

本文引用: 覃妮, 黄曙院, 周柳, 黄华萍, 沈新辉, 周琳, 孙东琪, 陆世银. 岩黄连总生物碱对四氯化碳诱导肝纤维化大鼠的改善作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2191-2198.

## 岩黄连总生物碱对四氯化碳诱导肝纤维化大鼠的改善作用研究

覃妮, 黄曙院, 周柳, 黄华萍, 沈新辉, 周琳, 孙东琪, 陆世银\*

柳州市中医医院(柳州市壮医医院), 中药(壮瑶药)制剂研发重点实验室, 中药(壮瑶药)制剂开发工程技术研究中心, 广西柳州 545026

**〔摘要〕** 目的 研究岩黄连总生物碱对四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)诱导的肝纤维化大鼠的保护作用及机制。方法 通过向SD大鼠腹腔给予30% CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液(0.1 mL/100 g)诱导复制肝纤维化模型, 2次/周, 连续12周。将肝纤维化大鼠随机分为模型组, 岩黄连总生物碱低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)组及联苯双酯(30 mg/kg)组, 另设正常组大鼠, 各组均为8只。各给药组于造模第11周按设定剂量灌胃相应药物(1.0 mL/100 g)干预, 1次/d, 连续2周。正常组与模型组大鼠每天灌胃等体积的生理盐水。末次给药24 h后, 收集大鼠血清、肝脏及脾脏组织, 测定大鼠肝脾指数; 采用HE染色和Masson染色观察肝组织病理学变化。比色法检测各组血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)与谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)的含量; 通过ELISA检测血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、Ⅲ型前胶原(type III procollagen, PCⅢ)及Ⅳ型胶原(collagen IV, IV-C)、转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)及白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)表达水平。结果 与正常组相比, 模型组大鼠反应迟钝, 肝脾指数增大( $P<0.01$ ), 肝组织呈现明显纤维化, 血清ALT、AST、MDA、LN、HA、PCⅢ和IV-C水平显著升高( $P<0.01$ ), 血清TP、ALB、SOD及GSH-Px水平显著下降( $P<0.01$ ); 血清中TGF-β1、IL-1β、IL-8及IL-6蛋白表达水平显著上调( $P<0.01$ )。与模型组比较, 岩黄连总生物碱中、高剂量组均能明显改善大鼠状态和肝脾指数( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 有效调节大鼠肝组织病理学损伤和纤维增生; 显著降低大鼠血清ALT、AST、MDA含量( $P<0.01$ ), 明显提高血清TP、ALB、SOD及GSH-Px的表达水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 并能明显下调LN、HA、PCⅢ、IV-C、TGF-β1、IL-1β、IL-8及IL-6蛋白的表达水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论 岩黄连总生物碱具有明显的抗肝纤维化作用, 其作用机制可能与抗氧化、抑制炎症因子表达相关。

**〔关键词〕** 岩黄连; 总生物碱; 四氯化碳; 肝纤维化; 抗氧化; 炎症因子

**〔中图分类号〕** R285.5

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.12.008

## Improvement effects of total alkaloids from Yanhuanglian (*Corydalis saxicola* Bunting) on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats

QIN Ni, HUANG Shuyuan, ZHOU Liu, HUANG Huaping, SHEN Xinhui, ZHOU Lin,  
SUN Dongqi, LU Shiyin\*

Liuzhou Key Laboratory of Preparation Research and Development of Chinese Medicines (Zhuang and Yao), Liuzhou  
Engineering Research Center for Preparation Technology of Chinese Medicines (Zhuang and Yao), Liuzhou  
Chinese Medical Hospital, Liuzhou, Guangxi 545026, China

**〔收稿日期〕** 2023-05-08

**〔基金项目〕** 柳州市科技攻关与新产品试制(2020NBAA0802); 广西中医药大学自然科学基金面上项目(2020MS055)。

**〔第一作者〕** 覃妮, 女, 主管药师, 研究方向: 民族药药理学研究。

**〔通信作者〕** \* 陆世银, 男, 副主任药师, E-mail: 1175463199@qq.com。

**[Abstract] Objective** To investigate the protective effects and mechanism of total alkaloids of Yanhuanglian (*Corydalis saxicola* Bunting) (TACS) on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. **Methods** The SD rats were injected intraperitoneally with 30% carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) olive oil solution (0.1 mL/100 g) to establish liver fibrosis model, twice a week for 12 consecutive weeks. Liver fibrosis rats were randomly divided into five groups with eight animals per group: model group, low-, medium-, and high-dose TACS (25, 50, 100 mg/kg) groups, and bifendate group (30 mg/kg). Additionally, a normal group (8 rats) was also set up. The normal group and model group were given constant volume of saline intragastrically, while the other groups were intervened by intragastric administration of the corresponding drug (1.0 mL/100 g) according to the set dose at the 11th week of modeling, once a day for two weeks. After 24 h of the last administration, the serum, liver and spleen tissues were collected to determine the liver and spleen indexes of rats. The pathological changes of liver tissues were observed via hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining. Colorimetric method was used to check the content of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein (TP), albumin (ALB), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and Glutathione peroxidase (GSH-Px) in serum. The expression levels of serum hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen (PCIII), collagen IV(IV-C), transforming growth factor-β1 (TGF-β1), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-8 (IL-8), and interleukin-6 (IL-6) in serum were measured by ELISA. **Results** Compared with the normal group, the rats in the model group were unresponsive, the liver and spleen indexes increased ( $P<0.01$ ), the liver tissues showed obvious fibrosis, the levels of ALT, AST, MDA, HA, LN, PCIII, and IV-C increased significantly ( $P<0.01$ ), the levels of TP, ALB, SOD, and GSH-Px in serum decreased significantly ( $P<0.01$ ), and the expression levels of TGF-β1, IL-1β, IL-8, and IL-6 in serum were significantly up-regulated ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the state and liver and spleen indexes of rats in medium- and high-dose TACS groups significantly improved ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), the pathological damage and fibrous hyperplasia of liver tissues were effectively regulated, the content of ALT, AST, and MDA in serum significantly decreased ( $P<0.01$ ), the expression levels of TP, ALB, SOD, and GSH-Px significantly increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and the expression levels of LN, HA, PCIII, IV-C, TGF-β1, IL-1β, IL-8, and IL-6 proteins significantly down-regulated ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** TACS has obvious anti-hepatic fibrosis effects, and its mechanism of action may be related to antioxidation and inhibition of inflammatory factor expression.

**[Keywords]** *Corydalis saxicola* Bunting; total alkaloid; carbon tetrachloride; carbon tetrachloride liver fibrosis; antioxidation; inflammatory factor

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是诸多慢性肝病病情发展的共同病理特征,是多种致病因素导致肝内结缔组织异常增生的肝内弥散性细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度淤积的病理过程,若未采取及时有效的治疗,将会导致肝硬化、肝癌的发生<sup>[1-3]</sup>。岩黄连 *Corydalis saxicola* Bunting 为罂粟科紫堇属多年生草本植物,被收载于《广西中药材标准》,主要生长在广西、云南以及贵州的山区,其性凉、味苦,功效为清热解毒、消肿、利湿、止痛、止血等<sup>[4-5]</sup>。现代药理学研究表明,岩黄连具有抗炎镇痛<sup>[6-8]</sup>、抗氧化<sup>[9-10]</sup>、保肝<sup>[11-13]</sup>等作用。虽然,目前研究表明岩黄连总生物碱(total alkaloids from *Corydalis saxicola* Bunting, TACS)可以保肝护肝、改善肝脏功能,然而,有关其抗 HF 的作用与机制鲜见报道。为此,基于前期研究,本研究以联苯双酯为阳性对照药物,采用四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)诱导建立大鼠 HF 模型,进一步探讨 TACS 在大鼠模型中的抗 HF 作用及其可能机制,为岩黄连抗 HF 药物的研究与开发

提供科学依据。

## 1 实验材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只,体质量 100~140 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物饲养于通风条件良好,12 h 光照昼夜循环,温度 20~25 ℃,相对湿度 45%~60%的环境中。动物生产许可证号:SCXK 湘 2019-0004,动物使用许可证号:SYXK 桂 2019-0001。动物实验伦理批号:GXMU2010032418。自由摄食标准饲料与蒸馏水。

### 1.2 药物与试剂

岩黄连药材(广西仙荣中药科技有限公司,批号 20190701),经柳州市中医医院中药师张洪平主任鉴定为罂粟科紫堇属植物岩黄连 *Corydalis saxicola* Bunting 全草。联苯双酯(北京协和药厂,批号:200606);橄榄油(山东鲁花集团商贸有限公司,批号:20190711);CCl<sub>4</sub>(天津博迪生化股份有限公司,批号:20210422);

丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)与谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20210419、20210420、20210417、20210418、20210420、20210420、20210418);4%多聚甲醛(广州赛国生物科技有限公司,批号21235935);HE染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号20210419);Masson染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号20210707);透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层黏连蛋白(laminin, LN)、Ⅲ型前胶原(type Ⅲ procollagen, PCⅢ)及Ⅳ型胶原(collagen Ⅳ, Ⅳ-C)酶联免疫分析试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司,批号均为20220310);转化生长因子 $\beta$ 1(trans forming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)、白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)及白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)酶联免疫分析试剂盒(武汉华联科生物技术有限公司,批号均为202104);其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 主要仪器

Bio-Rad iMark 酶标仪(上海伯乐生命医学产品有限公司,型号:Bio-Rad 680);电热恒温水浴锅(宁波新芝生物科技股份有限公司,型号:SC-20);高速低温离心机(长沙湘锐离心机有限公司,型号:TGD-20MC);电子天平(上海恒平科学仪器有限公司,型号:JY2002);制冰机(常熟雪科制冷设备有限公司,型号:IMS-130)。旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器公司,型号:RE-52);荧光成像系统[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,型号:Invitrogen EVOS M5000];台式离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司,型号:TD5);超纯水器(北京普析通用仪器有限责任公司,型号:GWB-1)。

## 2 方法

### 2.1 TACS 的制备

将岩黄连药材置于鼓风干燥箱中,50℃烘干2h,粉碎至约1.5cm,称取1000g,首次加入10倍量75%乙醇,浸泡30min,加热回流提取2h,趁热过滤,重复提取1次,合并两次滤液,旋转蒸发器真空浓缩所得醇提液至1g/mL(真空度-0.085~-0.095

Mpa,温度65℃),加入4000mL1%盐酸水溶液回流提取1h,趁热过滤,取滤液加入40%NaOH调节pH值至中性,浓缩至相对密度为1.06~1.08,4℃静置48h后过滤,滤渣用16倍量的1%盐酸水溶液回流1h,趁热过滤,滤液加入40%NaOH调节pH值至中性,浓缩至相对密度为1.06~1.08,4℃静置48h后过滤,滤渣冷冻,真空干燥,即得TACS粉末,提取完成后置于干燥器中备用。

### 2.2 分组、造模及给药

大鼠适应性饲养1周后,随机分为正常组、模型组、TACS低/中/高剂量(25、50、100mg/kg)组<sup>[14]</sup>和联苯双酯(阳性对照,30mg/kg,加适量生理盐水配制浓度为30mg/mL)组,每组8只。除正常组大鼠腹腔注射橄榄油(0.1mL/100g)外,其余各组分别于大鼠腹腔注射30%CCl<sub>4</sub>橄榄油混合液(0.1mL/100g)以制备HF模型<sup>[15]</sup>,2次/周,连续12周。各给药组在造模第11周按设定剂量(1.0mL/100g)给予大鼠灌胃相应药物,正常组和模型组灌胃等体积生理盐水,1次/d,连续2周。实验期间大鼠自由摄食饮水,每天观察各组大鼠活动情况,每周称定质量1次。所有大鼠末次给药后,禁食同时自由饮水24h。大鼠经3%苯巴比妥钠腹腔注射麻醉后,腹主动脉采血,3500r/min离心15min取血清,于-80℃超低温冰箱保存待检。采集血样后颈椎脱臼处死大鼠,取出肝脏和脾脏,并用预冷生理盐水清洗后,滤纸拭干,称重,计算肝(脾)脏指数,肝(脾)脏指数(%)=肝(脾)脏质量/体质量 $\times$ 100%<sup>[16]</sup>。取适量肝组织进行组织病理学检查,其余肝脏置于-80℃超低温冰箱保存待用。

### 2.3 各组大鼠肝组织病理学观察

取肝脏组织右叶同一位置约1cm<sup>3</sup>大小,以4%多聚甲醛液固定,常规脱水,石蜡包埋,切片(厚度约为3 $\mu$ m),经二甲苯脱蜡、酒精常规逐级脱水,苏木精染液染色,洗掉多余的染液后用0.5%盐酸酒精分化,分别行伊红染液染色和Masson丽春红复红液染色,再次酒精常规逐级脱水,二甲苯透明后采用中性树胶封片,于显微镜下观察肝组织病理学变化。

### 2.4 各组大鼠血清相关指标的检测

取分离好的大鼠血清,采用比色法检测血清中ALT、AST、TP、ALB、MDA、SOD的含量;采用ELISA检测血清中HA、LN、PCⅢ、Ⅳ-C、TGF- $\beta$ 1、IL-1 $\beta$ 、IL-8及IL-6的水平。上述指标均严格遵照检测试剂盒指

南步骤操作,并于酶联免疫检测仪上测定。

## 2.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析,计量资料通过“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。所有资料均作正态性检验和方差齐性检验,满足正态分布,多组间比较当满足方差齐性时采用单因素方差分析检验,各组间均数多重比较采用 Tukey 检验;当方差不齐时,采用 Welch 和 Dunnett's T3 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 TACS 对 CCl<sub>4</sub> 诱导 HF 大鼠体质量和脏器指数的作用

正常组大鼠毛色、精神状态、摄食、排便及体质量增长在实验期间均正常。与正常组相比,模型组大鼠毛发有轻微脱落且明显变黄,精神衰弱,食欲不振,便秘,体质量增长显著缓慢。而 TACS 低、中、高剂量组和联苯双酯组大鼠毛色、精神状态、摄食和体质量增长等较模型组明显改善。相比于正常组,模型组大鼠实验后体质量较小、肝脏指数和脾脏指数显著升高( $P<0.01$ );增长幅度与联苯双酯组比较,TACS 高剂量组体质量升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,TACS 中、高剂量组及联苯双酯组大鼠肝脏指数显著降低( $P<0.05, P<0.01$ );且 TACS 高剂量组优于联苯双酯的作用( $P<0.01$ );TACS 低、中、高剂量组和联苯双酯组均能显著降低 HF 大鼠的脾脏指数( $P<$

$0.05, P<0.01$ ), TACS 高剂量组下调脾脏指数效果优于联苯双酯组( $P<0.05$ )。TACS 对 CCl<sub>4</sub> 诱导 HF 大鼠体质量和脏器指数的作用呈现良好的剂量依赖性。详见表 1。

### 3.2 TACS 对 CCl<sub>4</sub> 诱导 HF 大鼠血清生化指标的影响

与正常组相比,模型组大鼠血清中 ALT、AST 水平明显上升( $P<0.01$ ), TP 与 ALB 水平显著下降( $P<0.01$ ),表明 CCl<sub>4</sub> 造成了大鼠肝损伤。相较于模型组,TACS 低、中、高剂量组和联苯双酯组均能明显下调大鼠血清中 ALT 和 AST 含量( $P<0.01$ ),并能显著提高血清 TP、ALB 水平( $P<0.05, P<0.01$ )。此外,相较于联苯双酯组,TACS 中、高剂量组对 ALT、AST、TP 与 ALB 调控改善作用更强( $P<0.05, P<0.01$ ),且 TACS 各剂量组间呈良好的量效相关性。结果表明 TACS 具有良好的保肝及改善肝功能作用。详见表 2。

### 3.3 TACS 对 CCl<sub>4</sub> 诱导的 HF 大鼠血清中 HA、LN、PC III 和 IV-C 表达的调控作用

与正常组比较,模型组血清中 HA、LN、PC III 和 IV-C 水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,经 TACS 干预后,各组血清中 HA、LN、PC III 和 IV-C 含量呈下降趋势或明显下降( $P<0.05, P<0.01$ ),且 TACS 改善作用呈现良好的剂量依赖性,同时 TACS 中、高剂量组抑制 HA、LN、PC III 和 IV-C 水平效果优于联苯双酯组( $P<0.05, P<0.01$ )。详见表 3。

表 1 TACS 对 CCl<sub>4</sub> 诱导 HF 大鼠肝脾指数的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	实验前体质量/g	实验后体质量/g	肝脏指数	脾脏指数
正常组	251.67±6.85	378.99±15.95	2.18±0.23	0.16±0.01
模型组	252.26±7.32	289.13±11.33 <sup>##</sup>	3.16±0.16 <sup>##</sup>	0.26±0.01 <sup>##</sup>
联苯双酯组	247.77±6.34	358.38±10.35 <sup>**</sup>	2.85±0.29 <sup>*</sup>	0.19±0.02 <sup>**</sup>
TACS 低剂量组	248.94±7.38	354.46±15.28 <sup>**</sup>	3.04±0.34	0.24±0.02 <sup>*</sup>
TACS 中剂量组	252.59±5.32	363.16±13.92 <sup>**</sup>	2.73±0.23 <sup>*</sup>	0.19±0.01 <sup>**</sup>
TACS 高剂量组	254.77±8.68	377.18±12.60 <sup>**△</sup>	2.38±0.19 <sup>**△△</sup>	0.17±0.01 <sup>**△</sup>

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与联苯双酯组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

表 2 各组大鼠血清中 ALT、AST、TP 和 ALB 的水平( $\bar{x}\pm s, n=8, U\cdot L^{-1}$ )

组别	ALT	AST	TP	ALB
正常组	16.91±5.94	14.58±4.97	46.01±1.54	30.09±0.81
模型组	113.97±8.27 <sup>##</sup>	53.07±9.58 <sup>##</sup>	38.46±1.68 <sup>##</sup>	24.49±1.43 <sup>##</sup>
联苯双酯组	53.24±3.72 <sup>**</sup>	36.60±9.26 <sup>**</sup>	44.18±3.10 <sup>**</sup>	26.98±2.43 <sup>*</sup>
TACS 低剂量组	97.64±12.41 <sup>**△△</sup>	36.16±3.70 <sup>**</sup>	40.92±1.76 <sup>*</sup>	27.69±2.36 <sup>*</sup>
TACS 中剂量组	33.60±7.43 <sup>**△△</sup>	23.36±3.32 <sup>**△△</sup>	46.97±1.57 <sup>**</sup>	29.82±1.56 <sup>**△</sup>
TACS 高剂量组	10.62±2.59 <sup>**△△</sup>	15.86±4.08 <sup>**△△</sup>	50.22±1.78 <sup>**△△</sup>	32.34±1.01 <sup>**△△</sup>

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与联苯双酯组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

表3 各组大鼠血清中HA、LN、PCⅢ和Ⅳ-C的水平( $\bar{x}\pm s, n=8, \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

组别	HA	LN	PCⅢ	Ⅳ-C
正常组	98.21±9.04	104.68±14.97	66.23±6.56	202.09±13.84
模型组	215.96±8.07 <sup>#</sup>	253.09±9.78 <sup>#</sup>	178.65±11.96 <sup>#</sup>	324.47±12.42 <sup>#</sup>
联苯双酯组	153.26±7.72 <sup>**</sup>	206.60±9.17 <sup>**</sup>	144.18±13.15 <sup>**</sup>	286.98±15.17 <sup>*</sup>
TACS低剂量组	177.64±12.31 <sup>**△△</sup>	208.16±13.24 <sup>**</sup>	140.94±15.06 <sup>**</sup>	307.69±12.76
TACS中剂量组	133.60±8.44 <sup>**△△</sup>	173.36±9.42 <sup>**△△</sup>	106.84±11.57 <sup>**△△</sup>	269.92±16.75 <sup>**△</sup>
TACS高剂量组	112.73±10.59 <sup>**△△</sup>	145.83±14.12 <sup>**△△</sup>	93.24±14.78 <sup>**△△</sup>	236.62±18.07 <sup>**△△</sup>

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与联苯双酯组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

### 3.4 TACS对CCl<sub>4</sub>诱导HF大鼠血清SOD、MDA及GSH-Px水平的影响

模型组大鼠血清MDA水平明显高于正常组( $P<0.01$ ),而SOD与GSH-Px水平明显低于正常组( $P<0.01$ )。相较于模型组,TACS中、高剂量组和联苯双酯组MDA水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),同时大鼠血清SOD水平明显上调( $P<0.01$ ),TACS各剂量组大鼠血清中GSH-Px表达水平升高( $P<0.01$ )。此外,TACS中、高剂量组对SOD、MDA及GSH-Px调控效果优于联苯双酯组( $P<0.01$ )。结果显示TACS可通过抗氧化活性发挥保肝、护肝的作用。详见表4。

表4 TACS对CCl<sub>4</sub>诱导HF大鼠血清SOD、MDA及GSH-Px水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=8, \text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ )

组别	SOD	MDA	GSH-Px
正常组	216.94±7.37	5.83±0.85	317.56±4.61
模型组	98.51±6.33 <sup>#</sup>	12.41±0.95 <sup>#</sup>	173.24±8.63 <sup>#</sup>
联苯双酯组	179.89±10.55 <sup>**</sup>	11.41±1.24 <sup>*</sup>	268.67±9.68 <sup>**</sup>
TACS低剂量组	124.70±5.64 <sup>**△△</sup>	11.83±0.80	260.32±6.54 <sup>**</sup>
TACS中剂量组	165.34±5.31 <sup>**△△</sup>	8.68±0.88 <sup>**△△</sup>	281.34±5.97 <sup>**△△</sup>
TACS高剂量组	209.89±5.70 <sup>**△△</sup>	6.14±0.69 <sup>**△△</sup>	293.52±7.64 <sup>**△△</sup>

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与联苯双酯组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

表5 MCAE对CCl<sub>4</sub>诱导HF大鼠血清中TGF-β1、IL-1β、IL-8及IL-6的调控作用( $\bar{x}\pm s, n=8, \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

组别	TGF-β1	IL-1β	IL-8	IL-6
正常组	131.39±13.75	76.56±5.41	67.34±3.12	76.40±6.48
模型组	218.78±19.32 <sup>#</sup>	109.15±8.51 <sup>#</sup>	89.07±5.75 <sup>#</sup>	105.71±7.46 <sup>#</sup>
联苯双酯组	185.40±16.77 <sup>**</sup>	94.25±8.07 <sup>**</sup>	81.14±8.36 <sup>*</sup>	88.52±7.85 <sup>**</sup>
TACS低剂量组	179.79±10.35 <sup>**</sup>	100.35±5.72 <sup>*</sup>	76.11±5.49 <sup>**</sup>	98.07±3.62 <sup>*△</sup>
TACS中剂量组	137.21±7.03 <sup>**△△</sup>	73.24±8.96 <sup>**△△</sup>	65.27±5.01 <sup>**△△</sup>	74.20±7.32 <sup>**△△</sup>
TACS高剂量组	119.16±10.05 <sup>**△△</sup>	60.78±4.03 <sup>**△△</sup>	57.61±4.22 <sup>**△△</sup>	59.61±7.71 <sup>**△△</sup>

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ;与联苯双酯组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

### 3.5 TACS对CCl<sub>4</sub>诱导HF大鼠血清促炎因子与促纤维因子的调节作用

相比于正常组,模型组大鼠血清促纤维因子TGF-β1,促炎因子IL-1β、IL-8和IL-6水平显著提高( $P<0.01$ )。与模型组相比较,经TACS低、中、高剂量干预均能显著抑制TGF-β1、IL-1β、IL-8和IL-6的表达( $P<0.05, 0.01$ )。此外,与联苯双酯组比较,TACS中、高剂量组的TGF-β1、IL-1β、IL-8和IL-6的表达水平下降更明显( $P<0.01$ ),且TACS各组呈现剂量依赖性。结果提示TACS可通过调节免疫,下调促炎细胞因子的水平及抑制促纤维因子表达从而发挥抗HF的作用。详见表5。

### 3.6 TACS对CCl<sub>4</sub>诱导HF大鼠肝组织病理变化的影响

HE染色显示,正常组大鼠肝小叶结构均匀完整,肝细胞排列清晰整齐且未见小胆管及纤维组织增生。相比于正常组,模型组大鼠肝小叶出现明显的结构模糊,细胞排列紊乱,局灶肝细胞点状坏死增加、炎症细胞浸润及充血病变,纤维化明显。TACS低、中、高剂量组及联苯双酯组对CCl<sub>4</sub>所致大鼠肝组织中肝小叶结构完整性、炎症坏死及纤维化病变均有所改善,且TACS干预作用效果呈剂量依赖性,其中TACS高剂量组较于联苯双酯组改善效果更为明显。详见图1。

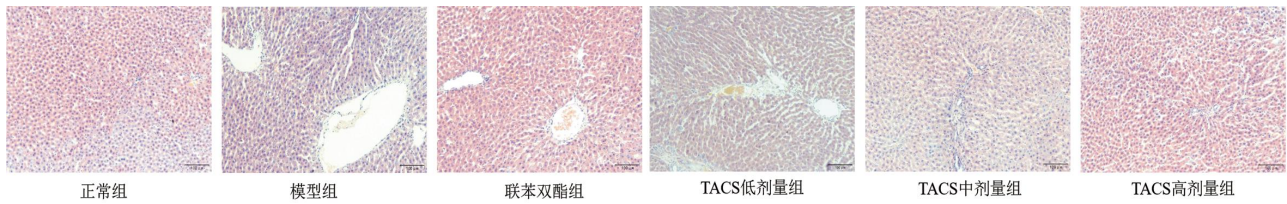


图 1 TACS 对 CCL<sub>4</sub> 致 HF 大鼠肝组织病理变化的改善作用(HE, ×100, 标尺=50 μm)

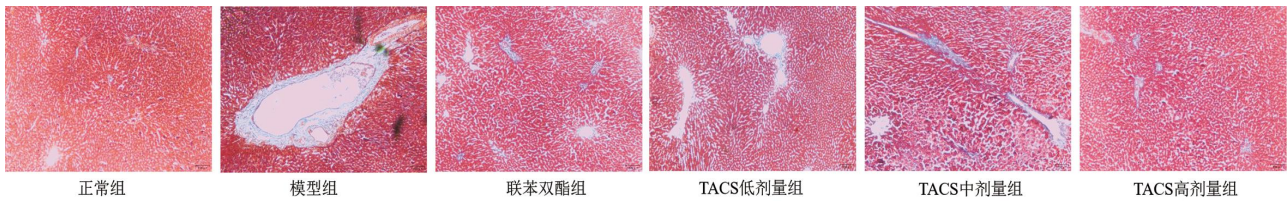


图 2 TACS 对 CCL<sub>4</sub> 致 HF 大鼠肝组织病理形态学的影响(Masson, ×100, 标尺=100 μm)

Masson 染色显示,正常组大鼠肝组织无被染成蓝色的纤维,未见病理性改变,而模型组明显可见广泛致密蓝色胶原沉积,肝脏汇管区和中央静脉周围纤维组织增生明显,且纤维间隔增厚,部分已出现假小叶及胶原纤维束。与模型组比较,TACS 各剂量组有不同程度的改善与逆转,胶原纤维增生范围显著减少,其中以 TACS 高剂量组治疗效果最佳。详见图 2。

#### 4 讨论

HF 是由遗传、代谢、病毒、损伤等原因引起慢性肝病的关键特征,若未采取有效干预手段,其进一步发展可导致肝硬化甚至肝衰竭、肝癌等致命性肝脏疾病,HF 也是影响慢性肝病预后的重要环节,严重影响患者健康及生存质量<sup>[17]</sup>。HF 的病理学基础为 ECM 的合成异常增多而降解减少,导致胶原在肝脏中过度沉积。目前,普遍认为肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝脏合成 ECM 的主要细胞<sup>[18]</sup>。HSC 的激活和增殖是 HF 的最终共同途径,在 HF 的病理生理过程的作用尤为关键,是 HF 发生、发展的中心环节<sup>[19-20]</sup>。然而,目前现代医学尚未找到良好的治疗 HF 的方法。中医中药以其对 HF 的良好预防和治疗效果、低毒性反应等特点,目前已引起越来越多学者的关注与重视。岩黄连为岭南地区治疗肝病的特色植物药,有研究发现岩黄连具有抗氧化、保肝及改善肝功能的作用,然而,有关其抗 HF 的作用与机制尚未明确。基于此,本实验将 MCAE 对 CCL<sub>4</sub> 诱导的 HF 大鼠进行药效评价及可能作用机制开展初步研究。

CCL<sub>4</sub> 是一种典型的实验动物 HF 模型诱导剂,

CCL<sub>4</sub> 在体内以肝脏为靶向,破坏肝细胞,其引起毒性三氯甲基自由基激发炎症反应,激活 HSC 后生成大量 ECM,最终导致严重肝损伤<sup>[21]</sup>。ALT、AST 是评价肝损伤的标志,目前极为广泛地应用于肝损伤判断<sup>[22]</sup>。在机体中,当自由基参与脂质过氧化反应时,其最终产物为 MDA,而 MDA 异常升高可致细胞膜结构遭受严重损坏,进而发生细胞肿胀与坏死<sup>[23]</sup>。一般而言,机体通过减少自由基水平并将其清除、重塑损伤及上调抗氧化酶表达这一系列抗氧化防御系统来发挥自身保护作用。其中 SOD 作为关键的抗氧化酶之一,对自由基具有良好的清除作用,从而抑制脂质过氧化反应物的生成<sup>[24]</sup>。GSH-Px 具有抗氧化活性,在体内发挥维持机体氧化与抗氧化的稳态,起到抵御自由基的作用,具有保护肝组织的功能<sup>[25]</sup>。本研究造模 12 周后,病理组织学显示,模型组大鼠肝脏出现显著的损伤与纤维化,血清 ALT、AST 含量明显升高,ALB、TP 水平显著下降。经不同剂量的 TACS、联苯双酯干预治疗后,上述血清生化指标、肝组织病理损伤及纤维化病变均具有较大程度的改善。同时,TACS 可修正 CCL<sub>4</sub> 导致的大鼠血清脂质过氧化产物 MDA 水平增加和 SOD 水平降低。提示调节脂质代谢、改善肝脂质过氧化损伤以及提高抗氧化酶活性是 TACS 保肝作用的机制之一。

HA 作为由 HSC 合成的 ECM 的主要成分,机体血清中 HA 浓度异常升高可反映其过度分泌;LN 为 HSC 合成的一种糖蛋白,在 HF 病理进展中,血清 LN 含量与纤维化严重程度高度相关;体内合成胶原蛋白时,PC III 经酶诱导释放到血清中,常作为判断 ECM 沉积程度;IV-C 是肝组织 ECM 的重要组成部分,其

血清水平与 HF 严重程度呈正相关<sup>[26-27]</sup>。因此,血清HA、LN、PCⅢ和IV-C的含量可作为HF的诊疗指标。本实验结果显示,与模型组比较,TACS干预可有效降低HF大鼠血清中HA、LN、PCⅢ和IV-C水平,提示TACS对CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠HF具有良好的抑制作用。

据文献报道,绝大多数肝病的发展进程中均涉及程度各异的氧化应激反应<sup>[28]</sup>。氧化应激反应所生成的产物可用于肝细胞,引起大分子如脂质、蛋白质等物质的变性,使其细胞膜、亚细胞器的结构被破坏后造成持续性氧化损伤;同时激活枯否细胞,活化的枯否细胞引起炎症因子(如IL-1 $\beta$ 、IL-8和IL-6等)的大量释放,这些炎症因子可直接刺激HSC的活化与增殖<sup>[29-30]</sup>;而活化后的HSC导致ECM过度形成与沉积,并会产生促HF因子,该因子以反馈性调节自身或周围HSC细胞群体的形式,稳定并增强肝脏纤维化状态。因此,炎症因子的释放水平能够体现肝内氧化应激反应水平<sup>[31]</sup>。本研究表明,模型组大鼠相较于正常组,其肝组织中IL-1 $\beta$ 、IL-8和IL-6的表达水平均明显增加,差异均有统计学意义,证实了HF与炎症反应密切相关。与模型组比较,TACS各剂量组和联苯双酯组大鼠肝组织中IL-1 $\beta$ 、IL-8和IL-6的水平均显著下降,差异均有统计学意义。说明TACS可通过抑制促炎细胞因子IL-1 $\beta$ 、IL-8和IL-6的表达而发挥抗HF的作用。此外,TGF- $\beta$ 1作为极具代表性的促HF因子,在HSC的激活和HF进展过程中担当重要作用;高水平的TGF- $\beta$ 1可调节相关基因转录引起ECM过度表达并沉积,诱导或加速HF发展,故有效抑制TGF- $\beta$ 1表达是逆转HF形成的重要手段之一<sup>[32-33]</sup>。

综上所述,TACS对CCl<sub>4</sub>诱导的HF模型大鼠具有一定的保护作用,其作用机制可能与调节脂质代谢、改善脂质过氧化损伤、抗氧化应激反应、抑制炎症因子及促纤维因子TGF- $\beta$ 1表达等相关。岩黄连主要分布于我国南方地区,在壮族民间,其已成为用于治疗肝炎、肝硬化和肝癌等疾病的常用药材。目前已研制有注射液和片剂等中成药制剂,是临床治疗肝炎特别是乙型肝炎、肝硬化、肝癌的有效药。近年研究发现,TACS作为岩黄连主要有效成分,具有保肝及改善肝功能之功效,但是其抗HF的作用研究尚不充分。本研究采用多项指标探讨了TACS对HF模型大鼠的改善调节作用,同时还对其机制

进行了较为全面的考察,为TACS抗HF的开发利用奠定了科学依据,但其具体作用机制仍有待后续深入研究。

## 参考文献

- [1] XIE X, DOU C Y, ZHOU Y, et al. microRNA-503 targets mothers against decapentaplegic homolog 7 enhancing hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2021, 66(6): 1928-1939.
- [2] FENG R, DU W X, LUI P, et al. CAPN2 acts as an indicator of hepatitis B virus to induce hepatic fibrosis[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2020, 121(3): 2428-2436.
- [3] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(3): 151-166.
- [4] 陆世银, 郑华, 程邦, 等. 基于组效关系的壮药岩黄连抑制HSC-T6细胞增殖活性成分辨识研究[J]. *中草药*, 2017, 48(7): 1354-1361.
- [5] QIN F, CHEN Y, WANG F F, et al. *Corydalis saxicola* bunting: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and clinical applications[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 16-26.
- [6] 蒙田秀, 李紫薇, 李琪琦, 等. 复方岩黄连膏剂的制备及抗炎镇痛作用研究[J]. *化学工程与装备*, 2022(9): 15-16.
- [7] WANG Q Y, LUO Z, LI D F, et al. Investigation of the therapeutic effect of total alkaloids of *Corydalis saxicola* bunting on CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats by LC/MS-based metabolomics analysis and network pharmacology[J]. *Metabolites*, 2022, 13(1): 2-21.
- [8] JU L J, HU P P, CHEN P, et al. *Corydalis saxicola* bunting total alkaloids attenuate walker 256-induced bone pain and osteoclastogenesis by suppressing RANKL-induced NF- $\kappa$ B and c-fos/NFATc1 pathways in rats[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11(5): 609119.
- [9] 李伶, 唐文迪, 陈寿焕, 等. 岩黄连总生物碱提取工艺及抗氧化活性研究[J]. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 40(6): 145-153.
- [10] GUO Y R, ZHAO L J, CHANG B T, et al. The traditional uses, phytochemistry, pharmacokinetics, pharmacology, toxicity, and applications of *Corydalis saxicola* bunting: A review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 822792.
- [11] WU J J, CHEN P, JU L J, et al. *Corydalis saxicola* Bunting Total Alkaloids ameliorate diet-induced non-alcoholic steatohepatitis by regulating hepatic PI3K/Akt and TLR4/NF- $\kappa$ B pathways in mice[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2022, 151(3): 113-132.
- [12] LIU X, ZHENG H, LU R G, et al. Intervening effects of total

- alkaloids of *Corydalis saxicola* bunting on rats with antibiotic-induced gut microbiota dysbiosis based on 16S rRNA gene sequencing and untargeted metabolomics analyses[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10(2): 1151-1169.
- [13] LIU X W, TANG C L, ZHENG H, et al. Investigation of the hepatoprotective effect of *Corydalis saxicola* Bunting on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats by <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics and network pharmacology approaches[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 159(4): 252-261.
- [14] WU F, ZHENG H, YANG Z T, et al. Urinary metabolomics study of the hepatoprotective effects of total alkaloids from *Corydalis saxicola* Bunting on carbon tetrachloride-induced chronic hepatotoxicity in rats using <sup>1</sup>H NMR analysis[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 140(3): 199-209.
- [15] EL-SHAWI O E, EL-NASHAR H A S, ABD EL-RAHMAN S S, et al. Protective effect of *acrocarpus fraxinifolius* extract against hepatic fibrosis induced by Gamma irradiation and carbon tetrachloride in albino rats[J]. *International Journal of Radiation Biology*, 2023, 99(2): 270-280.
- [16] 郭羽轩, 董惠娟, 刘 涛, 等. 睡莲花总黄酮对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用[J]. *中草药*, 2020, 51(19): 4983-4990.
- [17] ASLAM A, SHEIKH N, SHAHZAD M, et al. Quercetin ameliorates thioacetamide-induced hepatic fibrosis and oxidative stress by antagonizing the Hedgehog signaling pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2022, 123(8): 1356-1365.
- [18] LAN T, YU Y, ZHANG J, et al. Cordycepin ameliorates non-alcoholic steatohepatitis by activation of the AMP-activated protein kinase signaling pathway[J]. *Hepatology*, 2021, 74(2): 686-703.
- [19] FAN W G, LIU T H, CHEN W, et al. ECM1 prevents activation of transforming growth factor  $\beta$ , hepatic stellate cells, and fibrogenesis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(5): 1352-1367.
- [20] LI Y J, JIN C, SHEN M, et al. Iron regulatory protein 2 is required for artemether-mediated anti-hepatic fibrosis through ferroptosis pathway[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2020, 160(1): 845-859.
- [21] 王曼菲, 肖肽平, 赵好好, 等. 茵陈四苓汤对酒精性肝损伤大鼠肠黏膜屏障 ZO-1 及 occludin 的影响[J]. *中医药导报*, 2023, 29(5): 31-35.
- [22] ZHANG Q, CHANG X H, WANG H B, et al. TGF- $\beta$ 1 mediated Smad signaling pathway and EMT in hepatic fibrosis induced by Nano NiO in vivo and in vitro[J]. *Environmental Toxicology*, 2020, 35(4): 419-429.
- [23] ZHANG G K, JIANG Y Y, LIU X, et al. Lingonberry anthocyanins inhibit hepatic stellate cell activation and liver fibrosis via TGF $\beta$ /smad/ERK signaling pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(45): 13546-13556.
- [24] ALSHAMMARI G M, AL-QAHTANI W H, ALFARIS N A, et al. Quercetin prevents cadmium chloride-induced hepatic steatosis and fibrosis by downregulating the transcription of miR-21[J]. *BioFactors*, 2021, 47(3): 489-505.
- [25] MALYAR R M, NASERI E, LI H, et al. Hepatoprotective effects of selenium-enriched probiotics supplementation on heat-stressed wistar rat through anti-inflammatory and antioxidant effects[J]. *Biological Trace Element Research*, 2021, 199(9): 3445-3456.
- [26] MA H Y, DONG L, QUAN S Z, et al. Comparison of four markers of hepatic fibrosis and hepatic function indices in patients with liver cirrhosis and hepatoma[J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2021, 10(4): 4108-4121.
- [27] CHENG Q, LI C, YANG C F, et al. Methyl ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through the TGF- $\beta$ 1/Smad and NOX4/ROS pathways[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 299(6): 131-139.
- [28] 李淑娣, 陈欣菊, 刘江凯, 等. 虎杖活性成分治疗非酒精性脂肪性肝病的相关信号通路及相互作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(4): 902-907.
- [29] KAZEMI A, SOLTANI S, GHORABI S, et al. Effect of probiotic and synbiotic supplementation on inflammatory markers in health and disease status: A systematic review and meta-analysis of clinical trials[J]. *Clinical Nutrition*, 2020, 39(3): 789-819.
- [30] BERINGER A, MIOSEC P. IL-17 and TNF- $\alpha$  co-operation contributes to the proinflammatory response of hepatic stellate cells[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2019, 198(1): 111-120.
- [31] JIANG Y, XIANG C, ZHONG F, et al. Histone H3K27 methyltransferase EZH2 and demethylase JMJD3 regulate hepatic stellate cells activation and liver fibrosis[J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 361-378.
- [32] ZOU G L, ZUO S, LU S, et al. Bone morphogenetic protein-7 represses hepatic stellate cell activation and liver fibrosis via regulation of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2019, 25(30): 4222-4234.
- [33] 张 婷, 丁永芳, 彭蕴茹. 白首乌 C-21 甾体总苷通过 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路干预人肝星状细胞活化的机制[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(9): 1231-1236.

(本文编辑 苏 维)