

百合乌药蒲公英汤对肝纤维化的改善作用及机制研究

刘恒旭¹, 王 寰¹, 王 瑞¹, 冯欣怡¹, 贾晓冬¹, 郝思钰¹,
盛奕菲², 岳志伟^{2,3,4}, 齐亚娟^{1,2,3,4*}

(1. 华北理工大学药学院, 唐山 063210; 2. 华北理工大学基础医学院, 唐山 063210; 3. 唐山市新药基础研究重点实验室, 唐山 063210; 4. 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 唐山 063210)

摘 要: 目的 评价百合乌药蒲公英汤(decotion of Baihe Wuyao Pugongying, DBWP)对肝纤维化(liver fibrosis, LF)的保护作用, 并揭示其相关机制。**方法** 通过四氯化碳诱导 6~8 周龄雄性昆明种小鼠 LF 模型并随机分为 5 组, 给予 6 周不同剂量 DBWP 进行体内实验验证。检测肝功能指标、肝脏病理形态和纤维化沉积; Western-blot 检测胶原纤维因子及细胞外基质(extracellular matrixs, ECMs)降解酶表达, 反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测炎症相关因子表达。**结果** 与模型组相比较, DBWP 可明显改善肝功能, 降低小鼠血清谷丙转氨酶(alanine amino transferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate amino transferase, AST)水平。HE 染色和 Masson 染色表明, DBWP 可改善小鼠肝脏病理形态和纤维化沉积, 同时, 肝脏中 Collagen 1 和 Collagen 3 表达明显降低, 纤维化明显改善。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)/金属蛋白酶抑制因子 1 (metalloproteinase 1, TIMP1)比值明显升高, 肝脏对细胞外基质降解能力进一步加强。炎症相关因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)的表达明显降低。**结论** DBWP 通过抗炎、促进细胞外基质降解改善肝纤维化。

关键词: 百合; 乌药; 蒲公英; 肝纤维化; 炎症; 细胞外基质

Research on improving effects and mechanism of decotion of Baihe Wuyao Pugongying on liver fibrosis

LIU Heng-Xu¹, WANG Huan¹, WANG Rui¹, FENG Xin-Yi¹, JIA Xiao-Dong¹,
HAO Si-Yu¹, SHENG Yi-Fei², YUE Zhi-Wei^{2,3,4}, QI Ya-Juan^{1,2,3,4*}

(1. School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 2. School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 3. Tangshan Key Laboratory of Basic Research of New Drugs, Tangshan 063210, China; 4. Hebei Key Laboratory for Basic Research on Chronic Diseases, Tangshan 063210, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the protective effects of the decoction of Baihe Wuyao Pugongying (DBWP) on liver fibrosis (LF), and reveal the underlying mechanisms. **Methods** LF models of 6-8 week-old male Kunming

基金项目: 河北省中医药联合基金重点项目(H2022209087)、河北省自然科学基金项目(H2021209013)、国家自然科学基金项目(81471022)

Fund: Supported by the Key Project of TCM Joint Fund of Hebei Province (H2022209087), the Natural Science Foundation of Hebei Province (H2021209013), and the National Natural Science Foundation of China (81471022)

***通信作者:** 齐亚娟, 博士, 教授, 主要研究方向为代谢性疾病及其中药新药研发。E-mail: yajuanqi@ncst.edu.cn

***Corresponding author:** QI Ya-Juan, Ph.D, Professor, North China University of Science and Technology, No.21, Bohai Avenue, Caofeidian New City, Tangshan, Tangshan 063210, China. E-mail: yajuanqi@ncst.edu.cn

mice were induced by carbon tetrachloride and randomly divided into 5 groups, which were given DBWP at different doses for 6 weeks for *in vivo* experimental validation. Liver function index, liver pathological morphology and fibrosis deposition were detected. The expression of collagen and extracellular matrixs (ECMs) degrading enzymes was detected by Western-blot. The expression of inflammation-related factors was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with model group, DBWP significantly improved liver function and decreased serum aspartate amino transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST) levels. HE staining and Masson staining showed that DBWP could improve the pathological morphology and fibrosis deposition of mice liver. Meanwhile, the expressions of Collagen 1 and Collagen 3 in the liver were decreased, and the fibrosis was significantly improved. The ratio of matrix metalloproteinases (MMPs)/metalloproteinase 1 (TIMP1) increased, and the ability of liver to degrade extracellular matrix was further enhanced. The expression of inflammation-related factors interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) was significantly decreased. **Conclusion** DBWP can alleviate LF mainly through anti-inflammatory and promoting the degradation of extracellular matrix.

KEY WORDS: Baihe; Wuyao; Pugongying; liver fibrosis; inflammation; extracellular matrixs

0 引言

肝纤维化(liver fibrosis, LF)主要由于持续肝损伤引起的肝脏炎症和纤维化,导致肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)由静息状态异常活化和过量增殖,活化的HSCs进一步转分化为肌成纤维细胞引发细胞外基质(extracellular matrixs, ECMs)沉积^[1]。若未及时有效治疗,LF可进展为肝硬化,并导致一系列致命的并发症,如肝功能衰竭,甚至肝细胞癌^[2]。尽管LF发病机制已得到普遍认可,但目前仍未有特效药物以及治疗方法,因此需要一种较为有效且副作用较低的药物。

百合乌药蒲公英汤(decotion of Baihe Wuyao Pugongying, DBWP)由百合、乌药和蒲公英煎煮制成。在中医学传统中以食代药,以食代疗来发挥药物的预防和保健作用,展现出药食同源中药的天然安全性^[3]。百合和蒲公英作为传统药食同源中药,兼具防治疾病和毒副作用低的特点。百合主滋阴润肺、疏肝解郁、安神清热。乌药偏于行气解郁、散寒止痛。蒲公英清热解毒、消痈散结之力较强。三者配伍,共入肝、肺、胃经,具有清热生津,疏肝解郁之效。现代药理学研究百合具有抗氧化、抗炎、降血糖作用^[4-6]。乌药具有抗炎、保肝、抗菌、抗癌等作用^[7-9]。蒲公英具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等作用^[10-14]。

前期研究发现,传统复方百合乌药汤可通过阻断TGF- β 1/Smad2/3信号通路以及提高抗炎和抗氧化能力,对四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)诱导的慢性肝损伤和LF发挥保护作用^[15]。同时百合乌药汤可通过抗炎、抗氧化、抗凋亡,改善小鼠肝功能,并上调磷酸化蛋白激酶(phosphorylation protein kinases, p-AKT)/蛋白激酶(protein kinases, AKT)的表达,改善胰岛素抵抗,从而减轻一型糖尿病并发肝损伤^[16-17]。DBWP是在百合乌药汤基础上添加

药食同源中药蒲公英作为改良方,可通过减轻炎症、增加抗氧化能力来改善血糖,减轻I型糖尿病及其并发肝损伤^[18]。但DBWP对LF是否具有改善作用目前尚无报道。本研究通过考察DBWP对LF小鼠的药效以及在炎症和纤维化水平的影响,揭示其作用及机制,以期为进一步探究其保肝作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

由北京华阜康生物科技股份有限公司提供的6~8周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性昆明种小鼠50只,体质量为(20 $\pm$ 2) g,许可证号为SYXK(京)2020—0007;本实验经华北理工大学动物实验伦理委员会批准,符合中华人民共和国《实验动物管理条例》规定,伦理审批号:LX2021090。

1.2 材料与试剂

百合、乌药和蒲公英(唐人药业有限公司);甘利欣(正大天晴有限公司);谷丙转氨酶(alanine amino transferase, ALT)试剂盒(No.C009-2-1)、谷草转氨酶(aspartate amino transferase, AST)试剂盒(No.C010-2-1)(南京建成生物工程研究所);Trizol试剂(美国Invitrogen公司);反转录试剂盒(No.4368814,美国Thermo Fisher Scientific公司);QPCR试剂盒(No.208054,德国QIAGEN公司);Collagen 1 (1:2000)、Collagen 3 (1:2000)和 α -tubulin (1:2000)抗体(美国Affinity Antibody公司);HE染色试剂盒(No.C201102,珠海贝索生物技术有限公司);Masson染色试剂盒(No.DC0032,北京雷根生物技术有限公司);Bradford蛋白浓度测定液(美国BIORAD公司);RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 仪器

VORTE X-5 多功能酶标仪(美国伯图腾仪器有限责任公司); G560E 全自动生化分析仪(德国罗氏制药有限公司); DYCZ-40G 转印电泳仪(北京六一生物科技有限公司); Universal HoodIII 凝胶成像分析仪(美国 Biorad 公司); 5920R 低温离心机(德国 Eppendorf 公司); LightCycler480II 实时荧光定量分析仪(瑞士 Hoffmann-La Roche 有限责任公司); RM2245 切片机(德国 Leica 公司); YP502N 万分之一电子天平(上海菁海仪器有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 模型建立

将小鼠随机分为 5 组: 正常组(CNTR)、模型组(Model)、阳性给药组(Positive)、DBWP 低剂量(DBWP-LD)和高剂量给药组(DBWP-HD), 每组 10 只。除正常组外均按 1.0 mL/kg 剂量腹腔注射 20%的 CCl₄ 橄榄油溶液, 正常组按同等量腹腔注射橄榄油, 每周 2 次, 持续 6 周。

1.4.2 DBWP 熬制

DBWP 采用传统水溶液提取方法, 将百合、乌药、蒲公英三者按质量比 10:3:10 称量后, 放入总质量 8 倍量的双蒸水中浸泡 40 min, 之后武火转文火煎煮 1 h, 将滤渣回收, 再加入总质量 4 倍量的双蒸水同样方法继续煎煮 1 h, 合并两次滤液, 利用旋转蒸发仪将浓度浓缩至 0.9 g/mL 和 2.7 g/mL(按生药为 9 g/kg 和 27 g/kg)作为 DBWP 的低剂量和高剂量工作液备用, DBWP 的剂量依据《中国药典》2020 年版换算计算所得。

1.4.3 给药方法

造模期间, 阳性组灌胃给药甘利欣 29.2 mg/(kg·d), 持续 6 周。DBWP 低剂量和高剂量组分别灌胃 9 g/(kg·d) 和 27 g/(kg·d), 持续 6 周。正常组和模型组灌胃等体积蒸馏水。给药结束后, 将小鼠禁食 12 h, 吸入 5%水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血后, 于低温离心机按 4℃, 3000 r/min, 离心 10 min 得到血清(−80℃ 备用)。取小鼠肝脏组织(4%多聚甲醛固定, 用于 HE、Masson 染色, 其余−80℃ 保存)备用。

1.4.4 肝功能检测

按照试剂盒说明书使用全自动生化检测仪检测小鼠血清 ALT 和 AST 水平。

1.4.5 HE 染色观察肝脏病理形态

将组织切片进行脱蜡, 苏木精染色 8 min, 1%盐酸酒精分化液分化 5 s, 水返蓝 10 min, 伊红染色 3 min, 95%乙醇、无水乙醇分别脱水 2 次, 每次 2 min, 二甲苯透明 2 次, 每次 2 min, 封固后于显微镜下观察。

1.4.6 Masson 染色观察肝脏纤维化情况

将组织切片进行脱蜡, 铁苏木素染色 8 min, Masson 分化液分化 15 s, 水洗。Masson 蓝化液返蓝 4 min, 水洗, 丽春红品红染色 2 min, 0.1%乙酸洗 1 min, 磷钼酸分化 3 min, 0.1%乙酸洗 1 min, 胺蓝染色 2 min, 0.1%乙酸洗 1 min,

95%乙醇、无水乙醇分别脱水 2 次, 每次 2 min, 二甲苯透明 2 次, 每次 2 min, 封固后置于显微镜下观察。

1.4.7 Western-blot 检测肝组织中胶原蛋白表达

剪取 100 mg 肝组织, 加入蛋白裂解液研磨, 提取肝组织蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度后进行 Western-blot 检测, 制备 10%分离胶后上样 10 μL 变性蛋白, 电泳结束后转膜, 随后 5%的脱脂奶粉封闭 1 h, 在 Collagen 1、Collagen 3 和 α-tubulin 抗体中, 4℃孵育过夜。室温下, 孵育二抗 1 h, 曝光显影后采集图片, 利用 Image J 软件分析目标条带灰度值, 并计算其相对表达量。

1.4.8 反转录聚合酶链反应检测肝组织中 mRNA 表达

剪取 100 mg 肝组织, 加入 Trizol 试剂并研磨, 提取肝组织 RNA 定量后, 按照试剂盒说明书变性混匀后放入 PCR 仪中, 按照 25℃ 5 min, 42℃ 30 min, 70℃ 15 min, 4℃ 永久, 进行程序设置, 结束后加入 DEPC 水得到反转录 cDNA。按试剂盒要求加入试剂, 实时荧光 PCR 程序设置 95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 45 个循环; 95℃ 15 s; 60℃ 30 s; 95℃ 15 s, 检测肝脏中基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP2)、MMP9、金属蛋白酶抑制因子 1 (metalloproteinase 1, TIMP1)以及白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)的表达, 收集 CT 值进行统计, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	上游引物	下游引物
IL-1β	5'-GTTCCCATAGACAAC TGC-3'	5'-GATTCTTTCCTTTGAG GC-3'
IL-6	5'-GGCAATTCTGATTGTA TG-3'	5'-GACTCTGCGCTTTGTCT TT-3'
MMP2	5'-CAACGGTCGGGAATAC AGCAG-3'	5'-CCAGGAAAGTGAAG GGGAAGA-3'
MMP9	5'-GCTGACTACGATAAGG ACGGC-3'	5'-AGGAAGACGAAGGG GAAGACG-3'
TIMP1	5'-GCATCTCTGGCATCTG GCATC-3'	5'-GCGGTTCTGGGACTT GTGGGC-3'
β-actin	5'-CTAAGGCCAACCGTG AAAAG-3'	5'-ACCAGAGGCATACAG GGACA-3'

1.5 数据处理

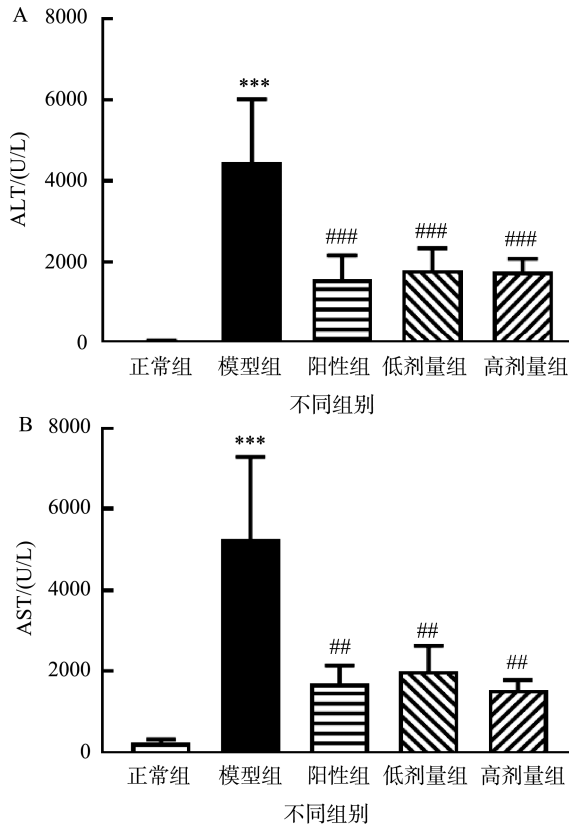
采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料以平均数±标准偏差表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA) 差分析; 两两比较采用最小显著差异 (least significant difference, LSD) *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 DBWP 对 LF 小鼠肝功能损伤的影响

ALT、AST 水平可作为反映 LF 损伤的重要指标。在

CCl₄诱导的 LF 小鼠模型中, 给予 6 周 CCl₄后, 小鼠受损的肝细胞会向血清中释放大量的 ALT 和 AST, 以此作为判断造模是否成功的指标。从图 1 可知, 与正常组相比, 模型组小鼠的 ALT 和 AST 水平均明显升高($P<0.001$), 表明模型组小鼠肝功能损伤严重, 造模成功。与模型组相比, DBWP 组和阳性组小鼠的 ALT 和 AST 水平明显降低($P<0.001$, $P<0.01$), 表明 DBWP 对 LF 小鼠肝功能损伤具有改善作用。



注: A: DBWP 对血清 ALT 水平影响; B: DBWP 对血清 AST 水平影响; 与正常组相比, ***表示 $P<0.001$, **表示 $P<0.01$, *表示 $P<0.05$; 与模型组相比, #表示 $P<0.05$, ##表示 $P<0.01$, ###表示 $P<0.001$, 下同。

图 1 DBWP 对 LF 小鼠血清 ALT 和 AST 的影响($n=10$)

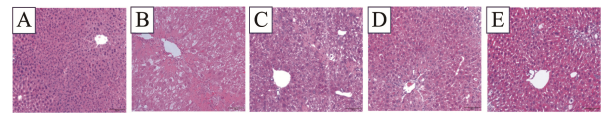
Fig.1 Effects of DBWP on serum content of ALT and AST in LF mice ($n=10$)

2.2 DBWP 对 LF 小鼠的肝脏病理形态的影响

可通过 HE 染色结果观察肝组织的病理生理变化(图 2), 结果表明, 正常组肝细胞结构完整, 核圆居中且无明显损伤, 肝细胞之间排列紧密。与正常组相比, 模型组肝索排列松散紊乱, 肝细胞出现弥散性肿大及水泡样变性, 同时伴有大量炎性细胞浸润。与模型组相比, 阳性组和 DBWP 组的肝组织病理形态均有所改善, 肝细胞结构完整且排列紧密, 细胞损伤明显减轻。

2.3 DBWP 对 LF 小鼠的肝组织纤维化分布的影响

当肝脏发生纤维化时, 会出现以胶原纤维为主的 ECMs 大量堆积, Masson 染料中的苯胺蓝可将胶原纤维染成蓝色, 其他细胞结构被品红染成红色, Masson 结果表明(图 3), 正常组肝细胞无明显损伤和肝脏 ECMs 沉积。与正常组相比, 模型组 LF 程度严重, 在肝组织中央静脉及汇管区周围有明显的 ECMs 沉积且延肝小叶边界扩散。与模型组相比, DBWP 组和阳性组的肝组织 ECMs 沉积明显减少, 仅在汇管区有少量 ECMs 沉积, 同时 DBWP 组较阳性组对 ECMs 沉积减轻更明显。说明 DBWP 可改善 LF 小鼠肝脏 ECMs 沉积。



注: A: 正常组; B: 模型组; C: 阳性组; D: 低剂量组, E: 高剂量组, 下同。

图 2 HE 染色观察肝脏病理形态(200×)

Fig.2 Pathological morphology of liver observed by HE staining (200×)

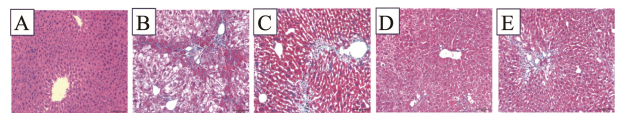


图 3 Masson 染色观察肝脏纤维化分布(200×)

Fig.3 Liver fibrosis distribution observed by Masson staining (200×)

2.4 DBWP 对 LF 小鼠胶原纤维因子的表达的影响

综合分析上述药效结果, DBWP 低剂量与高剂量的药效并无显著性差异。因此, 后续机制探讨选择已有较好药效的 DBWP 低剂量组进行研究。Collagen 1 和 Collagen 3 作为 ECMs 的主要组成成分, 通过 Western-blot 检测其蛋白表达来反映 LF 中 ECMs 沉积情况。由图 4 可知, 与正常组比, 模型组中 Collagen 1 和 Collagen 3 的表达显著升高($P<0.001$, $P<0.01$)。与模型组相比, DBWP 组和阳性组可显著降低肝脏中 Collagen 1 和 Collagen 3 的表达($P<0.01$, $P<0.05$)且 DBWP 组对 Collagen 1 和 Collagen 3 的降低效果更显著。说明 DBWP 可通过降低胶原纤维因子表达, 减少 ECMs 沉积, 改善 LF。

2.5 DBWP 对 LF 小鼠肝组织中基质相关降解酶表达的影响

在 LF 中 MMPs(主要包括 MMP2 和 MMP9)对于 ECMs 降解具有促进作用, 而 TIMP1 对 ECMs 降解具有抑制作用。通过 MMPs/TIMP1 比值反映肝组织对 ECMs 的降解能力, 比值越大表明降解能力越强。反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)结

果表明(图 5), 与正常组相比, 模型组中 MMP2、MMP9 和 TIMP1 在 mRNA 水平的表达均增加($P<0.05$, $P<0.001$)。与模型组相比, DBWP 组可明显上调 MMP2 和 MMP9 在 mRNA 水平的表达($P<0.001$, $P<0.01$), 下调 TIMP1 在

mRNA 水平的表达($P<0.05$), MMPs/TIMP1 比值明显升高($P<0.001$, $P<0.01$), 说明 DBWP 通过提高 MMPs 表达, 降低 TIMP1 表达, 进而提高 MMPs/TIMP1, 增强肝脏对 ECMs 的降解能力进而改善 LF。

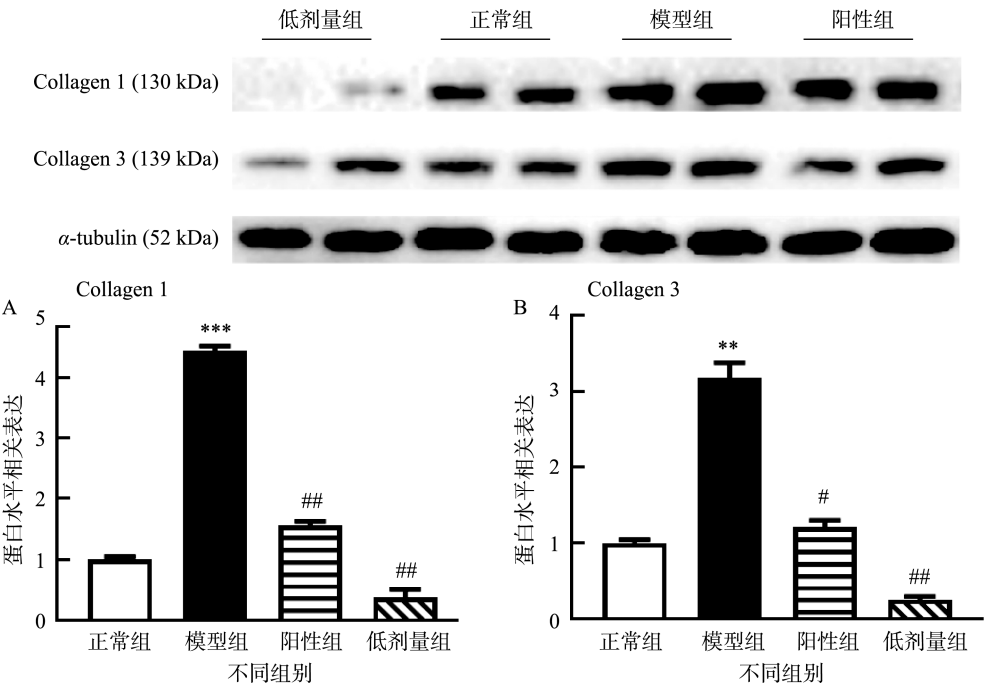


图 4 Western-blot 检测小鼠肝脏 Collagen 1 和 Collagen 3 的蛋白表达($n=4$)
Fig.4 Western-blot detection of mouse liver Collagen 1 and Collagen 3 protein expression ($n=4$)

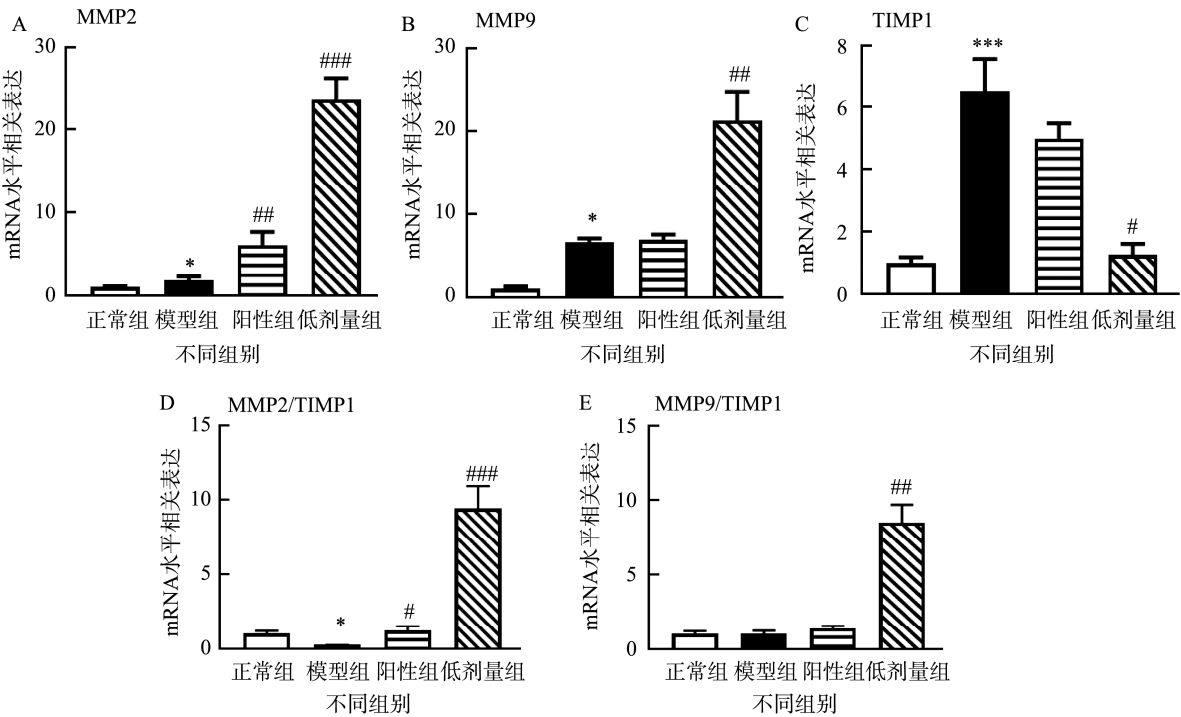


图 5 DBWP 对 LF 小鼠肝脏中 MMP2、MMP9 和 TIMP1 的影响($n=4$)
Fig.5 Effects of DBWP on MMP2, MMP9 and TIMP1 in the liver of LF mice ($n=4$)

2.6 DBWP 对 LF 小鼠肝组织中炎症因子的表达的影响

炎症反应是 LF 的主要特征之一,可通过检测肝组织中炎症因子的表达,来反映 LF 改善情况。RT-PCR 结果显示(图 6),与正常组相比,模型组炎症相关因子 IL-1 β 和 IL-6 在 mRNA 水平的表达显著增加($P<0.01$, $P<0.001$)。与模型组相比, DBWP 组和阳性组可以明显降低肝脏中炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 在 mRNA 水平的表达($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),表明 DBWP 可通过抗炎作用改善小鼠 LF。

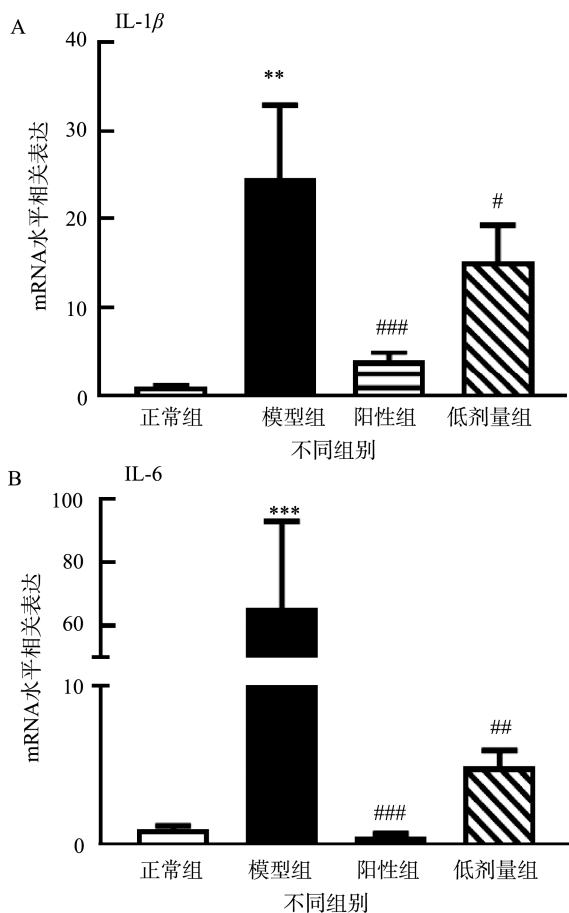


图6 DBWP对LF小鼠肝脏中IL-1 β 和IL-6的影响($n=4$)
Fig.6 Effects of DBWP on IL-1 β and IL-6 in the liver of LF mice ($n=4$)

3 讨论与结论

肝脏是体内代谢、调节免疫反应、储存糖原以及合成蛋白质的重要器官。LF是由慢性肝损伤导致HSCs活化和异常增殖以及ECMs过度沉积引起的病变^[19-20]。近年来随着对LF的深入研究,发现其在一定程度内是可逆的^[1]。

体内实验表明, DBWP可较好改善CCl₄诱导LF小鼠

的肝功能损伤, 肝脏病理形态和ECMs沉积, 且低、高剂量的药效并无显著性差异, 因此后续对DBWP作用机制分析, 只采用低剂量进行探讨。通过Western-blot检测小鼠肝组织中Collagen 1和Collagen 3的表达, 发现与模型组相比, 给予DBWP后, Collagen 1和Collagen 3的表达明显降低, ECMs沉积得到一定改善。同时RT-PCR定量结果显示: 与模型组相比, DBWP组MMPs/TIMP1明显升高, 表明肝脏对ECMs降解能力增强, 同时炎症因子IL-1 β 和IL-6表达明显降低, 抗炎效果明显。

ECMs是一种由胶原蛋白、弹性蛋白、纤维连接蛋白、层粘连蛋白以及蛋白聚糖组成的复杂网状结构, 为肝细胞提供结构支持, 也是体内重要调节因子之一, 包括调节细胞黏附、迁移、分化、增殖和存活。ECMs各组分在局部肝脏组织的异常沉积是LF形成的主要病理学特征, 其主要检测标志物包括Collagen 1和Collagen 3等^[21]。Collagen 1是一种纤维状胶原蛋白, 它在几乎所有的结缔组织和间质膜中都有表达, 其转录翻译后是组成ECMs的主要成分^[22]。同时Collagen 1还被认为是HSCs活化的关键标志物^[22], DBWP通过降低肝组织Collagen 1和Collagen 3的表达, 减轻肝脏ECMs沉积。

ECMs的产生和降解受MMPs和TIMPs的影响, 因此MMPs(主要包括MMP2和MMP9)以及TIMPs(主要包括TIMP1)的变化对维持肝脏结构和功能稳态至关重要^[23]。其中MMP2和MMP9被认为是LF过程中的合适标志物^[24]。MMP9在TIMP1水平较低时可通过加速HSCs的凋亡来改善LF^[25]。在生理状态下MMPs和TIMPs表达较低, 但当肝脏受到外界刺激时, HSCs被激活, ECMs沉积增多, 此时TIMPs表达升高, 抑制MMPs参与ECMs的降解^[26]。综上所述, 在LF期间MMPs/TIMP1可反映机体对于ECMs合成和降解能力, 因而MMPs/TIMP1越高, 表明肝脏对ECMs的降解能力越强, 改善LF效果越明显^[27]。DBWP通过上调MMPs/TIMP1比值, 增强肝脏对ECMs的降解能力。

炎症伴随于LF始终, IL-6、IL-1 β 是炎症反应中的重要指标。IL-1 β 被认为是慢性肝病中炎症和组织损伤的重要介质, 通常由受刺激的单核细胞、巨噬细胞产生, 在生理条件下IL-1 β 几乎不表达^[28]。当IL-1 β 刺激HSCs时, 可促进HSCs活化, 加快ECMs沉积。同时IL-1 β 是LF过程中HSCs表达MMP9的关键调控因子^[29]。IL-6是一种多效性细胞因子, 在调节免疫、造血、炎症和肿瘤发生等方面具有广泛的生物活性^[30]。IL-6通过NF- κ B和Ras-MAPK信号通路参与肝细胞的存活和再生。同时IL-6还可以促进HSCs活化, 诱导其产生多种急性期蛋白, 促进基质变性或与其粘附受体相互作用, 进而促使ECMs沉积。DBWP降低肝脏炎症因子表达, 发挥抗炎作用。

百合乌药汤作为传统中药复方对胃炎等胃病具有较

好疗效,根据中医学理论,肝胃互为表里,肝胃发病互相影响,DBWP 作为百合乌药汤的改良方,在原有方剂基础上添加药食同源中药蒲公英,蒲公英具有较强的抗炎、抗氧化和抗动脉粥样硬化作用,而这些病理学特性也参与 LF 发病过程,正是蒲公英的这些药理学作用,可能增强了 DBWP 改善 LF 的作用。本研究发现加入蒲公英后 DBWP 比百合乌药汤药效更好,其潜在机制正在进一步研究中。同时蒲公英具有毒性低、副作用较少特点^[1,10]。因此,在改善 LF 方面,DBWP 可能比百合乌药汤更具研发潜力。

综上,DBWP 可通过减轻肝功能损伤,改善肝脏病理学变化和肝脏纤维化沉积,促进 ECMs 降解和抗炎作用改善 LF,并为后续 DBWP 的研发奠定了基础。

参考文献

- [1] SUN YL, BAI T, ZHOU L, *et al.* SOD3 deficiency induces liver fibrosis by promoting hepatic stellate cell activation and epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(6): 4313–4329.
- [2] MASSIMO P. Pathophysiology of liver fibrosis [J]. *Digest Dis*, 2015, 33(4): 492–497.
- [3] 王晓慧, 杨波, 周忠光, 等. 药食两用中药及活性成分抗肝损伤研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(5): 138–141.
- [4] WANG XH, YANG B, ZHOU ZG, *et al.* Research progress in the anti-liver injury of Chinese herbal medicine and its active constituents [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2021, 23(5): 138–141.
- [5] ZHANG W, WANG JL, ZHANG ZJ, *et al.* Herbal textual research on traditional Chinese medicine “Baihe” (*Lilii bulbosus*) [J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(22): 5007–5011.
- [6] LI RF, LIU XF, WANG SP, *et al.* To investigate the clinical effect of Ganwei Baihe decoction in the treatment of gastric ulcer with disharmony between liver and stomach [J]. *Contemp Med*, 2021, 27(23): 33–35.
- [7] ZHAO KH, ZHOU F, YAN SEN, *et al.* Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities and analysis of chemical components in different extraction parts of fresh Longya lilium [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2020, 36(11): 87–97.
- [8] ZHU J, XUE X, HE ZP, *et al.* Using network pharmacology and molecular docking to explore the underlying anti-inflammatory mechanism of Wuyao-Danshen to treat endometriosis [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(4): 198.
- [9] CAI HD, WANG J, LUO YY, *et al.* Linderaggregatintervents adenine-induced chronic kidney disease by mediating metabolism and TGF- β /smad signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 134: 111098.
- [10] 刘慧芳, 黄敏聪, 杜伟锋, 等. 不同产地乌药中异乌药醚内酯、乌药醚内酯、乌药醇含量及体外抗炎作用比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(8): 171–174, 277.
- [11] LIU HF, HUANG MC, DU WF, *et al.* Comparative study on the content and *in vitro* anti-inflammatory effects of iso-aconitide, aconitide and aconitine in aconite of different origins [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2021, 39(8): 171–174, 277.
- [12] ZHANG Y, HU YF, LI W, *et al.* Updates and advances on pharmacological properties of *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz and its potential applications [J]. *Food Chem*, 2022, 30(373): 131380.
- [13] GE BJ, ZHAO P, LI HT, *et al.* *Taraxacum mongolicum* protects against *Staphylococcus aureus*-infected mastitis by exerting anti-inflammatory role via TLR2-NF- κ B/MAPKs pathways in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 25(268): 113595.
- [14] YANG N, LI C, TIAN G, *et al.* Organic acid component from *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz alleviates inflammatory injury in lipopolysaccharide-induced acute tracheobronchitis of ICR mice through TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 5(34): 92–100.
- [15] YANG N, DONG ZB, TIAN G, *et al.* Protective effects of organic acid component from *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. against LPS-induced inflammation: Regulating the TLR4/IKK/NF- κ B signal pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 12(194): 395–402.
- [16] YOU Y, YOO S, YOON HG, *et al.* *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(6): 1632–1637.
- [17] CHEN YJ, LI RF, HU N, *et al.* Baihe Wuyao decoction ameliorates CCl₄-induced chronic liver injury and liver fibrosis in mice through blocking TGF- β 1/Smad2/3 signaling, anti-inflammation and anti-oxidation effects [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 12(5): 113227.
- [18] 李爽, 宋宏宇, 刘丹丹, 等. 基于系统药理学探讨百合乌药汤对 1 型糖尿病并发肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(5): 39–45.
- [19] LI S, SONG HY, LIU DD, *et al.* Protective effect of Baihe Wuyao decoction in treatment of type 1 diabetes mellitus and induced hepatic injury based on systems pharmacology [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2022, 38(5): 39–45.
- [20] 薛丽会, 宋宏宇, 高旗, 等. 百合乌药汤对 1 型糖尿病并发肝损伤的保护作用及其机制分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 376–383.
- [21] XUE LH, SONG HY, GAO Q, *et al.* Protective effect and its mechanism analysis of Baihe Wuyao decoction on treatment of type 1 diabetes mellitus and associated hepatic injury [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(2): 376–383.
- [22] 高明明, 李一达, 付子杰, 等. 百合乌药汤对 1 型糖尿病肝病改善和保健作用机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(3): 737–745.
- [23] GAO MM, LI YD, FU ZJ, *et al.* Research on the mechanism of decoction of Baihe Wuyao Pungongying on improving and health care

- of type I diabetic liver disease [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(3): 737–745.
- [19] GWON MG, KIM JY, AN HJ, *et al.* Antifibrotic effect of smad decoy oligodeoxynucleotide in a CCl₄-induced hepatic fibrosis animal model [J]. *Molecules*, 2018, 8(10): 23.
- [20] CHEN Y, LIAO W, ZHU ZP, *et al.* Essential oil from the raw and vinegar-processed rhizoma curcumae ameliorate CCl₄-induced liver fibrosis: Integrating network pharmacology and molecular mechanism evaluation [J]. *Food Funct*, 2021, 12(9): 4199–4220.
- [21] 张春兵, 范媛, 詹臻, 等. III型胶原 α 链基因 mRNA 的表达与舌苔形成的关系研究[J]. *检验医学*, 2007, (5): 524–527.
- ZHANG CB, FAN Y, ZHAN Z, *et al.* Relationship between mRNA expression of type III collagen α chain gene and tongue coating formation [J]. *Lab Med*, 2007, (5): 524–527.
- [22] ISSA R, ZHOU XY, TRIM N, *et al.* Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl₄-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration [J]. *Faseb J*, 2003, 17(1): 47–49.
- [23] ASOKAN SM, HUNG TH, LI ZY, *et al.* Protein hydrolysate from potato confers hepatic-protection in hamsters against high fat diet induced apoptosis and fibrosis by suppressing Caspase-3 and MMP2/9 and by enhancing Akt-survival pathway [J]. *BMC Complem Altern M*, 2019, 19: 1–8.
- [24] CHAKRABORTY JB, OAKLEY F, WALSH MJ. Mechanisms and biomarkers of apoptosis in liver disease and fibrosis [J]. *Int J Hepatol*, 2012. DOI: org/10.1155/2012/648915
- [25] RODERFELD M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis [J]. *Matrix Biology*, 2018, 68: 452–462.
- [26] RAMACHANDRAN P, IREDALE JP. Liver fibrosis: A bidirectional model of fibrogenesis and resolution [J]. *QJM-Int J Med*, 2012, 105(9): 813–817.
- [27] DUARTE S, BABER J, FUJII T, *et al.* Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis [J]. *Matrix Biology*, 2015, 44: 147–156.
- [28] MEIER RPH, MEYER J, MONTANARI E, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist modulates liver inflammation and fibrosis in mice in a model-dependent manner [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1295.
- [29] GIELING RG, WALLACE K, HAN YP. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis [J]. *Am J Physiol-Gastr L*, 2009, 296(6): G1324–G1331.
- [30] KISHIMOTO T. IL-6: From its discovery to clinical applications [J]. *Int Immunol*, 2010, 22(5): 347–352.

(责任编辑: 黄周梅 韩晓红)

作者简介



刘恒旭, 硕士研究生, 主要研究方向为代谢性疾病及其中药新药研发。
E-mail: liuhengxu81@163.com



齐亚娟, 博士, 教授, 主要研究方向为代谢性疾病及其中药新药研发。
E-mail: yajuanqi@ncst.edu.cn