

本文引用: 闫盼悦, 苏思远, 叶苗青, 刘皎皎, 杨跃青, 何瑾瑜. 化瘀疏肝汤对猪血清诱导肝纤维化大鼠模型保护作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(2): 232-239.

化瘀疏肝汤对猪血清诱导肝纤维化大鼠模型保护作用研究

闫盼悦¹, 苏思远¹, 叶苗青², 刘皎皎², 杨跃青², 何瑾瑜^{2*}

1. 陕西中医药大学第一临床医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中医医院肝病科, 陕西 西安 710003

[摘要] **目的** 探讨化瘀疏肝汤对猪血清诱导肝纤维化大鼠模型的保护作用。**方法** 选取 80 只 SD 大鼠, 随机分成对照组、模型组、阳性组及化瘀疏肝汤低、中、高剂量组, 每组 13 只(有 2 只验证造模成功)。除对照组外, 其余大鼠连续 8 周, 每周 2 次腹腔注射猪血清 0.5 mL/只造模。对照组和模型组给予去离子水, 阳性组给予复方鳖甲软肝片 0.8 g/(kg·d), 化瘀疏肝汤低、中、高剂量组分别给予化瘀疏肝汤 30、60、120 g/(kg·d) 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 3 周。处死大鼠后, 检测大鼠血清酶指标丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)含量。计算肝、脾和胸腺脏器指数, 并检测肝组织中羟脯氨酸(hyp)含量。HE 染色观察肝脏组织纤维化程度并进行评分。流式细胞术检测外周血样中 T 淋巴细胞亚群表达以反映免疫功能变化。采用 Western blot 检测肝组织中母系抗双调蛋白 7(Smad7)与平滑肌肌动蛋白(α -SMA)蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠胸腺指数降低($P<0.05$); ALT、AST、GGT、ALP 含量升高($P<0.05$); hyp 含量升高($P<0.01$); 肝组织病理评分及纤维化水平升高($P<0.01$); T 淋巴细胞亚群中 CD3⁺T 淋巴比例、CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞比例及免疫指数 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺比值均下降($P<0.05$); Smad7 蛋白表达显著下降而 α -SMA 表达上升($P<0.05$)。与模型组相比, 化瘀疏肝汤低、中、高剂量组及阳性组胸腺指数升高($P<0.05$); 化瘀疏肝汤中、高剂量组及阳性组 ALT、AST、GGT、ALP 含量降低($P<0.05$); 化瘀疏肝汤中、高剂量组及阳性组 hyp 含量降低($P<0.05, P<0.01$); 根据 HE 染色观察肝脏组织纤维化程度并进行评分, 与模型组比较, 高剂量组及阳性组肝纤维化评分降低($P<0.01, P<0.05$); 化瘀疏肝汤低、中、高剂量组及阳性组 T 淋巴细胞亚群中 CD3⁺T 淋巴比例、CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞比例及免疫指数 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺比值升高($P<0.05, P<0.01$); Smad7 蛋白表达上升而 α -SMA 蛋白表达下降($P<0.05, P<0.01$)。**结论** 化瘀疏肝汤可改善猪血清所致肝纤维化模型大鼠肝功能指标、肝脏组织 hyp 含量以及肝纤维化水平, 并具有提高免疫作用的趋势。其作用机制可能与上调 Smad7、抑制 α -SMA 表达相关, 提示化瘀疏肝汤对肝纤维化治疗具有显著作用。

[关键词] 肝纤维化; 化瘀疏肝汤; 猪血清; 复方鳖甲软肝片; 胸腺指数

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.02.003

Protective effects of Huayu Shugan Decoction on a rat model with hepatic fibrosis induced by porcine serum

YAN Panyue¹, SU Siyuan¹, YE Miaoqing², LIU Jiaojiao², YANG Yueqing², HE Jinyu^{2*}

1. The First Clinical Medical College, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi 712046, China;

2. Department of Hepatology, Shaanxi Provincial Hospital of Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi 710003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effects of Huayu Shugan Decoction (HYSGD) on a rat model with hepatic fibrosis (HF) induced by porcine serum (PS). **Methods** Eighty SD rats were enrolled and randomly divided into control

[收稿日期] 2025-11-18

[基金项目] 国家中医优势专科建设项目(国中医药医政函[2024]90号); 陕西省自然科学基金(一般面上项目)(2022JM-519); 陕西省高水平中医药重点学科建设项目(SXZYZDXK-2024005); 陕西省感染性疾病临床医学研究中心(中西医结合)(2024S-LCZX-18, 2020LCZX-02)。

[通信作者] * 何瑾瑜, 女, 硕士, 副主任医师, E-mail: chrisandlm@126.com。

group, model group, positive control group, and low-, medium-, and high-dose HYSGD groups, with 13 rats in each group (with two additional rats used to verify successful modeling). Except for the control group, all rats were intraperitoneally injected with PS (0.5 mL/rat), twice a week for 8 consecutive weeks to establish the model. The control and model groups were given deionized water; the positive control group was given Fufang Biejia Ruangan Tablets (FFBJRGT) [0.8 g/(kg·d)]; and the low-, medium-, and high-dose HYSGD groups were treated with HYSGD by intragastric administration at doses of 30, 60, and 120 g/(kg·d), respectively, once daily for 3 consecutive weeks. After the rats were sacrificed, the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and γ -glutamyl transferase (GGT) were measured. Organ indices of liver, spleen, and thymus were calculated, and hydroxyproline (Hyp) content in liver tissues was checked. HE staining was performed to observe and evaluate the degree of HF. Flow cytometry was used to assess the expression of T lymphocyte subsets in peripheral blood samples as indicators of changes in immune function. Western blot was employed to determine the protein expression levels of SMAD family member 7 (Smad7) and α -smooth muscle actin (α -SMA) in liver tissues. **Results** Compared with the control group, the model group showed a decreased thymus index ($P<0.05$), elevated content of ALT, AST, GGT, and ALP ($P<0.05$), increased Hyp content ($P<0.05$), and higher pathological score and fibrosis level in liver tissues ($P<0.01$). Moreover, the proportions of CD3⁺ T and CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes, along with the immune index (CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ ratio), were all reduced ($P<0.05$). At the protein level, Smad7 protein expression was significantly downregulated, while α -SMA expression was upregulated ($P<0.05$). Compared with the model group, the low-, medium-, and high-dose HYSGD groups and positive control group exhibited an increase in thymus index ($P<0.05$), the medium- and high-dose HYSGD groups and positive group showed decreased levels of ALT, AST, GGT, and ALP ($P<0.05$) and reduced Hyp level ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the fibrosis scores were significantly reduced in the high-dose HYSGD and positive control groups ($P<0.01$, $P<0.05$). Furthermore, the low-, medium-, and high-dose HYSGD groups and positive control group demonstrated elevated proportions of CD3⁺ T and CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes, along with the immune index (CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ ratio) ($P<0.05$, $P<0.01$). Additionally, Smad7 protein expression increased, whereas α -SMA protein expression decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** HYSGD can significantly improve hepatic function indices, hepatic Hyp content, and HF level in rat models with PS-induced HF, accompanied by a trend toward enhanced immune function. Its mechanism of action may be related to the upregulation of Smad7 expression and the inhibition of α -SMA expression, suggesting that HYSGD has a significant therapeutic effect on HF.

[**Keywords**] hepatic fibrosis; Huayu Shugan Decoction; porcine serum; Fufang Biejia Ruangan Tablets; thymus index

肝纤维化是肝脏对损伤进行修复愈合的复杂病理反应,是多种慢性肝脏疾病的病理进展的重要病理特征之一,肝纤维化会引起细胞外基质的异常增生和沉积,最终形成纤维瘢痕损害肝脏结构及功能,可进一步引起肝硬化、肝细胞癌及肝功能衰竭等疾病^[1]。相关研究表明,肝纤维化与炎症反应、免疫复合物沉积等免疫系统过度损伤密切相关,因此,可通过调节机体免疫状态来改善肝纤维化,对治疗与控制各种慢性肝病也有重要作用^[2]。目前尚无治疗肝纤维化的特异性药物,临床多以针对各种慢性肝病的病因治疗为主,如治疗慢性乙型肝炎的核苷酸类药物、治疗自身免疫性肝炎的激素类药物等,且治疗效果不佳。因此,如何有效治疗肝纤维化是临床急需解决的问题。

中医药成分复杂,可同时作用于多条通路及靶点,在抗肝纤维化治疗中具有独特的临床疗效^[3]。根

据肝纤维化的症状及临床表现,中医学将其归属于“胁痛”“痞块”“积聚”等范畴^[4]。陕西省中医医院肝病科根据多年临床经验,从中医角度出发,认为其病机主要为肝气不足、气滞血瘀,治疗当以补气活血、软坚散结、化瘀解毒、柔肝保肝为法,在长期的临床实践中研制出化瘀疏肝汤,在抗肝纤维化治疗中发挥了良好的疗效^[5]。为进一步深入探索化瘀疏肝汤的作用机制及疗效,本课题组拟以猪血清诱导肝纤维化大鼠模型,并给予化瘀疏肝汤进行干预,从实验室角度明确其对肝纤维化的改善作用。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠80只,8周龄,体质量200~300 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号:NO0034771。动物饲养于通风条件良好,

12 h 光/暗交替循环,温度 20~25 ℃,相对湿度 50%~55%的环境中。本研究符合陕西省中医医院伦理委员会伦理学标准(伦理批号:2022L01009)。

1.2 受试药物

化癥疏肝汤购自陕西省中医医院中药房,由陕西省中医医院煎药房煎制[处方:鳖甲 15 g(先煎)、生牡蛎 10 g、水蛭 1.5 g、三七粉 10 g(冲服)、炒白术 12 g、桃仁 9 g、柴胡 12 g、白芍 12 g、当归 12 g、茯苓 15 g、黄芪 12 g、郁金 12 g 按比例配制]。煎煮方法:先将所有药物在去离子水中浸泡 40 min,大火煮沸后持续 5 min,转为文火熬制 40 min;前后煎煮 2 次,合并滤液,配制不同浓度,低温保存。阳性药:复方鳖甲软肝片(内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司生产,批准文号:国药准字 Z19991011,规格:0.5 g/片,生产批号:20090325)。

1.3 主要仪器

低温高速离心机(型号:centrifuge5810R,Eppendorf);电子天平(型号:BS210S,北京赛多利斯天平厂);组织研磨器(型号:HT-200,北京科实玻璃仪器有限公司);电热恒温水浴锅(型号:HH-2 型,北京科伟永兴仪器有限公司);流式细胞检测仪(型号:BD FACS CantoII,美国 Beck-man 公司)。

1.4 主要试剂

羟脯氨酸(hydroxyproline, hyp)试剂盒(批号:20090717,南京建成生物工程研究所);猪血清(批号:DI002-3,西安舟鼎国生物技术有限责任公司);氯化钠注射液(批号:H20058664,西安京西双鹤药业有限公司);RIPA 裂解液(碧云天生物技术有限公司,批号:20250108);BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:20250115);ELISA 试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:20250115);FITC 标记 CD3 抗体(克隆号 17A2,碧迪医疗器械有限公司,批号:8040162);PE-cy7 标记 CD4 抗体(克隆号:W3/25,Thermo Fisher Scientific 公司,批号:2246832);APC-cy7 标记 CD8 抗体(克隆号:OX-8,碧迪医疗器械有限公司,批号:8120456);10%(w/v)乌拉坦溶液(国药集团化学试剂有限公司,批号:20241208);红细胞裂解液(联科生物技术有限公司,批号:20250112);PBS 缓冲液(0.01 M,pH 7.4,国药集团化学试剂有限公司,批号:20241225);5×上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号:20241216);兔抗大鼠 Smad7 一抗(识别条带 49 kDa,Abcam plc,批号:GR3285612-

1);兔抗大鼠 α -SMA 一抗(特异性条带 42 kDa,Abcam plc,批号:GR3296728-1);兔抗大鼠 GAPDH 一抗(37 kDa,武汉三鹰生物技术有限公司,批号:102705);HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:102608)。

1.5 造模、分组及给药

雄性 SD 大鼠 80 只,适应性喂养 1 周,体质量 ≥ 200 g,随机分为对照组(13 只)和模型组(67 只),参照文献[6],除对照组外,模型组大鼠腹腔注射猪血清 0.5 mL/只,每周注射 2 次,共 8 周。并于造模后 8 周,在模型组中随机抽取 2 只,观察肝脏组织切片,如有明显的纤维增生则提示造模成功^[7]。剩余的 65 只大鼠随机分为模型组、阳性组及化癥疏肝汤高剂量组、中剂量组和低剂量组。对照组和模型组给予去离子水,阳性组给予复方鳖甲软肝片 0.8 g/(kg·d),化癥疏肝汤低、中、高剂量组分别给予化癥疏肝汤 30、60、120g/(kg·d)^[8],灌胃给药,1 次/d,连续 3 周。

1.6 生化检测指标

末次给药后,大鼠禁食 12 h,10%乌拉坦注射麻醉,颈总动脉采血,离心,取血清,采用全自动生化分析仪检测血清中丙氨酸氨基转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰氨基转移酶(γ -glutamyltransferase, GGT)含量。处死动物后分离肝脏、脾脏及胸腺组织,称重并计算肝脏指数、脾脏指数及胸腺。之后各组分别取同一部位肝脏组织湿重 1 g,加 5 mL 生理盐水制成匀浆,离心,hyp 试剂盒测定肝脏纤维化标志物 hyp 含量。

1.7 组织病理学检测

各组大鼠肝脏组织用 10%福尔马林溶液固定,取材,常规石蜡包埋,切片进行 HE 染色,用 LEICA 生物显微镜进行观察。依照以下评分标准进行肝纤维化评分:0 级(0 分),无纤维化;I 级(1 分),纤维结缔组织局限于汇管区或汇管区扩大;II 级(2 分),纤维结缔组织增生进入肝小叶 2/3,形成不完全间隔,同时有 I 级样改变;III 级(3 分),纤维结缔组织增生进入肝小叶达中央静脉周围,有个别菲薄的完全间隔形成(假小叶),或较厚的不完全间隔;IV 级(4 分),纤维结缔组织在全小叶呈多处弥漫性增生,完全间隔较厚,假小叶大量形成,并有 III 级样改变^[7]。

1.8 流式细胞术检测

各组大鼠处理完毕后尾静脉采集血液于抗凝管中,每组大鼠取 100 μL 血样,分别加入 5 μL 的单克隆抗大鼠 FITC 标记 CD3 抗体、PE-cy7 标记 CD4 抗体、APC-cy7 标记 CD8 抗体,避光孵育 30 min;后加入 1 mL 的红细胞裂解液,混匀裂解 10 min,1 500 r/min 条件下离心(离心半径 5 cm)10 min 去上清;再用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后加入 500 μL PBS 缓冲液重悬细胞,经 BD FACS Canto II 流式细胞仪检测各组大鼠外周血中 T 淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺)的表达水平及免疫指数 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ 比值,以评估大鼠免疫功能状态。

1.9 Western blot 检测

取各组大鼠肝组织 50~100 mg,加入 RIPA 裂解液(含 PMSF)匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下裂解 30 min,12 000 r/min 条件下离心(离心半径 5 cm)15 min,取上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,并按每孔 30~40 μg 总蛋白量加样。蛋白样品加入 5 \times 上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴变性 5 min 后,使用 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白(浓缩胶 80 V,分离胶 120 V)。电泳结束后,将蛋白转移至 PVDF 膜(0.22 μm),恒流 300 mA 转膜 90 min。转膜后,PVDF 膜以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加入一抗(Smad7、 α -SMA、GAPDH,均按 1:5 000 稀释)孵育过夜,TBST 洗膜后,加入 HRP 标记的二抗(1:5 000 稀释),室温孵育 2 h。ECL 化学发光显色并使用凝胶成像系统曝光。对各组代表性条带进行展示,并利用定量软件进行蛋白条带定量分析。

1.10 统计学方法

用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较,数据符合正态分布与方差齐性检验者,采用单因素方差分析;不符合者,采用非参

数检验进行分析。 $P<0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 化癥疏肝汤对大鼠脏器指数的影响

与对照组相比,模型组大鼠胸腺指数降低($P<0.05$),肝脏和脾脏指数也降低,但无统计学意义;与阳性组相比较,化癥疏肝汤高剂量组各脏器指数更高,但无统计学意义;与模型组相比,化癥疏肝汤低、中、高剂量组和阳性组胸腺指数均显著升高($P<0.05$),化癥疏肝汤低、中、高剂量组及肝脏指数及脾脏指数均有上升趋势,但差异无统计学意义。详见表 1。

表 1 各组大鼠脏器指数比较($\bar{x}\pm s, n=13$)

Table 1 Comparison of organ indices in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=13$)

组别	肝脏指数/(mg/g)	脾脏指数/(mg/g)	胸腺指数/(mg/g)
对照组	26.67 \pm 4.68	1.91 \pm 0.36	0.64 \pm 0.16
模型组	24.50 \pm 3.26	1.85 \pm 0.31	0.45 \pm 0.09 [△]
化癥疏肝汤低剂量组	24.93 \pm 3.61	1.88 \pm 0.45	0.52 \pm 0.07*
化癥疏肝汤中剂量组	25.25 \pm 3.54	1.90 \pm 0.31	0.56 \pm 0.12*
化癥疏肝汤高剂量组	26.31 \pm 5.93	2.02 \pm 0.48	0.62 \pm 0.16*
阳性组	26.28 \pm 5.21	1.89 \pm 0.29	0.61 \pm 0.15*

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

2.2 化癥疏肝汤对大鼠肝纤维化模型血清酶指标的影响

与对照组相比,模型组大鼠 ALT、AST、GGT、ALP 水平显著升高($P<0.05$);与模型组相比,化癥疏肝汤中、高剂量组和阳性组 ALT、AST、GGT、ALP 含量显著降低($P<0.05$)。详见表 2。

2.3 化癥疏肝汤对大鼠肝脏组织 hyp 含量及肝纤维化评分的影响

与对照组相比,模型组 hyp 含量及肝纤维化评

表 2 各组大鼠血清酶指标比较($\bar{x}\pm s, n=13$)

Table 2 Comparison of serum enzyme indicators in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=13$)

组别	ALT/(IU/L)	AST/(IU/L)	GGT/(IU/L)	ALP/(IU/L)
对照组	27.00 \pm 9.14	153.92 \pm 37.96	2.54 \pm 0.97	81.69 \pm 18.98
模型组	70.00 \pm 10.33 [△]	188.31 \pm 48.16 [△]	3.82 \pm 0.87 [△]	96.38 \pm 24.93 [△]
化癥疏肝汤低剂量组	68.69 \pm 22.27	174.00 \pm 44.55	3.08 \pm 0.86	92.46 \pm 26.95
化癥疏肝汤中剂量组	58.69 \pm 15.10*	167.92 \pm 45.29*	2.54 \pm 0.88*	80.00 \pm 11.22*
化癥疏肝汤高剂量组	45.54 \pm 9.93*	148.54 \pm 20.09*	2.38 \pm 0.77*	73.69 \pm 10.35*
阳性组	42.00 \pm 8.16*	157.38 \pm 37.57*	2.15 \pm 0.55*	80.38 \pm 12.81*

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

表3 各组大鼠肝脏组织 hyp 含量及肝纤维化评分比较($\bar{x}\pm s, n=13$)

Table 3 Comparison of hyp content in liver tissues and HF scores in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=13$)

组别	Hyp/($\mu\text{g/g}$)	肝纤维化评分/分
对照组	129.27 \pm 20.40	1.08 \pm 0.28
模型组	226.72 \pm 21.00 $\Delta\Delta$	2.08 \pm 0.76 $\Delta\Delta$
化癥疏肝汤低剂量组	187.66 \pm 44.78	1.69 \pm 0.63
化癥疏肝汤中剂量组	145.17 \pm 47.71*	1.54 \pm 0.97
化癥疏肝汤高剂量组	122.68 \pm 23.68**	0.92 \pm 0.86**
阳性组	142.33 \pm 21.89*	1.08 \pm 1.12*

注:与对照组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

分均显著升高($P<0.01$);与阳性组相比,化癥疏肝汤高剂量组 hyp 含量及肝纤维化评分均降低,但无统计学意义;与模型组相比,化癥疏肝汤中、高剂量组和阳性组 Hyp 含量均显著降低($P<0.01, P<0.05$),阳性组、化癥疏肝汤高剂量组肝纤维化评分降低($P<0.05, P<0.01$);HE 染色结果可见,对照组肝小叶结

构均正常,肝索排列整齐,肝门处有少量胶原合成;与对照组比较,模型组肝小叶结构紊乱,可见点状、灶状肝细胞坏死及窦周纤维化,汇管区纤维组织增生,纤维间隔形成,纤维化明显加重;与模型组比较,化癥疏肝汤高剂量组及阳性组纤维间隔明显变细变短,肝纤维化程度较模型组明显减轻。详见表3、图1。

2.4 化癥疏肝汤对大鼠外周血中 T 淋巴细胞亚群表达的影响

流式细胞术检测发现,与对照组相比,模型组大鼠 T 淋巴细胞亚群中 CD3⁺T 淋巴细胞比例、CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞比例及免疫指数 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺比值均显著下降($P<0.05$);与模型组相比,化癥疏肝汤低、中、高剂量组和阳性组大鼠 T 淋巴细胞亚群中 CD3⁺T 淋巴细胞比例、CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞比例及免疫指数 CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺比值均显著上升($P<0.05, P<0.01$)。详见图2和表4。

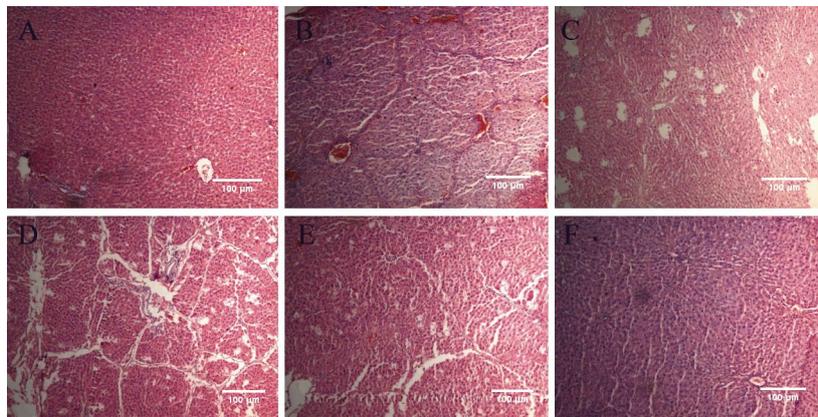


图1 各组大鼠肝脏病理形态学变化(HE, $\times 100$)

Fig.1 Histopathological changes in liver tissues of rats in each group (HE, $\times 100$)

注:A.对照组;B.模型组;C.阳性组;D.化癥疏肝汤低剂量组;E.化癥疏肝汤中剂量组;F.化癥疏肝汤高剂量组。

表4 各组大鼠 T 淋巴细胞亚群表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=13$)

Table 4 Immune-related indicators of T lymphocyte subsets of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=13$)

组别	CD3 ⁺ T 淋巴比例/%	CD3 ⁺ CD4 ⁺ T 淋巴比例/%	CD3 ⁺ CD8 ⁺ T 淋巴比例/%	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ 指数
对照组	65.58 \pm 8.43	40.52 \pm 5.11	25.39 \pm 5.21	1.85 \pm 0.42
模型组	36.82 \pm 5.66 Δ	15.35 \pm 4.20 Δ	23.89 \pm 3.89	0.75 \pm 0.33 Δ
化癥疏肝汤低剂量组	45.69 \pm 4.15*	20.08 \pm 3.19*	25.47 \pm 3.75	0.91 \pm 0.26*
化癥疏肝汤中剂量组	52.95 \pm 4.70*	30.67 \pm 4.29*	24.54 \pm 3.86	1.21 \pm 0.22*
化癥疏肝汤高剂量组	61.54 \pm 5.13**	48.59 \pm 5.06**	24.38 \pm 2.95	1.69 \pm 0.25**
阳性组	62.20 \pm 5.16**	48.88 \pm 3.50**	23.15 \pm 3.44	1.78 \pm 0.21**

注:与对照组比较, $\Delta P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

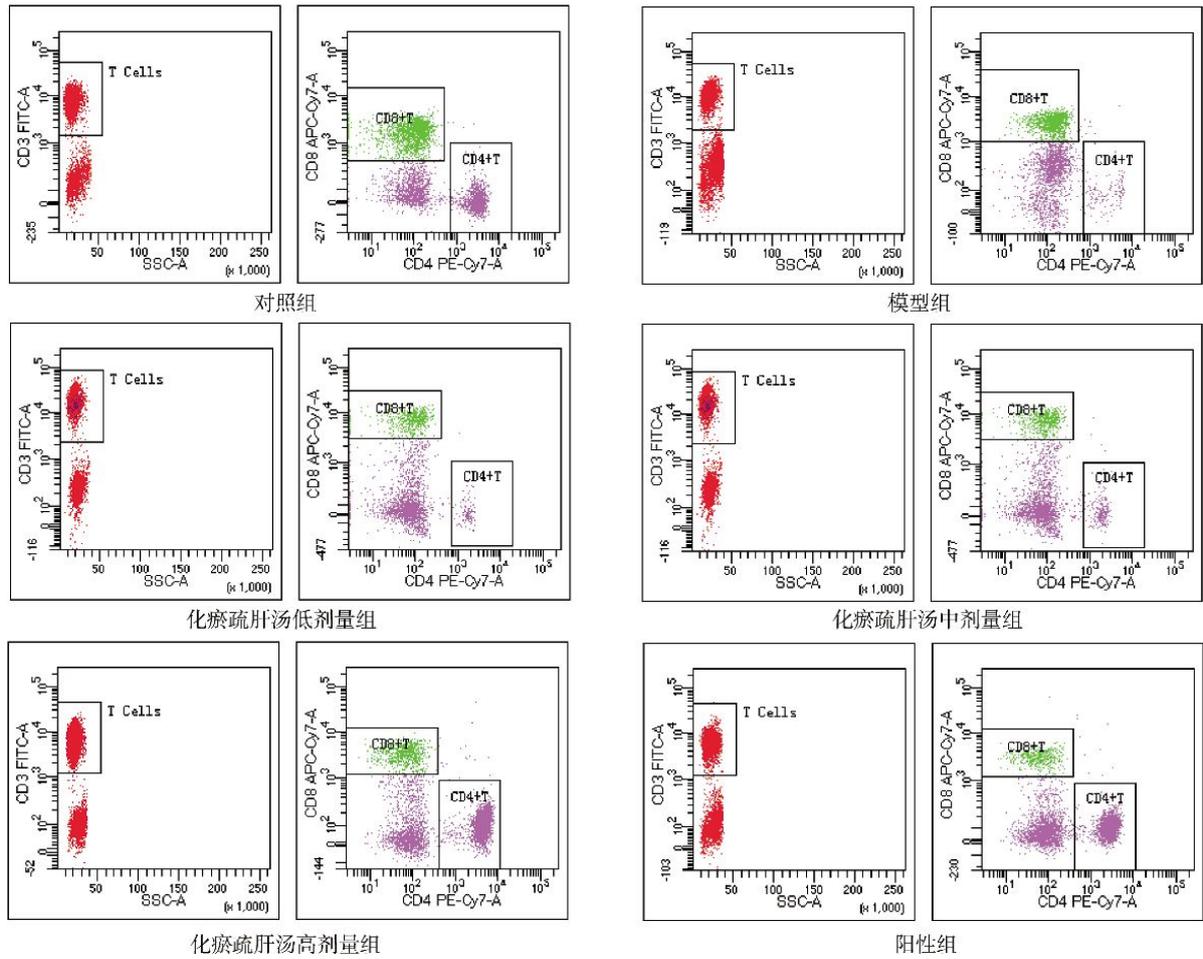


图2 流式细胞术检测各组大鼠外周血中T淋巴细胞亚群表达情况

Fig.2 Flow cytometry analysis of T lymphocyte subset expressions of rats in each group

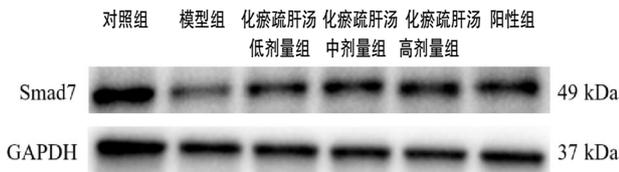


图3 各组对大鼠肝组织 Smad7 蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of different treatments on Smad7 protein expression in liver tissues of rats in each group

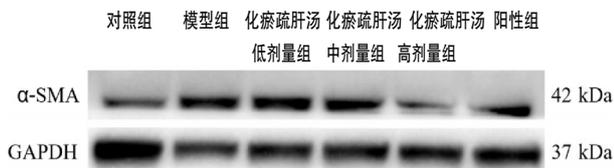


图4 各组对大鼠肝组织 alpha-SMA 蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of different treatments on alpha-SMA protein expression in liver tissues of rats in each group

2.5 化癥疏肝汤对大鼠肝组织 Smad7 与 alpha-SMA 蛋白表达水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠肝组织中 Smad7 蛋

白表达下降, alpha-SMA 蛋白表达上升 ($P < 0.01$)。与模型组相比,化癥疏肝汤低、中、高剂量组及阳性组, Smad7 蛋白表达显著升高,而 alpha-SMA 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。详见图 3、图 4 及表 5。

表5 Western blot 检测各组大鼠肝组织中 Smad7、alpha-SMA 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=13$)

Table 5 Western blot of Smad7 and alpha-SMA protein expressions in the liver tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=13$)

组别	Smad7/GAPDH	alpha-SMA/GAPDH
对照组	1.09±0.08	0.25±0.07
模型组	0.18±0.06 ^{△△}	1.23±0.09 ^{△△}
化癥疏肝汤低剂量组	0.35±0.07*	1.04±0.06
化癥疏肝汤中剂量组	0.46±0.07**	0.83±0.07*
化癥疏肝汤高剂量组	0.89±0.06**	0.35±0.05**
阳性组	0.92±0.08**	0.63±0.06*

注:与对照组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.05$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与阳性组比较, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

肝脏是维持人体新陈代谢最重要的器官,容易受到各种因素的影响,其中大约一半是由于肝硬化的并发症,另一半则是由于病毒性肝炎和肝细胞癌,这些疾病的早期阶段与肝纤维化密切相关^[8]。肝纤维化是慢性肝损伤以及持续炎症反应和纤维形成导致的结果。其过程是可逆的、动态的,因此,早期有效的干预措施对于阻止和逆转肝纤维化进展至关重要^[9]。肝纤维化临床表现为:胁痛、乏力、纳差、腹胀、胁下积块等,其发展路径为肝气郁结→气滞血瘀/湿热内生→痰瘀阻络→正气亏虚,而现代中医药研究通过“病证结合”,不断丰富和证实了传统理论的科学性,为中医药抗肝纤维化治疗提供了坚实的理论和实践依据^[10-11]。

化痰疏肝汤为陕西省中医医院肝病科自拟的经验方,由鳖甲、生牡蛎、水蛭、三七粉、炒白术、桃仁、柴胡、白芍、当归、茯苓、黄芪、郁金组成。其组方思路,体现了“疏肝以治其因,化痰以治其果”的原则。通过三七粉、桃仁等药物的强力活血化瘀功效,直接作用于痹阻的肝络,化解已形成的微癥积(纤维间隔),改善肝脏的微循环障碍,即中医所述“通络散结”。柴胡、白芍、当归等疏肝理气药,能恢复肝的疏泄功能,使全身气机通畅,从源头上阻止了气滞导致血瘀的肝纤维化疾病恶化,并增强其耐受力和修复能力^[12-14]。

本课题组前期研究发现化痰疏肝汤对患者的肝功能指标转氨酶、胆红素等及其临床症状均具有一定的改善作用,对慢性肝病患者免疫功能提升具有良好的临床疗效^[15]。现代药理研究证明,鳖甲提取物可通过抑制肝星状细胞的激活,促进其凋亡,并通过抗炎和抗过氧化损伤加速其降解,发挥抗纤维化作用^[16]。牡蛎中的提取物牡蛎肽可通过下调核因子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达来改善大鼠肝纤维化^[17]。三七总皂苷可降低肝纤维组织病理学改变,还可有效降低血清细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-1、IL-6、NF- κ B、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)水平发挥抗纤维化作用^[18]。柴胡中的柴胡皂苷可通过上调血清中 IL-10、一氧化氮(nitric oxide, NO)水平,

降低TNF- α 水平防治肝脏纤维化,保护肝脏细胞^[19]。白术-白芍可能通过改善肠道菌群紊乱,调节乳酸杆菌科、白藜芦醇菌科、蔗糖单胞菌科水平,从而延缓肝纤维化发展;同时也可以通过AGE-RAGE、NF- κ B等通路,影响环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma 2, BCL2)、BAX、PPARG、AKT1、IL-6、TNF等细胞因子而发挥抗纤维化的功效^[20]。当归中的主要活性成分欧当归内酯A、当归阿魏酸均可通过调节肝脏中NO的释放,保护肝窦内皮细胞,发挥抗纤维化作用^[21]。桃仁通过上调谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶等酶的水平抑制炎症反应,改善肝纤维化^[22]。黄芪可通过调控p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)、NF- κ B、前列腺素E2/前列腺素E2受体2/环磷酸腺苷多条信号通路,发挥减轻肝脏炎症反应、抗氧化应激、抑制肌成纤维细胞合成、减少细胞外基质合成等作用,达到抗肝纤维化的作用^[23]。茯苓可通过降低TGF- β 表达,抑制肝脏纤维化^[24]。水蛭素,可能通过抑制CTGF mRNA以及Smad4 mRNA的表达,减少肝脏细胞外基质异常增生,改善组织纤维化^[25]。

猪血清作为异物抗原,腹腔注射可诱导受试动物产生免疫反应,免疫复合物沉积于门静脉,使汇管区产生慢性炎症增生,刺激肝星状细胞向肌成纤维细胞转化,使细胞外基质过度沉积导致肝纤维化^[26]。相比较CCl₄或者硫代乙酰胺诱导建立的肝纤维化模型,猪血清诱导的肝纤维化对机体的整体健康状况和肝功能影响更小,且可以更好地体现免疫损伤对机体肝组织纤维化的影响^[27-28]。因此,本研究中模型组大鼠经猪血清诱导造模,引起肝细胞变性或者坏死,细胞膜通透性增加、破裂,ALT和AST分别从细胞质和线粒体中释放出来,在血清中高表达。同时,研究发现模型组大鼠的免疫功能指标均显著下降,提示猪血清诱导的肝纤维化机体免疫功能显著下降。肝组织内hyp的含量测定是衡量胶原蛋白合成和降解的指标,有助于评估肝纤维化程度及其进展情况^[29],化痰疏肝汤可以改善模型组大鼠血清中ALP、AST和hyp的含量,降低肝纤维化病理学评分,减轻肝纤维化程度。化痰疏肝汤还可提高肝纤维化模型大鼠胸腺指数和T淋巴细胞亚群表达,表明其可通过增强机体免疫功能,对肝纤维化有较好的治疗作用。肝组织病理切片结果显示,模型组肝组织炎症细胞渗出明显,肝小叶结构排列紊乱,汇管区扩大,纤

维组织增生明显,假小叶部分形成,而化瘀疏肝汤给药组的肝纤维化程度明显轻于模型组,并且可降低肝纤维化评分,表明化瘀疏肝汤对肝组织纤维化具有一定的改善作用。

综上所述,化瘀疏肝汤作为一种中药制剂,可显著降低肝功能血清酶指标的表达、提高脏器免疫功能、减少胶原纤维生成,进一步缓解肝纤维化损伤,抑制肝纤维化形成,对于临床中医治疗肝纤维化提供了研究基础,但本方剂药物成分复杂,具体干预作用机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 齐婧姝, 胡旭东, 刘成海. 肝纤维化的逆转机制[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(6): 577-582.
- [2] 王 河, 陈少锋, 谭蓓蓓. 中药治疗肝纤维化研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2023, 42(2): 128-131.
- [3] 董海舰, 李 晖, 陶雨静, 等. 古代经典名方与现代中药复方抗肝纤维化研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(11): 1392-1400.
- [4] 张雪萍, 尚小飞, 李秀惠. 肝纤维化的中西医结合诊治进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(2): 284-289.
- [5] 洪 玫, 段宏宪, 杨 敏. 化瘀疏肝汤治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床疗效[J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(9): 104-106.
- [6] 柴 焱, 王亚妮, 范引科, 等. 多因素诱导大鼠肝纤维化模型的建立及动态观察[J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(34): 1-4.
- [7] 贾英杰, 张晓博, 张新元, 等. 强肝胶囊对猪血清诱导大鼠肝纤维化的治疗作用[J]. 河北医药, 2021, 43(20): 3104-3107.
- [8] 陈镜宇. 大型学术著作《药理学方法学》出版发行[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(3): 481.
- [9] CHEN L, GUO W Y, MAO C, et al. Liver fibrosis: Pathological features, clinical treatment and application of therapeutic nanoagents[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2024, 12(6): 1446-1466.
- [10] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis in NAFLD/NASH: From pathophysiology towards diagnostic and therapeutic strategies[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2024, 95: 101231.
- [11] 李子舜, 赵长善, 陈仁伍, 等. 中医药基于 NF- κ B 信号通路治疗肝纤维化的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(23): 275-282.
- [12] 刘世恒, 赵素贤, 张玉果. 肝纤维化发生机制及其中药逆转治疗的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(10): 2373-2377.
- [13] 杨跃青, 张 燕, 何瑾瑜, 等. 化瘀疏肝汤治疗慢性乙型病毒性肝炎肝纤维化临床研究[J]. 中医学报, 2015, 30(5): 725-727.
- [14] 彭梦楠, 卓永祥, 林 明, 等. 基于肝脾相关理论的乙型肝炎肝硬化辨证用药规律数据挖掘[J]. 中西医结合肝病杂志, 2020, 30(3): 238-241.
- [15] 尚亚楠, 胡 微, 李 兰, 等. 化瘀疏肝汤联合恩替卡韦对乙型肝炎肝硬化失代偿期患者肝纤维化及炎性细胞因子的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2024, 19(5): 1011-1015.
- [16] CHENG X, HAN Z X, SU Z J, et al. Network pharmacology-based exploration on the intervention of Qinghao Biejia decoction on the inflammation-carcinoma transformation process of chronic liver disease via MAPK and PI3K/AKT pathway[J]. BioMed Research International, 2022, 2022: 9202128.
- [17] WANG Y K, HE H L, WANG G F, et al. Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice[J]. Marine Drugs, 2010, 8(2): 255-268.
- [18] DENG K X, PENG J Z, ZHANG M Q, et al. Oyster peptide ameliorates hepatic fibrosis through the NF- κ B/iNOS signaling pathway[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2023, 32(6): 435-445.
- [19] XIE X S, YANG M, LIU H C, et al. Ginsenoside Rg1, a major active component isolated from *Panax notoginseng*, restrains tubular epithelial to myofibroblast transition in vitro[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 122(1): 35-41.
- [20] 杨新荣, 窦 霞, 李国峰, 等. 柴胡皂苷 D 对肝病防治作用及机制研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(12): 3852-3862.
- [21] 周 雅, 汪 琪, 孙庆珠, 等. 白术-白芍药对的抗肝纤维化作用及对肠道微生物群的调控[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4): 1919-1923.
- [22] 赵志敏, 黄 恺, 沈 丽, 等. 欧当归内酯 A 对实验性纤维化肝脏 NO 及内皮细胞功能的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(19): 2850-2856.
- [23] 王诗洋, 王 泉, 徐祖清, 等. 苦杏仁苷通过抑制氧化应激及炎症反应减轻四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化作用[J]. 现代免疫学, 2020, 40(6): 471-475, 481.
- [24] 李淑娣, 王 振, 刘江凯, 等. 基于细胞信号通路探讨黄芪活性成分抗肝纤维化的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(1): 18-23.
- [25] 张明昊, 高一盈, 董文霞, 等. 丹参多酚酸盐对肝纤维化小鼠 Notch-Hes1 信号通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(9): 949-954.
- [26] 贾 彦, 牛英才, 张英博, 等. 天然水蛭素对实验性肝纤维化大鼠肝脏结缔组织生长因子 mRNA 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 95-97.
- [27] SUN W Y, GU Y J, LI X R, et al. β -arrestin2 deficiency protects against hepatic fibrosis in mice and prevents synthesis of extracellular matrix[J]. Cell Death & Disease, 2020, 11: 389.
- [28] 付双楠, 高 达, 郭佳佳, 等. 四氯化碳致小鼠急性肝损伤模型建立与考察[J]. 肝脏, 2022, 27(9): 1036-1040.
- [29] 卢芬萍, 胡世平, 唐颖慧, 等. 丹桃养肝丸对四氯化碳致肝纤维化大鼠的保护作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(14): 1940-1944, 1950.