

# 畚药十二时辰总皂苷对 $\text{CCl}_4$ 致小鼠肝纤维化的保护作用

沈锦煌<sup>1</sup>,冯是标<sup>1</sup>,杨娜娜<sup>1</sup>,马新华<sup>1</sup>,钟添华<sup>2</sup>,张永红<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>福建医科大学药学院,福州 350122;<sup>2</sup>自然资源部第三海洋研究所,厦门 361006

**摘要:**研究畚药十二时辰(*Clematis florida* Thunb. var. *plena*)总皂苷对四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导的小鼠肝纤维化的保护作用及其机制。将50只ICR雄性小鼠随机分为正常组、模型组、联苯双酯组和畚药十二时辰总皂苷(SCFP)低高剂量组。除正常组外其余各组腹腔注射 $\text{CCl}_4$ 溶液进行造模。造模结束后,除模型组和正常组灌胃0.1%CMC-Na水溶液外,各药物组按剂量灌胃给予受试药物,末次给药后采集血液和肝脏组织。HE和Masson染色观察各组肝脏病理组织学变化;生化试剂盒和ELISA试剂盒检测血清中谷草转氨酶(AST)和谷丙转氨酶(ALT)的含量及人I型胶原(Col I)和人III型胶原(Col III)的表达水平;肝脏中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)和一氧化氮(NO)的含量;用免疫组化染色检测小鼠肝脏中转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )和 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的表达水平;用Western blot法检测肝脏中TGF- $\beta_1$ 、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、 $\alpha$ -SMA和SMAD2的蛋白表达量。结果显示,与模型组相比,SCFP给药后肝组织破坏程度降低,肝细胞变性程度减轻,胶原沉积也显著减少;SCFP组小鼠血清中ALT和AST水平显著降低、血清中纤维化相关因子Col I和Col III显著性下降,且肝脏组织中TGF- $\beta$ 、MMP-9、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta_1$ 和SMAD2表达显著下降;而肝脏中抗氧化指标SOD和GSH显著性上升、MDA和NO显著性下降。本研究结果表明,畚药十二时辰总皂苷具有抗肝纤维化作用,其机制可能与其减少细胞间质胶原沉积,提高肝脏抗氧化能力和调节TGF-1/Smad信号通路相关蛋白的表达密切相关。

**关键词:**畚药十二时辰总皂苷;肝纤维化;四氯化碳;抗氧化

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)Suppl-0010-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.S.002

## Protective effect of total saponins of *Clematis florida* Thunb. var. *plena* on $\text{CCl}_4$ -induced hepatic fibrosis in mice

SHEN Jin-huang<sup>1</sup>, FENG Shi-biao<sup>1</sup>, YANG Na-na<sup>1</sup>,  
MA Xin-hua<sup>1</sup>, ZHONG Tian-hua<sup>2</sup>, ZHANG Yong-hong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China;

<sup>2</sup>Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361006, China

**Abstract:** To study the protective effect and mechanism of the total saponins from the roots of *Clematis florida* Thunb. var. *plena* on  $\text{CCl}_4$ -induced hepatic fibrosis in mice. Fifty ICR male mice were randomly divided into normal group, model group, bifendatum group and total saponins of *Clematis florida* Thunb. var. *plena* (SCFP) low and high dose groups. Except for the normal group, the mice in the other groups were injected with  $\text{CCl}_4$  solution by intraperitoneal injection. Except for the model group and the normal group, each drug group was given the same dose of 0.1% CMC-Na aqueous solution by intragastric administration. After the last administration, blood and liver tissue of mice were collected. HE and Masson staining were used to observe the histopathological changes of the liver in each group; the contents of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in serum and the expression levels of human collagen type I (Col I) and human collagen type III (Col III) in serum were detected by biochemical kits and ELISA kits; the contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and nitric oxide (NO) in liver; the expression levels of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta_1$ ) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in the liver of mice were detected by immunohistochemical staining; the pro-

收稿日期:2022-03-30 接受日期:2022-10-12

基金项目:国家自然科学基金(41806173);自然资源部海洋三所海洋生物遗传资源重点实验室开放课题(HY201807);福建省科技创新平台项目(2018Y2001);福建省自然科学基金项目(2020J01619)

\*通信作者 Tel:86-591-22862016;E-mail:zhangyh@fjmu.edu.cn

tein expressions of TGF- $\beta_1$ , matrix metalloprotein-9 (MMP-9),  $\alpha$ -SMA and SMAD2 in the liver were detected by Western blot. The results showed that compared with the model group, the SCFP group decreased the degree of liver tissue damage, the degree of hepatocyte degeneration, and significantly decreased collagen deposition, and the serum ALT and AST levels of the mice in the SCFP group was significantly decreased, and the serum fibrosis-related factors Col I and Col III was significantly decreased; the expressions of TGF- $\beta_1$ , MMP-9,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta_1$  and SMAD2 in liver tissue were significantly decreased; the antioxidant indexes SOD and GSH in liver increased significantly, while MDA and NO decreased significantly. The results of this study show that SCFP have anti-hepatic fibrosis effects, and the mechanism may be closely related to reducing the deposition of interstitial collagen, improving the antioxidant capacity of the liver and regulating the expression of TGF-1/Smad signaling pathway-related proteins.

**Key words:** total saponins of *Clematis florida* Thunb. var. *plena*; hepatic fibrosis; carbon tetrachloride; antioxidant

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是肝脏细胞对各种病因所致肝损伤的创伤愈合反应,是慢性肝病发展为肝硬化、肝癌的必要阶段<sup>[1]</sup>。肝纤维化常在慢性肝病患者中发生,会导致不可逆性的肝硬化<sup>[2]</sup>。肝硬化死亡率很高,目前研究发现,在肝纤维化阶段适当治疗,可以逆转肝纤维化过程<sup>[3]</sup>。虽然目前对肝纤维化发病机制的研究已取得了很大进展,但仍缺乏治疗肝纤维化的特异性手段<sup>[4]</sup>。中医角度认为对肝纤维化的治疗应主要集中在活血化瘀、扶正补气和清热解毒这三类中药上<sup>[5]</sup>。

畚药“十二时辰”是毛茛科铁线莲属重瓣铁线莲(*Clematis florida* Thunb. var. *plena* D. Don)的干燥根<sup>[6]</sup>,其味辛,性温,具有通关窍、通经活络、活血止痛、祛风除湿等功效<sup>[7]</sup>是一味颇具地方特色的闽东畚药。通过抑制肝脏中星状细胞活化和弱化肝脏细胞外基质的沉积可以达到控制肝脏的纤维化进程的目的。肝纤维化疾病联系最为紧密的通路是 TGF-1/Smad 通路。因此,本实验通过构建 CCl<sub>4</sub> 致小鼠肝纤维化模型,用畚药十二时辰总皂苷来治疗小鼠的肝纤维化,通过观察小鼠肝脏组织的病理学变化、血清生化指标及 TGF-1/Smad 信号通路相关分子的蛋白表达变化,以期揭示畚药十二时辰总皂苷缓解化学性肝纤维化损伤的作用机制,为后续天然药物抗肝纤维化奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠 50 只,体质量为 18 ~ 20 g,购于福建医科大学动物实验中心,实验动物生产许可证号:SYXK(闽)2014-0003。该研究经福建医科大学实验动物伦理与福利委员会批准(IACUC FJMU 2017-0102)。

### 1.2 药物与试剂

本试验所用药材为畚药十二时辰的根,购于福

建省宁德市畚草堂,由福建医科大学天然药物化学系张永红教授鉴定为十二时辰(*Clematis florida* Thunb. var. *plena* D. Don),将十二时辰醇提浸膏萃取得到正丁醇萃取物,将正丁醇萃取物用 MCI 柱层析 10% ~ 100% 甲醇水梯度洗脱,各馏分经二甲苯耳廓肿胀实验进行抗炎活性筛选,发现 70% 甲醇水组分活性最好,以下实验选择这一组分进行;联苯双酯(1.5 mg/丸,批号:H33021305,万邦德制药集团股份有限公司);谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)和一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所);人 I 型胶原(Col I)和人 III 型胶原(Col III)ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta_1$ )和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、SMAD2 一抗(英国 Abcam); $\beta$ -actin 一抗(美国 Cell Signaling);兔/小鼠通用二抗(美国 Cell Signaling);四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)为分析纯。

### 1.3 主要仪器

酶标仪(美国 Thermo 公司, Multiskan FC 型);台式高速离心机(美国 Beckman 公司, J6HC 型);蛋白电泳仪(北京六一生物科技有限公司, DYY-6C);显影仪(美国 Bio-Rad, ChemiDoc™ Touch)。

### 1.4 动物分组、造模及给药

将 50 只 SPF 级 ICR 小鼠适应性饲养 3 d 之后,随机分为空白对照组(control, Con)、模型组(model, Mod)、联苯双酯阳性药组(125 mg/kg, bifendatum, Bif)和畚药十二时辰总皂苷低浓度组(200 mg/kg, total saponins *Clematis florida* Thunb. var. *plena* in low dose, SCFP-L)、畚药十二时辰总皂苷低浓度组(400 mg/kg, total saponins *Clematis florida* Thunb. var. *plena* in low dose, SCFP-H)。除 Con 组以外的其他组小鼠均以体积浓度为 20% CCl<sub>4</sub> 的花生油溶液腹腔

注射一次, Con 组小鼠腹腔注射花生油, 腹腔注射剂量为 0.1 mL/10 g, 之后以每周三次, 共六周, 建立小鼠肝纤维化模型。建模成功后开始灌胃给药相应药物(0.2 mL/10 g), 每天一次, Con 组和 Mod 组按照相同方法给予 0.1% 羧甲基纤维素钠(0.1% CMC-Na) 水溶液, 连续八周。

### 1.5 血清生化指标检测

实验结束前 12 h 禁食不禁水, 将小鼠用 0.2 mL/10 g 的 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉后称定各组小鼠的体重, 处死后称取肝脏重量, 各组小鼠眼球取血, 静置 1 h, 在离心机上 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清, 按照生化试剂盒上的操作步骤测定各组小鼠血清中 ALT 和 AST 的含量, ELISA 酶标试剂盒上的操作步骤测定血清中 Col I 和 Col III 的含量。

### 1.6 肝脏组织氧化应激指标

取各组小鼠肝脏加入 RIPA 裂解液进行研磨, 在离心机上 3 000 r/min 离心, 取上层组织液, 按照 SOD、GSH、MDA 和 NO 试剂盒说明书的方法检测各组相应物质的在肝脏中的表达水平。

### 1.7 HE 及 Masson 染色

取小鼠肝脏左叶相同部位用 4% 中性多聚甲醛溶液固定, 用石蜡包埋切片, 作常规石蜡切片, 5  $\mu\text{m}$ /片。HE 染色方法: 将切片脱塑后, 苏木精染色洗涤后用伊红染色后封片, 显微镜观察。Masson 染色方法: 用重铬酸钾溶液与三氯醋酸混合液染色, 清洗后用天青石蓝浸泡, 再用酸性品红与丽春红混合液清洗后, 亮绿染色液染色后脱水封片在显微镜下镜检。

### 1.8 免疫组化染色

将肝组织切成 4  $\mu\text{m}$  薄片, 脱蜡和水化后, 加入过氧化氢溶液封闭后冲洗, 用枸橼酸钠缓冲液在微波下修复抗原, 并用山羊血清封闭后, 滴加稀释的一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 用磷酸盐 (PBS) 缓冲液洗涤后依次加

二抗孵育、PBS 缓冲液冲洗, DBA 显色, 苏木素复染和酒精梯度洗脱, 中性树胶封片, 随机选取 5 个视野于显微镜下取图并拍照, 观察肝脏组织  $\alpha$ -SMA 和 TGF- $\beta$  的表达情况。

### 1.9 Western blot 蛋白电泳实验

按照试剂盒说明书操作步骤提取肝脏组织总蛋白并用 BCA 法蛋白定量, 先用 80 V 恒压条件下, 将与溴酚蓝混合变性的蛋白置于 8% 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 中电泳 30 min 后, 将电压换成 100 V 恒压电泳 70 min。将聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜) 置于甲醇溶液中浸泡活化 30 s, 加入转移缓冲液, 200 mA 恒流转膜。将膜放入封闭液中, 常温封闭 1 h, 漂洗 3 次, 每次 10 min; 将  $\beta$ -actin、TGF- $\beta_1$ 、MMP-9、 $\alpha$ -SMA 和 SMAD2 的一抗溶液按照 1:1 000 的比例溶于一抗稀释液中, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。用 TBST 漂洗后, 加入二抗, 37  $^{\circ}\text{C}$  平衡 1 h, 用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。取 ECL 工作液润湿 PVDF 膜后, 将膜放入快速显影仪中进行显影和定影。

### 1.10 统计方法

采用 SPSS 20.0 统计分析软件对实验数据进行处理, 所得结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,  $P > 0.05$  时表示差异无统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝纤维化相关血清标志物检测

与 Con 组相比, Mod 组小鼠血清中的 AST、ALT、Col I 和 Col III 的表达水平均显著提高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。SCFP-L 组及 Bif 组小鼠血清中 AST、ALT、Col I 和 Col III 的表达量与模型组小鼠相比, 均有明显的下降, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且 SCFP 低高给药组的治疗效果呈剂量依赖性。

表 1 禽药十二时辰总皂苷对肝纤维化小鼠血清生化指标的影响

Table 1 Effects of SCFP on serum biochemical indexes in mice with liver fibrosis

组别	AST (U/L)	ALT (U/L)	Col I (ng/L)	Col III (ng/L)
Con	120.79 $\pm$ 13.59 **	52.22 $\pm$ 3.45 **	82.31 $\pm$ 3.10 **	69.51 $\pm$ 4.11 **
Mod	252.65 $\pm$ 27.54	83.22 $\pm$ 4.81	188.69 $\pm$ 6.11	160.33 $\pm$ 5.34
Bif	180.78 $\pm$ 38.57 *	70.75 $\pm$ 3.25 *	140.08 $\pm$ 4.36 **	124.41 $\pm$ 5.86 **
SCFP-L	222.85 $\pm$ 12.19	70.89 $\pm$ 3.94 *	151.21 $\pm$ 4.60 **	118.51 $\pm$ 5.14 **
SCFP-H	175.45 $\pm$ 14.66 *	65.09 $\pm$ 2.39 **	127.51 $\pm$ 4.05 **	78.44 $\pm$ 3.47 **

注: 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Mod, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.2 肝脏组织氧化应激指标检测结果

与 Con 组相比, Mod 组小鼠血清中的 SOD 和 GSH 表达水平均显著降低, 而 MDA 和 NO 的表达水平均显著提高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。SCFP 高低剂量给药组及 Bif 组小鼠血清中 SOD 和

GSH 的表达量与 Mod 组小鼠相比, 均有明显的上升, 而 MDA 和 NO 的表达水平均显著性下降, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 且 SCFP 低高给药组的治疗效果呈剂量依赖性。

表 2 奋药十二时辰皂苷对肝纤维化小鼠肝脏组织氧化应激指标的影响

Table 2 Effects of SCFP on oxidative stress indexes in liver tissue of hepatic fibrosis mice

组别	SOD(U/L)	GSH(U/L)	MDA(U/L)	NO(U/L)
Con	206.32 ± 9.29 **	360.22 ± 12.04 **	2.50 ± 0.18 **	67.25 ± 4.68 **
Mod	106.38 ± 7.07	197.33 ± 4.63	5.63 ± 0.24	168.30 ± 4.81
Bif	160.92 ± 8.38 **	267.23 ± 6.94 **	4.09 ± 0.26 **	104.51 ± 5.19 **
SCFP-L	150.86 ± 7.84 **	285.17 ± 7.84 **	3.89 ± 0.13 **	116.45 ± 4.59 **
SCFP-H	180.61 ± 5.24 **	323.04 ± 14.97 **	2.99 ± 0.20 **	107.00 ± 3.49 **

注: 与模型组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Mod, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

## 2.3 HE 及 Masson 染色结果

HE 染色: Con 组肝脏组织结构无明显异常, 呈条索状排列, 肝细胞无变性、坏死。与 Con 组小鼠的肝脏组织相比, Mod 组肝脏组织破坏明显、排列紊乱, 肝细胞肿胀、坏死, 可见少量炎性细胞浸润。SCFP-L 组小鼠肝脏组织结构略有紊乱, 肝细胞少见坏死、变性, 炎性细胞浸润明显减少。SCFP-H 组小

鼠肝细胞排列较有序, 未见明显的组织增生、细胞变性和坏死, 以及炎细胞浸润等病变情况 (见图 1A)。Masson 染色: Con 组小鼠肝脏组织切片未见明显胶原纤维增生。Mod 组小鼠肝脏组织切片中呈现许多明显的蓝色胶原纤维, 表明形成肝纤维化。SCFP 给药组小鼠肝脏组织切片与 Mod 组相比, 蓝色胶原纤维明显减少 (见图 1B)。

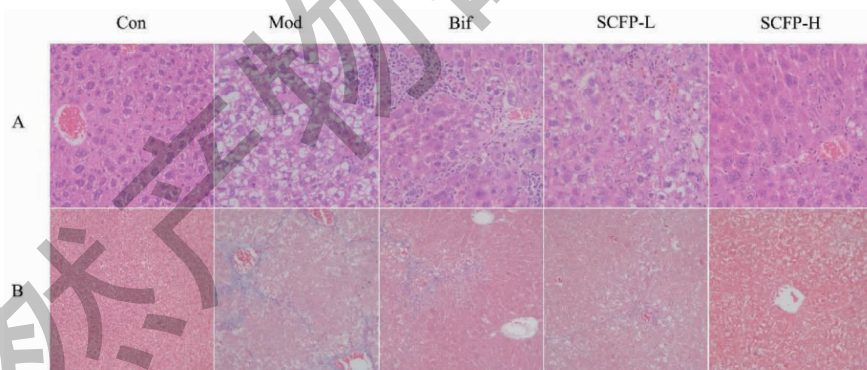


图 1 小鼠肝脏组织切片染色结果

Fig. 1 Staining results of mouse liver tissue sections

注: A. HE 染色 (100 ×); B. Masson 染色 (40 ×)。Note: A. HE staining (100 ×); B. Masson staining (40 ×)。

## 2.4 $\text{TGF-}\beta_1$ , $\alpha$ -SMA 免疫组化染色结果

免疫组化结果显示, 与 Con 组相比, Mod 组小鼠肝脏组织中  $\text{TGF-}\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达均明显增加, 差别有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。在给 SCFP 进行治疗后, 发现与 Mod 组小鼠肝脏组织中  $\text{TGF-}\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达量相比, 均有不同程度的下降, 且呈剂量依赖性 (见图 2)。空白对照组小鼠肝

组织  $\alpha$ -SMA 极少量表达于汇管区。与 Con 组比较, Mod 组除了汇管区外, 在肝实质中也呈强烈的阳性表达,  $\alpha$ -SMA 阳性表达细胞数明显增多。与 Mod 组相比, SCFP 低、高剂量组及 Bif 组汇管区、纤维间隔和邻近的肝窦阳性细胞数量显著减少, 阳性染色显著减轻, 可明显降低肝组织  $\alpha$ -SMA 的表达量。

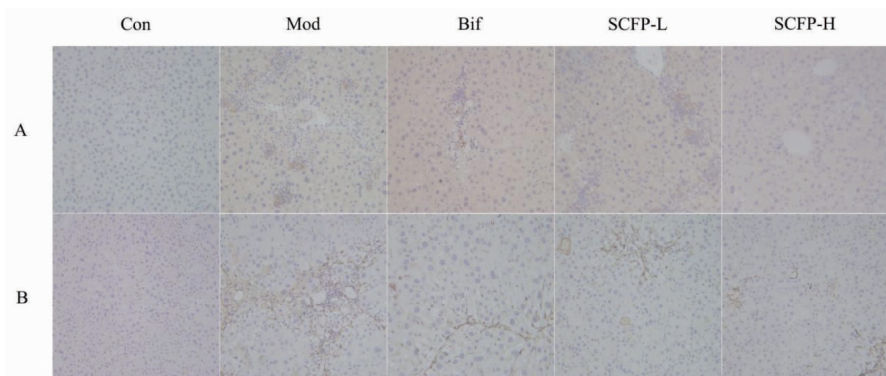


图2 小鼠肝脏组织切片免疫组化染色结果(50 ×)

Fig. 2 Immunohistochemical staining results of mouse liver tissue sections (50 ×)

注:A. TGF- $\beta$  免疫组化染色;B.  $\alpha$ -SMA 免疫组化染色。Note:A. TGF- $\beta$  immunohistochemical staining;B.  $\alpha$ -SMA immunohistochemical staining.

## 2.5 Western blot 蛋白电泳实验结果

采用 Western blot 法检测小鼠肝脏组织中 MMP-9、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta_1$  和 SMAD2 蛋白的表达情况,从图 3 结果显示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠肝脏组织中的 MMP-9、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta_1$  和 SMAD2 的蛋白表达

显著增加,差别具有统计学差异( $P < 0.05$ );与 Mod 组相比,SCFP 给药组小鼠肝脏中 MMP-9、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta_1$  和 SMAD2 的表达量显著性下降,差别具有显著性差异( $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖性。

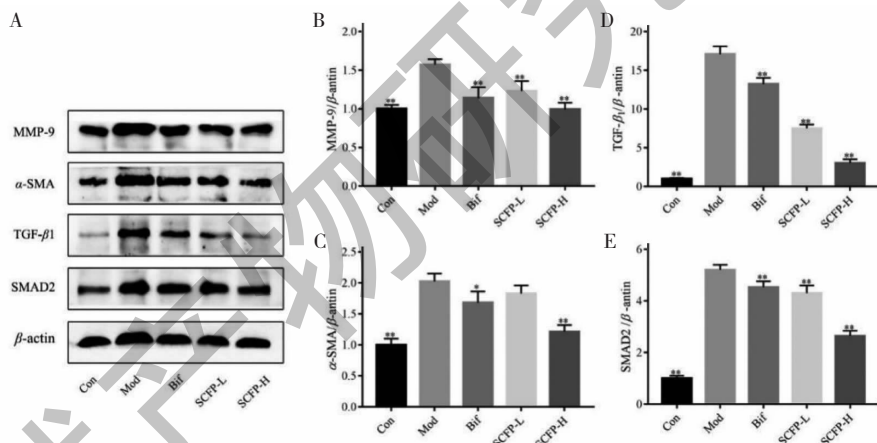


图3 肝脏组织中 MMP-9、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta_1$  和 SMAD2 蛋白的表达水平

Fig. 3 Expression levels of MMP-9,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta_1$  and SMAD2 proteins in liver tissue

注:与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with Mod, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

## 3 讨论与结论

肝脏细胞损伤可导致肝脏的急、慢性肝脏炎症反应,反复的急慢性肝损伤和肝炎被认为是肝纤维化的常见诱因<sup>[8]</sup>。AST 和 ALT 是肝细胞中的氨基转移酶,其在肝脏中的含量可以反映肝细胞的损伤程度<sup>[9]</sup>,因此本实验选用 ALT、AST 做为肝损伤指标。肝纤维化发病的主要病理过程是各种炎症因子和氧化应激因子反复刺激肝细胞,激活肝星状细胞(HSC),而活化状态的 HSC 细胞是最终导致肝纤维化疾病进展的最主要因素<sup>[10]</sup>。在机体正常情况下,

HSC 处于静止状态,当肝脏受到炎症或机械刺激等损伤时,HSC 从静止状态转变为激活状态的成纤维母细胞(MFB)<sup>[11]</sup>。MFB 可大量分泌细胞外基质(ECM),持续累积的 ECM 导致肝纤维化,最终发展成肝硬化、肝癌<sup>[12]</sup>。I、III 型胶原为 MFB 分泌的主要细胞外胶原蛋白,与肝纤维化病变程度呈正相关,其含量会随损伤程度而逐渐增加。有学者认为,逆转或缓解胶原蛋白的过度生成可有效抑制肝纤维化的进展<sup>[13]</sup>。本实验结果显示,SCFP 可通过调节血清中 Col I、Col III 的表达来治疗肝纤维化。

$\alpha$ -SMA 作为人和小鼠肝脏 HSC 活化的可靠标志物, 被广泛用于评价肝纤维化的进展, 可用于肝纤维化的早期敏感性诊断<sup>[14]</sup>。MMP-9 能够降解细胞外基质的多种成分, 包括 IV 型胶原、层粘连蛋白和纤连蛋白等。肝脏在受到损伤后会将其基底膜暴露出来, 基底膜的主要成分有 IV 型胶原蛋白, 又可以逆转其功能进而促进 MMP-9 分泌, 因此 MMP-9 与肝纤维化有着极为密切的关系<sup>[15]</sup>。研究发现, TGF- $\beta_1$  在 HSC 的活化过程中起关键作用, 可促进 MFB 表达 ECM 和纤维连接蛋白, 加速纤维化进展, 是目前发现的最强的致纤维化细胞因子。TGF- $\beta_1$  主要通过激活 TGF- $\beta_1$ /SMAD 信号转导通路加速肝纤维化的进展, 抑制 TGF- $\beta_1$ /SMAD 信号转导通路的激活可有效抑制肝纤维化的进展<sup>[16]</sup>。本实验结果显示, SCFP 能够有效抑制肝脏分泌 TGF- $\beta_1$ 、SMAD2、MMP-9 和  $\alpha$ -SMA 蛋白, 从而抑制 TGF- $\beta_1$ /SMAD 信号转导通路的激活。

SOD 和 GSH 是体内清除自由基和过氧化物的关键酶, 其水平的高低是衡量机体抗氧化能力强弱的重要因素<sup>[17]</sup>。随着机体内自由基水平的不断上升, SOD 和 GSH 含量逐渐降低, 故可作为评价肝硬化程度的又一重要指标<sup>[18]</sup>。MDA 是主要的脂质过氧化终产物, 其含量高低能反映机体内脂质氧化的强度, 间接反映出机体细胞受自由基攻击的严重程度。NO 被认为是炎症反应的介质和调节因子, 在活化的肝炎细胞中主要由 iNOS 产生, NO 的过度累积会对肝脏造成损伤<sup>[19]</sup>。本实验研究结果显示, SCFP 可以降低小鼠肝组织中 MDA、NO 含量和升高 SOD、GSH 含量, 提示 SCFP 能够通过调节机体抵抗过氧化自由基的能力, 清除体内脂质过氧化物, 从而起到缓解肝纤维化进程。

本实验结果中 HE 染色, Masson 染色以及免疫组化切片中 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达情况相一致, 说明 SCFP 能逆转肝纤维化进程, 其机制可能与调控 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路中 TGF- $\beta_1$ 、SMAD2、MMP-9 和  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达有关。

## 参考文献

- Zhou JY, Li BS, Liu JX. The mechanism of liver fibrosis[J]. J Hebei Med Univ(河北医科大学学报), 2002, 23: 50-52.
- Dong HJ, Guo YX, Wang X, et al. Preventive effect of total flavonoids from *Nymphaea candida* on CCl<sub>4</sub> induced hepatic fibrosis in mice[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32: 1754-1760.
- Hua HY, Fan YH, Zhu L. Advances in studies on the regulation of cytokines in liver fibrosis by Chinese herbal medicine[J]. Herald Med(医药导报), 2008, 27: 960-961.
- Gao Q, Li XG, Fan L, et al. The research advances of the pathogenesis of liver fibrosis[J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2017, 17: 2780-2785.
- Du JX, Sun MY, Liu C, et al. Ingredients of Huangqi decoction slow biliary fibrosis progression by inhibiting the activation of transforming growth factor-beta signaling pathway[J]. BMC Complement Altern Med, 2012, 12: 33.
- Wu Y, Zhang YF, Zhang HT, et al. A new cyclopeptide alkaloid from *Clematis florida*[J]. Nat Prod Res, 2019, 33: 1478-6419.
- Li WT, Yang BY, Zhu W, et al. A new indole alkaloidal glucoside from the aerial parts of *Clematis terniflora* DC. Nat Prod Res, 2013, 27: 2333-2337.
- Lara C, John PI. Regression of liver fibrosis. seminars in liver disease[J]. Semin Liver Dis, 2017, 37: 001-010.
- Sun XJ, Wang Y, Wang YG, et al. Protective effects of Su Gan Qing against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2010, 33: 105-108.
- Wu XX, Wu XD, Ma YX, et al. CUG-binding protein 1 regulates HSC activation and liver fibrogenesis[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13498.
- Hoffmann C, Djerir NEH, Danckaert A, et al. Hepatic stellate cell hypertrophy is associated with metabolic liver fibrosis[J]. Sci Rep, 2020, 10: 3850.
- Baihetiyaer A, Guo JS. Metabolic adaptation of activated hepatic stellate cells during hepatic fibrogenesis[J]. Chin J Cell Biol(中国细胞生物学学报), 2021, 43: 2054-2060.
- Debanjan D, Jacopo B, Tatiana K, et al. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer[J]. Exp Biol Med, 2020, 245: 96-108.
- Zhang J, Song Y, Wang QH, et al. Effects of Curcumae Rhizoma/vinegar-processed Curcumae Rhizoma on immune hepatic fibrosis, proliferation of HSC-T6 and expression of  $\alpha$ -SMA and Procollagen I[J]. China J Chin Med Pharm(中国中药杂志), 2017, 42: 2538-2545.
- Kong W, Han YZ, Shan TY. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on content of MMP-9 and TIMP-1 in hepatic fibrosis tissue[J]. Occup Health(职业与健康), 2021, 37: 752-755.
- Han DN, Su XL. Advances on TGF- $\beta$ /Smad signal pathway in hepatic fibrosis[J]. Biomed Transform(生物医学转化), 2021, 2: 49-56.