

复方鳖甲软肝片对肝纤维化大鼠的保护作用及其机制*

孙振亮¹, 吴哲^{2△}, 贵襄平², 田凌云², 李先鹏³

(1. 湖北省保康县人民医院感染科, 湖北 保康 441600; 2. 湖北中医药大学附属襄阳医院肝胆病科, 湖北 襄阳 441000;
3. 宁波市鄞州人民医院肝病科, 浙江 宁波 315040)

摘要: **目的** 观察复方鳖甲软肝片对肝纤维化的保护作用及其机制。**方法** 将 30 只清洁级 SD 大鼠随机分为对照组、模型组以及药物组, 每组各 10 只, 模型组及药物组使用橄榄油配制 40% CCL₄, 进行皮下注射造模, 每周 2 次, 连续注射 6 周, 对照组大鼠使用等容量橄榄油皮下注射; 同时药物组大鼠给予复方鳖甲片灌胃, 而对照组与模型组则每天给予等容量生理盐水灌胃, 灌胃均为 6 周。末次给药后, 抽取大鼠腹主动脉血, 分离血清, 检测各组大鼠血清肝功能指标及纤维化指标; 取各组大鼠部分肝组织, 使用免疫组化法检测大鼠肝组织 COX-2、 α -SMA 蛋白表达情况。**结果** 模型组、药物组大鼠 ALT、AST、T-Bil 水平较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 但药物组大鼠 ALT、AST、T-Bil 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$); 而模型组、药物组大鼠 ALB 较对照组显著降低 ($P < 0.05$), 但药物组大鼠 ALB 水平明显高于模型组 ($P < 0.05$)。模型组、药物组大鼠 HA、CIV、LN 水平较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 但药物组大鼠 HA、CIV、LN 水平明显低于模型组 ($P < 0.05$)。模型组、药物组大鼠 COX-2、 α -SMA 蛋白表达较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 但药物组大鼠 COX-2、 α -SMA 蛋白表达明显低于模型组 ($P < 0.05$)。**结论** 复方鳖甲软肝片对肝纤维化大鼠肝功能具有显著的保护作用, 并可有效延缓肝纤维化疾病进程, 其可能机制与抑制肝组织 COX-2、 α -SMA 蛋白表达有关。

关键词: 复方鳖甲软肝片; 肝纤维化; 大鼠; 机制

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2019)01-0030-03

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.01.006

肝纤维化既是慢性肝病的结果, 同时也是肝硬化发病的必经阶段, 因此, 对于肝纤维化的防治, 可有效延缓慢性肝病的进展并改善患者临床预后^[1-2]。复方鳖甲软肝片是临床上肝纤维化防治的复方制剂, 对于早期肝硬化具有明显的阻断作用^[3-4]。目前相关动物研究证实, 复方鳖甲软肝片可显著改善 CCL₄ 肝纤维化大鼠肝组织炎症程度以及大鼠的肝纤维化程度, 但是对于其具体的作用机制, 目前尚无统一认识^[5]。为进一步了解复方鳖甲软肝片对肝纤维化大鼠作用机制, 本研究探讨复方鳖甲软肝片对肝纤维化大鼠的保护作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择清洁级 SD 雄性大鼠 30 只, 体重 (250 ± 10) g, 购于重庆国家生物产业基地实验动物中心, 实验动物使用许可证 SYXK(渝)2017-0023。

1.2 主要试剂及仪器 复方鳖甲软肝片, 购于内蒙古福瑞医疗科技股份有限公司, 国药准字 Z19991011; IV 型胶原 (CIV)、透明质酸 (HA) 以及层粘连蛋白 (LN) ELISA 试剂盒均购于北京北方生物技术研究; CCL₄ 购于上海凌峰化学试剂有限公司; 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、总胆红素 (T-Bil)、白蛋白 (ALB)、总蛋白 (TP) 试剂盒购于深圳迈瑞生物医疗股份有限公司; 兔抗 COX-2 多克隆抗体购于美国 Noemarkers 公司; 鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 单克隆抗体购于武汉博士德生物技术有限公司。BSA124S 电子天平 (赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司); 台式高速冷冻离心机 (Heal Force 公司); 全自动生化分析仪 (深圳雷杜生命科技有限公司); 酶标仪 (美国 Bio Tek 仪器有限公司); 倒置荧光显微镜 (奥林巴斯 (中国) 有限公司)。

收稿日期: 2019-01-12

* 基金项目: 浙江省医药卫生一般研究计划项目 (2016KYA161)

第一作者简介: 孙振亮 (1971-), 男, 副主任医师, 从事传染病治疗工作。

△通信作者: 吴哲, E-mail: 2155430859@qq.com

1.3 方法 将 30 只大鼠随机分为 3 组,分别是对照组、模型组、药物组,每组各 10 只。其中模型组、药物组使用橄榄油配制 40% CCL₄,进行皮下注射造模,注射剂量 3 mL/kg,每周 2 次,首次注射剂量加倍,连续注射 6 周;对照组大鼠使用等容量橄榄油皮下注射。造模同时,药物组大鼠给予 1 g/kg·d⁻¹ 复方鳖甲片灌胃(磨成粉末后用生理盐水配制),而对照组、模型组每天给予等容量生理盐水灌胃,灌胃均为 6 周。各组大鼠均自由饮水,使用标准饲料饲养。

末次给药后,禁食不禁水 12 h,抽取大鼠腹主动脉血,离心 5 min(3 000 r/min),分离血清置于-80 ℃冰箱内保存待测,使用全自动生化分析仪检测大量肝功能指标 ALT、AST、T-Bil、ALB、TP 水平;采用 ELISA 法检测大鼠纤维化指标 HA、CIV、LN 水平。

取各组大鼠部分肝组织,使用 4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,采用免疫组化法检测大鼠 COX-2、 α -SMA 蛋白表达情况。评价标准:COX-2 蛋白阳性染色主要表现为细胞膜和/或细胞浆呈棕

黄色着色; α -SMA 蛋白阳性表达主要表现为细胞浆呈棕黄色表达。根据蛋白表达程度以及着色阳性细胞范围评分。阳性程度:0 分:不着色;1 分:着色淡;2 分:中等着色;3 分:着色深。阳性细胞范围:0 分:无着色;1 分:着色阳性细胞数<30%;2 分:着色阳性细胞数在 30%~50%之间;3 分:着色阳性细胞数>50%。蛋白表达积分为着色程度以及阳性细胞数得分之和。

1.4 统计学分析 采用统计学分析 SPSS 22.0 进行数据处理分析,计量资料比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝功能指标比较 模型组、药物组 ALT、AST、T-Bil 水平较对照组显著升高($P<0.05$),但药物组 ALT、AST、T-Bil 水平明显低于模型组($P<0.05$);而模型组、药物组 ALB 较对照组显著降低($P<0.05$),但药物组 ALB 水平明显高于模型组($P<0.05$);3 组 TP 水平无显著差异($P>0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠肝功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT(U/L)	AST(U/L)	T-Bil(μ mol/L)	ALB(g/L)	TP(g/L)
对照组	10	49.52±6.37	115.37±15.38	0.81±0.20	28.16±1.34	56.38±5.22
模型组	10	594.28±121.31*	643.95±133.52*	1.95±0.52*	22.58±1.55*	54.69±6.73
药物组	10	79.52±6.96**	163.97±31.05**	1.24±0.34**	25.69±1.21**	55.94±5.96

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$

2.2 各组大鼠纤维化指标比较 模型组、药物组 HA、CIV、LN 水平较对照组显著升高($P<0.05$),药物组 HA、CIV、LN 水平明显低于模型组($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠纤维化指标比较($\bar{x}\pm s$, U/L)

组别	<i>n</i>	HA	CIV	LN
对照组	10	56.37±17.38	5.84±2.14	45.62±7.21
模型组	10	147.28±41.42*	11.56±2.46*	78.32±6.79*
药物组	10	78.45±19.35**	8.96±1.75**	57.42±8.55**

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$

2.3 各组大鼠 COX-2、 α -SMA 蛋白表达情况比较 模型组、药物组 COX-2、 α -SMA 蛋白表达较对照组显著升高($P<0.05$),药物组 COX-2、 α -SMA 蛋白表达明显低于模型组($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠 COX-2、 α -SMA 蛋白表达情况比较($\bar{x}\pm s$, 分)

组别	<i>n</i>	COX-2	α -SMA
对照组	10	2.16±0.49	0.79±0.21
模型组	10	5.33±1.21*	3.97±0.56*
药物组	10	4.01±0.72**	2.19±0.42**

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$

3 讨论

肝纤维化是一切慢性肝病,如血吸虫病、酒精性肝病、病毒性肝炎的共同病理基础,是慢性肝病发展至肝硬化的必经过程,同时与肝癌的发生也具有着一定的关系^[6-7]。对于肝病的肝纤维化阶段,若采取恰当的治疗方案,可有效逆转肝纤维化进程,并促进肝病的恢复,因此,采取有效的抗纤维化药物对于控制肝

病的发展具有临床意义^[8]。根据慢性肝病的病因病机及患者临床表现,可将肝纤维化归属于中医学“积聚”“癥瘕”“胁痛”等范畴。肝纤维化因湿、热、痰、瘀、毒、郁等作用,导致机体正气不足,邪毒留滞于肝,从而导致脉络瘀阻、气机郁滞,因此临床治疗应以疏肝活血、软坚散结为治疗原则^[9]。复方鳖甲软肝片有党参、三七、鳖甲、当归、板蓝根等药物组成,具有化瘀解毒、软坚散结、益气养血之功效^[10-11]。本研究采用 CCL₄ 诱导肝纤维化,同时使用复方鳖甲软肝片进行干预治疗,分析复方鳖甲软肝片对肝纤维化大鼠的保护作用及其机制。

研究显示^[12-13],采用 CCL₄ 诱导大鼠肝纤维化模型,CCL₄ 诱导产生过量的自由基可引发肝细胞膜脂质过氧化,诱导释放大量炎症因子使肝细胞的损伤,肝细胞内转氨酶 ALT、AST 水平显著升高,引起蛋白质合成代谢功能降低。模型组、药物组大鼠 ALT、AST、T-Bil 水平较对照组显著升高($P<0.05$),药物组大鼠 ALT、AST、T-Bil 水平明显低于模型组($P<0.05$);而模型组、药物组大鼠 ALB 较对照组显著降低($P<0.05$),但药物组大鼠 ALB 水平明显高于模型组($P<0.05$)。与相关研究结果相似^[14],采用 CCL₄ 诱导大鼠肝纤维化模型,可造成大鼠肝功能损伤以及白蛋白水平的降低,而采取复方鳖甲软肝片干预后,可有效降低大鼠肝功能损伤,从而对肝纤维化大鼠具有着良好的肝功能保护作用。目前临床上常用的肝纤维化血清标志物主要由 HA、CIV 以及 LN,研究显示,HA、CIV、LN 水平与肝纤维化程度呈显著正相关关系。本研究结果显示,模型组、药物组大鼠 HA、CIV、LN 水平较对照组显著升高($P<0.05$),但药物组大鼠 HA、CIV、LN 水平明显低于模型组($P<0.05$)。提示 CCL₄ 可有效诱导大鼠肝纤维化的发生,而采取复方鳖甲软肝片干预,可有效阻止肝纤维化进程,减轻大鼠肝纤维化病情。

COX-2 是前列腺素合成酶亚型,主要在炎症因子以及细胞因子刺激下表达,可促进前列腺素合成,引起微血管障碍而引起血管内皮损伤,启动机体炎症级联反应,参与机体多种组织以及细胞炎症反应当中^[15]。研究显示^[16],在 CCL₄ 诱导慢性肝损伤大鼠肝

纤维化进程中,可表现出 COX-2 蛋白表达的显著增加,且随着肝纤维化严重程度的加剧而增加。此外, α -SMA 蛋白的表达与肝星状细胞(HSC)活化有关,参与到了肝纤维化的发生发展过程当中^[17-18]。研究分析复方鳖甲软肝片干预对肝纤维化大鼠 COX-2、 α -SMA 蛋白表达的影响,结果显示,模型组、药物组 COX-2、 α -SMA 蛋白表达较对照组显著升高($P<0.05$),药物组 COX-2、 α -SMA 蛋白表达明显低于模型组($P<0.05$)。提示复方鳖甲软肝片干预对肝纤维化大鼠肝功能保护作用、延缓肝纤维化疾病进程,其可能机制与抑制肝组织 COX-2、 α -SMA 蛋白表达有关。

参考文献:

- [1] 高家荣,陈金锋,姜辉,等.疏肝健脾方对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠肝脏代谢组学的影响[J].中医杂志,2015,56(11):961-966.
- [2] KIM W R, BERG T, ASSELAH T, et al. Evaluation of APRI and FIB-4 scoring systems for non-invasive assessment of hepatic fibrosis in chronic hepatitis B patients[J]. Journal of Hepatology, 2016, 64(4): 773-780.
- [3] 段雪琳,黎桂玉,李树民,等.复方鳖甲软肝片联合恩替卡韦对慢性乙型肝炎血清肝纤维化标志物影响的 Meta 分析[J].中国医院药学杂志,2015,35(19):1762-1765.
- [4] NING Z W, LUO X Y, WANG G Z, et al. MicroRNA-21 Mediates Angiotensin II-Induced Liver Fibrosis by Activating NLRP3 Inflammasome/IL-1 β Axis via Targeting Smad7 and Spry1 [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2017, 27(1):1-20.
- [5] 宫嫚,辛绍杰,邹正升,等.复方鳖甲软肝片治疗慢性乙型肝炎患者对血清肝纤维化指标的影响[J].实用肝脏病杂志,2015,18(6):585-589.
- [6] 杨年欢,袁国盛,周宇辰,等.恩替卡韦联合复方鳖甲软肝片治疗慢性乙型肝炎肝纤维化 96 周的临床疗效[J].南方医科大学学报,2016,36(6):775-779.
- [7] 张瑞凤,姚云洁,游忠岚,等.复方鳖甲软肝片联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的观察[J].第三军医大学学报,2014,36(18):1961-1963.
- [8] 章圣朋,何勇,徐涛,等.夏枯草总三萜调控 ERK、TGF- β 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.

(下转第 58 页)

- 粒治疗抑郁症的效果及对患者血清 IL-2、IL-6、TNF- α 、Hcy 水平的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(24): 4790-4793.
- [9] 庞敬涛, 刘娟, 田立. 首发缺血性脑卒中后抑郁中医体质、证型及血清 Hcy 水平研究 [J]. 山东中医杂志, 2018, 37(10): 814-816.
- [10] 肖靛宜, 刘未艾, 吴清明, 等. 隔药饼灸对功能性消化不良肝郁脾虚大鼠下丘脑单胺类神经递质表达的影响[J]. 针刺研究, 2016, 41(1): 60-64.
- [11] 杨秋霞, 任金生. 逐瘀解郁汤联合西酞普兰治疗卒中后抑郁 30 例临床观察 [J]. 实用中西医结合临床, 2012, 12(3): 17-19.
- [12] MoRVAI S, NAGY A I, B?LINT S A, et al. Ketamine administration in case of severe, therapy resistant depressed patient, case report [J]. Ideggyogyaszati Szemle, 2016, 69(11-12): 421-425.
- [13] 章显宝, 汪燕, 王震, 等. 针刺对卒中后抑郁大鼠 5-HTT、5-HT1AR、NE α 2R 蛋白表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(9): 783-788.
- [14] 张锐丽, 刘玥. 丹栀逍遥散配合针灸治疗脑卒中后抑郁的临床效果 [J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3(31): 138-139.
- [15] 马振峰, 张金铸. 艾司西酞普兰与文拉法辛缓释剂在老年卒中后抑郁治疗中的应用效果对比分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2017, 20(2): 20-22.
- [16] 聂容荣, 江伟, 符文彬. 基于扶阳固本理念探讨加味补阳还五汤治疗缺血性脑卒中后抑郁症疗效与安全性评价 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(2): 163-166.
- [17] 陆俊. 脑血管意外合并抑郁症患者对神经功能康复的影响[J]. 中国健康心理学杂志, 2017, 25(9): 1321-1324.
- [18] 刘瑶, 郭阳, 李志鹏, 等. 黛力新联合乌灵胶囊治疗脑卒中后抑郁的 Meta 分析 [J]. 云南中医学院学报, 2018, 41(3): 42-46.

(上接第 32 页)

- [9] LEMOINE M, SHIMAKAWA Y, NAYAGAM S, et al. The gamma-glutamyl transpeptidase to platelet ratio (GPR) predicts significant liver fibrosis and cirrhosis in patients with chronic HBV infection in West Africa [J]. Gut, 2016, 65(5): 882-884.
- [10] 吕建林, 柳琳琳, 黄瑞, 等. 复方鳖甲软肝片联合恩替卡韦治疗乙肝肝硬化的疗效及安全性观察 [J]. 中成药, 2018, 40(4): 1000-1005.
- [11] 陈梅梅, 范建高, 陈源文, 等. 复方鳖甲软肝片对乙肝肝硬化患者代偿期肝纤维化及炎症因子的影响[J]. 实用药物与临床, 2015, 18(12): 1429-1432.
- [12] 肖蕾, 王云莲, 艾力江·吐尔逊等. 血清透明质酸、IV 型胶原、层粘连蛋白与大鼠放射性肝纤维化的相关性研究[J]. 中华全科医学, 2015, 13(1): 18-20.
- [13] SONG G, PACHER M, BALAKRISHNAN A, et al. Direct reprogramming of hepatic myofibroblasts into hepatocytes in vivo attenuates liver fibrosis [J]. Cell Stem Cell, 2016, 18(6): 797-808.
- [14] KANG J, HONG J, LEE S. Melatonin enhances mitophagy and mitochondrial biogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis [J]. Journal of Pineal Research, 2016, 60(4): 383-393.
- [15] 周立文, 葛伟伟, 张雅丽, 等. 复方鳖甲软肝片血清防治肝纤维化作用机制的实验研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 60-62.
- [16] 林佃相, 刘颖翰, 石栓柱, 等. 恩替卡韦联合复方鳖甲软肝片对代偿期乙肝肝硬化患者肝纤维化程度的影响[J]. 河北医药, 2016, 38(11): 1639-1641.
- [17] 黄凌鹰, 周振华, 孙学华, 等. 复方鳖甲软肝片治疗原发性胆汁性肝硬化的临床疗效评价 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(2): 181-184.
- [18] 黄静, 龙子江, 李丽, 等. 水飞蓟宾胶囊对酒精性肝纤维化大鼠的保护作用[J]. 中成药, 2016, 38(2): 229-234.