDA)量降低($P<0.01$), 抑制肝组织中Hyp、透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、III型前胶原(PC-III)和IV型胶原(IV-C)的表达($P<0.05$ 、 0.01), 使肝组织中PDGF- α 和CTGF量降低($P<0.01$), 抑制MMP-2和TIMP-1 mRNA表达($P<0.01$), 降低 α -SMA免疫组化的阳性表达面积($P<0.01$), 改善肝组织病理学结构病变。与CBRP比较, MF-CBRP抗肝纤维化效果轻微减弱。**结论** MF-CBRP通过减轻氧化胁迫、抑制胶原纤维增生、逆转肝星状细胞激活和抑制肝生长因子表达来抗大鼠肝纤维化, 但其抗纤维化活性稍弱于CBRP。**关键词:** 复方鳖甲软肝片减方; 紫河车; 肝纤维化; 转化生长因子- β 1; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶抑制因子-1
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)06-1371-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.021

Effect of modified formula Compound Biejia Ruangan Pills on hepatic fibrosis in rats induced by CCl₄ and its mechanism

DENG Li^{1,2}, SHEN Bao-de², LIU Yuan², LIU Xiao², LIAN Wang-quan², LI Yin-chao¹, YUAN Hai-long²

1. Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

2. Air Force General Hospital, Beijing 100036, China

Abstract: **Objective** To explore the possible effects and mechanism of modified Compound Biejia Ruangan Pills (MF-CBRP) on liver fibrosis induced by CCl₄ in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, positive control (colchicine, 0.1 mg/kg) group, CBRP group (0.594 7 g/kg), MF-CBRP high- and low-dose (1.061 0 and 0.530 5 g/kg) groups. The rat model with liver fibrosis was established by sc injection CCl₄ solution (dissolved in soybean oil), twice a week for six weeks except control group. The rats in the treatment groups were administered six weeks after the model establishment. At the end of the administration, the contents of serum biochemical, hydroxyproline (Hyp), lipid peroxidation, fibrosis factor, platelet-derived factor- α (PDGF- α), and connective tissue growth factor (CTGF) were measured and the pathological changes of liver tissue were examined by HE and Masson. The level of α -SMA and the expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were detected by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** The results showed that MF-CBRP improved the liver function significantly through reducing the level of ALT, AST, T-Bil, ALP, Hyp, HA,

收稿日期: 2017-10-25

基金项目: 内蒙古科技计划重点项目(2015ZY0024); 中国肝炎防治基金会-王宝恩肝纤维化研究基金资助课题(WBE20170066)

作者简介: 邓 莉(1992—), 女, 河南信阳人, 在读硕士, 主要从事中药药理学及毒理学。Tel: 13526592308 E-mail: Lillian921105@163.com

*通信作者 李寅超, 硕士生导师, 副教授, 主要从事中药药理学及毒理学研究。Tel: (0371)67781908 E-mail: lyh@zzu.edu.cn

袁海龙, 博士生导师, 药理学部主任, 主要从事中药新药制剂学研究及开发。Tel: (010)66928505 E-mail: yhlpharm@126.com

LN, PC-III, IV-C, and MDA ($P < 0.05, 0.01$), and increasing the content of S/L, TP, ALB, SOD, and GSH ($P < 0.05, 0.01$). MF-CBRP also reduced the expression of PDGF- α , CTGF, α -SMA, MMP-2, and TIMP-1 mRNA ($P < 0.01$) and improved the pathological changes of liver histopathology. Compared with CBRP, MF-CBRP anti-hepatic fibrosis effect was slightly weakened. **Conclusion** The results suggested that MF-CBRP may against hepatic fibrosis by reducing oxidative stress, inhibiting collagen fibrillation, reversing hepatic stellate cell activation, and inhibiting the expression of hepatic growth factor. However its anti-fibrosis activity and mechanism was weaker than the original CBRP in a certain extent.

Key words: modified Compound Biejia Ruangan Pills; *Human Placenta*; liver fibrosis; TGF- β 1; MMP-2; TIMP-1

复方鳖甲软肝片 (Compound Biejia Ruangan Pills, CBRP) 由鳖甲 (制)、莪术、赤芍、紫河车等 11 味药材组成, 具有软坚散结、化瘀解毒、益气养血之功效, 是国内首个用于预防、治疗慢性乙型肝炎肝纤维化以及早期肝硬化的复方中药制剂, 临床应用广泛^[1-3]。紫河车 (*Human Placenta*, HP) 为我国传统名贵中药材, 是 CBRP 处方中的重要佐药, 具有益肾柔肝、被肾扶脾之功效。然而, 近年来受资源紧缺、价格昂贵等限制, HP 的应用存在采购困难、制约产业化生产等诸多问题, 可能对 CBRP 的长远发展存在潜在的影响。

中药复方的减方及濒危中药的替代研究为含濒危等特殊中药的方剂应用与开发打开了新的局面^[4-6]。在 CBRP 的组方中, HP 行使佐药之功, 并没有主要病症的治疗作用。据此, 本研究进行 CBRP 减方即去除 HP 的研究, 为含 HP 中成药的相关研究提供参考, 以期降低 HP 的缺失对相关中成药应用与发展的影响。本研究通过比较 CBRP 减去佐药 HP 形成的新组方 (MF-CBRP) 与原方在抗肝纤维化药效及作用机制上的不同, 探讨 CBRP 处方精简的可行性。

1 材料

1.1 药品与试剂

MF-CBRP 原料药粉 (即 CBRP 处方中减去 HP 后剩余 10 种药味混合而成的原料药粉末, 不含辅料, 每克药粉相当于生药 1.971 4 g, 批号 X20161206)、CBRP 原料药 (不含辅料, 每克药粉相当于生药 1.854 5 g, 批号 X20161205), 均由内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司提供; 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、白蛋白 (ALB)、总蛋白 (TP)、总胆红素 (T-Bil)、碱性磷酸酶 (ALP) 测定试剂盒均购于深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; 羟脯氨酸 (Hyp)、透明质酸 (HA)、层黏连蛋白 (LN)、III 型前胶原 (PC-III)、IV 型胶原 (IV-C)、血小板衍生因子- α (PDGF- α) 及结缔组织生长因子

(CTGF) 试剂盒均购于华美生物工程有限公司; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 测定试剂盒由南京建成生物工程有限公司提供; Trizol 试剂盒 (Life Technology 公司); 逆转录及 PCR 反应盒 (Thermo 公司); 转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶抑制因子-1 (TIMP-1) 和 GAPDH 引物由 Life Technology 提供合成; α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体由武汉谷歌生物科技有限公司提供。

1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠 80 只, 体质量 (200 ± 20) g, 雌雄各半, 动物质量合格证号 0041081, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 生产许可证号 SCXK (军) 2012-0004, 于中国人民解放军第三〇二医院实验动物房 [实验动物使用许可证号 SYXK (军) 2012-0010] 中适应性饲养 3 d 后进行实验。

1.3 仪器

YP2002 型电子天平 (上海越平科学仪器有限公司); BSA124S 电子天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; 全自动生化分析仪 (深圳雷杜生命科技有限公司); 超声细胞粉碎机 (宁波新芝生物公司); 台式高速冷冻离心机 (Heal Force 公司); 酶标检测仪 (美国 Bio Tek 仪器有限公司); Step One Plus 型荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司)。

2 方法

2.1 模型制备及给药

SD 大鼠随机取 10 只作为对照组, 其余 70 只造模, 均雌雄各半。实验第 1 天, 造模大鼠以 5 mL/kg sc 40% CCl₄ 大豆油溶液, 3 d 后以 3 mL/kg sc 40% CCl₄ 大豆油溶液, 同时对照组大鼠 sc 等体积大豆油溶液, 每周 2 次, 连续 6 周。造模结束后, 随机抽取对照及模型大鼠各 2 只, 验证造模是否成功。剩余大鼠随机分为对照组、模型组、阳性对照 (秋水仙碱 0.1 mg/kg) 组、CBRP (0.594 7 g/kg) 组和 MF-

CBRP 高、低剂量 (1.061 0、0.530 5 g/kg) 组, 每组 8 只。从第 7 周开始, 给药组 ig 对应剂量的药物溶液, 对照组及模型组大鼠 ig 等体积 0.5% 羟甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液, 连续给药 6 周。

2.2 大鼠肝功能指标检测

大鼠末次给药后, 禁食不禁水 12 h, 腹主动脉采血, 3 000 r/min 离心 15 min, 分取上层血清于 -80 °C 低温冰箱保存, 全自动生化分析仪检测 ALT、AST、ALB、TP、T-Bil 和 ALP 水平。

2.3 大鼠血清脂质过氧化和纤维化指标的检测

取“2.2”项下分离的血清, 按照试剂盒使用说明, 采用比色法测定大鼠血清中 SOD、MDA 及 GSH 的量; ELISA 法检测纤维化指标 HA、LN、PC-III 及 IV-C 水平, 采用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度 (*A*) 值。

2.4 大鼠肝脏组织中 Hyp、PDGF- α 和 CTGF 量的测定

取 1 g 新鲜大鼠肝脏组织, 低温条件下剪碎, 于匀浆器中研磨成浆, 加 9 倍冷生理盐水制成 10% 肝匀浆液, 按试剂盒说明测定大鼠肝匀浆中 Hyp 含量; 用 ELISA 法按试剂盒说明检测 PDGF- α 和 CTGF 水平的变化。

2.5 RT-PCR 检测大鼠肝脏组织中 TGF- β 1、TIMP-1 和 MMP-2 mRNA 表达

取新鲜大鼠肝脏组织 100 mg, Trizol 抽取总 RNA, 按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, RNA 定量后进行 PCR 扩增。GAPDH 作为内参, 引物信息见表 1。

2.6 大鼠肝脏组织病理学检查

取大鼠肝脏右叶相同部位新鲜组织于 10% 中性甲醛溶液中固定 72 h, 石蜡包埋, 常规切片, HE

染色观察肝组织病理变化。Masson 染色观察胶原纤维增生情况。显微镜下每张玻片随机选择 5 个视野 ($\times 200$), 3DHISTECH 扫描仪定量分析肝纤维化面积百分比平均值。

2.7 免疫组织化学法检测大鼠肝脏组织 α -SMA 表达

采用免疫亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (SABC) 法测定大鼠肝脏组织中 α -SMA 的表达。对大鼠肝组织进行取材、脱水、包埋及切片后, 用 3% 的 H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶进行热源修复, 5% 牛血清白蛋白封闭后, 加一抗 α -SMA (1:1 000) 于 4 °C 孵育过夜, 加二抗, 37 °C 中孵育 30 min, 显色后观察, 以胞浆或胞核内出现棕黄色颗粒视为 α -SMA 阳性细胞的表达。在显微镜下每张玻片随机选择 5 个视野 ($\times 200$), 3DHISTECH 扫描仪定量分析阳性细胞区域的面积平均值。

2.8 数据统计方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 One way ANOVA 进行分析。

3 结果

3.1 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠血清中肝功能指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清中 ALT、AST、T-Bil 和 ALP 水平均显著升高 ($P < 0.01$), AST/ALT、ALB 水平显著降低 ($P < 0.05$, 表 2)。与模型组比较, MF-CBRP 低剂量组大鼠血清中 ALT、AST、T-Bil 和 ALP 水平均显著降低 ($P < 0.01$), AST/ALT、TP 和 ALB 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01); MF-CBRP 高剂量组大鼠血清中 ALT、AST 和 ALP 水平均显著降低 ($P < 0.01$), AST/ALT 水平升高 ($P < 0.05$)。与 CBRP 组比较, MF-CBRP 低剂量组大鼠血清中 T-Bil 显著降低 ($P < 0.05$), 其他各指标变化稍优于 CBRP 组。结果表明, MF-CBRP 可以减轻 CCl_4 诱导的大鼠肝细胞损伤, 改善肝细胞代谢。

3.2 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠血清脂质过氧化指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清中 SOD、GSH 水平均显著降低 ($P < 0.01$), MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$, 图 1)。与模型组比较, MF-CBRP 低剂量组大鼠血清中 SOD、GSH 水平均显著升高 ($P < 0.05$), MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$); MF-CBRP 高剂量组大鼠血清中 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与 CBRP 组比较, MF-CBRP 各剂量组大鼠血清中 SOD、MDA 及 GSH 水平变化均无显著差异,

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

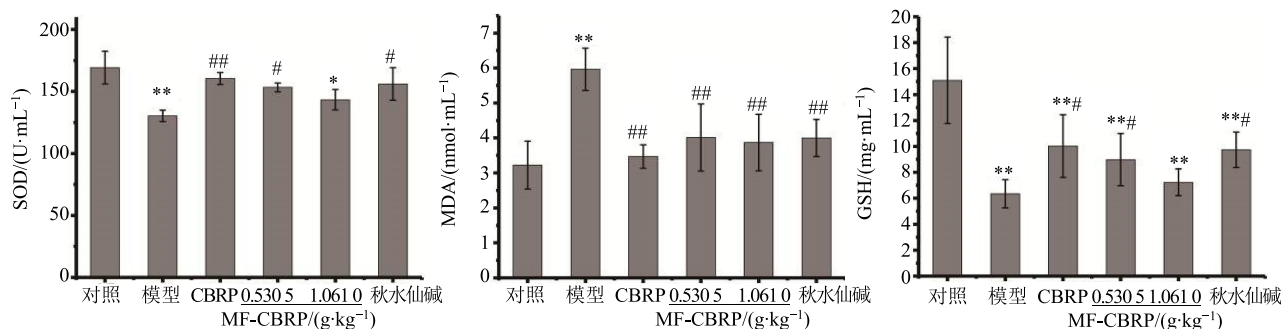
基因	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp
GAPDH	正向 TTCCTACCCCAATGTATCCG	281
	反向 CATGAGGTCCACCACCCTGTT	
TGF- β 1	正向 GGCGGTGCTCGCTTTGTA	201
	反向 TCCCGAATGTCTGACGTATTGA	
TIMP-1	正向 TAAAGCCTGTAGCTGTGCCC	122
	反向 CATAACGCTGGTATAAGGTGGTC	
MMP-2	正向 AAGGACACCCTCAAGAAGATGC	222
	反向 AAAGGCATCATCCACTGTCTCA	

表 2 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 2 Effects of MF-CBRP on liver function indexes in serum of rats with hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	AST/ALT	ALB/(g·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	T-Bil/(μmol·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)
对照	—	47.40 ± 5.22	100.80 ± 11.71	2.23 ± 0.47	27.16 ± 2.42	57.14 ± 3.59	0.74 ± 0.24	133.40 ± 48.04
模型	—	571.17 ± 145.00**	578.50 ± 134.23**	1.31 ± 0.76*	24.36 ± 1.37*	54.18 ± 3.85	1.85 ± 0.78**	211.67 ± 115.44**
CBRP	0.594 7	37.20 ± 12.32###	89.10 ± 24.32###	2.64 ± 1.05###	27.49 ± 1.68#	57.60 ± 4.63	1.04 ± 0.83	105.70 ± 26.06##
MF-CBRP	0.530 5	36.60 ± 11.58###	82.60 ± 11.93###	2.48 ± 0.87###	27.62 ± 2.09#	58.32 ± 3.26#	0.75 ± 0.36###&	102.90 ± 35.75##
	1.061 0	45.34 ± 10.69###	95.21 ± 21.74###	2.29 ± 0.95#	26.58 ± 1.78	57.18 ± 4.32	1.25 ± 0.35*	99.82 ± 37.43##
秋水仙碱	0.100 0	43.10 ± 15.47###	82.40 ± 21.17###	2.03 ± 0.60	26.84 ± 2.14	56.18 ± 2.70	0.82 ± 0.31###	114.60 ± 43.77#

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$; 与 CBRP 组比较: & $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs model group; & $P < 0.05$ vs CBRP group, same as below

图 1 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠血清中 SOD、MDA 及 GSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Fig. 1 Effects of MF-CBRP on SOD, MDA, and GSH levels in serum of rats with hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

但其抗脂质过氧化效果稍弱于 CBRP 组。结果提示, MF-CBRP 能够减少大鼠肝细胞氧自由基和脂质过氧化物的产生, 以 MF-CBRP 低剂量组效果最为显著。

3.3 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠肝脏组织中 Hyp 及纤维化指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肝组织中 Hyp、HA、LN、PC-III 和 IV-C 水平显著升高 ($P < 0.01$, 图 2)。与模型组比较, MF-CBRP 低剂量组大鼠肝组织中 Hyp、HA、LN、PC-III 和 IV-C 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), MF-CBRP 高剂量组大鼠肝组织中 Hyp、LN 和 IV-C 量也显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。与 CBRP 组比较, MF-CBRP 各剂量组大鼠肝组织中各指标变化不明显。结果提示, MF-CBRP 能够降低肝组织中胶原的量, 改善肝纤维化程度。

3.4 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠肝脏组织中促纤维化细胞因子水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肝组织中 CTGF 和 PDGF- α 水平均显著升高 ($P < 0.01$, 图 3), CBRP 和 MF-CBRP 组大鼠肝组织中 PDGF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, MF-CBRP 各剂量组大鼠肝组织中 CTGF 和 PDGF- α 水平均显著降低

($P < 0.01$)。与 CBRP 组比较, MF-CBRP 各剂量组大鼠肝组织中 CTGF 和 PDGF- α 水平无显著差异。结果显示, MF-CBRP 可有效抑制肝纤维化进程。

3.5 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠肝脏组织中 TGF- $\beta 1$ 、TIMP-1 及 MMP-2 mRNA 表达水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肝组织中 TGF- $\beta 1$ 、TIMP-1 及 MMP-2 mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.01$, 图 4), 各给药组 MMP-2 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, MF-CBRP 各剂量组大鼠肝组织中 TIMP-1 及 MMP-2 mRNA 的表达水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达仅有降低趋势。与 CBRP 组比较, MF-CBRP 各剂量对促肝纤维化生长因子 mRNA 的抑制作用无显著差异。表明 MF-CBRP 可以抑制促肝纤维化生长因子的表达, 改善肝纤维化进程。

3.6 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠肝脏组织病理学改变的影响

HE 染色结果 (图 5-A) 显示, 对照组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞排列整齐, 无变形、坏死改变, 纤维结缔组织无增生。模型组大鼠的肝小叶结构紊乱, 肝细胞弥漫性气球样变性至肝细胞坏死, 肝细

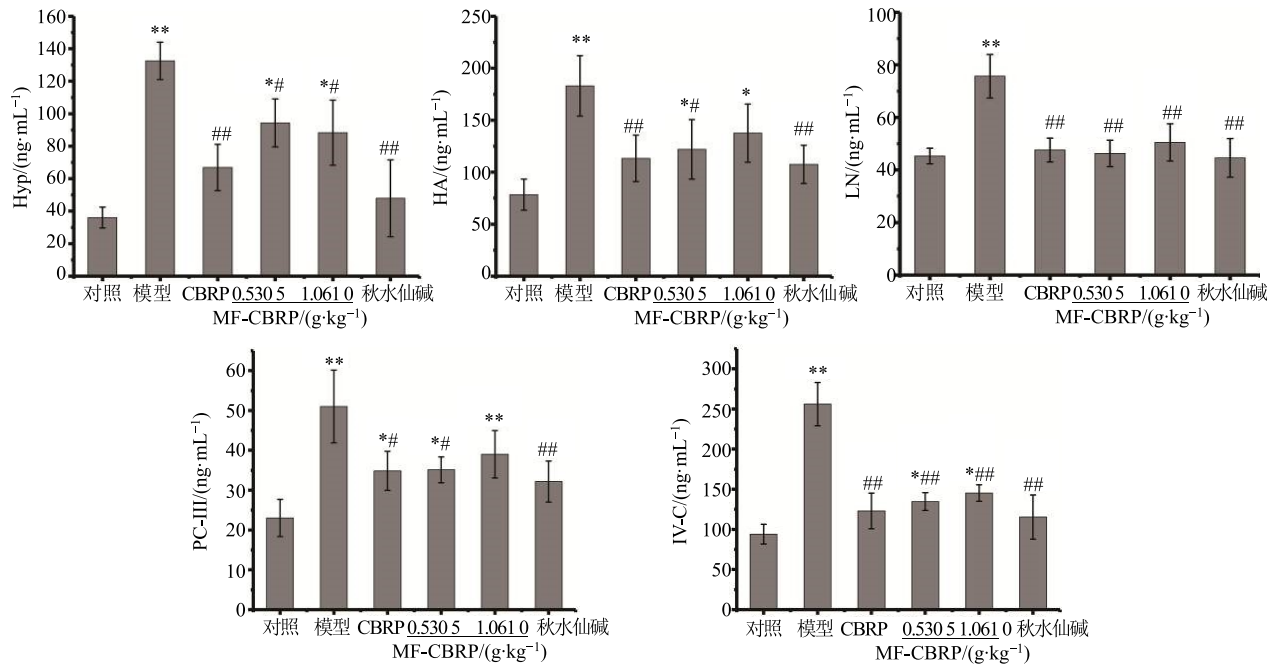


图 2 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠肝脏组织中 Hyp、HA、LN、PC-III 及 IV-C 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effects of MF-CBRP on Hyp, HA, LN, PC-III, and IV-C levels in liver tissue of rats with hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

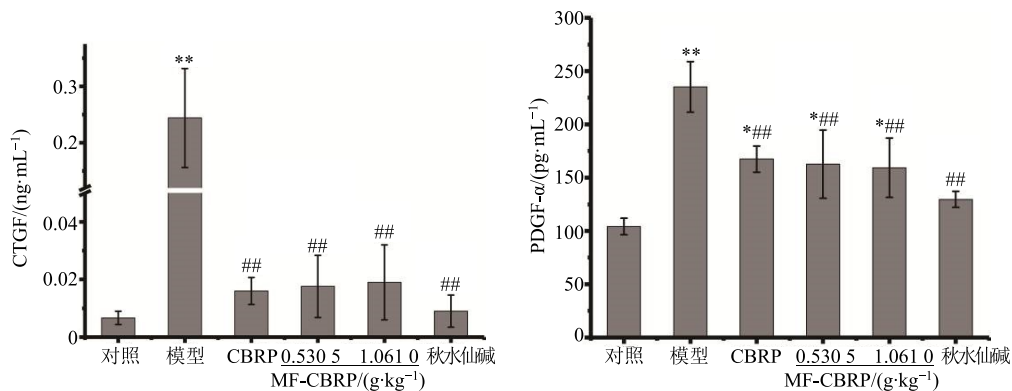


图 3 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠肝组织中 CTGF 及 PDGF-α 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effects of MF-CBRP on CTGF and PDGF-α levels in liver tissue of rats with hepatic fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

胞核固缩深染，胞浆呈空泡化，部分肝细胞伴有脂肪变性，胞浆内可见大小不一的圆形空泡，炎性细胞浸润，纤维结缔组织大量增生，形成纤维间隔。与模型组比较，MF-CBRP 低剂量组大鼠肝细胞变性明显改善，炎性细胞浸润大量减少，汇管区纤维结缔组织增生也明显减少，肝组织病理结构明显改善；MF-CBRP 高剂量组大鼠肝细胞变形轻微改善，炎性细胞浸润减少，汇管区结缔组织少量增生，胶原纤维少量增生。与 CBRP 组比较，MF-CBRP 各剂量改善肝组织病变效果稍有减弱，但无显著差异。说明 MF-CBRP 可改善 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化，对肝组织具有保护作用。

Masson 染色结果（图 5-B、D）显示，对照组大鼠肝小叶结构清晰，肝细胞排列整齐，仅中央静脉及汇管区血管壁附着少量蓝色，周围有少量胶原纤维。模型组大鼠肝组织汇管区明显附着大量蓝色，胶原纤维大量增生，纤维间隔增多、增宽，交联呈网状结构，形成完整的纤维间隔，将肝小叶分成大小不同的肝细胞团，形成假小叶。与模型组比较，MF-CBRP 低剂量组大鼠肝脏汇管区结缔组织增生明显减少，胶原纤维显著减少 ($P < 0.01$)；MF-CBRP 高剂量组大鼠肝脏汇管区结缔组织增生减少，胶原纤维显著减少 ($P < 0.01$)，纤维束向周围延伸，仅有小部分完全连接形成假小叶，较模型组有明显改

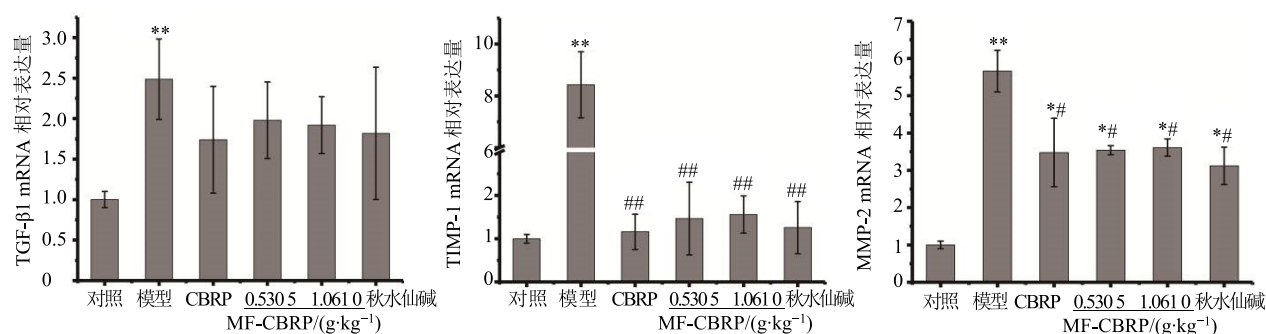
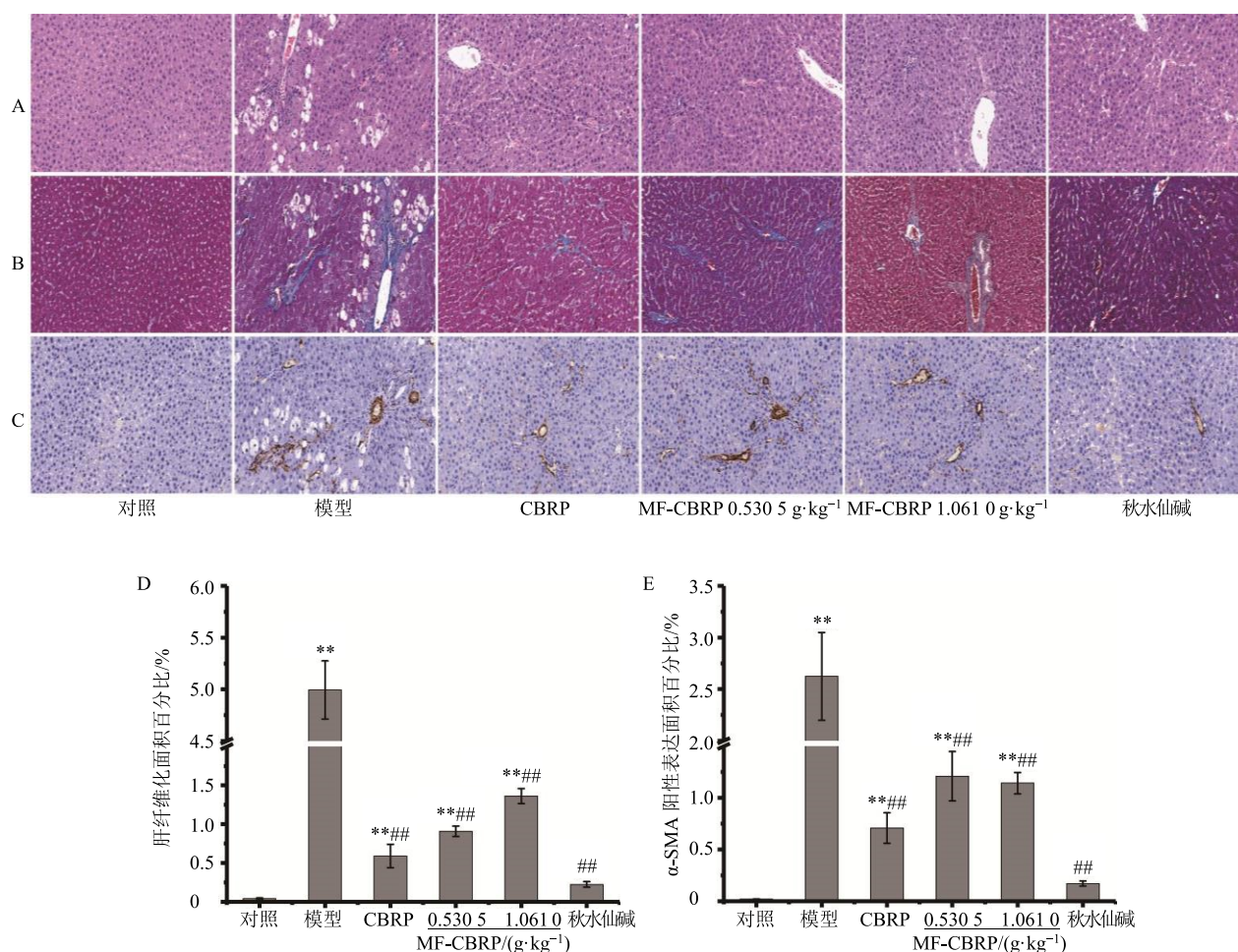


图 4 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠肝组织中 TGF-β1、TIMP-1 及 MMP-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effects of MF-CBRP on TGF-β1, TIMP-1, and MMP-2 mRNA expression of liver fibrosis induced by CCl₄ in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A-各组大鼠肝脏组织 HE 染色病理学图片 (×200) B-各组大鼠肝脏组织 Masson 染色病理学图片 (×200) C-各组大鼠肝脏组织 α-SMA 表达的免疫组化染色图片 (×200) D-各组肝纤维化面积百分比 E-各组 α-SMA 阳性表达面积百分比

A-liver histopathological photograms of rats in each group by HE staining (× 200) B-liver histopathological photograms of rats in each group by Masson staining (× 200) C-expression of α-SMA in liver tissue of rats in each group by immunohistochemistry staining (× 200) D-percentage of liver fibrosis area E-α-SMA positive expression area percentage

图 5 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠肝组织病理学改变及 α-SMA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effects of MF-CBRP on the liver tissue pathological changes and α-SMA expression of liver fibrosis induced by CCl₄ in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

善。与 CBRP 组比较, MF-CBRP 各剂量抗大鼠肝纤维化效果稍有减弱。提示 MF-CBRP 可抑制胶原纤维的增生, 改善肝纤维化。

3.7 MF-CBRP 对肝纤维化大鼠肝脏组织中 α -SMA 表达的影响

免疫组化染色结果(图 5-C、E)显示, 对照组大鼠肝脏组织中 α -SMA 表达极少, 仅在血管平滑肌细胞内有极少量表达。与对照组比较, 模型组大鼠肝组织纤维化程度加深, α -SMA 阳性表达面积大量增加($P<0.01$), 棕黄色区域颜色加深, 主要分布在汇管区及纤维间隔。与模型组比较, MF-CBRP 低剂量组大鼠肝脏组织中 α -SMA 阳性表达面积显著减少($P<0.01$), 棕黄色区域面积减少, 颜色减轻, 主要分布在汇管区及仅存的纤维间隔中; MF-CBRP 高剂量组大鼠肝脏组织中 α -SMA 阳性表达面积也有一定程度的减少($P<0.01$), 主要集中在汇管区。与 CBRP 组比较, MF-CBRP 各剂量组 α -SMA 表达水平无显著差异。提示 MF-CBRP 能够抑制肝星状细胞激活, 逆转肝纤维化的产生。

4 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病发展的共同病理过程^[7-8], 与肝星状细胞(HSCs)的活化增殖及细胞外基质(ECM)过度沉积有关^[9-10]。HSCs 具有合成、分泌 ECM 及胶原酶的能力, 是 ECM 增生的主要来源^[11]。因此, 抑制 HSCs 的活化及增殖、诱导 HSCs 凋亡、抑制 ECM 过度沉积是逆转肝纤维化形成的重要方式^[12-13]。在前期的研究中^[1], CBRP 显示出保肝降酶、抑制促纤维化因子表达、抑制 HSCs 活化增殖、诱导 HSCs 凋亡等显著的抗纤维化作用。其处方中佐药 HP 具有温肾补精、益气养血等功效, 但近年来因其资源短缺、采购困难等因素, 可能对 CBRP 未来的发展产生潜在影响。而 CBRP 中剩余佐药党参、黄芪及冬虫夏草等同样具有益气填精的作用, 减去处方中 HP 后亦能协助治疗肝病次要证候。剔除 CBRP 中的 HP 符合对复方处方优化条件, 同时也是大势所向。比较减去 HP 的处方与 CBRP 原处方是否具有相似的药理活性及作用机制, 是解决 HP 对 CBRP 制约问题的关键, 同样也为其他以 HP 配方的中成药研究拓宽思路。

本研究采用 CCl_4 诱导大鼠肝纤维化^[14], 产生过量自由基引发肝细胞膜脂质过氧化^[15-16], 随后释放炎症因子致肝细胞损伤^[17], 使肝细胞内转氨酶 ALT 和 AST 释放入血, AST/ATL 比值升高, 蛋白质合

成代谢功能降低^[18], 胆道梗阻抑制酶排泄。表现为纤维化大鼠血清中 ALT、AST、T-Bil 和 ALP 水平显著升高, ALB 和 TP 量也随着肝脏代谢功能降低而减少。结果提示, MF-CBRP 低剂量可显著降低肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST、T-Bil 和 ALP 水平, 升高 ALB 和 TP 水平, 保肝降酶效果显著。

Hyp 是胶原蛋白中特有的氨基酸, 可定量反映肝脏胶原蛋白合成的量。HA、LN、PC-III 和 IV-C 均为肝纤维化标志物^[19], 对肝纤维化的产生、发展、评价具有重要临床意义和价值^[20]。结果显示, MF-CBRP 低剂量可明显降低肝纤维化大鼠血清中 Hyp、LN、PC-III 和 IV-C 水平, 能抑制胶原蛋白沉积、促进胶原降解, 从而减少 ECM 合成, 表现出一定的抗肝纤维化活性。病理学及 Masson 染色半定量分析也进一步发现 MF-CBRP 能显著降低肝组织胶原纤维量, 明显改善肝纤维化病理损伤程度。上述结果均证明了 MF-CBRP 的抗肝纤维化活性与 CBRP 相当。

过量自由基使肝微粒体诱发脂质过氧化反应, 导致机体重要的抗氧化及自由基清除剂 SOD、GSH 大量减少, MDA 量增加^[21-23]。在本实验中, MF-CBRP 低剂量能够显著升高肝纤维化大鼠血清中 SOD、GSH 的量, 降低 MDA 量, 提示 MF-CBRP 可能通过减轻肝组织氧化胁迫达到减轻肝纤维化的效果。 α -SMA 是 HSCs 活化的标志物, 其表达量反映活化 HSCs 的数量^[6]。用 MF-CBRP 干预后, α -SMA 的阳性表达降低, 代表 HSCs 的激活被抑制。免疫组化结果显示, MF-CBRP 组大鼠肝脏组织中 α -SMA 的阳性表达率比模型组明显减少, 其减少程度稍弱于 CBRP 组。

HSCs 的激活与几个关键促肝纤维化细胞因子的顺序表达及细胞因子表面受体激活有关, 包括 TGF- β 、MMP-2、TIMP-1、CTGF 及 PDGF 等^[24]。其中, TGF- β 是 HSCs 活化及 ECM 分泌最有效的诱导因子^[25]; CTGF 是 TGF- β 下游细胞因子, 具有较强诱导 HSCs 活化的作用; PDGF 作为 HSCs 最强的丝裂原, 具有促有丝分裂和促进 HSCs 增殖的活性; MMP-2 主要由血管壁细胞表达, 可高效降解基底膜的 III 型胶原。其过表达可致 HSCs 激活, 从而诱发肝纤维化进程^[26]; TIMP-1 为特异性抑制 MMPs 的糖蛋白, 可抑制活化的 HSCs 凋亡, 维持 ECM 来源^[27]。因此, 下调 TGF- β 、MMP-2、TIMP-1 基因的表达, 抑制 CTGF 的产生, 在受体水平特异性阻断 PDGF 信号途径的传导, 可有效抑制肝纤维化的

发展。本实验结果显示, MF-CBRP 低剂量可显著降低大鼠肝脏组织中 CTGF、PDGF- α 及 MMP-2、TIMP-1 mRNA 表达水平, 对 TGF- β mRNA 表达水平也有一定的抑制作用。提示 MF-CBRP 能够抑制 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠肝脏组织中 HSCs 的活化和增殖及促纤维化因子的表达。

综上所述, CBRP 处方中去除 HP 后仍具有降低酶表达、保护大鼠肝纤维化损伤的效果。其机制与减轻肝组织氧化胁迫、降低 α -SMA 表达、抑制 HSC 活化和增殖、逆转 ECM 积累及肝生长因子表达有关, 与 CBRP 药理活性及机制保持一致, 稍弱于 CBRP。因此, 在 HP 使用受限时, 可以用 MF-CBRP 来替代 CBRP, 若要保持原处方中全部抗肝纤维化功效, 建议寻找其处方中 HP 新的替代药材。

参考文献

- [1] Yang F R, Fang B W, Lou J S. Effect of Fufang Biejia Ruangan Pills on hepatic fibrosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(32): 5326-5333.
- [2] 龙志玲, 邵泽勇, 伍锡刚, 等. 前列地尔联合复方鳖甲软肝片治疗慢性乙型肝炎肝硬化的疗效观察 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(1): 134-138.
- [3] 郭振国, 周高东, 陈永永, 等. 复方鳖甲软肝片联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(3): 351-355.
- [4] 黄廷荣, 费新应, 余珊珊, 等. 膈下逐瘀汤加减方对肝癌 H22 荷瘤小鼠的作用 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2007, 15(5): 326-328.
- [5] 高鑫, 黄海, 周颖, 等. 朱砂和万氏牛黄清心丸致大鼠亚慢性肝毒性作用研究 [J]. *毒理学杂志*, 2017(5): 366-369.
- [6] 宣振华. 杜仲壮骨丸处方药材替代研究 [D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2014.
- [7] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2): 209-218.
- [8] Lee U E, Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25(2): 195-206.
- [9] Reeves H L, Friedman S L. Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis [J]. *Front Biosci*, 2002, 7(1/3): 808-826.
- [10] Friedman S L. Liver fibrosis: From bench to bedside [J]. *J Hepatol*, 2003, 38(1): S300-S305.
- [11] Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells [J]. *Liver*, 1998, 18(1): 2-13.
- [12] 段冷听. 梅花鹿茸多肽的化学结构及其抗肝纤维化作用 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [13] Schuppan D, Kim Y O. Evolving therapies for liver fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 1887-1901.
- [14] Constantinou C, Henderson N, Iredale J P. Modeling liver fibrosis in rodents [J]. *Methods Mol Med*, 2005, doi: 10.1385/1-59259-940-0:237.
- [15] Cohennaftaly M, Friedman S L. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with, chronic liver disease [J]. *Ther Adv Gastroenterol*, 2011, 4(6): 391-417.
- [16] Tsai M K, Lin Y L, Huang Y T. Effects of salvianolic acids on oxidative stress and hepatic fibrosis in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 242(2): 155-164.
- [17] Weber L W D, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2003, 33(2): 105-136.
- [18] Sookoian S, Pirola C J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(3): 711-725.
- [19] 刘珺, 徐选福, 郭传勇, 等. 贝母辛抗大鼠肝纤维化的作用研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(11): 1455-1459.
- [20] 刘兆凤, 马洁, 刘静, 等. 丹参滴丸对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的影响及其作用机制 [J]. *中草药*, 2012, 43(10): 1991-1996.
- [21] 陈艳, 姜齐宏, 骆中华. 麝香保心丸对大鼠免疫性肝纤维化的影响及其机制 [J]. *中草药*, 2013, 44(18): 2563-2568.
- [22] Erman F, Balkan J, Çevikbaş U, *et al.* Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication [J]. *Amino Acids*, 2004, 27(2): 199-205.
- [23] Chiu Y W, Chao P Y, Tsai C C, *et al.* Ocimum gratissimum is effective in prevention against liver fibrosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(4): 833-852.
- [24] Liu T, Wang X, Karsdal M A, *et al.* Molecular serum markers of liver fibrosis [J]. *Biomarker Insights*, 2012, 7(7): 105-117.
- [25] Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor β Smad signal in hepatic fibrogenesis [J]. *Gut*, 2007, doi: 10.1136/gut.2005.088690.
- [26] Kim T H, Mars W M, Stolz D B, *et al.* Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2000, 31(1): 75-82.
- [27] Boeker K H, Haberkorn C I, Michels D, *et al.* Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C [J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 316(1/2): 71-81.