

## 扶肝化纤汤对肝纤维化模型大鼠 MAPK 信号通路的影响

肖政华<sup>1</sup>, 杨辉<sup>1</sup>, 杨君<sup>2</sup>, 雷伟<sup>2</sup>, 易旭<sup>1</sup>, 谭敏敏<sup>1</sup>

1. 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵州 贵阳 550001

2. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550001

**摘要:** **目的** 探讨扶肝化纤汤对肝纤维化模型大鼠 MAPK 信号通路的影响, 研究其抗肝纤维化的作用机制。 **方法** 120 只 SD 大鼠, 按照每组 20 只, 随机分为对照组、模型组、秋水仙碱 (2 mg/kg) 组及扶肝化纤汤高、中、低剂量 (67.08、33.54、16.77 g/kg) 组。对照组不建模, 其余各组在四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 诱导的大鼠肝纤维化模型的基础上, 综合运用夹尾、强迫游泳、饥饿失常、ig 大黄等方法, 制备正虚毒蕴血瘀型肝纤维化大鼠模型。造模 6 周, 进行肝病理检查, 验证模型成功后, 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 纯净水 2 mL/d, 连续给药 3 周。末次给药的次日, 检测各组大鼠血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、白蛋白 (ALB)、羟脯氨酸 (Hyp)、层黏连蛋白 (LN)、III 型前胶原肽 (PIIINP) 水平, 肝组织行 HE 染色和 Masson 染色。采用 Western blotting 法检测肝组织 MAPK 信号通路中 ERK1/2、JNK1/2、P38 相关蛋白及其磷酸化蛋白表达情况, 定量分析结果以 p-ERK/ERK、p-JNK/JNK、p-p38/p38 值表示。 **结果** 模型组肝组织炎细胞浸润、纤维化程度重, 各给药组肝损伤程度以及纤维化程度明显减轻。与对照组比较, 模型组大鼠血清 ALT、AST、Hyp、LN、PIIINP 明显升高, ALB 明显下降 ( $P < 0.01$ ), p-JNK、p-ERK、p-p38 蛋白表达显著增高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 扶肝化纤汤能降低大鼠血清 ALT、AST、Hyp、LN、PIIINP 水平, 升高 ALB 水平, 下调 p38、ERK1/2、JNK1/2 的磷酸化蛋白表达, 且呈现出剂量依赖性, 以高剂量组效果最好。 **结论** 正虚毒蕴血瘀病症结合肝纤维化模型大鼠建模成功。扶肝化纤汤具有保护肝细胞, 减轻肝损伤, 抑制肝纤维化的作用。扶肝化纤汤能够调控 p-JNK、p-ERK、p-p38 蛋白表达, 抑制 MAPK 信号通路的活化, 可能是其抗肝纤维化的作用机制之一。

**关键词:** 扶肝化纤汤; MAPK 信号通路; 肝纤维化; 丙氨酸氨基转移酶; 天冬氨酸氨基转移酶; 白蛋白; 羟脯氨酸; 层黏连蛋白; III 型前胶原肽

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)14-3374-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.016

## Effect of Fugan Huaxian Decoction on MAPK signaling pathway in model rats with hepatic fibrosis

XIAO Zheng-hua<sup>1</sup>, YANG Hui<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>2</sup>, LEI Wei<sup>2</sup>, YI Xu<sup>1</sup>, TAN Min-min<sup>1</sup>

1. The Second Clinical Medical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

2. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

**Abstract: Objective** To research the effect of Fugan Huaxian Decoction on MAPK signaling pathway in rats with hepatic fibrosis (HF) and explore the mechanism of anti-HF. **Methods** A total of 120 SD rats were randomly divided into control group, model group, colchicine group and Fugan Huaxian Decoction group (high, medium and low dose groups), with 20 rats in each group. The rats in the normal group were SD rats, and the rats model in the remaining groups were established into HF rats with syndrome of *qi* deficiency, poison weakness and blood stasis on the basis of the HF model induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). Moreover, the rats were also received tail clamping, forced swimming, abnormal of starvation and full as well as rhubarb gavage. Liver pathology was performed on all rats after six weeks of modeling. After the validation model was successful, each group was given different doses of gavage, colchicine group (2 mg/kg), high, medium and low dose groups of Fugan Huaxian Decoction were intra-gastrically administered (67.08, 33.54, and 16.77 g/kg), normal group and model group were given pure water 2 mL/d for three weeks continuously. On the second day of last gavage, the serum levels of ALT, AST, ALB, LN, HyP and PIIINP were detected in each group. HE staining and Masson staining were performed

收稿日期: 2019-04-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660790); 贵州省科学技术基金项目资助课题 (黔科合 LH 字 [2014] 7318 号); 院内博士启动基金课题

作者简介: 肖政华 (1977—), 男, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向为中西医结合防治消化系统疾病基础及临床。

Tel: 18984040248 E-mail: 435204673@qq.com

on liver tissues. The expression of ERK1/2, JNK1/2 and P38-related protein and their phosphorylated protein in liver MAPK signaling pathway were detected by Western blotting. The results of quantitative analysis were expressed as p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, p-p38/p38 ratio. **Results** In model group, hepatic tissue cells were severely infiltrated and fibrotic, while, the degree of liver injury and fibrosis were significantly reduced in other groups. Compared with normal group, the serum levels of ALT, AST, Hyp, LN and PIIINP in model group were increased significantly, ALB was decreased significantly ( $P < 0.01$ ), and the protein expression of p-JNK, p-ERK and p-p38 was increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, Fugan Huaxian Decoction decreased serum ALT, AST, Hyp, LN and PIIINP levels of rats, increased ALB content and down-regulated the expression of phosphorylated protein of p38, ERK1/2 and JNK1/2, and it showed in a dose-dependent manner, the high dose group worked the best. **Conclusion** The model of *qi* deficiency, poison weakness and blood stasis combined with HF model rats was successfully established. Fugan Huaxian Decoction not only protects hepatocytes, alleviates liver injury and inhibits HF, but also regulates the protein expressions of p-JNK, p-ERK, p-p38, as well as inhibits MAPK signaling pathway activation, which may be one of the mechanisms of its anti-HF function.

**Key words:** Fugan Huaxian Decoction; MAPK signaling pathway; hepatic fibrosis; ALT; AST; ALB; LN; Hyp; PIIINP

肝纤维化是对慢性肝损伤的一种修复反应,是各种慢性损肝因素作用下,损伤与修复过程中,细胞外基质(ECM)的合成增加而降解减少,最终导致 ECM 在肝内过度沉积所致。这是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段,是所有慢性肝病的共同病理基础<sup>[1]</sup>,肝纤维化有逆转的可能<sup>[2]</sup>,及时有效治疗意义重大。活化的肝星状细胞(HSC)是产生 ECM 最主要的细胞,有许多细胞信号传导通路参与 HSC 的激活及肝纤维化的形成,有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)是调控介导胞内信号转导的重要系统,是传递细胞增殖信息的汇聚点和共同通路,在肝纤维化发生、发展过程中有重要作用。中医药抗肝纤维化具有多部位、多靶点、毒副作用小等优势,现在已经成为世界肝病研究领域中的热点<sup>[3-6]</sup>。

笔者总结肝纤维化的中医病机关键就在于“正虚毒蕴血瘀”。治疗的关键是从脾论治,扶正解毒,创立扶肝化纤汤,以来源于《伤寒论》,堪称疏肝解郁、调和肝脾祖方的四逆散为基础,加黄精、当归、鳖甲益气健脾,补益肝肾精血,同时,鳖甲软坚散结;黄芪、白术补中益气健脾强正气;丹参、三七活血化瘀消积,绞股蓝益气扶正解毒。诸药合用补益肝肾、健脾益气、行气活血、扶正解毒。临床疗效明显,前期研究<sup>[7]</sup>表明,扶肝化纤汤能较好地改善肝纤维化患者的临床症状,恢复肝功能,降低血清肝纤四项水平,但是其抗肝纤维化的分子机制尚不明确。为此,本研究拟在经典 sc 四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )制备大鼠肝纤维化模型的基础上,基于病证结合,方证相符理论指导,运用多种不可预知的方式刺激建立正虚毒蕴血瘀病证结合肝纤维化模型大鼠,观察扶肝化纤汤对模型大鼠 MAPK 信号通路的影响,探讨其抗肝纤维化的可能作用机制,为其进一步开

发及临床应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠,120 只,12 月龄,清洁级,体质量( $200 \pm 20$ ) g,购自重庆腾鑫生物技术股份有限公司,许可证号 SCXK(渝)2015-001。所有大鼠分笼饲养,每笼 5 只;饲以标准合成饲料,自由饮水,动物房温度  $18 \sim 20$  °C,湿度 50%~60%。

### 1.2 药物和试剂

扶肝化纤汤组成:柴胡 10 g、白芍 20 g、枳实 15 g、炙甘草 6 g、黄精 15 g、黄芪 20 g、鳖甲 20 g、当归 20 g、丹参 20 g、三七粉 5 g、绞股蓝 10 g,采用广东一方制药有限公司生产的智能颗粒组成(批号 8121613);秋水仙碱(10 mg/片,实验前用蒸馏水配制成 0.5 mg/mL 药液),西双版纳药业有限责任公司产品;丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)、羟脯氨酸(Hyp)、层黏连蛋白(LN)、III 型前胶原肽(PIIINP)试剂盒(南京建成生物工程研究所);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、彩虹 180 广谱蛋白 Marker(11 000~180 000,北京索莱宝科技有限公司);Western 封闭液、Western 一抗稀释液、Western 二抗稀释液(碧云天生物技术研究所);p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) 兔单抗、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP<sup>®</sup>兔单抗、p38 MAPK (D13E1) XP<sup>®</sup>兔单抗、Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP<sup>®</sup>兔单抗、SAPK/JNK 兔抗体、Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) 兔单抗(Cell Signaling 公司)。

### 1.3 仪器

酶标仪(Multiskan Go);多应用微板分光光度

计、Sorvall ST16R 台式离心机 (Thermo 公司); 奥林巴斯 BX53 型生物显微镜 (Olympus 公司); 切片刀 (日本羽毛 R35 一次性刀片); 病理切片机 (德国 Leica RM 2016 轮转式切片机); 组织摊烤片机 (武汉俊杰 JK-6 生物); ChemiDoc™ 触摸成像系统、Trans-Blot® Turbo™ 全能型蛋白转印系统 (Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 受试药液的制备

组方颗粒加入 100 ℃ 纯净水 193 mL, 充分搅拌均匀后, 用恒温水浴锅进行浓缩, 分别浓缩至含生药 3.35、1.67、0.83 g/mL, 4 ℃ 冰箱保存备用。

### 2.2 分组、造模及给药

用随机数字表法将大鼠分为对照组、模型组、秋水仙碱组及扶肝化纤汤高、中、低剂量 (67.08、33.54、16.77 g/kg) 组, 每组 20 只。参考文献方法<sup>[8-11]</sup>制备正虚毒蕴血瘀病证结合肝纤维化动物模型, 将 CCl<sub>4</sub> 与橄榄油按 4:6 比例配成 40% 油剂, 造模组大鼠按 3 mL/kg sc 油剂, 对照组 sc 等量生理盐水, 每周 2 次。除对照组外, 其余各组大鼠从第 4 周开始予①夹尾 (1 h); ②食物剥夺 (24 h); ③ig 大黄水煎液 (2 g/mL, 10 mL/kg), 1 次/d; ④束缚 (30 min); ⑤游泳疲劳实验, 将大鼠放入 1 个内壁光滑、水深超过大鼠站立高度的盆中, 水温 28~32 ℃, 使其连续游泳, 至疲累下沉停止; ⑥超声刺激 (2 h)。每天随机选 6 种刺激中的 2 种, 相邻 2 天不重复, 以避免耐受单一刺激, 持续 3 周。总共造模 6 周后, 每组随机抽取 2 只大鼠, 取肝组织行 HE 及 Masson 染色, 观察肝纤维化情况。模型验证成功后开始 ig 给药, 根据成人与大鼠的临床等效量折算率换算, 扶肝化纤汤高、中、低剂量组给药量分别为 67.08、33.54、16.77 g/(kg·d)。对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 秋水仙碱组 ig 秋水仙碱 (2 mg/kg)。每日 1 次, 连续给药 3 周。

### 2.3 标本的采集与处理

末次给药的次日 (各组大鼠禁食禁水 12 h), 进行一般情况观察, 随后予 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) ip 麻醉。剖开腹腔, 腹主动脉采血, 静置后离心 (3 500 r/min, 10 min) 取血清, 标记, 置 -80 ℃ 冰箱保存备用; 剖取肝脏, 肝组织置于 10% 中性福尔马林液中固定 24~48 h 后进行组织病理学检测, 其余肝组织置 -80 ℃ 冰箱保存备用。

### 2.4 血清学指标检测

严格按照试剂盒说明, 采用微板法测定 ALT、AST 水平, 微量酶标仪法测定 ALB 水平, 碱水解法测定 Hyp 水平, ELISA 法测定 LN、PIIINP 水平。

### 2.5 肝组织病理学观察

10% 中性福尔马林液中固定肝组织, 行脱水、包埋、切片 (每块组织切 8 片、厚 4 μm), 行 HE 及 Masson 染色。镜下观察肝细胞变性坏死情况、肝脏组织结构、肝细胞炎症程度、肝纤维化组织增生情况。

### 2.6 Western blotting 法测定 p38、p-p38、ERK1/2、p-ERK1/2、JNK1/2、p-JNK1/2 蛋白表达水平

取肝组织约 50 mg 于玻璃匀浆器中, 加入 600 μL RIPA 裂解液+6 μL PMSF+6 μL 蛋白酶抑制剂+6 μL 磷酸酶抑制剂的混合液在冰上匀浆, 直至组织充分匀浆裂解。将匀浆液转移至 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min, 小心吸取上清液于新 EP 管中即为总蛋白提取液。采用 BCA 法测定蛋白含量, 稀释为一定浓度后加蛋白上样缓冲液, 煮沸变性备用。蛋白上样液经 10% SDS-PAGE 免染胶电泳分离。进行总蛋白均一化, 电泳后的免染胶于成像仪中扫描拍照, 获取总蛋白图像。将胶上蛋白经半干转转移至 PVDF 膜上, 摇床上室温封闭 1 h。将 PVDF 膜从封闭液中取出, TBST 摇床冲洗 3 次, 5 min/次, 4 ℃ 孵育一抗过夜。孵育一抗后的 PVDF 膜在 TBST 中摇床冲洗 3 次, 5 min/次, 加二抗, 室温摇床孵育 1 h。洗膜 (TBST 摇床冲洗 3 次, 5 min/次)。PVDF 膜取出, 加显影液, 孵育 5 min, 在成像仪中进行图像扫描, 拍照。测定各条带的灰度值, 以总蛋白均一化, 进行数据统计。

### 2.7 统计方法

采用 SPSS 22.0 进行数据处理及统计学分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据符合正态分布和方差齐性采用单因素方差分析, 不满足正态分布采用非参数检验。

## 3 结果

### 3.1 正虚毒蕴血瘀病证结合肝纤维化大鼠模型验证

造模 6 周后, 大鼠出现正虚毒蕴血瘀证候群, 表现为扎堆少动、弓背喜卧、反应迟钝、烦躁易怒、肛门污秽、大便稀溏、毛发枯黄疏松、体质量下降、舌质青紫瘀斑、眼球颜色变暗、尾部有紫或黄褐色斑等症。

肝组织 HE 染色显示,对照组的肝小叶结构完整清晰、有序排列形成肝索,肝细胞未发生变性和坏死,汇管区没有看到增生的纤维组织。模型组大多数肝小叶结构受到破坏,肝细胞大片脂肪变性、水肿,炎性细胞沉积。部分细胞坏死,肝索结构混乱。Masson 染色显示对照组小叶结构完整、清晰,无纤维化形成。模型组小叶结构破坏,汇管区域扩大,并有大量纤维组织增生,增生的纤维组织自汇管区向小叶内延伸,少部分到达肝小叶中央静脉,中央静脉及窦周有纤维化表现,形成纤维间隔,破坏肝小叶的界板,部分大鼠不完全肝小叶形成。造模大鼠出现的证候特点和肝组织病理检查结果,提示模型制备成功。结果见图 1。

### 3.2 各组大鼠血清 AST、ALT、ALB 水平比较

与对照组相比,模型组大鼠血清 AST、ALT 水平明显升高 ( $P<0.01$ ),ALB 水平则明显下降 ( $P<0.01$ )。和模型组相比,各治疗组大鼠血清 AST、ALT、ALB 水平均回调,且扶肝化纤汤呈现出剂量

依赖性,以高剂量组效果最好 ( $P<0.01$ )。说明扶肝化纤汤对模型大鼠的肝损伤有一定的保护作用,结果见表 1。

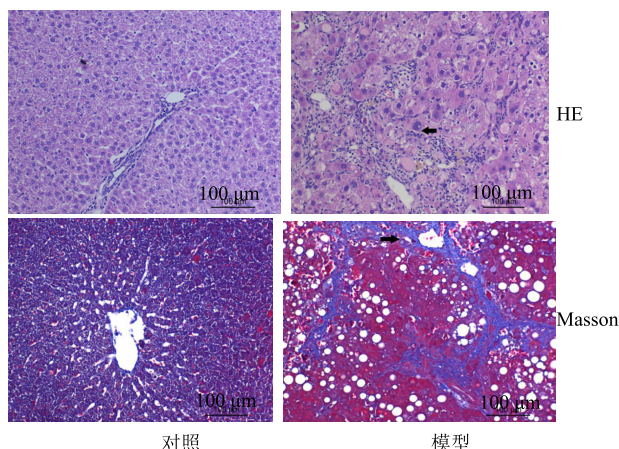


图 1 造模结束大鼠肝脏 HE 和 Masson 染色结果 ( $\times 200$ )  
Fig. 1 HE and Masson staining results of rats' liver after modeling ( $\times 200$ )

表 1 各组大鼠血清 AST、ALT、ALB、Hyp、LN、PIIINP 水平 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Determination of serum markers of AST, ALT, Hyp, LN, and ALB in rats ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别    | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | AST/(U·L <sup>-1</sup> ) | ALT/(U·L <sup>-1</sup> ) | ALB/(g·L <sup>-1</sup> ) | Hyp/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | LN/(ng·mL <sup>-1</sup> ) | PIIINP/(ng·mL <sup>-1</sup> ) |
|-------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| 对照    | —                        | 41.02±3.87               | 42.25±7.90               | 40.37±7.66               | 7.09±2.14                  | 74.30±4.16                | 9.23±1.81                     |
| 模型    | —                        | 150.00±2.98**            | 151.33±12.50**           | 24.91±2.18**             | 14.23±1.81**               | 133.02±9.32*              | 25.11±1.62**                  |
| 秋水仙碱  | 0.002                    | 100.18±3.48**△△          | 103.21±3.51**△△          | 28.28±2.27**△            | 9.68±1.11*△△               | 107.42±1.93*△△            | 13.60±1.10**△△                |
| 扶肝化纤汤 | 67.08                    | 79.49±4.65**△△           | 83.47±2.84**△△           | 31.30±1.83*△△            | 8.47±1.20*△△               | 92.48±5.26*△△             | 10.99±2.38△△                  |
|       | 33.54                    | 96.51±3.73**△△           | 108.14±5.92**△△          | 28.49±1.53**△△           | 9.94±1.28**△△              | 116.10±8.00*△△            | 15.04±0.70**△△                |
|       | 16.77                    | 106.63±5.51**△           | 117.48±7.48**△△          | 26.60±0.71**             | 12.25±2.98**               | 119.19±8.37*              | 16.15±1.07**△△                |

与对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较: △ $P<0.05$  △△ $P<0.01$ , 下表同

\* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs control group; △ $P<0.05$  △△ $P<0.01$  vs model group, same as below tables

### 3.3 各组大鼠血清 Hyp、LN、PIIINP 水平比较

与对照组比较,模型组大鼠血清 Hyp、LN、PIIINP 水平均显著增加 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。与模型组比较,各给药组大鼠血清 PIIINP 水平均显著降低 ( $P<0.01$ ),除扶肝化纤汤低剂量组,各给药组大鼠血清 Hyp、LN 水平显著降低 ( $P<0.01$ ),扶肝化纤汤高剂量效果最好。说明扶肝化纤汤抑制肝纤维的作用具有剂量依赖性,见表 1。

### 3.4 肝组织病理学检查结果

**3.4.1 HE 染色情况** 对照组和模型组与验证模型时的病理变化相似,说明,正虚毒蕴血瘀病证结合肝纤维化模型能显著增加大鼠肝组织胶原纤维含量,导致肝纤维化的形成。扶肝化纤汤高剂量组有少量胶原纤维沉积及炎性细胞浸润,肝索排列尚齐

整,无假小叶形成;秋水仙碱组与扶肝化纤汤中、低剂量组之间无明显差异,均有不同程度的肝细胞的变性和坏死,大量炎性细胞浸润,胶原纤维增生,少部分有不完全假小叶形成,肝索结构混乱。结果见图 2。

**3.4.2 Masson 染色情况** 对照组和模型组和验证模型时的病理变化类似,秋水仙碱组与扶肝化纤汤中、低剂量组小叶结构基本存在,汇管区域扩大,纤维组织增生。扶肝化纤汤高剂量组小叶结构完整,少量纤维组织增生。结果见图 3。

### 3.5 各组大鼠 p38、p-p38、ERK1/2、p-ERK1/2、JNK1/2、p-JNK1/2 蛋白表达水平

结果(图 4 和表 2~4)显示,和对照组比较,模型组大鼠肝组织中 p38、ERK1/2、JNK1/2 的磷酸



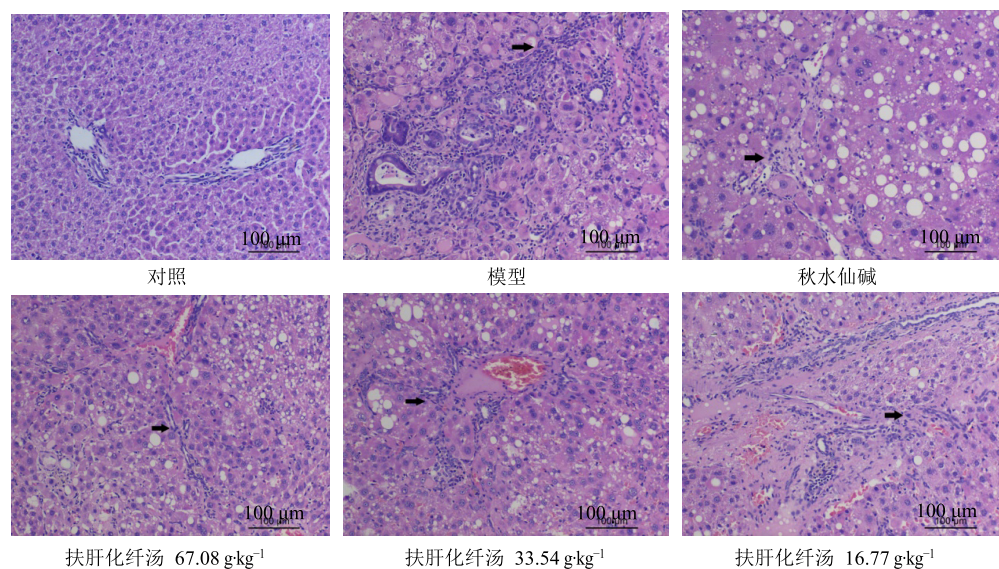


图 2 各组大鼠肝脏 HE 染色结果 (×200)

Fig. 2 HE staining results of rats' liver in each group after experiment (× 200)

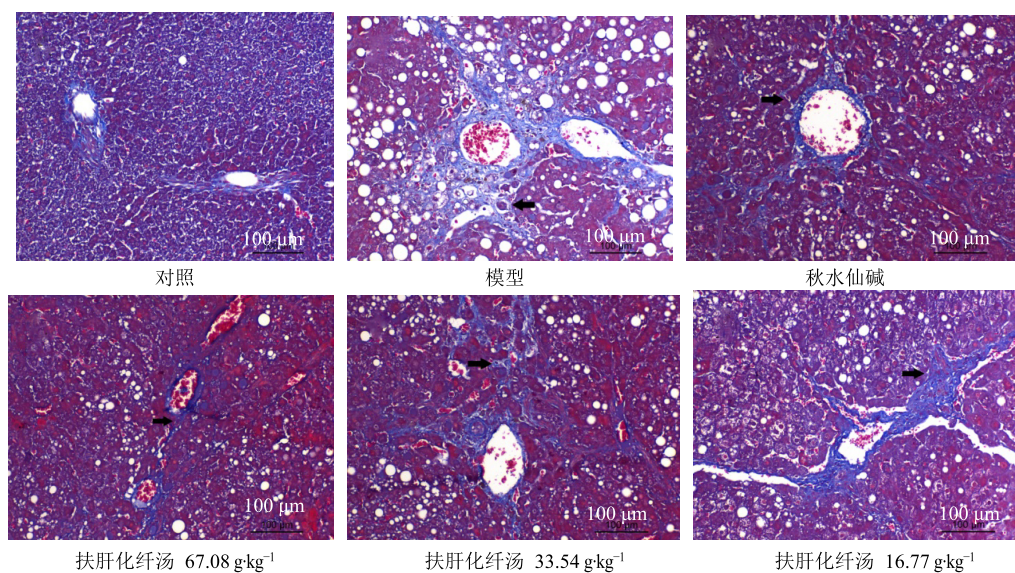


图 3 各组大鼠肝脏 Masson 染色结果 (×200)

Fig. 3 Masson staining results of rats' liver after experiment (× 200)

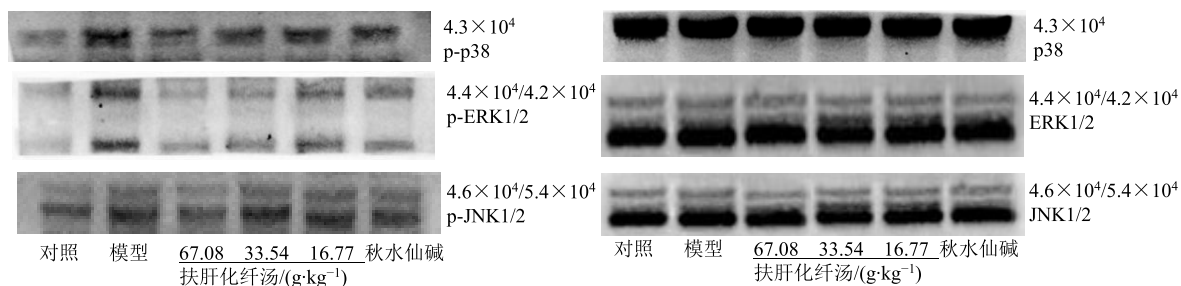


图 4 各组大鼠肝组织 p38、p-p38、ERK1/2、p-ERK1/2、JNK1/2、p-JNK1/2 蛋白表达水平

Fig. 4 Protein expressions of P-P38, P38, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK1/2, and p-JNK1/2 after treatment of Fugan Huaxian Decoction

表 2 各组大鼠 p-p38、p38 蛋白表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Table 2 Effects on p-p38 and p38 protein expressions of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别    | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | p-p38               | p38             | p-p38/p38           |
|-------|--------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| 对照    | —                        | 0.021 3±0.001 0     | 0.650 0±0.010 0 | 0.032 8±0.001 6     |
| 模型    | —                        | 0.039 7±0.001 0**   | 0.666 9±0.009 1 | 0.059 6±0.002 0**   |
| 秋水仙碱  | 0.002                    | 0.033 1±0.001 0**△△ | 0.653 9±0.022 0 | 0.050 7±0.001 8**△△ |
| 扶肝化纤汤 | 67.08                    | 0.028 3±0.001 3**△△ | 0.634 0±0.016 4 | 0.044 7±0.002 6**△△ |
|       | 33.54                    | 0.033 6±0.000 9**△△ | 0.662 0±0.015 6 | 0.050 8±0.001 8**△△ |
|       | 16.77                    | 0.034 2±0.003 5**   | 0.667 4±0.035 9 | 0.051 3±0.005 3**   |

表 3 各组大鼠 p-ERK1/2、ERK 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Table 3 Effects on p-ERK1/2 and ERK protein expressions of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别    | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | p-ERK1/2            | ERK1/2          | p-ERK/ERK           |
|-------|--------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| 对照    | —                        | 0.054 4±0.002 7     | 0.877 4±0.013 6 | 0.062 0±0.003 1     |
| 模型    | —                        | 0.101 3±0.002 6**   | 0.900 3±0.012 3 | 0.112 6±0.003 7**   |
| 秋水仙碱  | 0.002                    | 0.085 6±0.000 8**△△ | 0.882 7±0.029 7 | 0.097 1±0.003 2**△△ |
| 扶肝化纤汤 | 67.08                    | 0.072 2±0.003 2**△△ | 0.855 9±0.022 2 | 0.084 4±0.004 9**△△ |
|       | 33.54                    | 0.085 7±0.002 3**△△ | 0.893 7±0.021 0 | 0.096 0±0.003 3**△△ |
|       | 16.77                    | 0.087 3±0.008 9**   | 0.901 0±0.048 4 | 0.097 0±0.010 1**   |

表 4 各组大鼠 p-JNK1/2、JNK1/2 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Table 4 Effects on p-JNK1/2 and JNK1/2 protein expressions of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别    | 剂量/(g·kg <sup>-1</sup> ) | p-JNK1/2            | JNK1/2          | p-JNK/JNK           |
|-------|--------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| 对照    | —                        | 0.161 4±0.015 4     | 0.578 5±0.008 9 | 0.279 1±0.027 4     |
| 模型    | —                        | 0.314 6±0.008 1**   | 0.593 5±0.008 1 | 0.530 2±0.017 6**   |
| 秋水仙碱  | 0.002                    | 0.261 7±0.010 6**△△ | 0.582 0±0.019 6 | 0.449 8±0.120 0**△△ |
| 扶肝化纤汤 | 67.08                    | 0.224 1±0.010 0**△△ | 0.564 3±0.014 6 | 0.397 5±0.023 0**△△ |
|       | 33.54                    | 0.266 2±0.007 2**△△ | 0.589 2±0.013 9 | 0.452 0±0.015 7**△△ |
|       | 16.77                    | 0.271 1±0.027 5**   | 0.594 0±0.031 9 | 0.456 9±0.047 6*    |

化蛋白表达水平显著升高,各治疗组均有下调,其中以扶肝化纤汤高剂量组下调最明显。

#### 4 讨论

中医肝脾生理相依、病理相及、经脉相通。脾为气血生化之源,脾得肝之疏泄,则升降协调,运化健旺。脾气健运,气血生化有源,肝血充足则肝有所藏,肝体得以濡养,才会肝气冲和条达。即所谓“土得木而达”“木赖土以培之”“培土荣木”。医圣张仲景在《金匱要略》里有云:“见肝之病,知肝传脾,当先实脾,……故实脾,则肝自愈。此治肝补脾之要妙也”。叶天士曰“补脾必以疏肝,疏肝即以补脾也。”在这些经典理论指导下,笔者总结肝纤维化的中医病机关键就在于“正虚毒蕴血瘀”。正虚主要是肝血和脾肾精气不足,正气不足,无力祛邪

或者易感邪毒,邪毒内蕴,肝络阻塞则气滞血瘀。毒有病毒、药毒、疫毒、污染之毒等,毒陷经脉脏腑,气滞血瘀。基于此,在慢性肝病中强调从脾论治,培土荣木,效果明显<sup>[12]</sup>。基于中医“方-证-效”相关联的原则,只有病证结合、方证相符,疗效才会好。CCl<sub>4</sub>使脂质过氧化,直接破坏肝细胞膜,致肝细胞小叶中央坏死,ECM大量沉积,造成肝细胞变性坏死及纤维化,用CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化模型,是经典研究肝纤维化的模型<sup>[13-14]</sup>。因此,选择在CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化模型上,构建和叠加中医证候,建立正虚毒蕴血瘀病证结合肝纤维化模型来进一步探究疗效及其机制。CCl<sub>4</sub>就属“毒”,而用夹尾激怒大鼠撕咬,致肝气郁结,气滞血瘀。选择大黄致泻,耗气伤阴,饥饱失常伤其脾胃,导致

脾虚运化无力,气虚血瘀。再用游泳过劳导致气虚。根据“恐伤肾”理论,予超声刺激、束缚使其惊恐应急,用这些不可预知的刺激来叠加中医正虚毒蕴血瘀证型,造模 6 周结束后大鼠出现的正虚毒蕴血瘀证候群以及肝细胞变性坏死,炎症浸润,纤维组织增生的肝脏病理变化,提示模型制备是成功的。整个实验 9 周结束之后,模型组和对照组比较,病理上基本和 6 周造模结束时的表现相似,而血清 ALT、AST 反映肝实质损害的指标, LN、Hyp、PIIINP 反映肝纤维化常用的血清学指标均显著增加,而 ALB 明显减少,进一步说明模型组肝实质损害和肝脏合成 ALB 能力下降,肝纤维,说明正虚毒蕴血瘀肝纤维化大鼠模型的造模是成功的。

经过扶肝化纤汤干预后,大鼠肝组织 HE 染色及 Masson 染色均提示各治疗组肝纤维化程度低于模型组。各治疗组和模型组比较,大鼠 ALT、AST、LN、Hyp、PIIINP 均下调,ALB 则上调,且扶肝化纤汤各组病理和血清的改善程度,呈现出剂量依赖性,以高剂量组效果最好。说明对模型大鼠的肝损伤扶肝化纤汤有一定的保护作用,对其肝纤维化有一定的抑制作用。

肝纤维化的发病机制错综复杂,HSC 活化增殖并向肌成纤维细胞转化是肝纤维化的主要驱动因素。干扰 HSC 激活过程中的信号途径是治疗肝纤维化的热点。MAPK 影响着细胞的活化凋亡,介导炎症反应的发生,在人体多种纤维化的形成中起着重要作用,MAPK 与肝纤维化的发生发展同样密切相关<sup>[15-19]</sup>。MAPK 是一组可被各种细胞外炎症因子、激素、细胞毒物质、细胞应激等激活的蛋白激酶。MAPK 和细胞表面的受体与胞外信号关联在一起,产生一系列生物学反应,影响着细胞多方面的生理病理功能。MAPK 通路主要包括:c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、细胞外信号调节激酶(ERK)和 p38 丝裂酶原蛋白激酶(p38 MAPK)、BMK1/ERK5 通路 4 个亚族,其中以 ERK1/2 通路、p38 通路、JNK 通路最为重要。p38MAPK 影响着致炎与抗炎因素的平衡,影响调节炎症的过程,导致肝纤维化<sup>[20]</sup>。p-p38/p38 的表达可随肝纤维化阶梯式加重而升高,并转位入核进一步调控下游因子磷酸化,促进其目的基因表达,抑制 p38 MAPK 活性可阻断 HSC 活化,影响 HSC 的增殖<sup>[21-22]</sup>。ERK 是经典的 MAPK 信号转导途径,有 ERK1 和 ERK2 两个亚族,磷酸化后移位入核,调控 E1k-1 基因表达,在 HSC 增殖

和趋化中起正调节作用<sup>[23]</sup>。JNK 是调节细胞周期、活化、凋亡、应激的重要途径之一,能够活化 HSC 的细胞增殖,HSC 增殖明显的同时其 JNK 活性增强,阻断 JNK 则明显抑制了 HSC 增殖<sup>[24]</sup>。

本研究采用 Western blotting 法检测大鼠肝脏中 MAPK 信号通路中 ERK1/2、JNK1/2、p38 相关蛋白及其磷酸化蛋白表达情况,定量分析结果以 p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, p-p38/p38 值表示,结果显示,与对照组比较,模型组大鼠肝组织中 p38、ERK1/2、JNK1/2 的磷酸化蛋白表达显著升高,各治疗组均有下调,其中以扶肝化纤汤高剂量组下调最明显,表明扶肝化纤汤的抗肝纤维化作用机制之一,可能和其下调 p38、ERK1/2、JNK1/2 的磷酸化蛋白表达,抑制 MAPK 的激活有关。但肝纤维化病因病机复杂,介导的细胞信号通路众多,而中药复方制剂往往又具有多层面、多靶点、多途径的作用特性,因此,扶肝化纤汤抗纤维化的作用机制还需进一步研究探讨。

#### 参考文献

- [1] Tsukada S, Parsons C J, Rippe R A. Mechanisms of liver fibrosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 364(1/2): 33-60.
- [2] Sun M, Kisseleva T. Reversibility of liver fibrosis [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015, 39(1): 60-63.
- [3] Seifert L, Deutsch M, Alothman S, et al. Dectin-1 regulates hepatic fibrosis and hepatocarcinogenesis by suppressing TLR4 signaling Pathways [J]. *Cell Rep*, 2015, 13(9): 1909-1921.
- [4] 程明亮,周明玉. 中医药防治肝纤维化 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(12): 2761-2765.
- [5] 张继红,邓 为,石孟琼,等. 珠子参皂苷对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5): 73-78.
- [6] 孙媛媛,赵玉洁,赵金畅,等. 人参皂苷抗肝纤维化作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1912-1915.
- [7] 崔峻松,谭芊任,肖政华. 扶肝化纤汤治疗慢性乙型肝炎病毒性肝炎肝纤维化临床研究 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(4): 131-133.
- [8] 程明亮,杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [9] 徐 珊,包剑锋,周 敏,等. 肝纤维化病证结合模型的研制 [J]. 中国中医药科技, 2009, 16(2): 81-83.
- [10] 彭 岳,苗维纳,赵铁建,等. 中医病证结合肝纤维化动物模型的研究概况 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(27): 4053-4059.
- [11] 周玉平. 肝纤维化病证结合动物模型评析 [J]. 时珍国

- 医国药, 2011, 22(6): 1504-1505.
- [12] 肖政华, 王 敏. 从脾论治肝硬化腹水的临证探析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(12): 1358-1359.
- [13] 王 刚, 曹后康, 曹秋妍, 等. 叶下珠对四氯化碳诱导肝纤维化大鼠的保护作用及机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4): 104-108.
- [14] 邓 莉, 申宝德, 刘 园, 等. 复方鳖甲软肝片减方对 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化的影响及机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1371-1378.
- [15] 钟显飞, 蒋明德, 马洪德, 等. JNK 信号通路对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增殖的影响 [J]. 西南国防医药, 2004, 14(4): 350-353.
- [16] Wang J N, Li L, Li L Y, *et al.* Emerging role and therapeutic implication of Wnt signaling pathways in liver fibrosis [J]. *Gene*, 2018, doi: 10.1016/j.gene.2018.06.053.
- [17] Su Q, Kumar V, Sud N, *et al.* MicroRNAs in the pathogenesis and treatment of progressive liver injury in NAFLD and liver fibrosis [J]. *Adv Drug Del Rev*, 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.01.009.
- [18] Xia Y, Yu B, Ma C, *et al.* Yu Gan Long reduces rat liver fibrosis by blocking TGF- $\beta$ 1/Smad pathway and modulating the immunity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.081.
- [19] Shu M, Huang D D, Hung Z A, *et al.* Inhibition of MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways alleviate carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver fibrosis in Toll-like receptor 5 (TLR5) deficiency mice [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2016, 471(1): 233-239.
- [20] Chen L, Guo Y Z, Li A D, *et al.* Knockdown of astrocyte elevated gene-1 inhibits activation of hepatic stellate cells [J]. *Dig Dis Sci*, 2016, 61(7): 1961-1971.
- [21] Salvatore P, Concetta B. Feeding the Hedgehog: A new meaning for JNK signalling in liver regeneration [J]. *J Hepatol*, 2018, 69(3): 572-574.
- [22] 田代华. 黄帝内经 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [23] 傅应亚, 黎友伦. JNK 信号通路与细胞凋亡 [J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(3): 281-283.
- [24] 郑人源, 蒋明德, 梅浙川, 等. 肝星状细胞增殖与 P38 丝裂原活化蛋白激酶信号传导通路的关系 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20): 3711-3714.