

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.17.012

茵芪三黄解毒汤对肝纤维化模型小鼠肝脏硬度及上皮间质转化的影响

王宁, 吕文良[✉], 武庆娟

中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区北线阁5号, 100053



[摘要] **目的** 探讨复方茵芪三黄解毒汤抗肝纤维化进展的可能作用机制。**方法** 将38只C57BL/6J小鼠随机分为空白组、模型组、水飞蓟宾组 and 茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组, 模型组8只, 其余每组6只。除空白组外其余各组小鼠均腹腔注射10%四氯化碳(CCl_4)建立肝纤维化模型, 每周2次, 持续8周。首次造模1周后开始药物干预, 茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组分别给予茵芪三黄解毒汤混悬液8.325、16.65、33.3 g/(kg·d)灌胃, 水飞蓟宾组给予水飞蓟宾混悬液55 mg/(kg·d)灌胃, 空白组和模型组给予0.2 ml生理盐水灌胃, 持续8周。使用小动物超声探测仪观察活体小鼠肝脏硬度记录超声灰度值, 采用天狼猩红染色观察肝脏组织并计算胶原纤维沉积比例, 检测各组小鼠肝功能[包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)]及血清中层粘连蛋白(LN)、透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(CⅣ)含量, 检测小鼠肝组织中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、波形蛋白(Vimentin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)蛋白表达。**结果** 与空白组相比, 模型组小鼠肝脏超声灰度值、胶原纤维沉积比例升高, 血清ALT、AST、HA、LN、PCⅢ水平升高, 肝组织中E-cadherin表达减少, N-cadherin、 α -SMA、Vimentin、TGF- $\beta 1$ 表达增加($P<0.05$)。与模型组比较, 水飞蓟宾组与茵芪三黄解毒汤中、高剂量组肝脏超声灰度值及胶原纤维沉积比例下降, 血清ALT、AST、LN、HA、PCⅢ水平降低; 而与模型组相比, 水飞蓟宾组和茵芪三黄解毒汤各剂量组小鼠肝组织中E-cadherin表达升高, N-cadherin、Vimentin、TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA表达均下降($P<0.05$), 其中茵芪三黄解毒汤中剂量组各项指标改善最为显著($P<0.05$)。**结论** 茵芪三黄解毒汤能够显著减轻 CCl_4 致小鼠肝纤维化的程度, 可能与其调控肝脏硬度抑制小鼠上皮间质转化发生有关。

[关键词] 肝纤维化; 茵芪三黄解毒汤; 肝脏硬度; 上皮间质转化

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是肝脏损伤后细胞外基质(extracellular matrix, ECM)异常分布与过度沉积的病理过程^[1], 是慢性肝病过程中一种可逆的肝组织损伤过度修复反应^[2], 长期持续存在会进展为肝硬化, 甚至引起门静脉高压或肝癌, 导致肝功能衰竭^[3]。近年来, 上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)被认为是肝纤维化中产生肌成纤维细胞、加速ECM沉积的机制之一, 肝细胞、胆管上皮细胞、肝祖细胞及肝星状

细胞(hepatic stellate cell, HSC)EMT样过程均是HF发展过程中的重要机制^[4]。医学界普遍认为, 肝纤维化及时治疗在组织学上是可逆的^[5], 若发展至肝硬化阶段则逆转较为困难。目前临床上尚无治疗HF的特异性方法, 主要是通过针对病因及抗纤维化治疗, 一定程度上可以缓解肝损伤及炎症反应, 部分逆转肝纤维化, 但仍存在一定局限性, 如长期服用药物产生的副作用及疾病的反复发作^[6]。近年来中医药治疗HF获得广泛关注, 茵芪三黄解毒汤为中国中医科学院广安门医院抗肝纤维化临床治疗的常用有效方剂, 具有健脾益气、活血化瘀、解毒通络之效。前期研究显示, 茵芪三黄解毒汤联合西药可改善慢性乙型肝炎患者的神疲乏力、食欲

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1705700);国家自然科学基金(81774282);中国中医科学院科技创新工程(C12021A00801, C12021A00802);北京市自然科学基金(7222295)

✉ 通讯作者:lvwenliang@sohu.com

不振等症状,同时还显著改善患者肝功指标^[7-8];茵芪三黄解毒汤能够减轻四氯化碳(CCl₄)诱导的肝纤维化小鼠肝脏炎症^[9]。基于此,本实验拟从上皮间质转化方面进一步探索茵芪三黄解毒汤抗肝纤维化的可能分子机制,为其临床应用提供依据。本研究获得国家纳米科学中心实验动物伦理委员会批准(批准号:NCNST21-2204-0603)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠38只,6~8周龄,体质量20~25 g,购自北京维通利华实验动物有限公司,实验动物合格证号:SCXK(京)2021-0006。小鼠饲养于国家纳米科学中心标准实验室中,自由饮食水,温度(23±2)℃,明/暗(12 h/12 h)交替,湿度为50%~60%。

1.2 药物

茵芪三黄解毒汤由黄芪、茵陈、黄芩、黄连、黄柏、莪术、醋鳖甲、焦山楂、白芍、凌霄花、麸炒白术、茯苓、柴胡、白花蛇舌草按照4:4:1:1:1:2:1:5:4:2:3:3:2:4的比例配制,由广安门医院煎药房采用传统水煎法机械煎药制作,制备成最终含有生药量0.74 g/ml即为所需高剂量浓度,2倍及4倍稀释后即可得到相应的中、低剂量浓度混悬液,4℃保存备用。

1.3 主要试剂与仪器

水飞蓟宾粉剂(Macklin公司,批号:22888-70-6);CCl₄(Aladdin公司,批号:H1810200);10%水合氯醛(BBI公司,批号:302-17-0);层粘连蛋白(LN,批号:M179003-48T)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ,批号:MF5752-48T)、Ⅳ型胶原(CⅣ,批号:M177557-48T)检测试剂盒,Mreda公司;橄榄油(Macklin公司,批号:C2561860);多聚甲醛(Biosharp公司,批号:22172503);转化生长因子β1(TGF-β1)抗体(批号:ab31013)、波形蛋白(Vimentin)抗体(批号:ab92547)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体(批号:ab231303)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)抗体(批号:ab76011)、α平滑肌肌动蛋白(α-SMA)抗体(批号:ab5694)、GAPDH抗体(批号:ab8245),Abcam公司;抗兔(批号:02691115)、抗鼠(批号:02641118)、三色预染蛋白marker(批号:026A1000),EpiZyme公司;RIPA裂解液(批号:20220321)、PMSF(批号:20220322)、透明质酸(HA,批号:

SEKH-0509-48)、BCA蛋白定量试剂盒(批号:20220806),Solarbio公司;ECL曝光液(MCE公司,批号:217810)、聚偏二氟乙烯膜(PVDF,Merck公司,批号:R8HA5471);快速封闭液(NCM Biotech公司,批号:20221010);天狼猩红染色液(G-clone公司,批号:2610108)。

多功能酶标检测仪(BioTek公司,Epoch型);高速低温离心机(大龙兴创实验仪器股份公司,D3024R型);小动物超声检测仪(Vevo公司,VisualSonics VevoLAB型);蛋白电泳仪(Bio-Rad公司,165-8001型);全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学有限公司,Chemray 240/800型)。

1.4 分组、造模及干预方法

适应性饲喂1周后,将小鼠按体质量从小到大依次编号,采取随机数字表法将其分为:空白组,模型组,水飞蓟宾组和茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组,考虑到模型组需进行成模验证,设为8只,其余各组小鼠每组6只。除空白组外,其余各组小鼠采用CCl₄诱导肝纤维化动物模型^[10]:采用10% CCl₄橄榄油溶液0.1 ml/25 g腹腔注射,每周2次,分别于周一、周四进行,连续8周。模型组小鼠于第4、6周末按照随机数字表法抽取1只进行模型验证。造模成功判定标准:模型小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)明显升高,病理显示肝组织胶原纤维面积密度增加,汇管区纤维组织增生^[10]。

腹腔注射1周后药物组同时开始药物干预,给药剂量参照《中药药理研究方法学》^[11],按小鼠与人体表面积比等效剂量换算比率,将人每日临床剂量折算成的小鼠等效剂量作为中剂量组,低、高剂量组分别设为临床等效剂量的1/2倍、2倍。茵芪三黄解毒汤低、中、高剂量组小鼠分别予以8.325、16.65、33.3 g/(kg·d)混悬液灌胃,水飞蓟宾组给予水飞蓟宾混悬液55 mg/(kg·d)灌胃;模型组、正常组则给予每日相同时间0.2 ml/只生理盐水灌胃。各组小鼠均每日灌胃1次,共8周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 小鼠一般情况 药物干预期间,观察各组小鼠进食、饮水、活动、毛发及精神状态等情况,小鼠末次给药后禁食不禁水24 h后称量小鼠体质量并记录。

1.5.2 小动物超声检测仪检测小鼠肝脏硬度 最后一次灌胃后次日,每组采用随机数字表法选取3只小鼠用10%水合氯醛0.1 ml/10 g腹腔注射麻醉,

去除腹部毛发,充分暴露腹部,放置于小动物超声成像台上进行检测,记录灰度值。

1.5.3 肝功能及细胞外基质血清成分检测 小鼠活体超声检测结束后,采用眼球取血,放置于1 ml离心管内,室温静置30 min,于低温离心机(3000 r/min,离心半径为10 cm)4℃离心15 min,分离血清标本于EP管内,放于全自动生化分析仪上进行肝功能(包括ALT、AST)及细胞外基质成分(HA、LN、CIV、PCⅢ)含量检测。

1.5.4 肝组织病理学染色 各组小鼠均处死,游离整个肝脏,称取肝重。取肝右叶进行病理检查,用4%多聚甲醛固定,进一步乙醇脱水、包埋,制备组织病理切片,进行天狼猩红染色,以此来判断小鼠肝组织内纤维胶原沉积情况,其余肝组织置于EP管内,-80℃保存备用。

1.5.5 Western blot 法检测肝组织中 E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、 α -SMA、TGF- β 1 蛋白表达

取约100 mg肝组织,加入1 ml含1%100 mmol/L PMSF的RIPA裂解液,研磨后匀浆,放入离心管,4℃作用30 min后于离心机(15 000 r/min、离心半径10 cm)离心15 min,取上清放置于新的离心管中。采用BCA法测定组织中蛋白含量,取40 μ l蛋白样品加入10 μ l的5 $\times$ 上样缓冲液,95℃水浴锅作用5 min,冻存于-20℃冰箱中,用于进行SDS-PAGE分离。分离胶与浓缩胶配置完成后,上层胶使用80 V 30 min、下层胶120 V 60 min完成电泳,转膜条件120 V 90 min后取出PVDF膜,快速封闭液封闭15 min,加入不同比例稀释的一抗(E-cadherin 1:800; Vimentin 1:1000; N-cadherin 1:1000; TGF- β 1 1:1000; α -SMA 1:500; GAPDH 1:1000)4℃过夜,加入二抗(1:5000稀释),常温摇床孵育1 h, TBST洗3次,每次10 min,加入ECL显色液,放入化学发光仪中曝光,将E-cadherin、

Vimentin、N-cadherin、 α -SMA、TGF- β 1 与 GAPDH 灰度值相比得出目的蛋白相对表达量。

1.6 统计学分析

应用SPSS 22.0软件进行统计分析,计量资料符合正态分布,采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐者多组样本均数之间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验;方差不齐者多组间比较采用Kruskal Wallis H 检验,两两比较采用Dunnett's t 检验。所有假设检验均采用双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

实验期间模型组2只小鼠验证模型,水飞蓟宾组小鼠死亡1只,茵芪三黄解毒汤低剂量组小鼠死亡1只,可能与灌胃时操作不慎有关。

2.1 各组小鼠一般情况比较

空白组小鼠状态良好,毛色黑亮,活动正常,能正常进食、饮水;模型组小鼠状态较差,毛发蓬乱,行动明显迟缓,精神萎靡,喜蜷缩呈弓背状,进食较少;与模型组比较,茵芪三黄解毒汤各剂量组及水飞蓟宾组小鼠上述精神状态、毛发色泽、形态活动及进食等方面均有所恢复,尤以茵芪三黄解毒汤中剂量组改善最为明显。

2.2 各组小鼠体质量、肝重比较

表1示,与空白组比较,模型组小鼠体质量和肝重升高($P<0.05$);与模型组比较,茵芪三黄解毒汤中、高剂量组小鼠体质量和肝重均下降($P<0.05$);与水飞蓟宾组比较,茵芪三黄解毒汤高剂量组小鼠体质量和肝重下降,茵芪三黄解毒汤中剂量组肝重下降($P<0.05$)。茵芪三黄解毒汤各剂量组小鼠体质量和肝重比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 各组小鼠肝脏硬度比较

表1示,与空白组比较,模型组小鼠肝脏超声

表1 各组小鼠体质量、肝重及肝脏超声灰度值比较

Table 1 Comparison of body weight, liver weight and liver ultrasound gray value of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体质量/g	肝重/g	肝脏超声灰度值
空白组	6	28.53 $\pm$ 1.76	1.41 $\pm$ 0.11	124.64 $\pm$ 11.69
模型组	6	29.31 $\pm$ 0.74 ^{a)}	1.46 $\pm$ 0.12 ^{a)}	186.75 $\pm$ 0.52 ^{a)}
水飞蓟宾组	5	29.82 $\pm$ 1.18	1.47 $\pm$ 0.17	175.59 $\pm$ 2.12 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤低剂量组	5	28.36 $\pm$ 2.44	1.42 $\pm$ 0.14	177.40 $\pm$ 1.25
茵芪三黄解毒汤中剂量组	6	27.32 $\pm$ 1.13 ^{b)}	1.21 $\pm$ 0.08 ^{b) c)}	153.20 $\pm$ 3.96 ^{b) c) d)}
茵芪三黄解毒汤高剂量组	6	26.95 $\pm$ 1.45 ^{b) c)}	1.28 $\pm$ 0.75 ^{b) c)}	166.85 $\pm$ 2.62 ^{b) c) d)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与水飞蓟宾组比较, $P<0.05$; d) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组相比, $P<0.05$ 。

灰度值增高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 水飞蓟宾组和茵芪三黄解毒汤中、高剂量组小鼠肝脏超声灰度值减小 ($P<0.05$), 茵芪三黄解毒汤低剂量组差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与水飞蓟宾组和茵芪三黄解毒汤低剂量组比较, 茵芪三黄解毒汤中、高剂量组肝脏超声灰度值降低 ($P<0.05$); 茵芪三黄解毒汤中、高剂量组肝脏超声灰度值组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组小鼠肝脏组织病理学比较

空白组小鼠肝脏质地柔软、表面光滑、颜色淡润有光泽; 模型组小鼠肝脏质地粗糙、表面颗粒感、边缘变钝、颜色加深缺乏光泽; 水飞蓟宾组及茵芪三黄解毒汤各剂量组小鼠肝脏质地、颜色均有改善, 其中茵芪三黄解毒汤中、高剂量组肝脏改善明显, 颗粒感明显减少, 表面渐趋光滑, 颜色恢复。

天狼猩红染色结果见附件 (请扫描本文二维码获取)。空白组小鼠仅有少量胶原纤维, 局限于汇管区血管壁附近; 模型组可见大量特异性的红染胶原纤维, 且自汇管区向外辐射; 水飞蓟宾组可见胶原纤维沉积减少, 肝小叶周围轻度纤维化, 茵芪三黄解毒汤各剂量组胶原纤维沉积不同程度减少, 其中茵芪三黄解毒汤中剂量组仅见肝小叶周围轻微纤维沉积, 茵芪三黄解毒汤低、高剂量组可见肝窦、汇管区周围轻度纤维化。表 2 示, 与空白组比较, 模型组肝脏胶原纤维沉积比例明显增加 ($P<0.05$); 与模型组相比, 水飞蓟宾组和茵芪三黄解毒汤各剂量组肝脏胶原纤维沉积比例均减少 ($P<0.05$); 与水飞蓟宾组和茵芪三黄解毒汤高剂量组相比, 茵芪三黄解毒汤低、中剂量组小鼠肝脏胶原纤维沉积比例下降 ($P<0.05$); 茵芪三黄解毒汤中剂量组亦明显低于茵芪三黄解毒汤低剂量组 ($P<0.05$)。

2.5 各组小鼠肝功能及血清细胞外基质指标比较

表 3 示, 与空白组相比, 模型组小鼠肝组织

表 2 各组小鼠肝脏胶原纤维沉积比例

Table 2 Comparison of proportion of collagen fiber deposition in liver of mice in each group (% , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	胶原纤维沉积比例
空白组	6	0.702±0.6
模型组	6	6.814±1.3 ^{a)}
水飞蓟宾组	5	3.234±1.1 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤低剂量组	5	2.648±1.0 ^{b) c) d)}
茵芪三黄解毒汤中剂量组	6	1.806±0.8 ^{b) c) d) e)}
茵芪三黄解毒汤高剂量组	6	4.521±0.9 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与水飞蓟宾组比较, $P<0.05$; d) 与茵芪三黄解毒汤高剂量组相比, $P<0.05$; e) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组相比, $P<0.05$ 。

ALT、AST 及血清 HA、LN、PCⅢ 水平明显升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, 水飞蓟宾组和茵芪三黄解毒汤中、高剂量组小鼠 ALT、AST 及血清 HA、LN、PCⅢ 水平平均下降 ($P<0.05$); 与水飞蓟宾组相比, 茵芪三黄解毒汤中剂量组小鼠 ALT、AST 及血清 HA、LN、PCⅢ 水平降低 ($P<0.05$), 茵芪三黄解毒汤高剂量组 AST、HA、PCⅢ 水平亦降低 ($P<0.05$); 茵芪三黄解毒汤中剂量组 ALT、AST 水平低于茵芪三黄解毒汤低剂量组, 茵芪三黄解毒汤中、高剂量组 HA、CIV 水平低于茵芪三黄解毒汤低剂量组 ($P<0.05$)。

2.6 各组小鼠肝组织 E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、TGF-β1、α-SMA 蛋白表达比较

表 4 示, 与空白组相比, 模型组肝组织中 E-cadherin 蛋白表达降低, Vimentin、N-cadherin、TGF-β1、α-SMA 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与模型组相比, 水飞蓟宾组和茵芪三黄解毒汤各剂量组 E-cadherin 水平升高, Vimentin、N-cadherin、TGF-β1 蛋白表达降低; 茵芪三黄解毒汤各剂量组 α-SMA 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与水飞蓟宾组相比, 茵芪三黄解毒汤各剂量组 E-cadherin 蛋白表达升高, 茵芪三黄解毒汤中、高剂量组 Vimentin、

表 3 各组小鼠 ALT、AST 及血清 HA、LN、PCⅢ、CIV 水平比较

Table 3 Comparison of ALT, AST and serum HA, LN, PCⅢ, CIV levels of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	ALT	AST	HA	LN	PCⅢ	CIV
空白组	6	28.3±1.81	98.6±4.26	447.9±39.8	18.2±2.1	14.9±2.2	8.9±0.7
模型组	6	236.7±67.3 ^{a)}	476.3±23.6 ^{a)}	841.3±52.9 ^{a)}	27.5±3.2 ^{a)}	27.7±6.3 ^{a)}	10.6±1.0
水飞蓟宾组	5	39.8±5.23 ^{b)}	105.8±10.8 ^{b)}	458.2±94.6 ^{b)}	17.1±3.3 ^{b)}	22.6±4.1 ^{b)}	12.2±2.0
茵芪三黄解毒汤低剂量组	5	42.9±5.78 ^{b)}	123.5±12.6 ^{b)}	882.2±150.7 ^{b)}	17.3±2.5 ^{b)}	9.4±2.5 ^{b) c)}	16.0±1.7
茵芪三黄解毒汤中剂量组	6	37.8±4.10 ^{b) c) d)}	91.6±6.7 ^{b) c) d)}	410.9±60.3 ^{b) c) d)}	16.8±3.0 ^{b) c)}	15±4.3 ^{b) c)}	14.3±1.8 ^{d)}
茵芪三黄解毒汤高剂量组	6	65.2±9.87 ^{b)}	103.9±8.9 ^{b) c)}	414.8±76.1 ^{b) c) d)}	23.2±4.2 ^{b)}	15.6±4.8 ^{b) c)}	14.2±3.2 ^{d)}

注: ALT, 丙氨酸氨基转移酶; AST, 门冬氨酸氨基转移酶; HA, 透明质酸; LN, 层粘连蛋白; PCⅢ, Ⅲ型前胶原; CIV, Ⅳ型胶原。

a) 与正常组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与水飞蓟宾组比较, $P<0.05$; d) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组相比, $P<0.05$ 。

表 4 各组小鼠肝组织 E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、TGF- β 1、 α -SMA 蛋白表达比较Table 4 Comparison of E-cadherin, Vimentin, N-cadherin, TGF- β 1, and α -SMA protein expression in liver tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	E-cadherin	Vimentin	N-cadherin	TGF- β 1	α -SMA
空白组	6	1.02 $\pm$ 0.19	0.90 $\pm$ 0.18	0.90 $\pm$ 0.06	0.87 $\pm$ 0.08	0.82 $\pm$ 0.06
模型组	6	0.71 $\pm$ 0.12 ^{a)}	2.23 $\pm$ 0.06 ^{a)}	1.81 $\pm$ 0.22 ^{a)}	1.75 $\pm$ 0.06 ^{a)}	1.18 $\pm$ 0.10 ^{a)}
水飞蓟宾组	5	0.85 $\pm$ 0.29 ^{b)}	1.19 $\pm$ 0.21 ^{b)}	1.57 $\pm$ 0.17 ^{b)}	0.98 $\pm$ 0.43 ^{b)}	1.13 $\pm$ 0.14
茵芪三黄解毒汤低剂量组	5	1.22 $\pm$ 0.33 ^{b) c)}	1.61 $\pm$ 0.28 ^{b)}	1.42 $\pm$ 0.09 ^{b)}	1.36 $\pm$ 0.16 ^{b)}	1.10 $\pm$ 0.15 ^{b)}
茵芪三黄解毒汤中剂量组	6	1.74 $\pm$ 0.07 ^{b) c) d)}	0.80 $\pm$ 0.10 ^{b) c) d)}	0.90 $\pm$ 0.15 ^{b) c) d)}	0.80 $\pm$ 0.07 ^{b) c) d)}	0.77 $\pm$ 0.15 ^{b) c) d)}
茵芪三黄解毒汤高剂量组	6	1.25 $\pm$ 0.29 ^{b) c)}	0.82 $\pm$ 0.31 ^{b) c) d)}	1.15 $\pm$ 0.10 ^{b) c) d)}	1.04 $\pm$ 0.37 ^{b) d)}	0.88 $\pm$ 0.07 ^{b) c) d)}

注: E-cadherin, E-钙黏蛋白; Vimentin, 波形蛋白; N-cadherin, N-钙黏蛋白; TGF- β 1, 转化生长因子 β 1; α -SMA, α 平滑肌肌动蛋白。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与水飞蓟宾组比较, $P < 0.05$; d) 与茵芪三黄解毒汤低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

N-cadherin、 α -SMA 蛋白表达下降, 茵芪三黄解毒汤中剂量组 TGF- β 1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。与茵芪三黄解毒汤低剂量组相比, 茵芪三黄解毒汤中剂量组 E-cadherin 表达升高, 茵芪三黄解毒汤中、高剂量组 Vimentin、N-cadherin、TGF- β 1、 α -SMA 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。各组小鼠肝组织 E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、TGF- β 1、 α -SMA 蛋白电泳图见图 1。

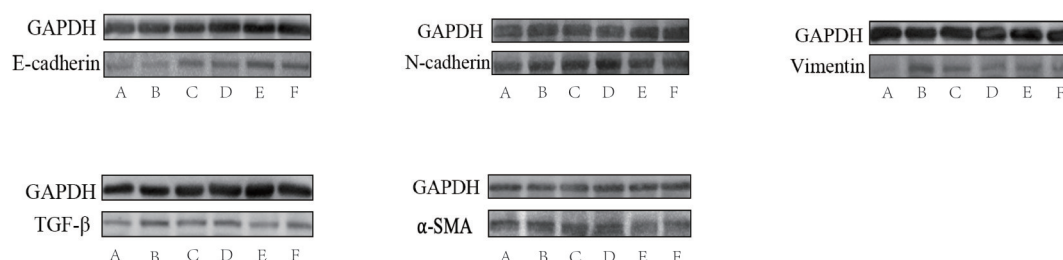
3 讨论

肝纤维化是慢性肝脏疾病进展的病理过程, 病位虽在肝脏, 但全身的稳态失衡是肝纤维化病变进程中最为重要的因素^[12]。我们认为, 肝纤维化基本病机可归纳为正虚邪盛、邪毒久稽、肝络受损、气滞血瘀, 即“正虚血瘀”, 气虚则推动不足, 血行受阻、气滞, 进而形成血瘀。茵芪三黄解毒汤方中黄芪甘温, 益气扶正, 鼓动正气驱毒外出, 亦可补气行气、率血行血, 促进气血畅行; 茵陈苦泄清热, 泄肝热、理肝郁, 使得气血生化与运行顺畅, 两药相合, 益气活血并举。黄芩、黄连、黄柏清热燥湿、泻火解毒, 助茵陈行上、中、下三焦之实

邪, 促进气血正常运行。焦山楂具有消食健胃化瘀之功, 与莪术、醋鳖甲、凌霄花合用, 健脾化积、消瘀化癥; 白芍补养肝血, 条达肝气, 使气血调和。纵观全方, 补虚不助邪, 泻实不伤正, 气血同调, 立意于“疏其血气, 令其条达, 而致和平”, 共奏健脾益气、活血化瘀、解毒通络之效。

在“慢性肝炎→肝纤维化→肝硬化→肝癌”进展研究过程中, 除了聚焦常规化学因子及生物因子带来的机制改变进行研究外, 机械-生物信号传导在肝脏疾病中的作用也受到关注^[13]。微环境中细胞与细胞外基质间的相互作用力影响细胞功能^[14], ECM 沉积构成的基底硬度, 被证明与 HF 发生发展密切相关^[15]。在肝纤维化进展中, EMT 是肝星状细胞表型转变的重要机制之一^[16]。体外研究发现, 基质硬度可诱导造血干细胞发生上皮间质转化, 促进造血干细胞活化和增殖, 加速疾病进展^[17-18]。因此, 本研究探究茵芪三黄解毒汤是否通过调节肝组织力学性质抑制肝脏 EMT 进程, 进而发挥抗肝纤维化的作用机制。

水飞蓟宾作为水飞蓟素提取物中最具生物活性



注: A, 空白组; B, 模型组; C, 水飞蓟宾组; D, 茵芪三黄解毒汤低剂量组; E, 茵芪三黄解毒汤中剂量组; F, 茵芪三黄解毒汤高剂量组; E-cadherin, E-钙黏蛋白; Vimentin, 波形蛋白; N-cadherin, N-钙黏蛋白; TGF- β 1, 转化生长因子 β 1; α -SMA, α 平滑肌肌动蛋白。

图 1 各组小鼠肝组织 E-cadherin、Vimentin、N-cadherin、TGF- β 1、 α -SMA 蛋白电泳图Figure 1 Protein electrophoresis of E-cadherin, Vimentin, N-cadherin, TGF- β 1, and α -SMA in liver tissue of mice in each group

的物质,能够通过调节免疫、改善肝脏微循环、降低门静脉压力、促进受损肝细胞修复、减少胶原沉积、抑制胶原降解、促进胶原降解等发挥抗肝纤维化的作用^[19],故本研究采用水飞蓟宾作为阳性对照药物。肝纤维化四项检查中,HA可反映肝内生成的纤维量及肝细胞受损状况^[20];LN为基底膜中特有的非胶原性结构蛋白,与肝纤维化活动程度呈正相关^[21];CIV反映基底膜胶原更新率,含量增高提示肝纤维化进展^[22];PCⅢ与肝纤维化形成的活动程度密切相关^[23]。因此,肝纤维化四项检查被视为细胞外基质的血清学标志。结果显示,与模型组相比,茵芪三黄解毒汤不同剂量组及水飞蓟宾组小鼠精神状态、毛发色泽及形态活动等一般情况有所恢复,并且茵芪三黄解毒汤中、高剂量组和水飞蓟宾干预后的小鼠肝脏超声结果显示肝脏灰度值减小,提示茵芪三黄解毒汤中、高剂量和水飞蓟宾能够改变肝组织力学性质(肝脏硬度)。天狼猩红染色提示,茵芪三黄解毒汤各剂量组和水飞蓟宾组干预后的小鼠肝组织中胶原纤维沉积明显减少,其中茵芪三黄解毒汤中剂量作用显著;肝功能及肝纤四项结果亦显示,茵芪三黄解毒汤中剂量组在降低ALT、AST、HA方面均优于茵芪三黄解毒汤低剂量组和水飞蓟宾组,在降低LN、PCⅢ水平方面优于水飞蓟宾组,在降低CIV方面优于茵芪三黄解毒汤低剂量组。以上结果提示茵芪三黄解毒汤和水飞蓟宾均能减少ECM沉积、降低肝脏硬度、改善肝脏功能,且以茵芪三黄解毒汤中剂量组效果最优。

EMT是一种高度保守的生物学过程,在此过程中上皮细胞标志物E-cadherin表达逐渐减少,间质细胞标志物N-cadherin、Vimentin表达不断增多^[18]。本研究结果显示,与空白组相比,模型组E-cadherin蛋白相对表达量下降,Vimentin、N-cadherin蛋白相对表达量增多,造血干细胞活化标志物 α -SMA、TGF- β 1表达量亦上升。与模型组相比,茵芪三黄解毒汤各剂量组和水飞蓟宾组小鼠肝组织中E-cadherin水平升高,Vimentin、N-cadherin、 α -SMA、TGF- β 1蛋白表达量均下降,提示茵芪三黄解毒汤及水飞蓟宾均可抑制肝组织中的上皮间质转化过程,减少ECM沉积,改善疾病进程。并且茵芪三黄解毒汤中、高剂量组改善优于水飞蓟宾组,尤以茵芪三黄解毒汤中剂量组效果最优。

综上所述,茵芪三黄解毒汤对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠损伤肝脏具有改善作用,可能通过调控肝脏硬度抑制肝脏EMT过程,逆转肝纤维化损伤,

改善受损肝脏。本研究初步从机械力学角度探讨了茵芪三黄解毒汤对肝纤维化小鼠肝组织硬度调节及EMT过程作用机制,为临床治疗提供了一定的理论依据,但本研究仅从动物实验证实茵芪三黄解毒汤调控肝组织硬度及EMT过程的有效性,关于其调控肝组织力学性质与抑制EMT过程的潜在关系及具体分子机制尚不明确,后期需采用多学科交叉手段对中医药抗肝纤维化的作用机制进行深入阐述。

参考文献

- [1] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-166.
- [2] ROEB E. Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects) [J]. *Matrix Biol*, 2018; 463-473. doi: 10.1016/j.matbio.2017.12.012.
- [3] HAN X, WU Y, YANG Q, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors in the pathogenesis and therapies of liver fibrosis [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 222: 107791. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107791.
- [4] 王永娟, 谢肖立, 姜慧卿. 肝纤维化中上皮间质转化的调控及靶向治疗的研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(1): 165-168.
- [5] OAKLEY F. Interrogating mechanisms of liver fibrosis with omics [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(2): 89-90.
- [6] BÖTTCHER K, PINZANI M. Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 3-8. doi: 10.1016/j.addr.2017.05.016.
- [7] 王栋平. 茵芪三黄解毒汤联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎的临床研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [8] 魏超, 江鸿, 邓先桂, 等. 茵芪三黄解毒汤联合常规西医治疗慢性乙型肝炎肝胆湿热证患者的疗效观察[J]. *实用临床医药杂志*, 2021, 29(5): 37-40, 51.
- [9] 王琦, 张明香, 孙胜男. 茵芪三黄解毒汤治疗乙型肝炎纤维化疗效机制的理论探讨[J]. *实用中医内科杂志*, 2021, 35(5): 12-15.
- [10] 刘甦苏, 霍桂桃, 王辰飞, 等. 四氯化碳诱导近交系C57BL/6小鼠建立肝纤维化模型[J]. *实验动物科学*, 2019, 36(4): 28-30, 34.
- [11] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1204.
- [12] 刘定, 潘富珍, 杨沈秋, 等. 肝脾肾同治法重塑自噬稳态抗肝纤维化的理论探讨[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(11): 1521-1525.
- [13] MITTEN E, BAFFY G. Mechanotransduction in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *J*

- Hepatology, 2022, 77(6):1642–1656.
- [14] VINING K, MOONEY D. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration[J]. Nat Rev Molec Cell Biol, 2017, 18(12):728–742.
- [15] VILLESSEN IF, DANIELS SJ, DLEEMING DJ, et al. Review article: the signalling and functional role of the extracellular matrix in the development of liver fibrosis [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2020, 52(1):85–97.
- [16] MUNKER S, WU YL, DING HG, et al. Can a fibrotic liver afford epithelial-mesenchymal transition? [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(26):4661–4668.
- [17] XU X, ZHANG Y, WANG X, et al. Substrate stiffness drives epithelial to mesenchymal transition and proliferation through the NEAT1-Wnt/ β -Catenin pathway in liver cancer[J]. Internat J Mol Sci, 2021, 22(21):12066.
- [18] DONG Y, ZHENG Q, WANG Z, et al. Higher matrix stiffness as an independent initiator triggers epithelial-mesenchymal transition and facilitates HCC metastasis [J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1):112.
- [19] 宋维芳. 核转录因子- κ B 在实验性肝纤维化过程中的意义及水飞蓟宾抗肝纤维化作用机制的研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2009.
- [20] CAVIGLIA G, CIANCIO A, ROSSO C, et al. Non-invasive methods for the assessment of hepatic fibrosis: transient elastography, hyaluronic acid, 13C-aminopyrine breath test and cytokeratin 18 fragment[J]. Ann Hepatol, 2013, 13(1):91–97.
- [21] 赵治凤, 贾秋龙. 肝纤维化四项联合检测对 410 例慢性肝炎诊断的临床意义[J]. 中国民康医学, 2012, 24(7):798–799.
- [22] 程红春. 血清 IV-C 水平检测对肝病患者肝纤维化的诊断价值[J]. 实用医药杂志, 2014, 31(7):618.
- [23] KARNA E, SZOKA L, PALKA J. The mechanism of hydralazine-induced collagen biosynthesis in cultured fibroblasts[J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2013, 386(4):303–309.

Effects of *Yinqi Sanhuang Jiedu Decoction* (茵芪三黄解毒汤) on Liver Hardness and Epithelial Mesenchymal Transition in Hepatic Fibrosis Model Mice

WANG Ning, LYU Wenliang, WU Qingjuan

Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of compound *Yinqi Sanhuang Jiedu Decoction* (茵芪三黄解毒汤, YSJD) against the progression of hepatic fibrosis (HF). **Methods** Thirty-eight C57BL/6J mice were randomly divided into blank group, model group, silybin group and low-, medium- and high-dose YSJD groups, with eight mice in the model group and six mice each in other groups. Except for the blank group, all mice were injected intraperitoneally with 10% carbon tetrachloride (CCl_4) to establish a HF model, twice a week for 8 weeks. The drug intervention started one week after the first modeling; the low-, medium- and high-dose YSJD groups were given 8.325, 16.65 and 33.3 g/(kg·d) of YSJD suspension by gavage, respectively, while the silybin group was given 55 mg/(kg·d) of silybin suspension by gavage, and the blank group and the model group were given 0.2 ml normal saline by gavage, all for 8 weeks. The liver hardness of living mice was observed using a small animal ultrasound detector, and grey-scale ultrasound was recorded. The liver tissue was observed by Sirius scarlet staining, and the proportion of collagen fiber deposition was calculated. Liver function indicators including alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), and serum laminin (LN), hyaluronic acid (HA), pre-collagen type III (PCIII) and collagen type IV (CIV) were also detected. The protein expression of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), Vimentin, E-cadherin, α smooth muscle actin (α -SMA) in liver tissue were detected. **Results** Compared to the blank group, the model group showed increased gray value, collagen deposition, serum ALT, AST, HA, LN and PCIII levels, decreased expression of E-cadherin, and increased expression of N-cadherin, α -SMA, Vimentin and TGF- β 1 in liver tissues ($P < 0.05$). Compared to the model group, the ultrasonic gray value and the proportion of collagen fiber deposition in liver of silybin group and YSJD medium- and high-dose groups decreased, and the serum ALT, AST, LN, HA and PC III levels decreased. Compared to the model group, the expression of E-cadherin in liver tissues of silybin group and all three YSJD groups increased, while the expressions of N-cadherin, Vimentin, TGF- β 1 and α -SMA decreased ($P < 0.05$), and among them, most improvements were seen in the medium-dose YSJD group ($P < 0.05$). **Conclusion** The effect of YSJD on significantly reducing the extent of HF in mice caused by CCl_4 may be related to its ability to regulate liver hardness and inhibit the occurrence of epithelial mesenchymal transition in mice.

Keywords hepatic fibrosis; *Yinqi Sanhuang Jiedu Decoction* (茵芪三黄解毒汤); liver hardness; epithelial mesenchymal transition

(收稿日期: 2023-03-01; 修回日期: 2023-05-26)

[编辑: 邓媛]