逍遥散加味颗粒对肝纤维化大鼠 ET－1、iNOS 的影响

罗语瞳，贺俊，唐琦，蔡林*
（川北医学院附属医院，四川 南充 637000）

摘要 目的：观察逍遥散加味颗粒对肝纤维化大鼠血清中内皮素－1（ET－1）、诱导型一氧化氮合酶（iNOS）含量的影响，探讨其治疗肝纤维化的分子机制。方法：雌雄各半的 SD 大鼠 78 只随机分为正常组（12 只）和模型组（66 只）。模型组采用四氯化碳皮下注射法建立肝纤维化模型后，将其分为模型对照组（12 只）、逍遥散加味颗粒高剂量组（13 只）、逍遥散加味颗粒低剂量组（13 只）、复方鳖甲软肝片组（13 只）和扶正化瘀胶囊组（12 只）。模型对照组给予正常饲料及饮用水，不予治疗。其余组分别灌胃给予相应剂量的对应药物，逍遥散加味颗粒高剂量组给予 16 g·kg^{-1}·d^{-1}的逍遥散加味颗粒，低剂量组给予 8 g·kg^{-1}·d^{-1}的逍遥散加味颗粒，复方鳖甲软肝片组给予 0.5 g·kg^{-1}·d^{-1}复方鳖甲软肝片，扶正化瘀胶囊组给予 0.5 g·kg^{-1}·d^{-1}扶正化瘀胶囊，每日 1 次，连续给药 4 周。末次给药禁食 8 h 后，大鼠进行目内眦取血；禁食 24 h 后，麻醉，固定，解剖肝组织，苏木素伊红（HE）染色观察肝脏组织的变化情况，酶联免疫吸附法（ELISA）测定血浆内皮素－1（ET－1）、诱导型一氧化氮合酶（iNOS）含量。结果：与正常组相比，模型对照组中 ET－1 的相对表达量明显增高（$P<0.05$）。与模型对照组比较，逍遥散加味颗粒高剂量组、低剂量组 ET－1 相对表达量均降低（$P<0.01$，$P<0.05$），其中高剂量组最为明显（$P<0.01$）。与正常组比较，模型对照组、逍遥散加味颗粒高剂量组 iNOS 蛋白的表达量差异无统计学意义（$P>0.05$）。与模型对照组相比，逍遥散加味颗粒低剂量组（$P<0.01$）、复方鳖甲软肝片组（$P<0.01$）iNOS 含量均降低，其中复方鳖甲软肝片组降低 iNOS 作用最明显。结论：逍遥散加味颗粒抗肝纤维化的作用效果明显，肝纤维化的逆转可能与内皮素－1（ET－1）、诱导型一氧化氮合酶（iNOS）有关。

关键词 逍遥散加味颗粒；肝纤维化；内皮素－1（ET－1）；诱导型一氧化氮合酶（iNOS）
中图分类号：R285.5 **文献标识码**：A **文章编号**：1002－2392（2025）06－0021－05
DOI：10.19664/j.cnki.1002－2392.250112

肝纤维化是肝硬化的必经过程之一，是在各种原因导致的慢性肝病进程中，肝星状细胞活化所致的大量细胞外基质沉积，从而影响肝细胞正常功能代谢的一种病理变化。国内外大量实验表明[1－4]，肝纤维化通过一定的治疗可以逆转，一旦发展为肝硬化，该进程将不可逆。在病理状态下 iNOS 可产生大量 NO，肝硬化患者和动物血浆中 ET－1 及 NO 水平明显增高，且与疾病严重程度相关。近年来，随着人们生活水平的提高和生活方式的改变，肝纤维化发病率逐年增加，据统计，全球每年超过 120 万人死于肝纤维化导致的终末期肝病[5]。在治疗过程中，逆转肝纤维化或延缓肝纤维化的进程显得尤为重要。经过多年的临床观察，逍遥散加味颗粒能有效改善患者的肝纤维化，但对于其改善肝纤维化的生理病理机制缺乏动物实验证据。本研究在前期研究的基础上，以肝脏微循环为切入点，通过检测肝纤维化大鼠血清中 ET－1 及 iNOS 的含量，探讨逍遥散加味颗粒抗肝纤维化的机制，为临床应用提供实验数据支撑。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 78 只，雌雄各半，体质量 160～200 g，由川北医学院动物实验中心提供。

1.2 药品及试剂

逍遥散加味颗粒组方：柴胡 15 g，白芍 10 g，茯苓 10 g，甘草 10 g，枳壳 10 g，白术 10 g，当归 10 g，三棱 10 g，莪术 10 g，鳖甲 20 g，生地黄 10 g，枸杞子 10 g，鸡

收稿日期：2024－04－27 **修回日期**：2024－10－18
基金项目：四川省科技厅科研项目（2019YJ0542）；南充市 2019 年市校合作科研资助项目（19SXHZ0063）；南充市社科项目（YAZX19－Z－02）
作者简介：罗语瞳（2000－），女，硕士研究生，主要从事中医药治疗脾胃系疾病研究。
*通信作者：蔡林（1974－），男，硕士，教授，硕士研究生导师，主要从事中医药防治脾胃系疾病研究。

血藤 15 g,党参 30 g,黄芪 30 g。以上药物均为中药配方颗粒,购自川北医学院附属医院中药房。复方鳖甲软肝片(内蒙古福瑞制药有限责任公司,国药准字 Z19991011);扶正化瘀胶囊(上海黄海制药有限责任公司,国药准字 Z20020073);四氯化碳(天津傲然精细化工研究所);酶联免疫吸附测定试剂盒(ET-1:ZC-37024;iNOS:ZC-37563,上海茁彩生物)。

1.3　主要仪器

H-1850R 高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);XD 系列倒置生物/荧光显微镜(舜宇光学科技有限公司)。

2　方法

2.1　分组与造模

大鼠正常喂养 1 周后,将其随机分为正常组 12 只和模型组 66 只。造模组首次给予皮下注射 40% CCL_4 花生油溶液 0.5 mL/100 g。此后每周 2 次皮下注射 0.3 mL/100 g,造模共 9 周。造模组前 2 周以 20% 猪油、0.5% 胆固醇、79.5% 玉米混合饲料喂养,后 7 周以 0.5% 胆固醇和 99.5% 玉米面混合饲料喂养,饮用水为 10% 乙醇溶液[6]。造模结束后,随机抽取 3 只大鼠进行肝组织活检,其余所有大鼠采用超声探测,确保造模的成功率。

2.2　给药及样本制备

模型制备结束,将造模成功大鼠随机分为模型对照组、逍遥散加味颗粒高剂量组、逍遥散加味颗粒低剂量组、复方鳖甲软肝片组和扶正化瘀胶囊组。模型对照组给予正常饲料及饮用水,不予药物治疗。其余组分别灌胃给予相应剂量的对应药物,逍遥散加味颗粒高剂量组给予 16 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 的逍遥散加味颗粒,低剂量组给予 8 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 的逍遥散加味颗粒,复方鳖甲软肝片组给予 0.5 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 复方鳖甲软肝片,扶正化瘀胶囊组给予 0.5 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 扶正化瘀胶囊,每日 1 次,连续 4 周。末次给药禁食 8 h 后,大鼠进行目内眦取血;禁食 24 h 后,麻醉,固定,解剖并保存肝组织,检测分析相关指标的变化情况。

2.3　肝组织病理形态学检查

肝组织 4% 甲醛固定,常规石蜡包埋、切片。HE 染色,光镜下观察肝组织病理形态学变化。

2.4　酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清 ET-1、iNOS 的浓度

ELISA 试剂盒检测血清 ET-1、iNOS 的浓度,并分别计算出平均值作为该组的含量,进行统计分析。实验操作以试剂盒说明书为参考标准。

2.5　统计学处理

本研究使用 SPSS16.0 软件统计结果,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,运用方差分析及 t 检验。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　HE 染色结果

正常组肝小叶结构清晰完整,肝血窦结构正常,肝细胞索排列整齐,无肝纤维化的形成,无纤维组织的明显增生。模型对照组可见炎性细胞浸润,肝细胞正常结构被假小叶取代,假小叶内肝细胞排列紊乱,外周被纤维隔包绕,表明造模成功。逍遥散加味颗粒高剂量组、低剂量组、扶正化瘀胶囊组、复方鳖甲软肝片组炎性细胞浸润程度、肝细胞排列方式、纤维隔包绕程度较给药前均有不同程度的减轻。与模型对照组比较,各治疗组纤维化有不同程度的降低。见图 1。

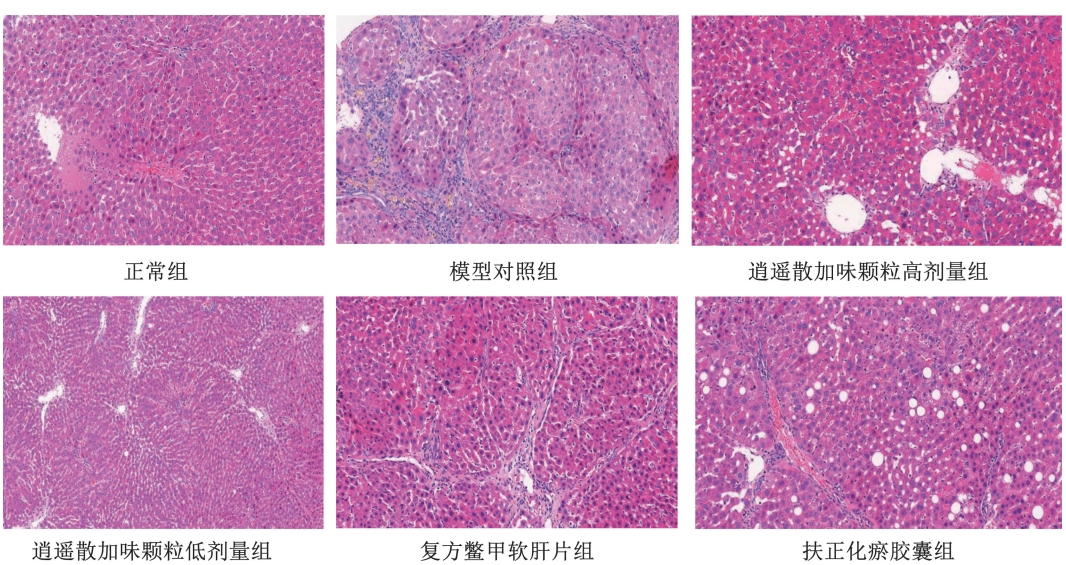


图 1　各组大鼠肝组织 HE 染色结果(×20)

3.2 血清中 ET－1、iNOS 含量

模型对照组的 ET－1 含量较正常组升高($P<0.05$),表明造模成功。逍遥散加味颗粒高剂量组、低剂量组、扶正化瘀胶囊组、复方鳖甲软肝片组与模型对照组相比较,ET－1 相对表达量降低($P<0.05$,$P<0.01$),说明逍遥散加味颗粒无论是高剂量还是低剂量都能降低血清中 ET－1 的含量,其中以高剂量效果最为突出,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

与模型对照组相比,逍遥散加味颗粒低剂量组($P<0.01$)、复方鳖甲软肝片组($P<0.01$)iNOS 含量均降低,其中复方鳖甲软肝片组降低 iNOS 作用最明显,见表 1。

表 1 各组肝纤维化大鼠血清 ET－1、iNOS 相对表达量($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ET－1/(pg/mL)	iNOS/(ng/mL)
正常组	12	9.639±1.857	11.038±1.726
模型对照组	12	12.749±1.921*	10.147±1.554
逍遥散加味颗粒高剂量组	13	6.228±1.221**△△	11.731±1.834
逍遥散加味颗粒低剂量组	13	10.648±1.627△	7.099±1.907**△△
扶正化瘀胶囊组	13	7.744±1.833*△△	8.894±1.916**
复方鳖甲软肝片组	12	9.292±2.317△	6.413±1.517**△△

注:与正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型对照组相比,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$。

4 讨论

中医学并无“肝纤维化”病名,根据患者病史、临床症状及体征,多归于“胁痛”“积聚”“肝着”“肝积”等范畴。《黄帝内经·素问》《诸病源候论》《金匮要略》分别记载了胁痛的临床症状、积聚的病因病机、肝着的治疗方法。现代医家张轻舟[7]归纳总结出“肝积”与肝纤维化意义最为接近,并对其病机进行了较为详细的阐述。外感疫毒、情志失调、饮食劳倦等多方因素,影响肝疏泄功能,肝气郁阻,血行不畅;肝之病气传其所胜而克脾土,中焦运化失司,气血生化乏源,精血无法互生,水湿无以为化;后天失养病久累积先天之本,则全身气血阴阳失衡,代谢失司,迁延不愈终发为肝积。正如《医宗必读》所云:“积之成者,正气亏虚而后邪气踞之”。由此可见,肝纤维化主要责之肝、脾、肾三脏功能失司,主要病机为外邪侵入,正气不足,内生气滞、血瘀、水湿三者交织相互影响,虚实夹杂,病情反复。

逍遥散出自《太平惠民和剂局方》,由柴胡、当归、芍药、白术、茯苓、甘草组成。方中以柴胡为君,当归、白芍为臣,三药共用,使肝体得补、血脉得充,则机体血足、肝和、肝柔。白术、茯苓、甘草为佐,三药益气健脾,能缓木郁乘土之势且使营血生化有源。组方符合《素问·脏气法时论》“肝苦急,急食甘以缓之……脾欲缓,急食甘以缓之……肝欲散,急食辛以散之”之旨,可使肝郁得舒,血虚得养,脾弱得复,气血兼顾,肝脾同调[8]。逍遥散加味颗粒在前方基础上加黄芪、党参健运脾气,不仅补益后天之本使气血生化有源,也顾护未病脏腑以达“肝病实脾”之旨,配合入脾经之枳壳理气行滞,使补中有行;肝体阴而用阳,故加生地黄、枸杞子滋养阴血;《医宗金鉴》有云:“东方之木,无虚不可补,补肾即所以补肝”,在前方基础上加入入肝、肾经之鳖甲以软坚散结、滋养肾阴,配合入肝、脾之三棱、莪术,入肝、肾之鸡血藤以达破血行气、消积止痛、补血活血、通络之功。因此,逍遥散加味颗粒具有疏肝健脾、滋养气血、活血化瘀为主、软坚散结、补益肝肾之功,避免了前人治疗肝纤维化主用温燥之药形成的伤阴之弊。

西医目前认为,肝纤维化(HF)的主要病理特征是细胞外基质(ECM)大量沉积,而活化的肝星状细胞是 ECM 的主要来源[9]。血流动力学改变是肝纤维化进一步向肝硬化发展的关键因素,其中以内皮素－1(ET－1)和一氧化氮(NO)这对相互拮抗舒缩血管活性物质之间的平衡被打破为主。国内外大量实验表明,肝硬化患者和动物血浆中,ET－1 及 NO 水平明显增高,且与疾病严重程度相关[10－12]。ET－1 主要由内皮细胞产生,具有强烈的收缩血管的作用,在刺激星状细胞活化、产生纤维化表现中起重要作用[13－14]。NO 是强有效的血管内皮细胞舒张剂,其活力及多少取决于一氧化氮合成酶(NOS)的数量及表达程度[15]。ET－1与 NO 本是一对处于动态平衡状态且存在反馈调节机制的血管活性物质,但在内毒素等病理因素的刺激下,ET－1 浓度升高,机体产生大量的 NO 拮抗[16]。肝纤维化初期由于肝脏受损,NO 浓度下降,随着肝纤维化程度加重,二者动态平衡被打破而致 ET－1及 NO 浓度均升高,最终介导血管扩张、门脉血流量增加,加重肝纤维化形成。

本研究以肝脏微循环为切入点,采用逍遥散加味颗粒进行实验,探究逍遥散加味颗粒对肝纤维化大鼠 ET－1、iNOS 的影响及作用机制。相关临床研究发现[17－18],复方鳖甲软肝片及扶正化瘀胶囊均能有效缓解肝纤维化,故本实验采取二者作为对照组,以更好地

说明逍遥散加味颗粒在抗肝纤维化中的作用效果。通过连续4周对CCL_4肝纤维化大鼠模型的干预后,分析其肝脏组织切片发现,逍遥散加味颗粒高剂量组相较于其余各组呈现出肝索细胞排列整齐、肝小叶完整、无明显纤维组织增生的特点,说明逍遥散加味颗粒可有效降低肝纤维化程度且与剂量有关。对比血清中ET-1含量,各实验组血清中ET-1含量均降低,其中以逍遥散加味颗粒高剂量组效果最为明显,说明逍遥散加味颗粒能有效降低血清中ET-1含量且可能与使用剂量有关。对比血清中iNOS含量,逍遥散加味颗粒低剂量组iNOS含量降低,但效果次于复方鳖甲软肝片组,说明低剂量逍遥散加味颗粒可降低血清中iNOS表达。在刘铭等[19]的研究中,随着肝纤维化的发展,iNOS的表达水平会逐渐升高。但本研究中模型对照组iNOS含量未见明显升高,分析原因可能是由于大鼠肝纤维化程度不同,所造成的差异。本研究证明,逍遥散加味颗粒有良好的抗肝纤维化效果,甚至某些疗效指标优于扶正化瘀胶囊和复方鳖甲软肝片。综上所述,逍遥散加味颗粒抗肝纤维化的作用效果明显,肝纤维化的逆转可能与内皮素-1(ET-1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)有关。

本研究为肝纤维化的分子机制提供了思路,也为逍遥散加味颗粒的临床推广应用奠定了理论依据。但也存在一定局限性,一是人与动物存在物种之间的本质区别,该研究结果在人体上的表达结果是否一致,还有待进一步临床验证;二是本研究中使用逍遥散加味颗粒的最大剂量为16 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$,若增加剂量,肝纤维化改善效果是否更明显,还需行下一步实验验证;三是本研究用药后跟踪反馈未充分,运用逍遥散加味颗粒抗肝纤维化治疗后,肝纤维化是否会复发,还有待进一步研究分析。

参考文献:

[1] SOHRABPOUR A A, MOHAMADNEJAD M, MALEKZADEH R. Review article: the reversibility of cirrhosis[J]. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2012, 36(9): 824-832.

[2] MAK L Y, REX W H H. Diverse effects of hepatic steatosis on fibrosis progression and functional cure in virologically quiescent chronic hepatitis B[J]. Journal of Hepatology, 2020, 73(4): 800-806.

[3] 张文富,吴姗姗,戴铭,等. 基于miR-135a/FOXO1/PINK1通路探讨柔肝化纤颗粒调控线粒体自噬抑制肝星状细胞活化的机制[J]. 中华中医药学刊,2024,42(04):30-34,269-272.

[4] 刁莹,王仲娟,李敏. 木犀草素对肝星状细胞活化和CCl4诱导小鼠肝纤维化的抑制作用及机制研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2023,51(05):131-139.

[5] 尚小飞,李秀惠. 中药抗肝纤维化实验研究进展[J]. 临床肝胆病杂志,2023,39(2):249-259.

[6] 邝满元,刘映霞,李映菊. 肝纤维化动物模型造模方法的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2008,8(9):1768-1770,1762.

[7] 张轻舟. 肝纤维化治疗中医传统历史文献研究[J]. 内蒙古中医药,2016,35(12):122-123.

[8] 李冀,连建伟. 方剂学[M]. 4版. 北京:中国中医药出版社,2016:67.

[9] HYUN J, JUNG Y. MicroRNAs in liver fibrosis: focusing on the interaction with hedgehog signaling[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(29): 6652-6662.

[10] 李校天,段海凤,于红艳,等. 肝硬化患者血浆内皮素、一氧化氮水平及与肝功能关系的研究[J]. 邯郸医专学报,1998(1):1-4.

[11] 王伯良,刘勇,付国强,等. 肝硬化患者血浆ET-1、NO和黏附分子的水平变化及临床意义[J]. 临床消化病杂志,2007,19(5):301-303.

[12] 王启之,郑玉宝,吴炎,等. 一氧化氮及内皮素在肝硬化患者肝损害中的作用及对肝门脉血流动力学的影响[J]. 蚌埠医学院学报,2007,32(1):7-9.

[13] 张平,袁迎春,任芳. 肝硬化门脉高压与内皮素及纤维化指标关系的分析[J]. 宁夏医学院学报,2005,27(4):274-275,279.

[14] MICHALSKI L, KLENIEWSKA P, PIECHOTA-POLANCZYK A, et al. The role of endothelin-1 and its receptor blockers on the liver function[J]. Gen Physiol Biophys, 2012, 31(4): 383-388.

[15] 周天彤,何生松. 肝炎患者血清一氧化氮和一氧化氮合酶水平变化及其临床意义[J]. 临床内科杂志,2007,24(5):313-315.

[16] 陈卫刚. 血管活性物质一氧化氮、内皮素-1在慢性肝炎与肝硬化患者中变化与机制探讨[D]. 石河子:石河子大学,2010.

[17] 龚启明,肖家诚,周霞秋. 复方鳖甲软肝片治疗50例肝纤维化的临床研究[J]. 临床肝胆病杂志,2006,22(3):196-198.

[18] 黄涛,王改莉,范京通,等. 扶正化瘀胶囊对乙肝肝硬化患者肝硬化、肝功能影响[J]. 临床军医杂志,2023,51(4):387-389.

[19] 刘铭,邢桦云,韩德五,等. 一氧化氮合酶在肝纤维化及肝硬化大鼠肝脏组织中的表达[J]. 山西医科大学学报,2007,38(4):305-308.

Effects of Modified Xiaoyao Granules on ET-1 and iNOS in Rats with Liver Fibrosis

LUO Yutong, HE Jun, TANG Qi, CAI Lin

(*Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong* 637000, *China*)

Abstract Objective: To observe the effects of Modified Xiaoyao Granules on serum levels of endothelin-1 (ET-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in rats with liver fibrosis, and to explore its molecular mechanism for treating liver fibrosis. Methods: A total of 78 Sprague-Dawley (SD) rats, with equal numbers of males and females, were

randomly divided into a normal group (12 rats) and a model group (66 rats). Liver fibrosis was induced in the model group via subcutaneous injection of carbon tetrachloride, after which the rats were divided into a model control group (12 rats), high - dose (13 rats) and low - dose Modified Xiaoyao Granules (13 rats) groups, Fufang Biejia Soft Liver Tablets group (13 rats), and Fuzheng Huayu Capsule group (12 rats). The model control group received regular feed and water without treatment. The other groups were administered corresponding doses of each drug by gavage. The high - dose Modified Xiaoyao Granules group received 16 g/kg/day, while the low - dose group received 8 g/kg/day. The Fufang Biejia Soft Liver Tablets and Fuzheng Huayu Capsule groups received 0.5 g/kg/day of their respective medications. Each group was dosed once daily for four weeks. After fasting for 8 hours following the final dose, blood samples were collected from the inner canthus of the rats, and liver tissue samples were collected after fasting for 24 hours, under anesthesia. Liver tissue changes were observed with hematoxylin and eosin (HE) staining, and serum ET - 1 and iNOS levels were measured using enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). Results: Compared to the normal group, the model control group exhibited a significant increase in ET - 1 expression ($P < 0.05$). Both high - dose and low - dose Modified Xiaoyao Granules groups showed reduced ET - 1 expression compared to the model control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with the high - dose group showing the most pronounced effect ($P < 0.01$). There was no statistically significant difference in iNOS expression between the model control group and the high - dose Modified Xiaoyao Granules group compared to the normal group ($P > 0.05$). Compared to the model control group, iNOS levels were reduced in the low - dose Modified Xiaoyao Granules group, the Fuzheng Huayu Capsule group, and the Fufang Biejia Soft Liver Tablets group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with the Fufang Biejia Soft Liver Tablets group showing the most notable effect. Conclusion: Modified Xiaoyao Granules show a significant anti - fibrotic effect on the liver, likely involving ET - 1 and iNOS in reversing liver fibrosis.

Key words Modified Xiaoyao Granules; Liver fibrosis; Endothelin - 1 (ET - 1); Inducible nitric oxide synthase (iNOS)