

nin and acetylcholine esterase activity in different regions of rat brain during postnatal development[J]. *Arch Toxicol*, 1993, 67 (6): 422-427.

[18] Heyer N J, Echeverria D, Farin F M, *et al.* The association between serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR), self-reported symptoms, and dental mercury exposure [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2008, 71 (19): 1318-1326.

鳖甲煎丸对大鼠肝星状细胞中 NF-κB 信号通路的影响

陈冠新¹, 文 彬², 孙海涛¹, 孙嘉玲¹, 徐 薇¹, 安海燕¹, 贺松其^{1*}
(1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 2. 中国人民解放军第四五八医院中医科, 广东 广州 510602)

摘要: **目的** 研究鳖甲煎丸(鳖甲胶、阿胶、蜂房等)对大鼠肝星状细胞(HSC-T6)中核转录因子-κB(NF-κB)信号通路中 NF-κB、p65、p50、IκB 及靶基因表达的影响。**方法** 使用鳖甲煎丸药物血清培养 HSC-T6 细胞 24 h 后,采用 qPCR 检测 *p65*、*p50*、血管内皮生长因子(*VEGF*)、基质金属蛋白酶抑制因子-1(*TIMP-1*) mRNA 的表达,免疫荧光法检测 p65 的表达,Western blot 检测 NF-κB 抑制蛋白 α(IκBα)、NF-κB 抑制蛋白 β(IκBβ)及 α 平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达。**结果** 与空白对照组及阴性对照组相比,鳖甲煎丸的中、高剂量组及阳性对照组 *p65*、*VEGF*、*TIMP-1* mRNA 的表达显著降低,各组间 *p50* mRNA 的表达无显著差异,但免疫荧光显示 p65 在细胞质中的表达降低。同时,鳖甲煎丸能显著上调 IκBα 的蛋白表达,并能明显下调 α-SMA 的表达,具有剂量依赖性,但对 IκBβ 的表达无显著影响。**结论** 鳖甲煎丸对肝纤维化的治疗作用可能与影响 NF-κB 信号通路、抑制下游靶基因的表达有关。

关键词: 鳖甲煎丸; 肝星状细胞; NF-κB; IκB; α-SMA; VEGF; TIMP-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)07-1355-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.07.006

Effects of Biejiajian Pills on NF-κB signaling pathway in hepatic stellate cells in rats

CHEN Guan-xin¹, WEN Bin², SUN Hai-tao¹, SUN Jia-ling¹, XU Wei¹, AN Hai-yan¹, HE Song-qi^{1*}
(1. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Traditional Chinese Medicine Department of No. 458 Hospital of PLA, Guangzhou 510602, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effects of Biejiajian Pills (*Colla Carapacis Trionycis*, *Asini Corii Colla*, *Nidus Vespaee*, *etc.*) on NF-κB, p65, p50 and IκB in NF-κB signaling pathway and target gene expression in HSC-T6 cells of rats. **METHODS** HSC-T6 cells were cultured with Biejiajian Pills drug serum for 24 hours, the expressions of *p65*, *p50*, *VEGF* and *TIMP-1* mRNA were determined by qPCR; the expression of p65 was measured by immunofluorescence; the expressions of IκBα, IκBβ and α-SMA were determined by Western blot. **RESULTS** The Biejiajian Pills middle-, high-dose and positive control groups showed significantly lower expressions of *p65*, *VEGF* and *TIMP-1* mRNA as compared with the blank control group and negative control group, the expressions of

收稿日期: 2016-11-03
基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (81373807)
作者简介: 陈冠新 (1990—), 男, 硕士生, 从事肝病证的临床与实验研究。E-mail: 164515260@qq.com
* 通信作者: 贺松其 (1968—), 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事肝病证的临床与实验研究。Tel: (020) 61648247, E-mail: hesongqijz@126.com

p50 mRNA among various groups showed no significant differences. But immunofluorescence showed that the expression of p65 in cytoplasm was decreased. Meanwhile, Biejiajian Pills showed significantly higher I κ B α protein expression and obvious down-regulation of α -SMA expression in a dose-dependent manner, but had no significant influence on the expression of I κ B β . **CONCLUSION** Biejiajian Pills' therapeutic effects on hepatic fibrosis may be related to influencing NF- κ B signaling pathway and inhibiting the expression of down-stream target gene.

KEY WORDS: Biejiajian Pills; hepatic stellate cells; NF- κ B; I κ B; α -SMA; VEGF; TIMP-1

肝纤维化是肝脏对各种慢性损伤的修复反应,是慢性肝病导致肝硬化的共同病理基础,目前已成为世界范围危害健康的重要问题之一。在大量炎症因子刺激下,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化,进一步转变为肌成纤维细胞,产生细胞外基质(extracellular matrix, ECM),ECM的增生与降解失衡,导致其在肝内沉积,是肝纤维化发生、发展的重要环节^[1],故抑制HSC的活化、增殖是肝纤维化防治研究的重要内容。早期抗肝纤维化治疗可以阻止其发展或逆转其过程,但西医药目前的疗效仍不理想。传统中医药治疗肝纤维化具有注重整体、辩证论治的特点,目前已广泛开展实验研究及临床观察,因此探讨中医药防治肝纤维化具有重要的意义。

鳖甲煎丸出自东汉医家张仲景所著《金匮要略》,具有益气扶正、活血化瘀、软坚散结等功效,具有抗纤维化、抗癌的作用^[2-3]。在肝纤维化的发展过程中,NF- κ B信号通路在调控HSC活化、增殖方面具有重要作用^[4]。在前期研究的基础上^[5-6],通过实验已经表明鳖甲煎丸可以抑制肝星状细胞的增殖,并诱导其凋亡^[7],但与具体信号通路的关系尚不明确。本实验将以肝星状细胞HSC-T6为研究对象,运用血清药理学方法,研究鳖甲煎丸对HSC-T6中NF- κ B信号通路信号分子NF- κ B、I κ B(inhibitor of NF- κ B,NF- κ B抑制蛋白)及下游靶基因VEGF(vascular endothelial growth factor,血管内皮生长因子)、TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1,基质金属蛋白酶抑制因子-1)、 α -SMA(α -smooth muscle actin, α 平滑肌肌动蛋白)表达的影响,探讨其抗肝纤维化的作用机制,为鳖甲煎丸的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雌雄各半Wistar大鼠40只,体重180~220 g,清洁级,由南方医科大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(粤)2011-0015。

1.1.2 实验细胞 大鼠肝星状细株(HSC-T6),具有永生化表型,由南方医院肝病中心提供。

1.1.3 实验药品 鳖甲煎丸购自武汉中联药业集团股份有限公司,国药准字Z42020772,生产批号150820,药物组成:鳖甲胶、阿胶、蜂房(炒)、土鳖虫(炒)、鼠妇虫、蜣螂、大黄、桃仁、牡丹皮、射干、黄芩、柴胡、干姜、白芍(炒)、桂枝、葶苈子、石韦、厚朴(姜制)、瞿麦、制半夏、硝石(精制)、党参。秋水仙碱购自西双版纳药业有限公司,国药准字H53021369,生产批号160215。

1.1.4 实验试剂、仪器 DMEM(高糖)、胎牛血清购自Gibco公司;胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma公司;Trizol购自北京全式金生物有限公司;PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser和SYBR[®] Premix Ex TaqTM II试剂盒购自TaKaRa公司,引物由广州英俊生物有限公司合成;蛋白提取试剂盒、BCA法蛋白浓度测定试剂盒、预染蛋白marker购自上海碧云天生物技术有限公司;I κ B α 、I κ B β 、 α -SMA一抗购自美国Santa Cruz公司;PVDF膜购自上海优宁维生物科技有限公司;ECL发光液购自美国Santa Cruz公司;免疫荧光试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;Mini-Protein电泳槽购自美国Bio-Rad公司;Kodak Image Station 2000MM成像系统购自美国Kodak公司;恒温细胞培养箱购自Thermo Fisher Scientific公司;酶标定量测定仪购自美国Thermo公司。

1.2 实验方法

1.2.1 含药血清的制备 Wistar大鼠饲养在室温(21~25℃)、相对湿度50%~60%、昼夜各半的环境中,普通饲料喂养、自由饮水,遵循《南方医科大学实验动物伦理和使用指南》进行实验操作。40只大鼠雌雄各半,体质量180~220 g,随机分为阴性对照组,鳖甲煎丸低、中、高剂量组,阳性药对照组,每组8只。将鳖甲煎丸溶解在生理盐水中制成混悬液,低、中、高剂量组分别按人体剂量日用量灌服3.5、7、14倍的鳖甲煎丸(0.45、

0.9、1.8 g/kg); 阳性药对照组以 0.2 mg/kg 秋水仙碱溶液灌胃; 阴性对照组灌胃等量的生理盐水, 每只大鼠每次灌胃 2 mL, 每日 2 次, 每次灌胃间隔 12 h, 连灌 7 次, 第 7 次给药前禁食不禁水 12 h。给药后 1 h, 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 无菌条件下腹主动脉采血, 4 ℃ 静置 4 h, 3 000 r/min 离心 20 min, 分离血清, 56 ℃ 水浴中灭活 30 min, 0.22 μm 微孔膜过滤, -80 ℃ 冷藏备用。

1.2.2 细胞培养 鼠系肝星状细胞 HSC-T6 用含 10% FBS (胎牛血清) 的 DMEM 培养于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的孵箱内, 细胞处于对数生长期时用 0.25% 胰蛋白酶进行消化后, 用含 10% FBS 的 DMEM 制成细胞悬液, 以备实验使用。按 2.5 × 10⁶/mL 的密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL。待细胞贴壁后弃培养基, 随机分为空白对照组, 阴性对照组, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组, 阳性药对照组, 分别更换为含 10% 药物血清的 DMEM, 空白对照组加入等量含 10% FBS 的 DMEM, 培养 24 h 后用于实验。

1.2.3 qPCR 检测 *p65*、*p50* mRNA 的表达水平 取上述方法处理的细胞, 按照 Trizol 试剂说明书提取 RNA, 在 260 nm 吸光度下测定 RNA, 逆转录具体步骤及反应条件参见试剂盒说明书。*NF-κB p65* 基因正向引物为 5' -ATGGATCCCTGCACACCTTG-3', 反向引物为 5' -CAAACCAAACAGCCT-CACGG-3'; *NF-κB p50* 正向引物为 5' -TTCAA-CATGGCAGACGACGA-3', 反向引物为 5' -CCATCTGTTGACAGTGGTATATCTG-3'; *Gapdh* 正向引物为 5' -TGCCACTCAGAAGACTGTGG-3', 反向引物为 5' -TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'; *VEGF* 基因正向引物为 5'-TCATCAGCCAGG-GAGTCTGT-3', 反向引物为 5'-GAGCAACCTCTC-CAAACCGT-3'; *TIMP-1* 基因正向引物为 5'-ACT-GCTGATCCGGACTCCTA-3', 反向引物为 5'-AGAAAGCTGTCTGTGGGTGG-3'。RT-PCR 过程按照说明书操作, 逆转录反应条件为 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s。qPCR 过程按照说明书操作, qPCR 反应条件为 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 10 s 40 周期, 57 ℃ 20 s, 72 ℃ 1 min。使用 *Gapdh* 作为内参基因。

1.2.4 免疫荧光法检测 *p65* 的表达情况 取上述方法处理的细胞, 4% 多聚甲醛固定 1 h, PBS 洗涤, 0.5% Triton X-100 孵育 1 次 20 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 封闭血清孵育 20 min, 一抗

(1:200, 湿盒) 孵育 4 ℃ 过夜, 二抗工作液孵育 (湿盒) 37 ℃ 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 滴加 DAPI 避光孵育 5 min, PBS 洗去多余的 DAPI, 含抗荧光淬灭剂的封片液封片。

1.2.5 Western blot 检测 *IκBα*、*IκBβ* 及 *α-SMA* 的表达水平 取上述细胞在倒置显微镜下进行计数, 按照蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白。BCA 法蛋白定量法 (参照说明书进行) 测各组蛋白浓度。用细胞裂解液将各组蛋白稀释至等浓度, 与 5 × 上样缓冲液按 4:1 混合, 98 ℃ 变性 5 min。每组取蛋白 60 μg, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳 (90 V, 100 min), 转膜以恒流 90 mA 转移 90 min, 至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉室温摇床上封闭 1 h, 孵一抗 (1:500) 4 ℃ 过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 封闭液稀释二抗 (1:2 000) 后, 常温下孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, ECL 发光试剂盒在曝光仪中进行曝光, 以内参 *β-Actin* 为对照, 实验重复 3 次。采用 Image J 软件进行灰度分析。

1.3 统计学分析 实验于同一条件下进行检测, 应用 SPSS 19.0 软件分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 *p65*、*p50*、*VEGF*、*TIMP-1* mRNA 表达的影响 与空白对照组及阴性对照组相比, 鳖甲煎丸中、高剂量组及阳性对照组的 *p65* mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$), 鳖甲煎丸低剂量组则无明显差异 ($P > 0.05$); 鳖甲煎丸中、高剂量组及阳性对照组的 *VEGF* mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$), 而鳖甲煎丸低剂量组下降不明显 ($P > 0.05$); 各组 *TIMP-1* mRNA 表达显著下降 ($P < 0.05$), 表明鳖甲煎丸可以抑制 HSC-T6 细胞中 *p65*、*VEGF*、*TIMP-1* 基因的表达。另外, 各组的 *p50* mRNA 表达无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 对 *p65* 的表达的影响 绿色荧光的深浅表示 *p65* 蛋白水平的高低。结果显示, *p65* 主要分布在 HSC-T6 细胞质中, 鳖甲煎丸中、高剂量组及阳性对照组细胞质中荧光强度较弱, 表示 *p65* 的蛋白表达水平较低; 鳖甲煎丸低剂量组与阴性对照组细胞质中荧光强度较强, 表示 *p65* 的蛋白水平较高, 即鳖甲煎丸可以降低 *p65* 在 HSC-T6 细胞质中的表达。见图 1。

表 1 鳖甲煎丸对 *p65*、*p50*、*VEGF*、*TIMP-1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of Biejiajian Pills on the expressions of *p65*, *p50*, *VEGF* and *TIMP-1* mRNA ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>p65</i>	<i>p50</i>	<i>VEGF</i>	<i>TIMP-1</i>
空白对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
阴性对照组	0.98 ± 0.05	1.06 ± 0.20	0.99 ± 0.20	1.01 ± 0.04
鳖甲煎丸低剂量组	0.92 ± 0.02	1.07 ± 0.09	0.93 ± 0.26	0.43 ± 0.03▲☆
鳖甲煎丸中剂量组	0.55 ± 0.05▲☆	0.93 ± 0.13	0.74 ± 0.12▲☆	0.27 ± 0.03▲☆
鳖甲煎丸高剂量组	0.43 ± 0.05▲☆	1.07 ± 0.15	0.56 ± 0.10▲☆	0.22 ± 0.03▲☆
阳性对照组	0.39 ± 0.07▲☆	0.75 ± 0.07▲☆	0.54 ± 0.04▲☆	0.20 ± 0.01▲☆

注：与空白对照组比较,▲*P* < 0.05；与阴性对照组比较,☆*P* < 0.05

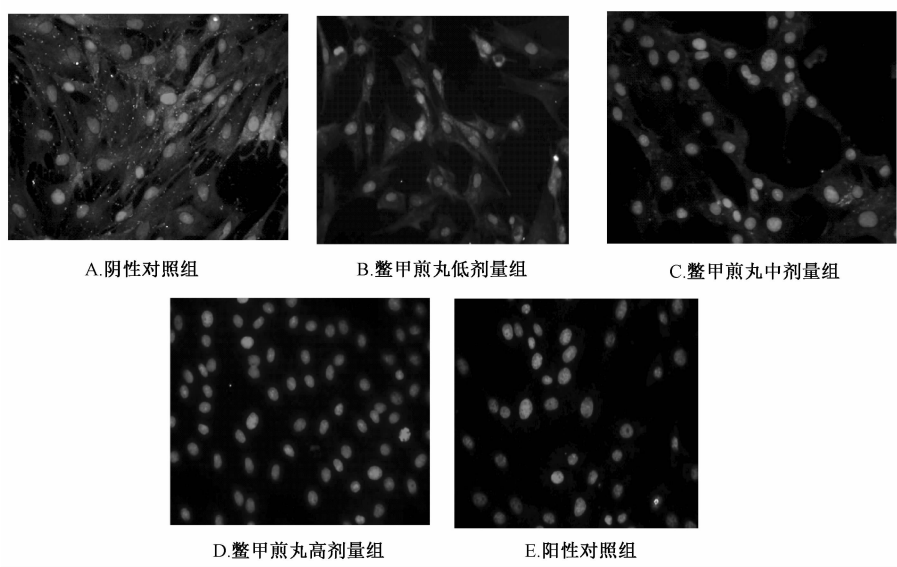


图 1 鳖甲煎丸对 *p65* 表达的影响 (×400)

Fig. 1 Effect of Biejiajian Pills on the expression of *p65* (×400)

2.3 对 *IκBα*、*IκBβ* 及 α -SMA 表达的影响 与空白对照组及阴性对照组相比，NF- κ B 信号通路信号分子 *IκBα* 的表达显著上升 (*P* < 0.05)，依次为鳖甲煎丸高剂量组 > 鳖甲煎丸中剂量组 > 鳖甲煎丸低剂量组 > 阳性对照组，而对 *IκBβ* 的表达无显著影响 (*P* > 0.05)，表明鳖甲煎丸可以促进 *IκBα* 的表达，且与药物剂量有关。

与空白对照组及阴性对照组相比，鳖甲煎丸中、高剂量组及阳性对照组中 α -SMA 的表达显著下降 (*P* < 0.05)，依次为阳性对照组 < 鳖甲煎丸高剂量组 < 鳖甲煎丸剂量组，而鳖甲煎丸低剂量组则无明显变化 (*P* > 0.05)，表明鳖甲煎丸能显著抑制 NF- κ B 信号通路下游靶基因 α -SMA 的表达，且与药物剂量有关。见图 2、表 2。

3 讨论

肝纤维化是各种病因导致肝损害时机体的一种可逆性修复过程，其治疗不当可进一步发展为不可逆的肝硬化^[8]，肝星状细胞的活化与增殖是肝纤

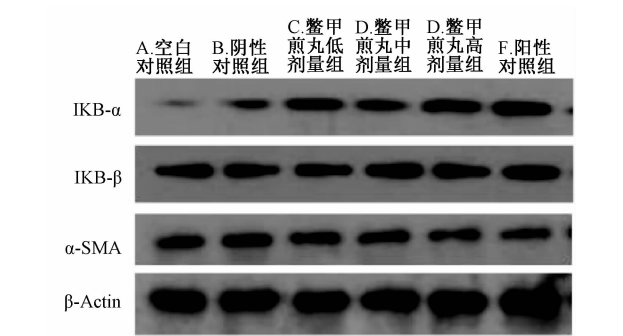


图 2 鳖甲煎丸对 *IκBα*、*IκBβ*、 α -SMA 表达的影响

Fig. 2 Effects of Biejiajian Pills on the expressions of *IκBα*, *IκBβ* and α -SMA

维化的中心环节。HSC 的持续活化、增殖，加剧了各种炎症因子浸润，使之与周围的肝细胞、免疫细胞相互作用而加剧了纤维化的发展^[9]。中医认为，肝纤维化归属于“症瘕积聚”等范畴，多因湿热瘀毒久羁体内，耗伤阴血，病久入络，脉涩血凝，导致肝络瘀阻，从而形成肝纤维化。鳖甲煎

表2 各组 IκBα、IκBβ、α-SMA 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Expressions of IκBα, IκBβ and α-SMA protein in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	IκBα	IκBβ	α-SMA
空白对照组	0.41 ± 0.03	1.22 ± 0.27	1.21 ± 0.05
阴性对照组	0.58 ± 0.05	1.15 ± 0.25	1.33 ± 0.04
鳖甲煎丸低剂量组	0.92 ± 0.06▲☆	1.14 ± 0.25	1.23 ± 0.10
鳖甲煎丸中剂量组	0.97 ± 0.12▲☆	1.34 ± 0.27	1.08 ± 0.06▲☆
鳖甲煎丸高剂量组	1.07 ± 0.17▲☆	1.07 ± 0.21	0.84 ± 0.02▲☆
阳性对照组	0.83 ± 0.26▲☆	1.16 ± 0.22	0.73 ± 0.06▲☆

注：与空白对照组比较,▲ $P < 0.05$ ；与阴性对照组比较,☆ $P < 0.05$

丸出自《金匱要略》，具有益气扶正、活血化瘀、软坚散结等功效，在临床上用于治疗肝纤维化、肝硬化，疗效确切，且无明显不良反应^[10-11]。秋水仙碱可明显降低肝脏组织中胶原组织的沉积，降低HSC的自分泌与旁分泌作用，使ECM的合成分泌减少，达到抗纤维化的目的，因此本实验以其为阳性对照药^[12]。

NF-κB 信号通路调控免疫应答，创伤愈合反应，并参与多种炎症因子的转录，在调控HSC的活化、增殖中产生重要作用，与肝纤维化密切相关^[4]。在人类细胞中，NF-κB 家族由5种亚基所组成：p50、p52、cRel、p65/RelA 和 RelB^[13]；IκB 家族包括 IκBα、IκBβ、IκBγ 等，在非激活状态下，NF-κB 与其抑制物 IκB 组成无活性的三聚体^[14-15]。在肝脏受损时，病原衍生分子〔诸如脂多糖 LPS、肿瘤坏死因子 α (TNF-α) 等〕刺激蛋白激酶 C (PKC)，使 IκB 被磷酸化后降解，NF-κB 活化入核，随后与 DNA 序列识别、结合，启动靶基因的转录^[16]，从而激活 HSC 的活化增殖。抑制 NF-κB 的表达可以抑制 HSC 的活化、增殖，从而达到抗肝纤维化的目的^[17]，抑制 IκB 的磷酸化，上调 IκBα 的表达，可以抑制 NF-κB 的核移位，使 HSC 的活化受到抑制，从而缓解肝纤维化进程^[18]。本实验结果表明，鳖甲煎丸可以明显抑制 HSC-T6 细胞中 NF-κB p65 的表达，同时上调 IκBα 的表达，但对 p50、IκBβ 无显著作用，表明鳖甲煎丸可以抑制 NF-κB 在肝星状细胞中表达，阻断 NF-κB 信号通路的激活，使 HSC-T6 的活化、增殖受到影响，从而达到抗肝纤维化的目的。

HSC 的活化与增殖是肝纤维化的中心环节，而 α-SMA 是 HSC 活化成为肌成纤维细胞的标志性骨架蛋白，其表达水平与肝纤维化程度密切相关^[19]。研究表明，α-SMA 的表达与 NF-κB p65 的表达呈正相关^[20]，故抑制 α-SMA 的表达能够抑制

HSC 的激活，是抗肝纤维化的作用机制之一^[21]。本实验结果表明，鳖甲煎丸可以抑制 NF-κB 信号通路下游靶基因 α-SMA 的表达，使 HSC 的活化增殖受到抑制，从而达到抗肝纤维化的目的，其作用机制可能与鳖甲煎丸能够直接降低 α-SMA 的水平，或通过抑制 NF-κB 信号通路的激活，使 α-SMA 合成减少有关。

血管内皮生长因子 VEGF 是特异性促进血管内皮生长的重要因子，具有促进血管内皮细胞增殖、增加血管通透性的作用。在肝纤维化的过程中，病变使得肝组织出现缺氧，继而刺激肝星状细胞活化，分泌各种细胞因子，从而使 VEGF 升高，促进血管的生成，但新生的血管多是未成熟的无效血管，阻止了肝细胞的正常物质交换^[22]，加快了肝纤维化的发展。有研究表明，人血清中 VEGF 的水平随着肝纤维化、肝硬化的不断发展而逐渐升高^[23]。鳖甲煎丸的抗肝纤维化效果可能与抑制 NF-κB 下游靶基因 VEGF 的表达，从而减少肝组织病理血管生成、改善肝细胞间的物质交换有关。

肝纤维化的主要病理特征为细胞外基质 ECM 的过度堆积，表现为 ECM 的合成增加，而活化的 HSC 增强 TIMP-1 的表达，其能够降低基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的表达活性，从而使肝组织降解 ECM 的能力不足，胶原过度沉积导致纤维化的形成。抑制 TIMP-1 的表达能够促进 ECM 的降解，能够减轻甚至逆转肝纤维化^[24-25]，是治疗肝纤维化的一种重要手段。本实验结果表明，鳖甲煎丸能够阻断 NF-κB 信号通路激活，使其下游靶基因 TIMP-1 表达减少，从而达到抗肝纤维化的目的。

肝纤维化的中医病机有“瘀血论”^[26]，其病理基础为结缔组织的增生和微循环的障碍^[27]。鳖甲煎丸方中鳖甲软坚消癥，能够抑制结缔组织的增生；桃仁、丹皮、土鳖虫活血化瘀，与实验中鳖甲煎丸能够抑制 VEGF 的表达，改善微循环的结果相一致，正切中肝纤维化的病机，且鳖甲煎丸用药方便，无明显不良反应，因此具有较高的临床应用价值。

综上所述，鳖甲煎丸能够抑制肝星状细胞中 p65 的表达，上调 IκBα 的表达，阻断 NF-κB 信号通路激活，使 NF-κB 信号通路下游靶基因 α-SMA、VEGF、TIMP-1 合成减少，从而使 HSC 的活化、增殖受到抑制，达到抗肝纤维化的目的。但肝纤维化的形成机制十分复杂，受多条细胞信号通路的影响，各信号通路之间的相互作用尚未完全阐明，有

待进一步研究。

参考文献:

[1] Friedman S L. Mechanism of hepatic fibrogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655-1669.

[2] 孙海涛, 贺松其, 文彬, 等. 鳖甲煎丸对肝癌细胞中 Wnt 信号分子 β -catenin、GSK-3 β 及靶基因 CD44v6、VEGF 的影响[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(10): 1454-1458.

[3] 谢玉宝, 萧焕明, 施梅姐, 等. 肝纤维化的中医药治疗进展[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(3): 703-706.

[4] Luedde T, Schwabe R F. NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(2): 108-118.

[5] 贺松其, 文彬, 吕志平, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化模型大鼠转化生长因子 β 1 的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2006, 14(1): 11-13.

[6] 贺松其, 文彬, 陈育尧, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化模型大鼠结缔组织生长因子的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(12): 1334-1335.

[7] 樊利艳, 贺松其, 文彬, 等. 鳖甲煎丸对大鼠肝星状细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(8): 960-966.

[8] 赵宗豪, 高人焄. 核因子 κ B 与肝纤维化的研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2004, 7(2): 119-121.

[9] Henderson N C, Iredale J P. Standing down the guard: stellate cells leave quietly[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(4): 890-892.

[10] 陈瑞玉, 贺松其, 程 旸, 等. 鳖甲煎丸治疗慢性乙型肝炎肝纤维化疗效观察[J]. 新中医, 2011, 43(3): 34-35.

[11] 姚飞龙, 贺松其, 吕志平, 等. 鳖甲煎丸联合阿德福韦酯治疗乙型肝炎后肝硬化 50 例疗效观察[J]. 新中医, 2011, 43(4): 31-32.

[12] 吕霞, 舒建昌, 何雅军, 等. 秋水仙碱抑制肝星状细胞活化与抗肝纤维化的作用[J]. 广东医学, 2006, 27(12): 1796-1798.

[13] Xiao C, Ghosh S. NF-kappaB, an evolutionarily conserved mediator of immune and inflammatory responses[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2005, 560: 41-45.

[14] Basak S, Kim H, Kearns J D, et al. A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module[J]. *Cell*, 2007, 128(2): 369-381.

[15] Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module[J]. *Oncogene*, 2006; 25(51): 6706-6716.

[16] Flohe L, Brigelius Flohe R, et al. Redox regulation of NF-kappa B activation[J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, 22(6): 1115-1126.

[17] Wang F, Liu S Y, Du T P, et al. NF- κ B inhibition alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via suppression of activated hepatic stellate cells[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(1): 95-99.

[18] Zhao W X, Wang L, Yang J L, et al. Caffeic acid phenethyl ester attenuates pro-inflammatory and fibrogenic phenotypes of LPS-stimulated hepatic stellate cells through the inhibition of NF- κ B signaling[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(3): 687-694.

[19] 胡泰洪, 蒋祥虎, 蒋跃明, 等. 肝纤维化大鼠肝组织中 NF- κ B 及 ERK-1 mRNA 的表达[J]. 临床肝胆病杂志, 2009, 25(1): 23-25.

[20] 李伟伟, 王全楚, 宋新文, 等. 核因子- κ B p65 在人肝纤维化组织中的表达[J]. 中华消化杂志, 2013, 33(2): 127-128.

[21] 欧阳灿晖, 朱 萱, 张焜和, 等. 熊果酸对肝纤维化大鼠组织 TGF- β 1 和 α -SMA 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(22): 2237-2243.

[22] 史萌萌, 奚胜艳, 王彦晖, 等. 桃红四物汤对肝纤维化小鼠病理性血管生成相关因子 VEGF、KDR 与 Flt-1 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(2): 487-491.

[23] 李晓红, 杨蒲芳, 戚红霞, 等. 血清 TGF- β 1 及 VEGF 在慢性乙肝、肝纤维化、肝硬化患者的临床变化及其意义[J]. 临床消化病杂志, 2011, 23(3): 144-145.

[24] 朱跃科, 段钟平, 王宝恩, 等. 芪参益气滴丸对 DMN 大鼠肝纤维化及肝组织 TIMP-1 表达的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(1): 11-16.

[25] 张 燕, 郎 清, 石小枫, 等. TIMP-1 siRNA 对肝纤维化大鼠 TIMP-1 及胶原表达的影响[J]. 重庆医科大学学报. 2016, 41(4): 364-368.

[26] 马继征, 张 云, 陈兰羽, 等. 肝纤维化的中医病机认识及治则治法研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2014, 24(6): 381-382.

[27] 唐 阁, 郭 卉. 瘀血阻络型慢性乙型肝炎患者胶原四项与病理分期的相关性研究[J]. 天津中医药大学学报, 2013, 32(1): 14-16.