

实验研究 EXPERIMENTAL STUDY

化痰活血扶正方拆方后的相关药组
对肝纤维化大鼠 α -SMA、FN 表达的影响[※]

郑保平 肖海 林唐唐 唐杨 刘海华

(赣南医学院第一附属医院中医科,江西 赣州 341000)

摘要:目的 观察化痰活血扶正方拆方后的相关药组对肝纤维化大鼠模型肝脏组织病理学、 α -SMA、FN 表达,胶原面积百分比的影响。方法 选择雄性SD大鼠120只,随机分为正常组、模型组、水飞蓟宾组、化痰低中高剂量组、活血化痰低中高剂量组、扶正低中高剂量组、化痰活血扶正低中高剂量组。除正常组外,其余各组大鼠均予腹腔注射4% TAA(水为溶剂)5 mL/kg 体质量,剂量200 mg/kg,每周2次,共8周。造模开始次日,各低、中、高剂量组分别按照0.25、0.5、1.0 g/kg 剂量,每日1次、予10 mL/kg 体质量不同浓度的药物灌胃,水飞蓟宾组给予水飞蓟宾50 mg/kg 体质量灌胃,每日1次,用药8周。8周后取各组大鼠肝右叶组织,免疫组化法观察各组大鼠肝脏组织 α -SMA、FN 的表达、胶原面积百分比及组织形态病理学变化情况。结果 中药干预后的各组大鼠肝组织 α -SMA、FN 的表达及胶原面积百分比均有下降,与模型组相比均有统计学意义($P<0.05$);各组大鼠肝脏病理切片光镜下观察均较模型组大鼠肝组织在炎细胞浸润程度、变性坏死、纤维增生等方面有明显减轻。结论 化痰活血扶正方及其拆方后的各药组可显著降低肝纤维化大鼠模型肝组织中 α -SMA、FN 的表达;各中药治疗组大鼠的组织形态病理学明显改善,表明化痰活血扶正各药组能够减缓或阻断肝纤维化的进展。

关键词:化痰活血扶正方; α -SMA;FN;肝纤维化;大鼠;胁痛

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2019.02.042

文章编号:1672-2779(2019)-02-0104-04

Influence of the Decomposed Formulas of Phlegm Reducing and Blood Activating for Body Resistance Strengthening Prescription on the Expression of α -SMA and FN of Liver Fibrosis in Rats

ZHENG Baoping, XIAO Hai, LIN Tangtang, TANG Yang, LIU Haihua

(Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Jiangxi Province, Ganzhou 341000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of the decomposed formulas of phlegm reducing and blood activating for body resistance strengthening prescription on the liver histopathology, the expression of α -SMA, FN and the collagen percentage of liver fibrosis in rats. **Methods** One hundred and twenty male SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, a positive drug (silybin) group, low-, middle-, and high-dose phlegm reducing groups, low-, middle-, and high-dose blood activating groups, low-, middle-, and high-dose body resistance strengthening groups, low-, middle-, and high-dose phlegm reducing, blood activating and body resistance strengthening groups. Except the normal group, the rats in the other groups were injected with 4% TAA in water at a dose of 200mg/kg, twice a week, for 8 weeks. The next day after modelling, the low-, middle-, and high-dose groups were intragastrically given corresponding drugs at 0.25, 0.5, and 1.0g/kg, according to the concentration by 10ml/kg, once a day, for 8 weeks in a row, respectively. And the positive drug group was given silybin 50mg/kg body weight once a day for 8 weeks. The expression of α -SMA, FN, the collagen percentage and the histopathology by immunohistochemical method was observed. **Results** After intervention, compared with the model group, the expression of α -SMA, FN and the collagen percentage in the liver tissue were significantly decreased ($P<0.05$) in all groups which intervened by Chinese herbology; and the degree of inflammatory cell infiltration, degeneration and necrosis, and fibroplasia were significantly reduced. **Conclusion** The phlegm reducing, blood activating, and body resistance strengthening decoction and its decomposed formulas can significantly decrease the expression of α -SMA, FN in the liver fibrosis in rats. Moreover, the decomposed formulas of phlegm reducing, blood activating, and body resistance strengthening decoction can slow the progression of liver fibrosis.

Keywords: phlegm reducing and blood activating for body resistance strengthening prescription; α -SMA; FN; rat; hypochondriac pain

各种慢性肝病进展到肝硬化必经的、共同的病理阶段是肝纤维化,它以结缔组织异常增生,细胞外基质过度沉积为病理特征。普遍认为,抗肝纤维化的治疗是延缓或阻止各种慢性肝病进展的重要手段。经过大量文献研究及临床观察,在对肝纤维化基本病机全面梳理认识

的基础上,认为肝纤维化发生发展过程中“痰、瘀、虚”贯穿于疾病的始终,因此在本病的治疗上“化痰”与“活血化瘀”“扶养正气”同等重要,不可偏废。前期通过对慢性乙肝肝纤维化患者的干预研究发现,临床拟定了化痰活血扶正方有较好的临床疗效^[1]。本研究拟通过动物实验研究着重探讨化痰活血扶正方及其拆方后的相关药组对肝纤维化大鼠 α -SMA、FN 表达的影响。

※ 基金项目:国家自然科学基金[No.81460707]

1 材料与方

1.1 药物及试剂 本实验所用的中药饮片均购自江西省赣州市协记大药房有限公司；秋水仙碱片，云南植物药业有限公司生产，批号：20170101；硫代乙酰胺（Thioacetamide, TAA），批号 172502-500G。FN 抗体，博士德，货号：BA1772； α -SMA，博士德，货号：BM0002；Masson 三色染色试剂，索莱宝，货号：G1340-100。

1.2 实验动物及分组 选用 SD 雄性大鼠（清洁级）120 只，体质量（80+10）g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司（动物许可证号：SCXK（湘）2013-0004，合格证号：43004700022265）。随机分为空白对照组、水飞蓟宾组、模型组、化痰药低剂量组、化痰药中剂量组、化痰药高剂量组、活血药低剂量组、活血药中剂量组、活血药高剂量组、扶正药低剂量组、扶正药中剂量组、扶正药高剂量组、化痰活血扶正药低剂量组、化痰活血扶正药中剂量组、化痰活血扶正药高剂量组，每组 8 只。分笼饲养，每笼 4 只，自由摄食饮水适应性喂养 7 天，自然光线，湿度 30%~50%，温度 20~26℃。

1.3 实验方法

1.3.1 药物制备 将中药饮片按照功效及主治分为：化痰药组（白芥子、半夏、茯苓、陈皮、甘草等）、活血化瘀药组（莪术、丹参、桃仁等）、扶正药组（黄芪、党参、当归、白术等）、化痰活血扶正方组。每组药物均水浸过药面 2 cm 并浸泡 12 h 以上、第 1 遍，加水 3 L，300℃，1 h 煮开；第 2 遍，加水 1.5 L，300℃，40 min 煮开。每遍煮开后 200℃ 续煎 30 min。2 次合液，旋转蒸发仪浓缩至 1000 mL。置 4℃ 冰箱备用，使用前按要求配成所需浓度。

1.3.2 造模及给药 除正常组外其余大鼠均腹腔注射 4% TAA（水为溶剂）5 mL/kg 体质量，剂量 200 mg/kg，每周 2 次，持续 8 周，复制大鼠肝纤维化模型。造模的同时各低、中、高剂量组分别按照 0.25、0.5、1.0 g/kg 剂量，按 1 mL/100 g 体质量不同浓度的药物灌胃；正常组、模型组予以生理盐水，等体积灌胃；阳性药物组给予水飞蓟宾 50 mg/kg 体质量灌胃，日 1 次；给药 8 周。

1.3.3 标本采集与处理 造模及用药的第 8 周后取各组所有剩余大鼠，每次均禁食 12 h 后称重，10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉后，冰盒上处死大鼠，取部分肝右叶组织，10% 甲醛常规固定、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋。

1.3.4 病理组织学观察 石蜡包埋组织，4 μ m 厚切片，分别行 Masson 染色。光镜下观察各组肝组织病理组织学变化。

1.3.5 免疫组化检测 α -SMA、FN 蛋白的表达 采用免疫组化 SP 法，鼠抗鼠 α -SMA 单克隆抗体及 FN 抗体均以 1:100 稀释，DAB 显色，苏木素复染 PBS 代替一抗作为阴性对照，阳性组织呈棕色，阴性组织呈蓝色。在自动

图像分析系统上，采用 HPIAS-2000 型图像分析软件进行定量分析，随视选取每张切片 10 个视野（ $\times 200$ ）倍测定阳性细胞的灰度值与所占视野面积的比，即平均光密度。**1.3.6 统计学方法** 统计学分析使用 SPSS 13.0 软件。各测量指标的数据以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 正常组大鼠食欲好、毛发光泽、活动灵敏，体质量增加明显；模型组大鼠进食少，体质量增长慢，活动少，反应迟钝，毛发干枯稀疏，部分大鼠毛发有结；其余各组大鼠较模型组相比在精神、毛发、活动、食欲方面均有不同程度的改善。

2.2 肝组织 α -SMA、FN 表达及胶原面积百分比的影响 免疫组化检查显示模型组 α -SMA、FN 的平均光度值较空白对照组显著升高，结果有统计学意义（ $P < 0.01$ ）；各中药治疗组 α -SMA、FN 的平均光度值较模型组显著下降，结果有统计学意义（ $P < 0.05$ ），其中以化痰活血扶正方组及活血化痰高剂量组为优。模型组 Masson 染色胶原面积百分比与空白组比较显著升高，结果有统计学意义（ $P < 0.01$ ）；各中药治疗组的胶原面积百分比较模型组显著下降，结果差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。见表 1。

表1 各组大鼠肝组织中 α -SMA、FN 表达、
胶原面积百分比水平比较 ($\bar{x} \pm s, 8W$)

组别	只数	α -SMA 平均光密度	FN 平均 光密度	Masson 染色胶原面积 百分比
空白对照组	8	0.81 \pm 0.18	0.19 \pm 0.11	0.17 \pm 0.11
模型组	8	8.71 \pm 0.92 [▲]	2.52 \pm 0.24 [▲]	2.08 \pm 0.23 [▲]
秋水仙碱组	8	4.21 \pm 0.46 ^c	1.31 \pm 0.20 ^c	1.26 \pm 0.27 ^c
化痰药低剂量组	8	6.21 \pm 0.87 ^c	1.88 \pm 0.35 ^c	1.62 \pm 0.27 ^c
化痰药中剂量组	8	5.42 \pm 0.81 ^c	1.68 \pm 0.22 ^c	1.48 \pm 0.23 ^c
化痰药高剂量组	8	5.37 \pm 0.64 ^c	1.63 \pm 0.25 ^c	1.42 \pm 0.20 ^c
活血药低剂量组	8	6.01 \pm 0.65 ^c	1.44 \pm 0.24 ^c	1.31 \pm 0.22 ^c
活血药中剂量组	8	5.20 \pm 0.54 ^c	1.06 \pm 0.28 ^c	1.08 \pm 0.10 ^c
活血药高剂量组	8	4.11 \pm 0.45 ^c	0.95 \pm 0.27 ^c	1.04 \pm 0.16 ^c
扶正药低剂量组	8	7.19 \pm 0.85 ^c	2.16 \pm 0.21 ^c	1.68 \pm 0.18 ^c
扶正药中剂量组	8	6.72 \pm 0.77 ^c	1.62 \pm 0.30 ^c	1.58 \pm 0.28 ^c
扶正药高剂量组	8	6.52 \pm 0.72 ^c	1.57 \pm 0.35 ^c	1.56 \pm 0.23 ^c
化痰活血扶正药低剂量组	8	3.33 \pm 0.57 ^c	1.33 \pm 0.18 ^c	1.20 \pm 0.18 ^c
化痰活血扶正药中剂量组	8	3.06 \pm 0.58 ^c	1.02 \pm 0.13 ^c	1.12 \pm 0.17 ^c
化痰活血扶正药高剂量组	8	2.94 \pm 0.45 ^c	0.92 \pm 0.26 ^c	0.92 \pm 0.20 ^c

注：与正常组相比较，[▲] $P < 0.01$ ；与模型组比较，^c $P < 0.05$

2.3 病理组织学改变 Masson 染色后光镜观察，对照组汇管区及小叶间隔见少量蓝色胶原纤维，模型组蓝色胶原纤维明显增多，汇管-中央静脉区纤维间隔增宽，包绕、分隔肝小叶明显，部分形成假小叶。化痰活血扶正方及拆方后的各组及秋水仙碱组与模型组相比：肝细胞变性、坏死，纤维组织增生、炎细胞浸润程度等减轻明显（见图 1~15）。

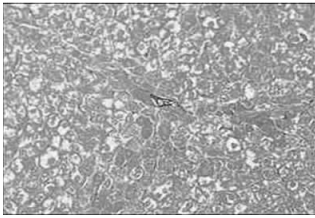


图1 正常组

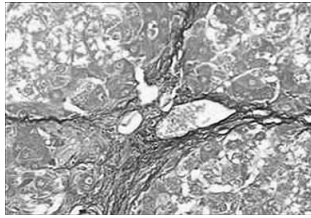


图2 模型组

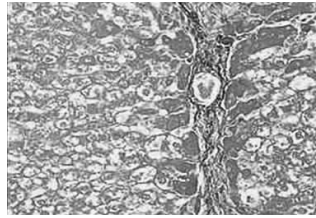


图3 水飞蓟宾组

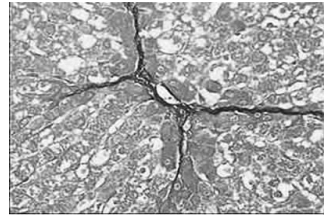


图4 化痰低剂量组

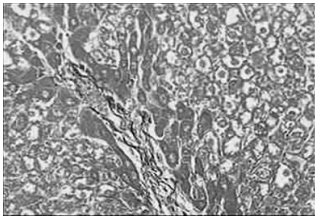


图5 化痰中剂量组

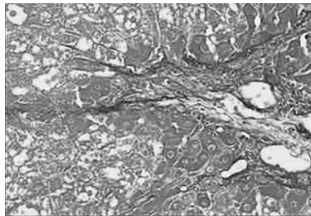


图6 化痰高剂量组

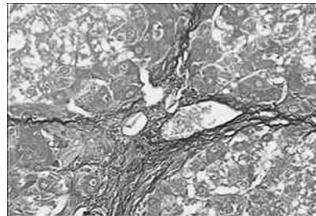


图7 活血化痰低剂量组

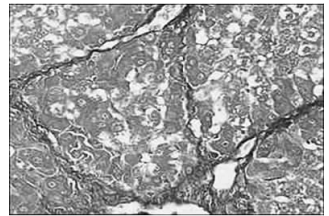


图8 活血化痰中剂量组

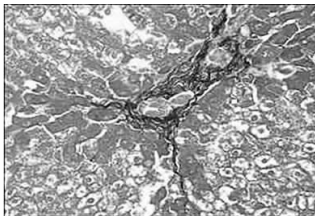


图9 活血化痰高剂量组

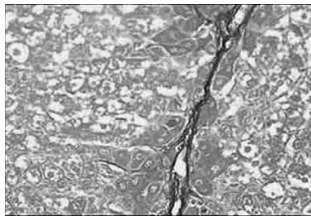


图10 扶正低剂量组

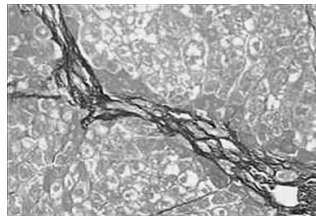


图11 扶正中剂量组

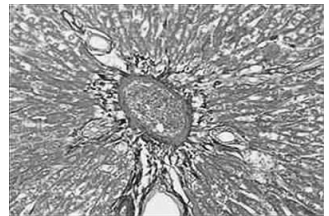


图12 扶正高剂量组

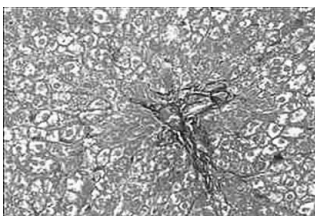


图13 化痰活血扶正低剂量组

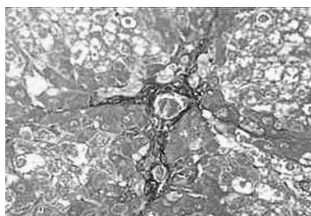


图14 化痰活血扶正中剂量组

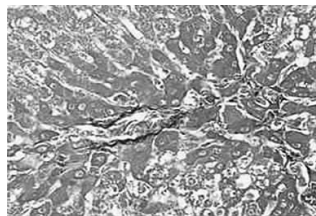


图15 化痰活血扶正高剂量组

3 讨论

虽然学者们一致认为早期有效地干预肝纤维化的进程便能阻断肝硬化的形成,但尚无安全有效的治疗药物。中医药长期防治“黄疸”“胁痛”“积聚”“臌胀”等(多与现代医学的“肝炎”“肝硬化”等疾病相关)理论总结和处方用药经验,为当今中医药抗肝纤维化研究提供了线索和捷径。肝纤维化的主要形成机制为肝细胞和内皮细胞的慢性炎症损伤,使得肝星状细胞活化、增殖、过度分泌,最终合成大量细胞外基质参与到肝纤维化的发生和发展之中^[2]。 α -SMA 作为 HSC 活化的特有标志蛋白,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^[3]。其表达强度的变化与肝纤维化程度相关^[4]。随着 α -SMA 表达的增多,肝纤维化的程度随之加重^[5]。另外,ECM 异常增多是肝纤维化发生与发展的主要病理基础^[6]。FN 是广泛存在于肝脏中的大分子糖蛋白,和胶原纤维分布在一起^[7]。它作为 ECM 的一种,在肝纤维化过程中起着直接或间接的重要作用^[5]。首先, FN 可作为其它基质蛋白的支架^[8];

其次, FN 具有调节贮脂细胞的作用,其水平升高可以加强吞噬作用,但同时也会破坏功能性基底膜,破坏贮脂细胞静止状态,进而导致贮脂细胞表型发生改变^[9]。本研究显示,用药 8 周后,中药各治疗组 HE 染色后的大鼠肝脏病理切片光镜下观察均较模型组大鼠肝组织在炎细胞浸润程度、变性坏死、纤维增生等方面有明显减轻,表示各干预治疗的中药对肝纤维的形成和发展均有一定的阻断作用。同时,化痰活血扶正方及其拆方后的相关药组能够有效减低模型大鼠肝脏组织中 α -SMA、FN 的表达及 Masson 染色后的胶原面积百分比。这说明化痰活血扶正方及其拆方后的相关药组可能是通过抑制 HSCs 的激活及 ECM 的合成而起到延缓或逆转肝纤维化向肝硬化的进程。

参考文献

- [1] 郑保平,林唐唐,刘海华,等.化痰活血扶正方治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的临床研究[J].时珍国医国药,2017,28(7):1589-1591.
- [2] 安纪红,倪文,乔杰.中药治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的疗效观察及生存质量研究[J].中华肝病杂志,2014,22(1):30-32.
- [3] 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, 18(4):233-235.
- [4] BaeMA, Rhee SD, JungWH, et al. Selective inhibition of activated stellate cells and protection from carbon tetrachloride-induced liver injury in rats by a new PPAR γ agonist-KR62776 [J]. Arch Pharm Res. 2010, 33(3): 433-442.
- [5] 李林蔚, 周景华, 刘华生. 柴胡桂枝汤对肝纤维化大鼠 FN、 α -SMA 表达的影响[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(2):265-267.
- [6] 刘华生, 刘洋, 周景华. 柴胡桂枝汤对肝纤维化大鼠 TNF- α 、CTGF 表达的影响[J]. 中医药学报, 2011, 39(6):35-37.
- [7] 周荣佼, 王金燕, 孙健, 等. 老年缺血性脑卒中患者颈动脉斑块性质与血脂、细胞纤维结合蛋白和同型半胱氨酸水平的关系[J]. 郑州大学学报(医学版), 2014, 49(6):876-878.
- [8] Reob F, Matern S. Fibronectin-a key substance in pathogenesis of liver-cirrhosis Leber Magen Darm, 1993, 23(6):239.
- [9] 程多智, 谭莹, 赵颖, 等. PA、FN、ADA、CHE 和 51-NT 联合检测在肝脏疾病中的应用[J]. 河北医药, 2013, 35(20):3102-3103.
- (本文编辑:张文娟 本文校对:韩立民 收稿日期:2018-09-03)

正交设计优选葛根超声加热提取工艺[※]

郭爱灵^{1,2} 姚斯琪¹ 姚涛¹ 潘斯庆¹ 周刘华¹ 常跃兴^{1,2*}

(1 安徽理工大学医学院药理学系, 安徽 淮南 232001; 2 安徽理工大学医学前沿实验中心, 安徽 淮南 232001)

摘要:目的 正交设计优选皖南野生葛根超声加热提取工艺。方法 以葛根总黄酮和葛根素为考察指标, 采用单因素考察和正交试验设计对皖南野生葛根超声加热提取工艺进行优化。结果 在考察因素变化范围内, 总黄酮和葛根素均随超声温度增加而增加, 随超声时间延长而增加, 乙醇浓度为 60% 时出现极值, 在液料比为 10:1 处出现极值; 正交试验结果表明, 四因素对总黄酮和葛根素提取率影响大小顺序为超声温度 > 乙醇浓度 > 超声时间 > 液料比。结论 皖南野生葛根最佳超声加热提取工艺参数为乙醇浓度为 60%, 超声温度为 60℃, 超声时间为 60 min, 液料比为 5:1。

关键词: 超声加热提取工艺; 葛根; 总黄酮; 葛根素

doi:10.3969/j.issn.1672-2779.2019.02.043

文章编号:1672-2779(2019)-02-0107-04

Optimization of Ultrasonic Heating Extraction Process of Puerariae Lobatae Radix by Orthogonal Design

GUO Ailing^{1,2}, YAO Siqi¹, YAO Tao¹, PAN Siqing¹, ZHOU Liuhua¹, CHANG Yuexing^{1,2*}

(1. Pharmacy Department, Medical College, Anhui University of Science and Technology, Anhui Province, Huainan 232001, China; 2. Center for Frontier Laboratory of Medicine, Anhui University of Science And Technology, Anhui Province, Huainan 232001, China)

Abstract: Objective To optimize the ultrasonic heating extraction process of wild Puerariae Lobatae Radix in southern Anhui province by orthogonal design. **Methods** With the total flavonoids and puerarin as the indexes in the experiment, the single factor and orthogonal experimental design were used to optimize the ultrasonic heating extraction process of wild Puerariae Lobatae Radix in southern Anhui province. **Results** In the designated range of factors, the contents of the total flavonoids and puerarin increased equally with the rising of ultrasonic temperature, the expanding of ultrasonic time, and their appeared respectively in 60% of ethanol concentration and in ratio of 10:1 of solid-liquid ratio; the Results of orthogonal test showed that The influence factors in the order of impacting the extraction rates of total flavonoids and puerarin are from the large to the small as ethanol concentration, ultrasonic temperature, ultrasonic time and solid-liquid ratio. **Conclusion** The optimum extraction parameters of wild Puerariae Lobatae Radix in southern Anhui province by orthogonal design were 60% of ethanol concentration, 60℃ of ultrasonic temperature, 60 min of ultrasonic time, and 5:1 of liquid ratio.

Keywords: ultrasonic heating extraction process; radix puerariae; extraction process; total flavonoids; puerarin

在医药工业大生产中葛根提取率直接影响其资源利用率, 制剂生产效率及经济效益^[1]。葛根提取技术见于报道的有传统浸提法^[2]、煎煮法、加热回流法^[3-4]、半仿生提取法^[5]、微波辅助提取法^[6]、超声波辅助提取法^[7]、超声波-微波辅助提取法^[8], 以及用超声波和热回流联合提取法等^[9]。前期实验表明, 可采用超声波辅助提取法

替代加热回流法对野葛样品进行处理^[10]。本文进一步采用超声加热提取方法, 以主要活性成分葛根总黄酮和葛根素 (puerarin, 1)^[11]含量为指标, 对该提取工艺参数进行单因素考察和正交设计优选, 以探讨葛根最佳提取工艺。

1 材料

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Plus C 18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m, 北京迪马欧泰科技发展中心); UV1902 型紫外可见分光光度计 (上海棱光技术有限公司); KQ-100 DE 型超声波清

※ 基金项目: 安徽理工大学引进人才基金项目 [No.11079]; 安徽理工大学大学生创新创业训练计划项目 [No.201610361317]

* 通讯作者: yxchang@aust.edu.cn