

·血瘀证治·

抗纤灵 I 方对小鼠血吸虫病肝纤维化的 干预及机制探讨

刘西霞^{1,3}, 黄政德², 卢芳国², 高 强², 赖 娟², 芦 俊², 向 琴², 刘水平^{1*}, 杨胜辉^{2*}

(1.中南大学湘雅医学院医学微生物学教研室,湖南 长沙 410013;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;
3.长沙医学院医学微生物学与免疫学教研室,湖南 长沙 410219)

〔摘要〕目的 观察抗纤灵 I 方对小鼠血吸虫病肝纤维化的干预效果,探讨抗纤灵 I 方干预血吸虫病肝纤维化的可能分子机制,为抗纤灵 I 方的临床应用提供实验依据。**方法** 采用日本血吸虫尾蚴经皮肤贴片感染昆明小鼠,建立血吸虫病早期肝纤维化动物模型,将建模成功的小鼠用吡喹酮药物连续杀虫治疗后分为抗纤灵 I 方低、中、高剂量组,抗纤灵 I 方的丹参加味方低、中、高剂量组,秋水仙素治疗对照组,蒸馏水灌胃对照组和未做任何处理的模型对照 9 组。以未感染血吸虫的正常小鼠为肝纤维化阴性对照组。各实验组连续灌胃治疗 8 周,收集各组小鼠肝脏,HE 染色观察肝纤维化病理改变,测量肝组织虫卵肉芽肿平均面积;免疫组化染色方法检测肝组织内胶原蛋白 I、Ⅲ、MMP-1 蛋白酶以及 TIMP-1 蛋白的表达,比较各组间的蛋白表达差异。**结果** HE 染色显示,与模型组和正常对照组相比抗纤灵 I 方及其丹参加味方高剂量组可显著减少肝组织虫卵肉芽肿面积($P<0.05$);免疫组化染色结果显示,与模型组比较,抗纤灵 I 方及其丹参加味方中、高剂量组干预后小鼠肝组织内的胶原 I、Ⅲ蛋白以及 TIMP-1 蛋白表达显著减少($P<0.05$)、MMP-1 蛋白酶表达显著增加($P<0.05$),但抗纤灵 I 方与丹参加味方之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 抗纤灵 I 方及其丹参加味方对小鼠血吸虫病肝纤维化具有较好的干预效果,但两者在疗效上差异无统计学意义,丹参未能增强抗纤灵 I 方的干预肝纤维化效果;抗纤灵 I 方的干预机制可能是通过抑制肝组织内胶原蛋白 I、Ⅲ和 TIMP-1 蛋白的表达,增加 MMP-1 蛋白酶的表达来发挥作用。

〔关键词〕 抗纤灵 I 方;血吸虫病;肝纤维化;胶原蛋白 I;胶原蛋白 Ⅲ;MMP-1 蛋白酶;TIMP 蛋白;丹参

〔中图分类号〕R285.5;R383.2⁴;R2-031 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.10.004

The Intervention Effects and Mechanisms of KangXianLing Prescription I on Schistosomiasis Liver Fibrosis in Mice

LIU Xixia^{1,3}, HUANG Zhengde², LU Fangguo², GAO Qiang², LAI Juan², LU Jun², XIANG Qin²,
LIU Shuiping^{1*}, YANG Shenghui^{2*}

(1. Department of Medical Microbiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Department of Medical Microbiology and Immunology, Changsha Medical University, Changsha, Hunan 410219, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the intervention effects of KangXianLing prescription I (KXLPI) on schistosomiasis liver fibrosis in mice, elucidate the possible molecular mechanisms of KXLPI anti hepatic fibrosis, and provide experimental basis for clinical application of KXLPI. **Methods** Kunming mice were infected by S_j cercariae in order to establish the animal model with hepatic fibrosis. All the model mice with hepatic fibrosis were treated by praziquantel (PZQ) and randomly divided into 9 groups, including KXLPI low dose group (L-KXLPI), medium dose group (M-KXLPI) and high dose group (H-KXLPI), KXLPI's modified prescription based on *Salvia miltiorrhiza* (KXLPI-Sm) low dose group (L-KXLPI-Sm), medium dose group (M-KXLPI-Sm) and high dose group (H-KXLPI-Sm), Colchicin treatment group (CTG), distilled water group (DWG)

〔收稿日期〕2016-05-11

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81373576);湖南省自然科学基金项目(11JJ3106);湖南省中医药管理局重点项目(201209);湖南省卫生厅基金项目(B2014-043);湖南省高校感染性疾病中医药防治研究科技创新团队开放基金项目(Grxjb-3);湖南省教育厅基金项目(15C0147)。

〔作者简介〕刘西霞,女,在读硕士研究生,从事感染性疾病中医药防治研究。

〔通讯作者〕* 刘水平,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail:spliu@csu.edu.cn;杨胜辉,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:shenghuiyang@126.com。

and model group (MG), and the mice which were not infected by *Sj* cercariae are used as normal control group (NG). After intragastric administration for 8 weeks, the livers of the mice were collected and the pathologic changes of hepatic fibrosis were observed by HE. The mean granuloma areas induced by eggs were detected, and pathologic changes of hepatic fibrosis were observed. The expression levels of collagen I, III, matrix-metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were detected by immunohistochemical staining, the differences of proteins were compared. **Results** Compared with MG and NG, the mean granuloma areas in H-KXLP I and H-KXLP I-Sm significantly decreased, ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining results showed that the expression levels of collagen I, III and TIMP-1 in M-KXLP I, H-KXLP I, M-KXLP I-Sm and H-KXLP I-Sm were significantly lower than that of MD group ($P < 0.05$), while the expression levels of MMP-1 significantly higher than that of MD ($P < 0.05$), there is no difference between KXLP I and KXLP I-Sm groups ($P > 0.05$). **Conclusion** KXLP I and KXLP I-Sm showed good preventive effects on experimental schistosomiasis liver fibrosis mice, but there was no difference on curative effect, and *Salvia miltiorrhiza* could not enhance the effect of KXLP I anti hepatic fibrosis. Meanwhile, KXLP I could inhibit the expressions of collagen I, III and TIMP-1 in liver tissues and increase the expression of MMP-1.

[**Keywords**] KangXianLing Prescription I; schistosomiasis; hepatic fibrosis; collagen I; collagen III; matrix-metalloproteinase-1; tissue inhibitor of metalloproteinase-1; *Salvia miltiorrhiza*

日本血吸虫是我国长江流域广泛流行的一种传染病,可导致急性、慢性和晚期血吸虫病^[1]。日本血吸虫虫卵的危害最为严重,虫卵在肝脏门静脉分支内沉积形成虫卵肉芽肿,在此基础上发生肝纤维化和肝硬化,导致肝脾肿大、门静脉高压、上消化道大出血等一系列临床综合征,严重者可因为肝功能衰竭、肝昏迷而死亡,对人类的健康危害极大。因而,积极预防和治疗虫卵所引起的肝纤维化和肝硬化对慢性血吸虫病患者具有重要的意义。研究发现,血吸虫病肝纤维化是机体对大量虫卵在肝脏汇管区沉积所引起的慢性损伤的一种修复反应,大量报道证实,肝纤维化以及肝硬化形成与肝星形细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化关系密切^[2-4], HSC被激活后能够分泌各种细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分,包括胶原蛋白、透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、纤维连接蛋白、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和基质金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMPs)。其中, I、III型胶原蛋白表达量是反映肝纤维化程度的敏感指标。MMPs是一组能降解各种ECM成分的蛋白质分解酶,其中MMP-1的活性最强,能够分解各种胶原蛋白。TIMPs是一组抑制MMPs功能的活性多肽,其中TIMP-1可通过抑制MMP-1酶的活性来阻止胶原蛋白的降解,对肝纤维化的发生与发展具有重要的促进作用。抗纤灵I方是湖南中医药大学国家级名老中医郭振球教授的临

床经验方,能够明显缓解血吸虫病肝纤维化常见的症状,降低血清透明质酸和血清羟脯氨酸的水平,增强血浆纤溶酶的活性来发挥修复肝脏病损的组织^[5]。但其对肝组织中胶原蛋白I、III、TIMP-1和MMP-1的表达是否产生影响尚不明确。本研究通过观察抗纤灵I方及其丹参加味方在防治血吸虫病肝纤维化中的作用及疗效,以胶原蛋白I、III、TIMP-1和MMP-1等为靶点,通过其表达的变化来探讨该方的可能分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与钉螺

昆明小鼠购于湖南长沙市天勤生物技术有限公司,许可证号SCXK(湘)2009-0012,体质量18~22 g,雌雄各54只。中国大陆株日本血吸虫尾蚴阳性钉螺购自湖南省血吸虫病防治所。

1.2 实验药物

抗纤灵I方由黄芪、防己、茯苓、鳖甲、赤芍、桃仁、莪术、牛膝、当归9味中药组成,抗纤灵I方的丹参加味方系在抗纤灵I方的基础上加30 g丹参组方而成。以上中药饮片均购自于湖南中医药大学第一附属医院中药房,加入蒸馏水煎煮后浓缩成含生药1.0 g/mL的水煎液,经高压灭菌后4℃冰箱备用。秋水仙素购自于美国Sigma公司,为分析纯产品,批号:505A0314。吡嗪酮片购自于南京制药有限公司,0.2 g/片,批号:20120919。

1.3 主要试剂

苏木素-伊红(HE)染色剂、兔抗大鼠/小鼠胶原

I、Ⅲ、MMP-1 和 TIMP-1 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、兔抗小鼠/大鼠 GAPDH 多克隆抗体、DAB 显色试剂盒均购自于武汉博士德生物工程有限公司;RIPA 裂解液(强)、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒、特超敏 ECL 化学发光试剂盒、PVDF 膜购自于南京碧云天生物技术有限公司。

1.4 主要仪器

酶标仪,美国 Bio-Teck 公司;美国 Leica 切片机;病理图像分析系统,麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司;低温超速离心机,长沙英泰仪器有限公司;mini 垂直电泳仪和转膜仪,美国 Bio-rad 公司。

1.5 造模、分组及给药

采用日本血吸虫尾蚴敷贴法感染 113 只昆明小鼠,(10±2) 条尾蚴/鼠,6 周后随机处死 5 只感染组小鼠,以正常未感染组作为对照,HE 染色显微镜镜下观察虫卵肉芽肿和肝纤维化情况,确定造模是否成功。将造模成功的 108 只肝纤维化模型小鼠均采用吡喹酮药物灌胃 300 mg/(kg·d) 彻底杀虫治疗,连续治疗 2 天,然后将小鼠随机分成抗纤灵 I 方低剂量组 10.237 g/(kg·d)、中剂量组 20.475 g/(kg·d)、高剂量组 40.95 g/(kg·d)、丹参加味方低剂量组 12.512 g/(kg·d)、中剂量组(25.025 g/kg·d)、高剂量组 50.05 g/(kg·d)、秋水仙素治疗组 0.2 mg/(kg·d)、蒸馏水灌胃对照组 0.4 mL/(只·d) 以及未进行任何治疗的模型对照组等 9 组,同时以未感染血吸虫的小鼠作为肝纤维化阴性的正常对照组,每组小鼠数为 12 只。除模型对照组和正常对照组之外,各试验组连续灌胃 8 周,在整个实验过程中,无小鼠死亡。参照体表面积计算法,小鼠灌胃药物的起始低剂量相当于临床剂量的 0.5 倍。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肝脏病理改变情况 收集小鼠左肝中叶相同部位 10% 中性甲醛固定,经脱水、石蜡包埋、切片、染色和苏木素复染封片后高倍镜下(×400)观察小鼠肝脏病理改变。

1.6.2 肝组织中虫卵肉芽肿平均面积的检测 各实验组小鼠肝组织切片经 HE 染色后,在低倍镜下每张切片随机取 5 个视野,以麦克奥迪数码医学图像分析系统 6.0 软件测量肝组织中虫卵肉芽肿的平均面积。虫卵肉芽肿平均面积=每张切片 5 个视野中所有肉芽肿面积总和/5 个视野中所有肉芽肿数量。

1.6.3 免疫组化检测小鼠肝组织胶原 I、胶原Ⅲ、MMP-1 酶和 TIMP-1 蛋白表达变化 实验结束后取各试验组小鼠的左肝中叶相同部位经 10% 中性甲醛,4 ℃ 固定过夜。经梯度酒精脱水后再行石蜡包埋、切片、贴片等处理,用 0.3% TritonX-100 和 3% H₂O₂ 在 37 ℃ 孵育 10 min 以灭活内源性过氧化物酶。80 ℃ 水浴修复抗原。加入正常山羊血清工作液封闭后,分别加入兔抗小鼠/大鼠胶原 I、胶原Ⅲ、MMP-1 和 TIMP-1 多克隆抗体(1:400 稀释),4 ℃ 冰箱过夜后,洗涤后滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37 ℃ 孵育 30 min,PBS 洗涤后加入 0.05% DAB 显色液室温显色,以苏木素复染,梯度酒精脱水,封片镜检。每次试验以 PBS 代替一抗作阴性对照,免疫组化染色以肝细胞质中出现黄色或棕黄色为阳性表达,每个样本高倍镜下随机采集 5 个视野照片,利用麦克奥迪数码医学图像分析系统 6.0 软件计算平均光密度值,以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,比较各实验组和对照组之间的蛋白表达差异。

1.7 统计学处理方法

实验组及对照组扫描数据均作为计量资料,以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 16.0 统计软件包对数据进行分析,各组之间的差异比较采用单因素方差分析方法;如方差齐性时则选用 LSD 法,当方差不齐时则采用 Tamhane's T2 检验法,所有结果均以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

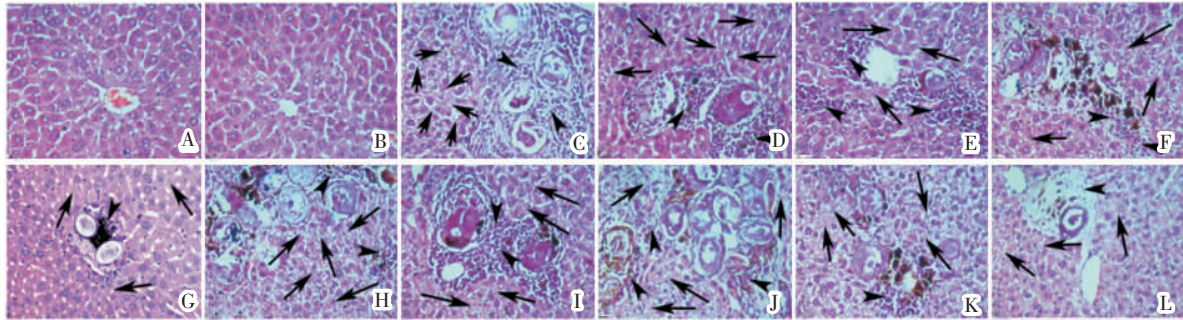
2 结果

2.1 各试验组小鼠肝脏病理改变情况

感染 6 周后显微镜下可见:正常对照组小鼠肝细胞排列整齐,肝小叶结构完整清晰,无炎性细胞浸润,无肝细胞变性和坏死现象(图 1-A)。模型组小鼠肝脏汇管区可见多个血吸虫卵及大量炎性细胞浸润,肝细胞有不同程度变性和坏死,肝细胞排列紊乱,肝小叶正常结构被破坏(图 1-C)。抗纤灵 I 方及丹参加味方治疗 8 周后镜下可见:正常对照组小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞排列规则,未见炎性细胞浸润和肝细胞变性、坏死等病变(图 1-B);蒸馏水灌胃组和模型组小鼠肝脏汇管区有较多虫卵肉芽肿形成,周围有大量炎性细胞浸润,肝细胞有不同程度变性和坏死,肝细胞排列紊乱(图 1-H、I)。抗纤灵 I 方和丹参加味方干预后,低剂量治疗组镜下可见汇管

区仍有较多的慢性虫卵肉芽肿,虫卵周围有较多炎性细胞浸润,肝细胞有不同程度变性和坏死,肝小叶结构遭到不同程度的破坏(图 1-D,J);中剂量(图 1-E,K)和高剂量组(图 1-F,L)慢性肉芽肿明显减

弱,虫卵周围炎性细胞浸润减少,肝细胞变性和坏死明显减轻,肝小叶结构逐渐恢复正常。
2.2 抗纤灵 I 方及丹参加味方治疗后小鼠肝组织虫卵肉芽肿面积的改变情况



A:6 周后正常对照组;B:灌胃治疗 8 周后正常对照组;C:感染 6 周后模型组;D:抗纤灵 I 方低剂量组;E:抗纤灵 I 方中剂量组;F:抗纤灵 I 方高剂量组;G:秋水仙素组;H:蒸馏水对照组;I:模型组;J:丹参加味方低剂量组;K:丹参加味方中剂量组;L:丹参加味方高剂量组;带柄黑色箭头示肝细胞变性和坏死;无柄黑色箭头示炎性细胞浸润

图 1 小鼠肝脏病理改变光镜图(HE×400)

日本血吸虫尾蚴感染小鼠后,肝组织内可见大量的虫卵在汇管区沉积,经抗纤灵 I 方及丹参加味方高剂量组干预后,小鼠肝组织中虫卵肉芽肿平均面积显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$,参见表 1),表明抗纤灵 I 方及丹参加味方能够杀灭部分血吸虫虫卵,抑制虫卵释放抗原,降低和减轻肝组织内虫卵肉芽肿的反应程度,但两方之间无差异($P>0.05$,参见表 1)。

表 1 抗纤灵 I 方与其丹参加味方对日本血吸虫病小鼠肝组织内虫卵肉芽肿平均面积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量 (g/kg)	平均肉芽肿面积 ($\times 10^5 \mu m^2$)	F 值	P 值
正常对照组	-	-		
模型组	-	16.98±4.55		
蒸馏水对照组	-	17.62±5.13		
抗纤灵 I 方低剂量组	10.237	16.15±4.36 [△]	4.143	0.006
抗纤灵 I 方中剂量组	20.475	15.78±4.29 [△]	3.895	0.009
抗纤灵 I 方高剂量组	40.950	12.65±2.86 [#]	4.245	0.005
丹参加味方低剂量组	12.512	15.64±4.17 [△]	3.245	0.014
丹参加味方中剂量组	25.025	14.88±3.57 [△]	3.367	0.012
丹参加味方高剂量组	50.050	11.96±2.35 [#]	4.351	0.003
秋水仙素组	0.0002	12.14±2.72 [#]	4.225	0.004

注:与模型组比,[#] $P<0.05$;与秋水仙素组比,[△] $P<0.05$ 。

2.3 免疫组化检测小鼠肝组织胶原蛋白 I、III、TIMP-1 蛋白和 MMP-1 蛋白酶的表达

2.3.1 小鼠肝组织胶原蛋白 I、III 和 TIMP-1 蛋白

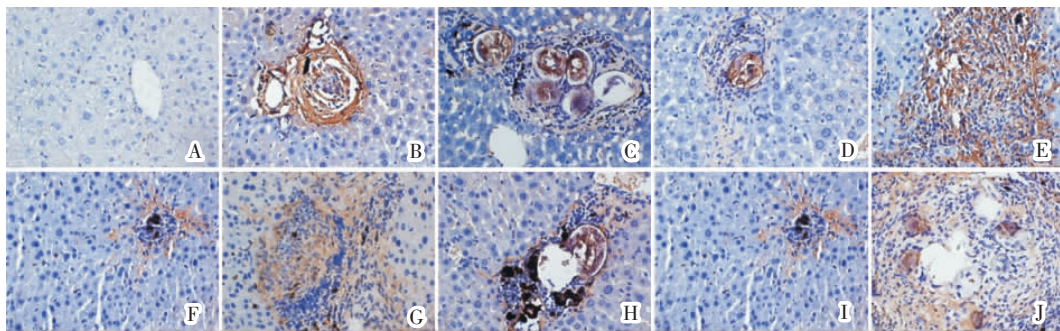
的表达差异 从图 2、3、4 可见,正常对照组小鼠肝脏胶原蛋白 I、III 和 TIMP-1 蛋白的表达很弱,主要分布于汇管区及中央小静脉管壁上(图 2,3,4-A)。模型组(图 2,3,4-E)和蒸馏水空白组(图 2,3,4-J)可见深棕褐色强阳性表达,主要位于肝窦周围、汇管区内及虫卵肉芽肿周围。与模型组比较,抗纤灵 I 方与丹参加味方低剂量治疗组(图 3,4,5-B、G)的胶原蛋白 I、III 和 TIMP-1 蛋白的表达减弱,但无统计学差异($P>0.05$,参见表 2);中剂量(图 2,3,4-C,H)与高剂量组(图 2,3,4-D,I)的表达显著减弱,有统计学差异($P<0.05$,参见表 2),提示两方对胶原蛋白 I、III 和 TIMP-1 蛋白的表达有明显抑制作用,并存在剂量依赖性;抗纤灵 I 方与丹参加味方低剂量组、中剂量组与秋水仙素治疗组(图 2,3,4-F)相比有显著性差异($P<0.05$,参见表 2),但高剂量组与秋水仙素治疗组之间无显著性差异($P>0.05$),提示两方的低剂量与中剂量治疗组疗效不及秋水仙素治疗组,但高剂量组疗效与其相近;结果还显示,抗纤灵 I 方与丹参加味方之间在抑制胶原蛋白 I、III 和 TIMP-1 蛋白的表达方面无统计学差异($P>0.05$,见表 2)。

2.3.2 小鼠肝组织 MMP-1 蛋白酶的表达差异

从图 5 可见,正常对照组小鼠肝脏(图 5-A)和秋水仙素治疗组(图 5-F)可见 MMP-1 蛋白酶的阳性褐色表达主要分布于肝细胞质内、肝窦周围以及汇管

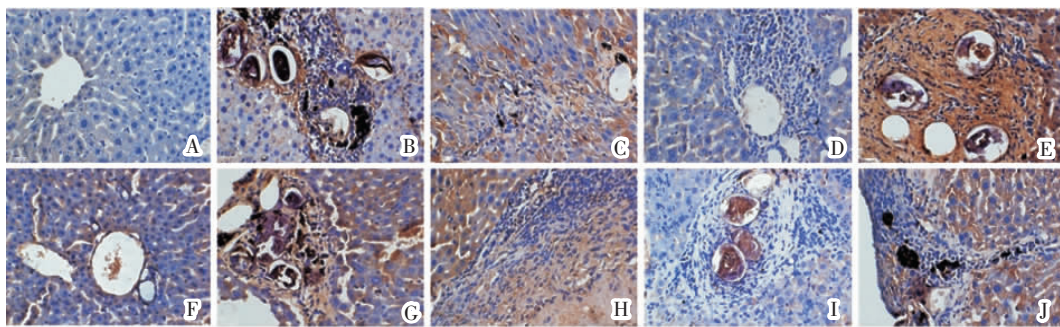
区。模型组(图 5-E)和蒸馏水空白组(图 5-J)可见少量微弱表达。抗纤灵 I 方及丹参加味方各剂量治疗组 MMP-1 酶阳性表达主要位于肝窦周围、汇管区和虫卵肉芽肿周围(图 5-B、G;C、H;D、I);与模型组相比,抗纤灵 I 方与丹参加味方中(图 5-C、H)、高剂量(图 5-D、I)治疗组 MMP-1 蛋白酶表达增加有统计学差异($P<0.05$, 参见表 2), 提示两方对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织中 MMP-1 蛋白酶的表达有促进作用, 并存在剂量依赖性;抗纤灵

I 方与丹参加味方低剂量组(图 5-B、G)、中剂量组与秋水仙素组(图 5-F)相比有统计学差异($P<0.05$), 但高剂量组与秋水仙素组之间比较无统计学差异($P>0.05$), 提示两方的低剂量和中剂量组疗效不及秋水仙素治疗组, 但高剂量组与其疗效相近。结果还显示, 抗纤灵 I 方与丹参加味方之间在促进肝组织内 MMP-1 酶的表达上无统计学差异($P>0.05$, 参见表 2)。



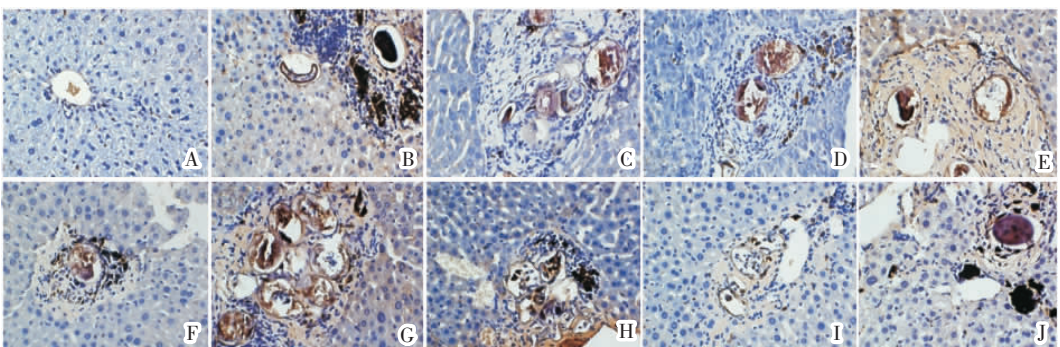
A: 正常对照组小鼠;B: 抗纤灵 I 方低剂量组;C: 抗纤灵 I 方中剂量组;D: 抗纤灵 I 方高剂量组;E: 模型组;F: 秋水仙素组;G: 丹参加方低剂量组;H: 丹参加方中剂量组;I: 丹参加方高剂量组;J: 蒸馏水空白组

图 2 免疫组化检测小鼠肝组织中胶原 I 蛋白表达($\times 400$)



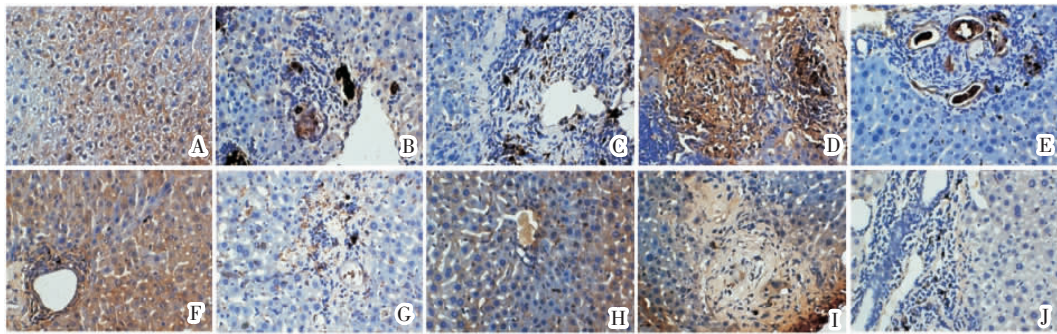
A: 正常对照组小鼠;B: 抗纤灵 I 方低剂量组;C: 抗纤灵 I 方中剂量组;D: 抗纤灵 I 方高剂量组;E: 模型组;F: 秋水仙素组;G: 丹参加方低剂量组;H: 丹参加方中剂量组;I: 丹参加方高剂量组;J: 蒸馏水空白组

图 3 免疫组化检测小鼠肝组织中胶原 III 蛋白表达($\times 400$)



A: 正常对照组小鼠;B: 抗纤灵 I 方低剂量组;C: 抗纤灵 I 方中剂量组;D: 抗纤灵 I 方高剂量组;E: 模型组;F: 秋水仙素组;G: 丹参加方低剂量组;H: 丹参加方中剂量组;I: 丹参加方高剂量组;J: 蒸馏水空白组

图 4 免疫组化检测小鼠肝组织中 TIMP-1 蛋白酶表达($\times 400$)



A: 正常对照组小鼠; B: 抗纤灵 I 方低剂量组; C: 抗纤灵 I 方中剂量组; D: 抗纤灵 I 方高剂量组; E: 模型组; F: 秋水仙素组; G: 丹参加味方低剂量组; H: 丹参加味方中剂量组; I: 丹参加味方高剂量组; J: 蒸馏水空白组

图 5 免疫组化检测小鼠肝组织中 MMP-1 蛋白酶表达 ($\times 400$)

表 2 抗纤灵 I 方及丹参加味方对血吸虫病小鼠肝组织胶原蛋白 I 和 III、MMP-1 以及 TIMP-1 表达的影响

(平均光密度, $\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量(g/kg)	胶原蛋白 I	胶原蛋白 III	MMP-1	TIMP-1
正常对照组	-	0.093±0.016	0.091±0.012	0.242±0.035	0.107±0.025
模型组	-	0.228±0.034 [▲]	0.232±0.041 [▲]	0.118±0.022 [▲]	0.265±0.045 [▲]
蒸馏水对照组	-	0.224±0.039 [▲]	0.237±0.041 [▲]	0.122±0.025 [▲]	0.254±0.043 [▲]
抗纤灵 I 方低	10.237	0.212±0.032 ^{▲&}	0.218±0.037 ^{▲&}	0.136±0.028 ^{▲&}	0.248±0.049 ^{▲&}
抗纤灵 I 方中	20.475	0.205±0.031 ^{▲&}	0.206±0.033 ^{▲&}	0.184±0.025 ^{▲&}	0.217±0.038 ^{▲&}
抗纤灵 I 方高	40.950	0.186±0.025 ^{▲#}	0.182±0.023 ^{▲#}	0.217±0.044 ^{▲#}	0.197±0.033 ^{▲#}
丹参加味方低	12.512	0.214±0.027 ^{▲&}	0.212±0.034 ^{▲&}	0.128±0.029 ^{▲&}	0.247±0.043 ^{▲&}
丹参加味方中	25.025	0.206±0.023 ^{▲&}	0.208±0.028 ^{▲&}	0.188±0.026 ^{▲&}	0.228±0.036 ^{▲&}
丹参加味方高	50.050	0.181±0.026 ^{▲#}	0.189±0.021 ^{▲#}	0.219±0.043 ^{▲#}	0.195±0.032 ^{▲#}
秋水仙素组	0.000	0.183±0.034 ^{▲#}	0.186±0.029 ^{▲#}	0.213±0.037 ^{▲#}	0.181±0.038 ^{▲#}

注:与正常对照组比,▲ $P<0.05$;与模型组比,# $P<0.05$;与秋水仙素组比,& $P<0.05$ 。

3 讨论

郭振球教授认为,血吸虫病肝纤维化属于中医学“蛊胀”、“蛊病”的范畴,致病因素为“蛊毒”,发病机制则多因虫积、气滞、血瘀、水湿、气虚等而致气血失和、气血逆乱;其病变主要涉及肝脾两脏,虫邪蛊毒随血流侵入肝,导致肝脏脉络瘀阻,肝气失和,经隧不利,气滞而血瘀;久则肝病传脾,因实而致虚。因而血吸虫病肝纤维化以气滞血瘀和气虚血瘀两证多见,其气虚血瘀证,病重在脾,气虚为主,脾虚夹湿,兼有肝瘀。抗纤灵 I 方(主要由黄芪、茯苓、防己、赤芍、桃仁、鳖甲、莪术等组成)具有活血化瘀、软坚散结、益气健脾、行气利水之效,是郭教授临床工作中治疗血吸虫病肝纤维化的经验方,方中的黄芪、茯苓、防己等药益气扶正、健脾化湿,具有保护肝细胞,促进肝功能恢复的功效;莪术、赤芍、牛膝等药活血行血,改善门静脉血流及肝微循环,因而常用于气滞血瘀证,病重在肝,血瘀为主,肝脏气血运行不畅。

多项研究结果证实本方对血吸虫病肝纤维化患者的肋下疼痛、肋腹痞块、面暗唇青、脘腹窜痛、胃纳呆滞、大便稀溏、面色萎黄等症状的总有效缓解率达到 93.9%^[5],明显缓解患者的临床症状,减轻和逆转患者的肝纤维化程度。但该方的抗肝纤维化作用的分子机制一直不明确,疗效也有待进一步提高。为增强该方的活血化瘀疗效,进一步观察其抗血吸虫病肝纤维化效果,阐明其抗肝纤维化作用的分子机理,本研究团队在抗纤灵 I 方的基础上加味丹参,组成抗纤灵 I 方的丹参加味方。大量研究证实,丹参具有很好的祛瘀和活血效果,可以抗血小板聚集、阻止血栓形成以及增强纤维蛋白的降解,也可显著降低血液黏度,减少红细胞的聚集,增加血液流速,扩张毛细血管,改善机体组织局部的微循环状况,增加各内器官的血流量等^[6]。抗纤灵 I 方及其丹参加味方持续灌胃治疗血吸虫病肝纤维化小鼠模型 8 周后,两方的高剂量组可以显著减少小鼠肝组织中虫卵肉芽肿平均面积,表明抗纤灵 I 方及其丹参加味方能够

降低肝组织内虫卵肉芽肿的反应程度,但两方之间无差异。免疫组化试验结果证实,两方能够明显逆转肝纤维化的进展,小鼠肝组织中胶原蛋白 I、Ⅲ的合成显著减少,表达明显减轻;MMP-1 蛋白酶的表达明显增强,增强了对胶原蛋白 I 和胶原蛋白Ⅲ的分解,减少了两种与肝纤维化发病至关重要的胶原蛋白在肝组织内的沉积;同时 TIMP-1 蛋白分泌明显减少,减轻了对 MMP-1 蛋白酶活性的抑制作用,间接增强了 MMP-1 蛋白酶的活性,进一步减少胶原蛋白在肝组织中的沉积,对肝纤维化的进展有明显的逆转作用。本研究团队的实验结果证实了抗纤灵 I 方及其丹参加味方可从多途径、多靶点、多效应等方面干预和逆转血吸虫病肝纤维化的进展,其逆转肝纤维化的分子机制主要为抑制 TIMP-1 蛋白的合成与表达,促进 MMP-1 蛋白酶的分泌,降解肝组织炎症部位的胶原蛋白 I 和胶原蛋白Ⅲ等。同时,本研究团队还发现两方的高剂量组对肝纤维化的逆转作用明显强于低剂量组和中剂量组,表现出明显的剂量依赖性,其干预和逆转肝纤维化的效果与西药治疗肝纤维化的秋水仙素药物之间无明显差异。但抗纤灵 I 方与其丹参加味方之间在干预效果方面未见显著性差异,分析其原因可能与下述因素有关:抗纤灵 I 方中已有活血化瘀的莪术、赤芍、牛膝等几味中药,再加味具有活血化瘀疗效的丹参后可能对原方各药之间的君臣佐使关系产生影响,并不能单

纯产生药物的叠加效应。阎小女等^[7]研究也显示,丹参与黄芪进行配伍干预四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化研究中,丹参与黄芪配伍与单用黄芪或单用丹参之间无显著性差异,与本研究团队的研究结果一致。其具体的原因有待于进一步的研究与分析。

综上所述,本研究进一步明确和证实抗纤灵 I 方具有防治血吸虫病肝纤维化的作用,其分子机制主要是通过抑制肝组织胶原蛋白 I、Ⅲ的沉积,抑制 TIMP-1 蛋白的表达,增强 MMP-1 蛋白酶的合成发挥作用。

参考文献:

- [1] 雷正龙,张利娟,徐志敏,等. 2014 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2015,27(6):563-569.
- [2] 夏海珊,陈少茹,钟月春,等.肝纤维化的发病机制和药物治疗现状[J].中国医药导报,2014,11(18):162-168.
- [3] 郭晓霞,李良学,武玉鹏.调肝理脾方对原发性胆汁性肝硬化小鼠调节性 T 细胞及肝组织病理的影响 [J]. 中医杂志,2016,57(2):161-165.
- [4] 于晓红,金博.肝纤维化发病机制的研究进展 [J]. 医学综述,2012,18(14):2155-2158
- [5] 袁肇凯,杨运高,黄献平.抗纤灵方治疗血吸虫病肝纤维化的临床研究[J].湖南中医药大学学报,2013,33(1):102-107.
- [6] 卢萍,华海涌,汪伟.丹参酮 II A 抗肝纤维化机理研究进展[J].热带病与寄生虫学,2013,11(4):256-259.
- [7] 阎小女,王金茹,韩子岩.丹参与黄芪配伍干预四氯化碳诱导大鼠肝损害的实验研究[J].山西医科大学学报,2014,45(6):450-453.

(本文编辑 李杰)