

双参饮对肝纤维化模型大鼠的改善作用及机制研究[△]

黄 祎^{1*}, 周 刚², 钟 珊³, 周 智³, 扈晓宇^{1#}(1.成都中医药大学, 成都 610075; 2.巴中市中医医院, 四川巴中 636600; 3.重庆医科大学附属第二医院感染病科, 重庆 400010)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1613-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.06

摘要 目的:研究双参饮对肝纤维化模型大鼠的肝功能和肝纤维化程度的改善作用及其机制。方法:取健康SD大鼠,以含40%四氯化碳的橄榄油溶液连续7周腹腔注射,建立肝纤维化模型。将造模成功的47只大鼠随机分为模型组、阳性对照组和双参饮低、中、高剂量组,各组分别为9、9、9、10、10只;另取10只健康SD大鼠作为正常组。从造模结束后次周开始,模型组与正常组大鼠灌胃水,阳性对照组[秋水仙碱0.2 mg/(kg·d)]和双参饮各剂量组[双参饮水煎液3、6、12 g/(kg·d),以总生药量计算]大鼠分别灌胃相应药液,连续给药28 d。采用赖氏分析法检测血清中肝功能指标[丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLB)]水平,采用酶联免疫吸附法检测血清中肝纤维化指标[透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型胶原(Ⅲ-PC)、Ⅳ型胶原前体(Ⅳ-C)]水平;采用苏木精-伊红染色法和苦味酸酸性复红染色法观察大鼠肝组织病理学变化;采用分光光度法检测大鼠肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、羟脯氨酸(HYP)水平;采用免疫组化法检测大鼠肝组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清中ALT、AST、TBIL、HA、LN、PC-Ⅲ、Ⅳ-C水平均显著升高,ALB水平显著降低($P<0.05$);大鼠肝组织出现空泡变性、纤维组织增生等病理现象;肝组织中SOD水平显著降低,MDA、HYP水平均显著升高($P<0.05$);肝组织中可见大量 α -SMA蛋白阳性染色颗粒,其蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,双参饮各剂量组大鼠血清中ALT、AST和肝纤维化指标水平均显著降低,ALB水平显著升高,双参饮中、高剂量组TBIL水平均显著降低($P<0.05$);肝细胞变性、纤维化组织增生现象均有较大改善;肝组织中SOD水平显著升高,MDA、HYP水平均显著降低($P<0.05$); α -SMA蛋白阳性染色明显减少,其蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。结论:双参饮对肝纤维化模型大鼠有保肝、抗肝纤维化的作用,其机制可能主要是通过增强机体抗氧化能力、下调 α -SMA蛋白表达、抑制肝星状细胞的活化、减少细胞外间质的合成,从而逆转肝纤维化进程。

关键词 双参饮; 丹参; 人参; 肝纤维化; 机制; 大鼠

Study on Improvement Effect and Mechanism of Shuangshen Yin on Liver Fibrosis Model Rats

HUANG Yi¹, ZHOU Gang², ZHONG Shan³, ZHOU Zhi³, HU Xiaoyu¹(1. Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China; 2. Bazhong Traditional Chinese Medicine Hospital, Sichuan Bazhong 636600, China; 3. Dept. of Infectious Disease, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study improvement effect and mechanism of Shuangshen yin on liver function and the degree of liver fibrosis in liver fibrosis model rats. METHODS: Healthy SD rats were collected and given 40% CCl₄ olive oil solution intraperitoneally for consecutive 7 weeks to induce liver fibrosis model. 47 model rats were randomly divided into model group, positive control group and Shuangshen yin low-dose, medium-dose and high-dose groups, with 9, 9, 9, 10, 10 rats respectively; another 10 healthy SD rats were included in normal group. From the next week after model induction, model group and normal group were given water intragastrically; positive control group [colchicines 0.2 mg/(kg·d)] and Shuangshenyin groups [Shuangshen yin water decoction 3, 6, 12 g/(kg·d), by crude drug] were given corresponding medicines respectively for consecutive 28 d. The serum levels of liver function indicators (ALT, AST, TBIL, ALB, GLB) were determined by Rye's analysis method. The serum levels of liver fibrosis indexes (HA, LN, Ⅲ-PC, Ⅳ-C) were determined by ELISA. The pathological changes of liver tissues were observed by HE staining and VG staining. The levels of SOD, MDA and HYP in liver tissues were determined by spectrophotometry. The expression of α -SMA was detected by immunohistochemistry. RESULTS: Compared with normal group, the serum levels of ALT, AST, TBIL, HA, LN, PC-Ⅲ and Ⅳ-C in model group were increased significantly, and the level of ALB was decreased significantly ($P<0.05$). There were some pathological phenomena such as vacuolar degeneration and fibrous tissue proliferation in rat liver. The levels of SOD in liver tissue were decreased significantly, while the levels of MDA and HYP were increased significantly ($P<0.05$). A large number of positive staining granules of α -SMA protein were observed in liver

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81273748、81500442);重庆市卫生计生委中医药科技项目(No.ZY20150305)

* 副主任中医师,博士研究生。研究方向:中西医结合治疗肝病。E-mail:417094299@qq.com

通信作者:主任中医师,教授,博士。研究方向:中西医结合治疗肝病。E-mail:1724330021@qq.com

tissue, and the expression level of α -SMA protein was significantly increased ($P<0.05$). Comparison of model group, the serum levels of ALT, AST and liver fibrosis indexes were significantly decreased and ALB level was significantly increased in Shuangshen yin groups, while the TBIL levels in Shuangshen yin medium-dose, high-dose groups

were significantly decreased ($P < 0.05$); the phenomena of hepatocyte degeneration and fibrosis tissue proliferation were significantly improved; the levels of SOD in liver tissue were significantly increased, and the levels of MDA and HYP were significantly decreased ($P < 0.05$); the positive staining of α -SMA protein decreased significantly, and the expression level of α -SMA protein was decreased significantly ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Shuangshen yin has protective and anti-fibrotic effects on liver in rats with hepatic fibrosis, the mechanism of which may be associated with enhancing antioxidant capacity, down-regulating the expression of α -SMA, inhibiting the activation of hepatic stellate cells, reducing extracellular matrix synthesis so as to reverse liver fibrosis.

KEYWORDS Shuangshen yin; *Salvia miltiorrhiza*; *Panax schinseng*; Liver fibrosis; Mechanism; Rats

肝纤维化(Hepatic fibrosis)是指肝脏内弥漫性细胞外基质过度沉积,即肝脏纤维结缔组织大量增生,而其降解活性相对或绝对不足,使得大量细胞外基质沉积下来所形成^[1]。它不是一个独立的疾病,而是许多慢性肝病的共同病理过程。抗肝纤维化治疗对于延缓慢性肝病的发展或逆转其病理过程具有重要的临床意义。

双参饮源于成都中医药大学附属医院感染科扈晓宇教授治疗肝纤维化的基础方。扈晓宇教授通过长期临床实践总结出肝纤维化的基本病机为正气亏虚、脉络瘀阻,而其所拟双参饮基础方由人参、丹参组成,利用这两种药材益气活血的功效治疗肝纤维化。前期临床研究已证实,该基础方具有益气扶正、活血化瘀的功效,对肝纤维化患者有较好的疗效^[2]。但该方的作用机制尚不明确,故本研究拟通过考察肝纤维化模型大鼠采用双参饮水煎液干预治疗后的血清肝功能和肝纤维化指标,肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、羟脯氨酸(HYP)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)水平以及肝脏组织病理变化等,初步探究该方改善实验性肝纤维化的作用机制,为其在临床用于治疗肝纤维化提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

MS104S型电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];Fresco 17型冷冻高速离心机(美国Bio-Rad Laboratories公司);KD-3368AM型全自动组织切片机(上海之信仪器有限公司);EVOS-FL型荧光显微镜(上海启文生物科技有限公司);756PC型紫外可见分光光度计(北京北拓仪器有限公司);JY-TSB型生物组织智能脱水机(湖北锦源医疗科技有限公司);TKY-KPA型病理组织烤片摊片机(湖北康泰医疗有限公司)。

1.2 药品与试剂

秋水仙碱片(阳性对照药物,云南植物药业有限公司,批号:H53020166,规格:0.5 mg);丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)测定试剂盒(上海纪宁科研试剂有限公司);总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLB)测定试剂盒(四川迈克生物科技股份有限公司);大鼠透明质酸(HA)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、大鼠IV型胶原(IV-C)、大鼠层黏蛋白(LN)、大鼠III型胶原前体(III-PC)检测试剂盒(成都里来生物科技股份有限公司);SOD、MDA、HYP检测试剂盒(广州创美生物科技有限公司);兔 α -SMA多克隆抗体(美国Ab-

cam公司);NovoLink聚合物检测系统RE7280-K检测试剂盒(德国Leica公司);四氯化碳(CCl_4 ,分析纯,成都金山化学试剂有限公司);使用时以橄榄油配成40%的油溶液);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、苦味酸酸性复红(VG)染色试剂盒(上海歌凡生物科技有限公司);橄榄油为市售食用橄榄油;水为高压灭菌水。

1.3 双参饮水煎液

双参饮水煎液由四川省中医院煎药房煎制(方中人参-丹参的质量比为1:3,药材均购自成都中医药大学附属医院中药房)。煎煮方法:按处方比例称取人参、丹参药材,加入6倍量水(mL/g)浸泡,每隔10 min观察浸润程度,直至药材浸透;煎煮3次,每次1 h;合并滤液,静置,取上清液浓缩制成相当于含生药总量1.2 g/mL 的浓缩液,低温保存,待用。

1.4 动物

SFP级SD雄性大鼠,65只,鼠龄10周,体质量为(200 ± 20)g,购自成都里来生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(川)2016-011。大鼠均适应性喂养1周,观察无异常后进行后续实验。所有大鼠全程均给予普通饲料和水喂养。

2 方法

2.1 大鼠分组、造模和给药

取大鼠65只,通过随机数字表法抽取10只纳入正常组,其余大鼠均纳入造模组。参考文献[3-4],本实验以 CCl_4 建立大鼠肝纤维化模型:造模组大鼠腹腔注射含40% CCl_4 的橄榄油溶液,首剂3 mL/kg ,之后每次1.5 mL/kg ,每周2次(间隔为3~4 d),连续注射7周。造模结束后,有5只大鼠死亡,在剩余50只造模组大鼠中随机抽取3只,以10 mg/mL 戊巴比妥溶液麻醉后断颈处死,剖取其肝脏组织,制作HE染色切片和VG染色切片,于显微镜下观察造模是否成功。参考2006年《肝纤维化中西医结合诊疗指南》中的纤维化程度分期标准^[5](S0期:无纤维化;S1期:汇管区纤维化扩大,局限窦周及小叶内纤维化;S2期:汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留;S3期:纤维间隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化;S4期:早期肝硬化)进行判断:当镜下观察结果符合肝纤维化病理变化特征且分期为S2~S4期时则视为造模成功。剩余47只造模组大鼠通过随机数字表法分为模型组、阳性对照组[秋水仙碱0.2 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$];剂量按成人临床用量换算制定]和双参饮低、中、高剂量组[双参饮

水煎液 3、6、12 g/(kg·d),以总生药量计算;剂量按成人临床用量的 2.5、5、10 倍换算制定],各组分别为 9、9、9、10、10 只。从第 8 周(即造模结束后次周)开始,模型组与正常组大鼠灌胃水,阳性对照组和双参饮各剂量组大鼠灌胃相应药液(秋水仙碱片以水配制成 0.02 mg/mL 的药液;双参饮水煎液以水稀释为含总生药量 0.3、0.6、1.2 g/mL 的药液),给药体积均为 10 mL/kg,连续给药 28 d。

2.2 大鼠血清肝功能和肝纤维化指标检测

给药结束后,全部大鼠禁食不禁水 24 h,然后以 10 mg/mL 的戊巴比妥溶液腹腔注射麻醉,立即经心脏采血,静置凝固后取上层血清。按相应试剂盒说明书操作,采用赖氏分析法^[6]检测血清中肝功能指标(ALT、AST、TBIL、ALB、GLB)水平,采用 ELISA 法检测血清中肝纤维化指标(HA、LN、Ⅲ-PC、Ⅳ-C)水平。

2.3 大鼠肝脏组织病理学观察

各组大鼠取肝相同部位组织,在 10% 的甲醛中固定 24 h,脱水,石蜡包埋,切片(厚度:6 μm),进行 HE 或 VG 染色,在显微镜下观察肝细胞炎症程度及纤维化改变等情况。

2.4 大鼠肝组织中 SOD、MDA、HYP 水平检测

采用分光光度法检测。取“2.3”项下部分肝组织,按 9 倍质量比加入冰生理盐水碾磨制成组织匀浆,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,按相应试剂盒说明书步骤操作,检测 SOD、MDA、HYP 水平。

2.5 大鼠肝组织中 α-SMA 蛋白表达水平检测

采用免疫组化法检测。取“2.3”项下制作的石蜡切片,脱蜡,抗原修复,滴加兔 α-SMA 多克隆抗体(1:800)后,置于孵育盒中于 4 ℃ 孵育 18~24 h;PBS 洗涤 2 min×3 次,按 NovoLink 聚合物检测系统 RE7159 试剂盒说明书操作步骤进行染色处理后,于显微镜下观察每个视野中阳性染色情况(即镜下呈棕褐色颗粒者);同时,采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析阳性染色部分的光密度值(OD),用来表示 α-SMA 蛋白表达水平。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行处理。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,组间两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠肝功能指标水平

与正常组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平均显著升高,ALB 水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和双参饮各剂量组大鼠 ALT、AST 水平均显著降低以及 ALB 水平显著升高,双参饮中、高剂量组 TBIL 水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与阳性对照组比较,双参饮高剂量组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平均显著减低,ALB 水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);各组大鼠血清 GLB 水平比较差异均无统计学意义($P >$

0.05)。各组大鼠肝功能指标水平检测结果见表 1。

表 1 各组大鼠肝功能指标水平($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The levels of liver function indexes of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT,U/L	AST,U/L	TBIL,μmol/L	ALB,g/L	GLB,g/L
正常组	10	48.52±12.38	89.72±10.38	1.12±0.16	42.37±4.17	34.52±6.34
模型组	9	196.38±42.59*	251.26±51.24*	2.37±0.52*	23.56±2.54*	33.17±3.58
阳性对照组	9	148.24±27.63*	138.74±34.25*	2.41±0.37	33.41±2.67*	34.16±5.63
双参饮低剂量组	9	154.34±37.52*	142.37±28.39*	2.54±0.32	35.49±3.66*	33.83±1.77
双参饮中剂量组	10	134.48±34.22*	133.97±37.62*	2.13±0.54*	32.24±1.25*	32.47±2.49
双参饮高剂量组	10	96.63±40.54* ^Δ	124.51±28.47* ^Δ	1.76±0.39* ^Δ	37.69±1.78* ^Δ	32.75±3.14

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, * $P < 0.05$; vs. positive control group, * $P < 0.05$

3.2 大鼠血清肝纤维化指标水平

与正常组比较,模型组大鼠血清 HA、LN、PC-Ⅲ、Ⅳ-C 水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和双参饮各剂量组大鼠上述血清肝纤维化指标水平均显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与阳性对照组比较,双参饮高剂量组大鼠上述血清肝纤维化指标水平均显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠血清肝纤维化指标水平检测结果见表 2。

表 2 各组大鼠血清肝纤维化指标水平($\bar{x} \pm s$,ng/mL)

Tab 2 The levels of serum hepatic fibrosis indexes of rats in each group($\bar{x} \pm s$,ng/mL)

组别	n	HA	LN	Ⅲ-PC	Ⅳ-C
正常组	10	117.18±24.15	136.34±24.53	19.62±2.54	11.28±1.76
模型组	9	237.54±41.52*	345.26±46.83*	43.76±3.58*	23.57±2.85*
阳性对照组	9	158.94±27.39*	198.67±33.19*	29.67±2.49*	17.37±1.61*
双参饮低剂量组	9	174.66±38.11*	213.16±27.44*	33.48±1.97*	20.59±2.16*
双参饮中剂量组	10	152.79±16.35*	183.49±29.53*	37.34±2.64*	16.31±1.78*
双参饮高剂量组	10	139.43±19.48* ^Δ	164.84±19.71* ^Δ	26.79±1.52* ^Δ	13.56±0.95* ^Δ

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$;与阳性对照组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, * $P < 0.05$; vs. positive control group, * $P < 0.05$

3.3 大鼠肝组织病理学变化

镜下可见,经 HE 或 VG 染色后,正常组大鼠肝细胞整齐规则,中央静脉清晰可见,未见扩张与萎缩;模型组大鼠肝细胞排列紊乱、存在大量空泡变性,肝组织汇管区、中央静脉周围可见较多纤维组织增生,甚至形成假小叶,中央静脉萎缩或消失;阳性对照组大鼠肝组织有少量肝细胞水肿变性,汇管区、中央静脉周围可见部分纤维组织增生,肝细胞坏死及纤维组织增生现象较模型组均有不同程度减轻;双参饮各剂量组大鼠肝细胞变性、纤维化组织增生现象较模型组均有较大改善,且中、高剂量组病理学变化程度较阳性对照组明显减轻。各组大鼠肝组织病理学变化显微图见图 1、图 2。

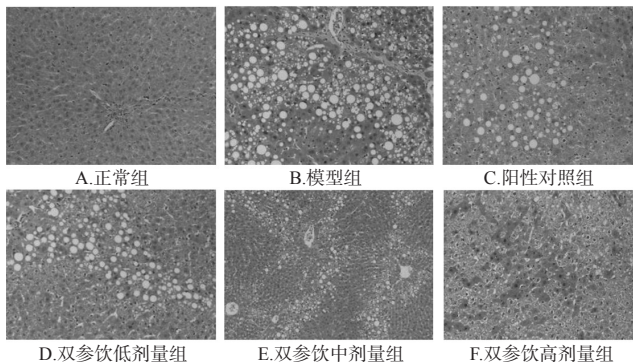


图1 各组大鼠肝组织病理学显微图(HE染色, ×200)
Fig 1 Histopathological micrographs of liver tissue of rats in each group (HE staining, ×200)

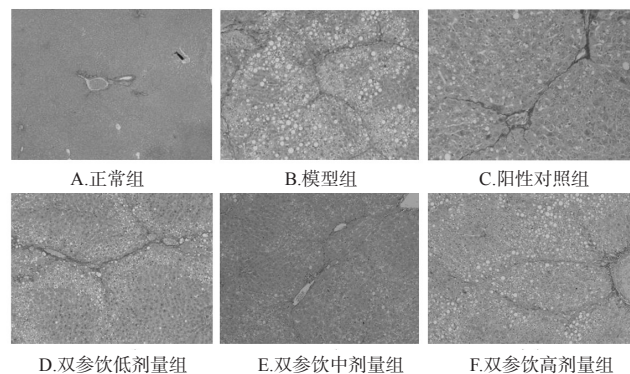


图2 各组大鼠肝组织病理学显微图(VG染色, ×100)
Fig 2 Histopathological micrographs of liver tissue of rats in each group (VG staining, ×100)

3.4 大鼠肝组织中SOD、MDA、HYP水平

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中SOD水平显著降低,MDA、HYP水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和双参饮各剂量组大鼠肝组织中SOD水平显著升高,MDA、HYP水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与阳性对照组比较,双参饮中、高剂量组大鼠肝组织中SOD水平均显著升高,MDA水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其余指标水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠肝组织中HYP、SOD、MDA水平检测结果见表3。

3.5 大鼠肝组织中 α -SMA蛋白表达水平

镜下可见,正常组大鼠肝组织中仅有少量阳性染色颗粒;模型组大鼠肝组织中可见大量棕褐色阳性染色颗粒,且主要集中于纤维组织及临近部位,在汇管区、中央静脉可见,而在假小叶及紧邻的肝窦区则更加明显,提示有较多 α -SMA蛋白表达;阳性对照组和双参饮各剂量组大鼠肝组织中棕褐色阳性染色颗粒较之模型组均有不同程度的减少。定量分析结果显示,与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 α -SMA蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和双参饮各剂量组大鼠肝组织中 α -SMA蛋白表达水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与阳性对照

表3 各组大鼠肝组织中SOD、MDA、HYP水平检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The levels of SOD, MDA and HYP in liver tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD,U/mg	MDA,nmol/mg	HYP, μ g/mg
正常组	10	60.40 \pm 3.60	0.49 \pm 0.05	0.43 \pm 0.05
模型组	9	18.89 \pm 3.30*	1.68 \pm 0.12*	0.84 \pm 0.27*
阳性对照组	9	30.11 \pm 3.89 [#]	1.29 \pm 0.13 [#]	0.59 \pm 0.09 [#]
双参饮低剂量组	9	30.22 \pm 4.09 [#]	1.32 \pm 0.16 [#]	0.62 \pm 0.40 [#]
双参饮中剂量组	10	47.00 \pm 2.91 ^{#*}	0.90 \pm 0.11 ^{#*}	0.63 \pm 0.12 [#]
双参饮高剂量组	10	55.30 \pm 3.02 ^{#*}	0.65 \pm 0.10 ^{#*}	0.59 \pm 0.11 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与阳性对照组比较,[△] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. positive control group, [△] $P < 0.05$

组比较,双参饮高剂量组大鼠肝组织中 α -SMA蛋白表达水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组大鼠肝组织中 α -SMA蛋白表达显微图见图3,蛋白表达水平检测结果见表4。

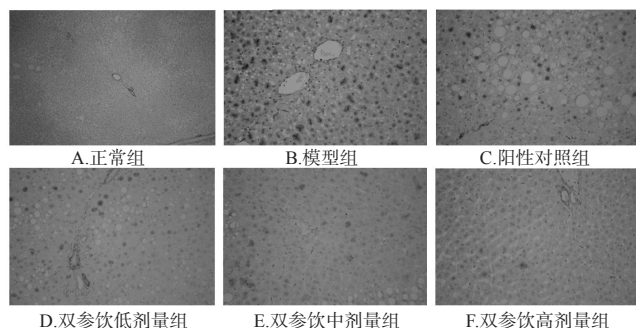


图3 各组大鼠肝组织中 α -SMA蛋白表达显微图(免疫组化染色, ×100)

Fig 3 Micrographs of the expression of α -SMA protein in liver tissue of rats in each group (immunohistochemical staining, ×100)

表4 各组大鼠肝组织中 α -SMA蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Protein expression levels of α -SMA in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD值
正常组	10	0.57 \pm 0.11
模型组	9	1.56 \pm 0.13*
阳性对照组	9	1.26 \pm 0.18 [#]
双参饮低剂量组	9	1.36 \pm 0.16 [#]
双参饮中剂量组	10	1.19 \pm 0.15 [#]
双参饮高剂量组	10	0.77 \pm 0.12 ^{#*}

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与阳性对照组比较,[△] $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. positive control group, [△] $P < 0.05$

4 讨论

双参饮源于扈晓宇教授治疗肝纤维化的基础方,由人参和丹参两味药材组成。扈教授认为,肝纤维化多起于先天不足,而又外受湿热疫毒之邪,正虚邪恋,邪毒留于体内,病久则滞则瘀,故本病的基本病机在于气虚血

瘀,血瘀贯穿于整个病程的始终。据我国《别录》《神农本草经》《本草纲目》等医药古籍记载,丹参活血而不伤正;人参助丹参活血祛瘀之功,补气而不壅滞;两药相伍,可共同发挥益气扶正、活血化瘀的治疗作用。现代药理学研究也证实,人参皂苷 Rg₁能提高肝纤维化模型大鼠细胞外基质(ECM)中的降解酶水平,并可显著降低大鼠体内活性氧的含量^[7];人参皂苷 czh-A-69能有效抑制肝星状细胞(HSC)的激活^[8];丹参主要是通过抑制新生血管活性并调节血管内皮细胞功能的途径发挥抗纤维化的作用^[9];丹参酮Ⅱ_A能发挥抑制HSC活化的作用,其机制可能与减少枯否细胞分泌的细胞因子表达有关^[10]。前期通过随机对照的方法,经103例慢性乙型肝炎肝纤维化患者临床试验结果证实,联用双参饮治疗能有效改善患者肝脏生化指标,减轻其肝纤维化程度,缓解其临床症状及体征^[2]。

ALT、AST、TBIL的水平可较准确地反映肝组织损伤程度^[11];ALB的水平也可作为反映肝功能的灵敏指标,用于协助诊断肝脏疾病^[12]。肝纤维化4项(HA、IV-C、LN、Ⅲ-PC)是ECM的主要成分,而ECM含量高低与肝纤维化程度呈正相关,因此这4项指标水平可用于评价肝纤维化的病变程度^[13]。本研究结果显示,与模型组比较,双参饮各剂量组大鼠血清中ALT、AST和肝纤维化4项水平均显著降低,ALB水平均显著升高,而双参饮中、高剂量组TBIL水平显著降低;与阳性对照组比较,双参饮高剂量组大鼠血清ALT、AST、TBIL和肝纤维化4项水平均显著降低,ALB水平显著升高。这表明双参饮有保肝、抗肝纤维化的作用,且呈剂量依赖趋势。

肝组织中SOD、MDA水平与肝脏过氧化有关。其中,SOD下降的程度能直接反映肝损伤程度;MDA是脂质过氧化物,可反映机体脂质过氧化的程度,能间接反映肝细胞损伤的程度^[14-15];而HYP与肝脏纤维化有关,是评估肝脏纤维化程度的有效指标^[16]。肝纤维化的形成机制主要是由多种损伤因素造成肝窦内的HSC发生活化和增殖,致使肝脏组织内ECM的过度生成、大于降解,从而引发肝小叶、界板区及汇管区的纤维增生,而 α -SMA正是活化的HSC的特征标志物^[17]。本研究结果显示,双参饮干预治疗后,能减少模型大鼠弥漫性肝细胞中空泡变性的产生和纤维组织增生,延缓肝纤维化的进程;能显著下调大鼠肝组织中MDA、HYP水平,上调SOD水平,并下调 α -SMA的蛋白表达。

综上,双参饮对肝纤维化大鼠有保肝、抗肝纤维化的作用,其机制可能主要是通过增强机体抗氧化能力、下调 α -SMA蛋白表达、抑制HSC的活化、减少ECM的合成,从而逆转肝纤维化进程。但肝纤维化的发生、发展过程涉及的机制极其复杂,并受多种因素影响,本研究仅对双参饮改善肝纤维化的作用机制进行了初步研究,而该方其他可能的作用机制还有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 梁扩寰,李绍白.肝脏病学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2016:796.
- [2] 张俊立.双参饮对慢性乙型肝炎肝纤维化的干预作用[D].成都:成都中医药大学,2017.
- [3] KOH EK, KIM JE, SONG SH, et al. Ethanol extracts collected from the styela clava tunic alleviate hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCl₄) through inhibition of hepatic apoptosis, inflammation, and fibrosis[J]. *J Toxicol Pathol*, 2017, 30(4): 291-306.
- [4] LEE GH, LEE HY, CHOI MK, et al. Protective effect of Curcuma longa L. extract on CCl₄-induced acute hepatic stress[J]. *Bmc Res Notes*, 2017. DOI: 10.1186/s13104-017-2409-z.
- [5] 中国中西医结合学会肝病专业委员会.肝纤维化中西医结合诊疗指南[J]. *中西医结合学报*, 2006, 4(6): 551-555.
- [6] 刘自安.赖氏法与丙酮酸氧化酶法检测ALT在血站实验室的应用[J]. *中国现代医药杂志*, 2009, 11(6): 117.
- [7] GENG JW, PENG W, HUANG YG, et al. Ginsenoside-Rg₁ from Panax notoginseng prevents hepatic fibrosis induced by thioacetamide in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 634(1/2/3): 162-169.
- [8] 宋顺宗.山茱萸新苷和人参皂苷保护及抗肝纤维化作用的研究[D].延吉:延边大学,2011.
- [9] 刘洪亮,吕靖,赵志敏,等.丹参水溶性成分抑制肝窦内皮细胞功能及血管新生的活性评价[J]. *中草药*, 2016, 47(6): 938-943.
- [10] LIU YW, HUANG YT. Inhibitory effect of tanshinone II_A on rat hepatic stellate cells[J]. *PLoS One*, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0103229.
- [11] 刘伟,符小红,黄思远,等.藏药波棱瓜子总木脂素对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用及机制探讨[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(3): 567-571.
- [12] CHEN MS, ZHANG JH, WANG JL, et al. Anti-fibrotic effects of neferine on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice[J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(2): 231-240.
- [13] 钱宏波,钱媛,赵江东. HA、PC-Ⅲ、LN、IV-C在原发性肝癌诊断及判断手术预后中的价值[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2016, 25(11): 1286-1288.
- [14] 刘军.超氧化物歧化酶的研究进展[J]. *天津药学*, 2000, 12(4): 23-24.
- [15] 姚翠鸾,王维娜,王安利.水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展[J]. *海洋科学*, 2003, 27(10): 18-21.
- [16] 徐珊,周敏,包剑锋,等.肝纤维化不同证型与肝功能和肝组织羟脯氨酸关系的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2008, 26(9): 1855-1857.
- [17] SCHNABL B, KWEON YO, FREDERICK JP, et al. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation[J]. *Hepatology*, 2001, 34(1): 89-100.

(收稿日期:2019-03-01 修回日期:2019-04-30)

(编辑:段思怡)