

本文引用: 侯玲, 覃妮, 陆世银, 陈秋贵, 磨奕玲, 徐敏丽, 卢鲜云, 何焯, 张洪平. 壮药牛大力醇提取物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, 2025, 45(1): 15-22.

## 壮药牛大力醇提取物对四氯化碳诱导肝纤维化大鼠的改善作用研究

侯玲<sup>1,2,3</sup>, 覃妮<sup>3</sup>, 陆世银<sup>3\*</sup>, 陈秋贵<sup>3</sup>, 磨奕玲<sup>1,3</sup>, 徐敏丽<sup>3</sup>, 卢鲜云<sup>3</sup>, 何焯<sup>3</sup>, 张洪平<sup>1,3</sup>

1. 广西中医药大学研究生院, 广西南宁 530000; 2. 柳州市柳铁中心医院, 药剂科, 广西柳州 545000

3. 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

**[摘要]** 目的 研究牛大力醇提取物对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导的肝纤维化大鼠的治疗作用及机制。方法 采用腹腔注射 40% CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液(0.1 mL/100 g)建立肝纤维化 SD 大鼠模型, 2次/周, 连续 12 周。将肝纤维化大鼠随机分为模型组, 牛大力醇提取物低、中、高剂量(3.5、7、14 g/kg)组及阳性对照秋水仙碱(0.12 mg/kg)组, 另设正常组大鼠, 各组均为 8 只。各给药组于造模第 9 周按设定剂量灌胃相应药物干预, 1次/d, 连续 4 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, 测定大鼠肝脾指数; 检测各组血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)、转化生长因子β1(TGF-β1)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-8(IL-8)及白细胞介素-6(IL-6)的水平; HE 染色和 Masson 染色观察肝组织病理学变化; Western blot 测定大鼠肝脏中 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1(Keap1)、核转录因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)和醌氧化还原酶 1(NQO1)的蛋白表达水平。结果 与正常组相比, 模型组大鼠反应迟钝, 肝脾指数、血清 ALT、AST、MDA、LN、HA、PCⅢ、Ⅳ-C、TGF-β1、IL-1β、IL-8 及 IL-6 水平显著升高(P<0.01), SOD 表达水平显著下降(P<0.01); 肝组织呈现明显纤维化; 肝组织 Keap1 蛋白含量明显升高(P<0.01), Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白表达水平显著降低(P<0.01)。与模型组比较, 牛大力各剂量组均能明显改善大鼠状态, 肝脾指数及血清 ALT、AST、MDA、LN、HA、PCⅢ、Ⅳ-C、TGF-β1、IL-1β、IL-8 及 IL-6 水平显著下调(P<0.05, P<0.01), SOD 的表达水平明显增加(P<0.01); 有效改善大鼠肝组织病理学损伤和纤维增生; 肝组织中 Keap1 表达被显著抑制(P<0.01), Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白含量明显升高(P<0.05, P<0.01)。与秋水仙碱组相比, 牛大力醇提取物高剂量组对上述指标的调控作用更强, 且改善作用随着牛大力醇提取物剂量的增加而增强。结论 牛大力醇提取物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、调控 Keap1/Nrf2 信号通路相关。

**[关键词]** 牛大力; 醇提取物; 肝纤维化; 抗氧化; 炎症因子; Keap1/Nrf2 信号通路

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.01.003

## Improvement effects of ethanol extract from Zhuang medicine *Millettia speciosa* Champ. on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats

HOU Ling<sup>1,2,3</sup>, QIN Ni<sup>3</sup>, LU Shiyin<sup>3\*</sup>, CHEN Qiugui<sup>3</sup>, MO Yiling<sup>1,3</sup>, XU Minli<sup>3</sup>, LU Xianyun<sup>3</sup>,

HE Ye<sup>3</sup>, ZHANG Hongping<sup>1,3</sup>

1. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530000, China; 2. Department of Pharmacy,

**[收稿日期]** 2024-08-16

**[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。

Liuzhou Municipality Liutie Central Hospital, Liuzhou, Guangxi 545000, China; 3. Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine (Zhuang & Yao Medicine) Preparations, Liuzhou Traditional Chinese Medicine Hospital (Liuzhou Hospital of Zhuang Medicine), Liuzhou, Guangxi 545026, China

**[Abstract] Objective** To investigate the therapeutic effects and mechanism of *Millettia speciosa* Champ. ethanol extract (MCEE) on carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced hepatic fibrosis (HF) in rats. **Methods** An SD rat model with HF was established by intraperitoneal injection of 40% CCl<sub>4</sub> olive oil solution (0.1 mL/100 g) twice a week for 12 consecutive weeks. HF rats were randomly divided into model group, low-, medium-, and high-dose MCEE (3.5, 7, 14 g/kg) groups, positive control colchicine (0.12 mg/kg) group, and normal group, with eight rats in each group. Each medication group was given the corresponding drug intervention by gavage at the set dose since the 9th week of modeling, once a day for four consecutive weeks. The normal group and model group were given an equal volume of normal saline by gavage every day. The liver and spleen indexes of rats were measured 24 hours after the last administration; serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen (PC III), collagen IV (IV-C), transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-8 (IL-8), and interleukin-6 (IL-6) were determined; HE staining and Masson staining were used to observe the pathological changes in liver tissue; Western blot was used to measure the protein levels of Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1), nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), and quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in rat liver. **Results** Compared with the normal group, rats in the model group showed delayed response, significantly increased liver and spleen indexes, and serum levels of ALT, AST, MDA, LN, HA, PC III, IV-C, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-8, and IL-6 ( $P < 0.01$ ), as well as significantly decreased SOD levels ( $P < 0.01$ ); they also exhibited obvious fibrosis in liver tissue, significantly increased Keap1 protein content in liver tissue ( $P < 0.01$ ), and significantly decreased protein levels of Nrf2, HO-1, and NQO1 ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the condition of rats in MCEE groups with all doses was significantly improved, with significant reductions in the liver and spleen indexes and serum levels of ALT, AST, MDA, LN, HA, PCIII, IV-C, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-8, and IL-6 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and a significant increase in SOD expression ( $P < 0.01$ ); the pathological damage and fibrosis in rat liver tissue were effectively alleviated; the expression of Keap1 in liver tissue was significantly inhibited ( $P < 0.01$ ), while the protein content of Nrf2, HO-1, and NQO1 significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the colchicine group, the high-dose MCEE group had a stronger regulatory effect on the above indicators, and the improvement effects were enhanced with increasing MCEE dosage. **Conclusion** MCEE has a significant anti-HF effect, and its mechanism of action may be related to antioxidant activity, inhibition of inflammatory cytokine expression, and regulation of the Keap1/Nrf2 signaling pathway.

**[Keywords]** *Millettia speciosa* Champ.; ethanol extract; hepatic fibrosis; antioxidation; inflammatory factors; Keap1/Nrf2 signaling pathway

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是许多慢性肝病病情发展的共同病理特征,是各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)过度沉积的病理过程,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>。壮医学理论认为,HF由于蛊病日久,湿毒热毒渐消,蛊毒停滞于龙路火路所致<sup>[4]</sup>。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、化瘀解毒”的治疗原则,则可更好地协同抗HF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HF。壮药牛大力为豆科崖豆藤属植物美丽崖豆藤(*Millettia speciosa* Champ.)的干燥根,又名大力薯、金钟根、山莲藕、九龙串珠等,被收载于《壮药学》,主要生长在广西、广东及海南等南方地区<sup>[5-6]</sup>。牛大力性平,味甘,其作为岭南地区药食同源的特色植物药具有润肺强肾、活筋通络、健脾益气等功效<sup>[7-8]</sup>。牛大力在临床上常用于治疗腰肌劳损、类风湿性关节炎、慢性肝炎、慢性支气管炎、咳嗽、遗精等疾病,其临床应用价值日益受到人们的重视<sup>[9-10]</sup>。现代药理研究表明,牛大力具有抗炎镇痛<sup>[11]</sup>、抗氧化<sup>[12]</sup>、

保肝<sup>[13]</sup>等作用。目前研究表明,牛大力可以保肝护肝、改善肝脏功能<sup>[14]</sup>,然而,有关其抗 HF 的作用与机制鲜见报道。为此,基于前期的研究基础<sup>[15]</sup>,本研究以秋水仙碱为阳性对照药物,采用 CCl<sub>4</sub> 诱导建立大鼠 HF 模型,初步探讨牛大力醇提物(*Millettia speciosa* Champ. ethanol extract)对大鼠的抗 HF 作用及其可能机制,为牛大力抗 HF 药物的研究和开发提供科学依据。

## 1 实验材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 54 只,体质量 120~140 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。动物饲养于通风条件良好,12 h 光照昼夜循环,温度 20~25 °C,相对湿度 50%~55%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:GXMU-2010032418。自由摄食标准饲料与灭菌注射用水。

### 1.2 药物与试剂

牛大力药材(广西仙荣中药科技有限公司,批号 20201101),经柳州市中医医院张洪平主任中药师鉴定为豆科植物美丽崖豆藤(*Millettia speciosa* Champ.)的干燥根。秋水仙碱片(西双版纳版纳药业有限责任公司,批号:20181108);橄榄油(山东鲁花集团商贸有限公司,批号 20190711);四氯化碳(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)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20210419、20210417、20210418、20210420);4%多聚甲醛(广州赛国生物科技有限公司,批号 21235935);HE 染色液、Masson 染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20210419、20210707);透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、Ⅲ型前胶原(type Ⅲ procollagen, PCⅢ)、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 20210310);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)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 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 牛大力醇提物的制备

取牛大力药材 3.0 kg,加 70%乙醇水溶液 30.0 L,待浸泡 0.5 h 后,加热至沸腾,保持微沸状态回流提取 1.5 h,双层 200 目滤布过滤取醇提液,同法重复提取滤渣 1 次,合并所得滤液,真空浓缩并定容质量浓度为 5.0 g/mL(以生药量计)的药液,置于-20 °C 冰箱分装保存备用,临用前稀释至相应浓度。取秋水仙碱片进行研磨,加纯化水进行溶解配制秋水仙碱混悬液。

### 2.2 分组、造模及给药

大鼠适应性饲养 1 周后,除正常组大鼠腹腔注射橄榄油(0.1 mL/100 g)外,其余大鼠腹腔注射 40% CCl<sub>4</sub> 橄榄油混合液(0.1 mL/100 g)以制备 HF 模型<sup>[16]</sup>,2 次/周,连续 12 周。分别于造模第 6、7、8 周随机选取 2 只大鼠进行肝脏病理学检查,以验证肝纤维化形成,当肝组织出现明显炎症细胞浸润、广泛致密蓝色胶原沉积、纤维组织增生及胶原纤维束时判定造模成功。于造模第 9 周开始分组给药,将大鼠随机分为模型组,牛大力醇提物低、中、高剂量(以生药量计,3.5、7、14 g/kg)组<sup>[9]</sup>和秋水仙碱(阳性对照,0.12 mg/kg)组,每组 8 只。另设正常组大鼠 8 只。各给药组灌胃给予相应药物,连续 4 周,1 次/d;正常组、模型组大鼠灌胃给予等体积的生理盐水。给药期间各组大鼠继续同法造模,同时观察大鼠生命体征及体重的变化。实验期间大鼠自由摄食饮水,每天观察各

组大鼠活动情况,所有大鼠末次给药后,禁食同时自由饮水 24 h,经 3% 苯巴比妥钠腹腔注射麻醉后,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。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×100%<sup>[6]</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 肝组织病理学观察

取肝脏组织右叶同一位置约 1 cm<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 μm),经二甲苯脱蜡、乙醇常规逐级脱水,分别行 HE 染色和 Masson 染色,随后乙醇常规逐级脱水,二甲苯透明后采用中性树胶封片,采用电子显微镜下观察并记录肝组织病理学变化。

### 2.4 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、MDA、SOD 的含量,采用 ELISA 检测血清中 LN、HA、PCⅢ、Ⅳ-C、TGF-β1、IL-1β、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 Western blot 法检测 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kelch-like ECH-associated protein1, Keap1)/核转录因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)信号通路相关蛋白的表达

取适量大鼠肝组织,研磨后加入 RIPA 裂解液置于冰上提取总蛋白,调整蛋白浓度加入 loading buffer 于沸水浴中加热 10 min,采用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,PVDF 膜转移蛋白,封闭液室温条件下封闭 1 h。与相应一抗于 4 ℃环境中孵育过夜,洗膜液洗涤后于二抗中孵育 1 h。ECL 显影。通过 Image J 软件测量蛋白质条带的灰度值。

### 2.6 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析,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 牛大力醇提物对 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,排便稀烂。而牛大力醇提物各剂量组和秋水仙碱组大鼠毛色、精神状态、摄食相比模型组明显改善。相比于正常组,模型组大鼠体质量增长幅度较小( $P<0.01$ )、肝脏指数和脾脏指数显著升高( $P<0.01$ );与秋水仙碱组比较,牛大力醇提物高剂量组体质量有上升趋势( $P<0.05$ ),表明牛大力醇提物不影响大鼠的正常生长。与模型组比较,牛大力醇提物各剂量组及秋水仙碱组能显著降低大鼠肝脏指数与脾脏指数( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),牛大力醇提物中剂量组与秋水仙碱组相当,且牛大力醇提物高剂量组优于秋水仙碱组( $P<0.01$ )。详见表 1。

### 3.2 牛大力醇提物对 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 和 MDA 水平明显上升( $P<0.01$ ),SOD 水平显著下降( $P<0.01$ );相较于模型组,牛大力醇提物各剂量组和秋水仙碱组均能明显下调大鼠血清中 ALT、AST 及 MDA 含量( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),并能显著提高 SOD 水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。此外,相较于秋水仙碱组,牛大

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

Table 1 Effects of MCEE on the liver and spleen indexes in rats with CCl<sub>4</sub>-induced HF ( $\bar{x}\pm s$ , $n=8$ )

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	252.32±7.66	395.03±16.21	2.56±0.35	0.25±0.02
模型组	250.31±6.84	290.56±14.02 <sup>##</sup>	3.97±0.26 <sup>##</sup>	0.48±0.03 <sup>##</sup>
秋水仙碱组	249.71±8.42	364.38±12.55 <sup>***</sup>	3.05±0.32 <sup>*</sup>	0.32±0.01 <sup>***</sup>
牛大力醇提物低剂量组	251.93±7.04	369.42±16.86 <sup>**</sup>	3.16±0.33 <sup>*</sup>	0.39±0.02 <sup>***</sup>
牛大力醇提物中剂量组	252.29±6.33	377.13±17.36 <sup>**</sup>	2.93±0.40 <sup>**</sup>	0.33±0.01 <sup>***</sup>
牛大力醇提物高剂量组	253.17±7.37	388.18±11.04 <sup>**△</sup>	2.48±0.29 <sup>**△△</sup>	0.23±0.02 <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> $P<0.01$ ;与秋水仙碱组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

表2 各组大鼠血清中ALT、AST、SOD和MDA的水平( $\bar{x}\pm s, n=8, U\cdot L^{-1}$ )Table 2 Serum levels of ALT, AST, SOD, and MDA in each group of rats ( $\bar{x}\pm s, n=8, U\cdot L^{-1}$ )

组别	ALT	AST	SOD	MDA
正常组	82.06±7.15	138.15±8.36	316.67±10.95	7.24±0.96
模型组	187.32±8.17 <sup>#</sup>	236.84±10.33 <sup>#</sup>	158.03±9.64 <sup>#</sup>	15.67±1.03 <sup>#</sup>
秋水仙碱组	85.63±8.64 <sup>**</sup>	156.01±9.13 <sup>**</sup>	235.31±12.16 <sup>**##</sup>	10.08±1.13 <sup>**</sup>
牛大力醇提物低剂量组	147.65±13.31 <sup>**</sup>	190.68±13.23 <sup>**##</sup>	188.41±13.73 <sup>**##</sup>	12.35±0.82 <sup>**</sup>
牛大力醇提物中剂量组	83.37±9.55 <sup>**</sup>	162.37±9.66 <sup>**</sup>	218.62±10.39 <sup>**##</sup>	9.62±0.75 <sup>**</sup>
牛大力醇提物高剂量组	58.60±7.82 <sup>**△△##</sup>	124.08±14.04 <sup>**△</sup>	306.45±11.37 <sup>**△</sup>	6.37±1.04 <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> $P<0.01$ ;与秋水仙碱组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

力醇提物中剂量组、牛大力醇提物高剂量组对ALT、AST、SOD与MDA调控作用更强( $P<0.05, P<0.01$ ),且牛大力醇提物组间呈剂量相关性。详见表2。

### 3.3 牛大力醇提物对CCl<sub>4</sub>诱导的HF大鼠血清中HA、LN、PCⅢ和Ⅳ-C表达的调控作用

与正常组比较,模型组血清中HA、LN、PCⅢ和Ⅳ-C水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,经牛大力醇提物干预后,各组血清中HA、LN、PCⅢ和Ⅳ-C含量明显下降( $P<0.05, P<0.01$ )。详见表3。

### 3.4 牛大力醇提物对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

与正常组比较,模型组大鼠血清促纤维因子TGF-

$\beta_1$ ,促炎因子IL-1 $\beta$ 、IL-8和IL-6水平显著提高( $P<0.01$ );与模型组相比较,经牛大力醇提物干预均能显著抑制TGF- $\beta_1$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8和IL-6的表达( $P<0.05, P<0.01$ )。此外,与秋水仙碱组比较,牛大力醇提物高剂量组对TGF- $\beta_1$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8和IL-6的下调作用更明显( $P<0.01$ )。详见表4。

### 3.5 牛大力醇提物对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,未见小胆管及纤维组织增生。模型组大鼠肝小叶出现明显的结构损伤,细胞排列紊乱,肝细胞局灶点状坏死增加、炎症细胞浸润,

表3 各组大鼠血清中HA、LN、PCⅢ和Ⅳ-C的水平( $\bar{x}\pm s, n=8, ng\cdot mL^{-1}$ )Table 3 Serum levels of HA, LN, PCⅢ, and Ⅳ-C in each group of rats ( $\bar{x}\pm s, n=8, ng\cdot mL^{-1}$ )

组别	HA	LN	PCⅢ	Ⅳ-C
正常组	87.32±10.05	125.05±12.07	83.09±8.31	163.11±10.03
模型组	196.18±9.30 <sup>#</sup>	266.13±10.04 <sup>#</sup>	187.31±10.98 <sup>#</sup>	274.82±11.64 <sup>#</sup>
秋水仙碱组	133.84±9.16 <sup>**##</sup>	215.77±13.36 <sup>**##</sup>	125.24±12.93 <sup>**##</sup>	206.01±13.24 <sup>**##</sup>
牛大力醇提物低剂量组	177.87±11.07 <sup>**</sup>	239.12±9.81 <sup>**</sup>	160.01±13.22 <sup>**</sup>	244.09±11.37 <sup>**</sup>
牛大力醇提物中剂量组	142.34±9.04 <sup>**##</sup>	206.50±13.60 <sup>**##</sup>	132.67±12.08 <sup>**##</sup>	213.38±15.91 <sup>**##</sup>
牛大力醇提物高剂量组	96.94±10.22 <sup>**△△</sup>	164.33±15.66 <sup>**△△</sup>	88.65±13.07 <sup>**△</sup>	167.65±10.47 <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> $P<0.01$ ;与秋水仙碱组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

表4 各组大鼠血清中TGF- $\beta_1$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8及IL-6的水平( $\bar{x}\pm s, n=8, pg\cdot mL^{-1}$ )Table 4 Serum levels of TGF- $\beta_1$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, and IL-6 in each group of rats ( $\bar{x}\pm s, n=8, pg\cdot mL^{-1}$ )

组别	TGF- $\beta_1$	IL-1 $\beta$	IL-8	IL-6
正常组	156.24±13.75	91.30±8.65	52.80±6.37	84.43±6.61
模型组	262.03±15.24 <sup>#</sup>	152.71±8.51 <sup>#</sup>	84.22±4.83 <sup>#</sup>	126.87±8.04 <sup>#</sup>
秋水仙碱组	172.73±15.04 <sup>**</sup>	84.62±10.08 <sup>**</sup>	70.06±7.62 <sup>**##</sup>	76.08±9.31 <sup>**</sup>
牛大力醇提物低剂量组	219.03±12.61 <sup>**</sup>	122.37±9.02 <sup>**##</sup>	71.13±6.30 <sup>**</sup>	102.50±7.59 <sup>*</sup>
牛大力醇提物中剂量组	187.65±9.11 <sup>**##</sup>	103.68±11.36 <sup>**</sup>	64.66±6.89 <sup>**</sup>	78.07±6.86 <sup>**</sup>
牛大力醇提物高剂量组	129.94±13.28 <sup>**△</sup>	60.78±7.69 <sup>**##</sup>	47.04±5.97 <sup>**△△</sup>	58.22±8.02 <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> $P<0.01$ ;与秋水仙碱组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

纤维化明显。牛大力醇提物各剂量组及秋水仙碱组对 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呈现不同程度改善,且牛大力醇提物干预作用效果随着剂量增加而加强,其中牛大力醇提物高剂量组较于秋水仙碱组改善效果更为显著。详见图 1。

Masson 染色显示,正常组大鼠肝组织未出现染成蓝色的纤维,未发现病理性改变,而模型组可见明显的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,局部可见假小叶及胶原纤维束。与模型组比较,牛大力醇

提物各剂量组胶原纤维增生范围明显减少,其改善作用随着剂量的增加而增强,其中以牛大力醇提物高剂量组治疗效果最佳。详见图 2。

### 3.6 牛大力醇提物对 CCl<sub>4</sub> 诱导 HF 大鼠肝组织 Keap1/Nrf2 信号通路蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织 Keap1 蛋白表达显著升高,Nrf2、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)和醌氧化还原酶 1(quinone oxidoreductase 1, NQO1)蛋白表达明显减少( $P<0.01$ )。与模型组相比,经牛大力醇提物干预后,各剂量组大鼠肝组织 Keap1 蛋白表达显著降低,Nrf2、HO-1 和NQO1

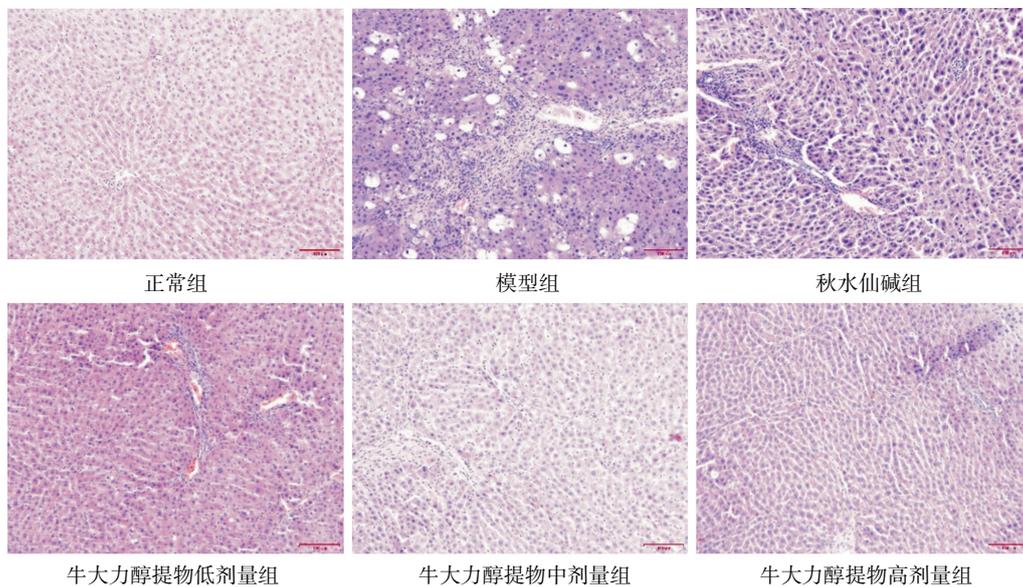


图 1 牛大力醇提物对 CCl<sub>4</sub> 致 HF 大鼠肝组织病理变化的改善作用(HE,×200,标尺:100 μm)

Fig.1 Improvement effects of MCEE on the pathological changes in liver tissue of rats with CCl<sub>4</sub>-induced HF rats (HE, ×200, scale bar=100 μm).

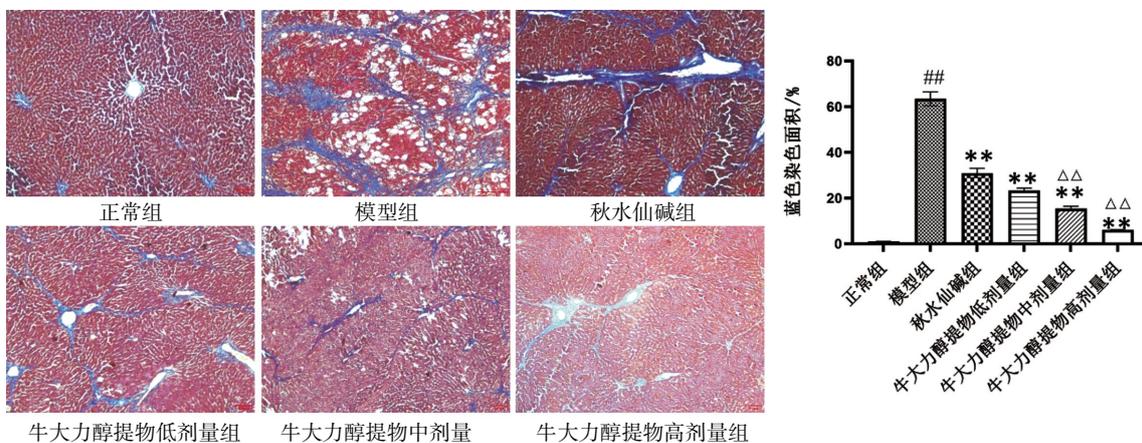


图 2 牛大力醇提物对 CCl<sub>4</sub> 致 HF 大鼠肝组织病理变化的改善作用(Masson,×200,标尺:100 μm)

Fig.2 Improvement effects of MCEE on the pathological changes in liver tissue of rats with CCl<sub>4</sub>-induced HF (Masson, ×200, scale bar=100 μm)

蛋白表达明显增加( $P<0.05, P<0.01$ )。与秋水仙碱组比较,牛大力醇提取物高剂量组对 Keap1、Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白调控作用更强( $P<0.01$ )。详见图 3。

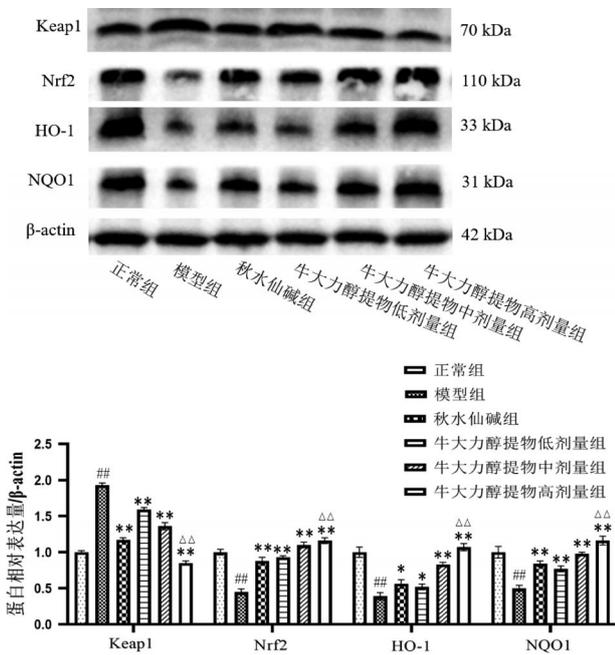


图 3 各组 Keap1、Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白的表达情况

Fig.3 Protein expressions of Keap1, Nrf2, HO-1 and NQO1 in each group

注:A.各组不同蛋白表达电泳条带图;B.各组不同蛋白相对表达量。与正常组比较,## $P<0.01$ ;与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与秋水仙碱组比较,△△ $P<0.01$ 。

## 4 讨论

ALT、AST 常用于肝损伤评价指标<sup>[17]</sup>,MDA 与 SOD 反应机体抗氧化应激水平<sup>[18]</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了明显的损伤与纤维化特征,血清 ALT、AST 及 MDA 含量显著升高,SOD 水平显著下降。给予牛大力醇提取物或秋水仙碱治疗后,上述血清生化指标、肝组织病理损伤及纤维化病变均具有不同程度的改善,而且牛大力醇提取物的改善效果随着剂量的增加而增强,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牛大力醇提取物保肝作用的机制之一。多数肝病的发展进程中均涉及不同程度的氧化应激反应。氧化应激反应可引起炎症因子(如 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 IL-6 等)的大量释放,刺激 HSC 的活化与增殖<sup>[19]</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,诱导肝纤维化进展<sup>[20]</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,证实了 HF 与炎症反应密切相关。与模型组比较,牛大力醇提取物各剂量组和秋水仙碱组大鼠肝组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 IL-6 的水平均显著下降,同时牛大力醇提取物的抑制效果随着剂量增加而增强,说明牛大力醇提取物可通过抑制促炎细胞因子的表达而发挥抗 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>[21]</sup>。

血清 HA、LN、PC III 及 IV-C 含量与纤维化严重程度呈正相关<sup>[22]</sup>,其含量常作为 HF 的诊疗指标。本实验结果显示,与模型组比较,牛大力醇提取物干预可有效降低 HF 大鼠血清中 HA、LN、PC III 和 IV-C 水平,且随着剂量的增加对上述指标抑制作用越强,提示牛大力醇提取物对 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠 HF 具有良好的抑制作用。

Keap1/Nrf2 通路与机体氧化应激密切相关,对细胞氧化还原与代谢稳态的维持,炎症反应和细胞毒性反应中具有重要调控作用。Keap1 与 Nrf2 耦联后可抑制后者活性;当机体处于氧化应激状态时,Nrf2 与 Keap1 解耦联后重新恢复活性并转运至细胞核中,再经系列反应后激活其下游的抗氧化基因(如 HO-1、NQO1、SOD)表达,以维持氧化还原稳态<sup>[23]</sup>。由此认为,通过激活 Nrf2 是阻滞氧化应激、抗 HF 的有力手段。本研究发现,CCl<sub>4</sub> 明显提高了大鼠肝组织中 Keap1 的水平,抑制了 Nrf2 及下游抗氧化酶 HO-1、NQO1 的表达,牛大力醇提取物显著抑制了大鼠肝组织 Keap1 的表达,促进 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白的表达,且牛大力对上述蛋白的调节强度与剂量相关,表明牛大力醇提取物可能是通过调控 Keap1/Nrf2 信号通路发挥抗氧化应激作用,进而发挥改善 HF 的作用。

综上所述,牛大力醇提取物对 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。牛大力主要分布于我国南方区域,临床常用于润肺强肾、活筋通络、健脾益气。近年研究发现,牛大力

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,其开发程度有待进一步提高。本研究采用多项指标探讨了牛大力醇提物对 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,为牛大力抗 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, 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] 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.
- [5] 陈 明, 施雪敏, 周小平, 等. HPLC 法同时测定不同产地牛大力中 3 种化合物的含量[J]. *亚太传统医药*, 2022, 245(1): 66-70.
- [6] SU Z, RUAN J, LIU X, et al. Combining 1H-NMR-based metabolomics and network pharmacology to dissect the mechanism of antidepressant effect of *Millettia speciosa* Champ on mouse with chronic unpredictable mild stress-induced depression[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2021, 73(7): 881-892.
- [7] HUANG Z, ZENG Y J, CHEN X, et al. A novel polysaccharide from the roots of *Millettia Speciosa* Champ: preparation, structural characterization and immunomodulatory activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145(12): 547-557.
- [8] 梁子昌, 陈 明, 施雪敏, 等. 牛大力总黄酮提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *粮食与油脂*, 2023, 36(10): 101-106.
- [9] 余 香, 张健民, 郑小吉, 等. 200 张含牛大力的中药饮片处方分析[J]. *临床合理用药杂志*, 2021, 14(6): 165-166.
- [10] 张 桐, 吴 峰, 刘冬文. 岭南习用药材牛大力治疗骨伤疾病的研究进展[J]. *医学食疗与健康*, 2021, 19(5): 206-208.
- [11] ZHANG C, MO Y Y, FENG S S, et al. Urinary metabolomics study of anti-depressive mechanisms of *Millettia speciosa* Champ on rats with chronic unpredictable mild stress-induced depression [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 205(10): 114338-114349.
- [12] 张庆熙, 金 晨, 陈 康, 等. 我国鸡血藤属和崖豆藤属药用植物的研究现状及比较[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(16): 198-208.
- [13] 王立抗, 陈鸿庚, 黄智霖, 等. 牛大力不同部位总黄酮、多酚含量及其抗氧化活性研究[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(3): 139-142.
- [14] 周添浓, 刘丹丹, 唐立海, 等. 牛大力对四氯化碳及酒精所致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 170(10): 2585-2587.
- [15] ZHANG Y, HUANG J, GAN L, et al. Hepatoprotective effects of Niudali (*Callerya speciosa*) root aqueous extracts against tetrachloromethane-induced acute liver injury and inflammation[J]. *Food Science & Nutrition*, 2023, 11(11): 7026-7038.
- [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] 刘 丹, 曹 硕, 刘 阳, 等. 地鳖肽对 CCl<sub>4</sub> 诱导的慢性肝损伤小鼠的抗氧化保护作用的研究[J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(1): 73-80.
- [18] 周 霖, 王肖辉, 荆自伟, 等. 鹿茸多肽对四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化的保护作用及其机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(3): 338-345.
- [19] ALSHAMMARI G M, AL-QAHTANI W H, ALFARIS NA, 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.
- [20] 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.
- [21] ZHANG G, JIANG Y, LIU X, et al. Lingonberry anthocyanins inhibit hepatic stellate cell activation and liver fibrosis via TGFβ/Smad/ERK signaling pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(45): 13546-13556.
- [22] 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.
- [23] SUZUKI T, TAKAHASHI J, YAMAMOTO M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 signaling pathway[J]. *Molecules and Cells*, 2023, 46(3): 133-141.

(本文编辑 苏 维)