

# 睡莲花总黄酮对 CCl<sub>4</sub> 致小鼠肝纤维化的保护作用

董惠娟<sup>1</sup>, 郭羽轩<sup>2</sup>, 王鑫<sup>1</sup>, 史浩楠<sup>1</sup>, 刘涛<sup>1\*</sup>, 赵军<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>新疆医科大学公共卫生学院, 乌鲁木齐 830011; <sup>2</sup>新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046;

<sup>3</sup>新疆药物研究所维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004

**摘要:** 研究睡莲花总黄酮(NCTF)对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导小鼠肝纤维化的保护作用。将72只雄性KM小鼠随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组(0.1 mg/kg)和NCTF低中高剂量组(50、100、200 mg/kg), 每组12只。除正常组外其余各组小鼠腹腔注射10%的CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液(2次/周)。造模次日, 除模型组和正常组灌胃等量生理盐水外, 各给药组按剂量给予受试药物, 连续8周。末次给药后, 禁食16 h后眼眶取血, 摘取肝脏脾脏。HE和Masson染色观察肝病理组织学变化; ELISA及生化法检测肝纤四项及AST等生化指标; RT-PCR法检测肝组织IKK $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达。结果显示, 与模型组比较, NCTF中、高剂量组可显著降低小鼠血清AST、ALT和ALP含量以及肝纤维化指标LN、HA、PCIII、IV-C的表达( $P < 0.05$ ), 并能降低促炎因子IL-6和TNF- $\alpha$ 水平( $P < 0.05$ ); 肝组织Hyp水平也得到明显降低( $P < 0.05$ )。病理组织学观察NCTF给药组的肝细胞损伤及胶原纤维沉积明显少于模型组( $P < 0.05$ )。此外, 与模型组相比, NCTF能显著降低肝组织IKK $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B p65 mRNA的表达( $P < 0.05$ )。以上结果说明NCTF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、降低促炎因子表达和调节NF- $\kappa$ B信号通路相关。

**关键词:** 雪白睡莲; 总黄酮; 四氯化碳; 肝纤维化

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)10-1754-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.10.017

## Preventive effect of total flavonoids from *Nymphaea candida* on CCl<sub>4</sub> induced hepatic fibrosis in mice

DONG Hui-juan<sup>1</sup>, GUO Yu-xuan<sup>2</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>, SHI Hao-nan<sup>1</sup>, LIU Tao<sup>1\*</sup>, ZHAO Jun<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>College of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

<sup>2</sup>College of Life Sciences and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;

<sup>3</sup>Xinjiang Key Laboratory for Uighur Medicine, Institute of Materia Medica of Xinjiang, Urumqi 830004, China

**Abstract:** To investigate preventive effect of total flavonoids from *Nymphaea candida* (NCTF) on carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced liver fibrosis in mice. Seventy-two male KM mice were randomly divided into normal group, model group, colchicine group (0.1 mg/kg), and NCTF group (50, 100, 200 mg/kg). Except normal group, other groups were intraperitoneally injected with 10% CCl<sub>4</sub> olive oil solution twice a week. The day after animals modeling, other groups were given intragastric administration for 8 weeks according to preset dose except the model group and normal group. Sixteen hours after the last medication, the eye balls of the mice were removed, blood taken; the mice were then killed, liver and spleen were collected. Pathological changes of liver tissue were observed by HE and Masson staining. Serum AST, ALT, and ALP levels were measured by a fully automatic biochemical analyzer; ELISA assay was used to determine serum HA, LN, PCIII, IV-C, IL-6 and TNF- $\alpha$  contents; Liver tissue Hyp content was detected according to hydroxyproline kit. IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65 mRNA expression were detected by fluorescence quantitative PCR. Compared with model group, the serum AST, ALT, ALP, LN, HA, PCIII and IV-C levels were significantly decreased by NCTF ( $P < 0.05$ ), and pro-inflammatory cytokine IL-6 and TNF- $\alpha$  levels were decreased ( $P < 0.05$ ). Liver tissue Hyp level was also significantly reduced ( $P < 0.05$ ). In addition, compared with model

收稿日期: 2020-03-30 接受日期: 2020-09-11

基金项目: 国家自然科学基金(81760631); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所项目(ky2019104)

\* 通信作者 Tel: 86-991-2320227; E-mail: xjmult@163.com, zhaojun21.cn@163.com

group, NCTF can significantly reduce IKK $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65 mRNA expression ( $P < 0.05$ ). These results suggest that NCTF have better anti-hepatic fibrosis effect, and its mechanism may be related to reduce cell interstitial collagen deposition, decrease proinflammatory factor expression and regulate NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** *Nymphaea candida*; total flavonoids; carbon tetrachloride; hepatic fibrosis

肝纤维化是多种原因所致慢性肝损伤不断发展的病理结果,主要表现为以胶原为主的细胞外基质在肝脏过度沉积,如不经治疗,可导致肝硬化、肝癌的发生<sup>[1]</sup>。肝纤维化是可逆的,而肝硬化是不可逆的。因此,寻找防治肝纤维化的药物仍然是肝病防治的重点之一。传统中药以其高效低毒的特点在抗肝纤维化方面显示了良好的效果,从中寻找具有显著疗效的有效成分亦已成为抗肝纤维化药物研发的有效途径。近年来,从中药材中发现了龙胆苦苷、姜黄素、川芎嗪等多种成分具有较好的抗肝纤维化作用,作用机制与其抗氧化、抗炎以及 NF- $\kappa$ B 等相关信号通路的调控密切相关<sup>[2,3]</sup>。睡莲花,睡莲科植物雪白睡莲 *Nymphaea candida* 的干燥花蕾,主产于新疆伊犁、博湖等地,是维吾尔药复方制剂炎消迪娜尔糖浆的主要组分之一,具有消炎止咳、降热养肝等功效<sup>[4]</sup>。黄酮类化合物是其主要的活性成分。前期研究建立了睡莲花总黄酮的制备工艺和质量标准,并进一步发现该有效部位对 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性肝损伤具有较好的保护作用<sup>[5,6]</sup>。基于此,本文通过 CCl<sub>4</sub> 致小鼠肝纤维化模型评价 NCTF 的抗肝纤维化作用及其初步的作用机制,以期为该有效部位的深入开发提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 试验动物

SPF 级雄性昆明种小鼠 72 只,体重 18 ~ 22 g,购自新疆医科大学实验动物中心,生产许可证号为 SCXK(新)2018-0002,使用许可证号为 SYXK(新)2017-0002,动物质量合格证编号: No. 65000700001119。饲养条件为:室内温度 22 ~ 23 °C,湿度为 40% ~ 50%,换气良好,环境清洁,无外来传染源,自由饮食和饮水。

#### 1.1.2 主要试剂

睡莲花总黄酮(NCTF)按文献<sup>[5]</sup>方法自制,纯度为 59.12%;秋水仙碱片(批号 190410,西双版纳版纳药业有限责任公司);分析纯四氯化碳(批号 20190220,天津市致远化学试剂有限公司);小鼠透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)酶联免疫 ELISA 试

剂盒(批号 190807376、190812643,上海碧云天生物技术有限公司);小鼠 III 型前胶原(PCIII)、IV 型胶原蛋白酶(IV-C)ELISA 试剂盒(批号 20190810、20190820,北京江莱试剂公司);羟脯氨酸(Hyp)检测试剂盒、4%多聚甲醛固定液和 Masson 三色染色试剂盒(批号 20190902、20190520、20190401,北京索莱宝试剂公司);其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.3 主要仪器

Imagic-V7 全自动生化检测仪(深圳市库贝尔生物科技股份有限公司);Varioskan Flash 全波长扫描式多功能读数仪(美国赛默飞世尔科技公司);BS 124S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);HC-3018R 高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);HZQ-C 全湿恒温培养摇床(上海一恒科学仪器有限公司);ABI7500 FAST 荧光定量 PCR 基因扩增仪(美国 Applied Biosystems);BIO-RadC1000 Touch 梯度 PCR 仪(美国伯乐生物科技)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 分组、造模及给药

参照文献<sup>[7]</sup>方法,72 只雄性昆明小鼠随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组(0.1 mg/kg)、NCTF 低中高剂量组(50、100、200 mg/kg),每组 12 只。适应性喂养一周后,除正常组注射橄榄油溶液外其余各组小鼠腹腔注射 10% CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液,每周两次。实验次日按设定剂量(供试药物溶解于 0.5% CMC-Na 溶液)灌胃给药,每日 1 次,连续 8 周,期间 unlimited 饮食和饮水。末次给药 16 h 后,眼眶取血,静置 40 min 后,3 000 rpm 离心 15 min,取血清冻存于 -80 °C 冰箱待检。颈椎脱臼处死小鼠,摘取肝脏和脾脏。取肝脏三角叶部分用预冷 0.9% 生理盐水冲洗其表面血液,再置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,用于病理学观察;锡箔纸包裹剩余肝脏放入液氮中速冻,随后转入 -80 °C 冰箱待测。

### 1.2.2 血清学指标测定

采用全自动生化仪检测血清 AST、ALT 和 ALP 含量;ELISA 法检测血清 HA、LN、PCIII、IV-C、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

名称 Gene name	序列 Gene sequence
mus-IKK $\alpha$ -F	CAGCGTGCCATTGATCTCTATAAG
mus-IKK $\alpha$ -R	CCAACAACCTTGCTCAGGTGAC
mus-I $\kappa$ B $\alpha$ -F	TCACCAACCAGCCAGGAATTG
mus-I $\kappa$ B $\alpha$ -R	TGCGTCAAGACTGCTACACTG
mus-NF- $\kappa$ B-p65	GGAGGCATGTTCCGCTAGTGG
mus-NF- $\kappa$ B-p65	CCCTGCGTTGGATTTCTGTG
mus-GAPDH-F	TGTGTCCGTCCTGGATCTGA
mus-GAPDH-R	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

### 1.2.3 肝组织 Hyp 水平测定

按试剂盒说明书,生化法检测肝脏组织 Hyp 的含量。

### 1.2.4 RT-PCR 检测小鼠肝脏组织中 IKK $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 和 NF- $\kappa$ B p65 表达

取新鲜小鼠肝脏组织 100 mg, Trizol 抽取总 RNA,按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,进行 PCR 扩增。GAPDH 作为内参,引物信息见表 1。

### 1.2.5 病理组织学观察

常规制作蜡块切片,切片进行 HE 染色和 Masson 染色,观察肝脏切片中的肝细胞损伤及胶原纤维分布,并根据文献中肝纤维化评分<sup>[8]</sup>进行 Masson 染色分级:0 级,正常,无纤维化表现;I 级,在汇管区出现纤维结缔组织或汇管区处有扩大,纤维结缔组织有向肝小叶发展的倾向;II 级,纤维结缔组织超过小叶的 2/3 并伴有 I 级改变,增生明显;III 级,肝小叶中央静脉周围出现明显的纤维结缔组织进入;IV 级,纤维结缔组织在肝全小叶呈多处弥漫性增生,甚至有假小叶出现,并伴有 III 级病理变化。

表2 NCTF 对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠体重变化的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of NCTF on body weight in CCl<sub>4</sub> induced liver fibrosis in mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	n	第0周 0th week	第1周 1th week	第2周 2th week	第4周 4th week	第6周 6th week	第8周 8th week
正常组 Normal	-	12	27.26 $\pm$ 2.11	32.71 $\pm$ 1.96	34.80 $\pm$ 2.50	39.26 $\pm$ 3.38	41.56 $\pm$ 3.82	42.66 $\pm$ 4.46
模型组 Model	-	8	27.31 $\pm$ 1.57	29.51 $\pm$ 1.38 <sup>##</sup>	29.89 $\pm$ 1.94 <sup>##</sup>	32.69 $\pm$ 1.11 <sup>##</sup>	33.03 $\pm$ 1.21 <sup>#</sup>	34.91 $\pm$ 2.08 <sup>##</sup>
秋水仙碱组 Colchicine	0.1	12	28.74 $\pm$ 1.99	32.40 $\pm$ 2.35	32.49 $\pm$ 2.64	34.15 $\pm$ 2.80	37.71 $\pm$ 3.55 <sup>*</sup>	42.86 $\pm$ 3.99 <sup>**</sup>
NCTF 低剂量组 NCTF-L	50	9	28.78 $\pm$ 2.36	29.06 $\pm$ 3.78	32.29 $\pm$ 3.08	33.69 $\pm$ 4.09	36.58 $\pm$ 5.16	39.09 $\pm$ 3.23 <sup>*</sup>
NCTF 中剂量组 NCTF-M	100	11	26.53 $\pm$ 3.22	30.08 $\pm$ 2.52	32.09 $\pm$ 2.39	35.10 $\pm$ 2.41	37.63 $\pm$ 2.94 <sup>*</sup>	40.03 $\pm$ 3.14 <sup>**</sup>
NCTF 高剂量组 NCTF-H	200	11	27.60 $\pm$ 0.71	31.33 $\pm$ 1.26	31.44 $\pm$ 2.48	35.57 $\pm$ 2.43	37.54 $\pm$ 1.97 <sup>*</sup>	40.69 $\pm$ 2.21 <sup>**</sup>

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note:Compared with normal group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;Compared with model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

### 1.2.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,先进行方差齐性检验,若符合用单因素方差分析(ANOVA),不符合则用秩和检验;有序分类资料采用 Ridit 分析,检验水准为  $\alpha = 0.05$ , $P < 0.05$  视为有统计学差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 小鼠一般状态

正常组小鼠精神状态良好、食欲旺盛、毛发光泽。模型组小鼠精神萎靡、毛色黯淡、易激惹、食量减少、体型消瘦,且死亡率达到 33.3%。推测死亡原因为 CCl<sub>4</sub> 反复刺激导致肝损伤严重并发严重腹水,出现肠粘连。NCTF 低剂量组小鼠精神不佳、活动量减少,死亡 3 只,死亡原因与模型组类似。NCTF 中、高剂量组小鼠食欲良好、毛色正常、进食摄水稍有增加、精神正常,且随实验的进行,体重增加显著(表 2)。中、高剂量的 NCTF(100、200 mg/kg)还可显著降低肝纤维化小鼠的肝脏指数( $P < 0.05$ );对脾脏指数也有降低作用,但无统计学意义(表 3)。

表 3 NCTF 对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠脏器指数影响( $\bar{x} \pm s$ )Table 3 Effects of NCTF on organ index in CCl<sub>4</sub> induced liver fibrosis in mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	n	肝脏指数 Liver index(mg/g)	脾脏指数 Spleen index(mg/g)
正常组 Normal	-	12	34.19 ± 3.50	2.21 ± 0.37
模型组 Model	-	8	42.55 ± 3.18 <sup>##</sup>	4.38 ± 1.66 <sup>##</sup>
秋水仙碱组 Colchicine	0.1	12	38.74 ± 1.28 <sup>*</sup>	3.71 ± 0.76
NCTF 低剂量组 NCTF-L	50	9	40.13 ± 2.68	4.16 ± 1.23
NCTF 中剂量组 NCTF-M	100	11	39.13 ± 1.96 <sup>*</sup>	3.72 ± 0.61
NCTF 高剂量组 NCTF-H	200	11	39.24 ± 1.60 <sup>*</sup>	4.02 ± 0.58

注:与正常组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

Note:Compared with normal group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;Compared with model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ .

## 2.2 NCTF 对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠血清 ALT、AST、ALP 水平及肝组织 Hyp 含量的影响

如表 4 所示,与正常组比较,模型组小鼠血清 AST、ALT、ALP 水平显著增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 CCl<sub>4</sub> 反复刺激导致了肝损伤。

中、高剂量组的 NCTF(100、200 mg/kg)及秋水仙碱可显著降低血清 AST、ALT、ALP 水平( $P < 0.01$ , $P < 0.05$ )。高剂量组 NCTF 还能显著降低 CCl<sub>4</sub> 损伤小鼠肝组织中 Hyp 的含量( $P < 0.05$ )。结果说明 NCTF 具有保护肝脏的作用。

表 4 NCTF 对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠血清 ALT、ALP、AST 水平及肝组织 Hyp 含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )Table 4 Effects of NCTF on the serum ALT,ALP and AST levels as well as hepatic tissue Hyp content in CCl<sub>4</sub> induced liver fibrosis in mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	n	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Hyp (μg/g)
正常组 Normal	-	12	53.17 ± 13.11	200.75 ± 14.51	76.67 ± 7.89	132.07 ± 20.21
模型组 Model	-	8	324.50 ± 58.33 <sup>##</sup>	390.13 ± 17.77 <sup>##</sup>	140.38 ± 9.67 <sup>##</sup>	240.80 ± 37.84 <sup>##</sup>
秋水仙碱组 Colchicine	0.1	12	161.67 ± 43.38 <sup>**</sup>	237.42 ± 14.51 <sup>**</sup>	91.00 ± 7.9 <sup>**</sup>	187.32 ± 28.91
NCTF 低剂量组 NCTF-L	50	9	282.00 ± 84.17	345.89 ± 16.76	118.11 ± 9.12	216.17 ± 58.27
NCTF 中剂量组 NCTF-M	100	11	238.18 ± 53.65 <sup>**</sup>	317.73 ± 15.16 <sup>*</sup>	115.55 ± 8.25 <sup>**</sup>	184.82 ± 14.70
NCTF 高剂量组 NCTF-H	200	11	138.45 ± 49.14 <sup>**</sup>	251.82 ± 15.16 <sup>**</sup>	95.64 ± 8.25 <sup>**</sup>	163.33 ± 35.47 <sup>*</sup>

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note:Compared with normal group,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;Compared with model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

## 2.3 NCTF 对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠血清 LN、HA、PCIII、IV-C 水平的影响

如表 5 所示,与正常组相比,模型组小鼠血清

HA、LN、PCIII、IV-C 含量升高,且差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组相比,NCTF(50、100、200 mg/kg)能显著降低肝纤维化小鼠血清 PCIII 水平

表 5 NCTF 对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠血清 LN、HA、PCIII、IV-C 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )Table 5 Effects of NCTF on the serum LN,HA,PCIII and IV-C levels in CCl<sub>4</sub> induced liver fibrosis in mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	n	LN (ng/mL)	HA (ng/mL)	PCIII (ng/mL)	IV-C (ng/mL)
正常组 Control	-	12	189.18 ± 28.62	9.56 ± 1.73	37.85 ± 5.67	76.86 ± 9.70
模型组 Model	-	8	265.80 ± 24.22 <sup>##</sup>	46.00 ± 8.80 <sup>##</sup>	113.58 ± 4.41 <sup>##</sup>	138.50 ± 9.99 <sup>##</sup>
秋水仙碱组 Colchicine	0.1	12	212.88 ± 16.87 <sup>**</sup>	26.46 ± 7.16 <sup>**</sup>	79.00 ± 4.05 <sup>**</sup>	98.70 ± 11.70 <sup>**</sup>
NCTF 低剂量组 NCTF-L	50	9	238.56 ± 32.81	47.61 ± 13.94	91.17 ± 4.62 <sup>**</sup>	158.64 ± 11.76
NCTF 中剂量组 NCTF-M	100	11	226.53 ± 16.08 <sup>*</sup>	40.00 ± 11.41	67.20 ± 7.99 <sup>**</sup>	112.10 ± 10.04 <sup>**</sup>
NCTF 高剂量组 NCTF-H	200	11	223.58 ± 29.37 <sup>**</sup>	27.92 ± 11.05 <sup>**</sup>	50.33 ± 5.14 <sup>**</sup>	109.51 ± 11.81 <sup>**</sup>

注:与正常组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note:Compared with normal group,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;Compared with model group,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

( $P < 0.01$ ), 且呈剂量效应依赖关系; 中、高剂量组的 NCTF 能明显降低小鼠血清 LN 和 IV-C 水平( $P < 0.01, P < 0.05$ )。NCTF 还能降低肝纤维化小鼠血清 HA 水平, 但与模型组相比只有高剂量组有统计学差异( $P < 0.01$ )。结果说明了 NCTF 具有抗肝纤维化的作用。

## 2.4 NCTF 对 $\text{CCl}_4$ 致肝纤维化小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量的影响

与正常组比较, 模型组小鼠血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量明显升高。NCTF 中、高剂量组(100、200 mg/kg)及秋水仙碱组(0.1 mg/kg)均能明显降低  $\text{CCl}_4$

引起的促炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 释放( $P < 0.01$ ) (表 6)。结果说明 NCTF 可通过抑制促炎细胞因子的释放发挥抗肝纤维化作用。

## 2.5 NCTF 对肝纤维化小鼠肝脏组织中 IKK $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$ 和 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达水平的影响

与正常组比较, 模型组小鼠肝组织中 IKK $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, NCTF 各剂量组小鼠肝组织 IKK $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达水平均显著降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结果表明 NCTF 可通过影响 NF- $\kappa$ B 信号通路改善肝纤维化的进程(表 7)。

表 6 NCTF 对  $\text{CCl}_4$  致肝纤维化小鼠血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Effects of NCTF on the serum TNF- $\alpha$  and IL-6 levels in  $\text{CCl}_4$  induced liver fibrosis in mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	n	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
正常组 Normal	-	12	320.34 $\pm$ 47.66	122.21 $\pm$ 10.62
模型组 Model	-	8	881.99 $\pm$ 45.01 <sup>##</sup>	239.28 $\pm$ 10.19 <sup>##</sup>
秋水仙碱组 Colchicine	0.1	12	543.22 $\pm$ 45.20 <sup>**</sup>	174.23 $\pm$ 15.17 <sup>**</sup>
NCTF 低剂量组 NCTF-L	50	9	743.61 $\pm$ 46.16 <sup>**</sup>	229.60 $\pm$ 12.56
NCTF 中剂量组 NCTF-M	100	11	661.33 $\pm$ 51.43 <sup>**</sup>	200.89 $\pm$ 11.02 <sup>**</sup>
NCTF 高剂量组 NCTF-H	200	11	405.80 $\pm$ 48.84 <sup>**</sup>	154.70 $\pm$ 10.85 <sup>**</sup>

注: 与正常组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; Compared with model group, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

表 7 NCTF 对  $\text{CCl}_4$  致肝纤维化小鼠组织 IKK $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65 和 I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 7 Effects of NCTF on IKK $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA expression in  $\text{CCl}_4$  induced liver fibrosis in mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	n	IKK $\alpha$	NF- $\kappa$ B p65	I $\kappa$ B $\alpha$
正常组 Normal	-	12	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型组 Model	-	8	3.59 $\pm$ 0.77 <sup>##</sup>	2.11 $\pm$ 0.60 <sup>##</sup>	2.80 $\pm$ 0.70 <sup>##</sup>
秋水仙碱组 Colchicine	0.1	12	1.13 $\pm$ 0.59 <sup>**</sup>	0.92 $\pm$ 0.12 <sup>**</sup>	1.12 $\pm$ 0.18 <sup>**</sup>
NCTF 低剂量组 NCTF-L	50	9	1.50 $\pm$ 0.60 <sup>*</sup>	1.06 $\pm$ 0.27 <sup>**</sup>	1.91 $\pm$ 0.47
NCTF 中剂量组 NCTF-M	100	11	1.29 $\pm$ 0.35 <sup>**</sup>	0.91 $\pm$ 0.09 <sup>**</sup>	1.53 $\pm$ 0.56 <sup>*</sup>
NCTF 高剂量组 NCTF-H	200	11	0.85 $\pm$ 0.33 <sup>**</sup>	0.71 $\pm$ 0.05 <sup>**</sup>	1.13 $\pm$ 0.34 <sup>**</sup>

注: 与正常组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

Note: Compared with normal group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; Compared with model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

## 2.6 NCTF 对 $\text{CCl}_4$ 致肝纤维化小鼠肝脏病理组织学影响

HE 染色观察如图 1 所示, 正常组小鼠肝脏形态未见异常, 肝小叶结构正常, 未见变性坏死的肝细胞。模型组小鼠纤维间隔分割肝汇管区形成假小叶, 有明显的肝细胞点状坏死, 异常肝细胞增殖并出现水肿和炎细胞浸润。NCTF 给药组与秋水仙碱组炎性浸润、肝细胞坏死程度减轻, 假小叶相比于模型

组明显变少。

Masson 染色如表 8 和图 2 所示, 模型组出现大量蓝色纤维条索形成的假小叶包绕汇管区, 可见大量坏死肝细胞形成的空泡。NCTF 中、高剂量和秋水仙碱组可显著降低肝脏组织的胶原分泌及肝纤维化水平, 且抗肝纤维化效果优于低剂量组: 汇管区周围蓝色纤维条索较模型组明显减少。

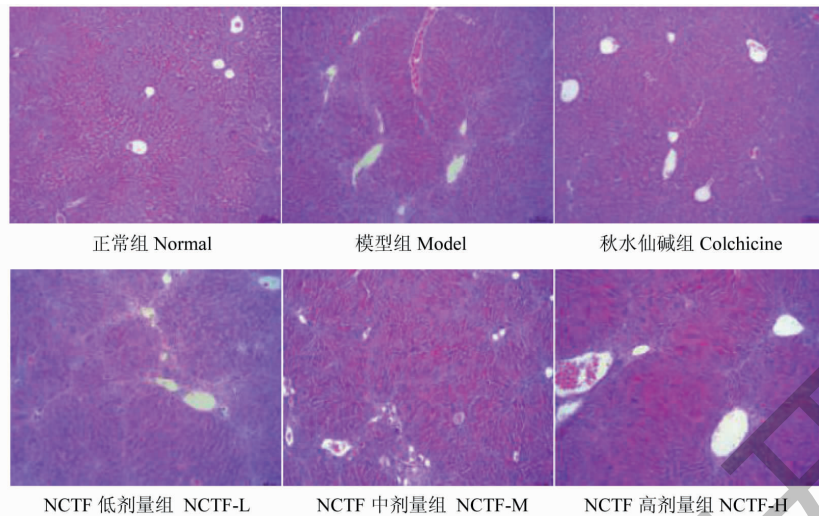


图 1 NCTF 对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维化小鼠肝组织病理学改变的影响 (HE 染色, × 100)

Fig. 1 Effects of NCTF on the liver pathological changes in CCl<sub>4</sub> induced liver fibrosis in mice (HE staining, × 100)

表 8 NCTF 对 CCl<sub>4</sub> 致肝纤维小鼠肝组织 Masson 病理分级分析

Table 8 Effects of NCTF on the Masson grades analysis in CCl<sub>4</sub> induced liver fibrosis in mice

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	n	肝纤维化分级 Grade of liver fibrosis					P
			0	1	2	3	4	
正常组 Normal	-	12	12	0	0	0	0	-
模型组 Model	-	8	0	1	2	2	3	#
秋水仙碱组 Colchicine	0.1	12	3	4	4	1	0	*
NCTF 低剂量组 NCTF-L	50	9	1	4	1	2	1	*
NCTF 中剂量组 NCTF-M	100	11	3	5	2	1	0	*
NCTF 高剂量组 NCTF-H	200	11	3	3	5	0	0	*

注:与正常组比较, # $P < 0.05$ ;与模型组比较, \* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, # $P < 0.05$ ; Compared with model group, \* $P < 0.05$ .

### 3 讨论

本文采用 CCl<sub>4</sub> 致小鼠肝纤维化模型探讨 NCTF 的抗肝纤维化作用。CCl<sub>4</sub> 作为外源性毒物,在体内可代谢成导致肝损伤的三氯甲基自由基,以 CCl<sub>4</sub> 反复刺激机体可造成其持续的肝损伤,继而引发肝纤维化的发生<sup>[9,10]</sup>。实验结果表明腹腔注射 10% CCl<sub>4</sub> 八周后,模型组小鼠出现了明显的肝细胞坏死、汇管区混合炎细胞浸润及肝纤维化,说明造模成功。NCTF 给药组减少了 CCl<sub>4</sub> 引起的胶原纤维增生和肝细胞变性,减少了肝脏切片中炎性细胞分布。肝细胞受损坏死时,细胞膜的通透性增加,存在于肝细胞浆内的 AST、ALT 进入血清中;ALP 升高,可能是由于肝细胞受损、微胆管梗阻所致,故这些指标的含量可反映肝细胞受损情况<sup>[11]</sup>。NCTF 能降低肝纤维化小鼠血清 ALT、AST、ALP 含量以及促炎细胞因子

IL-6、TNF- $\alpha$  水平。肝病患者血清 HA、LN、PCIII、IV-C 及肝组织 Hyp 含量能反应肝纤维化的发生发展,对早期肝纤维化的诊断有重要意义<sup>[12]</sup>,NCTF 给药组小鼠血清 HA、LN、PCIII、IV-C 水平及肝组织 Hyp 含量低于模型组,结果说明 NCTF 具有抗肝纤维化作用。

核转录因子 NF- $\kappa$ B 存在于细胞的胞质中,并在激活时转移到细胞核内发挥调控下游因子作用。NF- $\kappa$ B 信号通路活化引起 IKK $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B $\alpha$  等参与炎症、免疫应答等重要基因的转录,导致促炎细胞因子、自由基等炎症介质大量产生,致使炎症细胞募集、肝细胞增殖,并最终导致自发性肝纤维化发展<sup>[13,14]</sup>。肝纤维化患者肝组织中 NF- $\kappa$ B 表达增强,且与肝纤维化程度成正相关<sup>[15]</sup>。研究发现 NCTF 各剂量组小鼠肝组织 IKK $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B p65 mRNA



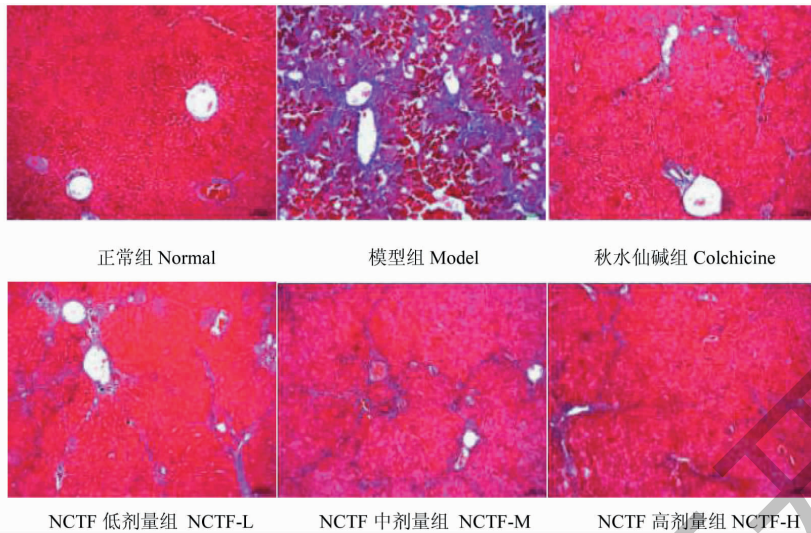


图2 NCTF对 $\text{CCl}_4$ 致肝纤维化小鼠肝组织胶原纤维改变的影响(Masson染色,  $\times 100$ )

Fig. 2 Effects of NCTF on the liver collagen fiber changes in  $\text{CCl}_4$  induced liver fibrosis in mice (Masson staining,  $\times 100$ )

NA的表达水平均显著降低。因此,NCTF可通过影响NF- $\kappa$ B信号通路改善肝纤维化的进程,达到逆转肝纤维化的作用。以上结果表明NCTF具有明显的抗肝纤维化作用,其作用机制可能与其抗氧化、抑制胶原纤维生成及阻抑NF- $\kappa$ B信号通路相关。

#### 参考文献

- Zeng ZP, Guo JS. Mechanisms and treatment of liver fibrosis [J]. World Chin J Digestol (世界华人消化杂志), 2017, 25:569-575.
- Wu YL, Lian LH, Nan JX. Protective effects of Chinese traditional medicine against liver injury and liver fibrosis and mechanisms involved[J]. World Chin J Digestol (世界华人消化杂志), 2017, 24:4144-4150.
- 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.
- Zhao J, Xu F, Ji TF, et al. Advances in the study on chemical constituents and biological activities in *Nymphaea* genus [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2014, 26:142-147.
- Maiwulajiang A. Study on preparation technology and quality standard of total flavonoids from *Nymphaea candida* [D]. Xinjiang: Xinjiang University(新疆大学), 2017.
- Zhang SL, You SP, Liu T, et al. Preventive effects of total flavonoids from *Nymphaea candida* on  $\text{CCl}_4$  induced acute liver injury in mice[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28:2017-2020.
- Sun JC, Sun WY, Li XR, et al. Comparison of hepatic fibrosis model induced by different concentrations of  $\text{CCl}_4$  in mice [J]. Lab Anim Comp Med(实验动物与比较医学), 2018, 38:255-260.
- Xu Y, Liu W, Fang B, et al. Artesunate ameliorates hepatic fibrosis induced by bovine serum albumin in rats through regulating matrix metalloproteinases [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 744:1-9.
- Zhang Y, Miao H, Yan HY, et al. Hepatoprotective effect of *Forsythiae fructus* water extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 218:27-34.
- Dong S, Chen QL, Song YN, et al. Mechanisms of  $\text{CCl}_4$ -induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis [J]. J Toxicol Sci, 2016, 4:561-572.
- Zheng JL. Effect of Shugan jianpirecipe on mice models of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride [J]. J Liaoning Univ TCM(辽宁中医药大学学报), 2015, 17:42-44.
- Liu FH, Zeng HL, Zheng XJ, et al. The role of serum hepatic fibrosis index, AST/ALT ratio and platelet detection in the diagnosis of hepatic fibrosis [J]. Exp Lab Med(实验与检验医学), 2011, 29:251-252.
- Stollenwerk MM, Lasson A, Andersson R. Active site-inactivated factor VIIa inhibits nuclear factor kappa B activation in intestinal ischemia and reperfusion [J]. J Surg Res, 2012, 178:692-699.
- Yoshiaki S, Frank L, Sarah G, et al. Hepatic activation of IKK/NF $\kappa$ B signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation [J]. Hepatology, 2012, 56:1117-1128.
- Li WW, Wang QC, Song XW, et al. Correlation of the expression of NF- $\kappa$ B p65 and hepatic fibrosis in hepatitis patients [J]. Natl Med J China(中华医学杂志), 2012, 92:1886-1888.