

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.13.002

文章编号: 1005-8982(2017)13-0006-08

肝纤溶颗粒与复方鳖甲软肝片对大鼠肝纤维化模型细胞凋亡及内质网应激相关因子表达影响研究*

钟军华,袁勇,宋飞飞,杨世忠,林丹
(海南医学院第一附属医院,海南 海口 570102)

摘要:目的 探究肝纤溶颗粒与复方鳖甲软肝片对大鼠肝纤维化模型细胞凋亡及内质网应激相关因子表达影响。**方法** 48 只雄性清洁级 SD 大鼠随机分为:正常对照组、模型对照组、复方鳖甲软肝片组及肝纤溶颗粒组,每组各 12 只。除正常对照组外各组复制肝纤维化模型。于复制模型后的 3 周各组大鼠同时给药,正常对照组与模型对照组大鼠给予生理盐水 1.5 ml/kg 灌胃,1 次/d;复方鳖甲软肝片组给予 33.3%复方鳖甲软肝片溶液 1.5 ml/kg 重灌胃,1 次/d;肝纤溶颗粒组给予 33.3%肝纤溶颗粒溶液 1.5 ml/kg 灌胃,1 次/d。各组连续用药 6 周。实验开始后第 3、6 和 9 周对各组大鼠肝脏病理学、细胞凋亡数量、肝纤维化指标水平以及内质网应激相关指标进行检测。**结果** 与其他各组相比,肝纤溶颗粒组纤维增生程度评分下降($P < 0.05$),肝凋亡数下降($P < 0.05$);透明质酸、层黏连蛋白、血清Ⅲ型前胶原、血清Ⅳ型胶原水平下降($P < 0.05$);CHOP、ATF6 蛋白表达水平下降($P < 0.05$)。**结论** 肝纤溶颗粒组肝纤维化大鼠细胞凋亡数量和肝纤维化水平较复方鳖甲软肝片组下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),肝纤溶颗粒能够改善肝脏病理变化,调节内质网应激相关指标,对临床有指导意义。

关键词: 肝纤溶颗粒;复方鳖甲软肝片;大鼠肝纤维化模型;细胞凋亡;内质网应激相关因子

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of Hepatic Fibrinolysis Granules combined with Fufang Biejia Ruangan Tablets on apoptosis and endoplasmic reticulum related factor expressions in rat hepatic fibrosis model*

Jun-hua Zhong, Yong Yuan, Fei-fei Song, Shi-zhong Yang, Dan Lin
(Department of Traditional Chinese Medicine, the Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570102, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Hepatic Fibrinolysis Granules combined with Fufang Biejia Ruangan Tablets on cell apoptosis and endoplasmic reticulum (ER) related factor expressions in rat hepatic fibrosis model. **Methods** A total of 48 male SD rats of clean grade were randomly divided into normal control group, model control group, Biejia Ruangan Tablets group and Hepatic Fibrinolysis Granules group with 12 rats in each group. The hepatic fibrosis models were copied in all the groups except the normal control group. After the model was made for 3 weeks, the rats were given medicines at the same time. In the normal control group and the model control group the rats were given intragastric administration of 1.5 ml/kg normal saline, once a day. In the Fufang Biejia Ruangan Tablets group the rats were given 33.3% Fufang Biejia Ruangan Tablets solution 1.5 ml/kg for gavage, once a day. In the Hepatic Fibrinolysis Granules group the rats were given 33.3% Hepatic Fibrinolysis solution 1.5 ml/kg for gavage, once a day. The medication continued for 6 weeks. In the 3rd, 6th and 9th week of the experiment, the liver pathology was observed, the number of apoptosis cells and the levels of hepatic fibrosis indexes and ER-related indexes were detected in all the groups. **Results** Compared with other groups, the fibrosis grade score significantly decreased ($P <$

收稿日期:2016-12-15

* 基金项目:海南省卫计委科学课题(琼卫 2011-54)

0.05); the number of apoptotic hepatocytes was significantly reduced ($P < 0.05$); the levels of hyaluronic acid, laminin, serum type III procollagen and type IV collagen were decreased significantly ($P < 0.05$); CHOP and ATF6 expression levels also decreased significantly ($P < 0.05$) in the Hepatic Fibrinolysis Granules group. **Conclusions** Hepatic Fibrinolysis Granules decrease the number of apoptosis cells and hepatic fibrosis level in rats with hepatic fibrosis. They are better than Biejia Ruangan Tablets in improvement of the pathological changes of liver and adjustment of endoplasmic reticulum related indicators, therefore have clinical significance.

Keywords: Hepatic Fibrinolysis Granules; Biejia Ruangan Tablets ; rat model of hepatic fibrosis; cell apoptosis; endoplasmic reticulum related factor

各种慢性肝病,包括病毒性肝炎、酒精性肝病以及非酒精性脂肪肝等肝脏疾病有相当一部分会转化为肝硬化,从而引起肝癌,甚至死亡,其中肝纤维化是关键的一个步骤,而早期肝纤维化是一种可逆性病^[1],因此临床研究以如何阻断纤维化的进展为预防肝硬化及肝癌的重要课题之一。肝纤维化是由于肝内胶原沉积增多,肝脏结构受损导致患者出现消化功能障碍、糖代谢异常、凝血功能紊乱与肝缺血再灌注损伤^[2]。西药治疗肝纤维化的研发仍处于临床研究阶段,并无高效、无明显毒副作用的药物。祖国医学大量的临床研究资料为肝纤维化提供了基础治疗契机,在改善临床症状等诸多方面存在较大潜力。肝纤溶颗粒是一种由鳖甲、黄芪、三七、紫河车、丹参制成的中药复方^[3],临床应用具有活血化瘀、益气软坚的疗效。曾有研究显示,肝纤溶颗粒能够减轻炎症反应^[4],缓解肝细胞变性坏死,对急性慢性肝炎及肝纤维化有良好的预防和治疗作用。但现今对本品靶点及其分子机制尚未进行深入研究。本研究采用复制动物模型及中药干预的方法,深入探讨肝纤溶颗粒对肝纤维化的药效机制和复方有效成分的作用机制是否与内质网应激途径相关,为临床防治肝纤维化提供新的防治策略和有效方法提供新的实验依据和方法论的指导。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

复方鳖甲软肝片,0.5 g/片(批号:20130511,内蒙古福瑞医疗科技股份有限公司),肝纤溶颗粒(鳖甲、黄芪、三七、紫河车、丹参组成,长春中医药大学附属医院制剂室提供),四氯化碳(上海子起生物科技有限公司),甲醛(上海嵘威达实业有限公司)。

恒温液压动物手术台(上海玉研科学仪器有限公司),石蜡包埋机(湖北泰康医疗设备有限公司),LVEM5 台式透射电子显微镜(Quantum 量子科学仪器贸易北京有限公司),Stratos 台式离心机(赛默飞

世尔科技),全自动生化分析仪(江苏省医药动物实验基地),放射性检测仪(北京东方德教育科技有限公司北科研发中心),WD-9413B 型凝胶成像分析系统(上海巴玖实业有限公司)。

大鼠透明质酸(HA)ELISA kit(上海古朵生物科技有限公司),层黏连蛋白(LN) Elisa kit(南京赛泓瑞生物科技有限公司),大鼠Ⅲ型前胶原(PCⅢ) ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司),大鼠Ⅳ型胶原(CoⅣ)ELISA 试剂盒(上海金穗生物科技有限公司),细胞凋亡-原位缺口末端标记法(TUNEL)(北京永欣康泰科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组 采用健康清洁级雄性 SD 大鼠 48 只,鼠龄为 7 周龄,体重为(200 ± 20)g,购买于南京君科生物工程有限公司,许可证号: RAWMX-90011。随机分为正常对照组、模型对照组、复方鳖甲软肝片组及肝纤溶颗粒组,每组各 12 只。分笼饲养,确保正常饮食和饮水。大鼠适应性喂养 1 周适应环境,动物自由进食、水,实验室温度维持在 25℃。

1.2.2 肝纤维化模型复制^[5] 除正常对照组外,其余 3 组健康清洁级雄性 SD 大鼠进行模型复制。给予 40% CCL₄ 色拉油溶液皮下注射给药,首次剂量为 0.5 ml/kg,以后剂量按照 0.3 ml/kg 注射,3 次/周,连续用药 6 周。

1.2.3 药品制备及应用 用研钵将复方鳖甲软肝片研磨成粉末状,将其与无菌蒸馏水混合调制为浓度为 33.3%的复方鳖甲软肝片溶液;将肝纤溶颗粒与无菌蒸馏水混合调制为浓度为 33.3%的肝纤溶颗粒溶液。于复制模型后的 3 周各组大鼠同时给药,正常对照组与模型对照组大鼠给予生理盐水 1.5 ml/kg 灌胃,1 次/d;复方鳖甲软肝片组给予 33.3%复方鳖甲软肝片溶液 1.5 ml/kg 重灌胃,1 次/d;肝纤溶颗粒组给予 33.3%肝纤溶颗粒溶液 1.5 ml/kg 灌胃,1 次/d。各组连续用药 6 周。

1.3 观察指标

于实验开始后第 3、6、9 周最后一次给药 2 h 后, 每组随机选取 4 只进行相关实验观察。

1.3.1 肝脏病理学检测 大鼠股动脉放血处死, 取肝左叶, 切分为 3 mm × 1 mm × 1 mm 大小, 用 10% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, 进行 HE 染色, 光镜下观察炎症反应及纤维组织增生等病理变化情况。将纤维增生程度分为 0~4 级, 0 级无纤维化; 1 级为纤维结缔组织仅局限于汇管区或存在汇管区扩大的区域, 出现向小叶发展的倾向; 2 级为纤维结缔组织增生侵入肝小叶 2/3 和 1 级有相同的变化; 3 级为纤维结缔组织增生侵入小叶甚至到达中央静脉周围; 4 级为纤维结缔组织蔓延整个小叶, 并存在多处弥漫性增生, 形成假小叶, 与 3 级有相同的变化。分别为 0、1、2、3、4 分。

1.3.2 细胞凋亡的检测 采用 TdT 介导的脱氧尿嘧啶缺口末端标 (TUNEL) 法检测各组大鼠肝细胞凋亡情况, 分别记录每个高倍视野内的肝凋亡细胞数量, 取平均值。

1.3.3 肝纤维化指标 取大鼠腹主动脉血, 分离血清, 采用放射性免疫分析法检测血清透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、层黏连蛋白 (laminin, LN)、III 型前胶原 (PC III) 以及 IV 型胶原 (CIV) 水平。

1.3.4 内质网应激相关指标的检测 鼠肝中叶取材, 行 ATF6 和 CHOP 免疫组织化学显色。

1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 同一时间点不同组间首先进行方差分析, 利用 LSD-*t* 检验进行组间比较; 使用配对 *t* 检验对不同时间点内同一组之间差异进行分析。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 纤维增生程度评分比较

在相同用药时间内 4 组之间差异具有统计学意义 (P < 0.05), 复方鳖甲软片组 ($t = -3.629, P = 0.011$)、肝纤溶颗粒对照组 ($t = -6.382, P = 0.001$) 的纤维增生程度评分低于模型组, 并且肝纤溶颗粒组低于复方鳖甲软片组 ($t = -3.416, P = 0.014$), 差异具有统计学意义。复方鳖甲软片组 ($F = 8.134, P = 0.020$)、肝纤溶颗粒组 ($F = 26.148, P = 0.001$) 的纤维增生程度评分用药后 3~9 周呈下降趋势, 差异具有统计学意义; 与复方鳖甲软片组比较, 肝纤溶颗粒组的纤维增生程度评分下降, 差异具有统计学意义 (P < 0.05), 见表 1。

2.2 肝凋亡数的表达值比较

肝纤溶颗粒组在肝凋亡数上低于复方鳖甲软片组, 在相同用药时间内, 复方鳖甲软片组和肝纤溶颗粒组之间差异无统计学意义 (P = 0.189), 但它们与模型对照组 (P = 0.000) 和正常对照组 (P = 0.000) 之间差异均具有统计学意义。复方鳖甲软片组 ($F = 1.282, P = 0.344$)、肝纤溶颗粒组 ($F = 4.021, P = 0.078$) 的肝凋亡数用药后 3~9 周呈下降趋势, 但差异不具有统计学意义; 与复方鳖甲软片组比较, 肝纤溶颗粒组的肝凋亡数除在第 3 周无统计学意义外 ($t = 1.703, P = 0.078$), 在 6 和 9 周均有统计学意义 ($t = 2.496$ 和 $3.992, P = 0.047$ 和 0.007), 见表 2 和图 1。

2.3 肝纤维化指标含量比较

复方鳖甲软片组和肝纤溶颗粒组在大鼠血清 HA 含量上低于模型对照组, 方差分析显示这两组与模型对照组在不同给药时间内差异均有统计学意义。配对 *t* 检验结果显示它们与正常对照组以及彼此之间比较差异均无统计学意义 (复方鳖甲软片组

表 1 各组大鼠纤维增生程度评分比较 ($n = 4$, 分, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 周	6 周	9 周	F 值	P 值
正常对照组	1.20 ± 0.13	1.34 ± 0.14	1.19 ± 0.18	-	-
模型对照组	28.02 ± 3.19	28.02 ± 3.19	28.02 ± 3.19	-	-
复方鳖甲软片组	21.05 ± 2.14 ¹⁾	16.93 ± 2.00 ¹⁾	14.28 ± 1.54 ¹⁾	8.134	0.020
肝纤溶颗粒组	16.14 ± 1.92 ¹⁾²⁾	10.08 ± 1.02 ¹⁾²⁾	8.38 ± 1.00 ¹⁾²⁾	26.148	0.001
F 值	97.736	99.961	114.301		
P 值	0.000	0.000	0.000		

注: 1) 与模型对照组比较, P < 0.05; 2) 与复方鳖甲软片组比较, P < 0.05

表 2 各组大鼠肝凋亡数的表达值比较 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 周	6 周	9 周	F 值	P 值
正常对照组	1.37 ± 0.16	1.33 ± 0.16	1.35 ± 0.15	-	-
模型对照组	7.08 ± 0.70	7.14 ± 0.76	7.11 ± 0.74	-	-
复方鳖甲软片组	4.10 ± 0.44 ¹⁾	3.74 ± 0.43 ¹⁾	3.56 ± 0.39 ¹⁾	1.282	0.344
肝纤溶颗粒组	3.52 ± 0.52 ¹⁾	3.04 ± 0.36 ¹⁾	2.59 ± 0.29 ¹⁾²⁾	4.021	0.078
F 值	67.956	77.747	91.248		
P 值	0.000	0.000	0.000		

注:1)与模型对照组比较,P<0.05;2)与复方鳖甲软片组比较,P<0.05

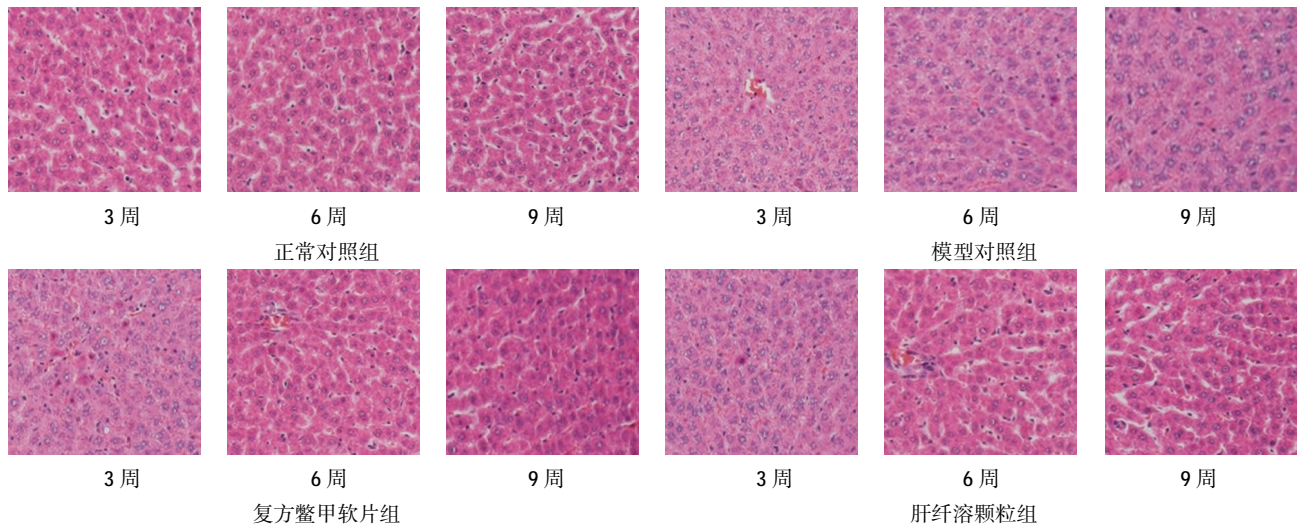


图 1 各组大鼠肝细胞凋亡情况 (× 200)

vs 正常对照组, $P=0.054$; 肝纤溶颗粒组 vs 正常对照组, $P=0.727$; 复方鳖甲软片组 vs 肝纤溶颗粒组, $P=0.263$ 。方差分析显示复方鳖甲软片组 ($F=8.268$, $P=0.019$) 和肝纤溶颗粒组 ($F=6.572$, $P=0.031$) 的大鼠 HA 含量在用药后 3~9 周呈下降趋势, 差异具有统计学意义。见表 3。

复方鳖甲软片组和肝纤溶颗粒组的大鼠血清 LN 含量随给药时间增加而略微增加并且它们的含量均低于模型对照组。方差分析显示在给药 3 和 6 周这两组与模型对照组中大鼠血清 LN 含量对比差异均无统计学意义 ($P=0.086$ 和 0.172), 而在给药 9

周后大鼠血清 LN 含量与模型对照组比较, 差异有统计学意义 ($P=0.000$)。方差分析结果表明复方鳖甲软片组中大鼠血清 LN 含量随给药时间增加但差异无统计学意义 ($F=0.077$, $P=0.927$), 肝纤溶颗粒组 LN 含量变化差异无统计学意义 ($F=0.014$, $P=0.986$)。见表 4。

复方鳖甲软片组和肝纤溶颗粒组大鼠血清 PC III 含量在各给药时间中均低于模型组, 不同培养时间下, 组内之间差异无统计学意义, 并且各组随时间增加大鼠血清 PC III 含量差异无统计学意义 ($F=0.354$ 和 0.417 , $P=0.716$ 和 0.677)。详见表 5。

表 3 各组大鼠血清 HA 含量变化比较 (n=4, $\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 周	6 周	9 周	F 值	P 值
正常对照组	314.86 ± 41.26	245.63 ± 30.82	325.46 ± 33.48	-	-
模型对照组	369.83 ± 41.29	415.38 ± 42.77	480.93 ± 50.92	-	-
复方鳖甲软片组	257.39 ± 34.78 [†]	316.39 ± 34.76 [†]	377.92 ± 39.19 [†]	8.268	0.019
肝纤溶颗粒组	235.09 ± 27.83 [†]	271.34 ± 24.02 [†]	319.80 ± 33.50 [†]	6.572	0.031
F 值	8.158	14.692	10.500		
P 值	0.008	0.001	0.004		

注:† 与模型对照组比较,P<0.05

表 4 各组大鼠血清 LN 含量变化比较 ($n=4, \mu\text{g/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	3 周	6 周	9 周	F 值	P 值
正常对照组	25.29 ± 3.49	23.29 ± 3.09	25.28 ± 2.97	-	-
模型对照组	33.29 ± 3.45	32.87 ± 3.52	43.28 ± 4.87	-	-
复方鳖甲软片组	28.19 ± 2.90 [†]	28.94 ± 3.10	29.11 ± 3.18 ¹⁾	0.077	0.927
肝纤溶颗粒组	26.17 ± 2.89 [†]	25.83 ± 3.10 [†]	26.19 ± 2.97 ¹⁾	0.014	0.986
F 值	3.770	4.977	16.337		
P 值	0.059	0.031	0.001		

注:† 与模型对照组比较, $P < 0.05$ 表 5 各组大鼠血清 PCIII 含量变化比较 ($n=4, \mu\text{g/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	3 周	6 周	9 周	F 值	P 值
正常对照组	37.29 ± 4.02	37.29 ± 4.15	39.29 ± 4.07	-	-
模型对照组	43.29 ± 4.63	43.29 ± 4.59	43.29 ± 5.19	-	-
复方鳖甲软片组	41.20 ± 4.59	38.29 ± 4.01	40.38 ± 4.49	0.354	0.716
肝纤溶颗粒组	38.19 ± 4.18	39.01 ± 4.11	41.19 ± 4.19	0.417	0.677
F 值	1.202	1.176	0.423		
P 值	0.369	0.378	0.742		

复方鳖甲软片组和肝纤溶颗粒组大鼠血清 CIV 在不同给药时间下均低于模型对照组, 方差分析显示培养第 3 周复方鳖甲软片组与模型组比较差异无统计学意义 ($P=0.100$), 但肝纤溶颗粒组与模型对照组比较差异有统计学意义 ($P=0.0018$)。培养 6~9 周后这两组与模型组比较差异均具有统计学意义 (6 周: 复方鳖甲软片组 vs 模型对照组, $P=0.019$; 肝纤溶颗粒组 vs 模型对照组, $P=0.0019$; 9 周: 复方鳖甲软片组 vs 模型对照组, $P=0.0055$; 肝纤溶颗粒组 vs 模型对照组, $P=0.0006$)。复方鳖甲软片组和肝纤溶颗粒组比较在各时间段内差异均有统计学意义 (复方鳖甲软片组 vs 肝纤溶颗粒组: $P_{3\text{周}}=0.0066$; $P_{6\text{周}}=0.027$; $P_{9\text{周}}=0.034$)。复方鳖甲软片组和肝纤溶颗粒组大鼠血清 CIV 含量随着给药时间增加而呈现下降趋势 (复方鳖甲软片组 $F=2.189, P=0.193$; 肝纤

溶颗粒组 $F=0.813, P=0.487$), 差异无统计学意义, 见表 6。

2.4 内质网应激相关指标比较

复方鳖甲软片组、肝纤溶颗粒组的 CHOP、ATF6 蛋白表达水平在各给药时间内均低于模型对照组, 各培养时间下组内差异有统计学意义 ($F=126.545, 124.792$ 和 142.968 , 均 $P=0.000$)。用药后 3~9 周这 2 种蛋白呈下降趋势, 差异具有统计学意义 (CHOP: 复方鳖甲软片组 $P=0.046$; 肝纤溶颗粒组 $P=0.036$; ATF6: 复方鳖甲软片组 $P=0.000$; 肝纤溶颗粒组 $P=0.001$); 与复方鳖甲软片组比较, 肝纤溶颗粒组的 CHOP、ATF6 蛋白表达下降, 差异具有统计学意义 (CHOP: 复方鳖甲软片组 $P=0.000$, 肝纤溶颗粒组 $P=0.000$; ATF6: 复方鳖甲软片组 $P=0.000$; 肝纤溶颗粒组 $P=0.000$), 见表 7 和图 2、3。

表 6 各组大鼠血清 CIV 含量变化比较 ($n=4, \text{u/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	3 周	6 周	9 周	F 值	P 值
正常对照组	5.02 ± 3.49	5.12 ± 3.09	5.06 ± 0.57	-	-
模型对照组	11.43 ± 1.37	12.09 ± 1.72	12.08 ± 1.57	-	-
复方鳖甲软片组	9.79 ± 0.99	8.94 ± 1.00 ¹⁾	8.11 ± 0.96 ¹⁾	2.189	0.193
肝纤溶颗粒组	7.23 ± 0.78 ¹⁾²⁾	7.10 ± 0.78 ¹⁾²⁾	6.50 ± 0.68 ¹⁾	0.813	0.487
F 值	6.111	7.46	26.390		
P 值	0.018	0.11	0.000		

注: 1) 与模型对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与复方鳖甲软片组比较, $P < 0.05$

表 7 各组大鼠肝脏 CHOP 和 ATF6 蛋白表达比较 (n=4, $\bar{x} \pm s$)

组别	CHOP			ATF6		
	3 周	6 周	9 周	3 周	6 周	9 周
正常对照组	2.54 ± 0.27	2.57 ± 0.28	2.69 ± 0.28	3.10 ± 0.37	3.19 ± 0.37	3.35 ± 0.39
模型对照组	56.39 ± 6.02	59.02 ± 6.76	58.14 ± 6.73	77.29 ± 12.39	78.29 ± 11.58	75.39 ± 7.64
复方鳖甲软肝片组	28.11 ± 3.79 ¹⁾	23.74 ± 3.43 ¹⁾	19.39 ± 2.39 ¹⁾	36.02 ± 3.93 ¹⁾	31.29 ± 3.61 ¹⁾	25.38 ± 2.67 ¹⁾
肝纤溶颗粒组	12.17 ± 1.36 ¹⁾²⁾	11.07 ± 1.36 ¹⁾²⁾	8.68 ± 1.02 ¹⁾²⁾	23.49 ± 2.59 ¹⁾²⁾	15.49 ± 1.63 ¹⁾²⁾	13.29 ± 2.44 ¹⁾²⁾
F 值	126.545	124.792	142.968	66.884	86.601	171.463
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:1)与模型对照组比较, P<0.05;2)与复方鳖甲软肝片组比较, P<0.05

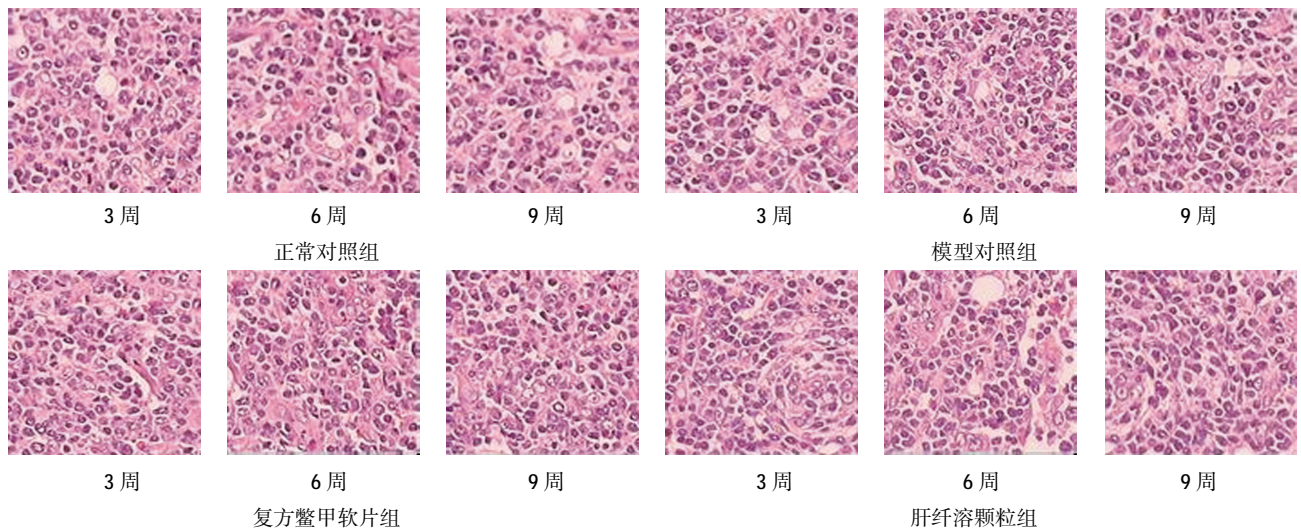


图 2 各组大鼠肝脏 CHOP 蛋白表达 (免疫组织化学 × 200)

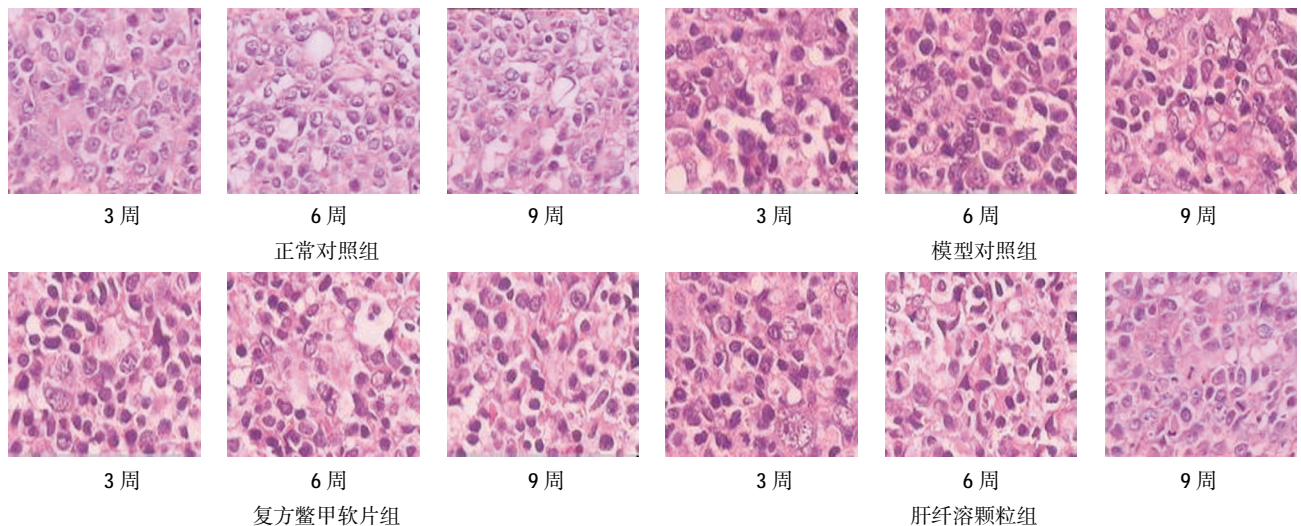


图 3 各组大鼠肝脏 ATF6 蛋白表达 (免疫组织化学 × 200)

3 讨论

肝纤维化是由于多种慢性肝病向肝硬化发展的病理过程,患有本病的患者细胞外基质分泌量增高,降解失衡,于肝脏内过度堆积,血清转氨酶升高代谢

异常,白蛋白合成障碍,肝细胞受损,肝脏严重受累,最终导致肝硬化及肝癌的发生^[6]。我国针对肝纤维化的非创伤性以及抗肝纤维化药物的临床治疗取得了长期有效的进展,研究证明肝纤溶颗粒对肝纤维化有良好的缓解作用,能够改善平滑肌痉挛,促进微

循环,调整肝血液流量,抑制自由基作用效果。研究显示,中药抗肝纤维化的作用机制具有多方面、多层次、复合性的作用^[7]。肝纤溶颗粒的药物组成中丹参具有活血凉血、祛瘀止痛的作用,有研究显示,丹参明显降低血清Ⅲ型胶原蛋白的表达,抑制细胞合成以及抗氧化的作用^[8]。黄芪具有补气健脾、利水的功效,研究人员通过对肝纤维化大鼠进行研究发现,黄芪能够改善肝纤维化程度。三七能够止血定痛、活血化瘀,研究显示^[9],三七具有改善微循环,抗过氧化作用,抑制肝纤维化的发生。曾有研究显示,肝纤溶颗粒治疗瘀血阻络型肝纤维化疗效明确^[10]。鳖甲具有滋阴潜阳,退热除蒸,软坚散结之功效,研究显示,复方鳖甲片能够通过降低血清中透明质酸、层黏蛋白水平,提高尿中羟脯氨酸,从而起到抗纤维化的作用^[11]。本研究就肝纤溶颗粒与复方鳖甲软肝片进行对比,探究两者治疗肝纤维化的疗效以及药效机制。在此类研究中动物实验至关重要,SD大鼠由于生长快,繁育性能好,其抗病能力强,自发肿瘤率低,对性激素感受性高的特性,非常适合本实验。

细胞凋亡在人类疾病的发病、机体发育以及组织稳定中起关键作用,属于机体内不必须或被损坏的细胞,能够对抗外来病原体以及缺陷细胞,进而防御机体受损。肝脏的生理活动和细胞凋亡具有相关性,可能通过基因抑制、激活或突变等多途径发挥作用。肝细胞凋亡是正常的生理过程,是细胞更新、增殖和再生的重要机制,诱导细胞凋亡的因素包括射线、高温、毒素药物以及缺血缺氧等物理因素,机体正常的细胞凋亡能够抗感染肿瘤、预防肝细胞自身免疫反应,从而保护正常细胞,机体正常分泌的肝细胞凋亡抑制因子能够预防过度凋亡诱发的肝衰竭。肝细胞凋亡不仅发生于肝发育以及成人肝细胞更新,同时是诱发肝脏损伤以及肝脏疾病的关键环节。现代研究显示,肝纤维化、病毒性肝炎以及自身免疫性肝炎等肝脏疾病均出现大量肝细胞凋亡,严重影响患者肝脏功能,诱发病情的恶化^[12]。本研究显示,与鳖甲软肝片组相比,肝纤溶颗粒组的纤维增生程度评分下降,证实肝纤溶颗粒降低肝纤维化大鼠细胞凋亡数量较复方鳖甲软肝片显著,能缓解肝脏的损伤。

诊断肝纤维化需要进行肝纤 4 项检查,因此肝纤 4 项是诊断肝纤维化发展的首选指标,具有衡量

炎症活动以及纤维化程度的作用。血清 PCⅢ水平与肝纤维化病变程度紧密相关,在患病早期即升高,对慢性肝炎肝纤维化的早期诊断以及预后具有临床诊断价值^[13]。CⅣ参与基底膜的构成,当患者出现肝纤维化时,肝细胞发生变性坏死,巨噬细胞活跃,基底胶原的更新率升高,促使 CⅣ水平升高,反映肝纤维化过程敏感性较高^[14]。LN 是一种参与肝纤维化活动的基底膜特有非胶原性结构蛋白,可有效反映纤维进展,随着肝纤维化转化为肝硬化患者食管静脉曲张加重,LN 水平增高^[15]。HA 是一种由间质细胞合成的反应肝内纤维量以及肝组织受损程度的肝纤维化以及肝硬变敏感指标,随着肝纤维化不断加剧,HA 水平随之增高,肝硬化时达到高峰。本研究显示,与鳖甲软肝片组相比,肝纤溶颗粒组的透明质酸、LN、血清 PCⅢ、血清 CⅣ较低,证实肝纤溶颗粒降低肝纤 4 项水平较复方鳖甲软肝片显著,减少肝内胶原,抑制纤维以及成纤维细胞的增殖分裂,促进肝脏细胞修复,从而抗肝纤维化。

内质网(endoplasmic reticulum,ER)源自于真核细胞,为蛋白质合成、折叠和运输以及细胞内钙离子储存、钙离子信号传导、类固醇、胆固醇及其他脂类合成等反应提供主要场所,能够调节细胞应激反应、蛋白质和脂类合成。现代研究显示,酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪肝、胆汁淤积、乙型和丙型肝炎病毒等疾病的发病机制与内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)诱发的损伤具有相关性^[16]。ERS 的发生主要由于 ER 出现功能障碍,患者出现钙离子稳态失衡,阻碍蛋白质 N- 相关的糖基化作用,突变蛋白表达,和其他不同类型的细胞应激引起内质网腔错误折叠蛋白质的积聚。曾有研究显示^[17],内质网应激时 CHOP 与碱基重复序列相结合,加速 TRB3 的表达,与相关凋亡具有相关性。TRB3 对 CHOP 具有抑制作用,能够起负反馈作用。有研究显示,大鼠肝纤维化过程中内质网应激相关分子 CHOP 以及 ATF6 的表达水平升高,参与肝纤维化的发生发展。本研究显示,与鳖甲软肝片组相比,肝纤溶颗粒组的 CHOP、ATF6 蛋白表达下降,证实肝纤溶颗粒降低内质网应激相关指标较复方鳖甲软肝片显著,起抗氧化作用,抑制肝纤维化的发生发展。

因此,可认为肝纤溶颗粒降低肝纤维化大鼠细胞凋亡数量、肝纤维化水平,较复方鳖甲软肝片显著,能够改善肝脏病理变化,调节内质网应激相关指

标,对临床有指导意义。在下一步研究中,将对本实验得出的结论进行更加深入的探讨,为本实验的结果做出进一步论证。

参 考 文 献:

- [1] 叶静,刘清华,王璐璐. 抗肝纤维化药物治疗的研究进展[J]. 山东医药, 2014, 54(42): 101-103.
- [2] 王兰,王红梅. 组织因子、凝血功能紊乱与肝缺血再灌注损伤[J]. 中华消化杂志, 2005, 25(12): 760-761.
- [3] 段斐,陈冬志,牛建昭,等. 复方鳖甲软肝片对高脂性脂肪肝大鼠血脂的影响[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(6): 375-376.
- [4] 孙龙,孙琳琳,杨世忠. 肝纤溶颗粒对肝纤维化大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(8): 1069-1070.
- [5] 闫冰川,丁常清,江伟炽,等. 长期腹腔注射四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(6): 1464-1465.
- [6] 尤红,吴鹏. 肝纤维化的治疗进展[J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(8): 574-575.
- [7] 陈曦,牟璐璐,陈丹丹,等. 逍遥散对肝纤维化大鼠模型抗纤维化作用及其机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(3): 241-244.
- [8] 马文东,张丽娟,罗玲,等. 抗纤维化短肽对血清诱导的心脏成纤维细胞增殖和胶原合成与 I、III 型胶原表达抑制作用的实验研究[J]. 华北煤炭医学院学报, 2008, 10(3): 291-293.
- [9] 姜辉,高家荣,张家富,等. 三七总皂苷对肝纤维化大鼠的保护作用及机制[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(3): 71-74.
- [10] 白静丽,杨世忠,陈澹,等. 肝纤溶颗粒抗实验性肝纤维化治疗中血清 HA、LN、PC III 的动态变化[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(1): 96-98.
- [11] 张东伟,王继峰,牛建昭,等. 复方鳖甲片预防肺纤维化大鼠细胞外基质过度形成的实验研究[J]. 中草药, 2004, 35(5): 545-548.
- [12] 袁淑芳,张跃新,单鑫,等. 肿瘤坏死因子 α 、Caspase-3、核因子 κ B mRNA 在病毒性肝炎中的表达与肝细胞凋亡[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(2): 129-131.
- [13] 王传敏,石庆凤,汤守兵,等. 乙型肝炎患者血清 IL-1 β 、 γ -IFN、HA、LN 和 PC III 在肝炎肝纤维化时水平的变化及其意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2015, 14(9): 718-721.
- [14] 李健,牛建昭,曾艳,等. 大鼠 ALD 发生过程中血清 HA、LN、C_{IV} 水平及肝组织胶原表达变化的动态观察[J]. 中国药物依赖性杂志, 2004, 13(1): 18-21.
- [15] 张平,袁迎春,任芳. 肝硬化门脉高压与内皮素及纤维化指标关系的分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2005, 27(4): 274-275.
- [16] 李祥柱. IRE1 α 与乙型病毒性肝炎相关性研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2015, 31(23): 3582-3585.
- [17] 杜锡潮,韩冰,谢汝佳,等. 肝纤维化大鼠肝脏中内质网应激相关分子 CHOP 和 TRB3 的表达变化[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(5): 906-912.

(张蕾 编辑)