

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.07.002

探究壮方柔肝化纤颗粒对肝纤维化大鼠肝组织病理影响机制*

张文富¹ 吴珊珊² 戴 铭^{3,4} 吕建林^{1,5} 黄晶晶^{1,5} 李晓龙⁶ 王振常^{2,5Δ}

(1 广西中医药大学第一附属医院 广西 南宁 530023; 2 广西国际壮医医院 广西 南宁 530201;

3 广西中医药大学 广西 南宁 530299; 4 广西中医基础重点实验室 广西 南宁 530299;

5 广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室 广西 南宁 530299; 6 广西医科大学 广西 南宁 530021)

摘要 目的:探究壮方柔肝化纤颗粒对肝纤维化大鼠肝组织病理影响机制。**方法:**选取 80 只雄性 Wistar 大鼠随机将其平均分成正常对照组、病理模型组、柔肝化纤颗粒低、中、高剂量组,每组各 16 只。四氯化碳复合因素造模,观察记录大鼠肝脏形态,采用 HE 染色、Masson 染色观察大鼠肝组织和胶原纤维变化,检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)指标数值,分析大鼠肝组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、羟脯氨酸(HYP)、超氧化物歧化酶(SOD)与丙二醛(MDA)的含量。**结果:**柔肝化纤颗粒低、中、高剂量组大鼠肝细胞变性、坏死及纤维化组织增生程度均较病理模型组明显减轻。柔肝化纤颗粒低、中、高剂量组血清 ALT、AST 指标数值与肝组织中 HYP、MDA 指标水平较病理模型组呈现剂量依赖性降低($P<0.001$),而柔肝化纤颗粒高剂量组 GSH-Px、SOD 的指标含量显著高于病理模型组,差异均有统计学意义($P<0.001$)。**结论:**柔肝化纤颗粒可有效改善肝纤维化大鼠的肝细胞损害情况,减轻其肝组织炎症程度,对肝纤维化大鼠有一定的保肝护肝与抗肝纤维化作用,其机制可能与提高 GSH-Px 与 SOD 的水平、降低 HYP 与 MDA 的含量、降低氧化应激水平、调节脂质代谢、减少机体胶原蛋白合成等相关。

关键词:肝纤维化;柔肝化纤颗粒;大鼠;病理;影响机制

中图分类号:R-33;R575.2; R242 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)07-1206-06

The Effect of Zhuangfang Rougan Huaxian Granule on Liver Histopathology in Rats with Liver Fibrosis*

ZHANG Wen-fu¹, WU Shan-shan², DAI Ming^{3,4}, LÜ Jian-lin^{1,5}, HUANG Jing-jing^{1,5},

LI Xiao-long⁶, WANG Zhen-chang^{2,5Δ}

(1 The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530023, China;

2 Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning, Guangxi, 530201, China; 3 Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530299, China; 4 Guangxi Key Laboratory of Basic Research of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530299, China; 5 Guangxi Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine and Transformational

Medicine for High Incidence Infectious Diseases, Nanning, Guangxi, 530299, China;

6 Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of Zhuangfang Rougan Huaxian Granule on liver tissue pathology in rats with liver fibrosis. **Methods:** Eighty male Wistar rats were randomly divided into normal control group, pathological model group, low, medium and high dose groups of Rougan Huaxian Granules, with 16 rats in each group. Carbon tetrachloride compound factors were used to make models, observe and record the morphology of rat liver, observe the changes of rat liver tissue and collagen fibers with HE staining and Masson staining, detect the values of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) indicators, and analyze the contents of glutathione peroxidase (GSH-Px), hydroxyproline (HYP), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in rat liver tissue. **Results:** The degree of liver cell degeneration, necrosis and fibrotic tissue proliferation of rats in the low, middle and high dosage groups of Rougan Huaxian granules were significantly reduced compared with those in the pathological model group. Compared with the pathological model group, the levels of serum ALT, AST, HYP and MDA in liver tissue in the low, middle and high dose groups of Rougan Huaxian Granules decreased in a dose-dependent manner ($P<0.001$), while the levels of GSH-Px and SOD in the high dose group of Rougan Huaxian Granules were significantly higher than those in the pathological model group($P<0.001$). **Conclusion:** Ru-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81960910;81660745;81860839;81760845); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFDA297021; 2020GXNSFAA238020); 戴铭广西名中医工作室建设项目(2022004-005-009)

作者简介: 张文富(1984-),男,副主任医师,博士研究生,硕士生导师,研究方向:肝纤维化、肝硬化及其并发症基础与临床研究,

E-mail: zhang.wf@163.com

Δ 通讯作者: 王振常(1972-),男,主任医师,博士生导师,研究方向:肝纤维化、肝硬化及其并发症基础与临床研究,

E-mail: wangzhenchang924@163.com, 电话: 0771-3133366

(收稿日期:2022-10-23 接受日期:2022-11-18)

gan Huaxian Granule can effectively improve the damage of hepatocytes in rats with liver fibrosis, reduce the degree of inflammation of their liver tissues, and has certain liver protection and anti fibrosis effects on rats with liver fibrosis. Its mechanism may be related to increasing the level of GSH-Px and SOD, reducing the content of HYP and MDA, reducing the level of oxidative stress, regulating lipid metabolism, and reducing the synthesis of collagen in the body.

Key words: Liver fibrosis; Rougan Huaxian Granules; Rats; Pathology; Impact mechanism

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R575.2; R242 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)07-1206-06

前言

肝纤维化是各种致病因素导致肝脏内细胞外基质过度沉积的病理形态学改变,亦是进展为肝硬化甚至肝癌的必经阶段^[1]。研究证实^[2,3],通过早期有效的抗肝纤维化措施干预,能及时阻止慢性肝病向终末期肝病转变,延缓甚至逆转早期肝硬化的进程及延长患者寿命有着至关重要的作用^[4]。中医在抗肝纤维化治疗的诸多研究中显示出了一些优势^[5,6],目前报道的一些中药单体里的活性成分^[7]与中药复方^[8-10]有一定抗肝纤维化的作用,但效果仍不甚理想^[11,12],且目前暂无抗肝纤维化的西药被正式批准上市^[13]。柔肝化纤颗粒是广西中医药大学第一附属医院与广西国际壮医医院目前正在用于治疗肝纤维化的广西名老中医经验方,已经被证实肝纤维化^[14]、肝硬化^[15]、腹水^[16,17]、肝癌^[18]等方面有较好临床疗效,其动员骨髓间充质干细胞归巢治疗肝纤维化与抑制肝纤维化大鼠脂质过氧化物生成的机制已取得了阶段性进展,但对肝组织病理影响机制尚未完全明确。本研究采用 CCl₄ 联合花生油复合溶液联合诱导肝纤维化大鼠,剖析柔肝化纤颗粒对肝组织病理学形态及 GSH-Px、HYP、SOD 与 MDA 水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取体重 100~120 克的 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 80 只,均购买于广西医科大学实验动物研究所。饲养室温度设定值为 19.2℃,相对湿度设定值为 49.8%,压力设定值为 0.9Pa,送风风速目标值为 7.1 m/s,排风风速目标值为 3.6 m/s,换气次数目标值为 70 次/小时,风量比例目标值为 50%,光照时间与黑暗时间对等,常规环境适应性喂养 7 天,期间由大鼠自主饮水与进食。实验动物生产许可证号:SCXK 桂 2020-0003;实验动物使用许可证号:SCXK 桂 2020-0004。

1.2 试剂耗材

环保型浸蜡脱蜡透明液(南昌雨露实验器材有限公司,200801);苏木精染液(南昌雨露实验器材有限公司,191202);脱水剂 I (75%乙醇)(南昌雨露实验器材有限公司,200801);脱水剂 II (85%乙醇)(南昌雨露实验器材有限公司,190604);脱水剂 III (95%乙醇)(南昌雨露实验器材有限公司,191101);脱水剂 IV (无水乙醇)(南昌雨露实验器材有限公司,200901);中性环保速干胶(南昌雨露实验器材有限公司,180502);无毒环保 Masson 三色染色液(北京索莱宝科技有限公司,G1340);无毒 HE 染色液(南昌雨露实验器材有限公司,200901);PBS 缓冲液干粉(北京索莱宝科技有限公司,P1010);山羊血清(Be-

yotime,C0265);EDTA 抗原修复液(50×)(北京索莱宝科技有限公司,C1034);30%过氧化氢(成都金山化学试剂有限公司,20190608);DAB 显色液(中杉金桥,ZLI-9018);CCl₄(中国医药集团上海化学试剂公司,20210218);ALT、AST 检测试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司,20210822,20210912);超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(吉林百奥生物科技有限公司,9054-89-1);丙二醛(MDA)测试盒(吉林百奥生物科技有限公司,XF03124B);GSH-Px 与 HYP 酶联免疫吸附试验试剂盒(吉林百奥生物科技有限公司,9002-05-1,9024-05-2)。

1.3 仪器

赛默飞世尔脱水机(英国赛默飞,Excelsior AS),普通 PCR 仪(Bio-RAD,T100),实时荧光定量 PCR 仪(RT-PCR)(杭州安誉 AGS8830-16),电泳仪(Bio-Rad,Mini-PROTEAN Tetra System),台式高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司),莱卡组织切片机(上海莱卡,2235),莱卡组织摊片机(上海莱卡,HI1210),莱卡组织烤片机(上海莱卡,HI1210),一恒电热干燥箱(上海一恒,DHG-9091A),恒温培养箱(上海申贤,DHP-90052),通风柜(广州汇绿,630),光学显微镜(日本奥林巴斯,BX-53),霉菌培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司,MJ-150-II),酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),化学发光凝胶成像分析系统(日本奥林巴斯,U-RFL-T),全自动生化免疫分析仪(美国强生公司,VITROS 5600 型)。

1.4 柔肝化纤颗粒药液

壮方柔肝化纤颗粒,由生黄芪 45 g、生牡蛎 30 g、老虎姜 20 g、枸杞子 20 g、薏苡仁 45 g、芸红 12 g、地瓜苗 30 g、上甲 30 g、虎杖 20 g、鸡黄皮 15 g、大枣 15 g 组成。所选取的药物为免煎颗粒(江阴天江药业有限公司生产),由广西国际壮医医院药理学部中心药房提供,入库的所有中药依据 2020 年版《中华人民共和国药典》第一部内容鉴定,选取地道药材,符合中国药典标准。

1.5 大鼠分组、造模与给药

采取随机数字表法将选取的 80 只健康 SPF 级雄性 Wistar 大鼠随机分成正常对照组、病理模型组、柔肝化纤颗粒低剂量组(柔肝化纤颗粒-L 组,2 mg/kg)、柔肝化纤颗粒中剂量组(柔肝化纤颗粒-M 组,4 mg/kg)、柔肝化纤颗粒高剂量组(柔肝化纤颗粒-H 组,8 mg/kg),共 5 组,每组各 16 只。本实验研究以 CCl₄ 联合花生油复合因素建立大鼠肝纤维化动物模型,动物造模方法参照马学惠^[19]与吕艳杭^[20]操作法规范操作,除正常对照组以外,其余各组大鼠皮下注射含 40% CCl₄ 联合花生油复合溶液,第一次皮下注射 5 mL/kg,之后间隔 3 天以每 3 mL/kg 的标准进行皮下注射,每周注射 2 次,连续 8 周。正常对照组皮下注射等剂量标准 5 mL/kg 的花生油,每周注射 2 次,连续 8

周。造模成功后, 柔肝化纤颗粒 -L 组、柔肝化纤颗粒 -M 组与柔肝化纤颗粒 -H 组灌胃给药, 每周灌胃 3 次, 连续 8 周, 中药使用剂量参照 Wojcikowski Ken^[21] 动物用药剂量的换算方法实施, 正常对照组与病理模型组以等体积的生理盐水灌胃。

1.6 肝脏外观形态观察与肝功能检测

各组大鼠标本采集前 1 天禁食但不禁水, 12 小时后予 1% 戊巴比妥溶液按 5 mL/kg 腹腔注射麻醉后, 称重、腹主动脉采血。采血结束后, 小心切取大鼠肝脏组织, 观察并对比各组外观形态。大鼠经腹主动脉采血后, 室温静置 1 小时后离心分离血清, 使用全自动生化分析仪测定 ALT 与 AST 指标水平。

1.7 肝组织病理分析

充分选取大鼠肝组织中右叶最厚处, 将选取的肝组织放入 4% 的中性多聚甲醛溶液中固定 12 h, 逐级脱水, 常规石蜡包埋, 使用切片机将石蜡包埋组织切成 4 μ m 厚的切片, 经过 HE 染色后, 置于光学显微镜下观察各组大鼠肝组织病理形态结构变化, 经过 Masson 染色后, 观察各组大鼠肝组织中胶原纤维排列分布。

1.8 大鼠肝组织中 GSH-Px、HYP、SOD 与 MDA 等指标水平检测

切取大鼠肝组织 0.2 g, 放于 0.9% 生理盐水的匀浆器中摇匀, 在冰水中配制肝匀浆液。采用 BCA 蛋白浓度检测实验对大鼠肝组织中蛋白浓度进行测定后, 使用 ELISA 试剂盒严格按

照操作步骤测量匀浆液中 GSH-Px、HYP、SOD 与 MDA 等指标水平。

1.9 统计学方法

本实验研究运用 SPSS 27.0 统计学软件对数据进行系统比较分析, 鉴于本实验结果所比较的计量资料为独立样本, 且所得实验数据符合统计学正态分布, 所以两组数据间相比的计量资料予采用 t 检验, 组间的比较予采用独立样本 t 检验。在符合独立样本、正态性分布且方差齐的情况下, 多组间相比较采用单因素方差分析(F 检验)。方差不齐时, 采用均值相等性的健壮性检验。采用双侧检验以再次验证本研究数据的准确性, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。数据图形处理采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行。

2 结果

2.1 柔肝化纤颗粒对大鼠肝脏形态和组织结构的影响

从正常对照组(NC Group)大鼠切取出来的肝脏标本包膜完整光滑无塌陷, 呈朱褐色。从病理模型组大鼠取出来的肝脏表面有塌陷区与瘢痕形成, 表层分布有粗糙颗粒。柔肝化纤颗粒 -L 组(RH-L Group)、柔肝化纤颗粒 -M 组(RH-M Group)与柔肝化纤颗粒 -H 组(RH-H Group)的大鼠肝脏表层亦分布有细小颗粒, 但较病理模型组(PM Group)减少, 且剂量越高组别的颗粒分布越少, 呈量效递增地减少肝脏表面塌陷分布。见图1。



图1 各组大鼠肝脏形态结果

A: 正常对照组; B: 病理模型组; C: 柔肝化纤颗粒 -L 组; D: 柔肝化纤颗粒 -M 组; E: 柔肝化纤颗粒 -H 组

Fig.1 Morphological results of rat liver in each group

A: NC Group; B: PM Group; C: RH-L Group; D: RH-M Group; E: RH-H Group

2.2 HE 染色结果

经 HE 染色光镜观察下显示(见图 2), 正常对照组大鼠肝细胞大小、形态整齐规则, 中央静脉呈放射状清晰显现, 未见有扩张与萎缩, 未见有肝脏纤维组织增生, 可见极少量炎症细胞浸润。病理模型组大鼠肝细胞内的小叶结构已残缺, 排列紊乱, 出现众多肝脏纤维组织异常增生, 增生所形成的胶原纤维汇合成密集的纤维间隔, 甚至形成假小叶, 假小叶结构内部出现大量形态各异、大小不均的脂肪变性的肝细胞, 炎症细胞弥漫性浸润显著。与病理模型组相比, 柔肝化纤颗粒 -L 组、柔肝化纤颗粒 -M 组与柔肝化纤颗粒 -H 组大鼠肝小叶结构被破坏的面积显著减少, 三组大鼠肝细胞变性、坏死的范围及胶原纤维组织增生程度均较病理模型组显著减轻, 均有少量炎症细胞浸润, 但浸润程度较病理模型组减轻。

2.3 Masson 染色结果

经 Masson 染色后光镜观察下显示(见图 3), 未经任何干预的正常对照组大鼠肝组织的肝小叶结构排列清晰可见, 细胞

排列正常有序, 仅在中央静脉区域的血管壁附近可见少许蓝色胶原纤维稀疏排列。病理模型组大鼠肝组织清晰显示出众多异常增生的蓝色胶原纤维, 不规则包围环绕、分隔肝小叶组织, 形成大小不等的假小叶结构。与病理模型组相比, 柔肝化纤颗粒 -L 组、柔肝化纤颗粒 -M 组与柔肝化纤颗粒 -H 组大鼠肝组织亦可见蓝色胶原纤维出现在汇管区, 纤维细薄, 从中央静脉向四周延伸, 胶原纤维增生较病理模型组均有不同程度的减轻。

2.4 各组大鼠血清 ALT、AST 指标数值比较

病理模型组大鼠血清 ALT 与 AST 指标数值均显著高于正常对照组(均 $P < 0.001$); 柔肝化纤颗粒 -L 组、柔肝化纤颗粒 -M 组与柔肝化纤颗粒 -H 组大鼠 ALT、AST 指标数值均显著低于病理模型组(均 $P < 0.001$); 柔肝化纤颗粒 -L 组、柔肝化纤颗粒 -M 组与柔肝化纤颗粒 -H 组比较, 方差齐性检验显著性 P 值为 0.964, F 值为 0.114, $P = 0.893$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

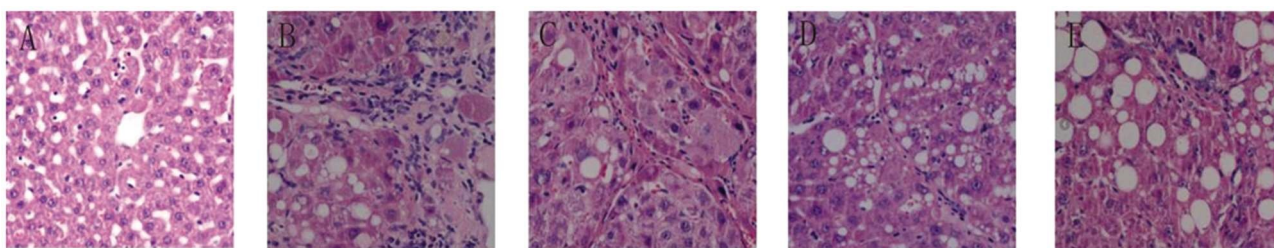


图2 各组大鼠肝组织 HE 染色结果(× 400)

A: 正常对照组; B: 病理模型组; C: 柔肝化纤颗粒 -L 组; D: 柔肝化纤颗粒 -M 组; E: 柔肝化纤颗粒 -H 组

Fig.2 HE staining results of liver tissue of rats in each group(× 400)

A: NC Group; B: PM Group; C: RH-L Group; D: RH-M Group; E: RH-H Group

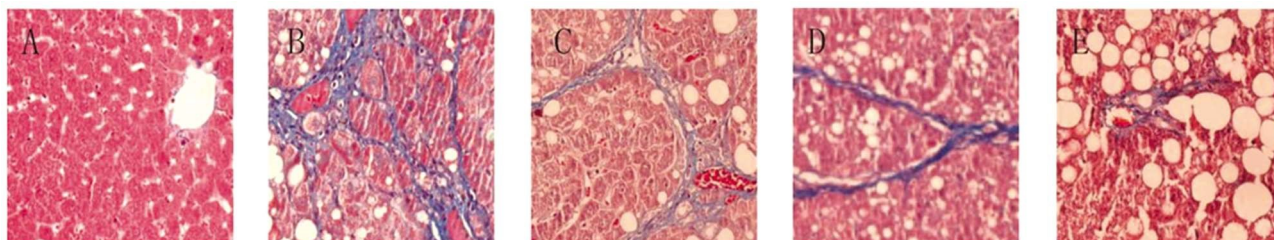


图3 各组大鼠肝组织 Masson 染色结果(× 400)

A: 正常对照组; B: 病理模型组; C: 柔肝化纤颗粒 -L 组; D: 柔肝化纤颗粒 -M 组; E: 柔肝化纤颗粒 -H 组

Fig.3 Masson staining results of liver tissue of rats in each group(× 400)

A: NC Group; B: PM Group; C: RH-L Group; D: RH-M Group; E: RH-H Group

表1 各组大鼠肝功能及肝组织相关指标或蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of liver function and liver tissue related indexes or protein expression levels of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Rat number	ALT (U/L)	AST (U/L)	GSH-Px (U/L)	HYP (μ g/L)	SOD (IU/mL)	MDA (nmol/L)
Normal control group	16	55.16 $\pm$ 3.53	179.25 $\pm$ 28.51	68.48 $\pm$ 9.81	1.01 $\pm$ 0.12	542.75 $\pm$ 69.46	297.72 $\pm$ 60.45
Pathological model group	16	225.29 $\pm$ 69.09	317.30 $\pm$ 82.88	25.53 $\pm$ 4.98	1.39 $\pm$ 0.09	162.20 $\pm$ 21.73	1095.13 $\pm$ 185.76
Rugan Huaxian Granule-L Group	16	167.83 $\pm$ 51.97 ^{af}	275.79 $\pm$ 64.17 ^a	36.47 $\pm$ 6.05 ^{bd}	1.11 $\pm$ 0.10 ^{cd}	284.97 $\pm$ 71.06 ^{ad}	946.35 $\pm$ 129.35 ^{af}
Rugan Huaxian Granule-M Group	16	163.35 $\pm$ 50.04 ^{ac}	237.50 $\pm$ 59.05 ^{bc}	49.85 $\pm$ 9.89 ^{ad}	1.22 $\pm$ 0.09 ^{ad}	324.98 $\pm$ 54.75 ^{ad}	816.54 $\pm$ 154.82 ^{ad}
Rugan Huaxian Granule-H Group	16	159.12 $\pm$ 52.80 ^{ac}	219.64 $\pm$ 56.75 ^{ac}	56.95 $\pm$ 7.23 ^{ad}	1.34 $\pm$ 0.08 ^a	398.45 $\pm$ 66.05 ^{ad}	671.54 $\pm$ 180.84 ^{ad}
F value		23.72	12.10	74.04	42.68	89.63	66.62
P value		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with the normal control group, ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$; Compared with pathological model group, ^d $P < 0.001$, ^e $P < 0.01$, ^f $P < 0.05$.

2.5 ELISA 结果

病理模型组大鼠肝组织中 MDA 与 HYP 指标数值明显高于正常对照组(均 $P < 0.001$),病理模型组大鼠肝组织中 SOD 与 GSH-Px 指标数值明显低于正常对照组(均 $P < 0.001$)。柔肝化纤颗粒 -L 组、柔肝化纤颗粒 -M 组与柔肝化纤颗粒 -H 组 MDA 与 HYP 的表达水平显著低于病理模型组, SOD 与 GSH-Px 的表达水平显著高于病理模型组(均 $P < 0.001$)。各组大鼠肝组织中 GSH-Px、HYP、SOD 与 MDA 含量比较见表 1 与图 4。

3 讨论

祖国医学虽无 "肝纤维化" 之病名, 但根据其临床特征, 可将其归属于中医学中 "积聚"、"胁痛" 等疾病范畴。中医对肝纤维化病因病机的解释在于邪毒、痰湿、血瘀等致病因素作用于肝脏与其经络, 导致肝脏瘀血阻滞肝脉、阴精亏虚、气机郁滞、血凝久稽而 "虚损生积" [22,23]。壮方柔肝化纤颗粒由生黄芪 45 g、生牡蛎 30 g、老虎姜 20 g、枸杞子 20 g、薏苡仁 45 g、芸红 12 g、地瓜苗 30 g、上甲 30 g、虎杖 20 g、鸡黄皮 15 g、大枣 15 g 等十一味药组成, 有 "攻毒补虚" 之功效, 使壮医基础理论之 "气道"、"水道"、"谷道" 三道通畅。用广西壮医药 "主、公、母、帮" 的特色配伍理论来诠释其方药, 以生黄芪为主药, 能补一身之气, 为劲补后天脾气与兼补肺气之要药, 以通达 "气道",

补虚以托邪毒外出,振奋后天中焦脾脏之气,寓"振奋脾土之气以顾护中焦,以防肝脏邪毒往脾土传变"之义;以薏苡仁、地瓜苗、虎杖共为公药,利水渗湿、祛瘀止痛、清热解毒散结以达通调"水道";老虎姜、枸杞子、生牡蛎、上甲共为母药,补气养

阴、补益肝脾肾、清热散瘀、软坚散结;鸡黄皮、芸红同为帮药,健胃消食,兼理气宽中,通调"谷道";大枣调和诸药药性。诸药合用以奏解毒散瘀、软坚散结、柔肝补肾之效。

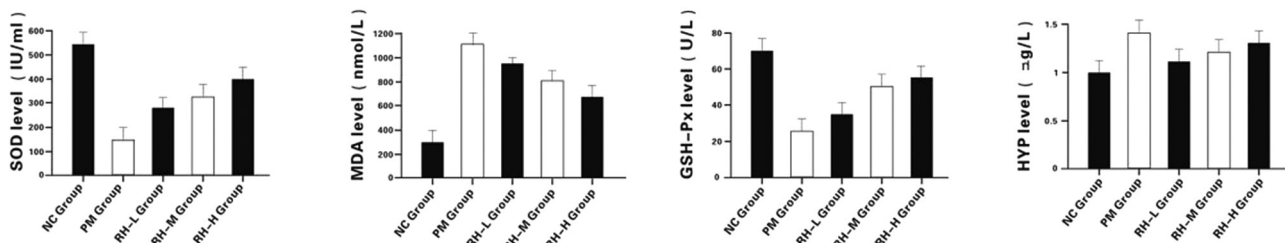


图4 各组大鼠肝组织 GSH-Px、HYP、SOD 与 MDA 水平比较

Fig.4 Comparison of GSH-Px, HYP, SOD and MDA levels in liver tissues of rats in each group

随着肝纤维化分子机制研究的不断进步,国内外已经发现有一些肝纤维化是可以改善的^[24-26],甚至有部分肝纤维化是可以逆转的^[27-29]。国内外现代药理学的临床与基础研究也证实^[30-32],柔肝化纤颗粒中的多种中药单体与活性成分有保肝护肝、抗炎、抗肝纤维化、抗肝硬化等作用。生黄芪的活性成分有黄芪总苷等,李芬等^[33]在基于 PAR2 信号传导通路研究黄芪总苷是否能减轻模型大鼠肝纤维化的实验中,结果显示黄芪总苷能直接有效干预模型大鼠的肝脏功能指标与肝组织蛋白水平,从而达到抗肝纤维化的作用,并能抑制肝脏炎症反应水平。孙墨晗等^[34]在研究黄芪当归配伍对抗肝纤维化作用时,发现此两味药的有效配伍对肝纤维化的逆转有较好效果。邓凯翔团队^[35]在深入钻研生牡蛎活性成分牡蛎肽功效的同时,对肝纤维化大鼠中的核因子- κ B(NF- κ B)与诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)也做了实验研究,结果显示该活性成分可通过干预 I、III 型胶原蛋白,抑制 NF- κ B/iNOS 途径,从而抑制大鼠肝纤维化。符蓉等^[36]在研究老虎姜改善肝纤维化模型大鼠肝脏病理形态时,发现老虎姜可通过降低病理模型中 TGF- β 1 及 Smad7 蛋白与基因表达,从而充分有效地减轻了大鼠肝组织炎症程度、抑制了肝纤维化的进展。李厚钢^[37]在探索上甲抗肝纤维化的基础研究时,发现上甲提取物有明显抗肝纤维化的药理作用,鳖甲多肽的两个肽段均可充分降低肝星状细胞中 TGF- β 1 的表达继而达到抗肝纤维化的作用。张丽等^[38]研究虎杖活性成分虎杖苷对肝纤维化的作用及其机制时,发现该活性成分可通过上调 Nr2f1/HO-1 通路,从而抑制肝星状细胞增殖与活化,减少胶原蛋白合成,达到抗肝纤维化的效果。

肝纤维化的血清生物标志物有很多^[39],GSH-Px 是一种广泛存在而又有有益于机体的过氧化物分解酶,能把机体里有毒的过氧化物有效还原成无毒的羟基化合物,能干扰氧自由基对机体细胞引起的破坏;若机体内自由基水平随着机体损害程度的持续升高,GSH-Px 指标水平则逐步下降,抗氧化能力与代谢中致病物质的存在呈负相关^[40]。HYP 是蛋白质中胶原组织里特有的氨基酸成分,可通过其指标水平来了解体内胶原蛋白分解代谢的基本情况,其在伤口愈合中也发挥着重要作用^[41];其含量在胶原蛋白中含量最高,与肝纤维化损伤严重程度呈正相关。SOD 是生物体内清除有害自由基的重要金属酶之一,具有高度抗氧化与抗衰老的作用^[42],在防御代谢、氧化应激、抗炎护肝

等方面也发挥着积极作用^[43-45];其含量的高低是反映机体抗氧化与抗衰老能力强弱的关键指标。MDA 是主要的膜脂过氧化指标,也是被世界卫生组织国际癌症研究机构列入癌物清单的其中一种化合物,具有细胞毒性,能过分激活 HSCs 从而使肝脏产生胶原蛋白,在患病人群中含量较高^[46];其水平的高低可衡量机体脂质过氧化的强弱,还可体现出机体细胞受自由基损伤的不同程度。本研究表明,病理模型组大鼠 ALT、AST 指标水平与肝组织中 MDA 与 HYP 指标水平均较正常对照组明显升高,相反,SOD 与 GSH-Px 指标水平均较正常对照组明显下降。经柔肝化纤颗粒干预后,大鼠 ALT、AST 指标水平与肝组织中 MDA 与 HYP 指标水平均较病理模型组下降,SOD 与 GSH-Px 指标水平均较病理模型组升高,提示柔肝化纤颗粒对肝纤维化模型大鼠的保护作用可能与保肝护肝、抑制脂质过氧化与减少机体胶原蛋白合成有关。GSH-Px 是组织中有用的抗氧化酶,起着调节氧化与抗氧化动态平衡的作用,倘若氧化与抗氧化平衡遭到破坏,就会进一步诱发免疫功能减退与炎症因子的增加,诱导组织发生脂质过氧化反应,从而引起组织损伤与器官纤维化的发生。HYP 是构成胶原蛋白的关键要素之一,其含量的高低能直接反映出肝肺等器官组织纤维化的严重程度,HYP 水平的高低与纤维化的严重程度呈正相关^[47];SOD 能有效清除机体氧自由基;MDA 是反映机体氧化应激程度的常用标志物,可以作为评估组织氧化损伤程度的重要指标,与肝损伤呈负相关,并可能在一定程度上诱发不可逆转的肝细胞损伤;本研究表明,经柔肝化纤颗粒治疗后,肝纤维化大鼠肝组织 MDA 与 HYP 指标水平显著下降,纤维化减轻;SOD 和 GSH-Px 指标水平显著增高,提示柔肝化纤颗粒能有效减少胶原含量,可能具有一定的抗氧化能力。

综上所述,柔肝化纤颗粒可有效改善肝纤维化大鼠的肝细胞损害情况,减轻其肝组织炎症程度,对肝纤维化大鼠有一定的保肝护肝与抗肝纤维化作用,其机制可能与提高 GSH-Px 与 SOD 的水平、降低 HYP 与 MDA 的含量、降低氧化应激水平、调节脂质代谢、减少机体胶原蛋白合成等相关。

参考文献(References)

- [1] KHAN S, SAXENA R. Regression of Hepatic Fibrosis and Evolution of Cirrhosis:A Concise Review [J]. Adv Anat Pathol, 2021, 28 (6): 408-414

- [2] LI JG, TUO BG. Current and Emerging Approaches for Hepatic Fibrosis Treatment[J]. Gastroenterol Res Pract, 2021, 2021: 6612892
- [3] HAMEED S, UR RA, MASSEY S, et al. Grevillea robusta Delayed the Progression of Experimentally Induced Hepatic Fibrosis and Cirrhosis in Wistar Rats by Attenuating the Expression of Smooth Muscle Actin, Collagen, and TGF- β [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 904584
- [4] YILMA M, SAXENA V, MEHTA N. Models to Predict Development or Recurrence of Hepatocellular Carcinoma (HCC) in Patients with Advanced Hepatic Fibrosis [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2022, 24(1): 1-9
- [5] LI WQ, LIU WH, QIAN D, et al. Traditional Chinese medicine: An important source for discovering candidate agents against hepatic fibrosis[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 962525
- [6] GUO XH, ZHENG Y, WANG JH, et al. Research progress on role of traditional Chinese medicine in hepatic fibrosis based on miRNA-mediated activation of NLRP3 inflammasome [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2022, 47(9): 2409-2418
- [7] LI BL, LIANG HJ, LI QR, et al. Euryachincoside, a novel phenolic glycoside with anti-hepatic fibrosis activity from Eurya chinensis[J]. Planta Med, 2022[Epub ahead of print]
- [8] FU YD, XIAO Z, TIAN XT, et al. The Novel Chinese Medicine JY5 Formula Alleviates Hepatic Fibrosis by Inhibiting the Notch Signaling Pathway[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 671152
- [9] ZHAO J, MIAO J, WEI X, et al. Traditional Chinese Medicine Ganshuang Granules Attenuate CCl₄-Induced Hepatic Fibrosis by Modulating Gut Microbiota [J]. Chem Biodivers, 2021, 18 (11): e2100520
- [10] ZHAO W, ZHANG XX, HOU MM, et al. Traditional Chinese medicine Yiqi Huoxue recipe attenuates hepatic fibrosis via YAP/TAZ signaling[J]. Histo Histopathol, 2021, 36(9): 967-979
- [11] DAMIRIS K, TAFESH ZH, PYRSOPOULOS N. Efficacy and safety of anti-hepatic fibrosis drugs[J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(41): 6304-6321
- [12] GUO JS. Research hotspots and progress of hepatic fibrosis-2019 viewpoints [J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2019, 27 (6): 401-402
- [13] FRIEDMAN SL, PINZANI M. Hepatic fibrosis 2022: Unmet needs and a blueprint for the future[J]. Hepatology, 2022, 75(2): 473-488
- [14] 段桂姣, 郝蔷薇, 吕艳杭, 等. 柔肝化纤颗粒联合恩替卡韦治疗 180 例慢性乙型肝炎肝硬化患者的临床疗效分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(12): 1920-1924
- [15] 吴姗姗. 柔肝化纤颗粒联合恩替卡韦治疗乙型肝炎肝硬化 (肝肾阴虚证)的临床疗效观察[D].广西中医药大学, 2020
- [16] 吕艳杭, 吴姗姗, 王振常, 等. 柔肝化纤颗粒治疗乙型肝炎肝硬化腹水的临床疗效及对肝纤维化、氧化应激水平的影响[J]. 西部中医药, 2021, 34(03): 19-24
- [17] 吴姗姗, 吕艳杭, 王振常, 等. 壮方柔肝化纤颗粒治疗肝肾阴虚型乙型肝炎肝硬化腹水的效果[J]. 中国医药导报, 2020, 17(01): 122-125
- [18] 吕艳杭, 吴姗姗, 王振常, 等. 柔肝化纤解毒颗粒治疗中晚期原发性肝癌的临床疗效及对血流动力学的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(02): 277-280
- [19] 马学惠. 肝纤维化动物模型的造模方法[J].中华肝脏病杂志, 1996, (01): 58-60
- [20] 吕艳杭, 吴姗姗, 王振常, 等. 肝纤维化动物模型造模方法的研究进展[J]. 广西医学, 2020, 42(07): 875-878
- [21] WOJCIKOWSKI K, GOBE G. Animal studies on medicinal herbs: predictability, dose conversion and potential value [J]. Phytother Res, 2014, 28(1): 22-27
- [22] 刘定, 曹洪欣, 潘富珍. 从 "五脏相关" 理论探讨肝纤维化病机变化特点[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(08): 4512-4514
- [23] 李霞, 吴文军, 刘文平, 等. 基于络病理论探讨肝纤维化病机与治疗 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(08): 4619-4622
- [24] ZHAO YC, LIU XL, DING CB, et al. Aronia melanocarpa polysaccharide ameliorates liver fibrosis through TGF- β 1-mediated the activation of PI3K/AKT pathway and modulating gut microbiota [J]. J Pharmacol Sci, 2022, 150(4): 289-300
- [25] YANG T, WU EY, ZHU XY, et al. TKF, a mexicanolide-type limonoid derivative, suppressed hepatic stellate cells activation and liver fibrosis through inhibition of the YAP/Notch3 pathway [J]. Phytomedicine, 2022, 107: 154466
- [26] WANG R, LI SN, CHEN PP, et al. Salvianolic acid B suppresses hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway via miR-6499-3p/LncRNA-ROR [J]. Phytomedicine, 2022, 107: 154435
- [27] ZHENG Y, ZHAO TJ, WANG JR, et al. Curcumin alleviates liver fibrosis through inducing autophagy and ferroptosis in hepatic stellate cells[J]. FASEB J, 2022, 36(12): e22665
- [28] ASHOUR AA, EL-KAMEL AH, MEHANNA RA, et al. Luteolin-loaded exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells: a promising therapy for liver fibrosis[J]. Drug Deliv, 2022, 29(1): 3270-3280
- [29] MENG XB, PAN ZQ, ZHAO JW, et al. Efficacy and safety of Fufang Biejia Ruangan Tablets as an adjuvant treatment for chronic hepatitis B liver fibrosis: A systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2022, 101(46): e31664
- [30] CHOI DJ, KIM SC, PARK GE, et al. Astragalus membranaceus Protective Effect of a Mixture of and Extract against Hepatic Steatosis in High Fat Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease Mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 8370698
- [31] 胡永红, 任爽, 刘伟, 等. 黄芪总苷上调 miRNA-744 表达抑制肝星状细胞活化的效应机制 [J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(01): 32-40
- [32] BAI GP, YAN GH, WANG GJ, et al. Anti-hepatic fibrosis effects of a novel turtle shell decoction by inhibiting hepatic stellate cell proliferation and blocking TGF- β 1/Smad signaling pathway in rats[J]. Oncol Rep, 2016, 36(5): 2902-2910
- [33] 李芬, 王甲彬, 张世龙, 等. 黄芪总苷通过 PAR2 信号通路减轻糖尿病大鼠肝纤维化的机制研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20 (10): 1043-1047
- [34] 孙墨哈, 赵哲, 靳玉秋, 等. 黄芪当归配伍对抗肝纤维化的作用研究[J]. 医学信息, 2022, 35(08): 17-20
- [35] 邓凯翔, 黄津. 牡蛎肽对 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠核因子 - κ B、诱导型一氧化氮合成酶的影响 [J]. 中国现代医药杂志, 2021, 23(11): 1-4
- [36] 符蓉, 曹斌. 黄精通过 TGF- β 1/Smad 信号通路对肝纤维化模型大鼠肝脏结构病理改善作用[J]. 解剖学研究, 2022, 44(01): 7-11

- [20] Tousif S, Wang Y, Jackson J, et al. Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Promotes Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Differentiation Of Regulatory B Cells in Lung Cancer[J]. *Front Immunol*, 2021, 12(11): 747780
- [21] Harden JL, Egilmez NK. Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity[J]. *Immunol Invest*, 2012, 41(6-7): 738-764
- [22] Sounidaki M, Pissas G, Eleftheriadis T, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses humoral alloimmunity via pathways that different to those associated with its effects on T cells [J]. *Biomed Rep*, 2019, 1(1): 1-5
- [23] Luan X, Liao W, Lai X, et al. Dynamic changes of indoleamine 2,3-dioxygenase of Kupffer cells in rat liver transplant rejection and tolerance[J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(4): 1045-1047
- [24] Jalili RB, Forouzandeh F, Rezakhanlou AM, et al. Local expression of indoleamine 2,3 dioxygenase in syngeneic fibroblasts significantly prolongs survival of an engineered three-dimensional islet allograft [J]. *Diabetes*, 2010, 59(9): 2219-2227
- [25] Vavrinova-Yaghi D, Deelman LE, Goor H, et al. Gene therapy with adenovirus-delivered indoleamine 2,3-dioxygenase improves renal function and morphology following allogeneic kidney transplantation in rat[J]. *J Gene Med*, 2011, 13(7-8): 373-381
- [26] 贺继刚, 韩金秀, 李贝贝, 等. 过表达 IDO 骨髓间充质干细胞通过外排体促进移植心脏存活的分子机制研究[J]. *临床心血管病杂志*, 2018, 34(3): 301-306
- [27] He JG, Xie QL, Li BB, et al. Exosomes Derived from IDO1-Overexpressing Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Immunotolerance of Cardiac Allografts [J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(11): 1657-1683
- [28] Chen F, Chen ZQ, Zhong GL, et al. Nicorandil inhibits TLR4/MyD88/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway to reduce pyroptosis in rats with myocardial infarction [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(17): 1938-1947
- [29] Liu Y, Lei Z, Chai H, et al. Salidroside alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury during liver transplant in rat through regulating TLR-4/NF- κ B/NLRP3 inflammatory pathway [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 13973
- [30] Du X, Que W, Hu X, et al. Ordonin Prolongs the Survival of Mouse Cardiac Allografts by Attenuating the NF- κ B/NLRP3 Pathway [J]. *Front Immunol*, 2021, 12(9): 719574

(上接第 1211 页)

- [37] 李厚钢. 鳖甲抗肝纤维化的物质基础研究 [D]. 湖北中医药大学, 2020
- [38] 张丽, 方步武. 虎杖苷抑制肝星状细胞增殖活化的作用和机制研究[J]. *天津医科大学学报*, 2020, 26(04): 309-312
- [39] CHEN ZY, MA YC, CAI JY, et al. Serum biomarkers for liver fibrosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2022, 537: 16-25
- [40] BATCIOGLU K, OZTURK C, KARAGOZLER A, et al. Comparison of the selenium level with GSH-Px activity in the liver of mice treated with 7,12 DMBA[J]. *Cell Biochem Funct*, 2002, 20(2): 115-118
- [41] SATO K, ASAI TT, JIMI S. Collagen-Derived Di-Peptide, Prolylhydroxyproline (Pro-Hyp): A New Low Molecular Weight Growth-Initiating Factor for Specific Fibroblasts Associated With Wound Healing[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 548975
- [42] ZHANG XR, ZHOU WX, ZHANG YX. Improvements in SOD mimic AEOL-10150, a potent broad-spectrum antioxidant [J]. *Mil Med Res*, 2018, 5(1): 30
- [43] CALVANI NE, DE MV, JEWURST HL, et al. Fasciola hepatica Two Distinct Superoxidase Dismutases (SOD) Secreted by the Helminth Parasite Play Roles in Defence against Metabolic and Host Immune Cell-Derived Reactive Oxygen Species (ROS) during Growth and Development [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(10): 1968
- [44] WANG HD, CAO XK, GUO JD, et al. BNTA alleviates inflammatory osteolysis by the SOD mediated anti-oxidation and anti-inflammation effect on inhibiting osteoclastogenesis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 939929
- [45] KIM DS, LEE HJ, SIM DY, et al. The underlying hepatoprotective mechanism of PKC#963 in alcohol or carbon tetrachloride induced liver injury via inhibition of iNOS, COX-2, and p-STAT3 and enhancement of SOD and catalase [J]. *Phytother Res*, 2022 [Epub ahead of print]
- [46] TSIKAS D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges [J]. *Anal Biochem*, 2017, 524: 13-30
- [47] 盛春瑞, 刘珊珊, 陈以文, 等. 炙甘草汤通过抗氧化抑制博来霉素诱导的小鼠肺纤维化 [J]. *现代生物医学进展*, 2022, 22(21): 4014-4019