

桃红芪术软肝煎对肝纤维化大鼠病理及 TGF- β /Smad 信号通路的影响

王靖思¹ 吴 洁² 孙桂芝^{1,2} 张秋云^{1,5} 刘玉琴³ 陈兰羽² 朱宏伟⁴

(1 首都医科大学附属北京中医医院, 北京, 100010; 2 中国中医科学院广安门医院, 北京, 100053; 3 中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所, 北京, 100005; 4 中国中医科学院望京医院病理科, 北京, 100102; 5 首都医科大学中医药学院, 中医临床基础学系, 北京, 100069)

摘要 目的: 观察桃红芪术软肝煎抗大鼠肝纤维化的作用及对 TGF- β /Smad 信号通路的影响。方法: 选取 105 只 Wistar 大鼠, 随机分为空白组、模型组、对照药物组(秋水仙碱组、扶正化瘀胶囊组)、桃红芪术软肝煎组(桃红芪术低剂量组、中剂量组、高剂量组)。除空白组外, 分 3、6、9 周 3 个时间点采用 50% CCl₄ 1 mL/kg 橄榄油溶液腹腔注射进行肝纤维化模型制作, 同时进行 HE 染色和 Masson 染色观察肝纤维化的病理表现; 并采用免疫组织化学法检测肝脏组织的 E-Cadherin、Vimentin、转化生长因子(TGF)- β_1 、Smad2 蛋白表达; RT-PCR 方法检测肝脏组织的 E-Cadherin、Vimentin、TGF- β_1 、Smad2 的 mRNA 表达。结果: 肝纤维化病理结果显示, 随着造模、给药时间的延长, 各给药组均能明显阻断模型大鼠肝组织纤维化进展; 与模型组比较, 第 9 周时桃红芪术高剂量组作用最明显。免疫组织化学结果显示, 与模型组比较, 用药各组从第 3 周至第 9 周, E-cadherin 表达均较模型组表达明显增加($P < 0.05$), 用药各组间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 与模型组比较, 用药各组 TGF- β_1 表达明显减弱, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 用药各组组间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。RT-PCR 结果显示, 与空白组比较, 模型组 Smad2 mRNA 表达量明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 桃红芪术低剂量组 Vimentin mRNA、Smad2 mRNA 表达量明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 桃红芪术软肝煎中剂量组 Smad2 mRNA 表达下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 扶正化瘀胶囊组 TGF- β_1 mRNA、Vimentin mRNA 表达量均较模型组下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 桃红芪术软肝煎可持续通过 TGF- β /Smad 信号通路调节上皮间质转化, 治疗肝纤维化。

关键词 孙桂芝; 桃红芪术软肝煎; 肝纤维化; 肝硬化; 肝纤维化防治; 转化生长因子- β /Smad 信号通路; 上皮-间充质细胞转化; 转化生长因子- β_1

Effects of Taohong Qizhu Ruangan Decoction on Pathology and TGF- β /Smad Signal Pathway in Rats with Liver Fibrosis

Wang Jingsi¹, Wu Jie², Sun Guizhi^{1,2}, Zhang Qiuyun^{1,5}, Liu Yuqin³, Chen Lanyu², Zhu Hongwei⁴

(1 Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China; 2 Guang'anmen Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China; 3 Institute for Medical Research, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Union Medical University, Beijing 100005, China; 4 Department of Pathology, Wangjing Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China; 5 College of Basic Clinical Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Objective: To observe effects of Taohong Qizhu Ruangan Decoction on treating liver fibrosis of rats, and effects on TGF- β /Smad signal pathway. **Methods:** A total of 105 Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, control group (colchicine and Fuzheng Huayu Capsule group), Taohong Qizhu Ruangan Decoction group (low dose group, middle dose group, high dose group). Except blank group, the liver fibrosis model was established by the intraperitoneal injection of 50% CCl₄ 1 mL/kg of olive oil solution at 3, 6, 9 week. At the same time, HE staining and Masson staining were used to observe the pathological expressions of liver fibrosis. The expressions of E-Cadherin, Vimentin, TGF- β_1 and Smad2 in liver tissues were detected by immunohistochemistry. The mRNA expressions of E-Cadherin, Vimentin, TGF- β_1 and Smad2 in liver tissues were detected by RT-PCR. **Results:** The pathological results of liver fibrosis showed that with the prolongation of modeling and administration time, each drug-administered group could significantly block the progression of hepatic fibrosis in model rats. And compared with model group, effect of high dose Taohong Qizhu Ruangan Decoction group was most obvious. Immunohistochemical: From 3 week to 9 week, com-

基金项目: 中国中医科学院博士研究生创新基金(CX201404)

作者简介: 王靖思(1985.06—), 女, 博士, 医师, 研究方向: 中西医结合防治肿瘤学, E-mail: ally7161@sina.com

通信作者: 孙桂芝(1937.12—), 女, 本科, 主任医师, 研究方向: 中西医结合防治肿瘤学, E-mail: whongzhong@263.net; 张秋云(1962.09—), 女, 博士, 教授, 中医临床基础学系主任, 研究方向: 慢性肝病的中医药防治, Email: zhangqiuyun8202@aliyun.com

pared with model group, E-cadherin expression was significantly increased than other groups ($P < 0.05$), and there were no differences between groups ($P > 0.05$); compared with model group, TGF- β expression decreased significantly in other drug groups ($P < 0.05$), and there were no differences between groups ($P > 0.05$). RT-PCR: Compared with the blank group, Smad2 mRNA expression in model group significantly increased ($P < 0.05$). Vimentin mRNA and Smad2 mRNA expression of low dose group of Taohong Qizhu Ruangan Decoction significantly decreased ($P < 0.05$). Smad2 mRNA expression of middle dose group of Taohong Qizhu Ruangan Decoction decreased ($P < 0.05$); TGF- β mRNA, Vimentin mRNA expression of Fuzheng Huayu Capsule group decreased compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Taohong Qizhu Ruangan Decoction can regulate epithelial-mesenchymal transition through TGF- β /Smad signaling pathway to treat liver fibrosis.

Key Words Sun Guizhi; Taohong Qizhu Ruangan Decoction; Hepatic fibrosis; Liver cirrhosis; Prevention and treatment of hepatic fibrosis; TGF- β signal pathway; Epithelial-mesenchymal transition; TGF- β_1

中图分类号: R289.5; R575.21 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.06.047

慢性病毒性肝炎是肝纤维化的主要原因,在肝硬化的形成过程中,肝纤维化是慢性病毒性肝炎向肝硬化发展的不可避免的阶段^[1],肝纤维化及其并发症给社会带来巨大健康负担,由于缺乏有效的治疗方法,慢性肝脏疾病困扰着世界上数百万人^[2]。且慢性肝病中一旦由纤维化进展到硬化,发展到肝细胞癌的概率就会增加^[3-4],因此有效抑制甚至逆转肝纤维化具有重要的临床意义。桃红芪术软肝煎(简称桃红芪术)为孙桂芝主任医师的经验方^[5],观察其抗大鼠肝纤维化的作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取 105 只雌性 Wistar 大鼠,体重(180 ± 20)g,购自北京华阜康生物科技有限公司。动物生产许可证号:SCXK(京)2009-0007 大鼠。分笼饲养于中国中医科学院广安门医院动物房,清洁级,适应性饲养 7 d,饲以标准的大鼠合成饲料,自由饮用纯净水,环境温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~60%。

1.1.2 药物 桃红芪术软肝煎,由生黄芪、炒白术、太子参、桃仁、莪术等药材组成,所用药材购自本草方源药业,全量水提取 2 次,浓缩收清膏 2 700 g 灌装,含生药量为 2.9 g/kg。扶正化瘀胶囊,含生药量 4.0 g/kg(上海黄海制药有限责任公司,国药准字 Z20020074);秋水仙碱(西双版纳药业有限责任公司,国药准字 H53021369)。

1.1.3 试剂 丙氨酸氨基转移酶试剂盒、天冬氨酸氨基转移酶试剂盒、白蛋白试剂盒(均购自美国贝克曼库尔公司);4%多聚甲醛(Solarbio 公司);磷酸缓冲盐溶液(PBS)(Hyclone 公司); CCl_4 分析纯、水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);苏木精-伊红(HE)染色及 Masson 染色试剂盒(均购自南京建成科技有限公司);Trizol 试剂盒(Life technologies 公

司,批号:84802);快速反转录试剂盒(FastQuant RT Kit)(天根生化科技(北京)有限公司,批号:N2828);RT-PCR 试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司,批号:N2828);引物序列由赛百盛生物公司合成。

1.1.4 仪器 低速离心机(型号 600-A),白洋离心机厂;荧光正置显微镜,Scope A1,德国 Zeiss 公司;ASP300 脱水机、EG1150H 包埋机、RM2235 切片机,德国 LEICA 公司;BX51 显微镜,日本 Olympus 公司。

1.2 动物分组及造模 105 只大鼠随机分组,分为空白组、模型组、对照药物组(秋水仙碱组、扶正化瘀胶囊组)、桃红芪术组(低剂量组、中剂量组、高剂量组)。每组 15 只。除空白组外均进行肝纤维化模型制作。造模方法:造模组采用含 50% CCl_4 的橄榄油溶液 1 mL/kg 腹腔注射制作肝纤维化模型,2 次/周,分 3、6、9 周 3 个时间周进行造模。空白组则采用含 50% 的 0.9% NaCl 溶液的橄榄油溶液进行腹腔注射。均每周称体重 1 次,以调整腹腔注射剂量。

1.3 干预 造模同时各组进行每日灌胃干预,桃红芪术低剂量组给予桃红芪术 3.1 g/(kg·d)、中剂量组给予 31 g/(kg·d)、高剂量组给予 62 g/(kg·d),秋水仙碱组给予 0.1% 的秋水仙碱 0.1 mg/(kg·d),扶正化瘀胶囊组给予扶正化瘀胶囊 0.415 g/(kg·d),空白组给予 0.9% 生理盐水,直至 9 周末。

1.4 取材 分别在干预第 3、6、9 周末分批处死各组大鼠,称重后麻醉(按照 3.5 mL/kg 体重的标准腹腔注射 10% 水合氯醛),打开腹腔,抽取腹主动脉动脉血,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 3 h 后,4 000 r/min 离心 10 min,分离血清;抽取血液后摘取大鼠肝脏和脾脏,用滤纸吸取血液。取肝脏右叶同一部位约 1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 0.5 cm 大小的肝脏组织放入 4% 多聚甲醛液中固定,以制作病理切片;再取肝脏右叶约 1 cm $\times$ 1 cm 大小的新鲜肝脏组织放入冻存管内,置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保

存,用于 RT-PCR 检测。

1.5 观察指标

1.5.1 肝、脾指数计算 摘取的大鼠肝脏和脾脏,分别用千分位电子天平称取质量并记录,计算肝、脾指数。计算公式:肝指数(%) = 肝质量/体重 × 100%;脾指数(%) = 脾质量/体重 × 100%。

1.5.2 肝脏病理观察 采用苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 染色。1)取材和固定:取肝组织标本,立即置于 4% 多聚甲醛中固定;2)冲洗:标本固定 24 h 后,流水冲洗 30 min;3)脱水:将标本经二甲苯(Ⅰ)→二甲苯(Ⅱ)→二甲苯(Ⅲ)处理,各级时间 20 min 左右;5)浸蜡及包埋:将含有肝脏组织的包埋盒放在熔蜡箱内约 1 h,共 3 次。切片、粘片及烤片:用石蜡切片机连续切片后粘片,烤片 2 h 后进入染色过程。HE 染色及 Masson 染色步骤参照试剂盒说明书。肝纤维化病理参照标准:参照 2000 年西安会议上由中华医学会传染病与寄生虫病学会、肝病学会联合修订的慢性肝炎分级分期标准^[6]。

1.5.3 E-Cadherin、Vimentin、TGF-β₁、Smad2 蛋白表达检测 采用免疫组织化学法检测。1)将切片脱蜡入蒸馏水,PBS 洗 5 min 后进行抗原修复,PBS 洗 5 min × 3 次,3% H₂O₂ 孵育 10 min,PBS 洗 5 min × 3 次,一抗作用 37 ℃ 2 h,PBS 洗 5 min × 3 次,二抗作用 37 ℃ 1 h,PBS 洗 5 min × 3 次,显色,苏木精复染,盐酸、乙醇分色,饱和碳酸锂返蓝,上行脱水、透明、封片。2)光镜下观察各指标表达,每张切片从左至右随机选择 5 个视野观察各指标的阳性表达情况。应用 MIAS 医学图像分析管理系统分析软件测量各指标的光密度值,计算平均吸光度值,并进行统计分析。

1.5.4 E-Cadherin、Vimentin、转化生长因子(TGF)-β₁、Smad2 的 mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 方法检测。1)RNA 制备:按 Trizol 试剂盒说明书步骤提取 RNA,测 A 值(260 nm,280 nm)。其余样品 -20 ℃ 冻存或立即反转录。2)RNA 反转录:使用快速反转录试剂盒(FastQuant RT Kit)合成第一链 cDNA,得到的 cDNA 可用于后续实验,或低温保存;3)Real-time PCR 扩增:反应体系 20 μL/管,2 × SyBr Green Mix 10 μL,上下游引物各 1 μL(10 μmol/L),DEPC H₂O 7 μL,cDNA 1 μL。引物序列如表 1。反应条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 35 s,40 个循环;72 ℃ 延伸 8 min。根据实时 PCR 的原始检测结果,按照相对定量计算公式计算出各样品的目的基因相对定量结果。2^{-ΔΔCt}计算方法:ΔΔCt = 实验组(Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因}) - 对照组(Ct_{目的基因} -

Ct_{管家基因})。

表 1 引物序列

基因	序列号	引物	序列	扩增产物长度(bp)
Smad2	NM_019191	上游	5'-agtcaaaaccagagcagaaa-3'	166
		下游	5'-ttatgcccaacgagacatca-3'	
TGF-β ₁	NM_021578	上游	5'-caacaattctctgcgtttacc-3'	200
		下游	5'-tgggaactgatccattgatt-3'	
E-cadherin	AB017696	上游	5'-agccaatcctgatgaatcg-3'	228
		下游	5'-ccatacatatcggcagctt-3'	
		下游	5'-caaaacacccaggagcagat-3'	
TGF-βR1	NM_012775	上游	5'-tgcctttagatgcagctgg-3'	165
		下游	5'-gcctcaaggcacttttag-3'	
Vimentin	NM_031140	上游	5'-agatcgaatgtggcagttcc-3'	198
		下游	5'-tccgggtattcgttgactcc-3'	
GAPDH	NM_008084	上游	5'-accagaagactgtggatgg-3'	171
		下游	5'-cacattggggtaggaacac-3'	

1.6 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,组间比较使用单因素方差分析,先进行方差齐性检验,方差齐使用 LSD 方法进行组间的两两比较;方差不齐先用 Welch 方法校正,然后再用 DunnettT3 方法进行各组间比较。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠一般情况的影响 空白组:大鼠精力充沛,反应灵活,毛发有光泽,脾气温和,实验过程中无死亡。模型组:大鼠精神萎靡,反应迟钝,目光呆滞,毛发粗糙欠光泽,脱落较多,脾气暴躁,对造模实验不配合,并且后期有腹部膨隆、口唇及皮毛出血等现象,无死亡。桃红芪术组(低剂量组、中剂量组、高剂量组)和对照药物组(秋水仙碱组、扶正化瘀胶囊组):精力较充沛,反应灵敏,目光灵活,毛发较光泽,脾气较好,对造模及灌胃过程配合较好,桃红芪术高剂量组和秋水仙碱组各死亡 1 只。

2.2 对大鼠肝纤维化程度的影响 从干预第 3 周至第 9 周的 HE 染色及 Masson 染色图片可以看出,第 3 周 HE 染色造模病理图片中部分纤维组织增生,Masson 染色病理图片中少许纤维组织着色,提示部分组织发生纤维化,桃红芪术中剂量组及高剂量组改善最为明显;第 6 周模型组病理图片已经存在纤维纵隔,将肝小叶分隔成大小不等的肝细胞团,形成假小叶,部分区肝被膜纤维组织显著增生,提示肝纤维化造模成功,其他用药各组病理程度均较模型组轻,模型组 Masson 染色纤维组织明显增多,其他各组纤维染色不及模型组显著,提示桃红芪术及扶正化瘀胶囊、秋水仙碱对于大鼠肝纤维化具有明显的缓解作用,桃红芪术高剂量组改善较其他组显著。见图 1。第 9 周 HE 染色图片可见造模各组均形成

假小叶,但是用药各组假小叶结构均较模型组有所改善,特别是桃红芪术中剂量组及高剂量组肝组织结构改善最为明显,模型组染色纤维显著增多,用药各组纤维染色增多程度不及模型组。

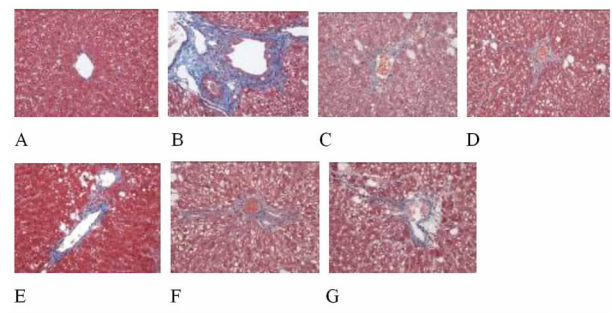


图1 大鼠肝组织(Masson染色,×100)

注:A:空白组;B:模型组;C:桃红芪术低剂量;D:桃红芪术中剂量组;E:桃红芪术高剂量组;F:扶正化瘀胶囊组;G:秋水仙碱组

2.3 对大鼠肝组织 E-Cadherin、Vimentin、TGF-β₁ 蛋白表达的影响 从第9周数据分析,与模型组比较,用药各组 E-cadherin 表达较模型组表达明显增加、TGF-β₁ 表达较模型组明显减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$),用药各组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),其中以桃红芪术软肝煎中剂量组和扶正化瘀胶囊组作用最明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2~4,表2。

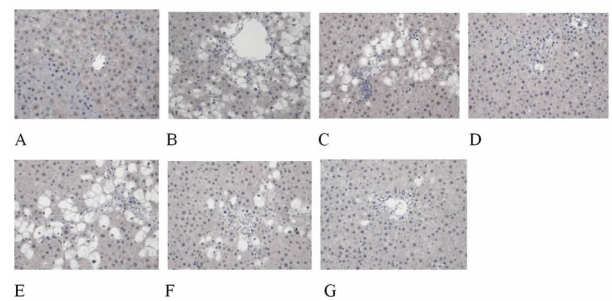


图2 大鼠肝组织 E-Cadherin 蛋白表达 (免疫组织化学法,×20)

注:A:空白组;B:模型组;C:桃红芪术低剂量;D:桃红芪术中剂量组;E:桃红芪术高剂量组;F:扶正化瘀胶囊组;G:秋水仙碱组

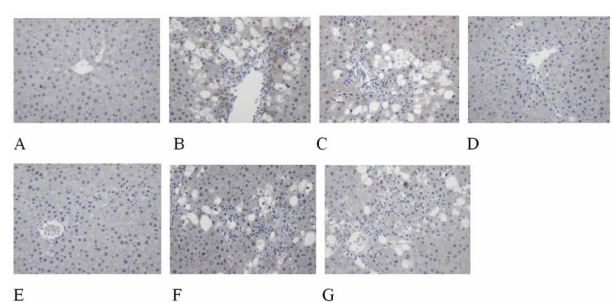


图3 大鼠肝组织 TGF-β₁ 蛋白表达 (免疫组织化学法,×20)

注:A:空白组;B:模型组;C:桃红芪术低剂量;D:桃红芪术中剂量组;E:桃红芪术高剂量组;F:扶正化瘀胶囊组;G:秋水仙碱组

表2 各组大鼠肝组织中 E-cadherin、TGF-β₁、Vimentin 比较($\bar{x} \pm s, A$)

组别	E-cadherin	TGF-β ₁	Vimentin
空白组($n=5$)	0.22 ± 0.06	0.12 ± 0.03	0.15 ± 0.02
模型组($n=5$)	0.12 ± 0.02 *	0.30 ± 0.05 *	0.25 ± 0.09 *
THQL 组($n=5$)	0.22 ± 0.05 Δ	0.17 ± 0.02 Δ	0.17 ± 0.02 Δ
THQM 组($n=5$)	0.22 ± 0.02 Δ	0.14 ± 0.03 Δ	0.19 ± 0.03 Δ
THQH 组($n=4$)	0.21 ± 0.05 Δ	0.18 ± 0.02 Δ	0.15 ± 0.04 Δ
FZHY 组($n=5$)	0.22 ± 0.03 Δ	0.21 ± 0.05 Δ	0.15 ± 0.03 Δ
QXSJ 组($n=5$)	0.18 ± 0.04 Δ	0.19 ± 0.07 Δ	0.19 ± 0.04 Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

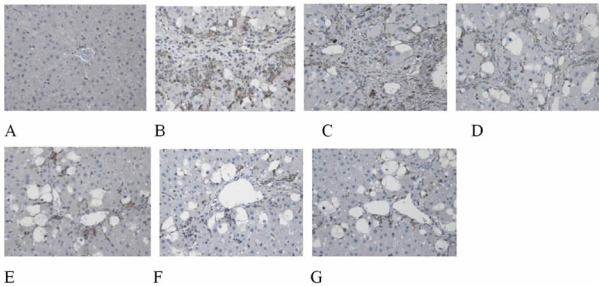


图4 大鼠肝组织 Vimentin 蛋白表达 (免疫组织化学法,1×20)

注:A:空白组;B:模型组;C:桃红芪术低剂量;D:桃红芪术中剂量组;E:桃红芪术高剂量组;F:扶正化瘀胶囊组;G:秋水仙碱组

2.4 对大鼠肝组织 E-Cadherin、Vimentin、TGF-β₁、Smad2 mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示,与空白组比较,模型组 Smad2 mRNA 表达量升高($P < 0.05$),说明造模过程中,Smad2 mRNA 表达上升,促进上皮间质转化,从而发生肝纤维化;桃红芪术低剂量组 TGF-β₁mRNA、Vimentin mRNA、Smad2 mRNA 表达下降($P < 0.05$),桃红芪术软肝煎中剂量组 Smad2 mRNA 表达下降($P < 0.05$);桃红芪术高剂量组 E-cadherin mRNA 表达上升($P < 0.05$),说明桃红芪术软肝煎可以通过下调 Smad2 mRNA 表达,下调 TGF-β 表达,逆转上皮间质转化,其中以桃红芪术软肝煎低剂量组疗效最好。

5.1 大鼠 RT-PCR mRNA 曲线 见图6。

3 讨论

肝纤维化是肝脏受损伤后(如肝脏感染发生乙型肝炎或丙型肝炎、酒精性肝炎、药物性肝病、自身免疫性肝病等)的结果,病理性肝纤维化主要归因于纤维化与基质降解所造成的失衡^[7]。上皮-间充质细胞转化(Epithelial-mesenchymal Transition, EMT)是指在组织重建和多细胞生物胚胎发育中存在的现象^[8],其主要特征为:上皮细胞标志物钙黏蛋白 E-cadherin 表达的降低或缺失;间质细胞表型的获得如 Vimentin 等标志物的升高及细胞形态间质化等。研究发现 EMT 分为3型,其中2型 EMT 与器官纤维化

密切相关^[9]。

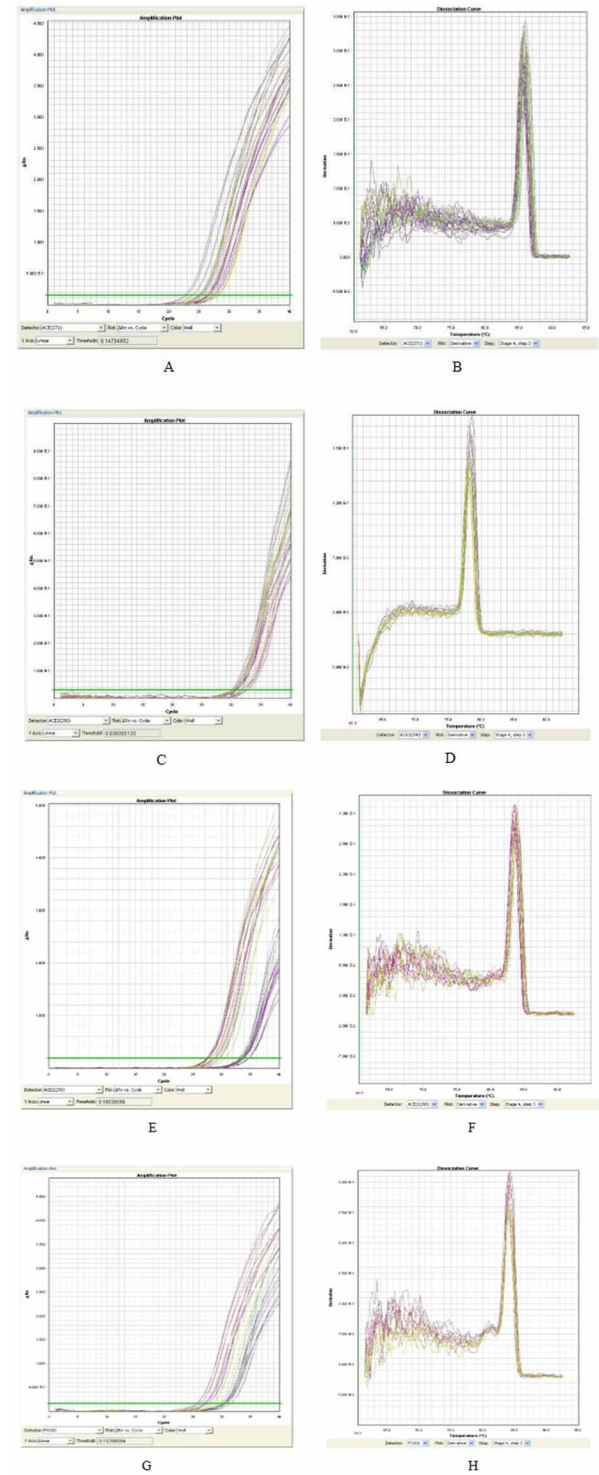


图5 大鼠 RT-PCR mRNA 曲线

注:A:Vimentin mRNA 扩增曲线;B:Vimentin mRNA 熔解曲线;C:Smad2 mRNA 扩增曲线;D:Smad2 mRNA 熔解曲线;E:E-Cadherin mRNA 扩增曲线;F:E-Cadherin mRNA 熔解曲线;G:TGF-β₁ 扩增曲线;H:TGF-β₁ 熔解曲线

许多信号通路参与肝纤维化的过程,有研究认为 TGF-β₁ 是导致肝纤维化最重要的细胞因子^[10]。肝脏受损后,肝脏内 TGF-β₁ 表达明显上升,与 TGF-

β 受体(TGF-beta Receptors,TβR)相结合,并进一步活化下游的 Smad 蛋白(如 Smad2、Smad3、Smad5、Smad8 等),最终导致大量胶原纤维的产生,形成肝纤维化^[11]。在肝纤维化中,TGF-β 诱导肝脏细胞发生 EMT,是成纤维细胞的潜在来源之一^[12]。

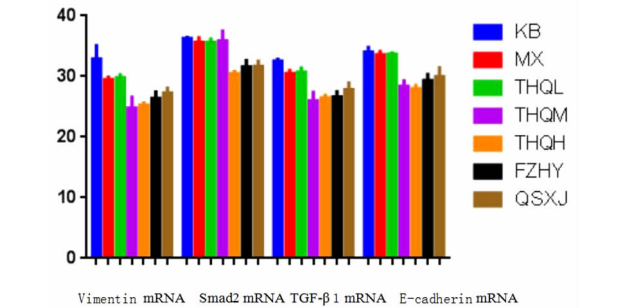


图6 各组大鼠 Vimentin、Smad2、TGF-β₁、E-Cadherin mRNA 表达

目前,肝纤维化动物模型一直是我們从事肝纤维化动物实验研究的重点及难题,李萍等^[13]对 30 只雄性 Wistar 大鼠给予腹腔注射牛血清白蛋白成功制作肝纤维化模型。王晓晗等^[14]通过喂养 C57/B6 雄性小鼠含 0.1% 的 3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢-2,4,6-三甲基吡啶(DDC)饲料成功构建肝纤维化模型。李旭等^[15]给 Wistar 大鼠采用胆总管结扎术的方法制作肝纤维化模型。Fan 等^[16]采用 SD 大鼠腹腔注射 50% CCl₄/橄榄油溶液 0.2 mL/100 g 造模。还有使用复合因素造模者,张贵阳等^[17]曾采用 CCl₄联合高脂低蛋白食物饮食、30% 乙醇饮用水等控制因素的方法制作大鼠肝纤维化模型,6 周即可成模。目前国际常用模型多为单一造模方式,较少使用复合造模方法,避免造模过程中产生较多干扰因素,较经典的模型是 Nakamura 等^[18]对 Wistar 大鼠腹腔注射 1 mL 50% CCl₄/橄榄油溶液 2 次每周制作肝纤维化模型,4~8 周即可成模,本研究采用此种造模方法,第 6 周模型组 HE 染色及 Masson 染色病理图片可见假小叶形成,肝纤维化模型成功形成。金明丽等^[19]研究四氯化碳不同注射方式对于构建大鼠不同分期肝纤维化模型的影响,发现腹腔注射及皮下注射的方式均可以建立大鼠不同分期的肝纤维化模型,但是皮下注射造模死亡率比腹腔注射的死亡率低,但是造模需要的时间较长,2 种注射方式获得有意义的肝纤维化模型无明显差异。

Chen 等^[20]研究发现外源性骨形态生成蛋白可以缓解血吸虫病肝纤维化小鼠的急性期和慢性期进展,并且其机制可能是通过 TGF-β/Smad 信号通路实现的。Tang 等^[21]通过体内、体外实验认为积雪草

酸可能是抗肝纤维化的潜在药物,其机制通过诱导 Smad7 针对 TGF- β /Smad 信号通路诱导的肝纤维化的阻断作用实现的。Zhou 等^[22]将 200 nmol/L 的紫杉醇干预经过人重组 TGF- β_1 诱导因子诱导后的肝星状细胞,发现 Smad2/3 的磷酸化作用,从而抑制胶原纤维 I 和 III 及纤连蛋白的表达,认为紫杉醇可以通过抑制 TGF- β 信号缓解肝纤维化。喻勤等^[23]研究发现荔枝核总黄酮通过抑制 TGF- β_1 及 Smad3,上调 Smad7 减轻二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化损伤程度。赵昉等^[24]发现健脾软肝方可以抑制 TGF- β /Smad 信号通路中 TGF- β_1 、TGF- β R1、及 Smad3、Smad7 的表达,从而缓解 CCl₄ 大鼠肝纤维化程度。牛学敏等^[25]发现益气活血方可以使 TGF- β_1 的 mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。邓莉等^[26]研究认为复方鳖甲软肝片可以通过抑制肝生长因子表达来抗大鼠肝纤维化。张智慧等^[27]认为银杏叶提取物 (GbE) 可以降低 TGF- β_1 的表达,有效防止 CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化的进展。尚双艳^[28]研究发现香附多糖组大鼠的组织金属蛋白酶抑制剂-2 (TIMP-2) 和 TGF- β_1 水平明显低于模型组,提示香附多糖可有效改善肝纤维化大鼠肝脏纤维化。黄晨恺等^[29]熊果酸 (Ursolic Acid, UA) 这种从药用植物中提取出的天然三萜类化合物,能抑制肝脏中 TGF- β 的表达,从而下调下游促纤维化信号通路,减少 I 型胶原的产生。杨欣等^[30]和夏雪皎等^[31]研究得出结论:疏肝健脾活血方可以通过影响大鼠转化生长因子- β_1 /Smad 信号通路传导,从而显著改善肝纤维化大鼠肝组织病理变化,具有不错的抗肝纤维化作用。马滢等^[32]认为丹酚酸 B 在二甲基亚硝胺 (DMN) 诱导肝纤维化-肝癌进程中,可能通过增强 pSmad3C/p21 介导的抑癌信号来减弱 pSmad3L/PAI-1/c-Myc 介导的促纤维化-癌变信号,从而阻碍肝纤维化向肝癌发展的进程。张可锋等^[33]发现七味净肝灵的高、中剂量组大鼠的肝纤维化病变程度比模型组减轻明显,从而得出结论:七味净肝灵对于 DMN 诱导的大鼠肝纤维化具有显著的改善作用,其机制可能与抑制 TGF- β_1 的表达有关。张玉等^[34]研究发现二氢杨梅素 (Dihydromyricetin, DHM) 能够通过抑制 TGF- β_1 /Smad 信号通路介导的细胞外基质从而抑制 HSC-T6 细胞的活化。杨文明等^[35]观察发现肝豆扶木汤可以降低 TX 小鼠肝纤维化血清学指标,作用机制可能是抑制 TGF- β_1 和 Smad2 蛋白的表达以及上调 Smad7 蛋白的表达。吕建林等^[36]研究发现海珠益

肝化纤方可降低肝纤维化大鼠 α -SMA 和 TGF β_1 的表达从而抑制肝纤维化的进展。章圣朋等^[37]认为夏枯草总三萜通过下调 p-ERK 表达和调控 TGF- β_1 /Smad 信号通路保护肝脏。张家富等^[38]观察肝乐颗粒中、高剂量组可以减轻肝组织病理损伤程度,减少胶原纤维沉积,还可以显著降低 Smad2, Collagen I, TGF- β_1 , T β R I 蛋白及 mRNA 的表达。

在肝纤维化过程中,肝脏内胶原纤维组织增加,造成肝脏重量增加;肝纤维化时,肝组织受损后,门静脉系统血液回流受阻,压力增高,脾静脉回流受阻,造成脾脏瘀血,最终导致脾脏增大,本研究发现桃红芪术软肝煎可以降低 CCl₄ 大鼠肝纤维化的肝脾值,缓解肝脾淤血情况;增加肝纤维化大鼠体重,改善营养状况;随着造模给药时间的延长,各给药组均有阻断模型大鼠肝组织纤维化进展的功效,以桃红芪术软肝煎中、高剂量组作用最为明显;免疫组织化学蛋白表达结果及 RT-PCR mRNA 结果显示桃红芪术软肝煎可上调 E-cadherin,下调 TGF- β 及 Vimentin、Smad2 蛋白表达,提示桃红芪术软肝煎可能通过调节 TGF- β /Smad 信号通路,降低 Smad2 蛋白表达,从而下调 TGF- β 、Vimentin,上调 E-cadherin 表达,发挥改善上皮间质转化、治疗肝纤维化的作用。

结合动物实验肝脾指数、病理染色、免疫组织化学及 RT-PCR 结果,可以看出桃红芪术软肝煎中、高剂量均有较好的治疗肝纤维化的作用,对比扶正化瘀胶囊和秋水仙碱组,也有较好的疗效。扶正化瘀胶囊由虫草、绞股蓝、松花粉、五味子、桃仁、丹参等药物组成^[39],具活血祛瘀,益精养肝之效。已被证实对于治疗肝纤维化具有较好疗效^[40-46]。西医对于肝纤维化没有特效用药,研究发现秋水仙碱可以刺激胶原酶的活性,促进胶原的降解^[47],孙嘉临和王先化^[48]发现秋水仙碱可以降低肝纤维化大鼠血清中的肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF- α) 和干扰素- γ (IFN- γ),通过抑制炎症反应来缓解肝纤维化。研究证明,桃红芪术软肝煎与中成药扶正化瘀胶囊、西药秋水仙碱具有相同甚至更好的疗效,因此,桃红芪术软肝煎有希望成为治疗肝纤维化的潜在用药,有待于临床疗效的验证。

参考文献

- [1] Zhang B, Wang Z, Deng B, et al. Identification of Enolase 1 and Thrombospondin-1 as serum biomarkers in HBV hepatic fibrosis by proteomics[J]. Proteome Sci, 2013, 11(1): 30.
- [2] Lim YS, Kim WR. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease[J]. Clin Liver Dis, 2008, 12(4): 733-746, vii.
- [3] Bissell DM. Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer[J]. Exp Mol Med, 2001, 33(4): 179-190.

- [4] Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver[J]. *Hepatology*, 2001, 34(5): 859-867.
- [5] Li R, Xu L, Liang T, et al. Puerarin mediates hepatoprotection against CCl₄-induced hepatic fibrosis rats through attenuation of inflammation response and amelioration of metabolic function[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 52: 69-75.
- [6] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6): 324-329.
- [7] Lin HJ, Chen JY, Lin CF, et al. Hepatoprotective effects of Yi Guan Jian, an herbal medicine, in rats with dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(3): 953-960.
- [8] 盛霞, 刘红胜, 沈晶莹, 等. CD151 及整合素 $\alpha 6$ 在肠癌中的表达及其与上皮间质转化的关系[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(5): 852-856.
- [9] Firrincieli D, Boissan M, Chignard N. Epithelial-mesenchymal transition in the liver[J]. *Gastroenterol Clin Biol*, 2010, 34(10): 523-528.
- [10] 李欣, 朱英. 肝纤维化发生相关信号传导通路研究进展[J]. *实用肝脏病杂志*, 2015, 18(1): 101-104.
- [11] 吕涛. TGF- $\beta 1$ /Smad 信号传导通路与肝纤维化[J]. *河北医科大学学报*, 2012, 33(6): 735-740.
- [12] 汤志杰, 张茂娜, 陈莉. 肝癌和肝纤维化发生 EMT 及相关信号通路的分子机制[J]. *实用癌症杂志*, 2014, 29(1): 113-116.
- [13] 李萍, 杨秋辉, 王俊岭, 等. 吡菲尼酮对牛血清蛋白诱导的肝纤维化大鼠肝损伤的保护作用观察[J]. *实用肝脏病杂志*, 2015, 18(1): 63-66.
- [14] 王晓娟, 艾罗燕, 许青青, 等. A20 在肝纤维化小鼠肝组织中的表达及相关研究[J]. *肝脏*, 2015, 20(1): 27-29.
- [15] 李旭, 蔡大明, 宁佐伟, 等. 螺内酯对肝纤维化大鼠肝窦血管生成的抑制作用[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(8): 1135-1138, 1142.
- [16] Fan W, Shi B, Wei H, et al. Γ -aminobutyric acid B receptor improves carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(7): 1909-1915.
- [17] 张贵阳, 杨卫平, 陈皓. 肝硬化动物模型构建的研究进展[J]. *外科理论与实践*, 2008, 13(3): 266-269.
- [18] Nakamura T, Akiyoshi H, Saito I, et al. Adenovirus-mediated gene expression in the septal cells of cirrhotic rat livers[J]. *J Hepatol*, 1999, 30(1): 101-106.
- [19] 金明丽, 潘志华, 舒健, 等. 四氯化碳不同注射方式诱导大鼠不同分期肝纤维化模型的研究[J]. *四川医学*, 2018, 39(3): 270-272.
- [20] Chen BL, Peng J, Li QF, et al. Exogenous bone morphogenetic protein-7 reduces hepatic fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected mice via transforming growth factor- β /Smad signaling[J]. *World J Gastroenterol* 2013, 19(9): 1405-1415.
- [21] Tang LX, He RH, Yang G, et al. Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF- β /Smad signaling in vivo and in vitro[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31350.
- [22] Zhou J, Zhong DW, Wang QW, et al. Paclitaxel ameliorates fibrosis in hepatic stellate cells via inhibition of TGF- β /Smad activity[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(26): 3330-3334.
- [23] 喻勤, 傅向阳, 罗伟生, 等. 荔枝核总黄酮对大鼠肝纤维化 TGF- β /Smad 信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(18): 223-227.
- [24] 赵昉, 罗大有, 谢慧珊, 等. 健脾软肝方对肝纤维化 TGF- β /Smad 细胞信号转导通路的影响[J]. *中药材*, 2012, 35(4): 617-620.
- [25] 牛学敏, 王宝玉, 王洋, 等. PTEN 在 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠模型中的作用及益气活血方对其的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(1): 122-128.
- [26] 邓莉, 申宝德, 刘园, 等. 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[J]. *中草药*, 2018, 49(6): 1371-1378.
- [27] 张智慧, 陈芝芸, 叶蕾, 等. 银杏叶提取物对肝纤维化大鼠肝血管紧张素 II 及其受体表达的影响[J]. *浙江中医杂志*, 2018, 53(2): 91-93.
- [28] 尚双艳, 高翔. 香附多糖对牛血清白蛋白诱导的肝纤维化大鼠血清 MMP-2、TIMP-2 和 TGF- $\beta 1$ 水平的影响[J]. *实用肝脏病杂志*, 2018, 21(1): 42-45.
- [29] 黄晨恺, 甘达凯, 张望, 等. 熊果酸对肝纤维化大鼠 NOX2/ROS/NLRP3 炎性小体活化的影响[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(4): 485-491.
- [30] 杨欣, 李清林, 陈卓辉, 等. 疏肝健脾活血方对肝纤维化过程中大鼠 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4): 1694-1698.
- [31] 夏雪皎, 林庚庭, 滕飞, 等. 疏肝健脾活血方对肝纤维化大鼠肝组织 HIF-1 α 蛋白及 VEGF mRNA 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(4): 1357-1360.
- [32] 马滢, 方萌, 伍超, 等. 丹酚酸 B 调控 pSmad3C/pSmad3L 发挥抗肝纤维化-肝细胞癌作用[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(1): 44-50.
- [33] 张可锋, 黄思茂, 陈毅飞, 等. 七味净肝灵对二甲亚硝胺诱导肝纤维化大鼠的保护作用及其作用机制[J]. *中药材*, 2018, 4(2): 464-467.
- [34] 张玉, 周曦, 易龙, 等. 二氢杨梅素通过 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路抑制肝星状细胞活化的作用研究[J]. *第三军医大学学报*, 2018, 40(4): 282-289.
- [35] 杨文明, 唐露露, 谢文婷, 等. 肝豆扶木汤对 TX 小鼠肝纤维化 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(4): 404-407.
- [36] 吕建林, 冉思邈, 陈永洪, 等. 海珠益肝化纤方对肝纤维化大鼠 α -SMA 和 TGF $\beta 1$ 表达影响的研究[J]. *大众科技*, 2018, 20(1): 42-44.
- [37] 章圣朋, 何勇, 徐涛, 等. 夏枯草总三萜调控 ERK、TGF- $\beta 1$ /Smad 通路对肝纤维化大鼠的保护作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(2): 261-266.
- [38] 张家富, 姜辉, 高家荣, 等. 肝乐颗粒对肝纤维化大鼠 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路的调控作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(6): 169-174.
- [39] Sun S, Dai J, Wang W, et al. Metabonomic Evaluation of ZHENG Differentiation and Treatment by Fuzhenghuayu Tablet in Hepatitis-B-Caused Cirrhosis[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 453503.
- [40] Liu C, Hu Y, Xu L, et al. Effect of Fuzheng Huayu formula and its actions against liver fibrosis[J]. *Chin Med*, 2009, 4: 12.
- [41] Wang QL, Yuan JL, Tao YY, et al. Fuzheng Huayu recipe and vitamin E reverse renal interstitial fibrosis through counteracting TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(3): 631-640.
- [42] 任公平, 张忠敏, 孙琳林, 等. 扶正化瘀方对大鼠肝癌前病变细胞周期调控的影响[J]. *临床医学工程*, 2011, 18(11): 1699-1700.
- [43] 王路冰, 闫秀川, 曾贞, 等. 扶正化瘀方与黄芪汤合用对实验性肝硬化大鼠的治疗作用[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(13): 1740-1744.
- [44] 姜春萌, 刘成海, 刘成. 扶正化瘀胶囊对肝星状细胞激活的干预[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2003, 11(5): 280-283.
- [45] 刘崇敏, 胡坪, 李医明, 等. 扶正化瘀复方有效组分群的配伍筛选和验证[J]. *上海中医药大学学报*, 2014, 28(6): 85-90.
- [46] 肖作汉. 扶正化瘀胶囊结合常规疗法治疗慢性乙型肝炎肝纤维化 104 例[J]. *上海中医药杂志* 2014, 48(2): 29-30.
- [47] 梁扩寰. *肝脏病学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 571-587.
- [48] 孙嘉临, 王先化. 秋水仙碱对实验性大鼠肝纤维化的影响[J]. *中国现代医生*, 2012, 50(14): 1-2.