

# 黄水枝醇提物对CCl<sub>4</sub>致小鼠肝纤维化的改善作用及其机制初探<sup>Δ</sup>

黄甫静<sup>1\*</sup>,张金娟<sup>2</sup>,董莉<sup>1</sup>,李雕<sup>1</sup>,张春雷<sup>1</sup>,廖尚高<sup>1</sup>,何迅<sup>1#</sup>(1.贵州医科大学药学院,贵阳 550025;2.贵州医科大学基础医学院,贵阳 550025)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)14-1685-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.14.04

**摘要** 目的:考察黄水枝醇提物(TPME)对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)致小鼠肝纤维化的改善作用,并初步探讨其可能的作用机制。方法:将60只雄性昆明种小鼠按体质量随机分为正常组、模型组、阳性对照组(秋水仙碱0.1 mg/kg)和TPME低、中、高剂量组(250、500、1 000 mg/kg),每组10只。除正常组外,其余各组小鼠均腹腔注射20% CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液诱导肝纤维化,每周2次,连续8周。从建模的第5周起,各给药组小鼠灌胃相应药液,正常组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续4周。末次给药12 h后,称定各组小鼠肝脏质量并计算肝指数,检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)、Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)、Ⅳ型胶原(C-Ⅳ)、层粘连蛋白(LN)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素6(IL-6)含量;采用Western blot法检测肝组织中α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、转化生长因子β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>)和Smad3蛋白的表达水平;以苏木精-伊红(HE)、Masson染色后观察肝组织病理变化。结果:与正常组比较,模型组小鼠肝指数和血清中ALT、AST活性以及MDA、PC-Ⅲ、C-Ⅳ、LN、TNF-α、IL-6含量均显著升高,SOD活性显著降低( $P<0.01$ ),肝组织中α-SMA、TGF-β<sub>1</sub>和Smad3蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.01$ ),镜下可见肝组织出现明显的纤维化病变。与模型组比较,阳性对照组和TPME各剂量组小鼠肝指数和血清中ALT、AST活性以及MDA、PC-Ⅲ、C-Ⅳ、LN、TNF-α、IL-6含量均显著降低,SOD活性均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),肝组织中α-SMA、TGF-β<sub>1</sub>和Smad3蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),镜下可见肝纤维化病变均有不同程度的改善。与TPME低剂量组比较,TPME高剂量组小鼠血清中PC-Ⅲ、LN、IL-6含量和肝组织中TGF-β<sub>1</sub>、Smad3蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。结论:TPME对CCl<sub>4</sub>诱导的小鼠肝纤维化具有一定的改善作用,该作用可能与抑制胶原合成、抑制氧化应激反应、降低炎症因子含量、下调α-SMA和TGF-β<sub>1</sub>/Smad信号通路相关蛋白的表达有关。

**关键词** 黄水枝;肝纤维化;炎症反应;氧化应激;转化生长因子β<sub>1</sub>/Smad信号通路;小鼠

## Preliminary Study on Improvement Effect of *Tiarella polyphylla* Ethanol Extract on CCl<sub>4</sub>-induced Hepatic Fibrosis in Mice and Its Mechanism

HUANG Fujing<sup>1</sup>, ZHANG Jinjuan<sup>2</sup>, DONG Li<sup>1</sup>, LI Diao<sup>1</sup>, ZHANG Chunlei<sup>1</sup>, LIAO Shanggao<sup>1</sup>, HE Xun<sup>1</sup>(1. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the improvement effect of *Tiarella polyphylla* ethanol extract (TPME) on CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in mice, and to explore its possible mechanism preliminarily. METHODS: Totally 60 male Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, positive control group (colchicine 0.1 mg/kg), TPME low-dose, medium-dose and high-dose groups (250, 500, 1 000 mg/kg) according to body weight, with 10 mice in each group. Except for normal group, other groups were given 20% CCl<sub>4</sub> olive oil solution intraperitoneally to induce hepatic fibrosis, twice a week, for consecutive 8 weeks. From the fifth week after modeling, administration groups were given relevant medicine intragastrically, normal group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 4 weeks. Twelve hours after last administration, the liver weight of mice in each group was measured and the liver index was calculated. The serum contents of ALT, AST, SOD, MDA, PC-Ⅲ, C-Ⅳ, LN, TNF-α and IL-6 were determined. Western blot assay was used to detect the protein expression of α-SMA, TGF-β<sub>1</sub> and Smad3 in liver tissue. HE and Masson staining were used to observe the pathological changes of hepatic tissue. RESULTS: Compared with normal group, the liver index, the activities of ALT and AST and the contents of MDA,

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.U1812403);贵州省高层次创新型人才“百层次人才”项目(No.黔科合平台人才[2020]6011)

\* 硕士研究生。研究方向:中药物质基础及作用机制。E-mail: hfjsznd8@126.com

# 通信作者:教授,硕士生导师,硕士。研究方向:中药新药研发、物质基础及质量控制。E-mail:2812878586@qq.com

LN, PC-Ⅲ, C-Ⅳ, LN, TNF-α and IL-6 in serum were increased significantly, while the activity of SOD was decreased significantly in model group ( $P<0.01$ ); the protein expression of α-SMA, TGF-β<sub>1</sub> and Smad3 in liver tissues were increased significantly ( $P<0.01$ ). Obvious fibrosis lesions was observed in liver tissue. Compared with model group, the live indexes, the activities of ALT and AST, the contents of

MDA, PC-Ⅲ, C-Ⅳ, LN, TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum were decreased significantly in positive control group and TPME groups, while the activities of SOD were increased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The protein expression of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta_1$  and Smad3 in liver tissue were decreased significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and liver fibrosis was improved to different extent. Compared with TPME low-dose group, the contents of PC-Ⅲ, LN and IL-6 in serum, protein expression of TGF- $\beta_1$  and Smad3 in liver tissue were decreased significantly in TPME high-dose group ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: TPME can improve hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in mice, the mechanism of which may be associated with the inhibition of collagen synthesis and oxidative stress, the reduction of inflammatory factors, and the down-regulation of the expression  $\alpha$ -SMA and relative proteins of TGF- $\beta_1$ /Smad signal pathway.

**KEYWORDS** *Tiarella polyphylla*; Hepatic fibrosis; Inflammation response; Oxidative stress; TGF- $\beta_1$ /Smad signal pathway; Mice

肝纤维化(hepatic fibrosis)是肝脏遭到病毒、自由基、炎症因子等损伤因素攻击时出现的损伤-修复反应,是各种慢性肝病向肝硬化乃至肝癌发展的中间环节<sup>[1]</sup>。研究表明,肝纤维化具有可逆性<sup>[2]</sup>,抑制并逆转肝纤维化对阻止慢性肝病向肝硬化、肝癌发展具有重要意义。

目前,临床上尚无有效的肝纤维化治疗药物<sup>[3]</sup>。因此,寻找有效的抗肝纤维化药物成为了药物研发者的重要任务之一。近年来,越来越多的基础和临床研究均发现,中医药对肝纤维化有良好的治疗作用<sup>[4-6]</sup>,已成为了近年来抗肝纤维化药物研究的热点。黄水枝 *Tiarella polyphylla* D. Don 为虎耳草科植物,具有活血祛瘀、消肿止痛的功效;其主要化学成分为黄酮类、三萜皂苷类、挥发油等,具有抗肿瘤、抗补体、抗哮喘、保肝等方面的作用<sup>[7-8]</sup>。本课题组在前期研究中发现,黄水枝醇提物(TPME)具有抑制人肝星状细胞(HSC)——LX-2 细胞增殖的活性,故推测其具有抗纤维化的作用。为了验证此推测,本研究采用四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导建立小鼠肝纤维化模型,观察 TPME 对模型小鼠肝纤维化的改善作用,并对其可能的作用机制进行初步探讨,旨在为寻找有效的抗肝纤维化药物奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括 ELX-800 型全波段多功能酶标仪、Universal Hood II 型凝胶成像分析仪(美国 BioTek 公司),TGL16M 型高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司),CP124C 型电子天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司],Eclipse E100 型正置光学显微镜(日本 Nikon 公司),ZYCGF-II-10T 型超纯水机(四川卓越水处理设备有限公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

黄水枝全草(批号 202010)由昆明采智生物技术有限公司提供,采集地为湖北省恩施市建始县芭蕉乡,经贵州医科大学龙庆德副教授鉴定为黄水枝 *T. polyphylla* D. Don 的全草;秋水仙碱对照品(批号 S15A8C34051,纯度  $\geq 99\%$ )购自上海源叶生物科技有限公司;天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒、丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒[水溶性四氮唑法(WST-1)]、

丙二醛(MDA)试剂盒[硫代巴比妥酸法(TBA)](批号分别为 20201204、20201207、20201230、20201223)均购自南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ,批号 M2001106-102a)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购自深圳欣博盛生物科技有限公司;白细胞介素 6(IL-6,批号 Nov 2020)ELISA 试剂盒购自河南九邦生物科技有限公司;Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)ELISA 试剂盒、Ⅳ型胶原(C-Ⅳ)ELISA 试剂盒(批号分别为 L210104920、L210104913)均购自武汉云克隆科技股份有限公司;层粘连蛋白(LN)ELISA 试剂盒(批号 A22011449)购自武汉华美生物工程有限公司;苏木精-伊红(HE)、Masson 染料(批号分别为 ZH203012、CR2101109)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;高效 RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒、彩虹 180 广谱蛋白 marker、ECL Plus 超敏发光液(批号分别为 R0010、PC0020、P1200、PR1910、PE0010)均购自北京索莱宝科技有限公司;SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 $\times$ ,批号 121817171214)购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗鼠转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)单克隆抗体(批号分别为 ab179695、ab124964)均购自美国 Abcam 公司;兔抗鼠 Smad3 单克隆抗体(批号 L1602077)购自北京博奥森生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗(批号 9300014001)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(批号 T0004)购自美国 Affinity 公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(批号 P2938)购自德国 Merck 公司;其余试剂均为分析纯或者实验室常用规格,水为超纯水。

### 1.3 实验动物

本研究所用实验动物为 SPF 级雄性昆明种小鼠,60 只,体质量 18~22 g,由贵州医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(黔)2018-0001。小鼠饲养环境通风良好,温度 18~25 $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 40%~70%,12 h 光照昼夜循环。相关动物实验方案通过了贵州医科大学实验动物伦理委员会审查批准(编号 2000069)。

## 2 方法

### 2.1 TPME的制备

取黄水枝全草,粉碎成粗粉,过24目筛;称取粗粉200 g,第1次加入甲醇2 000 mL,浸泡1 h后,加热回流提取1 h;第2次加入等体积甲醇,加热回流提取1 h;合并两次提取液,滤过,取滤液,减压回收溶剂,冷冻干燥后即得干浸膏44.58 g,提取率为22.29%。

### 2.2 分组、造模与给药

造模方法根据文献[9]及预实验结果确定,按体质量随机将60只雄性昆明种小鼠分为正常组、模型组、阳性对照组(秋水仙碱0.1 mg/kg)和TPME低、中、高剂量组(250、500、1 000 mg/kg,剂量按临床用药剂量的0.5、1、2倍设置),每组10只。除正常组小鼠腹腔注射等体积橄榄油外,其余5组小鼠均腹腔注射20% CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液(橄榄油与CCl<sub>4</sub>的体积比为4:1)1 mL/kg以建立肝纤维化模型,每周2次,连续8周。从造模的第5周起,正常组、模型组小鼠灌胃等体积生理盐水,各给药组小鼠灌胃相应药液(以生理盐水为溶剂),每天1次,连续4周。末次给药后,所有小鼠均禁食、不禁水12 h,再称定其体质量;腹腔注射戊巴比妥进行麻醉,于眼眶取血约1 mL,常温静置2 h,以3 500 r/min离心15 min,取血清,保存于-20 ℃,备用。采血后,脱颈椎处死小鼠,剖取其肝脏,称定质量,部分肝组织固定于4%多聚甲醛溶液中保存,备用;另一部分肝组织于-80 ℃冰箱中保存,备用。

### 2.3 脏器指数计算

计算各组小鼠末次给药后的肝指数:肝指数=肝质量/末次体质量×100%。

### 2.4 血清生化指标检测

采用微板法以酶标仪检测各组小鼠血清中ALT、AST的活性,ELISA法以酶标仪检测血清中PC-III、C-IV、LN、TNF- $\alpha$ 、IL-6的含量,TBA法以酶标仪检测血清中MDA的含量,WST-1法以酶标仪检测血清中SOD的活性。上述检测均严格按相应试剂盒说明书操作。

### 2.5 肝组织中 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta_1$ 、Smad3蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取于-80 ℃冻存的肝组织,复温后,称取每个肝组织样本100 mg,加高效RIPA裂解液1 mL,于冰上匀浆,再于4 ℃下以12 000 r/min离心10 min,取上清液,即得各组小鼠肝组织蛋白。采用BCA法测定肝组织样本的蛋白浓度,加入5×蛋白上样缓冲液,于100 ℃加热5 min变性;取变性蛋白进行10% SDS-PAGE,采用湿转法转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉室温封闭1.5 h;用TBST缓冲液清洗10 min×3次后,分别加入 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta_1$ 、Smad3、GAPDH一抗(稀释比例均为1:1 000),4 ℃孵育过夜;用TBST缓冲液清洗10 min×3次后,加入山羊抗兔IgG二抗(稀

释比例为1:3 000),室温孵育1 h;用TBST缓冲液清洗10 min×3次,用ECL Plus超敏发光液显影并置于凝胶成像分析仪上成像。采用Image J 1.8.0软件分析条带的灰度值,以目标蛋白与内参GAPDH的灰度值比值作为目标蛋白的表达水平。

### 2.6 肝组织病理学观察

取固定于4%多聚甲醛溶液中的肝组织,经乙醇脱水、石蜡包埋后切片,分别经HE、Masson染色后,于光学显微镜下观察各组小鼠肝组织的病理学变化。

### 2.7 统计学方法

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析。所有数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时两两比较采用LSD检验,方差不齐时则采用Dunnett's *T*<sub>3</sub>检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 TPME对肝纤维化模型小鼠肝指数的影响

与正常组比较,模型组小鼠的肝指数显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,阳性对照组和TPME各剂量组小鼠的肝指数均显著降低( $P<0.01$ ),而TPME各剂量组上述指标组间比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),详见表1。

表1 TPME对肝纤维化模型小鼠肝指数的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ , %)

Tab 1 Effects of TPME on liver index in hepatic fibrosis model mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ , %)

组别	剂量,mg/kg	肝指数
正常组		4.36±0.25
模型组		5.49±0.23**
阳性对照组	0.1	4.52±0.24**
TPME低剂量组	250	4.40±0.26**
TPME中剂量组	500	4.34±0.39**
TPME高剂量组	1 000	4.17±0.32**

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,\*\* $P<0.01$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, \*\* $P<0.01$

### 3.2 TPME对肝纤维化模型小鼠血清中ALT和AST活性的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清中ALT和AST的活性均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,阳性对照组和TPME各剂量组小鼠血清中ALT和AST的活性均显著降低( $P<0.01$ ),而TPME各剂量组上述指标组间比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),详见表2。

### 3.3 TPME对肝纤维化模型小鼠血清中PC-III、C-IV、LN含量的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清中PC-III、C-IV、LN的含量均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,阳性对照组和TPME各剂量组小鼠血清中PC-III、C-IV、LN的

含量均显著降低( $P<0.01$ )。与 TPME 低剂量组比较, TPME 高剂量组小鼠血清中 PC-III、LN 的含量均显著降低( $P<0.05$ ), 详见表 3。

表 2 TPME 对肝纤维化模型小鼠血清中 ALT 和 AST 活性的影响( $\bar{x}\pm s, n=10, U/L$ )

Tab 2 Effects of TPME on serum activities of ALT and AST in hepatic fibrosis model mice( $\bar{x}\pm s, n=10, U/L$ )

组别	剂量,mg/kg	ALT	AST
正常组		30.94±3.64	28.85±4.88
模型组		97.15±14.15**	81.57±8.34**
阳性对照组	0.1	53.76±11.97 <sup>##</sup>	55.86±10.92 <sup>##</sup>
TPME 低剂量组	250	36.46±7.41 <sup>##</sup>	42.08±4.47 <sup>##</sup>
TPME 中剂量组	500	38.77±6.72 <sup>##</sup>	40.02±5.80 <sup>##</sup>
TPME 高剂量组	1 000	31.96±5.48 <sup>##</sup>	39.37±7.02 <sup>##</sup>

注:与正常组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.01$

表 3 TPME 对肝纤维化模型小鼠血清中 PC-III、C-IV 和 LN 含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=10, ng/mL$ )

Tab 3 Effects of TPME on serum contents of PC-III, C-IV and LN in hepatic fibrosis model mice( $\bar{x}\pm s, n=10, ng/mL$ )

组别	剂量,mg/kg	PC-III	C-IV	LN
正常组		9.94±2.34	26.94±8.64	59.56±12.35
模型组		46.79±13.25**	122.27±17.06**	137.64±21.46**
阳性对照组	0.1	25.79±14.32 <sup>##</sup>	24.63±5.65 <sup>##</sup>	87.44±9.14 <sup>##</sup>
TPME 低剂量组	250	16.16±5.85 <sup>##</sup>	79.40±18.23 <sup>##</sup>	103.87±21.93 <sup>##</sup>
TPME 中剂量组	500	11.48±7.01 <sup>##</sup>	79.02±8.61 <sup>##</sup>	90.73±14.19 <sup>##</sup>
TPME 高剂量组	1 000	9.52±3.05 <sup>##Δ</sup>	78.78±19.14 <sup>##</sup>	65.99±18.78 <sup>##Δ</sup>

注:与正常组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P<0.01$ ;与 TPME 低剂量组比较, <sup>Δ</sup> $P<0.05$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. TPME low-dose group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$

### 3.4 TPME 对肝纤维化模型小鼠血清中 MDA 含量和 SOD 活性的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清中 MDA 的含量显著升高, SOD 的活性显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,阳性对照组和 TPME 各剂量组小鼠血清中 MDA 的含量均显著降低, SOD 的活性均显著升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 而 TPME 各剂量组上述指标组间比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ), 详见表 4。

### 3.5 TPME 对肝纤维化模型小鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 含量的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 的含量均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,阳性对照组和 TPME 各剂量组小鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 的含量均显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与 TPME 低剂量组比较, TPME 高剂量组小鼠血清中 IL-6 的含量显著降低( $P<0.05$ ), 详见表 5。

表 4 TPME 对肝纤维化模型小鼠血清中 MDA 含量和 SOD 活性水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab 4 Effects of TPME on MDA content and SOD activity in serum of hepatic fibrosis model mice( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量,mg/kg	MDA, nmol/mL	SOD, U/mL
正常组		5.68±0.95	106.26±0.73
模型组		16.43±1.76**	72.62±3.02**
阳性对照组	0.1	8.09±0.99 <sup>##</sup>	80.94±1.87 <sup>##</sup>
TPME 低剂量组	250	6.05±0.72 <sup>##</sup>	80.87±1.10 <sup>##</sup>
TPME 中剂量组	500	6.19±0.58 <sup>##</sup>	82.39±2.43 <sup>##</sup>
TPME 高剂量组	1 000	5.96±1.02 <sup>##</sup>	83.25±3.64 <sup>##</sup>

注:与正常组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P<0.05$ , <sup>###</sup> $P<0.01$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.05$ ,

<sup>###</sup> $P<0.01$

表 5 TPME 对肝纤维化模型小鼠血清中 TNF-α 和 IL-6 含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=10, pg/mL$ )

Tab 5 Effects of TPME on serum contents of TNF-α and IL-6 in hepatic fibrosis model mice( $\bar{x}\pm s, n=10, pg/mL$ )

组别	剂量,mg/kg	TNF-α	IL-6
正常组		224.12±7.50	97.93±12.55
模型组		336.12±24.72**	156.57±23.72**
阳性对照组	0.1	244.36±16.93 <sup>##</sup>	102.90±10.37 <sup>##</sup>
TPME 低剂量组	250	221.40±16.96 <sup>##</sup>	130.60±14.12 <sup>##</sup>
TPME 中剂量组	500	207.24±13.15 <sup>##</sup>	102.66±4.40 <sup>##</sup>
TPME 高剂量组	1 000	209.64±19.72 <sup>##</sup>	104.11±19.81 <sup>##Δ</sup>

注:与正常组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P<0.05$ , <sup>###</sup> $P<0.01$ ;与 TPME 低剂量组比较, <sup>Δ</sup> $P<0.05$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.05$ , <sup>###</sup> $P<0.01$ ; vs. TPME low-dose group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$

### 3.6 TPME 对肝纤维化模型小鼠肝组织中 α-SMA、TGF-β<sub>1</sub>、Smad3 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠肝组织中 α-SMA、TGF-β<sub>1</sub>、Smad3 蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,阳性对照组和 TPME 各剂量组小鼠肝组织中 α-SMA、TGF-β<sub>1</sub>、Smad3 蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与 TPME 低剂量组比较, TPME 高剂量组小鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 和 Smad3 蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.05$ ), 详见图 1、表 6。

### 3.7 TPME 对肝纤维化模型小鼠肝组织病理学变化的影响

HE 染色显示,正常组小鼠的肝小叶结构完整、清晰,肝细胞以汇管区或中央静脉为中心向四周呈放射状排列,肝组织未见明显肝实质细胞病变及炎症细胞浸润;模型组小鼠的肝细胞排列紊乱且有部分肝细胞坏死,肝组织结构被破坏,可见炎症细胞浸润和脂肪空泡;阳性对照组和 TPME 各剂量组小鼠肝组织上述病理改变均有不同程度缓解,详见图 2。

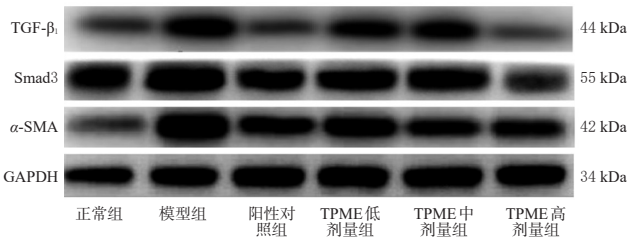


图1 TPME对肝纤维化模型小鼠肝组织中 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta_1$ 、Smad3蛋白表达影响的电泳图

Fig 1 Electrophoretograms of the effects of TPME on the protein expression of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta_1$  and Smad3 in liver tissue of hepatic fibrosis model mice

表6 TPME对肝纤维化模型小鼠肝组织中 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta_1$ 、Smad3蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 6 Effects of TPME on the protein expression of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta_1$  and Smad3 in liver tissue of hepatic fibrosis model mice( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量,mg/kg	$\alpha$ -SMA	TGF- $\beta_1$	Smad3
正常组		0.96 $\pm$ 0.06	0.83 $\pm$ 0.09	0.90 $\pm$ 0.08
模型组		2.08 $\pm$ 0.09**	2.72 $\pm$ 0.08**	1.92 $\pm$ 0.14**
阳性对照组	0.1	1.31 $\pm$ 0.09##	0.88 $\pm$ 0.08##	1.27 $\pm$ 0.11#
TPME低剂量组	250	1.63 $\pm$ 0.12#	1.97 $\pm$ 0.15 <sup>†</sup>	1.37 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>
TPME中剂量组	500	1.26 $\pm$ 0.08##	1.92 $\pm$ 0.09##	1.49 $\pm$ 0.02 <sup>†</sup>
TPME高剂量组	1 000	1.10 $\pm$ 0.16##	1.00 $\pm$ 0.09## <sup>‡</sup>	0.95 $\pm$ 0.12## <sup>‡</sup>

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与TPME低剂量组比较,<sup>†</sup> $P<0.05$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. TPME low-dose group, <sup>†</sup> $P<0.05$

Masson染色显示,正常组小鼠肝组织仅在中央静脉和汇管区有少量胶原沉积,未见增生的纤维组织;模型组小鼠肝组织汇管区出现大量胶原沉积,增生的纤维组织形成的纤维条索将相邻的汇管区连接形成假小叶;阳性对照组和TPME各剂量组小鼠肝组织中的胶原沉积均有不同程度减少,肝纤维化程度均有所减轻,详见图3。

#### 4 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化恶性发展的必经病理过程,其实质是肝组织损伤后机体的过度修复<sup>[10]</sup>。肝纤维化发生的中心环节是HSC的激活,形成肌成纤维细胞,后者分泌大量的细胞外基质(ECM);同时,肝脏对ECM的降解相对或绝对不足,大量的ECM在肝脏沉积,从而导致肝纤维化<sup>[11-12]</sup>。当肝脏受损时,出现大量炎症细胞浸润,并产生TNF- $\alpha$ 、IL-6、TGF- $\beta_1$ 等炎症因子<sup>[13]</sup>。其中,TNF- $\alpha$ 、IL-6为强促炎因子,能促使肝组织的炎症反应加剧并加重肝组织的损伤程度,从而加速肝纤维化的发展<sup>[14]</sup>。与此同时,TGF- $\beta_1$ 可刺激静止状态下的HSC,使其被激活并大量增殖,促使HSC向肌成纤维细胞转化,增强HSC合成ECM的能力并抑制ECM的

分解,从而导致肝组织内出现大量的ECM沉积<sup>[15]</sup>,且过度沉积的ECM可重新分割肝小叶,严重时使肝组织结构发生重构形成假小叶<sup>[16]</sup>。

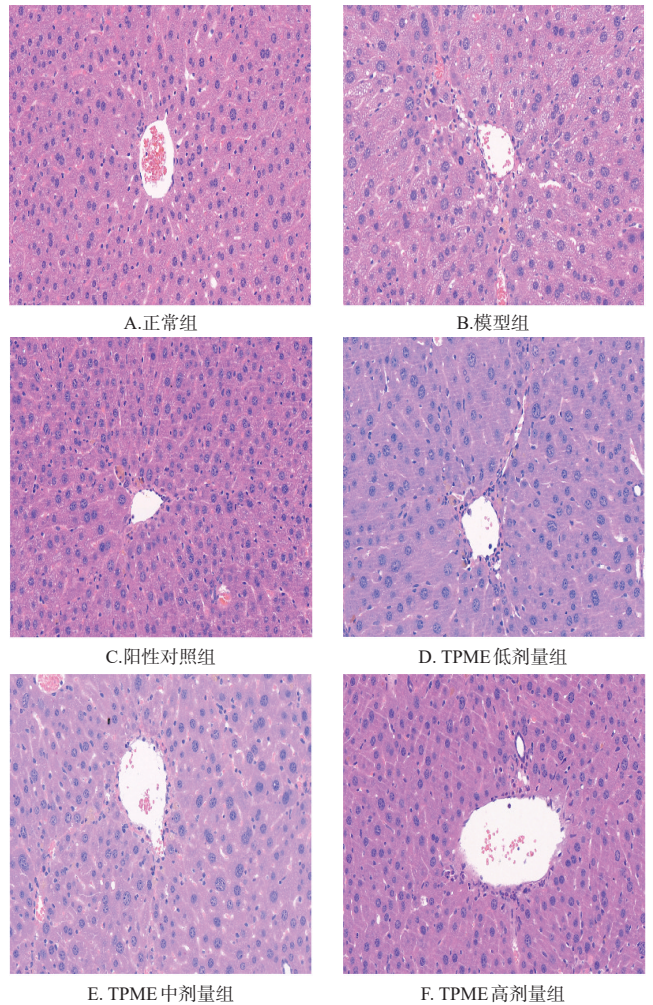


图2 TPME对肝纤维化模型小鼠肝组织病理学改变的显微图(HE染色, $\times 200$ )

Fig 2 Microscopic images of the effects of TPME on the pathological changes of liver tissue in hepatic fibrosis model mice (HE staining,  $\times 200$ )

#### 4.1 造模方法和阳性药物的选择

CCl<sub>4</sub>可在肝脏氧化代谢过程中产生大量的自由基,使细胞膜发生脂质过氧化而出现损伤或坏死,从而导致纤维化的发生<sup>[17]</sup>。用CCl<sub>4</sub>诱导动物肝纤维化,已成为国内外建立肝纤维化动物模型的经典方法<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,模型组小鼠的肝指数显著高于正常组,提示模型组小鼠出现了肝损伤<sup>[20]</sup>;TPME可显著降低模型小鼠的肝指数,提示TPME可减轻模型小鼠的肝损伤。秋水仙碱具有良好的抗炎作用,可通过减少细胞因子分泌、调节TGF- $\beta_1$ 等蛋白的表达、减少胶原形成、促进胶原分解等途径来发挥抗肝纤维化作用,目前被作为阳性药物广泛应用于抗肝纤维化研究中<sup>[21-22]</sup>。基于此,本研究采用CCl<sub>4</sub>诱导建立肝纤维化小鼠模型,以秋水仙碱

为阳性药物,对 TPME 的保肝作用及其机制进行初步探索。

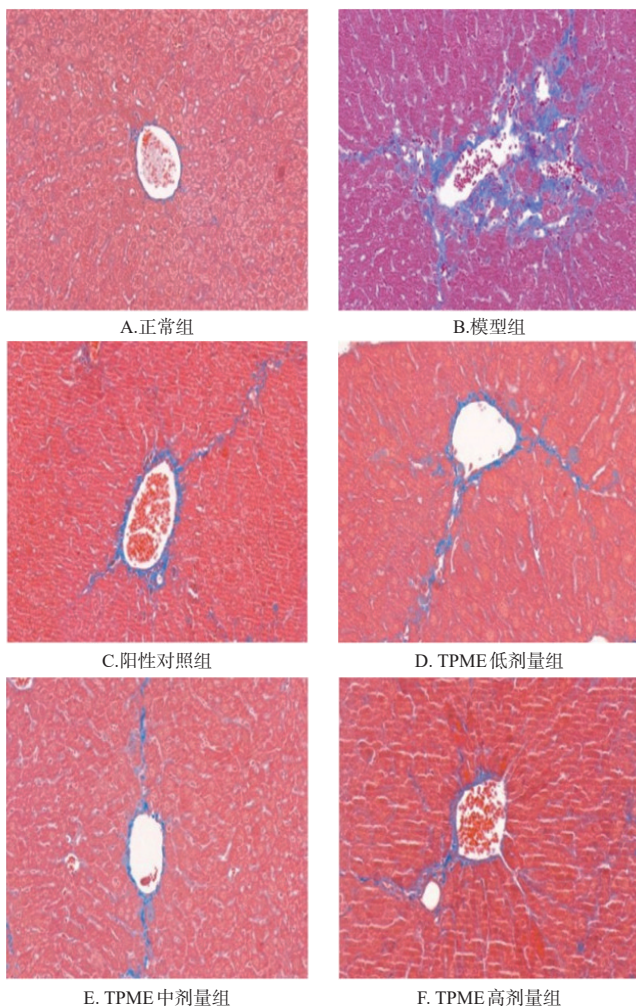


图3 TPME 对肝纤维化模型小鼠肝组织病理学改变的显微图(Masson 染色,  $\times 200$ )

Fig 3 Microscopic images of the effects of TPME on the pathological changes of liver tissue in hepatic fibrosis mice (Masson staining,  $\times 200$ )

#### 4.2 血清生化指标的检测及意义

ALT 和 AST 是反映肝细胞损伤的灵敏指标<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 的活性均显著升高,由此说明模型组小鼠出现了肝损伤<sup>[23]</sup>。与模型组比较,TPME 可显著降低模型小鼠血清中 AST 和 ALT 的活性,说明 TPME 可减轻 CCl<sub>4</sub> 所致小鼠的肝损伤程度。LN、PC-III、C-IV 是临床上常用于反映肝脏受损程度和肝纤维化水平的指标。其中, LN 是非胶原性结构糖蛋白,当肝纤维化发生时,肝窦内 LN 明显沉积并被释放入血,使血清中 LN 含量升高<sup>[24]</sup>; PC-III 是在基底膜胶原纤维形成的过程中被氮末端酶裂解后释放入外周血的氨基端前胶原肽,血清中 PC-III 的含量会随着纤维形成的增多而升高<sup>[25]</sup>; C-IV 为肝血窦基底膜的主要成分,在肝纤维过度增生时, C-IV 的合成处于较高水平,血

清中 C-IV 的含量随之上升<sup>[26]</sup>。本研究结果显示,与正常组比较,模型组小鼠血清中 LN、PC-III、C-IV 的含量均显著升高,提示该组小鼠出现了肝损伤和肝纤维化; TPME 可显著降低模型小鼠血清中 LN、PC-III、C-IV 的含量,且高剂量组的 LN、PC-III 降低更明显,提示 TPME 可减轻模型小鼠的肝损伤和肝纤维化程度,有剂量依赖趋势。

氧化应激和炎症反应在肝纤维化发展进程中有着重要作用,检测血清中 SOD 活性、MDA 含量可反映机体氧化损伤发生情况<sup>[27-28]</sup>,而血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量可反映机体炎症反应发生情况。本研究结果显示,给予 TPME 治疗后,模型小鼠血清中 MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的含量均显著升高, SOD 的活性均显著降低,且高剂量组的 IL-6 升高更明显,说明 TPME 能减轻肝纤维化模型小鼠的氧化应激反应和炎症反应,有剂量依赖趋势。

#### 4.3 肝纤维化相关蛋白表达的检测及意义

$\alpha$ -SMA 是 HSC 激活的特征标志物,其表达水平与肝脏的纤维化程度呈正相关<sup>[29]</sup>。本研究结果显示, TPME 能够显著下调肝纤维化模型小鼠肝组织中  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达水平,提示 TPME 抑制了 HSC 的活化。TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路是介导 HSC 激活、促进 HSC 增殖和产生 ECM 的主要信号通路,在肝纤维化的发生和发展过程中有重要作用,因此阻断 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路,对肝纤维化的治疗有重要意义<sup>[4]</sup>。本研究结果显示, TPME 能够显著下调肝纤维化模型小鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$  和 Smad3 蛋白的表达水平,且作用强度与药物剂量呈正相关,提示 TPME 能够剂量依赖性地阻断 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路,这可能是 TPME 抑制 HSC 活化、减少胶原合成,进而减轻模型小鼠肝纤维化程度的作用机制之一。

#### 5 结语

综上所述, TPME 对 CCl<sub>4</sub> 致小鼠肝纤维化具有一定的改善作用,能减轻模型小鼠的肝损伤和纤维化程度,其作用可能与抑制胶原合成、抑制氧化应激反应、降低炎症因子含量、下调  $\alpha$ -SMA 和 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路相关蛋白的表达有关。

#### 参考文献

- [1] PUCHE J E, SAIMAN Y, FRIEDMAN S L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Compr Physiol, 2013, 3(4): 1473-1492.
- [2] NAKANO Y, KAMIYA A, SUMIYOSHI H, et al. A deactivation factor of fibrogenic hepatic stellate cells induces regression of liver fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2020, 71(4): 1437-1452.
- [3] 徐诗雨, 郭惠婕, 刘揭, 等. 肝纤维化治疗靶标研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(10): 1930-1934.

- [4] 陈冠新,文彬,孙海涛,等.鳖甲煎丸对CCl<sub>4</sub>致大鼠肝纤维化模型中NF-κB信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(10):161-167.
- [5] 张定棋,徐莹,杨海琳,等.不同制法下瘀血汤对CCl<sub>4</sub>诱导大鼠肝纤维化的影响[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(5):18-25.
- [6] 王乾宇,王文佳,奚锦,等.杜仲多糖对肝纤维化模型大鼠I、Ⅲ型胶原蛋白,MMP-1,TIMP-1及TGF-β<sub>1</sub> mRNA表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(23):153-158.
- [7] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:第10卷[M].上海:上海科学技术出版社,2009:56-57.
- [8] 刘慧,孟爱荣,彭春喜,等.黄水枝属药学研究概况[J].安徽农业科学,2014,42(35):12472-12473.
- [9] 唐爱存,韦燕飞,刘喜华,等.葫芦茶苷对四氯化碳致肝纤维化模型小鼠的保护作用及机制研究[J].中国药房,2020,31(2):190-195.
- [10] 徐列明,刘平,沈锡中,等.肝纤维化中西医结合诊疗指南:2019年版[J].临床肝胆病杂志,2019,35(7):1444-1449.
- [11] HUANG Y, DENG X, LIANG J. Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 352(2):420-426.
- [12] 贾继东,魏来,侯金林,等.《中国肝病诊疗管理规范》白皮书:节选[J].临床肝胆病杂志,2014,30(3):197-209.
- [13] DU Q H, ZHANG C J, LI W H, et al. Gan shen fu fang ameliorates liver fibrosis in vitro and in vivo by inhibiting the inflammatory response and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(21):2810-2820.
- [14] CZAJA A J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(10):2515-2532.
- [15] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF-β/SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. *Eur J Histochem*, 2016, 64(3):157-167.
- [16] 吴姗姗,王振常,黎妍,等.中药复方壮肝逐瘀煎对肝纤维化模型大鼠微循环的影响[J].中华中医药学刊,2020,38(1):151-156,277.
- [17] WANG R, ZHANG H, WANG Y, et al. Inhibitory effects of quercetin on the progression of liver fibrosis through the regulation of NF-κB/IκBα, p38 MAPK, and Bcl-2/Bax signaling[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 47:126-133.
- [18] SUN H, CHEN G, WEN B, et al. Oligo-peptide I-C-F-6 inhibits hepatic stellate cell activation and ameliorates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis by suppressing NF-κB signaling and Wnt/β-catenin signaling[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 136(3):133-141.
- [19] BU F T, CHEN Y, YU H X, et al. SENP2 alleviates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis by promoting activated hepatic stellate cell apoptosis and reversion[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 289:86-98.
- [20] CHEN Y, LI R, HU N, et al. Baihe Wuyao decoction ameliorates CCl<sub>4</sub>-induced chronic liver injury and liver fibrosis in mice through blocking TGF-β<sub>1</sub>/Smad2/3 signaling, anti-inflammation and anti-oxidation effects[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 263:113227.
- [21] 许琼梅,李跃龙,曹后康,等.溪黄草水提物对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的保护作用及机制研究[J].中国药房,2018,29(20):2791-2796.
- [22] ZHU Z, HU R, LI J, et al. Alpinetin exerts anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-angiogenic effects through activating the Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 pathway in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 96:107660.
- [23] 李小侠.血清谷氨酸脱氢酶与其他肝功能指标联合检测在肝病诊断中的临床意义[J].陕西医学杂志,2020,49(12):143-146.
- [24] NALLAGANGULA K S, NAGARAJ S K, VENKATASWAMY L, et al. Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression[J]. *Future Sci OA*, 2018, 4(1):FSO250.
- [25] GRESSNER O A, WEISKIRCHEN R, GRESSNER A M. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2007, 381(2):107-113.
- [26] CEQUERA A, GARCÍA DE LEÓN MÉNDEZ M C. Biomarkers for liver fibrosis: advances, advantages and disadvantages[J]. *Rev Gastroenterol Méx*, 2014, 79(3):187-199.
- [27] GUO Y, LIANG X, MENG M, et al. Hepatoprotective effects of Yulangsan flavone against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced hepatic fibrosis in rats[J]. *Phytomedicine*, 2017, 33:28-35.
- [28] 杨婧,贾彦,王蔚,等.膈下逐瘀汤对大鼠纤维化肝脏组织谷胱甘肽抗氧化系统的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(17):129-134.
- [29] JIANG Y, XIANG C, ZHONG F, et al. Histone H3K27 methyltransferase EZH2 and demethylase JMJD3 regulate hepatic stellate cells activation and liver fibrosis[J]. *The-ranostics*, 2020, 11(1):361-378.

(收稿日期:2021-03-31 修回日期:2021-05-27)

(编辑:邹丽娟)