

乌梅抗肝纤维化的作用及机制研究[△]

郝峰^{1*}, 李冀², 杜菁³, 欧阳宇晨¹, 崔艺春⁴, 魏爽^{3#}(1. 江西中医药大学临床医学院, 南昌 330004; 2. 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040; 3. 江西中医药大学中医学院, 南昌 330004; 4. 江西中医药大学针灸推拿学院, 南昌 330004)

中图分类号 R285;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)02-0172-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.02.07



摘要 目的 探讨乌梅抗肝纤维化(HF)的作用及机制。方法 将雄性SD大鼠随机分为正常对照组($n=10$)与造模组($n=50$),造模组大鼠以四氯化碳诱导建立HF模型。将造模组大鼠分为模型组(生理盐水)、阳性对照组[秋水仙碱, 0.09 mg/(kg·d)]及乌梅低、中、高剂量组[1.35、2.70、5.40 g/(kg·d)],每组9只。大鼠每天灌胃相应药物/生理盐水1次,持续8周。末次给药后,计算大鼠肝脏指数,检测其肝功能指标、肝纤维化四项、氧化应激指标及炎症因子水平,采用苏木精-伊红(HE)染色法观察大鼠肝组织病理改变、Masson染色法观察大鼠HF程度、透射电镜法观察大鼠肝组织超微结构、TUNEL染色法检测大鼠肝细胞凋亡水平,并采用Western blot法检测大鼠肝组织中转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、血小板源性生长因子(PDGF)蛋白的表达。结果 与正常对照组相比,模型组大鼠丙氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、天冬氨酸转氨酶、总胆红素、丙二醛、Ⅲ型前胶原蛋白、Ⅳ型前胶原酶、层粘连蛋白、透明质酸、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 水平和TGF- β_1 、PDGF蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$),超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化酶水平均显著降低($P<0.01$);HE、Masson染色及透射电镜观察结果均提示模型组大鼠出现了明显的HF特征。与模型组比较,乌梅各剂量组大鼠上述指标均有不同程度改善,其中乌梅中、高剂量组大鼠上述指标均被显著逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 乌梅具有抗HF的作用,该作用可能是通过抗氧化、抗炎、减少胶原产生、抑制PDGF表达及调控TGF- β_1 信号通路等机制实现的。**关键词** 乌梅;肝纤维化;转化生长因子 β_1 ;血小板源性生长因子

Effect and mechanism of *Prunus mume* against hepatic fibrosis

HAO Feng¹, LI Ji², DU Jing³, OUYANG Yuchen¹, CUI Yichun⁴, WEI Shuang³(1. College of Clinical Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. College of Basic Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 4. College of Acupuncture, Moxibustion and Massage, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effect and mechanism of *Prunus mume* against hepatic fibrosis (HF). **METHODS** Male SD rats were randomly divided into normal control group ($n=10$) and modeling group ($n=50$). The modeling group established HF model using carbon tetrachloride. The modeled rats were randomly divided into model group (normal saline), positive control group [colchicine, 0.09 mg/(kg·d)], and *P. mume* low-dose, medium-dose and high-dose groups [1.35, 2.70, 5.40 g/(kg·d)], with 9 rats in each group. They were given the corresponding drug/normal saline intragastrically, once a day, for 8 consecutive weeks. After the last medication, the liver index was calculated, while liver function indexes, liver fiber indexes, oxidative stress indicators and inflammatory factors of rats were measured. HE staining was used to observe the pathological changes in liver tissue of rats; Masson staining was used to observe the degree of HF in liver tissue of rats; transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of liver tissue in rats; TUNEL staining was used to detect liver cell apoptosis in each group of rats. Western blot method was used to detect the protein expressions of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and platelet-derived growth factor (PDGF) in liver tissue of rats. **RESULTS** Compared with normal control group, the levels of alanine transaminase, alkaline phosphatase, aspartate transaminase, total bilirubin, malondialdehyde, procollagen type III protein, IV-type pre collagenase, laminin, hyaluronic acid, interleukin-6, tumor necrosis factor- α , as well as the protein expressions of TGF- β_1 and PDGF in model group were increased significantly, while the levels of superoxide dismutase and glutathione peroxidase were significantly reduced ($P<0.01$); the HE, Masson staining and transmission electron microscopy observation results showed obvious HF characteristics in rats of model group. Compared with model group, varying degrees of improvement in above indexes were observed in *P. mume* groups, and the above indicators of rats in *P. mume* medium-dose and high-dose groups were reversed significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** *P. mume* has an anti-HF effect, which may be achieved through mechanisms such as antioxidation, anti-

[△]基金项目 江西省卫生健康委科技计划项目(No.202211426); 江西中医药大学2021年度上半年博士科研启动基金课题(No. 2021BSZR011)

* 第一作者 副教授,主治医师。研究方向:经方方证药证。
E-mail:380368678@qq.com

通信作者 副教授,主治医师。研究方向:方剂配伍。E-mail:
864031535@qq.com

inflammation, reduction of collagen production, inhibition of PDGF protein expression, and regulation of TGF- β signaling pathway.

KEYWORDS *Prunus mume*; hepatic fibrosis; transforming growth factor- β ; platelet-derived growth factor

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是在各种原因致肝细胞受损时,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)发生的病理变化。HF是慢性肝病发展到肝硬化的必经阶段,若未得到有效治疗,可显著增加肝衰竭和肝细胞癌的发生率。研究指出,早期干预HF的发生发展或促使其逆转,是预防肝硬化及其他恶性肝病发生的重要措施^[1]。然而,目前西医治疗HF的手段较为单一,主要为抗病毒、保肝及对症治疗,疗效欠佳^[2]。因此,探索新的HF防治药物具有重要意义。

中医学尚无“肝纤维化”的病名记载,但根据其临床特征, HF当归于“积聚”“癥瘕”“臌胀”“死肌”等范畴。研究表明,中药在防治HF方面疗效明确,且具有多成分、多靶点、多角度及长期服用副作用较小的优势^[3]。乌梅为临床常用药,《神农本草经》言其具有治疗“死肌”之功效,《本草纲目》认为其可治“恶肉”,且有研究证实重用乌梅的乌梅丸对息肉、癍痕等有很好的疗效^[4-5]。此外,乌梅中含多种黄酮类化合物,而黄酮类化合物具有较低的毒性和广泛的药理活性,已有研究证实其具有抗HF作用^[6]。由此可见,乌梅具有一定的抗HF潜力。

HF的发生发展是一个复杂的病理过程,其中肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的激活是HF发生的关键环节,而HSC的激活与促炎或促纤维化因子密切相关^[7]。研究指出,肝细胞可直接激活HSC,释放转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等促纤维化因子以及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)等炎症因子,促使HSC向肌成纤维细胞转化,增强HSC合成ECM的能力并抑制ECM的分解,从而促进HF的发生发展^[8]。同时,有研究发现,氧化应激过程是包括HF在内的诸多疾病发生的重要环节,细胞自由基产生与消除的失衡可使大量氧化自由基蓄积,导致肝损伤及炎症发生,继而诱发HF^[9]。基于此,本研究拟通过动物实验评价乌梅抗HF的作用并观察其对促炎因子、促纤维化因子及氧化应激指标的影响,初步探讨其抗HF的作用机制,以期为乌梅的临床应用及相关新药研发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有ME203E/02型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]、KZ-II型高速组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司)、D3024R型台式高速冷冻离心机和SCI-VS型涡旋混合器[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司]、G20 TWIN型透射电子显微镜(美国FEI公司)、FV3000型共聚焦显微镜(日本Olympus公司)、DK-8B型电热恒温水槽(上海精宏实验

设备有限公司)、Epoch型酶标检测仪(美国BioTek公司)、PBC22A Plus型全自动生化分析仪(深圳市活水床旁诊断仪器有限公司)、5430R型离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 主要药品与试剂

乌梅饮片(批号20240101)购自江西齐仁堂中药饮片有限公司,由江西齐仁堂中药饮片有限公司质检合格并鉴定为蔷薇科植物梅*Prunus mume*(Sieb.) Sieb. et Zucc.的干燥近成熟果实。

秋水仙碱片(批号20221006,规格0.5 mg)购自云南植物药业有限公司;肝功能酶及肝代谢物测定试剂盒(批号分别为20220901、20220901)均购自深圳市活水床旁诊断仪器有限公司;Ⅲ型前胶原蛋白(procollagen type III protein, PCⅢ)、Ⅳ型前胶原酶(Ⅳ-type pre collagenase, Ⅳ-C)、层粘连蛋白(laminin, LN)、透明质酸(hyaluronic acid, HA)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号均为2023-06)均购自江苏酶免实业有限公司;IL-6、TNF- α 定量检测试剂盒(批号分别为RX302856R、RX302058R)均购自泉州市睿信生物科技有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒(批号分别为20221020、20230520、20230224)均购自南京建成生物工程研究所有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(批号20220820)购自北京兰杰柯科技有限公司;兔源TGF- β_1 、PDGF、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(批号分别为21898-1-AP、14075-1-AP、66009-1-Ig、SA00001-2)均购自美国Proteintech公司。

1.3 动物及饲料

本研究所用动物为雄性SPF级SD大鼠,共60只,体重(180 \pm 20) g,6~8周龄,购自江西中医药大学动物实验科技中心,动物使用许可证号为SYXK(赣)2022-0002。购入后,所有大鼠均架笼饲养,实验室自然采光、通风良好且温度和湿度适宜。实验饲料由江西中医药大学动物实验科技中心提供,动物实验方案符合江西中医药大学实验动物伦理委员会条例(伦理批号为20220301016)。

2 方法

2.1 乌梅药液的制备

取乌梅饮片,以10倍量水浸泡0.5 h,武火快速煮沸,然后转文火煎煮30 min,过滤,重复操作1次。将2次煎煮所得药液混合均匀后蒸发浓缩,得每1 mL含生药量0.54 g的药液,4 $^{\circ}$ C下保存,临时时稀释至所需浓度。

2.2 HF大鼠模型制备

将60只大鼠适应性饲养1周后,随机分为正常对照组(10只)和造模组(50只)。其中,造模组大鼠使用四氯化碳(CCl_4)诱导建立HF模型:大鼠皮下注射首剂为5 mL/kg的40% CCl_4 -橄榄油溶液,而后每隔3 d皮下注射40% CCl_4 -橄榄油溶液(3 mL/kg)1次,连续8周^[10];正常对照组大鼠皮下注射等体积橄榄油。8周后,随机选取造模组大鼠5只和正常对照组大鼠1只,麻醉后取肝组织进行HE及Masson染色,若肝组织可见明显的纤维化病变和炎症细胞浸润,则确认HF大鼠模型复制成功。

2.3 分组与给药

依据2020年版《中国药典》(一部)所载乌梅参考用量、文献报道临床常用剂量及古今度量衡^[11],本研究按成人日服乌梅30 g生药量给药,折算得到大鼠等效给药剂量为2.7 g/(kg·d)。

模型建立成功后,将造模组大鼠随机分为模型组、阳性对照药组[秋水仙碱,0.09 mg/(kg·d)^[12]]和乌梅低、中、高剂量组[1.35、2.70、5.40 g/(kg·d),分别为0.5、1、2倍临床等效剂量],每组9只。各给药组大鼠灌胃相应药物,灌胃体积均为10 mL/kg;正常对照组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水;每天1次,连续8周。

2.4 体重、肝脏质量记录及取材

末次给药结束后,称定各组大鼠的体重,麻醉后打开腹腔,于腹主动脉取血,血样静置后于4℃下以3 000 r/min离心10 min,获得上层血清,于-20℃下保存,备用。取血后,将肝脏充分暴露,快速分离其周围组织,取出整个肝脏,称重并记录。分别于各组大鼠肝脏相同部位剪取部分肝组织,洗净,吸干,以4%多聚甲醛溶液固定,待后续行肝组织HE、Masson染色和超微结构观察;剩余肝组织于-80℃下冻存,用于后续相关指标及蛋白的提取与检测。

2.5 大鼠肝脏指数测定

根据大鼠体重、肝脏质量计算肝脏指数:肝脏指数(%)=肝脏质量(g)/体重(g)×100%。

2.6 大鼠肝功能、肝纤维化四项及氧化应激、炎症因子指标测定

使用全自动生化分析仪,分别测定各组大鼠血清中肝功能指标[丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)及总胆红素(total bilirubin, TBIL)]水平,使用酶标仪以ELISA法检测各组大鼠血清中纤维化四项指标(PCⅢ、Ⅳ-C、LN、HA)水平。称取“2.4”项下各组大鼠冻存的肝组织适量,按照相应试剂盒说明书要求操作,使用酶标仪检测肝组织中氧化应激指标(SOD、MDA、GSH-Px)、炎症因子(IL-6、TNF- α)水平。

2.7 大鼠肝组织病理改变观察

取“2.4”项下固定于4%多聚甲醛溶液中48 h的各组大鼠肝组织,用流水冲洗;经乙醇脱水、石蜡包埋、切片后,分别进行苏木精染色和伊红染色,脱水后封片,使

用显微镜观察其肝组织病理改变并拍照。

2.8 大鼠肝组织纤维化程度观察

取“2.4”项下固定于4%多聚甲醛溶液中的各组大鼠肝组织,常规制备石蜡切片,经脱蜡复水后,依次行Weigert铁苏木精染液染核(5 min)、盐酸乙醇分化(30 s)、水冲洗(1 min)、Masson蓝液返蓝(1 min)、水漂洗(2 min)、丽春红品红染液染色(5 min)、弱酸(即水与弱酸溶液以体积比2:1配出的弱酸工作液,下同)清洗(1 min)、磷钼酸溶液漂洗(1 min)、弱酸工作液漂洗(1 min)、苯胺蓝染液染色(2 min)、弱酸工作液漂洗(1 min),然后进行梯度乙醇脱水(3次,每次10 s)、二甲苯透明后,以中性树胶封片,待封固、晾干后,使用显微镜观察其肝组织纤维化程度并拍照。

2.9 大鼠肝组织超微结构观察

取“2.4”项下固定于4%多聚甲醛溶液中48 h的各组大鼠肝组织,以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗15 min×3次,再于1%锇酸固定液中固定2 h,以漂洗液漂洗15 min×3次;于4℃下行梯度乙醇脱水,再用无水丙酮室温脱水20 min×3次;于室温下,将组织置于由无水丙酮和包埋液以体积比1:1组成的混合液中包埋3 h,再在由无水丙酮与包埋液以体积比1:2组成的混合液中静置过夜,最后在37℃包埋液中放置3 h;将组织依次置于37℃烘箱内过夜、45℃烘箱内12 h、60℃烘箱内48 h;以超薄切片机制片后,行3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色,使用透射电镜观察其肝组织超微结构并拍照。

2.10 大鼠肝细胞凋亡水平检测

采用TUNEL法检测。取“2.4”项下固定于4%多聚甲醛溶液中的各组大鼠肝组织,常规制备石蜡切片,依次在二甲苯溶液中浸泡15 min×3次、无水乙醇中浸泡10 min×2次、90%乙醇中浸泡2 min×1次、水中浸泡2 min×1次,擦干;加入20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不含DNase的蛋白酶K,于37℃下孵育后用PBS在摇床上清洗3 min×3次,擦干;加入50 μL 的TUNEL检测液,37℃下避光孵育2 h,用PBS在摇床上洗3 min×3次,擦干;以抗荧光淬灭封片剂封片,使用共聚焦显微镜观察各组大鼠肝细胞凋亡情况并采集图像。TUNEL染色后,正常细胞核以蓝染为主,凋亡细胞核呈棕褐色。按下式计算细胞凋亡率:细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

2.11 大鼠肝组织中TGF- β_1 、PDGF蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.4”项下各组大鼠冻存的肝组织适量,提取总蛋白,以BCA法测定蛋白的浓度。将蛋白高温变性,依次进行分离胶配制、上样、电泳、转膜、洗膜、封闭等操作;分别加入TGF- β_1 、PDGF抗体(稀释比例均为1:1 000)及内参 β -actin抗体(稀释比例为1:50 000),孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:50 000),室温下摇床振摇0.5 h,孵育60 min;洗膜后,加入ECL化学发光试剂进行显色,置于凝胶成像系统成像。采用Image J软件进行灰度值检测和数据分析,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.12 统计学方法

采用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,采用LSD-*t*检验进行进一步两两比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠体重、肝脏质量、肝脏指数比较

与正常对照组相比,模型组大鼠体重显著减少($P < 0.05$)。与模型组相比,各给药组大鼠体重和乌梅中剂量组大鼠肝脏质量均显著增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与阳性对照药组相比,乌梅高、中、低剂量组大鼠体重和肝脏质量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠的肝脏指数相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠体重、肝脏质量及肝脏指数比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	体重/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
正常对照组	363.97 ± 31.79	10.32 ± 1.01	2.80 ± 0.20
模型组	321.14 ± 52.75 ^a	9.34 ± 2.28	2.90 ± 0.60
阳性对照药组	405.76 ± 30.30 ^b	11.00 ± 1.19	2.70 ± 0.10
乌梅低剂量组	415.12 ± 40.80 ^b	11.32 ± 1.47	2.70 ± 0.10
乌梅中剂量组	445.40 ± 40.91 ^b	11.73 ± 2.21 ^c	2.60 ± 0.30
乌梅高剂量组	402.22 ± 22.77 ^b	11.51 ± 1.16	2.90 ± 0.10

a:与正常对照组相比, $P < 0.05$;b:与模型组相比, $P < 0.01$;c:与模型组相比, $P < 0.05$ 。

3.2 大鼠血清中肝功能指标比较

与正常对照组相比,模型组大鼠血清中AST、ALT、TBIL、ALP水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,各给药组大鼠血清中ALT水平以及阳性对照药组和乌梅中、高剂量组大鼠血清中AST、TBIL、ALP水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与阳性对照药组相比,乌梅高剂量组大鼠血清中ALT、TBIL水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠血清中AST、ALT、TBIL、ALP水平比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	AST/(U/L)	ALT/(U/L)	TBIL/(μ mol/L)	ALP/(U/L)
正常对照组	114.42 ± 8.68	62.41 ± 16.59	0.71 ± 0.39	133.27 ± 18.63
模型组	439.12 ± 21.96 ^a	318.47 ± 30.96 ^a	13.41 ± 2.68 ^a	427.32 ± 31.44 ^a
阳性对照药组	152.56 ± 25.85 ^b	76.95 ± 9.10 ^b	1.31 ± 0.65 ^b	182.17 ± 22.00 ^b
乌梅低剂量组	406.01 ± 10.72 ^a	244.10 ± 25.90 ^a	11.10 ± 2.49 ^a	391.55 ± 14.25 ^a
乌梅中剂量组	321.20 ± 7.39 ^a	171.88 ± 3.59 ^a	8.85 ± 0.97 ^a	325.14 ± 27.54 ^a
乌梅高剂量组	226.40 ± 24.63 ^a	104.32 ± 13.73 ^b	4.54 ± 1.43 ^b	256.73 ± 38.53 ^c

a:与正常对照组相比, $P < 0.01$;b:与模型组相比, $P < 0.01$;c:与模型组相比, $P < 0.05$;d:与阳性对照药组相比, $P < 0.01$;e:与阳性对照药组相比, $P < 0.05$ 。

3.3 大鼠血清中肝纤维化四项指标比较

与正常对照组相比,模型组大鼠血清中PC III、IV-C、LN、HA水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,阳性对照药组和乌梅中、高剂量组大鼠血清中PC III、IV-C水平以及各给药组大鼠血清中LN、HA水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与阳性对照药组相比,乌梅高剂量组大鼠血清中IV-C水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表3。

表3 各组大鼠血清中PC III、IV-C、LN、HA水平比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	PC III/(μ g/L)	IV-C/(ng/mL)	LN/(μ g/L)	HA/(ng/L)
正常对照组	11.77 ± 2.31	8.00 ± 1.49	110.91 ± 8.46	234.11 ± 36.77
模型组	56.73 ± 3.11 ^a	25.00 ± 2.22 ^a	346.86 ± 30.03 ^a	655.02 ± 47.48 ^a
阳性对照药组	17.76 ± 2.44 ^b	10.84 ± 1.50 ^b	125.43 ± 14.83 ^b	282.83 ± 20.16 ^b
乌梅低剂量组	48.93 ± 4.39 ^d	22.65 ± 3.63 ^d	290.34 ± 33.85 ^{cd}	545.11 ± 44.58 ^{bd}
乌梅中剂量组	39.75 ± 2.13 ^{bd}	18.42 ± 2.11 ^{cd}	221.89 ± 21.15 ^{bd}	434.65 ± 28.79 ^{bd}
乌梅高剂量组	30.04 ± 6.07 ^{bd}	14.43 ± 2.05 ^b	187.14 ± 19.86 ^{bc}	372.33 ± 28.04 ^{bc}

a:与正常对照组相比, $P < 0.01$;b:与模型组相比, $P < 0.01$;c:与模型组相比, $P < 0.05$;d:与阳性对照药组相比, $P < 0.01$;e:与阳性对照药组相比, $P < 0.05$ 。

3.4 大鼠肝组织中氧化应激指标比较

与正常对照组相比,模型组大鼠肝组织中MDA水平显著升高($P < 0.01$),SOD、GSH-Px水平均显著降低($P < 0.01$)。与模型组相比,阳性对照药组及乌梅中、高剂量组大鼠肝组织中MDA水平均显著降低($P < 0.01$),SOD水平显著升高($P < 0.05$);各给药组大鼠肝组织中GSH-Px水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与阳性对照药组相比,乌梅中、高剂量组大鼠肝组织中MDA水平和乌梅高剂量组大鼠肝组织中SOD水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表4。

表4 各组大鼠肝组织中MDA、SOD、GSH-Px水平比较($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)	GSH-Px/(mmol/mg)
正常对照组	0.64 ± 0.15	55.48 ± 3.78	113.27 ± 5.95
模型组	2.58 ± 0.43 ^a	28.59 ± 3.23 ^a	37.11 ± 5.12 ^a
阳性对照药组	1.02 ± 0.20 ^b	51.85 ± 4.11 ^b	102.35 ± 3.25 ^b
乌梅低剂量组	2.16 ± 0.15 ^d	34.04 ± 3.92 ^d	49.66 ± 6.43 ^{cd}
乌梅中剂量组	1.71 ± 0.13 ^b	37.27 ± 4.24 ^{cd}	77.42 ± 4.23 ^{bd}
乌梅高剂量组	1.44 ± 0.15 ^b	43.96 ± 3.35 ^b	90.33 ± 4.80 ^{bc}

a:与正常对照组相比, $P < 0.01$;b:与模型组相比, $P < 0.01$;c:与模型组相比, $P < 0.05$;d:与阳性对照药组相比, $P < 0.01$;e:与阳性对照药组相比, $P < 0.05$ 。

3.5 各组大鼠肝组织中炎症因子比较

与正常对照组相比,模型组大鼠肝组织中IL-6、TNF- α 水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,阳性对照药组和乌梅高剂量组大鼠肝组织中IL-6、TNF- α 水平以及乌梅中剂量组大鼠肝组织中IL-6水平均显著降低($P < 0.01$);与阳性对照药组相比,乌梅高剂量组大鼠肝组织中IL-6、TNF- α 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表5。

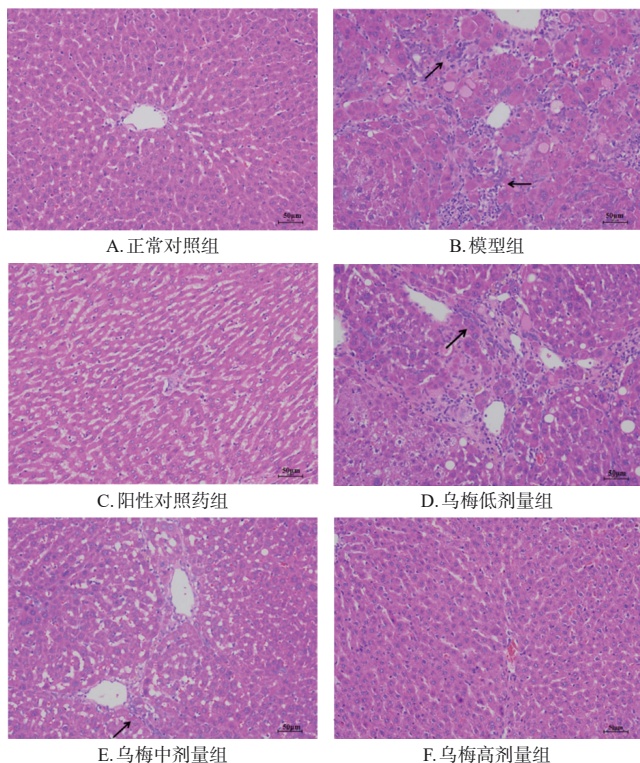
表5 各组大鼠肝组织中IL-6、TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 9, \text{pg/g}$)

组别	IL-6	TNF- α
正常对照组	6.89 ± 1.00	59.66 ± 8.21
模型组	18.24 ± 2.88 ^a	132.52 ± 11.61 ^a
阳性对照药组	8.70 ± 1.05 ^b	74.73 ± 7.64 ^b
乌梅低剂量组	15.67 ± 1.47 ^d	120.79 ± 16.68 ^d
乌梅中剂量组	12.31 ± 1.06 ^{cd}	111.99 ± 7.13 ^c
乌梅高剂量组	9.96 ± 1.24 ^b	92.18 ± 6.34 ^b

a:与正常对照组相比, $P < 0.01$;b:与模型组相比, $P < 0.01$;c:与阳性对照药组相比, $P < 0.01$;d:与阳性对照药组相比, $P < 0.05$ 。

3.6 大鼠肝组织病理形态比较

正常对照组大鼠肝组织结构未见明显异常。模型组大鼠肝组织结构发生明显改变,可见汇管区炎症细胞浸润,轻度扩张;肝小叶结构受损,小叶中央静脉难以辨认;肝细胞变性坏死,出现空泡改变且排列紊乱,细胞核染色加深;肝窦狭窄,出现明显桥接纤维化,可见多条交错的纤维间隔,将肝细胞分隔包绕。与模型组相比,各药物组大鼠肝组织病理结构明显改善,空泡明显减少,肝小叶结构改善,肝细胞排列尚存一定规律,肝索结构较清晰,肝窦结构较明显,未见假小叶结构形成,汇管区纤维组织增生明显减少。结果见图1。



黑色箭头:炎症细胞浸润区域或胶原纤维聚集区域。

图1 各组大鼠肝组织病理形态的显微图(HE染色,标尺=50 μm)

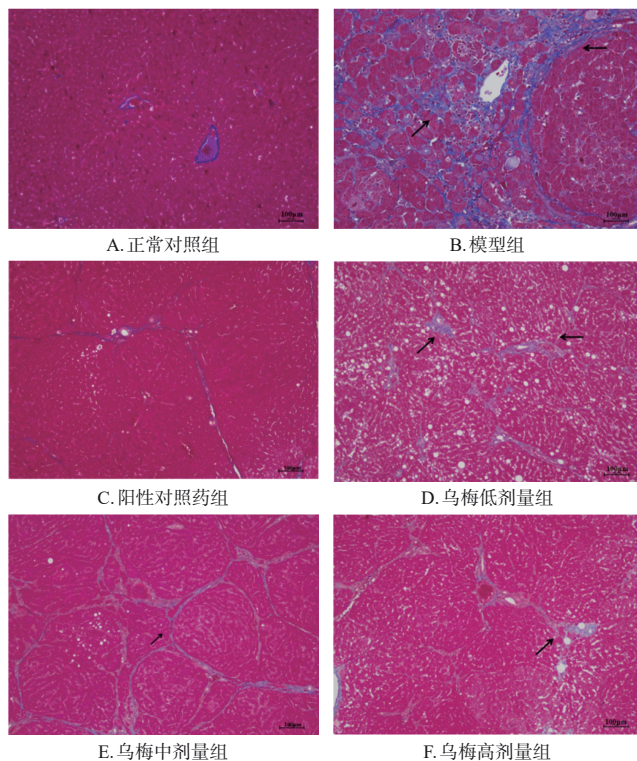
3.7 各组大鼠肝组织纤维化程度比较

正常对照组大鼠肝结构组织清晰,肝细胞胞质完整,细胞核清晰,仅在汇管区及中央静脉可见蓝染的胶原纤维,肝细胞间未见明显纤维增生,肝窦未扩张,肝细胞呈放射状整齐排列。模型组大鼠肝组织可见大量胶原纤维(呈蓝色)沉积,纤维条索(呈深蓝色)较粗。与模型组相比,各药物组大鼠汇管区可见不同程度胶原纤维增生,但纤维着色较浅,纤维条索较细。结果见图2。

3.8 各组大鼠肝组织超微结构比较

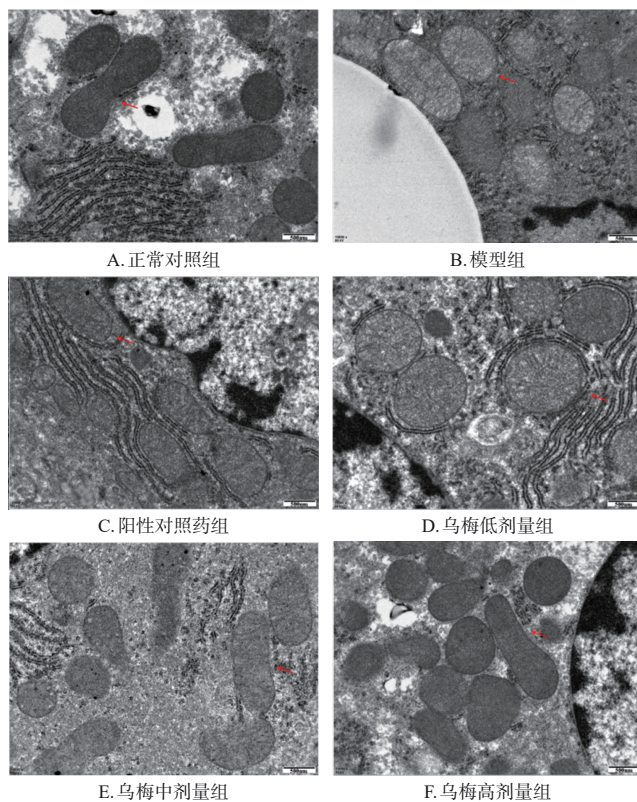
正常对照组大鼠肝细胞线粒体形态结构及分布正常,排列紧密,线粒体嵴清晰、致密,基质均匀。与正常对照组相比,模型组大鼠肝细胞线粒体大多畸形且明显肿胀,内部结构融合,嵴明显减少甚至消失。与模型

组相比,各药物组大鼠肝细胞线粒体损伤显著改善,正常形态结构的线粒体数量显著增加。结果见图3。



黑色箭头:胶原纤维聚集区域。

图2 各组大鼠肝组织纤维化程度的显微图(Masson染色,标尺=100 μm)



红色箭头:线粒体。

图3 各组大鼠肝组织超微结构的电子显微图(标尺=500 nm)

3.9 大鼠肝细胞凋亡情况比较

与正常对照组[细胞凋亡率(0.56 ± 0.06)%]比较,模型组大鼠肝组织细胞凋亡率[(4.15 ± 0.30)%]显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照药组和乌梅低、中、高剂量组大鼠肝组织细胞凋亡率[分别为(1.93 ± 0.11)%、(1.70 ± 0.48)%、(1.62 ± 0.48)%、(1.53 ± 0.25)%]均显著降低($P < 0.05$),且乌梅各剂量组与阳性对照药组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图4。

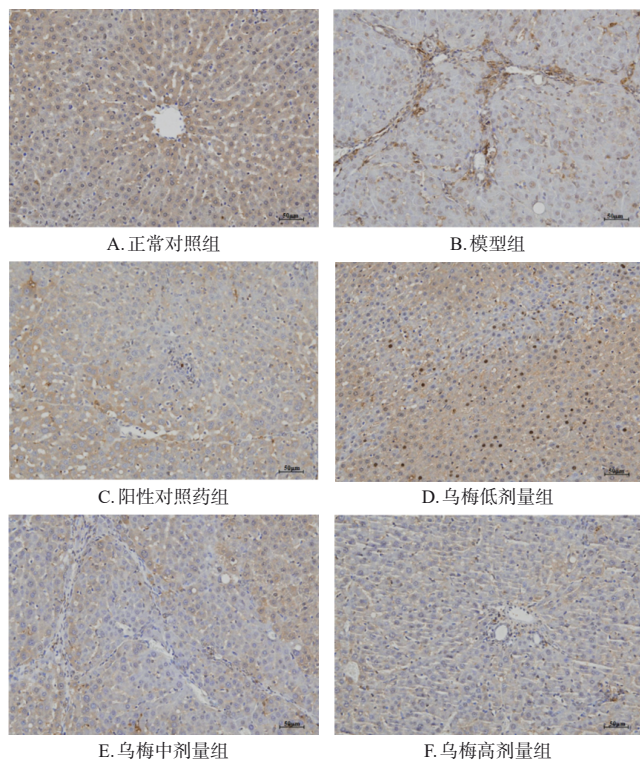
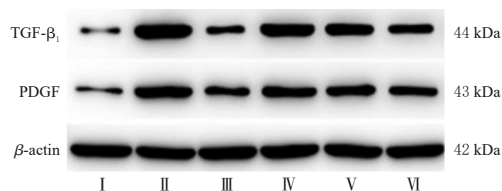


图4 各组大鼠肝组织细胞凋亡的共聚焦显微镜(TUNEL染色,标尺=50 μm)

3.10 大鼠肝组织中TGF-β₁、PDGF蛋白表达比较

与正常对照组相比,模型组大鼠肝组织中TGF-β₁、PDGF蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,各药物组大鼠肝组织中TGF-β₁、PDGF蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$);与阳性对照药组相比,乌梅高剂量组大鼠肝组织中TGF-β₁蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图5、表6。



I: 正常对照组; II: 模型组; III: 阳性对照药组; IV: 乌梅低剂量组; V: 乌梅中剂量组; VI: 乌梅高剂量组。

图5 各组大鼠肝组织中TGF-β₁、PDGF蛋白表达的电泳图

表6 各组大鼠肝组织中TGF-β₁、PDGF蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	TGF-β ₁ /β-actin	PDGF/β-actin
正常对照组	0.13 ± 0.04	0.10 ± 0.03
模型组	1.11 ± 0.08 ^a	0.88 ± 0.06 ^a
阳性对照药组	0.26 ± 0.04 ^b	0.39 ± 0.03 ^b
乌梅低剂量组	0.76 ± 0.12 ^{bc}	0.70 ± 0.01 ^{bc}
乌梅中剂量组	0.63 ± 0.13 ^{bc}	0.59 ± 0.03 ^{bc}
乌梅高剂量组	0.44 ± 0.09 ^b	0.54 ± 0.02 ^{bc}

a: 与正常对照组相比, $P < 0.01$; b: 与模型组相比, $P < 0.01$; c: 与阳性对照药组相比, $P < 0.01$ 。

4 讨论

ALT及AST是临床常用间接判断肝细胞损伤情况的重要标志物,二者血清水平的升高提示肝细胞发生损伤,能够在一定程度上反映肝脏功能状态;ALP与TBIL也能反映肝脏功能状态,其水平的升高同样可提示肝细胞损伤坏死;肝纤维化四项包括PCⅢ、Ⅳ-C、LN、HA,均参与了HF的发生及进展,是目前评估HF水平、直观反映HF进展的指标之一^[13]。当HF发生时,上述指标会发生明显的变化,且其水平下调后HSC的激活及胶原蛋白的蓄积将受到抑制,继而延缓或抑制HF的进展^[14]。肝细胞过度凋亡也被认为是肝损伤的特征,也是HF的关键诱因^[15],故常使用TUNEL染色法观察肝细胞凋亡情况,以判断HF程度。此外,秋水仙碱能较好地改善HF,是抗HF药物研究中的常用阳性对照药,因此本研究也以其为阳性对照药开展药效研究。本研究结果显示,模型组大鼠AST、ALT、TBIL、ALP、PCⅢ、Ⅳ-C、LN、HA水平均较正常对照组显著升高;各药物组大鼠的ALT、LN、HA水平以及阳性对照药组和乌梅中、高剂量组大鼠的AST、TBIL、ALP、PCⅢ、Ⅳ-C水平均较模型组显著降低,并且乌梅高剂量组大鼠部分指标与阳性对照药组相比差异无统计学意义,再结合HE、Masson、TUNEL染色及透射电镜观察结果,提示乌梅对大鼠HF具有一定的改善作用。

氧化应激损伤能促进HF的进展。GSH-Px可减少过量自由基产生,进而抑制HF进程;SOD及MDA水平是反映氧化应激损伤的重要指标^[16]。肝脏在发生纤维化时,会伴有不同程度炎症的发生。TNF-α是由巨噬细胞分泌的具有肝脏毒性的促炎细胞因子,可直接促进HSC活化、增殖以及ECM的合成;作为一种经典的促炎因子,IL-6也常被用于判断慢性HF的程度^[17]。HF发生的关键因素之一是HSC激活。PDGF由血小板、巨噬细胞、肌成纤维细胞和HSC产生,是促进HSC活化的一种生长因子;TGF-β₁是一种重要的细胞因子,可在慢性肝损伤过程中促进HF的发生发展^[18],是最为有效的促HF因子之一。本研究结果显示,与正常对照组相比,模型组大鼠MDA、IL-6、TNF-α水平及TGF-β₁、PDGF蛋白表达水平均显著升高,SOD、GSH-Px水平均显著降低。给药后,乌梅各剂量组大鼠上述指标均有不同程度改善,其中以乌梅高剂量组效果最好,并且乌梅高剂量组大鼠部分指

标与阳性对照药组相比差异无统计学意义。这提示乌梅改善HF的机制可能与抗氧化、抗炎等多种作用有关。

综上所述,乌梅对HF具有较好的改善作用,其作用可能是通过抗氧化、抗炎、减少胶原产生、抑制PDGF表达及调控TGF- β_1 信号通路等机制实现的。

参考文献

- [1] LI M, WANG Z Q, ZHANG L, et al. Burden of cirrhosis and other chronic liver diseases caused by specific etiologies in China, 1990-2016: findings from the global burden of disease study 2016[J]. *Biomed Environ Sci*, 2020, 33(1):1-10.
- [2] DAMIRIS K, TAFESH Z H, PYRSOPOULOS N. Efficacy and safety of anti-hepatic fibrosis drugs[J]. *World J Gastroentero*, 2020, 26(41):6304-6321.
- [3] 韦柳婷,高松林,吴凡,等. 专利中药复方治疗肝纤维化的用药规律及机制研究[J]. *科学技术与工程*, 2024, 24(8):3133-3144.
- WEI L T, GAO S L, WU F, et al. Medication regularity and mechanism of patented Chinese herbal compounds in treating hepatic fibrosis[J]. *Sci Technol Eng*, 2024, 24(8):3133-3144.
- [4] 张保伟,李爱峰,赵志敏. 乌梅丸对免疫损伤性肝纤维化大鼠肝组织细胞因子TGF- β_1 及其mRNA的影响[J]. *中国中医急症*, 2007(5):585-586.
- ZHANG B W, LI A F, ZHAO Z M. The effects of Wumei pill on the expression TGF- β_1 and the mRNA in liver tissue of immunity-damaged liver fibrosis rats[J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2007(5):585-586.
- [5] 徐海龙,门科丽,潘林康. 刘兴山教授运用乌梅丸治验[J]. *中医研究*, 2021, 34(1):62-65.
- XU H L, MEN K L, PAN L K. Professor Liu Xingshan's experience in treating Mume Fructus pill[J]. *Tradit Chin Med Res*, 2021, 34(1):62-65.
- [6] 杨亚焱,王瑞,钱程程,等. 乌梅化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测[J]. *中成药*, 2023, 45(5):1583-1588.
- YANG Y T, WANG R, QIAN C C, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Mume Fructus and prediction of quality markers[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2023, 45(5):1583-1588.
- [7] 李燕,赖泳. 炎症细胞和细胞因子在肝纤维化中的作用研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(18):1980-1984.
- LI Y, LAI Y. Research progress on the roles of inflammatory cells and cytokines in liver fibrosis[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2018, 38(18):1980-1984.
- [8] 梁文杰,陈晶,杜雅菊. 参与肝纤维化形成的细胞和细胞因子的新进展[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2017, 26(5):581-584.
- LIANG W J, CHEN J, DU Y J. New progress of the cells and cytokines involved in the formation of liver fibrosis[J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 26(5):581-584.
- [9] YANG C Q, ZEISBERG M, MOSTERMAN B, et al. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(1):147-159.
- [10] 李高辉,吕文良,闫瞰,等. 四氯化碳致大鼠肝纤维化动物模型的文献再评价[J]. *实验动物科学*, 2021, 38(3):39-46.
- LI G H, LYU W L, YAN T, et al. Re-evaluation of literature on rat liver fibrosis animal model induced by carbon tetrachloride[J]. *Lab Anim Sci*, 2021, 38(3):39-46.
- [11] 王颖,赵冠宇,薛淑萍,等. 乌梅丸及其类方治疗胃肠疾病的临床与基础研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(3):122-128.
- WANG Y, ZHAO G Y, XUE S P, et al. Mume Fructus wan and its similar prescriptions in the treatment of gastrointestinal diseases[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2023, 39(3):122-128.
- [12] 章波,麦琬婷,檀燕君,等. 秋水仙碱治疗肝纤维化的网络药理学研究[J]. *广西医科大学学报*, 2020, 37(3):372-379.
- ZHANG B, MAI W T, TAN Y J, et al. A network pharmacological study of colchicine in the treatment of liver fibrosis[J]. *J Guangxi Med Univ*, 2020, 37(3):372-379.
- [13] 田甜,郑璐,汤雷,等. 肝纤维化大鼠肝脏中组蛋白修饰水平的变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(3):554-558.
- TIAN T, ZHENG L, TANG L, et al. Changes of histone modification levels in rats with liver fibrosis[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2019, 35(3):554-558.
- [14] 付月月,朱兰平,张国梁,等. 夏枯草硫酸多糖对CCl₄致大鼠肝纤维化及TGF- β_1 诱导的大鼠肝星状细胞活化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(14):147-152.
- FU Y Y, ZHU L P, ZHANG G L, et al. Effect of *Prunellae Spica sulfated polysaccharide* on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis and activation of hepatic stellate cell induced by TGF- β_1 [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2018, 24(14):147-152.
- [15] ZHANG K, ZHANG M X, YAO Q B, et al. The hepatocyte-specifically expressed lnc-HSER alleviates hepatic fibrosis by inhibiting hepatocyte apoptosis and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Theranostics*, 2019, 9(25):7566-7582.
- [16] LIAO Z Z, ZHANG J Y, LIU B, et al. Polysaccharide from okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] improves antioxidant capacity via PI3K/AKT pathways and Nrf2 translocation in a type 2 diabetes model[J]. *Molecules*, 2019, 24(10):1906.
- [17] 陈秀梅,王英杰,赵成周,等. 三味甘露对大鼠肝纤维化的改善作用及机制[J]. *中国药房*, 2024, 35(6):707-711.
- CHEN X M, WANG Y J, ZHAO C Z, et al. Ameliorative effect and mechanism of Sanwei ganlu on hepatic fibrosis in rats[J]. *China Pharm*, 2024, 35(6):707-711.
- [18] MASSAGUÉ J. TGF- β signalling in context[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(10):616-630.

(收稿日期:2024-07-06 修回日期:2024-11-05)

(编辑:林静)