

益气逐瘀解毒颗粒调控 MMPs/TIMPs 平衡抗大鼠肝纤维化作用研究

李晖¹, 杨琪², 韩朋丽³, 林俊芝¹, 陈婧¹, 赵梓亦¹, 陈昌金¹

1. 成都中医药大学附属医院中心实验室, 四川 成都 610072

2. 湖南省湘潭市金侨医院, 湖南 湘潭 411202

3. 郑州市中心医院, 河南 郑州 451150

[摘要] 目的: 探讨益气逐瘀解毒颗粒对四氯化碳 (CCl₄) 诱导的大鼠肝纤维化的治疗作用及机制。方法: 将 SD 雄性大鼠给予 CCl₄ 橄榄油混合液进行皮下注射 7 周, 制备肝纤维化大鼠模型, 随机分为益气逐瘀解毒颗粒高、中、低剂量组、阳性对照组、模型组、空白组, 给予相应治疗, 5 周后处死大鼠, 检测外周血生化指标, 逆转录-定量 PCR 法和蛋白印迹法分别检测大鼠肝组织中基质蛋白酶 1 (Matrix metalloproteinase1, MMP-1)、MMP-2、MMP-9、MMP-13 及基质蛋白酶抑制因子 1 (tissue Inhibitor of metalloproteinases1, TIMP-1) 表达水平, 肝组织苏木精-伊红 (Hematoxylin-Eosin staining, HE 染色)、MASSON 染色检测肝纤维化程度。结果: 治疗后与空白组比较, 模型组的 ALT、AST 无显著性差异 ($P > 0.05$), MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-13 基因表达显著降低 ($P < 0.05$), TIMP-1 基因表达显著升高 ($P < 0.05$), 肝纤维化半定量计分 (SSS) 评分显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益气逐瘀解毒颗粒各剂量组 ALT、AST 无显著性差异 ($P > 0.05$), 益气逐瘀解毒颗粒高剂量组 MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-13 基因表达明显升高 ($P < 0.05$), 中剂量组 MMP-9、MMP-13 基因表达明显增高 ($P < 0.05$), 低剂量组 MMP-13 基因表达明显增高 ($P < 0.05$), 高、中剂量组 TIMP-1 基因表达明显降低 ($P < 0.05$), 益气逐瘀解毒颗粒各剂量组 MMP-2、MMP-9 蛋白表达量无显著性差异 ($P > 0.05$), 高、中剂量组 MMP-13 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$), 各剂量组 TIMP-1 蛋白表达量均显著下降 ($P < 0.05$), 以低剂量组下降尤为显著, 优于高、中剂量组 ($P < 0.05$), 各药物干预组 SSS 评分显著降低 ($P < 0.01$); 与阳性对照组比较, 益气逐瘀解毒颗粒各剂量组 ALT、AST 无显著性差异 ($P > 0.05$), 益气逐瘀解毒颗粒高剂量组 MMP-2 基因表达明显升高 ($P < 0.05$), 高、中剂量组 TIMP-1 基因表达明显降低 ($P < 0.05$), 益气逐瘀解毒颗粒高、中剂量组 MMP-13 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 益气逐瘀解毒颗粒各剂量组 TIMP-1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 低剂量组下降尤为显著, 优于高、中剂量组 ($P < 0.05$), 益气逐瘀解毒颗粒高、中、低剂量组 SSS 评分显著降低 ($P < 0.01$)。结论: 调控 MMPs/TIMPs 平衡可能是益气逐瘀解毒颗粒抗肝纤维化的作用机制之一, 其通过升高 MMP-13、降低 TIMP-1 表达水平, 调控 MMPs/TIMPs 平衡, 促进过度沉积的细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 降解, 改善 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠模型的肝脏功能, 从而改善其肝纤维化程度。

[关键词] 益气逐瘀解毒颗粒; 肝纤维化; MMPs/TIMPs 平衡; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 05-0017-06

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.05.005

Study on the Effect of Yiqi Zhuyu Jiedu Granule in Regulating the Balance of MMPs/TIMPs for Anti-liver Fibrosis in Rats

LI Hui, YANG Qi, HAN Pengli, LIN Junzhi, CHEN Jing, ZHAO Ziyi, CHEN Changjin

Abstract: Objective: To observe the clinical effect of Yiqi Zhuyu Jiedu granule for rats with liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl₄), and its functional mechanism. Methods: The model of SD male rats with liver fibrosis was established by subcutaneous injection of the mixture of CCl₄ and olive oil. The rats were divided into the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in high, middle and low doses, the positive control group, the model group and the blank group randomly, which received treatment accordingly. After 5 weeks, the rats were sacrificed. Detected biochemical indexes in the peripheral blood, measured the expression levels of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) in the liver tissue of rats respectively via reverse transcription PCR and Western blot, and detected the degree of liver fibrosis in the liver tissue via hematoxylin-eosin staining (HE) and MASSON staining. Results:

[收稿日期] 2018-08-02

[基金项目] 四川省科技厅项目 (2018SZ0401; 2017FZ0052; 2016FZ0093); 四川省中医药管理局项目 (2016C036); 成都中医药大学附属医院项目 (2016-D-YY-06)

[作者简介] 李晖 (1970-), 女, 教授, 研究方向: 肝纤维化基础与临床研究。

After treatment, comparing with the blank group, there was no significant difference being found in ALT and AST in the model group($P > 0.05$), the gene expression levels of MMP-1, MMP-2, MMP-9 and MMP-13 were significantly decreased ($P < 0.05$), the gene expression level of TIMP-1 was significantly increased($P < 0.05$), and the scores of Semiquantative scoring system(SSS)for liver fibrosis were significantly increased($P < 0.01$). Comparing with the model group, there was no significant difference being found in ALT and AST in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in each dose($P > 0.05$), the gene expression levels of MMP-1, MMP-2, MMP-9 and MMP-13 in the high-dose Yiqi Zhuyu Jiedu granule group were significantly increased($P < 0.05$), the gene expression levels of MMP-9 and MMP-13 in the middle-dose Yiqi Zhuyu Jiedu granule group were significantly increased($P < 0.05$), the gene expression level of MMP-13 in the low-dose Yiqi Zhuyu Jiedu granule group was significantly increased($P < 0.05$), and the gene expression level of TIMP-1 in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in high and middle doses was significantly decreased($P < 0.05$); there was no significant difference being found in the protein expression levels of MMP-2 and MMP-9 in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in each dose ($P > 0.05$), the protein expression level of MMP-13 in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in high and middle doses was significantly increased($P < 0.05$), the protein expression level of TIMP-1 in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in each dose was significantly decreased($P < 0.05$), and the protein expression level of TIMP-1 in the low-dose Yiqi Zhuyu Jiedu granule group was decreased particularly significantly, being better than that in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in high and middle doses($P < 0.05$); the scores of SSS in each medicine intervention group were significantly decreased ($P < 0.01$). Comparing with the positive control group, there was no significant difference being found in ALT and AST in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in each dose($P > 0.05$), the gene expression level of MMP-2 in the high-dose Yiqi Zhuyu Jiedu granule group was significantly increased($P < 0.05$), the gene expression level of MMP-1 in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in high and middle doses was significantly decreased($P < 0.05$); the protein expression level of MMP-13 in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in high and middle doses was significantly increased($P < 0.05$), the gene expression level of TIMP-1 in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in each dose was significantly decreased($P < 0.05$), and the protein expression level of TIMP-1 in the low-dose Yiqi Zhuyu Jiedu granule group was decreased particularly significantly, being better than that in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in high and middle doses($P < 0.05$); the scores of SSS in the groups of Yiqi Zhuyu Jiedu granule in each dose were significantly decreased($P < 0.01$). **Conclusion:** One of the functional mechanism of Yiqi Zhuyu Jiedu granule may be regulating the balance of MMPs/TIMPs by increasing the level of MMP-13 and decreasing the expression level of TIMP-1. It promotes the degradation of excessively deposited extracellular matrix (ECM) for rats with liver fibrosis induced by carbon tetrachloride(CCl_4), and promote liver functions of the model of rats with liver fibrosis induced by CCl_4 , thus to improve the degree of liver fibrosis.

Keywords: Yiqi Zhuyu Jiedu granule; Liver fibrosis; Balance of MMPs/TIMPs; Animal experiment; Rats

肝纤维化是细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的合成与降解失衡,最终导致 ECM 过度沉积的结果,是慢性肝病向肝硬化发展的必经病理过程,见于肝炎病毒、脂肪性肝病、酒精、代谢、自身免疫、药物、血吸虫等多种原因引起的大多数慢性肝病。晚期肝硬化和肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)等终末期肝病主要采取肝移植进行治疗,但由于肝脏供体的来源、排异反应以及治疗费用等问题使治疗极端困难,逆转肝纤维化是防止慢性肝病进展至肝硬化、HCC 的重要手段,目前已成为临床和基础研究关注的热点^[1]。

肝纤维化一旦触发,即呈现复杂的网络化调控模式,目前的生物或化学药物往往作用于其中某一个靶点,导致疗效不佳,中医药有多途径、多层次、多靶点综合药理作用的特点,使之在肝纤维化治疗方面发挥独特优势。益气逐瘀解毒颗粒紧

抓肝纤维化“气虚血瘀,湿热未清”的病机,以“益气逐瘀,活血解毒”为基本治则,在益气祛瘀的同时,清解湿热余毒,通畅气机,是笔者在临床上应用多年的经验方,可促进肝纤维化的消退,治疗肝纤维化有良好疗效,全方未使用名贵中药,价格低廉,但需要进一步明确其作用机制,本研究在构建四氯化碳(CCl_4)肝纤维化大鼠模型基础上,研究益气逐瘀解毒颗粒对该大鼠肝纤维化模型的治疗作用及作用机制,以便进一步推广益气逐瘀解毒颗粒的临床应用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 94 只,体质量为(220 ± 20) g,购自成都达硕实验有限公司,合格证编号: SCXK(川)201503。

1.2 实验药物 益气逐瘀解毒颗粒由成都中医药大学附属医

院药剂科制备,由党参、黄芪、莪术、当归、川芎、赤芍、丹皮、丹参、柴胡、黄芩等组成。全方药物加入8倍量水,浸泡40 min,煎煮3次,每次50 min,合并3次滤液,浓缩至相对密度1.3,加入糊精,混合,在75℃下鼓风干燥6 h,粉碎过筛,加入80%乙醇,制粒,65℃下鼓风干燥4 h,整粒,分包装至10 g每袋;阳性药物扶正化瘀胶囊购自上海黄海制药有限公司。

1.3 实验试剂及设备 MMP-2、MMP-9单克隆抗体,MMP-13、TIMP-1多克隆抗体购自英国abcam公司;生物素-链霉卵白素免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。7500荧光定量PCR仪为ABI公司产品。基质蛋白酶(Matrix metalloproteinase1, MMP-1)、MMP-2、MMP-9、MMP-13、基质蛋白酶抑制因子1(tissue Inhibitor of metalloproteinases1, TIMP-1)及 β -actin的上下游引物见表1。

表1 各检测指标上下游引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
MMP-1	F-TCTGGGTGTTTCGAGAGCAT; R-CCTGGATCCATGGACTGTGT
MMP-2	F-GCAACCACAACCACTACGA; R-CCAGTGTGAGTATCAGCATCAG
MMP-9	F-AAAGGTCGCTCGGATGGTTA; R-GGTAGTACTGCTTGCCCA
MMP-13	F-TGCTCCAGATGATGACGTT; R-TGCTCCAGATGATGACGTT
TIMP-1	F-TGCAACTCGGACCTGGTTAT; R-GCGTCGAATCCTTTGAGCAT
β -actin	F-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA; R-GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG

1.4 模型制备 用CCl₄、橄榄油混合液(按2:3配制而成)腹部皮下注射的方式,每周造模2次,根据大鼠的体质量,前4周给药剂量4 mL/kg,后3周给药剂量3 mL/kg,共7周。造模第7周末随机处死造模及空白组大鼠各5只,收集外周血,4℃离心20 min,血清检测生化指标,另取肝右叶组织标本,通过HE染色和MASSON染色确定肝纤维化模型制备成功。

1.5 动物分组及给药 造模结束后,肝纤维化模型大鼠随机分成益气逐瘀解毒颗粒高、中、低剂量组、阳性对照组及模型组,每组各14只,另设空白组14只。大鼠用药剂量根据等效体表面积公式计算,益气逐瘀解毒颗粒高、中、低剂量组服用生药分别为10.800、5.400、2.700 g/(kg·d),以4:2:1的浓度比将颗粒用温水溶解后等体积灌胃;阳性对照组使用扶正化瘀胶囊,药量为0.405 g/(kg·d),稀释成一定浓度,与益气逐瘀解毒颗粒组等体积灌胃;空白组、模型组均以等体积的蒸馏水灌胃,每天灌胃1次,连续5周。

1.6 标本采集及血清丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase, AST)检测 灌胃5周后,大鼠禁饮、禁食12 h,用10%苯巴比妥腹腔注射麻醉,开腹充分暴露腹主动脉,采血,4℃离心20 min,血清于-80℃保存备用;然后取出肝脏,剪下大小约0.6 cm×0.6 cm×0.6 cm的肝右叶组织,放入10%的中性甲醛中固定,常规石蜡包埋,切片备用。另取大小约0.1 cm×

0.1 cm×0.1 cm新鲜肝组织-80℃保存,以备q-PCR检测使用。采用速率法,全自动生化检测仪检测ALT、AST。

1.7 检测大鼠肝组织中MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-13、TIMP-1基因的表达 采用逆转录-荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测Trizol®Reagent提取转染细胞总RNA,取纯化后的总RNA进行逆转录,37℃水浴1.5 h以合成cDNA模板进行RT-qPCR检测,经过95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火、延伸15 s,共40个循环。以 β -actin为内参,测各基因的相对表达情况。

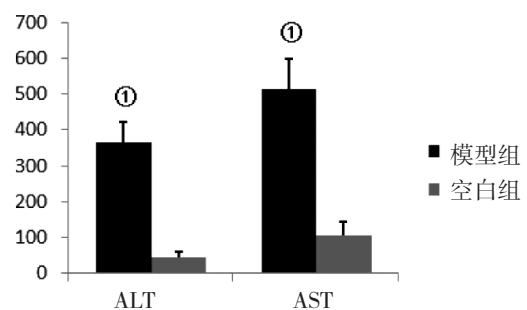
1.8 检测大鼠肝组织中MMP-2、MMP-9、MMP-13、TIMP-1蛋白的表达 RIPA裂解液及超声破碎,提取大鼠肝组织总蛋白,BCA检测蛋白浓度,SDS-PAGE电泳、转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭,分别加一抗、二抗孵育,经ECL发光,X线胶片曝光,显影及定影,并以计算机图像扫描进行图像分析,测定灰度值以计算蛋白的表达量。

1.9 HE染色、MASSON染色进行病理组织学观察 标本取自大鼠肝右叶,10%的中性甲醛固定,常规石蜡包埋,切片,分别进行肝组织的HE染色和MASSON染色。参照Knodell肝纤维化分期标准,对大鼠肝纤维化程度进行评估,并参照肝纤维化半定量计分系统(Semi-quantitative scoring system, SSS)计分标准,给予每个样本半定量评分。

1.10 统计学方法 用SPSS21.0统计软件分析数据,若各组满足正态分布、方差齐,同一指标间可采用单因素方差分析,组间两两比较,可采用独立样本t检验或非参数检验,所有资料用($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后空白组与模型组血清ALT、AST检测结果比较 见图1。与空白组比较,模型组大鼠血清中ALT、AST均明显增高($P < 0.05$),提示造模成功。

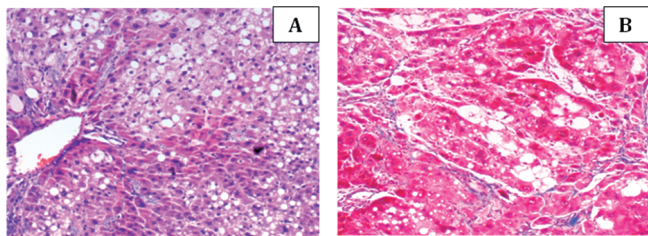


与空白组比较,① $P < 0.05$

图1 造模后空白组与模型组血清ALT、AST检测结果比较

2.2 造模后模型组病理组织学观察结果 见图2。第7周造模结束时肝脏外观出现明显改变,萎缩质硬,色暗无光泽,表面明显颗粒样凸起,边缘钝可见;HE染色可见肝索排列明显紊乱,肝小叶结构破坏,可见瘀血形成,肝纤维化不仅仅局限在中央静脉和汇管区周围,而是弥漫整个视野;MASSON染色

可见肝纤维化已从中央静脉和汇管区周围向外周延伸,有形成假小叶的趋势,参照 Knodell 肝纤维化分期标准,造模第7周,肝纤维化分级达3级,肝纤维化模型制备成功。



A. 肝组织 HE 染色结果 ($\times 100$); B. 肝组织 MASSON 染色结果 ($\times 100$)

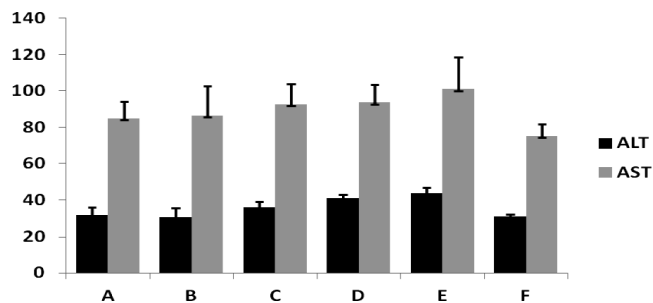
图2 造模后模型组病理组织学观察结果

2.3 治疗后各组大鼠血清 ALT、AST 检测结果比较 见图3。与空白组比较,模型组 ALT、AST 无显著性差异($P > 0.05$);与模型组比较,益气逐瘀解毒颗粒各剂量组 ALT、AST 无显著性差异($P > 0.05$);与阳性对照组比较,益气逐瘀解毒颗粒各剂量组 ALT、AST 无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4 治疗后各组大鼠 MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-13、TIMP-1 基因表达结果比较 见图4。与空白组比较,模型组 MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-13 基因表达显著降低($P < 0.05$),TIMP-1 基因表达显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,益气逐瘀解毒颗粒高剂量组 MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-13 基因表达明显升高($P < 0.05$),中剂量组 MMP-9、MMP-13 基因表达明显增高($P < 0.05$),低剂量组 MMP-13 基因表达明显增高($P < 0.05$),高、中剂量组 TIMP-1

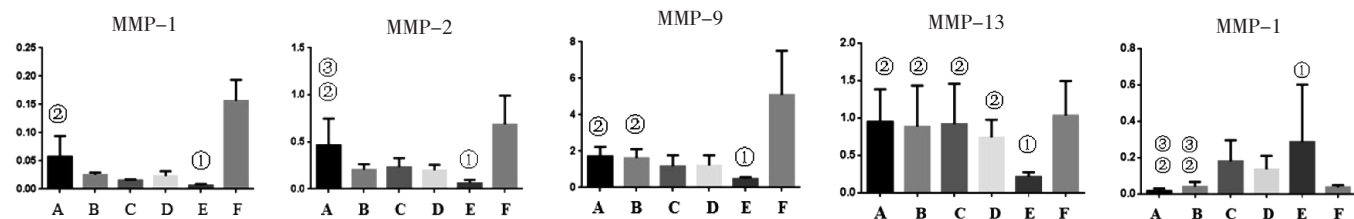
基因表达明显降低($P < 0.05$);与阳性对照组比较,益气逐瘀解毒颗粒高剂量组 MMP-2 基因表达明显升高($P < 0.05$),高、中剂量组 TIMP-1 基因表达明显降低($P < 0.05$)。

2.5 治疗后各组大鼠 MMP-2、MMP-9、MMP-13、TIMP-1 蛋白表达结果比较 见图5。与空白组比较,模型组 TIMP-1 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,益气逐瘀解毒颗粒高、中剂量组 MMP-13 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$),益气逐瘀解毒颗粒各剂量组 TIMP-1 蛋白表达量均显著下降($P < 0.05$),以低剂量组下降尤为显著,优于高、中剂量组($P < 0.05$);与阳性对照组比较,益气逐瘀解毒颗粒高、中剂量组 MMP-13 蛋白表达量显著升高($P < 0.05$),益气逐瘀解毒颗粒各剂量组 TIMP-1 蛋白表达量显著降低($P < 0.05$),低剂量组下降尤为显著。



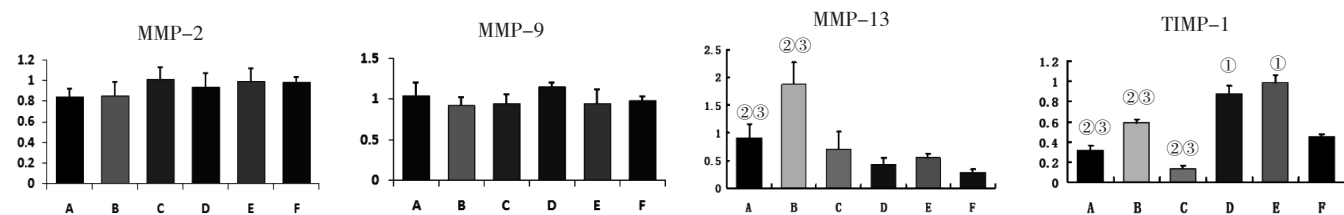
A. 益气逐瘀解毒颗粒高剂量组; B. 益气逐瘀解毒颗粒中剂量组; C. 益气逐瘀解毒颗粒低剂量组; D. 阳性对照组; E. 模型组; F. 空白组

图3 治疗后各组大鼠血清 ALT、AST 检测结果比较



A. 益气逐瘀解毒颗粒高剂量组; B. 益气逐瘀解毒颗粒中剂量组; C. 益气逐瘀解毒颗粒低剂量组; D. 阳性对照组; E. 模型组; F. 空白组。与空白组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与阳性对照组比较,③ $P < 0.05$

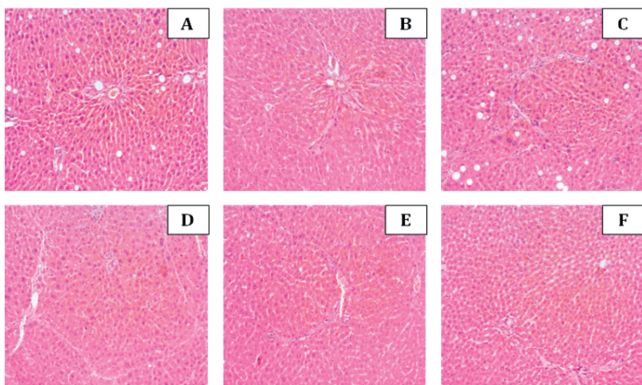
图4 治疗后各组大鼠 MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-13 及 TIMP-1 基因表达结果比较



A. 益气逐瘀解毒颗粒高剂量组; B. 益气逐瘀解毒颗粒中剂量组; C. 益气逐瘀解毒颗粒低剂量组; D. 阳性对照组; E. 模型组; F. 空白组。与空白组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与阳性对照组比较,③ $P < 0.05$

图5 治疗后各组大鼠 MMP-2、MMP-9、MMP-13、TIMP-1 蛋白表达结果比较

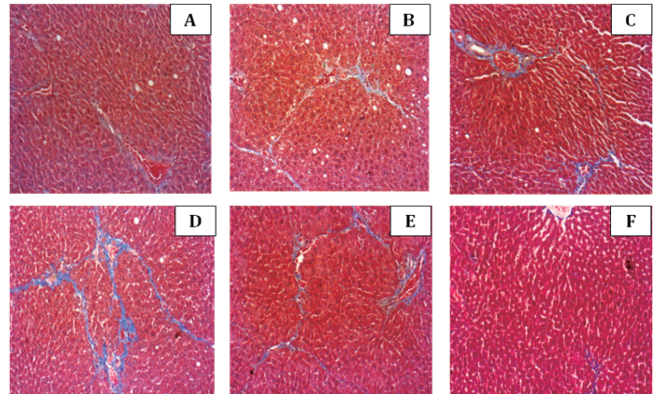
2.6 治疗后各组大鼠肝组织 HE 染色结果比较 见图 6。模型组可见肝索排列不齐,肝细胞浆内数量不等、大小不一的空泡样变及纤维组织增生,在中央静脉和小叶间静脉周围,还形成较粗的纤维间隔向周围延伸分割肝小叶结构,有的肝细胞可见核分裂相,少数肝细胞出现点状坏死,汇管区可见扩大,肝纤维化分级多数在 3 级或以上;益气逐瘀解毒颗粒高剂量组肝索排列整齐,肝组织被膜完整,肝小叶结构清晰,少数肝细胞的胞浆内有数量不等、大小不一的空泡样变,少数小叶周边可见有纤维组织增生,肝纤维化分级在 1 级左右;益气逐瘀解毒颗粒中剂量组肝纤维化分级在 2 级左右;益气逐瘀解毒颗粒低剂量组在中央静脉和小叶间静脉周围可见纤维组织增生,小叶周边也可见纤维组织增生,可见少数肝细胞崩解坏死及核分裂相,肝纤维化分级在 3 级及以下;阳性对照组在中央静脉和小叶间静脉周围可见纤维组织增生,小叶周边也可见纤维组织增生,形成纤细的纤维间隔向周围延伸,将肝小叶结构分割开,肝纤维化分级大部分在 3 级左右;空白组无肝纤维化。



A. 益气逐瘀解毒颗粒高剂量组; B. 益气逐瘀解毒颗粒中剂量组; C. 益气逐瘀解毒颗粒低剂量组; D. 阳性对照组; E. 模型组; F. 空白组

图 6 治疗后各组大鼠肝组织 HE 染色结果比较 (×100)

2.7 治疗后各组大鼠肝组织 MASSON 染色及其 SSS 计分结果 见图 7、表 2。益气逐瘀解毒颗粒高、中剂量组,胶原纤维含量较少,一般分布在汇管区、中央静脉及其周围,肝小叶结构清晰;益气逐瘀解毒颗粒低剂量组中可见胶原纤维增多,并形成细条索状结构逐渐延伸至周围,延伸距离较短,尚未形成假小叶;阳性对照组可见胶原纤维明显增多,少部分肝小叶结构被纤维间隔分割;模型组中肝纤维化增生更加明显,形成较粗的纤维间隔向周围延伸分割肝小叶,同时伴有肝细胞明显的空泡样变;空白组中仅有少量的胶原纤维分布在汇管区和中央静脉周围。与空白组比较,模型组 SSS 评分显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各个药物干预组 SSS 评分显著降低($P < 0.01$);与阳性对照组比较,益气逐瘀解毒颗粒高、中、低剂量组 SSS 评分显著降低($P < 0.01$);益气逐瘀解毒颗粒各剂量组比较,SSS 评分无显著差异。



A. 益气逐瘀解毒颗粒高剂量组; B. 益气逐瘀解毒颗粒中剂量组; C. 益气逐瘀解毒颗粒低剂量组; D. 阳性对照组; E. 模型组; F. 空白组

图 7 治疗后各组大鼠肝组织 MASSON 染色结果 (×100)

表 2 治疗后各组大鼠肝组织 MASSON 染色 SSS 计分结果 分

组别	鼠数	SSS
空白组	8	0.750 0±0.46
模型组	8	26.000 0±3.28 ^①
阳性对照组	8	12.785 7±8.99 ^②
益气逐瘀解毒颗粒低剂量组	8	5.333 3±1.21 ^{②③}
益气逐瘀解毒颗粒中剂量组	8	4.166 7±1.32 ^{②③}
益气逐瘀解毒颗粒高剂量组	8	2.000 0±0.63 ^{②③}

与空白组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.01$;与阳性对照组比较,③ $P < 0.01$

3 讨论

中医学并无肝纤维化概念,肝纤维化的病变结果肝硬化,属于中医“肝积”“癥积”“积聚”等范畴。湿热是肝纤维化的始动因素和关键环节,并贯穿疾病始终,瘀血阻络是重要的病理基础,病理过程由实而虚、由气及血、由轻到重动态变化,且沿“湿热-血瘀-瘀热-气阴亏耗”进展,“气虚血瘀”为本病的核心病机^[2-5]。对于在四川盆地湿热型地域的患者,仅从“气虚血瘀”论治,往往由于湿热未清而难以获得良好疗效。结合“气虚血瘀,湿热未清”的病机学说,益气逐瘀解毒颗粒以“益气逐瘀,活血解毒”为本,由膈下逐瘀汤合小柴胡汤加减化裁而成;在益气祛瘀的同时,清解湿热余毒,通畅气机,是笔者在临床上应用多年的经验方,可促进肝纤维化的消退,有良好疗效。其基本药物为莪术、黄芪、党参、丹参、当归、川芎、赤芍、绞股蓝、丹皮、柴胡、黄芩、桔梗、枳壳、甘草,其中莪术破血逐瘀,黄芪益气扶正,共为君药;党参助黄芪益气,补脾气升清阳,当归、川芎补血、活血、行气,与逐瘀药同用,使瘀血祛而又不伤阴血,丹参助莪术活血祛瘀,丹皮清热凉血,活血化瘀,赤芍养血活血,绞股蓝味苦,性寒,清热解毒,以解未尽之热毒,共为臣药;桔梗、枳壳一升一降,宽胸行气,柴胡、黄芩和解少阳,黄芩清泄少阳

半里湿热,柴胡疏肝解郁,升达清阳,与枳壳、桔梗同用,尤善理气行滞,气行则血行,共为佐药;甘草为使,调和诸药。全方配伍得当,标本兼治。

本研究 CCl₄ 皮下注射 7 周后,进行外周血生化指标的检测,发现模型大鼠血清中 ALT、AST 均出现明显的增高,提示 CCl₄ 皮下注射后,模型组大鼠出现明显的肝功能损害,进一步进行病理组织学检测,HE 染色和 MASSON 染色提示肝索排列紊乱,肝小叶结构破坏,瘀血形成,肝纤维化弥漫整个视野,参照 Knodell 肝纤维化分期标准,肝纤维化分级达 3 级,提示肝纤维化模型制备成功。益气逐瘀解毒颗粒灌胃治疗肝纤维化模型大鼠 5 周后,进行外周血生化指标的检测,发现各组 ALT、AST 均在正常范围内,说明各治疗组的肝细胞损伤造成的 ALT、AST 升高均在治疗后恢复,而模型组大鼠也恢复正常,说明大鼠也具有一定的肝功能自我修复能力。肝组织学分析被公认为诊断、评估肝纤维化严重程度的最佳技术,Knodell 评分系统及其修订版 Ishak 评分系统,常被用于评判肝纤维化的分级和分期。益气逐瘀解毒颗粒治疗肝纤维化大鼠模型后,肝纤维化程度显著改善,以高、中剂量组更明显,显著优于模型组和阳性对照组;MASSON 染色半定量评分结果中,益气逐瘀解毒颗粒各剂量组评分均较模型组和阳性对照组低,抗纤维化效果优于阳性对照组。

由胶原、纤维连接蛋白、蛋白聚糖、层粘连蛋白等组成的 ECM 合成与降解失衡,过度沉积最终导致肝纤维化形成,因此恢复 ECM 的合成与降解平衡是治疗肝纤维化的重要途径。MMPs 及 TIMPs 是参与 ECM 组分降解的蛋白水解酶家族及其抑制因子^[9],MMPs/TIMPs 平衡在维护肝脏稳态过程中发挥重要作用,肝纤维化进展与 MMPs/TIMPs 失衡导致 ECM 过度沉积密切相关^[7]。其中 MMP-1、MMP-8、MMP-13 属于胶原酶类,MMP-2、MMP-9 属于明胶酶类,TIMP-1 是最重要的基质蛋白酶抑制剂,通过调节 MMPs、TIMPs 的平衡进行 ECM 的重塑,可能达到治疗肝纤维化的目的^[6~11]。鉴于益气逐瘀解毒颗粒治疗肝纤维化大鼠模型后,大鼠肝纤维化程度得到显著改善,其过程可能与调控 MMPs/TIMPs 平衡有一定的相关性,基于此设想,益气逐瘀解毒颗粒灌胃治疗肝纤维化模型大鼠 5 周后,笔者分别采用 RT-qPCR 和 Western Blot 法检测了 MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-13 及 TIMP-1 的表达水平,其中 MMP-1 因缺乏大鼠特异性单克隆抗体,未进行 Western Blot 检测。RT-qPCR 法检测结果和 Western Blot 法检测结果均显示,益气逐瘀解毒颗粒可能通过升高 MMP-13 的表达及降低 TIMP-1 的表达,达到抗肝纤维化的目的,且该作用优于扶正化瘀胶囊。

综上,益气逐瘀解毒颗粒治疗肝纤维化模型大鼠的机制之一可能是通过升高 MMP-13、降低 TIMP-1 表达水平,调控

MMPs/TIMPs 平衡,促进过度沉积的 ECM 降解,改善 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠模型的肝功能,从而改善 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠的肝纤维化程度,因此,调控 MMPs/TIMPs 平衡可能是益气逐瘀解毒颗粒的作用机制之一。肝纤维化发病机制复杂,一旦触发,即呈网络化调控模式,益气逐瘀解毒颗粒的抗肝纤维化作用机制及关键靶点尚需要进一步明确完善。

[参考文献]

- [1] ROSENBLOOM J, MACARAK E, PIERA-VELAZQUEZ S, et al. Human Fibrotic Diseases: Current challenges in Fibrosis Research[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1627: 1-23.
- [2] 叶放,薛博瑜,周珉,等.论湿热瘀毒与肝纤维化[J].*南京中医药大学学报*, 2005, 21(6): 346-349.
- [3] 吕媛媛,薛博瑜.关幼波治疗慢性肝病经验[J].*河南中医*, 2013, 33(4): 521-522.
- [4] 戴克敏.姜春华治疗肝病验方[J].*山西中医*, 2007, 23(6): 10-11.
- [5] 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.
- [6] ROEB E. Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects) [J]. *Matrix Biol*, 2018, 68-69: 463-473.
- [7] 谭勤锐,李晖,杨琪,等.基质金属蛋白酶及其特定抑制剂在肝纤维化形成中的作用研究进展[J].*山东医药*, 2017, 57(34): 109-111.
- [8] ROBERT S, GICQUEL T, VICTONI T, et al. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis [J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(4): e00360.
- [9] DUARTE S, BABER J, FUJII T, et al. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis [J]. *Matrix Biol*, 2015, 44-46: 147-156.
- [10] GIANNANDREA M, Parks W C. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis[J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(2): 193-203.
- [11] HAN Y P. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21(Suppl.3): S88-S91.

(责任编辑:冯天保,钟志敏)