

• 药理与临床 •

睡莲花总黄酮对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用

郭羽轩¹, 董惠娟², 刘涛², 姚雨含³, 叶倩云², 赵军^{3*}

1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

2. 新疆医科大学公共卫生学院, 新疆 乌鲁木齐 830011

3. 新疆药物研究所维吾尔药重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830004

摘要:目的 研究睡莲花总黄酮(NCTF)对四氯化碳(CCl₄)诱导大鼠肝纤维化的防治作用。方法 Wistar大鼠随机分为对照组、模型组、NCTF低、中、高剂量(50、100、200 mg/kg)组和秋水仙碱(0.2 mg/kg)组。除对照组大鼠sc花生油外,其余各组分别于大鼠背部sc 50% CCl₄花生油溶液(0.1 mL/100 g),2次/周,连续12周。除对照组和模型组ig 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液外,其余各组于造模第2天按设定剂量ig药物(1.0 mL/100 g),1次/d,连续12周。实验结束后,收集大鼠血样、肝脏及脾脏组织,测定大鼠肝脾指数;通过HE染色和Masson染色观察肝组织病理变化;通过免疫组化法检测肝组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达;通过全自动生化仪检测大鼠血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)水平;通过生化法检测丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)和一氧化氮(NO)水平;通过放射免疫分析法检测血清透明质酸(HA)水平;采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清层粘连蛋白(LN)、III型前胶原(PCIII)、IV型胶原(CIV)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)和白介素-6(IL-6)水平;采用碱水解法处理肝组织后测定其羟脯氨酸(Hyp)水平。结果 与对照组相比,模型组大鼠精神萎靡、肝脾指数增大,肝组织炎性细胞浸润并呈现出明显的纤维化,血清ALT、AST、ALP、HA、LN、PCIII、CIV、MDA和NO水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01),血清TP、ALB、GSH和SOD水平显著下降($P<0.01$);肝组织 α -SMA和Hyp表达明显上调($P<0.01$)。与模型组比较,NCTF组能明显改善大鼠状态和肝脾指数($P<0.05$ 、 0.01),改善大鼠肝组织病理学损伤和纤维化;显著降低大鼠血清ALT、AST、ALP、MDA、NO水平及大鼠肝组织 α -SMA、Hyp的表达($P<0.05$ 、 0.01),显著提高血清TP、ALB、GSH、SOD水平($P<0.05$ 、 0.01);并能显著抑制HA、LN、PCIII、CIV型蛋白表达及TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的水平($P<0.05$ 、 0.01)。结论 NCTF具有较好的抗肝纤维化作用,其作用机制与抗氧化、调节胶原合成、抑制促炎因子表达相关。

关键词: 雪白睡莲;总黄酮;肝纤维化;四氯化碳;抗氧化;胶原合成

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)19-4983-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.017

Effects of total flavonoids from *Nymphaea candida* on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in ratsGUO Yu-xuan¹, DONG Hui-juan², LIU Tao², YAO Yu-han³, YE Qian-yun², ZHAO Jun³

1. College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

2. College of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

3. Xinjiang Key Laboratory for Uighur Medicine, Institute of Materia Medica of Xinjiang, Urumqi 830004, China

Abstract: Objective To investigate the preventive effect of total flavonoids from *Nymphaea candida* (NCTF) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis in rats. **Methods** Wistar rats were randomly divided into control group, model group, NCTF groups (50, 100, 200 mg/kg) and colchicine group (0.2 mg/kg). Rats were subcutaneously injected with 50% CCl₄ peanut oil solution (0.1 mL/100g,

收稿日期: 2020-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81760631);新疆维吾尔自治区公益性科研院所科研基本业务费资助项目(ky2019104)

作者简介: 郭羽轩(1994—),女,陕西西安人,硕士研究生,研究方向为药食兼用植物的研究与开发。

Tel: 13991633092 E-mail: 892727122@qq.com

*通信作者 赵军 Tel: (0991)2320227 E-mail: zhaojun21cn@163.com

twice a week for 12 weeks) to induce hepatic fibrosis. In addition to control and model group given with 0.5% CMC-Na, the other groups were intragastrically administered with drugs (1.0 mL/100 g, once a day for 12 weeks), all rats were put to death. Blood, hepatic and splenic tissue were collected to detect liver indexes. Pathological histology observation by Masson and HE staining were performed for other hepatic tissues. The expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in hepatic tissue was analyzed by immunohistochemical technique. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total protein (TP) and albumin (ALB), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and nitric oxide (NO) were determined by automatic biochemical analyzer. The levels of serum laminin (LN), type III procollagen (PCIII), type IV collagen (CIV), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) were measured by enzyme-linked immunoassay assay (ELISA). Serum hyaluronic acid (HA) was detected by radioimmunoassay. Hepatic tissue hydroxyproline (Hyp) was measured by spectrophotometric method. **Result** Compared with the control group, the rats showed energielos, liver and spleen index of those were increased, as well as inflammatory cell infiltration and obvious fibrosis of hepatic tissue were appeared in the model group; The levels of ALT, AST, ALP, HA, LN, PCIII, CIV, MDA, NO, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum in model group were increased significantly ($P < 0.05, 0.01$); The levels of TP, ALB, GSH and SOD in serum were decreased significantly ($P < 0.01$); The expressions of α -SMA and Hyp in hepatic tissue were significantly improved ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of ALT, AST, ALP, MDA, NO in serum in NCTF group were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$); The levels of HA, LN, PC III, CIV, TNF- α , IL-1 β and IL-6 were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$); The levels of TP, ALB, GSH and SOD were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$); The expressions of α -SMA and Hyp in hepatic tissue were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the model group, the pathological damage of hepatic tissue was significantly improved, the degeneration and necrosis of liver cells in rat were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** NCTF has a better anti-hepatic fibrosis effect, its mechanism is related to antioxidant, regulation of collagen synthesis and inhibition of the proinflammatory factors expression.

Key words: *Nymphaea candida* C. Presl; total flavonoids; hepatic fibrosis; carbon tetrachloride; antioxidation; collagen synthesis

肝纤维化是一种严重危害人类身体健康的疾病,若得不到及时、有效的治疗,最终会发展为不可逆转的肝硬化,甚至肝癌^[1]。睡莲花是睡莲科睡莲属多年生水生草本植物雪白睡莲 *Nymphaea candida* C. Presl 的干燥花蕾,主产于我国新疆的博湖、伊犁和阿勒泰地区^[2]。睡莲花是维吾尔药抗肝炎复方制剂炎效迪娜尔糖浆的主要组成药材之一,《中华本草维吾尔药卷》中记载睡莲花具有清热补心、降热养肝、消炎止咳之功效,用于心虚、肝虚、热性感冒等疾病的治疗^[3-4]。已有多篇文献报道,睡莲提取物具有较好的肝保护作用^[5-6]。多酚和黄酮类化合物是睡莲花的特征性化学成分^[7]。前期研究表明,富含黄酮的睡莲花总黄酮(NCTF)对四氯化碳(CCl₄)致急性肝损伤有较好的防治作用^[8]。NCTF的主要有效成分烟花苷和睡莲酚(isostrictiniin)也对小鼠急性化学性和免疫性肝损伤均有较好的保护作用^[9-11]。因此,基于前期研究结果,本研究通过CCl₄诱导的大鼠肝纤维化模型,进一步探讨了NCTF的抗肝纤维化作用,以期为该有效部位及睡莲花的深入开发提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF级Wistar雄性大鼠68只,体质量180~220 g,由新疆医科大学动物中心提供,动物质量合格证

号 No.65000700001098; 许可证号 SCXK(新)2018-0002。动物饲养环境为室温20~24℃,相对湿度50%~60%,每日光照12 h,大鼠分笼饲养,自由摄食饮水,均用标准饲料,每周称定质量1次,大鼠适应性饲养1周后使用。

1.2 药品与试剂

睡莲花药材于2018年9月购自新疆维吾尔药业有限公司,由新疆药物研究所何江副研究员鉴定为雪白睡莲 *Nymphaea candida* C. Presl 的干燥花蕾。秋水仙碱(西双版纳药业有限公司,批号H53021369);花生油(山东鲁花集团);四氯化碳(CCl₄,天津市致远化学试剂有限公司);天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司); α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、IgG-HRP多聚体抗体(上海艾博抗贸易有限公司);IV型胶原(CIV)、III型前胶原(PC III)和层连蛋白(LN)检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);4%多聚甲醛、Masson三色染色液和羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);总超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和一氧化氮(NO)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-6

(IL-6) 酶联免疫分析试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

Caris200 全自动化学发光免疫分析仪 (厦门优迈科医学仪器); Varioskan Flash 酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司); HZQ-C 全湿恒温培养摇床 (上海一恒科学仪器有限公司); DK-8D 电热恒温水浴锅 (江苏金怡仪器科技有限公司); HC-3018R 高速冷冻离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); BS124S 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); KDC-2046 低速冷冻离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司); MLS-3750 高压灭菌器 (日本三洋公司); FM-40 制冰机 (北京长流科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 NCTF 的制备

将睡莲花药材粉碎后, 用 12 倍量 70%乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 减压浓缩至浸膏。浸膏以水混悬并通过大孔树脂吸附后, 分别以水、30%乙醇和 50%乙醇洗脱, 收集 50%乙醇洗脱液, 减压浓缩得大孔树脂洗脱物。该洗脱物上聚酰胺树脂柱后, 以水和 70%乙醇洗脱, 收集 70%乙醇洗脱液, 浓缩, 干燥, 即得 NCTF。以烟花苷为对照品, NCTF 经紫外分光光度计测定, 总黄酮平均质量分数为 61.11%。

2.2 分组、造模及给药

大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、NCTF 低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组和秋水仙碱 (0.2 mg/kg) 组, 对照组和模型组各 10 只, 其余每组 12 只。自造模之日起, 称取 0.5、1.0、2.0 g NCTF 粉末, 分别溶于 100 mL 0.5%羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液中, 用于 NCTF 低、中、高剂量组; 称取 2.0 mg 秋水仙碱溶于 100 mL 0.5% CMC-Na 溶液中, 用于秋水仙碱 (0.2 mg/kg) 组。除对照组大鼠 sc 花生油外, 其余各组分别于大鼠背部 sc 50% CCl₄ 花生油溶液 (0.1 mL/100 g), 2 次/周, 连续 12 周。各给药组在造模第 2 天按设定剂量 (1.0 mL/100 g) ig 药物, 对照组和模型组 ig 等体积 0.5% CMC-Na 溶液, 1 次/d, 连续 12 周。实验期间大鼠自由摄食饮水, 每天观察各组大鼠活动情况。大鼠末次给药后, 禁食不禁水 24 h, 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 打开腹腔, 腹主动脉穿刺取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清于 -80 °C 低温冰箱保存待检。采集血样后处死大鼠, 完整取出肝脏和脾脏并用滤纸

拭干, 置于电子天平上测量肝质量和脾质量, 计算肝 (脾) 脏指数。同时剪取肝组织进行常规病理学检查, 剩余肝脏用液氮速冻, 于 -80 °C 保存待检。

肝 (脾) 脏指数 = 肝 (脾) 脏质量 / 体质量

2.3 肝功能及肝纤维化指标检测

采用全自动生化仪检测血清中 ALT、AST、ALB、ALP 和 TP 水平; 通过放射免疫分析法检测血清 HA 水平, ELISA 法检测血清 LN、PCIII、CIV、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。酶标仪测定大鼠血清中 MDA、SOD、GSH 和 NO 水平。

2.4 肝组织 Hyp 的测定

取 1.0 g 大鼠肝脏组织, 低温条件下剪碎, 于匀浆器中研磨成浆, 加 9 倍冰生理盐水制成 10%肝匀浆液, 离心取上清液, 按试剂盒说明测定大鼠肝匀浆中 Hyp 水平。

2.5 病理组织学检查

剪取肝组织左叶, 以 4%多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 厚 5 μ m, 分别进行 HE 染色和胶原特异性纤维 Masson 染色, 于光学显微镜下观察肝组织病理变化。对 Masson 染色结果进行半定量分析, 肝纤维化程度分级标准^[12]为: 0 级, 无纤维化; 1 级, 轻度纤维化, 纤维化沉积仅位于小叶中央, 无纤维间隔形成; 2 级, 中度纤维化, 纤维沉积扩散至小叶中央之外, 汇管区纤维间隔形成, 但未至小叶边缘; 3 级, 重度纤维化, 纤维沉积扩散至小叶边缘, 广泛的汇管区纤维间隔形成; 4 级, 肝硬化。

2.6 免疫组化法检测肝组织中 α -SMA 表达

肝组织切片脱蜡后, 以 3% H₂O₂ 去除内源性过氧化物酶, 用 0.01 mol/L 枸橼酸抗原修复液对组织抗原进行微波修复, 冷却到室温后, 加一抗 α -SMA 封闭过夜后, 滴加二抗 (IgG-HRP 多聚体抗体), 室温孵育 1~2 h。PBS 液冲洗后, DAB 显色, 中性树脂胶封片, 于光镜下观察。

2.7 统计学分析

应用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 各组数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料采用方差分析, 等级资料采用 Ridit 分析。

3 结果

3.1 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠体质量和脏器指数的影响

对照组大鼠毛色光滑, 精神状态较好, 体质量在实验期间不断增长。与对照组相比, 模型组大鼠体毛明显变黄, 精神萎靡不振, 食欲下降, 体质量

明显减轻,实验过程中有 2 只大鼠死亡。NCTF 低、中剂量组和秋水仙碱组各有 1 只大鼠死亡,其余给药组大鼠毛色、精神状态和摄食等明显优于模型组。

如表 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠体质量减轻、肝脏指数和脾脏指数增加,差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。与模型组比较,NCTF 高剂量组能显著降低大鼠肝脏指数 ($P<0.01$); NCTF 低、中、高剂量组和秋水仙碱组均能显著降低肝纤维化大鼠的脾脏指数 ($P<0.05$ 、 0.01),并能显著增加大鼠体质量 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果表明 NCTF 能够显著改善 CCl₄ 导致的肝脾充血、肿大。

3.2 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠血清生化指标的影响

如表 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 ALT、AST、ALP 水平显著增加 ($P<0.01$), TP 和 ALB

水平明显下降 ($P<0.01$),说明 CCl₄ 成功诱导大鼠肝损伤。与模型组相比,NCTF 低、中、高剂量组和秋水仙碱组均能明显降低大鼠血清中 ALT、AST、ALP 水平 ($P<0.05$ 、 0.01),并能明显提高血清 TP 和 ALB 水平 ($P<0.01$),且具有剂量相关性。结果表明 NCTF 具有较好的保护肝细胞、改善肝功能作用。

3.3 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠血清中 HA、LN、PCIII、CIV 水平的影响

由表 3 可得,与对照组相比,模型组大鼠血清中 HA、LN、PCIII、CIV 水平显著增加,差异具有统计学意义 ($P<0.01$),说明 CCl₄ 成功诱导大鼠肝纤维化。与模型组相比,NCTF 低、中、高剂量组和秋水仙碱组均能明显降低大鼠血清中的 HA、LN、PCIII、CIV 水平 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果提示 NCTF 具有明显的抗肝纤维化作用。

表 1 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝脾指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of NCTF on hepatosplenic index in CCl₄-induced liver fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g		肝脏指数	脾脏指数
			实验前	实验后		
对照	10	—	246.80±7.38	383.60±15.69	2.29±0.05	0.154±0.004
模型	8	—	251.58±2.62	292.50±19.82 ^{##}	3.37±0.16 ^{##}	0.246±0.021 ^{##}
秋水仙碱	11	0.2	255.92±5.26	350.82±7.73 ^{**}	2.96±0.11 [*]	0.180±0.010 ^{**}
NCTF	11	50	254.17±5.49	344.42±10.07 [*]	3.10±0.17	0.194±0.005 [*]
	11	100	252.58±4.32	357.27±18.72 [*]	3.02±0.10	0.194±0.009 [*]
	12	200	249.25±7.26	370.73±13.85 ^{**}	2.70±0.07 ^{**}	0.189±0.009 [*]

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 table

表 2 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST、ALP、TP 和 ALB 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of NCTF on ALT, AST, ALP, TP and ALB levels in serum of CCl₄-induced liver fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)	TP/(U·L ⁻¹)	ALB/(U·L ⁻¹)
对照	10	—	58.90±10.18	137.10±8.32	121.20±8.25	59.60±1.47	30.50±0.42
模型	8	—	393.25±88.17 ^{##}	703.38±140.49 ^{##}	328.13±21.36 ^{##}	53.13±1.48 ^{##}	26.63±1.12 ^{##}
秋水仙碱	11	0.2	98.18±9.02 ^{**}	197.45±10.83 ^{**}	184.82±14.91 ^{**}	63.00±0.97 ^{**}	31.27±0.43 ^{**}
NCTF	11	50	103.64±27.78 ^{**}	244.55±30.36 ^{**}	255.64±24.46 [*]	58.55±0.89 ^{**}	30.09±0.41 ^{**}
	11	100	68.18±5.58 ^{**}	194.00±10.72 ^{**}	226.45±12.34 ^{**}	59.45±1.10 ^{**}	31.45±0.58 ^{**}
	12	200	64.64±6.41 ^{**}	175.45±8.28 ^{**}	199.55±16.08 ^{**}	61.45±1.01 ^{**}	31.73±0.30 ^{**}

表 3 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠血清中 HA、LN、PCIII、CIV 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of NCTF on HA, LN, PCIII and CIV levels in serum of CCl₄-induced liver fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg ⁻¹)	HA/(ng·mL ⁻¹)	LN/(ng·mL ⁻¹)	PCIII/(ng·mL ⁻¹)	CIV/(ng·mL ⁻¹)
对照	10	—	80.76±5.17	115.53±4.70	1.12±0.10	5.84±0.05
模型	8	—	209.37±28.14 ^{##}	168.21±15.66 ^{##}	4.07±0.65 ^{##}	8.30±0.99 [#]
秋水仙碱	11	0.2	97.61±5.08 ^{**}	115.86±5.18 ^{**}	1.18±0.13 ^{**}	6.41±0.20 [*]
NCTF	11	50	124.04±6.21 ^{**}	134.03±3.73 [*]	1.64±0.27 ^{**}	6.31±0.15 [*]
	11	100	98.49±5.12 ^{**}	129.67±4.43 [*]	1.42±0.20 ^{**}	5.99±0.17 [*]
	12	200	91.89±7.44 ^{**}	120.64±4.59 ^{**}	1.20±0.14 ^{**}	6.02±0.10 [*]

3.4 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织 Hyp 水平的影响

由表 4 可见, 与对照组相比较, 模型组大鼠肝组织 Hyp 水平明显增加 ($P<0.01$), CCl₄ 导致大鼠肝纤维化的产生。与模型组相比, NCTF 高剂量组和秋水仙碱组可显著降低大鼠肝组织 Hyp 水平 ($P<0.05$)。结果说明 NCTF 具有降低纤维化大鼠肝组织中的胶原纤维表达的功能。

3.5 NCTF 对肝纤维化大鼠血清 SOD、MDA、GSH 和 NO 水平的影响

如表 5 所示, 与对照组相比较, 模型组大鼠血清 MDA、NO 水平显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01), SOD 和 GSH 水平明显减少 ($P<0.01$)。与模型组相比, NCTF 中、高剂量组和秋水仙碱组均能明显降低 MDA、NO 水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 并显著提高大鼠血清 SOD 和 GSH 水平 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果说明 NCTF 可通过抗氧化活性发挥保护肝的作用。

表 5 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠血清 SOD、MDA、GSH、NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	GSH/(mg·L ⁻¹)	NO/(μmol·L ⁻¹)
正常	10	—	336.27±13.03	5.48±0.33	8.63±0.61	8.62±1.32
模型	8	—	285.54±9.16 ^{##}	8.21±0.93 [#]	5.09±0.44 ^{##}	26.24±5.57 ^{##}
秋水仙碱	11	0.2	324.75±5.16 ^{**}	6.22±0.51 [*]	8.02±0.66 ^{**}	9.28±2.05 ^{**}
NCTF	11	50	302.69±8.42	6.77±0.44	5.63±0.38	13.41±3.06
	11	100	314.15±5.43 [*]	6.17±0.44 [*]	6.34±0.34 [*]	11.90±3.02 [*]
	12	200	321.06±3.05 ^{**}	5.58±0.55 [*]	8.50±0.26 ^{**}	9.78±1.37 ^{**}

表 6 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠血清中 IL-1β、TNF-α、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
正常	10	—	125.16±6.86	646.93±15.77	100.54±4.66
模型	8	—	256.81±3.98 ^{##}	1 262.79±27.02 ^{##}	241.04±2.77 ^{##}
秋水仙碱	11	0.2	143.70±5.65 ^{**}	797.48±17.59 ^{**}	127.87±6.05 ^{**}
NCTF	11	50	197.38±4.90 ^{**}	1 121.20±26.21 ^{**}	200.05±3.94 ^{**}
	11	100	171.90±4.59 ^{**}	977.33±15.34 ^{**}	176.60±6.89 ^{**}
	12	200	163.64±4.82 ^{**}	928.61±19.21 ^{**}	160.59±3.50 ^{**}

3.7 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织病理变化的影响

HE 染色法是判断炎症细胞浸润、细胞脂肪变性、坏死等肝损伤状态的常用病理检测手段。如图 1 所示, 对照组大鼠肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝小叶结构完整, 肝细胞排列整齐无胶原纤维增生。模型组大鼠肝细胞排列紊乱, 纤维结缔组织增生, 汇管区炎性细胞及坏死细胞增多, 增多的胶原纤维形成条状纤维间隔, 肝脏门束区出现增厚的纤维隔板, 可见假小叶形成。NCTF 低、中、

3.6 NCTF 对肝纤维化大鼠血清 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 水平的影响

如表 6 所示, 与对照组相比较, 模型组大鼠血清 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著提高 ($P<0.01$)。与模型组相比较, NCTF 低、中、高剂量组均能显著降低 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平 ($P<0.01$)。结果说明 NCTF 可通过调节免疫, 抑制促炎细胞因子的表达而发挥抗肝纤维化的作用。

表 4 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织中 Hyp 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of NCTF on Hyp level in hepatic tissue of CCl₄-induced liver fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Hyp/(μg·g ⁻¹)
对照	10	—	248.65±23.49
模型	8	—	390.36±33.66 ^{##}
秋水仙碱	11	0.2	286.10±21.83 [*]
NCTF	11	50	323.63±16.03
	11	100	316.85±19.70
	12	200	299.46±16.42 [*]

高剂量组和秋水仙碱组对纤维化程度均有不同程度的改善, 仅纤维隔内可见炎细胞浸润。

Masson 染色法常用于鉴别胶原纤维和肌纤维的, 可准确判断肝组织纤维化的程度。如图 2 和表 7 所示, 对照组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞排列整齐, 仅于汇管区血管周围有少许胶原纤维染色, 无明显胶原增生。模型组大鼠肝脏组织中纤维明显增多, 胶原纤维沿汇管区或炎症坏死区向外延伸, 形成薄厚不一的纤维间隔, 多位于汇管区和血管周围, 分割包围肝小叶, 有明显的结节样假小叶形成。

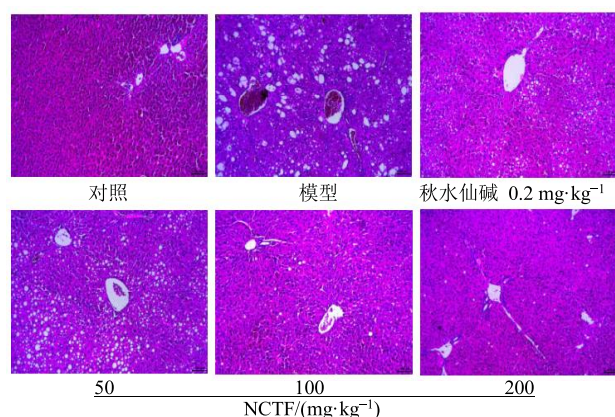


图 1 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of NCTF on pathological changes in hepatic tissue of CCl₄-induced liver fibrosis rats (HE, ×100)

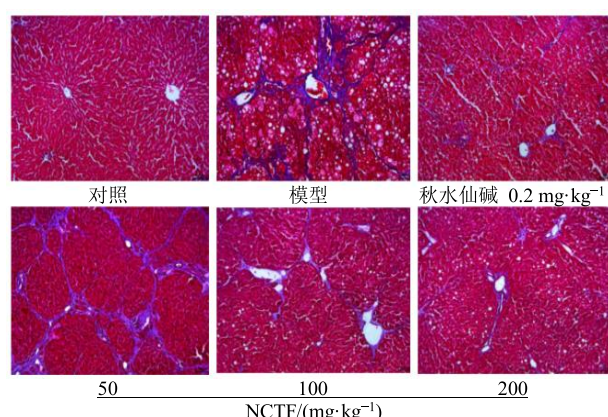


图 2 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织病理变化的影响 (Masson, ×100)

Fig. 2 Effects of NCTF on pathological changes in hepatic tissue of CCl₄-induced liver fibrosis rats (Masson, ×100)

表 7 NCTF 对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化分级变化程度的影响

Table 7 Effect of NCTF on graded liver fibrosis in CCl₄-induced liver fibrosis rats

组别	n	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝纤维化分级					P 值
			0	1	2	3	4	
对照	10	—	10	0	0	0	0	
模型	8	—	0	1	1	4	2	#
秋水仙碱	11	0.2	2	6	2	1	0	*
NCTF	11	50	1	5	3	2	0	*
	11	100	1	5	4	1	0	*
	12	200	2	6	3	1	0	*

NCTF 低、中、高剂量组能不同程度地减少胶原纤维组织增生及纤维化程度, 其中尤以高剂量组作用显著, 效果接近秋水仙碱组。

3.8 NCTF 对肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA 表达的影响

由图 3 和表 8 可知, 对照组大鼠肝组织中少见 α -SMA 棕色阳性表达。模型组大鼠 α -SMA 阳性表达

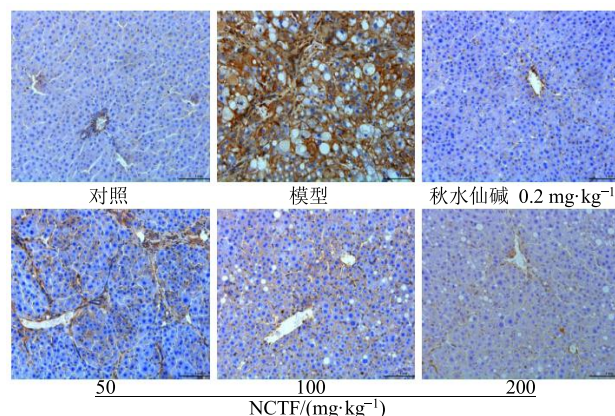


图 3 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 3 Effect of NCTF on α -SMA expression in hepatic tissue of CCl₄-induced liver fibrosis rat (Immunohistochemistry, ×200)

表 8 NCTF 对 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 8 Effect of NCTF on α -SMA expression in hepatic tissue of CCl₄-induced liver fibrosis rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(mg·kg ⁻¹)	α -SMA
对照	10	—	1.66 ± 0.09
模型	8	—	17.63 ± 0.36 ^{##}
秋水仙碱	11	0.2	3.96 ± 0.38 ^{**}
NCTF	11	50	8.69 ± 1.09 ^{**}
	11	100	6.97 ± 0.29 ^{**}
	12	200	4.09 ± 0.40 ^{**}

主要位于间质细胞和胞浆中, 呈现明显的棕色; 与对照组相比, 其表达量明显上升 ($P < 0.01$), 肝组织纤维化程度明显。与模型组相比, NCTF 低、中、高剂量组和秋水仙碱组大鼠肝组织细胞间质中 α -SMA 的表达量显著减少 ($P < 0.01$)。

4 讨论

CCl₄ 是一种典型的肝毒性药物, 单剂量给予 CCl₄ 可导致脂肪变性、坏死的肝细胞损伤, 长期给药可导致肝纤维化、肝硬化和肝癌^[13]。CCl₄ 诱导的

肝纤维化动物模型具有耗时短、成模率高及其病理组织学变化与人类肝纤维化相似的特点, 现已被广泛应用于抗肝纤维化天然药物的研究之中。sc CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化简单易行, 但存在死亡率高的缺点^[14]。本实验模型组大鼠在造模第 11、12 周, 分别死亡 1 只; NCTF 低、中剂量组和秋水仙碱组大鼠在实验第 3、7、9 周各死亡 1 只。造模 12 周后, 病理组织学观察显示剩余模型组大鼠肝脏均出现了损伤和纤维化, 血清 ALT、AST、ALP 水平显著升高, ALB、TP 水平明显下降, 肝细胞受损严重。经不同剂量的 NCTF 和秋水仙碱治疗后, 以上血清生化指标及肝组织病理损伤纤维化状况均得到不同程度的改善。同时, NCTF 可逆转 CCl₄ 导致的大鼠血清 NO、脂质过氧化产物 MDA 水平增加和 GSH、SOD 水平降低, 说明抗氧化是 NCTF 保肝作用的机制之一。

肝纤维化的本质是肝脏对各种慢性刺激进行损伤修复反应时, 以胶原蛋白为主要组分的细胞外基质 (ECM) 在肝内大量沉积的病理过程^[15]。肝星状细胞 (HSC) 是肝脏 ECM 的主要来源, HSC 的表型激活和过度增殖是肝纤维化形成过程的关键所在。因此, 抑制 HSC 的活化及增殖、诱导 HSC 凋亡、抑制 ECM 过度沉积可逆转肝纤维化的发展。 α -SMA 是 HSC 激活的标志物, 与 HSC 增殖及肝纤维化程度呈正相关^[16]。NCTF 干预后, α -SMA 的阳性表达较模型组明显降低, 说明 HSC 的激活可被 NCTF 抑制, 肝纤维化得到改善。

胶原所特有的氨基酸成分 Hyp 是其降解产物, 它的含量可反映胶原代谢的变化情况, 且与肝纤维化程度相平行^[17]。NCTF 降低了 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化模型肝组织中 Hyp 水平, 高剂量组 (200 mg/kg) 作用尤为显著。血清 PCIII 是 III 型前胶原在细胞外形成原胶原前, 被相关酶切下后进入血液循环的氨基端尾肽, 故被视为纤维化形成的血清学指标。CIV 胶原是反映基底膜变化的可靠指标, 随慢性肝炎的阶段性病变, CIV 含量逐步升高^[18]。HA 水平可反映肝纤维化的程度, 肝脏内皮细胞是清除血液中 HA 的主要场所。LN 在纤维化中的作用主要是连接基质中的大分子成分, 共同参与基膜的形成及肝血窦的毛细血管化。肝纤维化时 LN 的浓度明显升高^[19]。临床实践表明, PCIII、CIV、HA 和 LN 水平与肝组织炎症活动及纤维化均呈正相关^[20-21]。本研究发现模型组大鼠血清 PCIII、CIV、HA 和 LN

水平明显升高, 说明 CCl₄ 引起了大鼠肝组织的损伤及纤维化。给予 NCTF 干预后, 大鼠血清 PCIII、CIV、HA 和 LN 水平均有显著下降, 说明 NCTF 具有阻抑纤维化的作用。CCl₄ 诱导的肝损伤可造成促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的增加, 这些细胞因子的不断刺激又可进一步加重肝损伤, 形成恶性循环, 导致肝纤维化发生发展。与模型组相比较, 不同剂量的 NCTF 均可显著降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。结果说明 NCTF 可通过减少促炎细胞因子的表达而发挥抗肝纤维化的作用。

综上所述, NCTF 具有较好的抗肝纤维化作用, 其作用机制与抗氧化、抑制脂质过氧化、调节胶原合成、减少促炎因子表达相关。本研究为睡莲花药效物质基础的揭示及其富含黄酮有效部位的开发利用提供了科学参考。

参考文献

- [1] 刘立新, 石永强. 药物所致肝纤维化动物模型研究进展 [J]. 中国药物与临床, 2009, 9(9): 851-853.
- [2] 刘勇民. 维吾尔药志 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编辑委员. 中华本草维吾尔药卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [4] 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维吾尔药分册 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999.
- [5] 王雪, 杨巧丽, 赵军, 等. 睡莲花提取物对小鼠实验性肝损伤的保护作用研究 [J]. 中药材, 2015, 38(1): 139-142.
- [6] Bhandarkar M R, Khan A. Antihepatotoxic effect of *Nymphaea stellata* willd against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in albino rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 91(1): 61-64.
- [7] 赵军, 徐芳, 吉腾飞, 等. 睡莲属植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(1): 142-147.
- [8] 张石蕾, 由淑萍, 刘涛, 等. 睡莲花总黄酮对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的防治作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(12): 2017-2020.
- [9] Zhao J, Zhang S L, You S P, et al. Hepatoprotective effects of nicotiflorin from *Nymphaea candida* against concanavalin A-induced and D-galactosamine-induced liver injury in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 587.
- [10] 麦尔旦·吐尔逊麦麦提, 刘涛, 李晨阳, 等. 睡莲花 isostrictiniin 对 CCl₄ 致小鼠急性肝损伤防护作用及其体外抗氧化活性研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(3): 321-325.

- [11] Zhao J, Tuersunmaimaiti M, Ji T F, *et al.* Hepatoprotective activity of isostrictinin from *Nymphaea candida* on Con A-induced acute liver injury in mice [J]. *Nat Prod Res*, 2019, doi: 10.1080/14786419.2019.1622105.
- [12] 陈小亮, 李俊, 邓子煜, 等. 苦参素对肝纤维化大鼠肝脏 TGF- β 1 的调节作用 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(6): 761-764.
- [13] 张磊, 李俊, 朱鹏里, 等. 四氯化碳诱导大鼠肝纤维化进展期和恢复期模型的建立 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(12): 1757-1760.
- [14] 金俊杰, 钟鸣, 余胜民, 等. 穿破石水提取物对四氯化碳致大鼠肝纤维化的治疗作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 258-263.
- [15] Zhou W C, Zhang Q B, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis [J]. *World J Gastroentero*, 2014, 20(23): 7312-7324.
- [16] Pradere J, Kluwe J, Minicis S, *et al.* Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice [J]. *Hepatology*, 2013, 58(4): 1461-1473.
- [17] Zheng J F, Liang L J, Wu C X, *et al.* Transplantation of fetal liver epithelial progenitor cells ameliorates experimental liver fibrosis in mice [J]. *World J Gastroentero*, 2006, 12(45): 7292-7298.
- [18] 邵祥强, 肖华胜. 肝纤维化发病机制与临床诊断的研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(3): 268-274.
- [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] 程红春. 血清 IV-C 水平检测对肝病患者肝纤维化的诊断价值 [J]. 实用医药杂志, 2014, 31(7): 618.
- [21] Attallah A M, Mosa T E, Omran M M, *et al.* Immunodetection of collagen types I, II, III and IV for differentiation of liver fibrosis stages in patients with chronic HCV [J]. *J Immunoass Immunoch*, 2007, 28(2): 155-168.