

实验研究

健脾软肝方对四氯化碳致肝纤维化大鼠 α -SMA 及其 mRNA 表达的影响陈文玲¹ 王宪东² 陈文慧¹ 朱晓松¹ 姚 政¹ 石安华¹

(1 云南中医学院,昆明,650000; 2 云南省中医中药研究院,昆明,650223)

摘要 目的:明确健脾软肝方对肝纤维化大鼠 α -SMA 及其 mRNA 表达的影响,初步探讨健脾软肝方防治肝纤维化的作用机制,为肝纤维化的中医临床治疗提供实验依据。方法:选取 Wistar 雄性大鼠 72 只,随机分为正常组、模型组、扶正化瘀胶囊组、健脾软肝方高、中、低剂量组。模型组利用 CCl_4 对大鼠进行腹腔注射,按 0.2 mL/100 g 腹腔注射 30% CCl_4 与 70% 橄榄油混合溶液,正常组注射等量生理盐水,2 次/周,4 周后复制大鼠肝纤维化动物模型,该实验采用免疫组化 ABC 法检测肝纤维化大鼠 α -SMA 蛋白的表达水平,采用 Real-time PCR 法检测肝纤维化大鼠 α -SMA mRNA 的表达水平,采用 H-E 染色和 Mallory 染色观察大鼠肝纤维化的病变程度。结果:模型组 α -SMA 蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$);健脾软肝方高、中、低剂量组与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),其中高、中、低剂量组之间 α -SMA 蛋白阳性表达逐渐升高,可以呈一定的药物依赖关系。模型组 α -SMA mRNA 表达显著上升 ($P < 0.05$);健脾软肝方高、中、低剂量组与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且高、中、低剂量组之间 α -SMA mRNA 表达水平逐渐升高,呈一定的药物依赖关系。结论:健脾软肝方抗肝纤维化的作用机制可能与抑制大鼠肝脏内 α -SMA 及其 mRNA 的表达有关。

关键词 健脾软肝方;肝纤维化; α -平滑肌肌动蛋白;大鼠;四氯化碳

Effects of Jianpi Ruangan Formula on the Expression of α -SMA and m-RNA in Rats
with Hepatic fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride

Chen Wenling¹, Wang Xiandong², Chen Wenhui¹, Zhu Xiaosong¹, Yao Zheng¹, Shi Anhua¹

(1 Clinical Medical School, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650000, China;

2 Yunnan Academy of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650223, China)

Abstract Objective: To study the effects of Jianpi Ruangan Formula on the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and m-RNA in rats with hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl_4), to preliminarily discuss the mechanism of Jianpi Ruangan Formula in preventing and treating liver fibrosis, and to provide experimental basis for clinic treatment of hepatic fibrosis in traditional Chinese medicine. **Methods:** A total of 72 Wistar male rats were selected and randomly divided into normal group, model group, Fuzheng Huayu Capsule group, Jianpi Ruangan Formula high, middle, low dose group. Rats in model group was intraperitoneally injected with the mixed solution of 30% CCl_4 and 70% olive oil at 0.2 mL/100 g while the normal group was intraperitoneally injected with the same dose of saline. Each group injected twice a week for 4 weeks, and the animal models of rat liver fibrosis was replicated after 4 weeks. The expression of α -SMA in rats with hepatic fibrosis was detected by ABC immunohistochemical method and expression of the m-RNA was determined by Real-time PCR method. The HE staining and Mallory staining were applied to observe the pathological changes of hepatic fibrosis in rats. **Results:** The expression of α -SMA protein in model group increased ($P < 0.05$). Compared with the Jianpi Ruangan formula high, middle, low dose groups, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Among them, the positive expression of α -SMA protein in the high, middle and low dose groups gradually increased, showing some signs of drug dependence. Compared with the Jianpi Ruanfang formula high, middle, low dose groups, the expression of α -SMA mRNA in model group significantly increased ($P < 0.05$), and there was significant difference ($P < 0.05$). The expression of α -SMA mRNA in the high, middle and low dose groups gradually increased, showing some signs of drug dependence. **Conclusion:** The mechanism of the Jianpi Ruangan Formula against hepatic fibrosis may be related to the inhibition of the expression of α -SMA and m-RNA in rat liver.

Key Words Jianpi Ruangan Formula; Hepatic fibrosis; α -smooth muscle actin

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.09.041

基金项目:云南省科技厅应用基础面上项目(2013FZ091)

作者简介:陈文玲(1978.11—),女,硕士,讲师,主治医师,研究方向:肝胆病中西医结合治疗,E-mail:2786070879@qq.com

通信作者:石安华(1977.06—),男,硕士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:肝病中西医结合基础研究,E-mail:2697349858@qq.com

肝纤维化(Hepatic Fibrosis)是指肝脏内弥漫性细胞外基质过度增生堆积的病理阶段,是肝脏在多种病因的作用下,肝细胞损伤后自我修复的病理反应。诱发肝纤维化的病因多种多样,其中病毒性肝炎为主要病因^[1]。肝纤维化早期症状不明显,患者常无明显表象,如不及时治疗,发展到后期极易发展成为肝硬化^[2]。慢性肝病现已成为威胁全球的人类身体健康的主要诱因,且在肝硬化失代偿期难以治疗,病死率极高,所以早期治疗及预防肝纤维化的发生极为关键。 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth Muscle Actin, α -SMA)是肝星状细胞(HSC)活化的标志,活化的HSC胞体展开,突出延长,增殖活跃,胞质内脂滴消失,表达 α -SMA,产生ECM的能力增强,表明已转变为肌成纤维细胞(Myofibroblast, MFB),除了增加基质成分的合成之外,还能调节ECM的降解,在肝纤维化的进程中起核胞。我们在前期研究中发现,健脾软肝方可以有效的治疗二甲基亚硝胺诱导的肝纤维化大鼠,健脾软肝方抑制Col I、Col III胶原的合成,促使其降解,并在抑制HSC活化等方面起作用。肝脏中仅有大血管壁平滑肌细胞存在 α -SMA表达,其余肝脏细胞内都无 α -SMA表达;若肝脏细胞中出现大量 α -SMA细胞表达,说明肝星状细胞已经转化为肌成纤维细胞较优^[3],但是否与 α -SMA蛋白及其mRNA的表达有关还不清楚,本实验以肝纤维化为研究对象,通过检测肝纤维化大鼠 α -SMA蛋白及其mRNA表达的影响,探讨健脾软肝方抗肝纤维化的机制是否与肝纤维化形成和发展有关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 本实验选用健康雄性大鼠60只,体重(150±10)g,由四川达硕生物科技有限公司提供,动物质量合格证书编号:0017752。所有大鼠自由饮水、摄食,云南中医学院实验动物房中分笼饲养,环境温度20~22℃,相对湿度50%~55%,通风良好。

1.1.2 药物 健脾软肝方由兰花参、白芍、莪术、香附、三七等中药组成,生药购自云南中医学院附属医院门诊部药方,扶正化瘀胶囊购自于云南省中医医院门诊部药方,生产厂家为上海黄海制药有限责任公司,生产批号:140309。

1.1.3 试剂与仪器 1)主要试剂:鼠抗 α -SMA单克隆抗体,由博士德生物有限公司提供,大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)ELISA检测试剂盒及DAB免疫组化显色试剂盒由生工生物工程(上海)有限公司提供。2)主要仪器:DGX-9140电热恒温干燥箱

(太仓市华利达实验设备有限公司),荧光显微镜、Image-pro Plus5.0图像分析系统(日本Olympus株式会社),SW-CJ-1D洁净工作台(江苏苏洁净化设备厂),HC-2518R高速冷冻离心机(安徽中科中佳仪器有限公司),TU-1901紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),PCR反应扩增仪、移液器(加拿大BIO公司),StepOne型荧光定量PCR仪(美国应用生物系统中国公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物的分组与模型制备 实验所用动物随机分为6组,即正常组,模型组,扶正化瘀胶囊组,健脾软肝方低剂量组,健脾软肝方中剂量组,健脾软肝方高剂量组,10只/组。肝纤维化动物模型的建立成功与否,是研究肝纤维化发生发展的前提。本实验从第1周起,2次/周对大鼠进行腹腔注射,共注射四周,剂量为0.2 mL/100 g。其中模型组、扶正化瘀胶囊组、健脾软肝方低剂量组、健脾软肝方中剂量组、健脾软肝方高剂量组分别腹腔注射70%橄榄油与30%CCl₄混合溶液,正常组腹腔注射等量的生理盐水。各组大鼠均给予普通饲料饲养,自由饮水。

1.2.2 动物给药剂量及方法 健脾软肝方按等效剂量换算法,成人每日用量为60 g,每200 g大鼠1 d所需生药量(g)=60 g×0.018=1.08,为0.54 g/100 g·d。扶正化瘀胶囊组规格为0.3 g/粒,成人每日每次用量为:3次/d,5粒/次。据人和大鼠间体表面积及折算的等效剂量比值表计算临床等效剂量,从第一周开始给予空白组和模型组等量的生理盐水灌胃,健脾软肝方高、中、低剂量组每天给予相应剂量灌胃(分别是1.08 g/100 g·d、0.54 g/100 g·d、0.27 g/100 g·d),扶正化瘀胶囊组给予灌胃0.0405 g/100 g·d。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 病理组织学检查 病理组织学采用H-E及Mallory染色2种染色方法,染色后通过光学显微镜观察并记录切片中大鼠肝组织的病变程度。在第4周末,各组大鼠禁食12 h,饮水正常。第2天以10%的水合氯醛配90%生理盐水,按照每0.25 mL/100 g的剂量计算,对大鼠腹腔注射麻醉,迅速取出大鼠肝脏,分切成1 cm×1 cm×3 cm,置于福尔马林溶液保存备用,并分别进行脱水、包埋、脱蜡、染色、封片,进行H-E及Mallory染色观察。

1.2.3.2 肝纤维化分级 肝纤维化的分级标准是根据观察汇管区周围肝细胞炎症反应程度、小叶内情况及纤维增生程度,将肝纤维化分为4级,具体分

级标准参考中华医学会 2002 年肝病学会肝纤维化诊断及疗效评估共识^[4]。见表 1。

表 1 肝纤维化分级

分级	汇管区及周围	小叶内	肝纤维化程度
S0	无炎症反应	无炎症反应	无
S1	汇管区炎症反应	少数点状坏死	汇管区及中央静脉有纤维化增生
S2	汇管区与中央静脉有轻微炎症反应	变性,呈点、灶样坏死。	汇管区与中央静脉有炎症反应形成,纤维间隔形成
S3	汇管区及中央静脉炎症反应较严重	无假小叶形成	纤维间隔及小叶结构紊乱,但无肝硬化形成
S4	汇管区及中央静脉重度炎症反应	有假小叶形成	假小叶形成

1.2.3.3 免疫组化 ABC 法检测大鼠肝组织中 α -SMA 的蛋白表达 将标本放置于 4% 多聚甲醛常规灌注固定,取材后放置于 20% 蔗糖溶液 12 h,制作蜡块,制作切片,并贴片,PBS 清洗。之后将切片分别放置于 0.3% 的过氧化氢甲醇溶液 30 min、0.3% Triton X100 30 min、血清稀释液稀释的一抗在 4℃ 冰箱中放置 24~48 h、于 PBS 稀释的二抗中室温孵育 2 h、ABC 复合物之类的抗体室温孵育 2 h,最后将切片放置于显色液中,进行染色,时间控制在 30 min 左右,在这期间需要经常在显微镜下进行观察,若细胞着色且背底颜色较淡时,应迅速清除显色液, α -SMA 蛋白阳性表达在切片上呈棕黄色,利用 Image-pro Plus 6.0 软件分对切片进行定量分析,每张切片在光学显微镜下去 5 个视野($\times 40$),测定 α -SMA 蛋白阳性表达的灰度值与总视野面积比值。

1.2.3.4 采用 Real-time PCR 法检测 cDNA 样本中 α -SMA 基因相对含量 大鼠肝组织 α -SMA 的表达采用 Real-time PCR 法。将大鼠肝脏组织均质化、匀浆并离心,提取上清液,之后相分离上清液,抽取肝组织水相中的总 RNA,按试剂盒说明操作,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。引物序列: α -SMA 上游引物 5'-CGGGAGAAAATGACCCAGAT-3',下游引物 5'-CCAGAGTCCAGCACAATACCA-3';内参 β -actin 上游引物 5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3',下游引物 5'-AGCCACCAATCCACACAGAG-3';在 PCR 管中加入 total RNA,Random Primer p(dN)6,之后冰浴,离心加入下列试剂,37℃ 温浴 5 min,42℃ 温浴 60 min,70℃ 温浴 10 min。终止反应,最后将上述溶液 -20℃ 保存。完成上述步骤后,把加好样品的 96 孔板放在 ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪中进行反应。收集数据,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,通过 Ct 值对样

本基因表达量的进行计算。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,计数资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组实验结果的统计数据符合正态分布,使用单因素方差分析,不符合正态分布的数据使用秩和检验。2 个数据之间比较时,若方差齐则使用 LSD 方法检验,若方差不齐时使用 Dunnett T3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠大体形态和大鼠肝脏观察 实验从第一周便开始造模,正常组大鼠饮食饮水正常,毛色光泽,大小便正常,身体状态良好。模型组大鼠进食及进水量均减少,毛色暗黄无光泽,大便时而稀溏不成形,小便色黄,精神萎靡,注射部位无红肿感染,肛门区红肿。健脾软肝方高、中、低剂量组大鼠与模型组比较活动度较好,进食进水量较模型组比较有所增加,毛色较光泽,大便时而有稀溏但总体状况较好,腹腔注射部位无感染。正常组大鼠肝脏呈褐色,体积适中,表面光滑,质地柔软,边缘呈锐圆状,无结缔组织粘连,无包块。模型组大鼠肝脏较正常组颜色浅,呈暗红色,肝脏体积大于正常组,表面有结节,质地较硬,边缘呈钝圆庄且有结缔组织粘连。扶正化瘀胶囊组及健脾软肝方高、中、低剂量组大鼠肝脏颜色较模型组色泽变深,表面较光滑,肝脏大小与正常组比较稍微增大,表面有轻微结节,质地硬,但总体状况好于模型组。

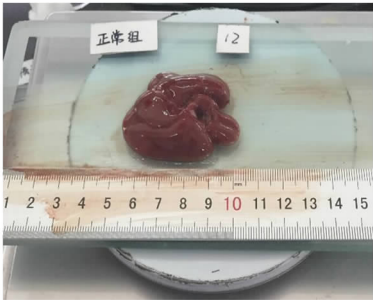


图 1 正常组



图 2 模型组

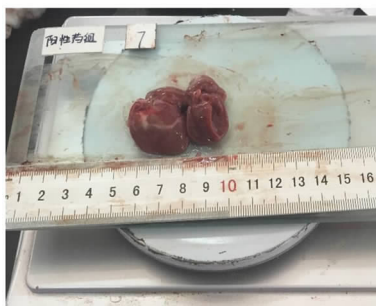


图3 扶正化瘀胶囊组

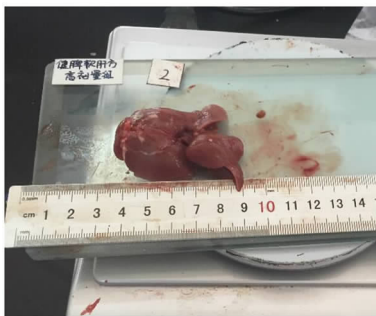


图4 健脾软肝方高剂量组



图5 健脾软肝方中剂量组

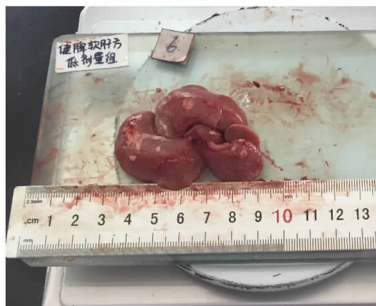


图6 健脾软肝方低剂量组

2.2 大鼠肝脏病理组织学观察 H-E 染色,光学显微镜下提示,正常组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞呈现卵圆状,并以中央静脉为圆心,肝细胞呈放射状排列,细胞核呈圆形,肝索排列规则。模型组大鼠肝细胞肿胀变形,假小叶形成,肝索排列紊乱,局部肝细胞发生脂肪变性,胶原纤维组织扩大。此种现象说明 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠造模已经成功。健脾软肝方高、中、低剂量组及扶正化瘀胶囊组病变程度与模型组比较,病变程度较轻,肝索排列紊乱,有假

小叶形成,脂肪病变程度较轻,有少许脂肪样空泡形成,且胶原纤维减少,但光镜下并不能明显判断各组间差别。

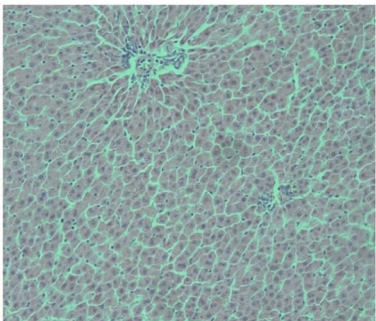


图7 正常组 ×100

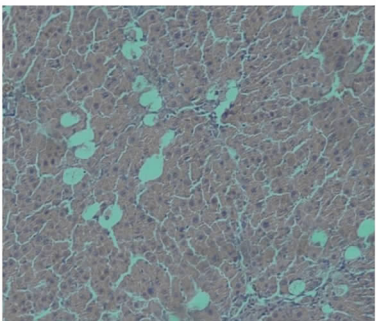


图8 模型组 ×100

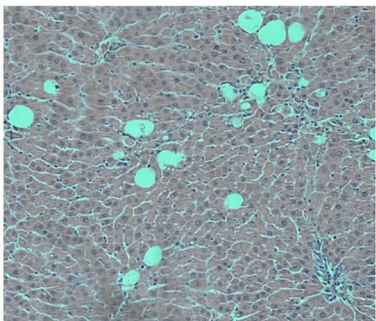


图9 扶正化瘀胶囊组 ×100

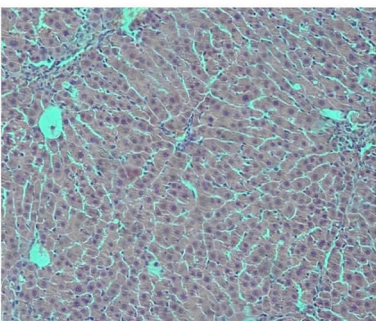


图10 健脾软肝方高剂量组 ×100

Mallory 染色时,切片上胶原纤维会表现为蓝色丝带状组织。光学显微镜下,正常组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞呈卵圆状,肝细胞呈放射状排列,细胞核圆形,肝索排列规则。模型组大鼠肝细胞变性,

假小叶形成,大量脂肪空泡出现,纤维结缔组织大量沉积,肝小叶和汇管区机构被破坏。健脾软肝方高、中、低剂量组及扶正化瘀胶囊组有假小叶形成,各组汇管区有少量纤维结缔组织沉积,并少量脂肪空泡聚集,肝小叶的结构有一定程度的破坏,但总体破坏程度较与模型组比较好。

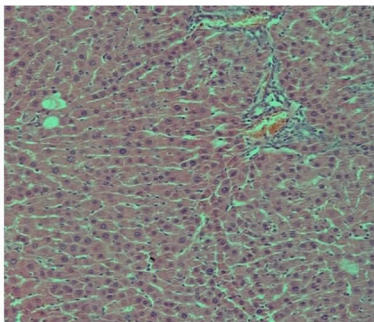


图 11 健脾软肝方中剂量组 ×100

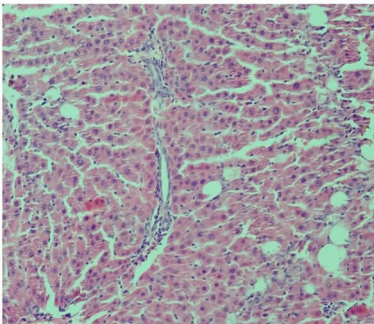


图 12 健脾软肝方低剂量组 ×100

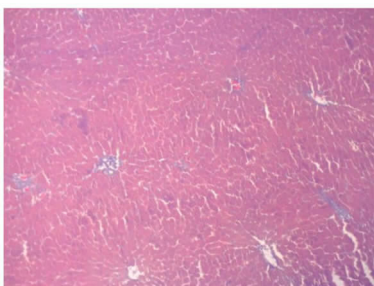


图 13 正常组 ×40

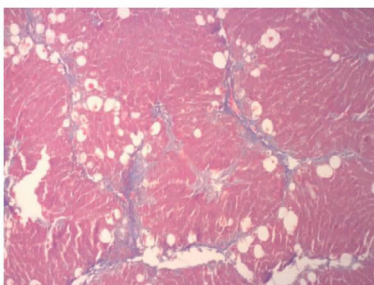


图 14 模型组 ×40

2.3 肝纤维化的分级程度 Mallory 染色完成后,观察切片后发现,模型组大鼠肝组织中,假小叶形成较多,大部分处于 S3 型这一阶段这也从侧面提示动

物模型复制成功。健脾软肝方高、中、低剂量组及扶正化瘀胶囊组大鼠肝组织中有少量胶原纤维形成,但大部分处于 S2 阶段,说明治疗后有一定效果,各组大鼠肝纤维化程度有所减轻。

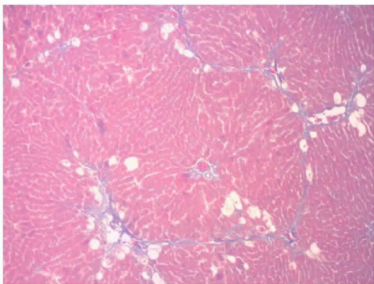


图 15 扶正化瘀胶囊组 ×40

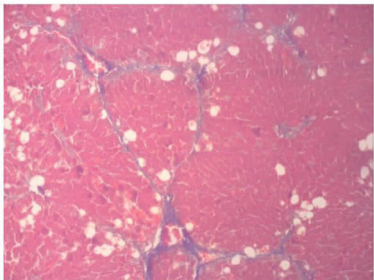


图 16 健脾软肝方高剂量组 ×40

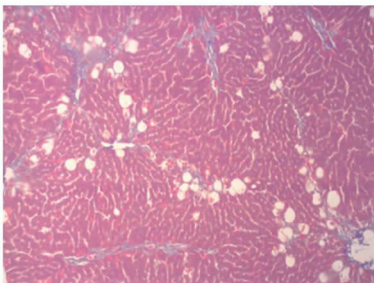


图 17 健脾软肝方中剂量组 ×40

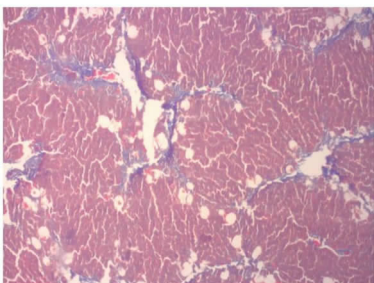


图 18 健脾软肝方低剂量组 ×40

表 2 肝纤维化的分级程度(只,n=10)

组别	S0	S1	S2	S3	S4
正常组	9	1	0	0	0
模型组 [△]	0	0	1	7	2
扶正化瘀胶囊组 [*]	0	7	2	1	0
健脾软肝方高剂量组 [*]	0	0	8	2	0
健脾软肝方中剂量组 [*]	0	0	8	1	1
健脾软肝方低剂量组 [*]	0	0	6	3	1

注:与模型组比较^{*}P<0.05;与正常组比较,[△]P<0.05

2.4 各组大鼠肝组织 α -SMA 蛋白的表达的观察

肝组织 α -SMA 蛋白的表达,正常组大鼠肝组织中仅在血管壁周围见少量 α -SMA 表达,模型组大鼠肝组织中见大量 α -SMA 表达,主要集中在汇管区、中央静脉、假小叶纤维隔及临近的肝窦区周围。正常组与模型组比较,模型组显著上升($P < 0.05$);扶正化瘀胶囊组与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$);健脾软肝方高、中、低剂量组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),健脾软肝方高、中、低剂量组之间 α -SMA 蛋白在肝组织中阳性表达逐渐升高,可以呈一定的药物依赖关系。

表 3 各组大鼠肝组织 α -SMA 蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	α -SMA IOD 值(积分光密度值)
正常组	1.458 9 $\pm$ 0.582 1
模型组	6.558 7 $\pm$ 0.478 5 Δ
扶正化瘀胶囊组	2.580 3 $\pm$ 0.325 4 *
健脾软肝方高剂量组	3.604 2 $\pm$ 0.456 2 *
健脾软肝方中剂量组	4.528 1 $\pm$ 0.569 8 *
健脾软肝方低剂量组	5.048 7 $\pm$ 0.897 4 *

注:与模型组比较 * $P < 0.05$;与正常组比较, $\Delta P < 0.05$



图 19 正常组($\times 400$)

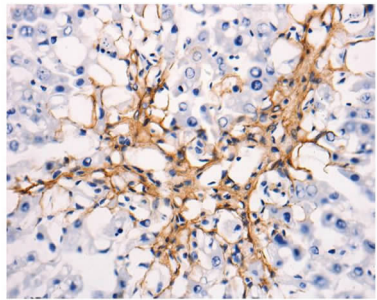


图 20 模型组($\times 400$)

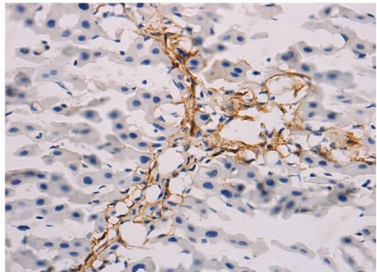


图 21 扶正化瘀胶囊组($\times 400$)

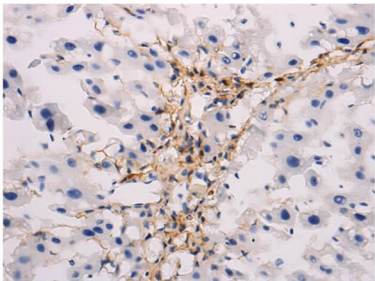


图 22 健脾软肝方高剂量组($\times 400$)

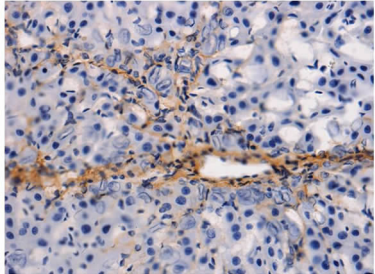


图 23 健脾软肝方中剂量组($\times 400$)

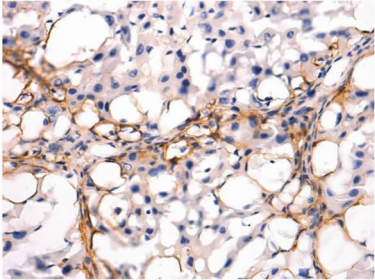


图 24 健脾软肝方低剂量组($\times 400$)

2.5 各组大鼠肝组织 α -SMA mRNA 的表达 肝组织 α -SMA mRNA 的表达:正常组与模型组比较,模型组显著上升($P < 0.05$);扶正化瘀胶囊组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);健脾软肝方高、中、低剂量组与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),高、中、低剂量组之间 α -SMA mRNA 表达水平逐渐升高,呈一定的药物依赖关系。

表 4 各组大鼠肝组织 α -SMA mRNA 的表达($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	α -SMA mRNA
正常组	0.4655 $\pm$ 0.0950
模型组	1.0036 $\pm$ 0.0452 Δ
扶正化瘀胶囊组	0.5236 $\pm$ 0.0687 *
健脾软肝方高剂量组	0.6057 $\pm$ 0.0127 *
健脾软肝方中剂量组	0.6502 $\pm$ 0.0162 *
健脾软肝方低剂量组	0.6988 $\pm$ 0.0541 *

注:与模型组比较 * $P < 0.05$;与正常组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

肝纤维化是一种慢性肝损伤导致的肝脏病理改变,HSC 的活化是肝纤维化发生的中心环节^[5]。HSC 在肝脏中称之为储脂细胞,属于肝脏间质细胞,正常情况下 HSC 呈卵圆状,位于肝索与肝窦壁之

间,可以贮藏脂肪与维生素 A,合成少量金属蛋白酶抑制剂等,当各种致病因素持续作用于肝脏时,通过复杂的机制激活 HSC。HSC 被激活后,转化为肌成纤维细胞,然后其在肝脏内合成胶原纤维、蛋白多糖及糖蛋白等,从而形成了 ECM 并大量堆积于肝脏中,最终导致肝纤维化的发生^[6]。平滑肌肌动蛋白共分为 γ 亚型、 α 、 β 3 型,其中 α -SMA 所占比例最高, α -SMA 存在于脊椎类动物细胞中,其在细胞内有丰富的能聚合成微丝,微丝可以撑起细胞的骨架,加强细胞的能动性,并可以促进细胞的收缩及形成^[7]。在生理条件下, α -SMA 主要由平滑肌细胞和肌成纤维细胞表达,其表达很少,仅存在于血管壁上。当 HSC 被激活后, α -SMA 表达大量增加,并附着于假小叶增生的纤维隔内。在各种急慢性肝病及相应的动物模型中,大鼠 HSC 在活化过程中丧失 Desmin,转而表达 α -SMA^[8]。 α -SMA 是 HSC 活化的特有标志物, α -SMA 的表达与 HSC 的活化、增殖、复制呈正相关^[9]。刘成^[10]教授观察肝纤维化形成过程中 α -SMA 与门脉压力变化之间的关系,研究发现随着肝纤维化程度的加重, α -SMA 的表达也逐渐增加,二者呈正相关,且随着 α -SMA 病变面积的扩大,门脉压力也随之增加,二者也呈正相关。

α -SMA 作为肝细胞内肌动蛋白之一,对肝纤维化的发生发展起重要作用,是肝星状细胞活化的重要标志。谢君等^[11]观察肝苏颗粒对 CCl_4 致肝纤维化大鼠肝功能和病理损伤的影响,免疫组化结果发现肝苏颗粒可以降低 α -SMA 蛋白的表达,改善肝功能,减轻肝纤维化的病变程度。邵佳亮等^[12]观察羟基喜树碱对 CCl_4 诱导的肝纤维化大鼠模型具有防治作用,结果发现羟基喜树碱可以抑制肝星状细胞的增殖,减少 α -SMA 蛋白的表达。本次实验,我们采用免疫组化 ABC 法检测大鼠肝组织中 α -SMA 蛋白的表达,通过结果,我们观察发现,正常组大鼠肝组织中仅在血管壁周围见少量 α -SMA 蛋白表达,模型组大鼠肝组织中见大量 α -SMA 蛋白表达,主要集中在汇管区、中央静脉及临近的肝窦区周围。扶正化瘀胶囊组,健脾软肝方高、中、低剂量组在汇管区也可见 α -SMA 蛋白的表达,但其病变程度比较模型组有所减轻,说明健脾软肝方可以减少 α -SMA 蛋白的表达。马力等^[13]观察疟母丸对进展期大鼠肝纤维化的干预作用,研究发现疟母丸可以显著的降低 α -SMA mRNA 的表达,抑制肝纤维化的进展,且这一机制与抑制 HSC 的活化有关。吴芙蓉等^[14]观察橙皮苷对化学性肝纤维化大鼠 α -SMA 表达的影响,实

验结果发现橙皮苷可以显著的降低大鼠肝组织中 α -SMA 及其 mRNA 的表达,提示橙皮苷对化学性肝纤维化大鼠具有很好的保护作用,其机制与抑制肝星状细胞的增殖、活化有关。本次实验,我们采用 Real-time PCR 法检测大鼠肝组织中 α -SMA mRNA 的表达,通过结果,我们观察发现,正常组大鼠肝组织中仅少量表达 α -SMA mRNA,正常组与模型组比较,模型组大鼠肝组织中 α -SMA mRNA 表达显著上升($P < 0.05$);扶正化瘀胶囊组与模型组比较,肝组织中 α -SMA mRNA 表达显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);健脾软肝方高、中、低剂量组肝组织中 α -SMA mRNA 表达也显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),高、中、低剂量组之间 α -SMA mRNA 表达水平逐渐升高,呈一定的药物依赖关系。由此可见,我们的结果与众多专家的研究结论相一致,说明健脾软肝方可以减少 α -SMA mRNA 的表达,其机制可能与抑制 HSC 的活化有关,从而起到治疗肝纤维化的作用。此外,大鼠肝脏病理组织学 Mallory 染色结果也显示,健脾软肝方高、中、低剂量组及扶正化瘀胶囊组大鼠肝组织汇管区有少量纤维结缔组织沉积,并少量脂肪空泡聚集,肝小叶的结构有一定程度的破坏,但总体破坏程度较模型组比较好,这进一步说明了健脾软肝方可以改善大鼠肝纤维化的病变程度。

参考文献

- [1] Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis[J]. Front Biosci, 2002, 7: d808-826.
- [2] 王吉耀. 抗肝纤维化治疗的途径[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(5): 311.
- [3] 陈文慧, 魏东, 马洁, 等. 健脾软肝方及拆方对 CCl_4 肝纤维化大鼠 MMP-2、MMP-9 活性及蛋白表达的影响[J]. 云南中医学院学报, 2007, 30(1): 29-32.
- [4] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南[J]. 中西医结合学报, 2006, 4(6): 551-555.
- [5] 任昌镇. 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.
- [6] Schnabl B, Kwon YO, Frederick JP, et al. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation[J]. Hepatology, 2001, 34(1): 89-100.
- [7] Halyko A J, Hassan S, Ma X F, et al. Marker of airway smooth muscle cell phenotype[J]. Am J Physiol LungCell Mol Physiol, 1996, 14(6): L1040.
- [8] Liu P, Zhang XY, Shao Y, et al. Microsatellite instability in gastric cancer and pre-cancerous lesions[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(31): 4904-4907.
- [9] 王者令, 刘中景, 宋霆, 等. 扶正活血不同组方对肝纤维化大鼠肝组织 α -平滑肌肌动蛋白和 Smad3 表达的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2010, 20(4): 231-233.

(下接第 2271 页)

通过影响钠离子的主动转运来干扰肠道内的水分分泌与吸收平衡,从而达到润肠通便的效果^[7-8];同时组方中其他中药对便秘也有不同的药理作用^[9-12]。

复方地芬诺酯片致大鼠便秘结果显示,大鼠排便数量减少,粪便重量降低,肠道推进率下降,结肠黏液量明显减少,杯状细胞萎缩,分泌黏液能力下降甚至丧失,结果表明此模型与临床上便秘患者的肠道病理改变吻合度较高,是研究便秘药物的较好模型。杯状细胞是肠道的正常细胞,具有分泌黏液、润滑和保护肠道黏膜的作用,其分泌功能下降可能是慢传输型便秘的根本原因,而肠道的微循环供养能力决定了杯状细胞的活力。本研究发现,首荟通便胶囊中、高剂量组可明显缩短大鼠首次排便时间($P < 0.05$),增加 12 h 排便颗粒数($P < 0.05$),并且能增加小肠碳墨推进率($P < 0.05$)。首荟通便胶囊中、高剂量组大鼠结肠黏膜黏液细胞数明显增多,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。做为临床常用的首荟通便胶囊中剂量,总体效果优于高剂量和低剂量,表明首荟通便胶囊中剂量在治疗便秘时达到了补泻平衡,剂量最佳。

综上所述,首荟通便胶囊能够有效地改善便秘症状,提高患者的生命质量,其作用机制可能与提高肠道动力,增加结肠黏液的分泌有关,更深层次的机理还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 祝飞美,李俊龙,倪小清,等. 苳归片对复方地芬诺酯便秘模型小鼠的治疗作用研究[J]. 四川生理科学杂志,2015,37(1):8-10.
- [2] 姚景春,冯芹,孙宝存. 己酮可可碱对慢传输型便秘模型大鼠的结肠黏液分泌和结肠肌电活动的影响[J]. 中国药理学通报,2011,27(12):1749-1752.

- [3] 中国医学会消化病学分会胃肠动力组. 中国慢性便秘诊治指南(2013,武汉)[J]. 中华消化杂志,2013,33(5):605-612.
- [4] 郭荣. 慢性功能性便秘中医证候诊断标准的量化研究[D]. 南京中医药大学,2011.
- [5] 常东,冯春霞,唐纯志,等. 自拟加味枳术四磨汤加减治疗慢性功能性便秘疗效观察[J]. 中国中西医结合消化杂志,2011,19(5):320-322.
- [6] 郑倩,徐华. 便秘动物模型的研究进展[J]. 临床消化病杂志,2012,24(3):189-191.
- [7] 姚一博,陆金根,曹永清,等. 中医药治疗慢性功能性便秘研究进展[C]. 沈阳:中华中医药学会肛肠分会换届会议暨便秘专题研讨会论文,2007.
- [8] Angelo A Izzo, Lidia Sautebin, Francesca Borrelli, et al. The role of nitric oxide in aloe-induced diarrhoea in the rat[J]. European Journal of Pharmacology, 1999, 368:43-48.
- [9] Ishii Y, Tanizawa H, Takino Y. Studies of aloe; III. Mechanism of cathartic effect[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1990, 38:197-200.
- [10] 梅雪,余刘勤,陈小云,等. 何首乌化学成分和药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究,2016,39(1):122-131.
- [11] 刘旭,杜爱林,姜洪波,等. 决明子对便秘小鼠结肠肌电和水通道蛋白 3 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(8):2145-2147.
- [12] 王文革,次苗苗,张俊红,等. 不同剂量生白术对慢传输型便秘大鼠胃肠道传输功能及 Cajal 间质细胞的影响[J]. 长春中医药大学学报,2016,32(1):18-21.
- [13] HE Mei-juan, YANG Jin-xiang, WEI Yue, et al. Effects of Fructus Aurantii Immaturus volatile oil on slow transit constipation in rats[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2013, 28(5):1487-1491.

(2018-06-06 收稿 责任编辑:张雄杰)

(上接第 2267 页)

- [10] 刘成,徐光福,陆雄,等. 二甲基亚硝胺诱发大鼠肝纤维化过程中 α 平滑肌肌动蛋白与门脉压力的变化[J]. 中国中西医结合消化杂志,2002,10(5):271-272,275.
- [11] 谢君,谢晓芳,代良萍,等. 肝苏颗粒对四氯化碳致肝纤维化大鼠肝功能和病理损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(8):117-123.
- [12] 邵佳亮,胡国信,郑洁,等. 羟基喜树碱对肝纤维化大鼠肝组织

- Bax、Bcl-2 基因和 α -SMA 蛋白表达及肝纤维化的影响[J]. 第二军医大学学报,2014,35(4):399-405.
- [13] 马力,马军梅. 疔母丸对进展期大鼠肝纤维化的干预作用研究[J]. 宁夏医学杂志,2016,38(12):1137-1140.
- [14] 吴芙蓉,姜玲,何晓丽,等. 橙皮苷对化学性肝纤维化大鼠 α -SMA 表达的影响[J]. 安徽医药,2015,19(12):2267-2271.

(2017-12-12 收稿 责任编辑:王明)