DOI:10.16016/j.1000-5404.202010046

益气法制剂对肝纤维化大鼠的治疗作用及其分子机制

高 霞,程俊雄,曹文富 400016 重庆,重庆医科大学中医药学院

[摘要] **目的** 探讨益气法制剂对肝纤维化大鼠的治疗作用及分子机制。**方法** 7周龄Wistar大鼠,建立肝纤维化模型大鼠前,选取10只为正常对照组;建模成功后,分为模型组($n=10$)、秋水仙碱组($n=9$)、益气法制剂组($n=9$),后两组分别给予相应药物[秋水仙碱制剂0.45 mg/kg,益气法制剂(黄芪、白术)3.6 g/kg],模型组和正常对照组大鼠给予等量生理盐水灌胃,每天1次,连续治疗12周。Western blot检测肝组织中α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、磷酸化的细胞外信号调节激酶(p-ERK1/2)、磷酸化P38丝裂原活化蛋白酶(p-p38)相关指标表达。RT-qPCR检测肝组织中单核细胞趋化蛋白-1a(MCP-1a)指标的表达。免疫组化检测肝组织中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)指标表达。**结果** Western blot结果显示,与正常对照组相比,模型组的α-SMA、p-ERK1/2的表达均升高($P<0.05$),p-p38的表达差异无统计学意义;与模型组比较,益气法制剂组和秋水仙碱组的α-SMA、p-p38的表达均降低($P<0.05$),秋水仙碱组p-ERK1/2的表达降低($P<0.05$),益气法制剂组p-ERK1/2的表达差异无统计学意义,表明益气法制剂可通过抑制α-SMA、p-ERK1/2、p-p38的表达缓解肝纤维化的进程。RT-qPCR结果显示,与正常对照组相比,模型组的MCP-1a的表达上调($P<0.05$);与模型组相比,益气法制剂组和秋水仙碱组的MCP-1a表达下调($P<0.05$),提示益气法制剂可能通过下调MCP-1a的表达,缓解肝纤维化的进程。免疫组化结果显示,MMP-2在正常对照组明显表达,模型组中可见MMP-2的表达,与模型组相比,益气法制剂组和秋水仙碱组MMP-2的表达上调;MMP-9的表达在正常对照组可见,与正常对照组相比较,模型组上调,与模型组比较,益气法制剂组上调;TIPM-1正常对照组表达较少,与正常对照组相比,模型组的表达有所上调,与模型组相比较,益气法制剂组和秋水仙碱组均下调。**结论** 益气法制剂可改善大鼠肝纤维化,可能通过抑制MCP-1来减少炎症细胞的释放,进而抑制ERK1/2、p38信号通路的激活,减少磷酸化p-ERK1/2、p-p38介导信号由胞浆向胞核传递,从而抑制TIMP-1的表达,促进MMP-2、MMP-9的释放,增加ECM降解,减少沉积,逆转肝纤维化。

[关键词] 益气法制剂;黄芪;白术;肝纤维化

[中图法分类号] R285.5;R289.5;R575.2 [文献标志码] A

Efficacy and molecular mechanism of Qi-Tonifying preparations in rats with liver fibrosis

GAO Xia, CHENG Junxiong, CAO Wenfu College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the therapeutic effect and molecular mechanism of Qi-Tonifying preparations (*Astragalus membranaceus* and *Atractylodes macrocephala*) on hepatic fibrosis in rats. **Methods** Wistar rats (7 weeks old) were divided into normal control ($n=10$), model group ($n=10$), colchicine group (0.45 mg/kg, $n=9$), and Qi-Tonifying preparation group (3.6 g/kg, $n=10$). Corresponding drugs or

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573860)

[通信作者] 曹文富,E-mail:caowenfu9316@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

normal saline were given to the rats intragastrically, once a day, for continuous 12 weeks. Western blotting was used to detect the expression of α-smooth muscle actin (α-SMA), phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) and phosphorylated p38 mitogen activated protease (p-p38) in the liver tissues. RT-qPCR was employed to detect the expression of monocyte chemoattractant protein-1a (MCP-1a) in the liver tissues. Immunohistochemical assay was adopted to detect the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9 and metalloproteinase tissue inhibitor-1 (TIMP-1) in the liver tissues. **Results** The results of Western blotting showed that the expression levels of α-SMA and p-ERK1/2 were significantly higher in the model group than the normal control group ($P<0.05$), but no such difference was seen in that of p-p38 ($P>0.05$). Compared with the model group, the expression levels of α-SMA and p-p38 were decreased in the Qi-Tonifying preparation group and the colchicine group ($P<0.05$), and that of ERK1/2 was decreased obviously in the colchicine group ($P<0.05$), but the level was similar in the Qi-Tonifying preparation group ($P>0.05$). These results suggested that Qi-Tonifying preparations alleviated the progression of liver fibrosis by inhibiting the expression of α-SMA, p-ERK1/2 and p-p38. RT-qPCR results showed that the expression of MCP-1a was significantly increased in the model group than the normal control group ($P<0.05$), and was down-regulated in the Qi-Tonifying group and the colchicine group than the model group ($P<0.05$). Qi-Tonifying preparations alleviated the progression of liver fibrosis by down-regulating MCP-1a. Immunohistochemical assay showed that MMP-2 was obviously expressed in the normal control group, and observed in the model group. Its expression was stronger in the Qi-Tonifying group and the colchicine group than the model group. The expression of MMP-9 was mildly observed in the normal group, and was up-regulated in the model group than the normal group, but down-regulated in the Qi-Tonifying group and the colchicine group when compared with the model group. **Conclusion** Qi-Tonifying preparations can improve liver fibrosis in rats, and may reduce the release of inflammatory cells by inhibiting MCP-1, thereby suppressing the activation of ERK1/2 and p38 signaling pathways and reducing phosphorylated p-ERK1/2, P-p38 mediated signal transmission from the cytoplasm to the nucleus, and then inhibits the expression of TIMP-1, promotes the release of MMP-2 and MMP-9, increases ECM degradation, reduces deposition, and finally, reverses liver fibrosis.

[**Key words**] Qi-Tonifying preparations; *Astragalus membranaceus*; *Atractylodes macrocephala*; liver fibrosis

Supported by the General Project of National Natural Science Foundation of China (81573860). Corresponding author: CAO Wenfu, E-mail: caowenfu9316@163.com

肝纤维化是肝脏对各种原因所致肝损伤的创伤愈合反应,表现为肝内结缔组织增生与沉降。肝纤维化类属于中医的“癥积”“胁痛”等病证范畴,基本病机是“气虚、血瘀痰凝互结”[1],其中正气虚为本,痰瘀互结为病理产物,故确立益气化瘀化痰为基本治法。黄芪是临床常用中药,其主要成分黄芪多糖具有提高免疫力、抗病毒、抗菌、抗氧化、调节血糖、保肝护肾等多种药效作用,有研究表明黄芪能有效抑制 CCl4 诱导大鼠肝纤维化[2]。白术能维持肝脏组织结构完整,提高肝脏抗氧化功能[3]。

有研究表明,中医药针对早期慢性肝病(慢性肝炎、肝纤维化)的患者,在逆转其病程发展或者改善晚期肝病患者终末期生存质量等方面优于西医保守治疗。黄芪和白术是常见中药材,但两者联合用药对肝纤维化治疗的作用机制知之甚少。为了探究黄芪和白术联合用药对肝纤维化大鼠的保护作用和机制,本研究以黄芪、白术为主要组分研制了益气法制剂,旨在以 ERK1/2、p38MAPK 通路为切入点探讨其分子机制,为肝纤维化中医临床益气治法选药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 同批次的 7 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,体质量 180~220 g,购于重庆医科大学实验动物中心。动物生产许可证:SCXK(渝) 2012-0001。在恒温室(22±2)℃分笼饲养,每笼 5 只,自由进食(标准饲料和自来水)。所有动物实验程序严格遵照国家动物实验管理的政策法规和实验动物伦理福利原则,

经重庆医科大学医学研究伦理委员会批准(2015 年 3 月 5 日)。

1.1.2 药品与试剂 益气法制剂组方:黄芪 30 g、白术 10 g(生药购于重庆医科大学附属第一医院中药房),共 40 g,加入 200 mL 蒸馏水,武火加热至沸腾,然后文火加热 1 h,期间不断搅拌,3 层纱布过滤得滤液;在药渣中再加入 200 mL 蒸馏水,同法煎煮过滤,共 2 次;混合滤液并加热浓缩成益气法口服制剂 20 mL,每毫升含生药 2 g,4 ℃冰箱保存备用。高脂低蛋白饮食饲料配方:20%猪油+79.5%玉米粉+0.5%胆固醇(北京科澳协力饲料有限公司)。其他药物和试剂包括:注射用 CCL4(成都市科龙化工试剂厂);秋水仙碱(云南植物药业有限公司);EDTA(美国 Sigma),Tris 碱(上海生工),α-SMA(兔来源,中国 Protein tech),p-p38(兔来源,美国 CST),p-ERK1/2(兔来源,美国 CST),GAPDH(鼠来源,美国 Abcam);二抗:山羊抗兔、山羊抗鼠(美国 Sigma);PVDF 膜(Bio-Rad),引物(Western Biotechnology),DEPC(美国 Sigma),RNA 提取试剂盒(日本 Takara),氯仿(上海化学试剂公司),异丙醇(上海化学试剂公司),RT 试剂(Western Biotechnology),荧光定量 PCR 试剂(Western Biotechnology),SYBR green I(Western Biotechnology),HRP 标志的二抗(山羊抗兔,美国 Abcam),DAB(北京中杉),二甲苯(国药集团),苏木精(南京建成)。

1.1.3 仪器 垂直板电泳转移装置(美国 Bio-Rad),Trans-Blot 转膜装置(美国 Bio-Rad),图像分析系统(Lab works ™Analysis),电泳仪(美国 Bio-Rad),多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher),Tannon-4200 凝胶成像系统(中国天能 Tan non),低温高速离心机(GS-15R)(美国 Beckman),电子酸度计(美国 Beckman),实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI Ste pone plus),电泳仪(美国 Bio-Rad),凝胶成像仪稳压 DNA 电泳仪(美国 Tianneng),GDS8000 凝胶扫描系统(美国 UCP),超净工作台(苏州净化设备公司),电热压力蒸汽消毒器(YXQ-LS-100A)(上海博讯实业有限公司),倒置显微镜(CK-40)(日本 OLYMPUS),切片机(RM2235)(德国 Leica),展片机(HI1210)(德国 Leica),烤片机(HI1210)(德国 Leica)。

1.2 *方法*

1.2.1 模型及药物制备 7 周龄 Wistar 大鼠 60 只适应性喂养 1 周后,选取 10 只为正常对照组,其余 50 只大鼠建立肝纤维化模型[4]。造模期间死亡 19 只,剩下 31 只,随机挑选 3 只大鼠检验成模。本课题组已有相关研究表明,SD 大鼠造模后,与正常对照组相比,肝组织中 Col Ⅰ、PⅢNP、FN 含量显著升高[4],经此方法建模后可造成肝纤维化。28 只造模后的大鼠完全随机法分成 3 组:模型组 10 只、秋水仙碱组 9 只、益气法制剂组 9 只,给予药物灌胃治疗。根据《药理实验方法学》体表面积折算法计算大鼠用药剂量,成人体质量以 70 kg 计算,大鼠等效剂量为成人 6.3 倍,公式为药物质量/70 kg×6.3。由此可得大鼠各制剂剂量为益气法制剂 3.6 g/kg,秋水仙碱制剂 0.45 mg/kg。模型组和正常对照组大鼠给予等量生理盐水灌胃,每天 1 次,连续治疗 12 周。末次给药后,禁食不禁水 24 h,各组大鼠用 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,取左下最大叶肝脏边缘 2 cm 处组织,一半放入 4%多聚甲醛溶液中固定,余下标本 2/3 用于提取蛋白,1/3 于液氮中冷冻后再转移到-70 ℃冰箱中保存备用。

1.2.2 病理形态学观察 肝脏组织 4%多聚甲醛固定 48 h,常规脱水,石蜡包埋、切片,厚度 4 μm,HE、Masson 染色后,光学显微镜下观察肝组织病理形态变化。

1.2.3 Western blot 检测肝组织中α-SMA、p-ERK1/2、p-p38 表达 将肝组织剪碎,1 000 mg 组织加入 1 mL RIPA 裂解液,12 000 r/min,离心 5 min,收取上清液,得到组织蛋白液样本,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,按照上样量计算后,加入 5×上样缓冲液,混匀,煮沸 7 min,取煮沸后变性的蛋白上样,SDS-PAGE 电泳,加入 4 μL 预染 marker,加入肝组织样本,开始电泳,开始时 100 V,进入分离胶层后,改用 120 V 电压。采用湿转法进行转膜,按照纤维棉-滤纸-PVDF 膜-SDS-PAGE 凝胶-滤纸-纤维棉,像夹三明治一样夹紧,电流 200 mA,视蛋白分子量大小确定转膜时间,将 SDS-PAGE 上的蛋白转移到 PVDF 膜上,置于封闭液中(5%脱脂奶粉,60 min),用 PBST 洗膜 3 次,加入一抗,4 ℃冰箱,孵育过夜。次日用二抗孵育,用 TBST 洗膜 3 次。将 TBST 洗好的膜,放于保鲜膜上,保持平整,加入适量 ECL 发光液,固定于暗盒中,使 PVDF 膜的正面向上,取胶片,曝光,显影,再用清水洗去表面的显影液,再定影,保留底片进行光密度分析。

1.2.4 RT-qPCR 检测肝组织中 MCP-1a 表达 取冰冻保存的肝脏组织样本约 50 mg,用 TRIzol 法提取总 RNA;检测总 RNA 浓度及纯度后按逆转录试剂盒操作步骤配制反应体系,置于 T100 反应 PCR 仪中进行逆转录反应,按照 SYBR Green 法配制 Mix 及反应体系后上机进行 RT-qPCR 反应。反应结束后,由通过 CFXmanager3.1 软件读取 Ct 值,采用相对定量法分析,待测基因 mRNA 相对表达量=$2^{-\Delta Ct}$,公式为:ΔCt=Ct(target gene)-Ct(GAPDH)。上下游引物序列:

MCP-1a(234 bp),正义链 5′-TCTCTCACGCCAGCACTGACC-3′,反义链 5′-GCTTGAGGTGGTTGTGGAAA-3′;GAPDH(139 bp),正义链 5′-GAAGACGCCAGACTCCACGAC-3′,反义链 5′-CCACGGCAAGTTCAACGGC-3′。

1.2.5 免疫组化检测肝组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 相关指标表达 肝脏组织切片依次经过 60 ℃烤箱、二甲苯脱蜡、酒精梯度水化、过化氢溶液、热修复抗原、加血清封闭液、加一抗等步骤,4 ℃冰箱过夜次日取出切片 PBS 冲洗 3 次,依次加二抗(山羊抗兔),DAB 染色,苏木精复染,饱和碳酸锂返蓝,梯度 75%乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。显微镜于 400 倍镜下观察。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。数值变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间差异的比较采用单因素方差分析,其组间两两比较采用 LSD-t 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

正常对照组大鼠体质量增加明显,进食好,皮毛光泽度好,反应灵敏,活动自如。模型组大鼠体质量减轻,精神萎靡,进食较少,皮毛粗糙,活动减少,动作迟缓。益气法制剂组和秋水仙碱组大鼠一般情况较模型组明显改善。

2.2 各组大鼠肝组织病理学观察

HE 染色显示:正常对照组大鼠肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞呈多边形,无变性坏死,有 1~2 个圆形细胞核,核仁明显,胞质丰富;模型组大鼠肝小叶结构紊乱,肝细胞胞浆稀疏,细胞核被挤压到细胞边缘,大量炎性细胞浸润。益气法制剂组和秋水仙碱组炎症细胞减少,部分肝细胞形态结构正常,可见正常肝小叶结构,见图 1。

Masson 染色显示:正常对照组肝小叶结构完整,汇管区有少量疏松纤维结缔组织沉积。模型组表现为肝小叶结构破坏,肝内胶原纤维组织增生明显,连接成片,分割正常肝脏组织结构,形成假小叶,肝纤维化程度高,汇管区扩大并失去正常形态。益气法制剂组和秋水仙碱组未见明显纤维间隔,仅在中央静脉孔及汇管区有纤维沉积,见图 1。

2.3 益气法制剂显著改善 CCL4 诱导的大鼠肝纤维化

MMP-2、MMP-9 在正常对照组明显表达,模型组中可见 MMP-2、MMP-9 的表达显著升高($P<0.05$);与模型组相比,益气法制剂组 MMP-2、MMP-9 的表达下调($P<0.05$),秋水仙碱组 MMP-2、MMP-9 的表达下调,但无统计学差异;TIMP-1 在正常对照组明显表达,模型组中可见 TIMP-1 的表达升高,但无统计学差异;与模型组相比,益气法制剂组和秋水仙碱组 TIMP-1 的表达有下降趋势,但无统计学差异,见图 2。

2.4 益气法制剂抑制α-SMA、p-ERK1/2、p-p38 的表达

与正常对照组相比,模型组的α-SMA、p-ERK1/2、p-p38 的表达均升高($P<0.05$);与模型组比较,益气法组和秋水仙碱组的α-SMA、p-p38 的表达均降低,差异有统计学意义($P<0.05$),秋水仙碱组 p-ERK1/2 的表达降低($P<0.05$),益气法制剂组 p-ERK1/2 的表达有下降趋势,但无统计学差异,表明益气法制剂可通过抑制α-SMA、p-ERK1/2、p-p38 的表达缓解肝纤维化的进程,见图 3。

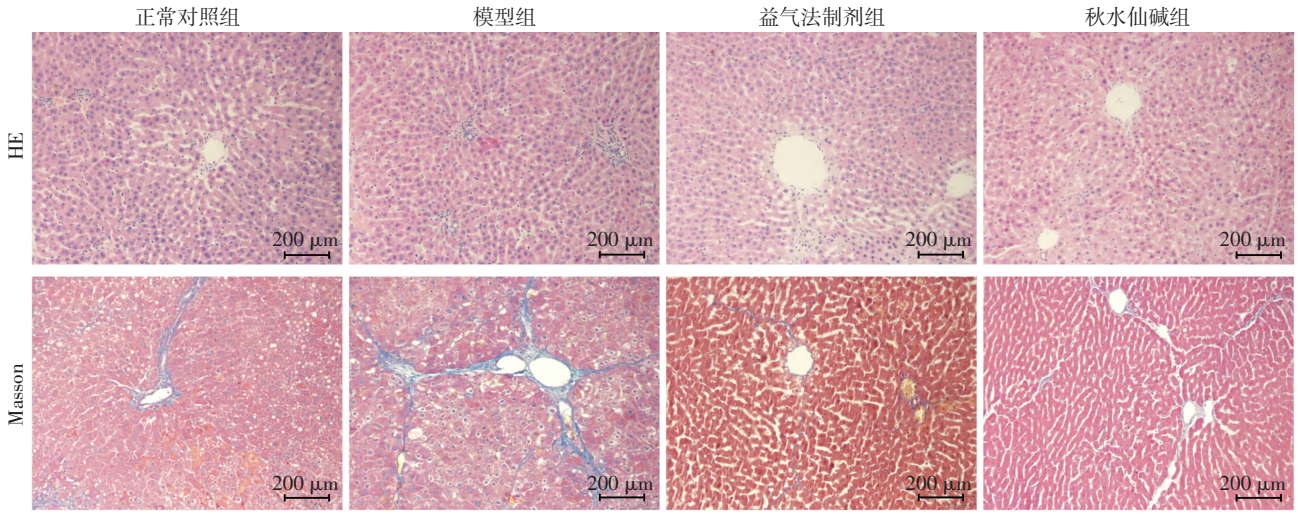
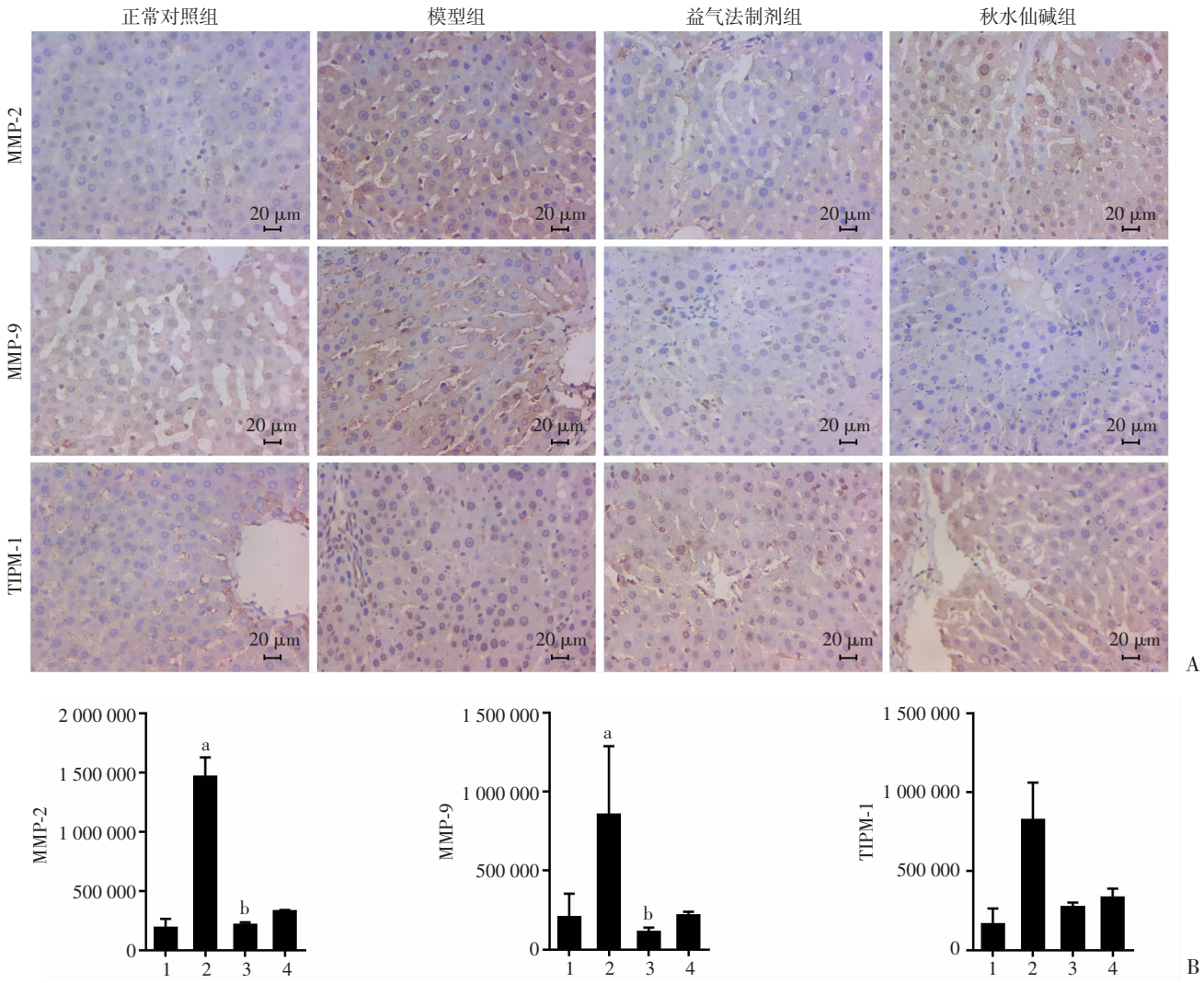
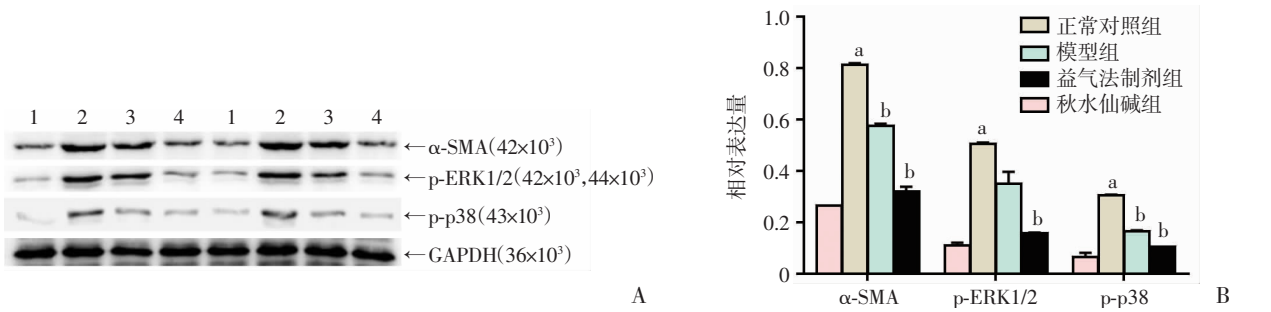


图 1 益气法制剂和秋水仙碱显著改善 CCL4 诱导的大鼠肝纤维化程度



A:免疫组化检测各组中 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 的表达;B:半定量分析;1:正常对照组;2:模型组;3:益气法制剂组;4:秋水仙碱组;a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

图 2 免疫组化检测各组大鼠肝组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 表达

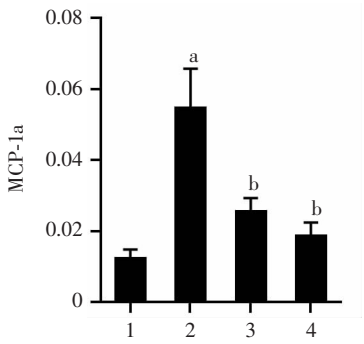


A:Western blot 检测结果;1:正常对照组;2:模型组;3:益气法制剂组;4:秋水仙碱组;B:半定量分析;a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

图 3 Western blot 检测各组肝组织中α-SMA、p-ERK1/2、p-p38 蛋白表达

2.5 益气法制剂可抑制 MCP-1a 的表达

RT-qPCR 结果显示,与正常对照组相比,模型组的 MCP-1a 表达上调($P<0.05$);与模型组相比,益气法制剂组和秋水仙碱组的 MCP-1a 表达下调($P<0.05$),益气法制剂可能通过下调 MCP-1a 的表达,缓解肝纤维化的进程,见图 4。



1:正常对照组;2:模型组;3:益气法制剂组;4:秋水仙碱组;a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

图4 RT-qPCR检测各组大鼠肝组织中MCP-1a基因的表达

3 讨论

本研究采用CCL4诱导的肝纤维化动物模型,是公认的经典肝纤维化造模方法,被广泛应用于肝纤维化的信号通路及分子调控机制、组织病理改变以及抗纤维化药物筛选等方面的体内研究[5]。肝纤维化是一种慢性肝损伤导致的肝脏病理改变,肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)的活化是肝纤维化发生的中心环节[6]。抑制转化生长因子(transforming growth factor beta1,TGF-β1)生成能够改善肝纤维化[4]。TGF-β1主要通过Smad和MAPKs这两个效应相反的细胞内信号转导通路发挥作用[7]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPKs)信号转导通路存在于大多数细胞内,是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,主要包括ERK1/2通路、p38MAPK通路、JNK/SAPK通路、ERK5通路等[8],其异常表达是炎症反应时炎症介质和相关细胞因子的主要信号通路[9]。

肝纤维化的逆转过程十分复杂,影响因素众多,确切机制仍不甚明了。有研究表明黄芪可通过p38MAPK通路抑制肝纤维化的进程[2]。益气法制剂(黄芪、白术)可通过TGF-β1/Smad信号通路改善肝纤维化[10]。但以黄芪和白术联合的益气法制剂研究ERK1/2、p38MAPK通路对肝纤维化的机制很少,因此探讨以黄芪和白术联合的益气法制剂对肝纤维化模型大鼠的治疗作用,并以ERK1/2、p38MAPK通路为切入点探讨其分子机制仍有重要意义。

α-SMA作为HSC活化的特有标志性蛋白,与HSC增殖、肝纤维化程度呈正相关,α-SMA可作为HSC是否激活的重要标志物[11]。黄芪的主要单体组分,如黄芪多糖通过保护肝细胞,抑制HSC活化,从而抑制CCL4所致肝纤维大鼠纤维化[12]。唐静等[13]发现黄芪汤可以减轻DMN诱导的肝纤维化,调节胆汁酸代谢酶抑制HSC沉积,且其作用优于它的化合物。MAPK通路活化相关的部分蛋白分子水平的变化也可影响α-SMA的表达[14]。本研究通过Western blot检测α-SMA发现,大鼠肝纤维化模型组的α-SMA表达上调,益气法制剂和秋水仙碱α-SMA的表达下调,表明肝纤维化模型成功建立,益气法制剂(黄芪、白术)可以抑制HSC活化,防止肝纤维化的进一步发展,与既往研究相符。

MCP-1a是一种主要的单核细胞趋化因子,在正常人的组织中有少量的表达,其主要的功能是对单核、巨噬细胞以及T1淋巴细胞具有趋化和激活作用。MCP-1a还可以直接引起溶酶体释放、过氧化物阴离子产生,参与肝细胞损伤[15]。在本研究中发现,与正常对照组相比,模型组MCP-1a的上调,表明MCP-1a在肝纤维化的发生中发挥了重要作用。与模型组相比,益气法制剂组和秋水仙碱组的MCP-1a表达下调,表明益气法制剂(黄芪、白术)可通过降低MCP-1a的表达,抑制单核、巨噬细胞以及T1淋巴细胞的激活及趋化,改善肝纤维化的发展。

ERK1/2信号通路是MAPKs通路中最早鉴定出来的一条。细胞受到外界刺激时,各种胞外信号与细胞膜上的受体结合,转入胞浆,通过Ras/Raf/MEK/ERK级联反应,使得ERK被磷酸化激活成为p-ERK1/2,发挥其生物学效应[16]。其中,p38 MAPK属于应激型MAPK,其活化形式为p-p38 MAPK。p38 MAPK是细胞内信号转导的关键枢纽,参与多种生理病理过程的调控,生理过程为:可以对细胞因子、热休克、紫外线、刺激做出应激反应,影响细胞的分化、增殖、迁移和凋亡等生命过程。病理过程为:一方面炎症因子可通过诱导巨噬细胞的活化,进而促进组织细胞的凋亡,激活p38 MAPK信号通路发挥作用;另一方面p38 MAPK的磷酸化促进核转录因子活化并转位向核区,进而刺激炎症因子的大量合成[17]。本研究通过Western blot检测发现,肝纤维化可导致p-ERK1/2和p-p38的表达升高,而益气法制剂和秋水仙碱可通过下调p-ERK1/2和p-p38的表达,进而逆转肝纤维化。因此可见,益气法制剂(黄芪、白术)可通过下调ERK1/2和P38信号通路的表达,抑制p-ERK1/2和p-p38磷酸化,进而逆转肝纤维化的进程。

肝纤维化的本质是细胞外基质(CEM)在肝内的过度沉积,这种过度沉积不仅是由于CEM合成增多,更大程度上是CEM降解减少引起的[18]。研究表明,基质金属蛋白酶(MMPS)及其组织抑制因子(TIMPs)在调整CEM过程中起重要作用。肝脏受损后,TIMP-1表达上调,对MMPs具普遍抑制作用,使ECM降解减

少,沉积增多,导致肝纤维化的形成[19]。机体在遭遇创伤后,大量炎性细胞聚集创区,最早以中性粒细胞到达创面,之后巨噬细胞、淋巴细胞等免疫细胞进一步到达创面,MMP-2 可由内皮细胞、间质细胞、T 细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和中性粒细胞等合成和分泌,MMP-9 则主要由炎性细胞(如 T 细胞和巨噬细胞)分泌,炎症早期释放的 TNF-α 和 IL-6 等炎性介质能够促进 MMP-2、MMP-9 的表达,而过表达的 MMP-2、MMP-9 可降解细胞外基质[20]。在本研究中发现,肝纤维化可导致 TIMP-1、MMP-2、MMP-9 表达明显上调,而益气法制剂组和秋水仙碱组可使 TIMP-1、MMP-2、MMP-9 的表达下调,说明益气法制剂可改善肝纤维化,与以上研究结果相符合;在正常大鼠肝组织 TIMP-1 的表达极低,在肝纤维化的发生、发展过程中,TIMP-1 表达逐渐增强,到肝硬化阶段达到高峰[21]。与本研究结果相符,说明益气法制剂(黄芪、白术)可以通过下调 TIMP-1、MMP-2、MMP-9 的表达,增加 ECM 降解,减少沉积,逆转肝纤维化。

综上所述,黄芪和白术联合的益气法制剂可改善大鼠肝纤维化,可能通过抑制 MCP-1 来减少炎症细胞的释放和趋化,进而抑制 ERK1/2、p38 信号通路的激活,减少磷酸化 p-ERK1/2、p-p38 介导信号由胞浆向胞核传递,从而抑制 TIMP-1、MMP-2、MMP-9 的表达,增加 ECM 降解,减少沉积,逆转肝纤维化,进而为黄芪和白术联合用药治疗肝纤维化提供科学依据。本研究中,益气法制剂组和秋水仙碱组只设计了 1 个剂量组,结果表明这个剂量的益气法制剂和秋水仙碱可改善大鼠肝纤维化,且效果较好。在后续的研究中可考虑增加 2~3 个剂量组,进一步说明量效关系,为临床用药提供更好的实验证据。

参考文献:

[1] 马继征, 张云, 陈兰羽, 等. 肝纤维化的中医病机认识及治则治法研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2014, 24(6): 381-382.
MA J Z, ZHANG Y, CHEN L Y, *et al*. Research on TCM pathogenesis and treatment of liver fibrosis[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2014, 24(6): 381-382.

[2] 李艳, 伊航, 蔡轶伦, 等. 黄芪总黄酮对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响[J]. 中成药, 2019. 41(7): 1710-1713.
LI Y, YIN H, CAI T L, *et al*. Effect of total flavonoids of astragalus on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats[J]. Chin Tradit Patent Med, 2019, 41(7): 1710-1713.

[3] 钱隆, 刘洋, 李冰心, 等. 白术多糖可能通过 Toll 样受体 4 信号通路缓解环磷酰胺诱导的雏鹅肝脏损伤[J]. 动物营养学报, 2019, 31(2): 764-774.
QIAN L, LIU Y, LI B X, *et al*. Polysaccharide of Atractylodes macrocephala koidz may alleviates liver injury induced by cyclophosphamide *via* toll-like receptor 4 signaling pathway in goslings[J]. Chin J Animal Nutr, 2019, 31(2): 764-774.

[4] 兰天, 曾志, 陈颖华. 栀子苷改善 CCl_4 引起的小鼠肝纤维化损伤的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(16): 1752-1755.
LAN T, ZENG Z, CHEN Y H. Geniposide attenuates liver fibrosis in CCl_4-induced mice[J]. J Third Mil Med Univ, 2013, 35(16): 1752-1755.

[5] KNOCKAERT L, BERSON A, RIBAULT C, *et al*. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver[J]. Lab Invest, 2012, 92(3): 396-410. DOI: 10.1038/labinvest.2011.193.

[6] 任昌镇,郝礼森. 肝星状细胞活化过程中的信号转导[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(3): 452-456. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.03.034.
REN C Z, HAO L S. Signal transduction involved in activation of hepatic stellate cells[J]. J Clin Hepatol, 2015, 31(3): 452-456. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.03.034.

[7] 章丽霞. 宫颈癌者治疗前后 HPV16/18、TGF-β1、ERK2 和 P-ERK1/2 的表达及其临床意义与相关性研究[D]. 南充:川北医学院,2011.
ZHANG L X. The expression of HPV16/18, TGF-β1, ERK2 and P-ERK1/2 before and after treatment in patients with cervical cancer and their clinical significance and correlation [D]. Nanchong: North Sichuan Medical College, 2011.

[8] 张志磊. 姜黄素对肝细胞癌 HepG2 中 p-ERK1/2、p-p38MAPK 表达的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2012.
ZHANG Z L. Effect of curcumin on the expression of p-ERK1/2 and p-p38MAPK in hepatocellular carcinoma HepG2[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2012.

[9] 梁灿鑫, 刘新伟, 刘玲, 等. 氢气对急性肺损伤大鼠肺组织 p38MAPK 活化的影响[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(8): 1211-1213, 1217. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.08.32.
LIANG C X, LIU X W, LIU L, *et al*. Effect of hydrogen inhalation on p38 MAPK activation in rats with lipopolysaccharideinduced acute lung injury[J]. J South Med Univ, 2012, 32(8): 1211-1213, 1217. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.08.32.

[10] 吴庆,曹文富,马琳,等. 益气法制剂对 CCL4 所致肝纤维化大鼠 TGF-β1/Smad 信号通路的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(4): 634-639. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.017.

WU Q, CAO W F, MA L, *et al*. Effects of Qi-Tonifying decoction on TGF-β1/Smad signaling pathway in rats with hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride[J]. Nat Prod Res Dev, 2018, 30(4): 634-639. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.017.

[11] 陈文玲, 王宪东, 陈文慧, 等. 健脾软肝方对四氯化碳致肝纤维化大鼠 α-SMA 及其 mRNA 表达的影响[J]. 世界中医药, 2018, 13(9): 2261-2267,2271.
CHEN W L, WANG X D, CHEN W H, *et al*. Effects of Jianpi Ruangan formula on the expression of α-SMA and m-RNA in rats with hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride[J]. World Chin Med, 2018, 13(9): 2261-2267, 2271.

[12] SONG Y N, ZHANG G B, LU Y Y, *et al*. Huangqi decoction alleviates dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis: An analysis of bile acids metabolic mechanism[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 189: 148-156. DOI: 10.1016/j.jep.2016.05.040.

[13] 唐静, 戴立里, 闵琳琳, 等. 肝纤维化中丹参素对 TGFβ1/Smads/ERK 信号通路的影响及其相互关系[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(11): 1159-1164.
TANG J, DAI L L, GUO L L, *et al*. Tanshinol inhibits TGFβ1/Smads/ERK signaling pathways in rat hepatic stellate cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2011, 33(11): 1159-1164.

[14] 张敏,吴万春. 阻断 RAAS 系统对肝纤维化大鼠枯否细胞 MCP-1 的影响[J]. 临床消化病杂志, 2009(4): 226-228. DOI: 10.3870/j.issn.1005-541X.2009.04.012.
ZHANG M, WU W C. Effect of RAAS on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rat with fibrotic liver[J]. Chin J Clin Gastroenterol, 2009(4): 226-228. DOI: 10.3870/j.issn.1005-541X.2009.04.012.

[15] CHEN P,HUANG L Y, ZHANG Y P, *et al*. SiRNA-mediated PIAS1 silencing promotes inflammatory response and leads to injury of cerulein-stimulated pancreatic acinar cells via regulation of the P38MAPK signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2010, 26(4): 619-626. DOI: 10.3892/ijmm_00000507.

[16] KIM D, HAYNES C L. The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression[J]. Analyst, 2013, 138(22): 6826. DOI: 10.1039/c3an01076g.

[17] OLASO E, FRIEDMAN S L. Molecular regulation of hepaticfibrogenesis[J]. J Hepatol, 1998, 29(5): 836-847. DOI: 10.1016/s0168-8278(98)80269-9.

[18] 黄冠华. 盐酸川芎嗪对慢性肝炎肝纤维化患者血清 TIMP-1 及瘦素水平的影响[J]. 中国执业药师, 2019,16(6): 107-109,112.
HUANG G H. Effect of Ligustrazine hydrochloride on serum TIMP-1 and leptin levels in patients with chronic hepatitis and hepatic fibrosis[J]. Chin J Rat Drug Use, 2019, 16(6): 107-109,112.

[19] 王海波, 俞为荣. MMP-2/MMP-9 在炎症中的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(17): 3120-3122.
WANG H B, YU W R. Advances in the research of MMP-2/MMP-9 in inflammation[J]. Med Recapitul, 2014, 20(17): 3120-3122.

[20] NIE Q H, CHENG Y Q, XIE Y M, *et al*. Inhibiting effect of antisense oligonucleotidesphosphorthioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2001, 7(3): 363-369. DOI: 10.3748/wjg.v7.i3.363.

[21] 赵正斌, 李俊峰, 张立婷, 等. 黄芪总皂苷对瘦素诱导的 HSC 增殖和 TIMP-1 上调的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2012, 33(5): 651-653,667.
ZHAO Z B, LI J F, ZHANG L T, *et al*. Effect of total saponins of Astragalus on HSC proliferation and TIMP-1 production induced by leptin[J]. J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci, 2012, 33(5): 651-653,667.

(**收稿**:2020-10-02;**修回**:2020-12-17)

(编辑 吴培红)