苗药地锦草对肝纤维化模型大鼠的改善作用及机制研究Δ

文维农[1*]，安祯祥[1,2#]，何远利[1,3]，吴　闵[1]，何　松[1,2]（1.贵州中医药大学第一临床医学院，贵阳　550001；2.贵州中医药大学第一附属医院消化内科，贵阳　550001；3.贵州中医药大学第一附属医院老年病科，贵阳　550001）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2025）04-0407-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.04.04

摘　要　目的　探讨苗药地锦草对肝纤维化（HF）模型大鼠的改善作用及机制。**方法**　将38只大鼠按随机数字表法分为对照组（生理盐水，n=7），模型组（生理盐水，n=7），地锦草低、中、高剂量组（0.675、1.35、2.70 g/kg，n=6）和水飞蓟宾组（阳性对照，18.9 mg/kg，n=6）。除对照组外，其余各组大鼠均腹腔注射四氯化碳构建HF模型。造模成功后，各组大鼠灌胃相应药物/生理盐水，每天1次，连续30 d。末次给药后，计算大鼠肝指数，观察其血清中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素17（IL-17）、IL-1β、IL-6、丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）、羟脯氨酸（HYP）水平，观察其肝组织形态与HF变化，检测其肝组织中转化生长因子β_1（TGF-β_1）、α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）水平，检测肝组织中α-SMA及TNF-α/NF-κB信号通路相关蛋白以及TNF-α、NF-κB p65 mRNA表达。**结果**　与模型组比较，各给药组大鼠肝指数，血清中TNF-α、IL-17、IL-1β、IL-6、ALT、AST、HYP水平，肝组织中NF-κB p65 mRNA相对表达量，肝组织中TNF-α、α-SMA蛋白表达水平及NF-κB p65蛋白磷酸化水平，以及地锦草中、高剂量组大鼠的肝组织中α-SMA、TGF-β_1表达水平和地锦草高剂量组大鼠肝组织中阳性染色百分比、TNF-α mRNA相对表达量均显著降低（P<0.05或P<0.01）；各给药组大鼠肝组织中IκBα蛋白表达水平均显著升高（P<0.05或P<0.01）；各给药组大鼠肝组织病理变化及HF程度均有不同程度改善。**结论**　地锦草可能通过抑制TNF-α/NF-κB信号通路激活来缓解大鼠HF。

关键词　地锦草；肝纤维化；TNF-α/NF-κB信号通路；苗药

Ameliorative effects and mechanisms of Miao medicine *Euphorbia humifusa* on hepatic fibrosis model rats

WEN Weinong[1], AN Zhenxiang[1,2], HE Yuanli[1,3], WU Min[1], HE Song[1,2]（1. The First Clinical Medical College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China; 2. Dept. of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China; 3. Dept. of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the ameliorative effects and mechanisms of Miao medicine *Euphorbia humifusa* on hepatic fibrosis (HF) model rats. **METHODS** Thirty-eight rats were randomly assigned according to a random number table into control group (normal saline, n=7), model group (normal saline, n=7), *E. humifusa* low-, medium- and high-dose groups (0.675, 1.35, 2.70 g/kg, n=6), and silybin group (positive control, 18.9 mg/kg, n=6). All groups except the control group were subjected to HF induction via intraperitoneal injection of carbon tetrachloride. After modeling, rats were administered their respective drugs/normal saline by gavage, once a day, for 30 days. At the last medication, the liver index was calculated, and serum levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-17 (IL-17), IL-1β, IL-6, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), and hydroxyproline (HYP) were measured. Liver morphology and HF changes were observed. Levels of transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1) and α-smooth muscle actin (α-SMA), as well as the expressions of α-SMA, proteins related to TNF-α/NF-κB signaling pathway, mRNA expressions of TNF-α and NF-κB p65 in liver tissue were determined. **RESULTS** Compared with model group, liver index, serum levels of TNF-α, IL-17, IL-1β, IL-6, ALT, AST and HYP, relative expression of NF-κB p65 mRNA, and the levels of TNF-α and α-SMA proteins and

Δ基金项目　国家自然科学基金项目（No.82160893，No.81760865）；国家中医药管理局第五批全国中医临床优秀人才研修项目（No.国中医药人教函〔2022〕1号）；贵州省卫生健康委科学技术基金项目（No.gzwkj2024-120）；贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目（No.QZYY-2024-014）；贵州中医药大学中医脾胃病科技创新人才团队建设项目（No.贵中医TD合字〔2022〕005号）

***第一作者**　博士研究生。研究方向：中医药、民族医药防治消化系统疾病的基础及临床。E-mail：1018458981@qq.com

#通信作者　主任医师，教授，博士生导师，博士。研究方向：中医药、民族医药防治消化系统疾病的基础及临床。E-mail：407206115@qq.com

phosphorylated NF-κB p65 in liver tissues of rats from administration groups, the expressions of α-SMA and TGF-β_1 in liver tissue of rats from *E. humifusa* medium-dose and high-dose groups, as well as positive staining percentage and mRNA expression of TNF-α in liver tissue of rats from *E. humifusa* high-dose group were all decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); IκBα protein expression from administration groups was significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Pathological changes and the degree of HF in the liver tissues of rats from administration groups were ameliorated to various extents. **CONCLUSIONS** *E. humifusa* may alleviate HF in rats by inhibiting the activation of the TNF-α/NF-κB signaling pathway.

KEYWORDS *Euphorbia humifusa*; hepatic fibrosis; TNF-α/NF-κB signaling pathway; Miao medicine

肝纤维化（hepatic fibrosis，HF）是指在各种致病因素的作用下使肝脏受到损伤，从而激活静止状态的肝星状细胞（hepatic stellate cell，HSC），使HSC大量增殖、转化以及细胞外基质（extracellular matrix，ECM）过度沉积和异常分布，最后形成纤维瘢痕的一种病理过程[1]。HF是众多慢性重症肝病的共同病理基础，如果不加以防治会进一步发展为肝硬化，甚至肝癌[2-3]。研究指出，虽然HF是可逆的，但目前没有批准的可用于抗HF的药物[4]；另有研究指出，肝脏疾病相关的死亡率会随着HF的加剧而呈指数增长[2]。因此，对HF进行有效干预显得尤为重要。

地锦草为大戟科植物地锦 *Euphorbia humifusa* Willd. 或斑地锦 *Euphorbia maculata* L. 的干燥全草，归肝、胃、大肠经，具有清热解毒、凉血止血、活血化瘀、利湿退黄的功效[5]。地锦草始载于《嘉裕本草》，为我国贵州苗族常用药[5]，又被称为“地瓣草”（兴义）、“斑鸠窝”（贵阳）”、“倒欠草”（铜仁）。在国医大师周仲瑛的用药案例中，地锦草常被用于治疗HF和肝硬化[6]。地锦草的主要有效成分包括黄酮类、萜类、香豆素类等，具有抗肿瘤、降血脂、抗氧化、护肝等多种药理作用[7]。有研究发现，地锦草及其提取物可明显改善肝损伤小鼠的肝功能，初步证实了其对小鼠急性肝损伤的保护作用[8]，但其是否可以缓解HF尚不明确。肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）/核因子κB（nuclear factor-κB，NF-κB）信号通路的激活能诱导多种促炎介质的转录，刺激HSC转化与ECM的过度沉积，从而促进HF的发生发展[9]。本研究拟从TNF-α/NF-κB信号通路出发，初步探讨地锦草对HF大鼠的改善作用及机制，旨在为挖掘HF的潜在治疗药物奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括DYCZ-24DN型垂直电泳槽（北京六一仪器厂）、SH-523型化学发光成像系统（杭州申花科技有限公司）、L00686C eBlot™ L1型快速湿转仪（金斯瑞生物科技股份有限公司）、H1-16KR型台式高速冷冻离心机（湖南可成仪器设备有限公司）、Multiskan FC型酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、ND-100型超微量紫外-可见光分光光度计（杭州米欧仪器有限公司）、Chemray240型全自动生化分析仪（深圳雷杜生命科学股份有限公司）、QuantStudio 6型实时荧光定量-聚合酶链式反应（PCR）仪（美国ABI公司）、Fi3型生物显微镜（尼康株式会社）。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂包括地锦草（地锦）配方颗粒（神威药业集团有限公司，批号230325Q，规格为1 g配方颗粒相当于中药饮片3.5 g），水飞蓟宾胶囊（天津天士力圣特制药有限公司，批号35070805，规格35 mg），小鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）单抗、兔源NF-κB p65多抗、兔源核因子κB抑制蛋白α（inhibitor-κ binding protein α，IκBα）多抗、兔源转化生长因子β_1（transforming growth factor-β_1，TGF-β_1）多抗（武汉三鹰生物技术有限公司，批号分别为10028230、00162675、10268-1-AP、21898-1-AP），α-兔源平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）单抗（英国Abcam公司，批号1000229-37），兔源TNF-α多抗（上海碧云天生物技术股份有限公司，批号AF8208），兔源磷酸化NF-κB p65（p-NF-κB p65）多抗（江苏亲科生物研究中心有限公司，批号4c61978），反转录试剂盒、总RNA提取试剂、高灵敏性染料法定量PCR检测试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，批号分别为7E731J3、7E1141H4、7E0962H4），丙氨酸转氨酶（alanine transaminase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate transaminase，AST）测定试剂盒（深圳雷杜生命科学股份有限公司，批号分别为20221130、20221103），羟脯氨酸（hydroxyproline，HYP）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所有限公司，批号20230218），TNF-α、白细胞介素17（interleukin-17，IL-17）、IL-1β、IL-6酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（江苏酶免实业有限公司，批号均为202407），兔源α-SMA多抗（武汉塞维尔生物科技有限公司，批号AC240103198），Poly-HRP标记的羊抗鼠/兔二抗（厦门通灵生物医药科技股份有限公司，批号20709024D）。

1.3 实验动物

本研究所用动物为SPF级健康SD大鼠，共38只，雄性，6～8周龄，体重（200±20）g，由贵州中医药大学动

物研究所提供，动物生产许可证号为SCXK（黔）2021-0003。所有动物饲养于贵州中医药大学动物研究所，实验期间大鼠自由进食与饮水。本研究严格遵循“3R”原则，动物处理严格按照《实验动物管理条例》进行。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

大鼠适应性饲养1周后，按随机数字表法将38只大鼠分为对照组（n=7），模型组（n=7），地锦草低、中、高剂量组（n=6）和水飞蓟宾组（阳性对照，n=6）。除对照组外，其余各组大鼠均腹腔注射3 mL/kg的四氯化碳（CCl_4）和橄榄油（2∶3，*V/V*）溶液以制备HF模型，每周注射2次（每周一、四上午分别注射1次），连续8周[10]；对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水和橄榄油（2∶3，*V/V*）溶液。造模结束后，随机处死对照组和模型组大鼠各1只，通过苏木精-伊红（HE）和Masson染色观察大鼠的肝组织病理变化。根据Metavir分期评分系统——HF分期评分标准，以HF分期≥2期表示HF模型制备成功[11]。

根据2020年版《中国药典》（一版）中地锦草推荐剂量与国医大师周仲瑛教授在治疗HF及肝硬化中地锦草的使用剂量[6]，确定该药的成人剂量为0.214 g/kg，再通过体表面积法换算得到大鼠的临床等效剂量为1.35 g/kg，故地锦草低、中、高剂量组大鼠分别给予0.5、1、2倍临床等效剂量地锦草，即0.675、1.35、2.70 g/kg。水飞蓟宾的成人剂量为3 mg/kg，根据体表面积法换算后得到大鼠的临床等效剂量为18.9 mg/kg。造模成功后，各给药组大鼠灌胃相应药物，对照组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水，灌胃体积均为10 mL/kg，每天1次，连续30 d。

2.2 动物取材与处理

末次给药后，各组大鼠禁食不禁水12 h，称重，然后腹腔注射盐酸替来他明盐酸唑拉西泮（50 mg/kg）麻醉大鼠，再于腹主动脉取血，室温静置2 h后，离心得血清，置于－80 ℃暂存。取血结束后，用颈椎脱臼法处死大鼠，取完整肝脏，称重；另取大鼠新鲜的肝右叶组织，一部分用4%多聚甲醛溶液固定，另一部分置于－80 ℃冰箱中保存，备用。

2.3 大鼠肝指数计算

根据大鼠取材前体重和取材后肝脏湿重计算肝指数：肝指数（%）＝取材后肝脏湿重（g）/大鼠取材前体重（g）×100%。

2.4 大鼠血清中炎症因子指标水平测定

取“2.2”项下各组大鼠血清适量，常规解冻后，按照ELISA试剂盒说明书操作，使用酶标仪检测大鼠血清中TNF-α、IL-17、IL-1β、IL-6水平。

2.5 大鼠血清中肝功能指标及HYP水平测定

取“2.2”项下各组大鼠血清适量，常规解冻后，按照试剂盒说明书操作，使用全自动生化分析仪检测大鼠血清中ALT、AST、HYP水平。

2.6 大鼠肝组织病理观察

取“2.2”项下于4%多聚甲醛溶液中固定24 h的大鼠肝组织，制备石蜡切片（厚度3 μm），行HE和Masson染色后，封片，采用荧光显微镜于白光下观察大鼠的肝组织病理变化。应用Image Pro Plus 6.0软件对Masson染色照片进行阳性染色（呈蓝色）面积测算，并计算阳性染色百分比[阳性染色百分比（%）＝阳性染色面积/总面积×100%]，以此为指标评价HF程度。

2.7 大鼠肝组织中TGF-β_1、α-SMA表达测定

采用免疫组化法测定。取“2.2”项下冻存的大鼠肝组织（每组选4只大鼠的肝组织），经组织脱水、透明、浸蜡、包埋、切片与烤片、脱蜡、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭等常规操作后，加入TGF-β_1、α-SMA一抗（稀释比例分别为1∶100、1∶200），于4 ℃湿盒孵育15 h。冲洗后，加相应二抗，于37 ℃孵育30 min，再次冲洗后，加入DBA显色液，常规进行复染、脱水、封片，最后采用生物显微镜拍照。采用Image Pro Plus 6.0软件对免疫组化照片进行阳性光密度分析（阳性染色呈棕黄色），以阳性光密度值大小来反映蛋白的表达水平。

2.8 大鼠肝组织中TNF-α、NF-κB p65 mRNA表达检测

采用qRT-PCR法检测。取“2.2”项下冻存的大鼠肝组织（每只大鼠约100 mg），采用Trizol法提取肝组织中总RNA，测定总RNA浓度后，将其逆转录成cDNA，并以cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应程序如下：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火60 s，95 ℃延伸15 s，循环40次。扩增体系如下（20 μL）：cDNA模板4 μL，SYBR Green Master Mix 10 μL，上、下游引物各0.4 μL，50×ROX Reference Dye 2 0.4 μL，H_2O 4.8 μL。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算肝组织中TNF-α、NF-κB p65 mRNA的相对表达量。引物由北京擎科生物科技股份有限公司设计并合成，引物序列及产物长度见表1。

表1 引物序列及产物长度

基因	引物序列（5′→3′）	产物长度/bp
GAPDH	上游：ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
	下游：TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	
TNF-α	上游：CCGATTTGCCATTTCATACCAG	232
	下游：TCACAGAGCAATGACTCCAAAG	
NF-κB p65	上游：ACCTGTTCCAAAGAGCACCC	113
	下游：GGTCTGTGTTGTTGCCAAGC	

2.9 大鼠肝组织中α-SMA及TNF-α/NF-κB信号通路相关蛋白表达测定

采用Western blot法测定。取“2.2”项下冻存的大鼠肝组织（每组选3只大鼠的肝组织），提取组织中总蛋白，采用BCA法测定总蛋白浓度。将蛋白变性后，取蛋白40 μg上样进行电泳（恒压180 V，电泳时间40 min），转膜13 min至聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上。电转移后，用含5%脱脂奶粉的TBST（磷酸化蛋白用1%BSA）浸泡PVDF膜，室温摇床封闭2 h；加入α-SMA、TNF-α、NF-κB p65、p-NF-κB p65、IκBα、GAPDH一抗（稀释比例分别为1∶30 000、1∶1 000、1∶5 000、1∶1 000、1∶10 000、1∶10 000），于4 ℃孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释比例为1∶10 000），室温孵育2 h。洗膜后进行曝光显色，利用Image Pro Plus 6.0软件分析条带灰度值。以目标蛋白与内参蛋白（GAPDH）条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平，以p-NF-κB p65与NF-κB p65灰度值比值表示NF-κB p65蛋白的磷酸化水平。

2.10 统计学方法

使用SPSS 29.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的定量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐性时组间两两比较采用LSD-t检验，方差不齐性时组间两两比较采用Tamhane's $T2$检验；不符合正态分布的定量资料以$M(P_{25},P_{75})$表示，组间比较采用Kruskal-Wallis H检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 地锦草对HF大鼠肝指数的影响

对照组、模型组、水飞蓟宾组和地锦草低、中、高剂量组大鼠的肝指数分别为(3.18±0.20)%、(4.07±0.17)%、(3.47±0.14)%、(3.59±0.21)%、(3.36±0.06)%、(3.30±0.14)%。与对照组比较，模型组大鼠的肝指数显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大鼠的肝指数均显著降低（$P<0.01$）。

3.2 地锦草对HF大鼠血清中炎症因子水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清中TNF-α、IL-17、IL-1β、IL-6水平均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，各给药组大鼠血清中上述指标水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表2。

3.3 地锦草对HF大鼠血清中肝功能指标及HYP水平的影响

与对照组比较，模型组大鼠血清中ALT、AST、HYP水平均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，各给药组大鼠血清中上述指标水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表3。

表2 各组大鼠血清中炎症因子指标水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$，ng/L）

组别	TNF-α	IL-17	IL-1β	IL-6
对照组	106.17±16.18	11.08±1.18	23.90±2.12	76.55±8.08
模型组	428.67±32.81[a]	31.24±1.96[a]	79.56±4.52[a]	159.09±10.98[a]
水飞蓟宾组	261.98±21.89[b]	19.46±1.50[b]	47.84±3.73[b]	115.27±7.43[b]
地锦草低剂量组	349.65±19.27[b]	25.55±1.53[b]	60.73±4.88[b]	129.38±8.15[b]
地锦草中剂量组	246.70±24.51[b]	20.91±1.50[b]	46.35±3.17[b]	117.17±9.22[b]
地锦草高剂量组	169.44±16.32[b]	14.97±1.37[b]	34.04±3.84[b]	92.49±9.62[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$。

表3 各组大鼠血清中肝功能指标及HYP水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

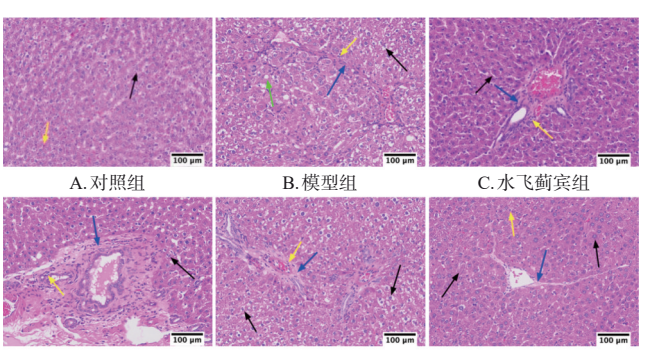
组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	HYP/(μg/mL)
对照组	33.25±4.10	84.73±7.04	11.89±2.11
模型组	144.08±17.04[a]	257.89±17.38[a]	40.66±3.62[a]
水飞蓟宾组	84.42±9.27[b]	165.40±13.76[b]	21.41±2.49[b]
地锦草低剂量组	121.37±11.72[c]	210.20±15.01[b]	27.11±2.77[b]
地锦草中剂量组	86.78±7.52[b]	156.66±12.80[b]	19.40±1.90[b]
地锦草高剂量组	55.08±8.85[b]	127.32±13.22[b]	14.72±1.72[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$。

3.4 地锦草对HF大鼠肝组织病理的影响

3.4.1 HE染色情况

对照组大鼠肝组织结构完整，肝细胞排列不规则，未见明显结缔组织增生，间质内可见零散炎症细胞浸润。与对照组比较，模型组大鼠肝细胞排列更不规则，肝细胞水肿伴明显胞浆疏松化，肝细胞实质内有少量空泡样变性，汇管区可见大量结缔组织增生，间质内可见少量炎症细胞浸润。与模型组比较，各给药组大鼠肝组织在炎症细胞浸润、肝细胞水肿等方面均有不同程度改善。结果见图1。



A. 对照组　B. 模型组　C. 水飞蓟宾组

D. 地锦草低剂量组　E. 地锦草中剂量组　F. 地锦草高剂量组

蓝色箭头：结缔组织增生；黑色箭头：肝细胞水肿；绿色箭头：肝细胞空泡样变性；黄色箭头：炎症细胞浸润。

图1 各组大鼠肝组织HE染色显微图

3.4.2 Masson染色情况

对照组大鼠肝组织未见结缔组织增生，可见少量蓝色胶原纤维。模型组大鼠肝组织蓝色胶原纤维明显增多，纤维间隔变粗。与模型组比较，各给药组大鼠肝组织蓝色胶原纤维明显变细，纤维间隔变窄。与对照组[(0.06±0.01)%]比较，模型组大鼠阳性染色百分比

[(2.44±0.68)%]显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，水飞蓟宾组和地锦草高剂量组大鼠阳性染色百分比[分别为（0.65±0.17）%、（0.34±0.14）%]均显著降低（$P<0.05$），但地锦草低、中剂量组大鼠阳性染色百分比[分别为（2.37±1.97）%、（1.69±0.25）%]差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图2。

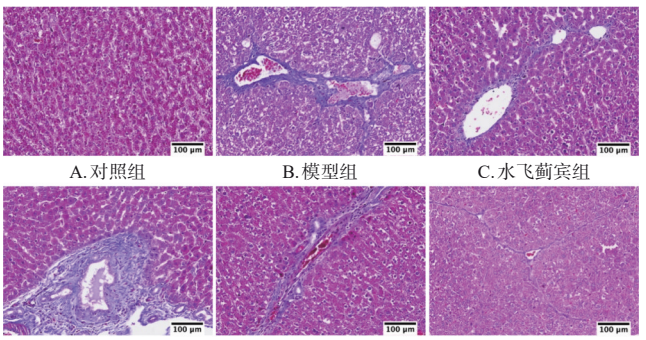


图2　各组大鼠肝组织Masson染色显微图

3.5　地锦草对HF大鼠肝组织中α-SMA、TGF-β$_1$表达的影响

对照组大鼠肝组织中α-SMA检测可见少量着色，主要分布在小动、静脉血管壁，其余未见明显广泛表达；TGF-β$_1$检测可见少量表达，主要分布在肝细胞中。模型组大鼠肝组织中α-SMA检测可见大片区高表达，主要分布在胶原纤维增生处及汇管区；TGF-β$_1$检测可见大片区高表达，颜色为深棕褐色，并出现颗粒状改变。各给药组大鼠肝组织中α-SMA、TGF-β$_1$表达有不同程度减轻。与对照组比较，模型组大鼠肝组织中α-SMA、TGF-β$_1$阳性光密度值均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；与模型组比较，水飞蓟宾组和地锦草中、高剂量组大鼠肝组织中α-SMA、TGF-β$_1$阳性光密度值均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图3、图4和表4。

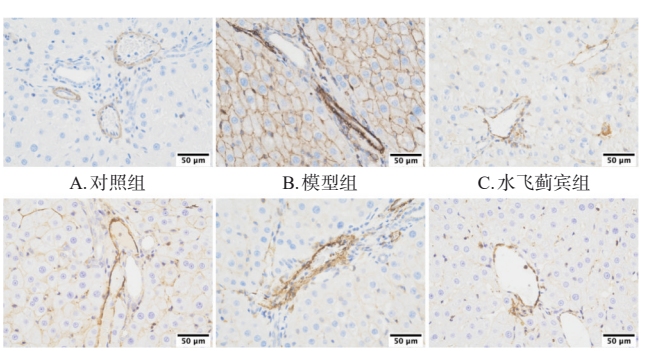


图3　各组大鼠肝组织中α-SMA检测的免疫组化图

3.6　地锦草对HF大鼠肝组织中TNF-α、NF-κB p65 mRNA表达的影响

与对照组比较，模型组大鼠肝组织中TNF-α、NF-κB p65 mRNA相对表达量均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，地锦草高剂量组大鼠肝组织中TNF-α mRNA相对表达量以及各给药组大鼠肝组织中NF-κB p65 mRNA相对表达量均显著降低（$P<0.01$）。结果见表5。

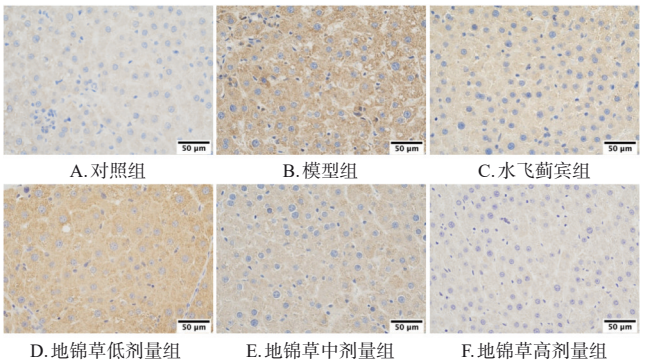


图4　各组大鼠肝组织中TGF-β$_1$检测的免疫组化图

表4　各组大鼠肝组织中α-SMA、TGF-β$_1$阳性光密度值比较（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组别	α-SMA	TGF-β$_1$
对照组	0.19±0.09	2.13±0.42
模型组	2.49±0.39[a]	10.61±0.86[b]
水飞蓟宾组	1.09±0.14[c]	5.90±0.24[c]
地锦草低剂量组	1.70±0.55	8.53±0.45
地锦草中剂量组	1.13±0.35[c]	5.20±0.05[c]
地锦草高剂量组	0.53±0.07[c]	3.13±0.04[d]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与对照组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$；d：与模型组比较，$P<0.01$。

表5　各组大鼠肝组织中TNF-α、NF-κB p65 mRNA的相对表达量比较[$\bar{x}\pm s$或$M(P_{25},P_{75})$，$n=6$]

组别	TNF-α	NF-κB p65
对照组	1.01(0.98,1.03)	1.00±0.08
模型组	4.06(3.98,4.29)[a]	3.21±0.36[a]
水飞蓟宾组	2.66(2.53,2.74)	2.02±0.20[b]
地锦草低剂量组	3.41(3.27,3.51)	2.48±0.11[b]
地锦草中剂量组	2.59(2.37,2.59)	2.14±0.15[b]
地锦草高剂量组	1.76(1.74,1.90)[b]	1.47±0.11[b]

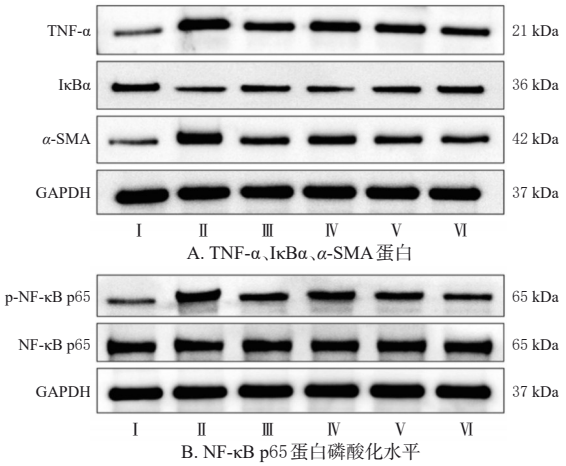
a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$。

3.7　地锦草对HF大鼠肝组织中α-SMA及TNF-α/NF-κB信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较，模型组大鼠肝组织中α-SMA、TNF-α蛋白表达水平及NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.01$），IκBα蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$）。与模型组比较，各给药组大鼠上述指标均显著改善（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图5、表6。

4　讨论

中医学认为，肝脏从正常到HF乃至肝硬化是渐进发展的，不同阶段对应的中医病证不尽相同。中医古籍虽无HF记载，但考究文献，HF符合“肝积”“胁痛”“积聚”等病证的特征[12]。《灵枢·百病始生篇》记载“肠外有寒，汁沫与血相搏，则并合凝聚不得散，而积成矣”，因寒气、水饮、痰饮、瘀血共同凝聚，积最基本的病理因素为“湿”和“瘀”。肝藏血，主疏泄，若因湿热或外邪阻滞气



Ⅰ：对照组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：水飞蓟宾组；Ⅳ：地锦草低剂量组；Ⅴ：地锦草中剂量组；Ⅵ：地锦草高剂量组。

图5　各组大鼠肝组织中α-SMA及TNF-α/NF-κB信号通路相关蛋白表达的电泳图

表6　各组大鼠肝组织中α-SMA及TNF-α/NF-κB信号通路相关蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	α-SMA/GAPDH	IκBα/GAPDH	TNF-α/GAPDH	p-NF-κB p65/NF-κB p65
对照组	0.09±0.06	0.59±0.02	0.09±0.09	0.06±0.04
模型组	0.61±0.02[a]	0.24±0.01[a]	0.69±0.06[a]	1.11±0.04[a]
水飞蓟宾组	0.35±0.03[b]	0.42±0.02[b]	0.32±0.10[b]	0.48±0.20[b]
地锦草低剂量组	0.45±0.03[b]	0.27±0.01[c]	0.53±0.05[c]	0.82±0.09[c]
地锦草中剂量组	0.35±0.03[b]	0.41±0.00[b]	0.39±0.05[b]	0.55±0.13[b]
地锦草高剂量组	0.34±0.17[b]	0.51±0.00[b]	0.20±0.09[b]	0.22±0.15[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$。

机，湿困气阻热扰而酿毒，则肝络瘀阻，积聚已成，血行不畅[13]。若湿、热、瘀、毒相互作用，互相影响，滞留蕴结在肝，肝脉瘀滞则肝运转失司，则可形成肝积。“湿-热-毒-郁-瘀-虚”是慢性肝病到HF的病机演化过程，有研究认为，“湿、热、瘀、毒”四者相互联系，相互转化与兼杂，并且提出“湿热瘀毒是HF形成和加重的始动因素和关键环节”假说[13]，而地锦草的功效十分契合“湿热瘀毒”理论的治疗方向。

腹腔注射CCl_4是构建HF大鼠模型的经典方法。CCl_4可以激活库普弗细胞，导致TNF-α、IL-1、IL-6等多种细胞因子和生长因子高表达，进而诱导肝损伤和HF[14]。本研究结果显示，经地锦草干预后，HF大鼠血清中TNF-α、IL-17、IL-1β、IL-6水平显著降低，表明地锦草具有抑制炎症水平的作用。本研究病理结果显示，经地锦草干预后，HF大鼠肝组织的炎症细胞浸润、肝细胞水肿情况均明显好转，且蓝色胶原纤维明显变少、变细，纤维间隔缩小，因此笔者推测地锦草具有恢复受损肝细胞、缓解HF进程的作用。HYP是胶原组织的主要成分之一，是反映胶原组织代谢和纤维化程度的重要指标[15]。本研究结果显示，经地锦草干预后，HF大鼠血清中HPY水平降低，表明地锦草有减少胶原沉积的作用；此外，HF大鼠血清中ATL、AST水平降低，说明地锦草可恢复肝功能，缓解肝损伤。NF-κB是一种异二聚体，该家族有p50、p52、p65（RelA）、RelB和c-rel 5种蛋白。NF-κB激活经典途径是由TNF-α、IL-1等诱导的，该途径依赖于NF-κB抑制因子激酶介导的IκBα磷酸化，导致其降解，从而使p50/p65 NF-κB二聚体进入细胞核并激活基因转录[16]。炎症常被认为是纤维化的重要环节，而NF-κB是炎症反应的关键转录调节因子，可参与控制炎症过程中许多基因的表达[16]。NF-κB通路可诱导多种促炎介质的转录、HSC的激活和增殖，阻断细胞因子诱导的HSC凋亡效应[9]，激活多条信号通路来调控细胞生长，诱导组织纤维化[17]。通过抑制NF-κB信号通路的激活可以达到减轻HF和炎症的目的[18—19]。本研究结果显示，经地锦草干预后，模型大鼠肝组织中TNF-α、α-SMA、TGF-β_1蛋白表达以及TNF-α、NF-κB p65 mRNA表达和NF-κB p65蛋白磷酸化水平均不同程度下调/下降，而IκBα蛋白表达水平显著上调。这表明地锦草可通过降低炎症水平，抑制NF-κB p65磷酸化，来抑制NF-κB信号通路的激活。

综上所述，地锦草可能通过抑制TNF-α/NF-κB信号通路激活来缓解大鼠HF，但其具体作用机制有待进一步研究。

（利益冲突声明：本文不存在利益冲突）

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] BERUMEN J, BAGLIERI J, KISSELEVA T, et al. Liver fibrosis: pathophysiology and clinical implications[J]. WIREs Mech Dis, 2021, 13(1): e1499.

[3] ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. Cells, 2020, 9(4): 875.

[4] ZHOU X X, FU Y D, CHEN J M, et al. Progress in clinical and basic research of Fuzheng huayu formula for the treatment of liver fibrosis[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 327: 118018.

[5] 李晓颖，田娅飞，刘畅，等. 苗药地锦草对糖尿病肾病大鼠肾小球足细胞相关蛋白表达的影响[J]. 中国比较医学杂志，20，33(8)：105-111.
LI X Y, TIAN Y F, LIU C, et al. Effect of *Euphorbia humifusa* on expression of glomerular podocyte-related proteins in diabetic kidney disease rats[J]. Chin J Comp Med, 20, 33(8): 105-111.

[6] 豆晓云，陈潇颖，补娟娟，等. 周仲瑛从虚实相因辨治肝炎肝硬化经验[J]. 中医杂志，2024，65(11)：1104-1108.

DOU X Y, CHEN X Y, BU J J, et al. Professor Zhou Zhongying's experience in differentiating and treating hepatitis and liver cirrhosis from deficiency and excess[J]. J Tradit Chin Med, 2024, 65(11): 1104-1108.

[7] 戴鹏宇, 黄锦豪, 张凯惠, 等. 地锦全草化学成分研究[J/OL]. 中药材, 2024: 1-6[2024-07-30]. http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZYCA2024072900-G&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2024.07.016.
DAI P Y, HUANG J H, ZHANG K H, et al. Studies on the chemical constituents of *Euphorbia humifusa* L. [J/OL]. China Ind Econ, 2024: 1-6[2024-07-30]. http://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?filename=ZYCA2024072900-G&dbname=CJFD&dbcode=CJFQ.DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2024.07.016.

[8] 侯静, 黎理, 蔡毅. 地锦草组药用植物的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2020, 35(2): 218-224.
HOU J, LI L, CAI Y. Research advances on medicinal plants of *Euphorbia humifuse*[J]. West China J Pharm Sci, 2020, 35(2): 218-224.

[9] 李子舜, 赵长普, 陈仁伍, 等. 中医药基于NF-κB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.
LI Z S, ZHAO C P, CHEN R W, et al. Traditional Chinese medicine treats hepatic fibrosis via NF-κB signaling pathway: a review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(23): 275-282.

[10] 戈宏焱, 王安庆. 清肝九味散对肝纤维化大鼠Raf/MEK/ERK信号通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(7): 848-854.
GE H Y, WANG A Q. Effect of Qinggan jiuwei powder on Raf/MEK/ERK signal pathway in liver cirrhosis rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2021, 41(7): 848-854.

[11] 徐列明, 刘平, 沈锡中, 等. 肝纤维化中西医结合诊疗指南: 2019年版[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(11): 1286-1295.
XU L M, LIU P, SHEN X Z, et al. Diagnosis and treatment guidelines of integrated Chinese and western medicine for treating hepatic fibrosis: 2019 edition[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2019, 39(11): 1286-1295.

[12] 安祯祥, 何远利, 唐东昕, 等. 扶脾柔肝颗粒对肝纤维化模型大鼠的改善作用机制研究[J]. 中国药房, 2021, 32(21): 2587-2592.
AN Z X, HE Y L, TANG D X, et al. Mechanism of improvement effects of Fupi Rougan Granules on hepatic fibrosis model rats[J]. China Pharm, 2021, 32(21): 2587-2592.

[13] 叶放, 薛博瑜, 吴勉华, 等. 重视对慢性肝炎肝纤维化进程中湿热瘀毒证治研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(12): 2477-2480.
YE F, XUE B Y, WU M H, et al. Study on treating chronic hepatitis and hepatic fibrosis by eliminating damp-heat toxin and blood stasis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2007, 25(12): 2477-2480.

[14] FAREED M M, KHALID H, KHALID S, et al. Deciphering molecular mechanisms of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: a brief systematic review[J]. Curr Mol Med, 2024, 24(9): 1124-1134.

[15] 周杰, 单婉歆, 欧玲, 等. 肝龙胶囊对CCl_4性肝损伤所致肝纤维化的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(4): 513-517.
ZHOU J, SHAN W X, OU L, et al. Effect of Ganlong capsule on liver fibrosis induced by CCl_4 liver injury[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(4): 513-517.

[16] 张晓霞, 李霁, 于锋. IKK/NF-κB通路在肝纤维化中的作用及相关药物研究进展[J]. 药学研究, 2017, 36(4): 236-239.
ZHANG X X, LI J, YU F. Research progress on the role of IKK/NF-κB pathway in liver fibrosis and correlated drugs[J]. J Pharm Res, 2017, 36(4): 236-239.

[17] ZHANG T P, HU J J, WANG X M, et al. MicroRNA-378 promotes hepatic inflammation and fibrosis via modulation of the NF-κB-TNF-α pathway[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 87-96.

[18] WANG K P, YANG X W, WU Z J, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharide protected CCl_4-induced liver fibrosis through intestinal homeostasis and the LPS-TLR4-NF-κB signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 240.

[19] BRUNO DE S B, HAUTE G V, ORTEGA-RIBERA M, et al. Methoxyeugenol deactivates hepatic stellate cells and attenuates liver fibrosis and inflammation through a PPAR-γ and NF-κB mechanism[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 280: 114433.

（收稿日期：2024-08-20　修回日期：2024-12-28）
（编辑：林　静）