

本文引用: 覃妮, 周柳, 李俊伟, 吴腾, 李秋萍, 陶晓静, 黄灵聪, 韦西玲, 张洪平, 陆世银. 脱氢卡维丁对 CCL₄ 诱导的肝纤维化大鼠的改善作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 220-226.

脱氢卡维丁对 CCL₄ 诱导的肝纤维化大鼠的改善作用

覃妮^{1,2}, 周柳^{1,2}, 李俊伟^{1,2}, 吴腾¹, 李秋萍¹, 陶晓静¹, 黄灵聪¹, 韦西玲¹,
张洪平^{1,2}, 陆世银^{1,2*}

1. 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, 广西柳州 545026
2. 柳州市中医医院(柳州市壮医医院), 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 探讨脱氢卡维丁对四氯化碳(carbon tetrachloride, CCL₄)诱导的肝纤维化大鼠的改善作用及可能机制。方法 将 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、水飞蓟宾组(30 mg/kg)、脱氢卡维丁组(50 mg/kg), 每组 6 只。除正常组外, 其他各组采用 30% CCL₄ 橄榄油溶液(1 mL/kg)腹腔注射复制肝纤维化模型, 每周 2 次, 连续 14 周。各给药组于造模第 13、14 周每天按设定剂量灌胃相应药物进行干预。正常组与模型组大鼠灌胃等体积的生理盐水。末次给药 12 h 后, 测定各组大鼠肝脾指数; 采用 HE 染色与 Masson 染色观察肝组织病理学变化, 比色法检测大鼠血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的含量; 采用 ELISA 检测血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层黏连蛋白(laminin, LN)、Ⅲ型前胶原蛋白(type Ⅲ procollagen, PCⅢ)及Ⅳ型胶原蛋白(collagen Ⅳ, Col Ⅳ)的表达水平; Western blot 法检测肝组织转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)的表达情况。结果 与正常组相比, 模型组大鼠肝脾指数显著增加($P<0.001$), 肝组织纤维化进展明显, 胶原容积分数明显增加($P<0.001$), 血清中 ALT、AST、MDA、LN、HA、PCⅢ和 Col Ⅳ水平显著升高($P<0.001$), SOD 明显下降($P<0.001$); 肝组织 TGF-β1、α-SMA 及 N-cadherin 蛋白表达水平明显上升($P<0.001$), E-cadherin 蛋白表达明显下降($P<0.001$)。与模型组比较, 脱氢卡维丁组大鼠肝脾指数明显降低($P<0.001$), 肝组织病理学损伤和纤维增生有效改善, 胶原容积分数明显下降($P<0.001$), 血清 ALT、AST、MDA 含量显著降低($P<0.001$), 血清 SOD 的表达水平明显升高($P<0.001$), LN、HA、PCⅢ、Col Ⅳ的表达明显下调($P<0.05$, $P<0.001$), 肝组织 TGF-β1、α-SMA 和 N-cadherin 蛋白表达显著下降($P<0.001$), 而 E-cadherin 蛋白表达明显升高($P<0.001$)。结论 脱氢卡维丁对肝纤维化大鼠具有良好的改善作用, 其机制可能与调节氧化应激反应、下调 N-cadherin、α-SMA、TGF-β1 蛋白表达及上调 E-cadherin 蛋白表达有关。

〔关键词〕 脱氢卡维丁; 肝纤维化; 氧化应激; E-钙黏蛋白; N-钙黏蛋白; α-平滑肌肌动蛋白; 转化生长因子-β1

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.007

Alleviating effects of dehydrocavidine on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats

QIN Ni^{1,2}, ZHOU Liu^{1,2}, LI Junwei^{1,2}, WU Teng¹, LI Qiuping¹, TAO Xiaojing¹, HUANG Lingcong¹,
WEI Xiling¹, ZHANG Hongping^{1,2}, LU Shiyin^{1,2*}

1. Liuzhou Key Laboratory for Preparation Development of Chinese Medicines (Zhuang and Yao Medicines), Liuzhou Chinese Medical Hospital (Liuzhou Hospital of Zhuang Medicine), Liuzhou, Guangxi 545026, China; 2. Liuzhou Engineering Technology Research Center for Preparation Development of Chinese Medicines (Zhuang and Yao Medicines), Liuzhou Chinese Medical Hospital (Liuzhou Hospital of Zhuang Medicine), Liuzhou, Guangxi 545026, China

〔收稿日期〕 2023-07-12

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

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

[Abstract] Objective To investigate the alleviating effects and their possible mechanism of dehydrocavidine on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis in rats. **Methods** SD rats were randomized into normal group, model group, silybinin group (30 mg/kg), and dehydrocavidine group (50 mg/kg), with six rats in each group. Except for normal group, the other three groups were injected intraperitoneally with 30% CCl₄ olive oil solution (1 mL/kg) to establish the hepatic fibrosis model, twice a week for 14 weeks. At the 13th and 14th weeks of modeling, each medication group was given the corresponding drug at the set dose intragastrically every day. Meanwhile, normal and model groups were given the equal volume of normal saline intragastrically. After 12 h of the last administration, the rat hepatic and splenic tissue were collected to measure the hepatic and splenic indexes; HE staining and Masson staining were used to observe the histopathological changes of the liver; colorimetric method was carried out to determine the content of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in rat serum. ELISA was performed to measure the expression levels of serum hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen (PCIII) and collagen IV (Col IV); Western blot was applied to examining the protein expression levels of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), α -smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin, and N-cadherin in the liver tissue. **Results** Compared with normal group, the hepatic and splenic indexes of rats in model group significantly increased ($P < 0.001$), the degree of hepatic fibrosis was remarkable, and the collagen volume fraction was significantly elevated ($P < 0.001$); meanwhile, the serum levels of ALT, AST, MDA, LN, HA, PCIII, and Col IV were fairly higher ($P < 0.001$), while the level of SOD was obviously lower ($P < 0.001$); the protein expression levels of TGF- β 1, α -SMA, and N-cadherin in the liver tissue were significantly up-regulated ($P < 0.001$), while that of E-cadherin was obviously down-regulated ($P < 0.001$). Compared with model group, the hepatic and splenic indexes of rats in dehydrocavidine group were significantly reduced ($P < 0.001$), the histopathological damage and fibrous hyperplasia were effectively alleviated, and the collagen volume fraction decreased significantly ($P < 0.001$); the serum levels of ALT, AST, and MDA were significantly lower ($P < 0.001$), while that of SOD was significantly higher ($P < 0.001$); the serum expression levels of LN, HA, PCIII, and Col IV were obviously up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.001$); the protein expression levels of TGF- β 1, α -SMA, and N-cadherin in the liver tissue markedly decreased ($P < 0.001$), while that of E-cadherin significantly increased ($P < 0.001$). **Conclusion** Dehydrocavidine can alleviate hepatic fibrosis in rats significantly, the mechanism of which may be related to the intervention in the oxidative stress, down-regulation of N-cadherin, α -SMA, and TGF- β 1 protein expressions, and up-regulation of E-cadherin protein expression in the liver tissue.

[Keywords] dehydrocavidine; hepatic fibrosis; oxidative stress; E-cadherin; N-cadherin; α -smooth muscle actin; transforming growth factor β 1

肝纤维化是诸多有害因素造成的持久的慢性肝损伤时,机体产生自我修复反应进程中诱导肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活并大量增殖,进而导致肝内弥散性细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度积聚的病理进程,若未及早干预可发展为肝硬化和肝癌^[1]。据报道,肝纤维化和早期肝硬化可经干预手段逆转^[2]。因此,缓解乃至逆转肝纤维化的恶化对防治与改善慢性肝病具有重大现实意义。HSC活化转化为肌成纤维细胞,后者分泌大量ECM,此过程被认为是肝纤维化进展的关键环节^[3]。研究发现,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)为HSC转化成肌成纤维细胞的重要机制^[4]。因此,调控EMT过程中的关键分子和信号通路是治疗肝纤维化的潜在重要靶点。

壮医学理论认为,肝纤维化及肝硬化均属“蛊病”范畴,肝纤维化由于蛊病日久,湿毒热毒渐消,蛊毒停滞于龙路火路,在腹中瘀积结块所致^[5];因而疏通龙路火路为主要治疗手段,辅以祛湿清热解

毒从整体发挥疗效。壮药岩黄连 *Corydalis saxicola* Bunting 为壮族民间常用于治疗肝病的草药,专用于疏通龙路火路、清除热毒湿毒,是壮医治疗蛊毒、腹部硬块的良药,具有清热解毒、利湿、抗炎、保肝、止痛等功效^[6]。结合中医基础理论“肝肾同源,肾生髓、髓生肝”,若遵循“理气、补肾、祛瘀解毒”的治疗原则,则可更好地协同抗肝纤维化作用,修复损伤的肝细胞,抑制炎症因子表达,增强机体免疫,从而改善肝纤维化。我们前期研究发现,以脱氢卡维丁为代表的岩黄连总生物碱能保肝护肝、改善肝脏的功能,对急慢性肝损伤具有较好的保护作用^[7-8];此外,脱氢卡维丁可通过抑制HSC活化而抗肝纤维化^[9]。然而,有关脱氢卡维丁抗肝纤维化的作用机制鲜见报道。为此,基于前期的研究基础,本研究采用CCl₄诱导复制大鼠肝纤维化模型,以水飞蓟宾为阳性对照药物,从EMT的角度进一步探讨脱氢卡维丁在大鼠模型中的抗肝纤维化效果及其可能机制,为脱氢卡维丁抗肝纤维化的研究与开发提供实验依据。

1 实验材料

1.1 动物

24只SPF级雄性SD大鼠,体质量(120±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004,动物使用许可证号:SYXK(桂)2019-0001。采用标准大鼠笼饲养于条件良好的动物房,12h光照昼夜循环,温度20~25℃,相对湿度55%~65%。自由摄食标准饲料及灭菌注射用水。

1.2 药物与主要试剂

脱氢卡维丁(批号:111667-200401,中国食品药品检定研究院);水飞蓟宾胶囊(批号:150709063,天津天力士圣特制药有限公司);CCl₄(批号:20210422,天津博迪生化股份有限公司);橄榄油(批号:20190711,山东鲁花集团商贸有限公司);ALT(批号:20210419)、AST(批号:20210420)、MDA(批号:20210417)和SOD(批号:20210420)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;4%多聚甲醛(批号:21235935,广州赛国生物科技有限公司);HE染色液(批号:20210419)、Masson染色液(批号:20210707)均购自北京索莱宝科技有限公司;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, Col Ⅳ)酶联免疫分析试剂盒(批号均为20220310,武汉贝茵莱生物科技有限公司);兔抗TGF-β1(批号:150203)、α-SMA(批号:140202)、E-cadherin(批号:150205)、N-cadherin(批号:140301)一抗均购自美国Abcam公司;兔抗β-actin一抗(批号:150303,美国CST公司);Western快速凝胶试剂盒(批号:090222,上海碧云天生物技术有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

Bio-Rad 680 iMark型酶标仪(上海伯乐生命医学产品有限公司);SC-20电热恒温水浴锅(宁波新芝生物科技股份有限公司);TGD-20MC高速低温离心机(长沙湘锐离心机有限公司);JY2002电子天平(上海恒平科学仪器有限公司);IMS-130制冰机(常熟雪科制冷设备有限公司);DYCZ-24DN双垂直电泳仪(北京六一仪器厂);YB-6LF生物组织石蜡包埋机(孝感亚光医用电子技术有限公司);RM2235石蜡切片机(德国LAICA公司);MI52-N倒置显微镜(广州市明美光电技术有限公司);DG5033A酶

联免疫检测仪(南京华东电子集团医疗装备有限责任公司);Tanon-5200全自动化学发光分析仪(上海天能科技有限公司);TD5台式离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);GWB-1超纯水器(北京普析通用仪器有限责任公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

大鼠自由摄食饮水适应性饲养1周后,随机分为正常组、模型组、脱氢卡维丁组(50 mg/kg,预实验剂量为25、50 mg/kg,结果提示50 mg/kg改善肝纤维化作用较显著,故本研究采用50 mg/kg作为脱氢卡维丁给药剂量)和水飞蓟宾组^[10](阳性对照,30 mg/kg)组,每组6只。除正常组大鼠腹腔注射橄榄油(1 mL/kg)外,其余各组分别于大鼠腹腔注射30% CCl₄橄榄油混合液(1 mL/kg)以建立肝纤维化模型^[11],每周2次,连续14周,于第12周末解剖模型组大鼠1只,通过HE及Masson肝组织病理染色确认造模成功。各给药组在造模第13周按设定剂量(10 mL/kg)每天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,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。大鼠末次给药后,禁食12h。采用3%苯巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后,腹主动脉采血,3 500 r/min离心(半径5 cm)15 min取血清,于-80℃超低温冰箱保存待检。完成血样采集后处死大鼠,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,脏器指数(%)=脏器湿重(g)/体质量(g)×100%。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。

2.2 肝组织病理学观察

取肝脏组织右叶同一位置约1 cm³大小,常规4%多聚甲醛液固定,脱水,石蜡包埋,切片(厚度约为3 μm),经二甲苯脱蜡、乙醇常规逐级脱水,苏木精染液染色,洗掉多余的染液后用0.5%盐酸乙醇分化,分别行HE染色和Masson染色,再次乙醇常规逐级脱水,二甲苯透明后采用中性树胶封片,通过显微镜下观察肝组织病理学变化。以Image J软件测定胶原纤维面积,计算胶原容积分数(CVF=胶原阳性的蓝色面积/总面积)。

2.3 大鼠血清相关指标的检测

取分离好的大鼠血清,应用比色法检测血清中ALT、AST、MDA、SOD的水平,采用ELISA法检测血清中HA、LN、PCⅢ、Col Ⅳ的含量。上述指标均严格

遵照检测试剂盒步骤操作,并于酶联免疫检测仪上测定。

2.4 Western blot 检测肝组织 TGF- β 1、 α -SMA、E-cadherin 及 N-cadherin 蛋白的表达

各组随机抽取 3 个标本,称量肝组织块体质量,剪碎后加入组织蛋白提取试剂,提取总蛋白,检测各样本蛋白含量。根据目的蛋白分子量大小配制合适的 SDS-PAGE 分离胶,蛋白经电泳分离后,转至 PVDF 膜,室温封闭后与相应目的蛋白一抗(1:1 500)在 4 °C 条件下孵育过夜。洗涤后置于二抗(1:3 000)中孵育 1 h。洗涤后进行 ECL 发光显影与定影。通过 DU 4 图像分析软件测定蛋白条带的灰度值以做定量分析,以内参 β -actin 作为参考,结果以目的蛋白/内参的积分光密度值的比值表示。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较使用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 脱氢卡维丁对 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠体质量和脏器指数的影响

正常组大鼠状态良好、皮毛光亮,饮食、排便均正常,体质量增长稳定。与正常组相比,模型组大鼠毛发显著发黄、粗糙,食欲减退,排便稀烂,活跃度降低,体质量长势缓慢。而脱氢卡维丁组和水飞蓟宾组大鼠毛色、精神状态、食欲和体质量增长等较模型组明显改善。如表 1 所示,实验后,相比于正常组,模型组大鼠体质量较小($P<0.001$),肝脏指数和脾脏

指数显著升高($P<0.001$);与水飞蓟宾组比较,脱氢卡维丁组体质量较大($P<0.05$)。与模型组比较,脱氢卡维丁组及水飞蓟宾组肝纤维化大鼠肝脏指数与脾脏指数显著降低($P<0.001$),且脱氢卡维丁组低于水飞蓟宾的作用($P<0.05$)。

3.2 脱氢卡维丁对 CCl₄ 诱导肝纤维化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 与 MDA 水平明显上升($P<0.001$),SOD 水平显著下降($P<0.001$),表明 CCl₄ 造成了大鼠肝损伤。相较于模型组,经脱氢卡维丁干预后和水飞蓟宾大鼠血清中 ALT、AST 与 MDA 含量显著下降($P<0.05$, $P<0.001$),血清 SOD 水平显著提高($P<0.001$)。相较于水飞蓟宾组,脱氢卡维丁组对 ALT、AST、MDA 与 SOD 调控改善作用更强($P<0.05$, $P<0.001$)。详见表 2。

3.3 脱氢卡维丁对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠血清中 HA、LN、PC III 和 Col IV 表达的调控作用

与正常组比较,模型组血清中 HA、LN、PC III 和 Col IV 水平显著升高($P<0.001$);与模型组比较,水飞蓟宾组、脱氢卡维丁组血清中 HA、LN、PC III 和 Col IV 含量明显下降($P<0.05$, $P<0.001$),且脱氢卡维丁组上述指标含量明显低于水飞蓟宾组($P<0.001$)。详见表 3。

3.4 脱氢卡维丁对 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠肝组织病理变化的影响

正常组大鼠肝小叶结构清晰完整,未见病理性纤维组织增生。与正常组相比,模型组大鼠肝小叶结构紊乱明显,肝细胞排列紊乱,可见细胞空泡变性,与细胞坏死增加,纤维间隔内发生明显的炎症细胞浸润,纤维化显著。脱氢卡维丁组与水飞蓟宾组对

表 1 各组大鼠体质量和肝脾指数的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

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	248.16 \pm 7.24	369.24 \pm 16.35	2.28 \pm 0.31	0.17 \pm 0.02
模型组	251.64 \pm 8.69	286.22 \pm 12.39 ^{###}	3.36 \pm 0.24 ^{###}	0.30 \pm 0.01 ^{###}
水飞蓟宾组	252.34 \pm 7.54	347.36 \pm 14.57 ^{**}	2.89 \pm 0.33 [*]	0.21 \pm 0.01 ^{**}
脱氢卡维丁组	249.37 \pm 8.83	365.57 \pm 15.63 ^{**Δ}	2.34 \pm 0.22 ^{**Δ}	0.18 \pm 0.02 ^{**Δ}

注:与正常组比较,^{###} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.001$;与水飞蓟宾组比较, ^{Δ} $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠血清中 ALT、AST、SOD 和 MDA 的水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$, $U\cdot L^{-1}$)

组别	ALT	AST	SOD	MDA
正常组	17.16 \pm 4.84	16.51 \pm 6.05	232.21 \pm 9.74	6.04 \pm 0.95
模型组	108.63 \pm 9.37 ^{###}	60.22 \pm 10.17 ^{###}	102.07 \pm 11.25 ^{###}	13.63 \pm 1.57 ^{###}
水飞蓟宾组	64.14 \pm 7.58 ^{**}	43.03 \pm 11.76 ^{**}	164.30 \pm 13.52 ^{**}	10.42 \pm 1.04 [*]
脱氢卡维丁组	15.36 \pm 6.94 ^{**Δ}	18.32 \pm 8.31 ^{**Δ}	147.82 \pm 12.06 ^{**Δ}	7.03 \pm 0.99 ^{**Δ}

注:与正常组比较,^{###} $P<0.001$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.001$;与水飞蓟宾组比较, ^{Δ} $P<0.05$, ^{Δ} $P<0.001$ 。

表 3 各组大鼠血清中 HA、LN、PC III 和 Col IV 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=6, \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)

组别	HA	LN	PC III	Col IV
正常组	95.42±11.02	99.02±16.47	70.85±7.06	213.66±14.07
模型组	219.01±9.34 [#]	263.21±11.38 [#]	184.62±14.04 [#]	315.62±13.87 [#]
水飞蓟宾组	148.33±8.67 ^{**}	194.35±12.86 ^{**}	149.48±16.21 ^{**}	286.13±17.82 [*]
脱氢卡维丁组	115.46±12.29 ^{**△△}	131.36±15.93 ^{**△△}	91.04±14.36 ^{**△△}	243.04±16.33 ^{**△△}

注:与正常组比较,[#] $P<0.001$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.001$;与水飞蓟宾组比较,^{△△} $P<0.001$ 。

CCl₄ 所致大鼠肝纤维化均有改善,且脱氢卡维丁组效果较水飞蓟宾组更为突出。详见图 1。

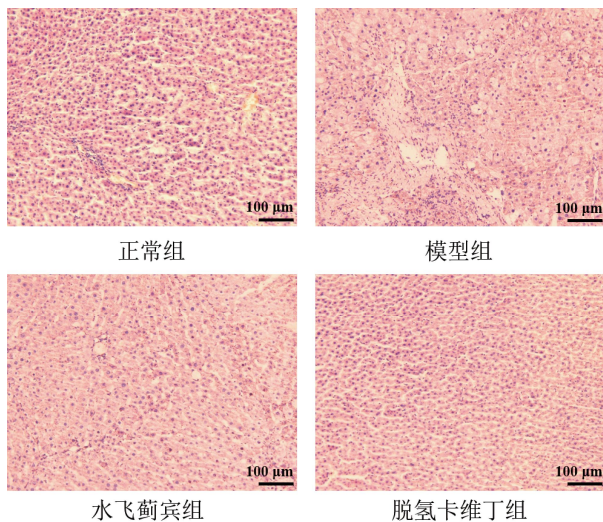


图 1 各组大鼠肝组织病理变化的改善情况 (HE, ×200, 标尺=100 μm)

如图 2 所示,Masson 染色可见正常组大鼠肝组织有轻微被染成蓝色的胶原纤维,未发现病理性改变。模型组可观察到明显、大量致密蓝染胶原沉积,肝脏汇管区纤维组织明显增生,且纤维间隔增大,部分已形成假小叶及胶原纤维束。与模型组比较,脱氢卡维丁组与水飞蓟宾组有不同程度的改善与逆转,胶原纤维增生范围显著减少、变细,胶原容积分数明显减少($P<0.001$),其中脱氢卡维丁组胶原容积分数小于水飞蓟宾组($P<0.05$)。详见表 4。

3.5 脱氢卡维丁对 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠肝组织内 E-cadherin、N-cadherin、 α -SMA、TGF- β 1 蛋白相对表达的影响

与正常组相比,模型组大鼠 N-cadherin、 α -SMA、TGF- β 1 蛋白表达增加明显($P<0.001$),E-cadherin 蛋白表达显著下调($P<0.001$)。与模型组比较,水飞蓟宾组和脱氢卡维丁组 N-cadherin、 α -SMA、TGF- β 1 蛋白表达均明显下调($P<0.001$);E-cadherin 蛋白表达明显上调($P<0.001$)。与水飞蓟宾组比较,脱氢卡维丁组诱导 E-cadherin、抑制 N-cadherin 及 α -

SMA 蛋白表达作用更强,具有显著差异($P<0.001$)。详见表 5、图 3。

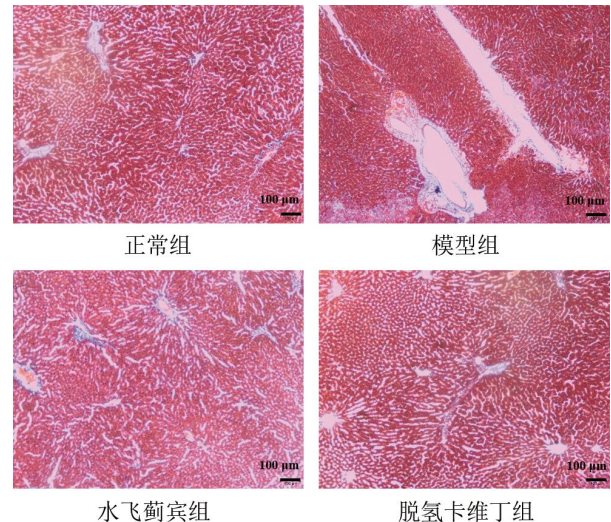


图 2 各组大鼠肝组织病理形态学比较 (Masson, ×100, 标尺=100 μm)

表 4 各组大鼠肝组织胶原容积分数比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	胶原容积分数/%
正常组	—	1.24±0.63
模型组	—	33.65±3.86 [#]
水飞蓟宾组	30	11.04±2.97 ^{**}
脱氢卡维丁组	50	8.16±2.05 ^{**△}

注:与正常组比较,[#] $P<0.001$;与模型组比较,^{**} $P<0.001$;与水飞蓟宾组比较,[△] $P<0.05$ 。

4 讨论

肝纤维化通常由病毒、代谢、损伤等因素诱发慢性肝病所引起,若未采取干预而任其发展,可发展为肝硬化、肝癌;同时,肝纤维化作为影响慢性肝病预后的关键环节,对肝病患者的健康及生存质量影响密切^[2]。现代医学认为,肝纤维化的病理学基础为 ECM 的合成异常增多,导致胶原在肝脏中过度沉积,而 HSC 是肝脏合成 ECM 的主要细胞^[3]。HSC 的活化和增殖在肝纤维化的进展中发挥重要作用,是肝纤维化发生、发展的中心环节^[4]。然而,尚未找到治疗肝纤维化的有效方法,地方特色民族医药因其对肝纤维化的良好防治效果及低毒性反应等优势,越

表5 各组大鼠肝组织内 E-cadherin、N-cadherin、 α -SMA、TGF- β 1 蛋白相对表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	E-cadherin/ β -actin	N-cadherin/ β -actin	α -SMA/ β -actin	TGF- β 1/ β -actin
正常组	0.621 \pm 0.011	0.805 \pm 0.008	0.896 \pm 0.011	0.600 \pm 0.017
模型组	0.305 \pm 0.010 ^{###}	0.963 \pm 0.005 ^{###}	1.061 \pm 0.009 ^{###}	0.954 \pm 0.013 ^{###}
水飞蓟宾组	0.794 \pm 0.019 ^{**}	0.564 \pm 0.013 ^{**}	0.656 \pm 0.015 ^{**}	0.210 \pm 0.010 ^{**}
脱氢卡维丁组	1.055 \pm 0.017 ^{**$\Delta\Delta$}	0.220 \pm 0.018 ^{**$\Delta\Delta$}	0.449 \pm 0.011 ^{**$\Delta\Delta$}	0.615 \pm 0.018 ^{**$\Delta\Delta$}

注:与正常组比较,^{###} $P<0.001$;与模型组比较,^{**} $P<0.001$;与水飞蓟宾组比较, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.001$ 。

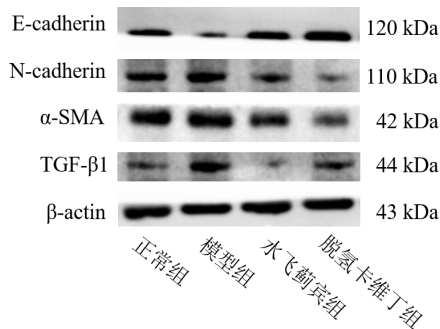


图3 各组大鼠肝组织内 E-cadherin、N-cadherin、 α -SMA、TGF- β 1 蛋白电泳图

发引起关注与重视。肝纤维化在壮医医学中归属于“咪叠蛊病”范畴,壮医认为“咪叠蛊”发生与进展是由于人体正气亏虚,热毒入侵机体并滞留于肝脏^[15],壮药岩黄连为清热解毒、利湿、通络止痛,常用于主治肝纤维化、肝硬化及肝癌的药材。前期研究发现,岩黄连总生物碱具有良好的抗肝纤维化作用,且生物碱成分脱氢卡维丁抗肝纤维化作用较强,然而,有关脱氢卡维丁抗肝纤维化的作用与机制尚未明确。基于此,本实验将脱氢卡维丁对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠的改善效果及可能作用机制开展初步研究。水飞蓟宾作为临床治疗肝纤维化的常用药,在抗炎、抗氧化、抗肝纤维化方面作用较好^[16],故选其作为本研究的阳性对照药物。

本研究采用经典的实验动物肝纤维化模型诱导剂 CCl₄,其在体内对肝细胞具有靶向性破坏作用,进而引起毒性三氯甲基自由基激发炎症反应,激活 HSC 后产生过量 ECM,最终导致严重肝损伤^[17]。ALT、AST 为评价肝损伤的典型标志^[18]。MDA 是机体中自由基参与脂质过氧化反应时的终产物,MDA 异常升高可严重损坏细胞膜结构,从而导致细胞肿胀与坏死^[19]。SOD 作为关键的抗氧化酶之一,可有效清除机体中的自由基,从而抑制脂质过氧化反应物的生成,发挥自身保护作用^[20]。本研究造模 14 周后,病理组织学结果表明,模型组大鼠肝脏出现了明显的损伤与纤维化,且血清 ALT、AST 含量明显升高。经脱氢卡维丁干预后,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,脱氢卡维

丁可修正 CCl₄ 诱导的大鼠血清脂质过氧化产物 MDA 和 SOD 水平。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脱氢卡维丁保肝作用的机制之一。

HA 为 HSC 合成的 ECM 的主要成分,机体血清中 HA 含量异常增加可提示 HSC 的活跃程度;LN 为 HSC 合成的一种糖蛋白,在肝纤维化病理进展中,血清 LN 浓度与纤维化进程密切相关;体内合成胶原蛋白时,PC III 经酶诱导释放到血清中,常用于 ECM 沉积程度的判定;Col IV 作为肝组织 ECM 的重要组成部分,其血清水平与肝纤维化严重程度呈正相关^[21]。因此,血清 HA、LN、PC III 和 Col IV 的含量可作为肝纤维化的诊疗指标。本实验结果显示,与模型组比较,脱氢卡维丁干预可有效抑制肝纤维化大鼠血清中 HA、LN、PC III 和 Col IV 的表达,提示脱氢卡维丁对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化具有良好的改善作用。

上皮细胞向间质细胞的转化过程称为 EMT,主要包括细胞黏附连接蛋白 E-cadherin 减少,间质细胞特征如细胞迁移、侵袭能力增强,间质标志物 N-cadherin、 α -SMA 等水平显著升高^[22]。TGF- β 信号通路可调节 EMT 过程^[23]。TGF- β 1 具有激活 HSC 向肌成纤维细胞转化的作用,抑制 TGF- β 1 表达可延缓肝纤维化进展^[24]。 α -SMA 是 HSC 活化的特异性标志蛋白,其表达增加可促进肝纤维化和肝损伤程度,成为预测肝硬化甚至肝癌进展的有效指标^[25]。HSC 活化前表达上皮细胞标志物 E-cadherin,活化后 E-cadherin 表达受抑制,间质细胞标志物 N-cadherin 水平上升,同时分泌 I 型胶原。由此可见,EMT 与肝纤维化的进程高度相关。因此,调控 EMT 发生、发展是改善和逆转肝纤维化的一种重要手段。本研究发现,与正常组比较,模型组肝纤维化组织 TGF- β 1、 α -SMA 和 N-cadherin 蛋白表达增加,E-cadherin 蛋白含量减少;经过脱氢卡维丁干预后,肝组织 TGF- β 1、 α -SMA 和 N-cadherin 蛋白水平下调,E-cadherin 蛋白含量升高。说明脱氢卡维丁可有效抑制 HSC 的活化,对肝纤维化有一定的抑制作用,提示脱氢卡维丁可能通过抑制 EMT 而发挥抗肝纤维化作用。

综上所述,脱氢卡维丁对 CCl₄ 诱导的肝纤维化

模型大鼠具有一定的保护作用,脱氢卡维丁能抑制肝纤维组织增生,改善肝功能,其抗肝纤维化机制可能与下调 N-cadherin、 α -SMA、TGF- β 1 的蛋白表达,上调 E-cadherin 蛋白表达,抑制细胞 EMT 有关。本研究为脱氢卡维丁抗肝纤维化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] BOYER-DIAZ Z, ARISTU-ZABALZA P, ANDRÉS-ROZAS M, et al. Pan-PPAR agonist lanifibranor improves portal hypertension and hepatic fibrosis in experimental advanced chronic liver disease[J]. *Journal of Hepatology*, 2021, 74(5): 1188-1199.
- [2] 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.
- [3] KHADRAWY S M, MOHAMED H M, MAHMOUD A M. Mesenchymal stem cells ameliorate oxidative stress, inflammation, and hepatic fibrosis via Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2021, 28(2): 2019-2030.
- [4] DOLIVO D, WEATHERS P, DOMINKO T. Artemisinin and artemisinin derivatives as anti-fibrotic therapeutics[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2021, 11(2): 322-339.
- [5] 吕艳杭, 吴姗姗, 王振常. 壮方柔肝化纤颗粒联合自体骨髓干细胞治疗乙肝患者肝纤维化、炎症因子及外周血 T 细胞的影响[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(4): 824-828.
- [6] 金书屹, 李红婷, 汪万利, 等. 紫堇属岩黄连的化学成分及药理作用研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(5): 1545-1552.
- [7] 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 ^1H NMR analysis[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017, 140: 199-209.
- [8] LIANG Y H, TANG C L, LU S Y, et al. Serum metabolomics study of the hepatoprotective effect of *Corydalis saxicola* Bunting on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats by ^1H NMR analysis[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 129: 70-79.
- [9] 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.
- [10] 戴鸿志, 安祯祥, 黄丹, 等. 黄芩甲苷对肝纤维化模型大鼠的改善作用机制研究[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(10): 1268-1274.
- [11] 金俊杰, 钟鸣, 余胜民, 等. 四氯化碳致肝纤维化大鼠模型药理实验方法学研究[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(7): 1659-1661.
- [12] 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- κ B pathways in mice[J]. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2022, 151: 113132.
- [13] LUO N A, LI J B, WEI Y, et al. Hepatic stellate cell: A double-edged sword in the liver[J]. *Physiological Research*, 2021, 70(6): 821-829.
- [14] LIU G F, WEI C, YUAN S Y, et al. Wogonoside attenuates liver fibrosis by triggering hepatic stellate cell ferroptosis through SOCS1/P53/SLC7A11 pathway[J]. *Phytotherapy Research*, 2022, 36(11): 4230-4243.
- [15] 苏悦, 宋虹霏, 王鑫, 等. 黄芩甲苷经 CXCL12/CXCR4 信号轴及 TXNIP/NLRP3 炎症体路径抗肝纤维化的机制研究[J]. *中草药*, 2023, 54(8): 2453-2461.
- [16] YANG X D, CHEN Z, YE L, et al. Esculin protects against methionine choline-deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis by regulating the Sirt1/NF- κ B p65 pathway[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2021, 59(1): 922-932.
- [17] 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.
- [18] ZHANG Q, CHANG X H, WANG H B, et al. TGF- β 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.
- [19] ZHANG G K, JIANG Y Y, LIU X, et al. Lingonberry anthocyanins inhibit hepatic stellate cell activation and liver fibrosis via TGF- β /smad/ERK signaling pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(45): 13546-13556.
- [20] LI J D, WANG T Q, LIU P P, et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD[J]. *Food & Function*, 2021, 12(9): 3898-3918.
- [21] LI D C, MA D H, LIU Y, et al. Extracts of *Periplaneta americana* alleviate hepatic fibrosis by affecting hepatic TGF- β and NF- κ B expression in rats with pig serum-induced liver fibrosis[J]. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2022, 60(2): 125-135.
- [22] CHENG B Q, ZHU Q, LIN W G, et al. microRNA-122 inhibits epithelial-mesenchymal transition of hepatic stellate cells induced by the TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2019, 17(1): 284-290.
- [23] MA Z Y, SHENG L L, LI J, et al. Resveratrol alleviates hepatic fibrosis in associated with decreased endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and inflammation[J]. *Inflammation*, 2022, 45(2): 812-823.
- [24] LE T V, DIEP T T N, NHAN V T, et al. A simple and effective scaffold for mouse hepatic stellate cell primary culture[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2023, 324(6): C1213-C1222.
- [25] XU C G, ZHU X L, WANG W, et al. Ursolic acid inhibits epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2019, 57(1): 169-175.