

## 辣木叶水提物对大鼠肝纤维化的改善作用及机制

杨学芳, 董馨忆, 普吉霞, 刘建昆, 马立, 张志毕

### Ameliorative Effects and Mechanism of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Leaves on Hepatic Fibrosis in Rats

YANG Xuefang, DONG Xinyi, PU Jixia, LIU Jiankun, MA Li, and ZHANG Zhibi

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040136>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

蒙古扁桃不同极性部位对肝纤维化大鼠的保护作用及机制研究

Effect of Different Solvent Extracts of *Amygdalus mongolica* on Liver Fibrosis Rat Models Induced by Carbon Tetrachloride and Its Mechanisms

食品工业科技. 2021, 42(14): 348-355 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020090212>

辣木叶的营养、功能及应用研究进展

Research Progress on Nutrition, Function and Application of *Moringa oleifera* Leaves

食品工业科技. 2021, 42(21): 435-444 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020100030>

响应面优化泡沫法提取辣木叶蛋白工艺

Optimization of Foaming Extraction of a *Moringa oleifera* Leaf Protein by Response Surface Methodology

食品工业科技. 2020, 41(12): 150-154 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.12.024>

蒙古扁桃种仁不同极性部位对博来霉素致大鼠肺纤维化的保护作用

Protective Effect of Different Polar Parts of *Amygdalus mongolica* on Pulmonary Fibrosis Rat Models Induced by Bleomycin

食品工业科技. 2020, 41(22): 305-309 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050143>

蒙古扁桃药材抗大鼠肾纤维化有效提取物部位的筛选

Screening of Effective Extraction Sites of *Amygdalus mongolica* Medicinal Materials against Rat Renal Fibrosis

食品工业科技. 2020, 41(9): 297-302,308 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.048>

人参多糖对氧化应激损伤肝细胞的保护作用机制研究

Mechanism of Protective Effect of Ginseng Polysaccharide on Hepatocytes Induced by Oxidative Stress

食品工业科技. 2020, 41(5): 280-285,292 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.05.046>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

杨学芳,董馨忆,普吉霞,等. 辣木叶水提物对大鼠肝纤维化的改善作用及机制 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(6): 313-320. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040136

YANG Xuefang, DONG Xinyi, PU Jixia, et al. Ameliorative Effects and Mechanism of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Leaves on Hepatic Fibrosis in Rats[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(6): 313-320. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040136

· 营养与保健 ·

# 辣木叶水提物对大鼠肝纤维化的改善作用及机制

杨学芳<sup>1</sup>,董馨忆<sup>1</sup>,普吉霞<sup>1</sup>,刘建昆<sup>2</sup>,马立<sup>3,\*</sup>,张志毕<sup>1,\*</sup>

(1.昆明医科大学,云南昆明 650500;

2.解放军联勤保障部队第九二〇医院,云南昆明 650032;

3.大理农林职业技术学院,云南大理 671003)

**摘要:**研究辣木叶 (*Moringa oleifera* Lam, LM) 水提物对大鼠肝纤维化 (Hepatic Fibrosis, HF) 的改善作用和机制。60 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、秋水仙碱组 (100 mg/kg), 以及 LM 高、中、低剂量组 (200、100、50 mg/kg), 除空白组外, 其余组大鼠通过腹腔注射硫代乙酰胺 (Thiacetamide, TAA) 建立 HF 模型, 自第 5 周开始灌胃给药。给药结束后检测大鼠体重、肝脏指数、血清丙氨酸氨基转移酶 (Alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (Aspartate aminotransferase, AST)、HF 指标 (血清 III 型前胶原 (procollagen III, PCIII)、IV 型胶原 (IV collagen IV-C)、层黏蛋白 (laminin, LN)、透明质酸 (hyaluronidase, HA)、肝脏羟脯氨酸 (HYP)、Masson 染色观察肝脏纤维组织病变、氧化应激指标 (肝脏活性氧 (reactive oxygen, ROS)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD), 实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印记检测肝脏转生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor beta1, TGF- $\beta 1$ ) /Smads 通路基因表达。结果表明, 与空白组比较, HF 模型组大鼠体重极显著降低 ( $P < 0.01$ ), 肝脏指数显著增加, 血清 ALT、AST、PCIII、IV-C、LN、HA 和肝脏 HYP 浓度极显著增加 ( $P < 0.01$ ); 肝脏组织胶原纤维沉积显著增加, HF 病变严重; 肝脏 ROS 和 MDA 含量极显著增加 ( $P < 0.01$ ), SOD 活力极显著降低 ( $P < 0.01$ ), 表明模型组大鼠肝脏处于氧化应激和纤维化病变状态, 肝脏功能受损。与模型组比较, LM 各剂量组大鼠血清 ALT、AST、PCIII、IV-C、LN、HA 和肝脏 HYP 浓度不同程度的降低, 肝脏组织胶原纤维沉积显著减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 肝脏 ROS 和 MDA 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), SOD 活力显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 表明 LM 能够降低肝脏氧化应激水平, 改善大鼠 HF, 保护肝脏功能。对 TGF- $\beta 1$ /Smads 通路基因表达检测发现, 模型组 TGF- $\beta 1$ 、Smad2、Smad3 和  $\alpha$ -SMA 基因 mRNA 和蛋白表达较空白组显著增加; 相较于模型组, LM 高、中剂量组大鼠肝脏 TGF- $\beta 1$ 、Smad2、Smad3 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 基因表达显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), LM 低剂量组大鼠肝脏 Smad3 和  $\alpha$ -SMA 基因表达显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 表明 LM 可下调 HF 大鼠肝脏 TGF- $\beta 1$ /Smads 通路基因表达。LM 可能通过下调 ROS-TGF- $\beta 1$ /Smads 通路, 改善 TAA 诱导的大鼠肝纤维化。

**关键词:**肝纤维化,辣木叶,氧化应激,肝脏功能

中图分类号:TS201.4

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2024)06-0313-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040136



本文网刊:

## Ameliorative Effects and Mechanism of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Leaves on Hepatic Fibrosis in Rats

YANG Xuefang<sup>1</sup>, DONG Xinyi<sup>1</sup>, PU Jixia<sup>1</sup>, LIU Jiankun<sup>2</sup>, MA Li<sup>3,\*</sup>, ZHANG Zhibi<sup>1,\*</sup>

收稿日期: 2023-04-17

基金项目: 国家自然科学基金 (82260487); 云南省教育厅科学研究基金 (2022J0228, 2023Y0621)。

作者简介: 杨学芳 (1987-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 天然药物药理学研究, E-mail: yxf873105@163.com。

\* 通信作者: 马立 (1987-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 天然药物化学及药效物质基础研究, E-mail: 120236541@qq.com。

张志毕 (1986-), 男, 博士, 实验师, 研究方向: 天然药物药理学研究, E-mail: zhangzhibi@kmmu.edu.cn。

- (1. Kunming Medical University, Kunming 650500, China;
2. The 920th Hospital of PLA Joint Logistics Support Force, Kunming 650032, China;
3. Dali Agricultural and Forestry Vocational and Technical College, Dali 671003, China)

**Abstract:** To investigate the ameliorative effects and mechanism of *Moringa oleifera* Lam (LM) leaf aqueous extract on hepatic fibrosis (HF) in rats. 60 male SD rats were randomly divided into normal group, model group, colchicine group (100 mg/kg), and LM high, medium and low dose groups (200, 100 and 50 mg/kg), except for the normal group, rats in the remaining groups were established as HF model by intraperitoneal injection of thioacetamide (TAA) and the corresponding drugs were administered from the 5th week. At the end of drug administration, rats were examined for body weight, liver index, liver function indexes, including serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). HF indices including serum procollagen type III (PCIII), collagen type IV (IV-C), laminin (LN), hyaluronic acid (HA), liver hydroxyproline acid (HYP). Masson staining was used to observe liver fibrotic tissue lesions. Indicators of Liver oxidative stress, including hepatic reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD), were also detected. Real-time quantitative fluorescence PCR and protein immunoblotting were performed to detect hepatic TGF- $\beta$ 1/Smads pathway gene expression. Rats in the HF model group had significantly lower body weight, highly significantly increased liver index, serum ALT, AST, PCIII, IV-C, LN, HA and liver HYP concentrations compared with rats in the normal group ( $P < 0.01$ ). In addition, the liver tissue of rats in the model group showed a significant increase in collagen fibre deposition, severe liver fibrosis, highly significant increase in liver ROS and MDA content, and a highly significant decrease in SOD activity ( $P < 0.01$ ), indicating that the liver of rats in the model group was in a state of oxidative stress and fibrotic lesions, and liver function was impaired. Compared with the model group, serum ALT, AST, PCIII, IV-C, LN, HA and hepatic HYP concentrations were reduced to varying degrees in the LM group rats. In addition, collagen fibre deposition in liver tissue was significantly reduced, liver ROS and MDA content were significantly decreased, and SOD activity was significantly increased in the LM group rats, indicating that LM could reduce the level of liver oxidative stress, ameliorate liver fibrosis and protect liver function in rats ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Gene expression detection of the TGF- $\beta$ 1/Smads pathway showed that the mRNA and protein expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3 and  $\alpha$ -SMA genes were significantly increased in the model group compared with the control group. Compared with the model group, the liver TGF- $\beta$ 1, Smad2, Smad3 and  $\alpha$ -SMA gene expressions were significantly lower in the LM high and medium dose groups ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the liver Smad3 and  $\alpha$ -SMA gene expressions were significantly lower in the LM low dose group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), indicating that LM could downregulate liver TGF- $\beta$ 1/Smads pathway gene expression in HF rats. LM would ameliorate TAA-induced liver fibrosis in rats by down-regulating the ROS-TGF- $\beta$ 1/Smads pathway.

**Key words:** liver fibrosis; *Moringa oleifera* leaf; oxidative stress; liver function

肝脏纤维化 (Hepatic Fibrosis, HF) 是一种肝脏组织无效的损伤-修复, 是多种慢性肝脏疾病中后期共同的病理过程, 主要的病理表现为细胞外基质 (Extracellular Matrix, ECM) 积累和瘢痕形成<sup>[1]</sup>。当肝脏受到严重破坏或持续损伤时, ECM 大量积累, 纤维增生向肝实质细胞间隙延伸, 并逐渐形成纤维素及纤维间隔, 纤维间隔继续发展则连接形成纤维包裹<sup>[2]</sup>。HF 之前的肝脏病变都是可逆的, 但是当肝脏疾病发展到肝硬化和肝癌阶段, 是不可逆转的, 所以在 HF 阶段及时阻止并逆转肝脏疾病的发展, 对于各种肝脏疾病的治疗具有重要的意义<sup>[3]</sup>。

人类机体很容易受到氧化应激的伤害, 氧化应激是指机体内活性氧 (ROS) 积累过多, 造成细胞和组织损伤的一种病理状态, ROS 诱导的细胞损伤及炎症反应, 影响细胞膜和细胞器的结构, 释放大量的炎症因子, 导致肝星状细胞 (Hepatic Stellate Cells, HSC) 活化、增殖和细胞外基质的合成、积累, 导致 HF 的形成<sup>[4]</sup>。研究发现 ROS 与酒精性肝病和病毒性肝炎导致的 HF 发生具有密切的关系, 在 HF 患者或实验性 HF 模型动物的血清和肝脏组织中, 都检测

到高浓度的 ROS 表达<sup>[5-6]</sup>。研究表明转化生长因子  $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor  $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 与 ROS 具有协同作用, 共同介导 HF 的发生。一方面 TGF- $\beta$ 1 激活细胞膜氧化酶和促进细胞线粒体复合物 IV 活性, 导致细胞 ROS 合成增加; 另一方面, TGF- $\beta$ 1 抑制抗氧化还原酶的表达, 降低细胞清除 ROS 的能力, 导致细胞内 ROS 积累<sup>[7]</sup>。ROS 的积累会促进了 TGF- $\beta$ 1 的表达, TGF- $\beta$ 1 与细胞膜表面受体结合后招募 Smad2 和 Smad3 形成蛋白复合物, Smad2/3 蛋白复合物被 ROS 介导的磷酸化激活后转移进入细胞核, 作为转录因子与下游靶基因 DNA 结合, 激活  $\alpha$ -SMA、胶原纤维等 HF 基因的表达, 导致 HF 发生<sup>[8]</sup>, 因此抗氧化是治疗 HF 的重要方法。

辣木 (*Moringa oleifera* Lam.) 主要分布于我国云南、广东、福建、台湾等地<sup>[9]</sup>, 2012 年, 辣木叶被卫生部批准为新资源食品。辣木含有丰富的蛋白质、维生素、多糖、多酚等多种营养成分和活性物质, 具有抗氧化、抑菌、降血糖、降血脂、抗肿瘤、清热解毒等功效, 是一种药食同源的中草药<sup>[10-11]</sup>。研究发现辣木叶乙醇提取物具有较强的抗氧化作用<sup>[12]</sup>, 对高脂饮食

导致的肝损伤及高脂血症<sup>[13]</sup>、 $\text{CCl}_4$  诱导的肝损伤<sup>[14]</sup>、奥氮平诱导的糖脂代谢紊乱<sup>[15]</sup>和肝癌<sup>[16]</sup>都具有一定的保护作用,其保护作用机制与抗氧化损伤、提高脂肪代谢速率和促进肝癌细胞凋亡有关,但是对辣木叶对肝纤维化是否具有改善作用缺乏目前尚无报道。

因此,本研究建立大鼠肝纤维化模型,用辣木叶水提物(LM)灌胃治疗后检测 LM 对大鼠肝纤维化病理损伤、肝脏功能和氧化应激的影响,旨在探讨 LM 对肝纤维化的改善作用,为辣木叶资源的开发利用提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

SPF 级雄性大鼠 60 只,6 周龄的,体重 180~200 g,购买自昆明医科大学实验动物学部,动物生产使用许可证 SYXK(滇)K2020-0006,本研究获得昆明医科大学实验动物伦理委员会的批准通过(批准编号:kmmu20211491);硫代乙酰胺(纯度 $\geq 98\%$ ) Sigma 公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、羟脯氨酸(HYP)试剂盒 南京建成生物工程有限公司;PCIII、IV-C ELISA 试剂盒 上海酶联生物科技有限公司;LN ELISA 试剂盒、HA ELISA 试剂盒 武汉华美生物工程有限公司;TGF- $\beta 1$ 、 $\alpha$ -SMA 一抗 武汉华美生物工程有限公司;Smd2 一抗、Smd3 一抗 ABclonal 公司;总 RNA 提取试剂盒 Axygen 公司;逆转录试剂盒 Thermo Scientific 公司;实时荧光定量 PCR 试剂盒 宝生生物工程有限公司;秋水仙碱片 云南吴邦制药有限公司;辣木叶干粉 陕西泰科生物科技有限公司。

Synergy2 型多功能酶标仪 美国 Biotek 公司;Centrifuge5804R 型冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司;EG1150 石蜡包埋机、RM2245 切片机、DMLIM 显微镜 德国 Leica 公司;GCZX3 型垂直电泳仪及转膜仪 美国 BD 公司;QuantStudioTM 6 Flx 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪 美国 Thermo Fisher 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 辣木叶水提取物制备 辣木叶干粉 200 g,加入 2 L 超纯水煮沸 10 min,冷却到室温后用 2  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,溶液经 5000 r/min 离心 10 min 后真空冷冻干燥,得到褐绿色的辣木叶水提物粉末(LM), $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冷冻保存,每次灌胃前需用生理盐水现配为相应的浓度。

1.2.2 动物分组及处理 60 只大鼠随机分为空白组、模型组、秋水仙碱组(100 mg/kg·d)、LM 高、中、低剂量组(剂量分别为 200、100、50 mg/kg·d),每组 10 只,除空白组外,其余组大鼠隔天注射硫代乙酰胺(TAA,剂量 160 mg/kg)1 次,共注射 8 周<sup>[17]</sup>,自造模

开始后的第 5 周开始灌胃,药物组灌胃 1 mL/kg 药物,1 次/d,空白组和模型组灌胃等量生理盐水,灌胃至第 8 周结束后处死大鼠,取大鼠血清和部分肝脏 $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存,另一部分肝脏用 10% 甲醛溶液固定。

### 1.2.3 检测指标

1.2.3.1 体重和肝脏指数检测 给药处理期间每周检测 1 次大鼠体重,给药结束后取大鼠肝脏,用预冷生理盐水快速清洗后滤纸吸干,称量肝脏质量,计算肝脏指数,肝脏指数=肝脏重量/大鼠体重 $\times 100$ 。

1.2.3.2 肝脏功能、氧化应激水平和 HF 指标检测 大鼠血清样根据试剂盒说明书检测转氨酶 ALT、AST 浓度评价肝脏功能;检测肝脏 ROS、MDA 浓度和 SOD 活性,评价肝脏氧化应激水平和抗氧化能力;检测血清 HF 四项指标(PCIII、IV-C、LN、HA)和羟脯氨酸(HYP)浓度,评价 HF 程度。

1.2.3.3 肝脏组织病理学观察 肝脏组织于甲醛固定液中固定 7 d。脱水透明后石蜡包埋,切片后脱蜡、水化,然后进行 Masson 染色,封片后显微镜下观察肝脏纤维化水平,根据 Ishak 评分标准评估大鼠 HF 程度,根据肝脏纤维化严重程度评分为 0~6 分,分值越大代表纤维化程度越严重<sup>[18]</sup>。

1.2.3.4 肝脏 TGF- $\beta 1$ /Smads 通路基因表达检测 蛋白表达检测:肝脏组织约 30 mg,加入蛋白裂解液后超声匀浆,冰浴裂解 30 min 后 12000 r/min 离心 10 min,取上清用 BCA 法检测蛋白浓度,10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白质通过湿转转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温 2 h 封闭后加入一抗孵育过夜,清洗后加入二抗室温孵育 2 h,ECL 化学发光检测蛋白表达,Image J 软件分析目的蛋白条带相对表达量。mRNA 表达检测:肝脏组织约 20 mg 提取总 RNA,然后逆转录合成 cDNA。NCBI 网站设计大鼠 TGF- $\beta 1$ 、Smad2/3、 $\alpha$ -SMA、 $\beta$ -actin(内参)基因引物,并通过 Blast 确定引物的特异性。根据实时荧光定量试剂盒操作说明检测目的基因 mRNA 表达水平。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法分析每个基因 mRNA 的相对表达量。引物信息见表 1。

### 1.3 数据处理

数据使用 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析和绘图,数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析方法, $P < 0.05$  代表组间差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 大鼠一般情况观察

实验观察发现空白组大鼠精神状态好,毛发光泽,体重增长稳定。与空白组比较,模型组大鼠精神萎靡,毛发干枯且颜色暗淡,进食和饮水减少,行动迟缓,体重极显著降低( $P < 0.01$ ),肝脏指数极显著增加( $P < 0.01$ ),符合文献 [17] 报道的 HF 模型特征。与模型组比较,给药后(第 8 周)LM 组和秋水仙碱组

表1 PCR引物序列  
Table 1 Sequence of PCR primer

基因名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
<i>TGF-β1</i>	CTTGCCCTCTACAACCAACA	CTTGCGACCCACGTAAGTAGA
<i>Smad2</i>	AGTGTTTGCCGAGTGCCTAAGTG	GAGCAGCAAATTCTTGGTTGTTGA
<i>Smad3</i>	TAGCACAGGCTCTTTGGATG	GAAGCAGAGACTGGGTCTCTC
<i>α-SMA</i>	GGAGCATCCGACCTTGCTAA	CCATCTCCAGAGTCCAGCAC
<i>β-actin</i>	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTACGCACGATTTTC

大鼠精神状态均有所改善, 进食和饮水量增加, 毛发恢复光泽, 体重均显著增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 肝脏指数也显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。本结果显示 LM 具有改善大鼠精神状态和显著下调肝脏指数的作用, 见表 2。

表2 LM对HF大鼠体重和肝脏指数的影响  
Table 2 Effects of LM on body weight and liver index in HF rats

组别	剂量 (mg/kg)	第0周	第4周	第8周	肝脏指数
空白	-	235.72±6.11	278.80±9.95	307.49±10.24	3.72±0.37
模型	-	240.24±6.80	218.10±9.72**	209.90±10.77**	5.11±0.61**
秋水仙碱	100	234.09±8.00	214.20±12.18	238.39±11.38 <sup>###</sup>	4.17±0.41 <sup>###</sup>
LM-高	200	237.96±8.51	221.83±8.12	251.05±11.73 <sup>###</sup>	4.03±0.45 <sup>###</sup>
LM-中	100	233.27±6.85	217.97±10.16	245.05±9.86 <sup>###</sup>	4.42±0.61 <sup>#</sup>
LM-低	50	236.02±7.01	219.30±8.48	239.12±11.10 <sup>###</sup>	4.52±0.39 <sup>#</sup>

注: 与空白组比较\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与模型组比较<sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>###</sup> $P<0.01$ , 表2~表6、图2同。

### 2.2 辣木叶对 HF 大鼠肝脏功能的保护作用

结果见表 3, 与空白组比较, 模型组大鼠血清 AST 和 ALT 浓度都显著升高( $P<0.01$ ), 表明 HF 大鼠肝脏功能受到损伤。秋水仙碱是逆转肝纤维化的药物之一, 陶柏楠等<sup>[19]</sup>、胥文娟等<sup>[20]</sup>研究发现秋水仙碱能够降低 HF 大鼠血清 ALT 和 AST, 改善肝脏功能, 本研究也发现, 秋水仙碱组大鼠血清 ALT 和

AST 浓度较模型组显著降低( $P<0.01$ ), 表明秋水仙碱能够改善 HF 大鼠肝脏功能。与模型组比较, LM 高、中、低剂量都能够显著降低 HF 大鼠血清 AST 和 ALT 浓度( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。本结果显示 LM 能够改善大鼠肝脏功能。

表3 LM对HF大鼠血清AST、ALT浓度和肝纤维化评分的影响

Table 3 Effects of LM on serum AST, ALT levels and liver fibrosis score in HF rats

组别	剂量(mg/kg)	AST(U/L)	ALT(U/L)	肝纤维化评分
空白	-	30.40±6.75	56.09±17.43	0
模型	-	79.66±16.31**	192.36±63.05**	4.10±0.57**
秋水仙碱	100	47.93±17.11 <sup>#</sup>	115.51±31.38 <sup>###</sup>	2.60±0.84 <sup>###</sup>
LM-高	200	33.82±3.49 <sup>###</sup>	94.76±31.86 <sup>###</sup>	2.10±0.74 <sup>###</sup>
LM-中	100	35.35±8.74 <sup>###</sup>	112.64±35.82 <sup>#</sup>	2.50±0.97 <sup>###</sup>
LM-低	50	41.95±8.62 <sup>###</sup>	120.01±24.73 <sup>#</sup>	2.90±0.99 <sup>###</sup>

### 2.3 LM 改善 HF 大鼠肝纤维化病理损伤

HF 病理损伤和肝纤维化评分如图 1 和表 2 所示, 空白组大鼠肝脏组织细胞大小均匀, 排列规整, 细胞形态清晰, 沿中央静脉呈现放射状分布, 无炎性细胞浸润, 也无变形和坏死。模型组大鼠肝脏细胞排列混乱, 肝细胞显著变性, 肝小叶结构遭到破坏, 细胞染色不均, 部分细胞呈空泡样改变, 外基质分泌较多, 汇管区纤维增生严重, 形成清晰的纤维间隔, HF 评分

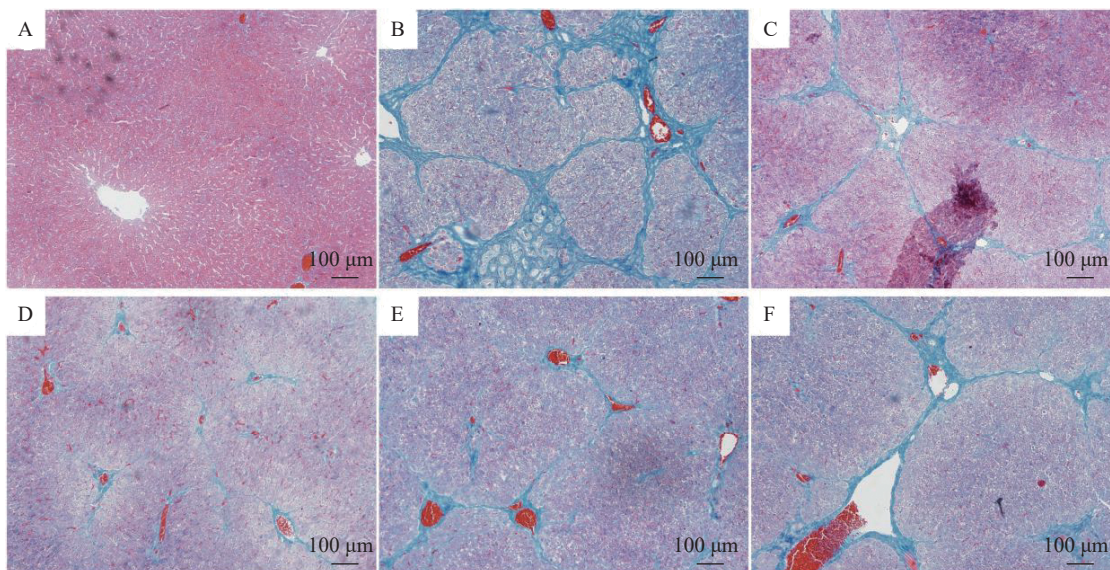


图1 LM减轻HF大鼠肝纤维化损伤(200×)

Fig.1 LM attenuates liver fibrosis injury in HF rats (200×)

注: A: 空白组; B: 模型组; C: 秋水仙碱组; D: LM 高剂量组; E: LM 中剂量组; F: LM 低剂量组。

极显著增加( $P<0.01$ ),表明本研究成功建立了大鼠 HF 模型。与模型组比较,秋水仙碱组 HF 大鼠肝脏组织纤维增生显著减少,肝细胞空泡样改变得到显著缓解,炎症浸润程度降低,肝脏细胞排列相对规整, HF 评分极显著降低( $P<0.01$ )。而 LM 高剂量组大鼠肝脏组仅能观察到少量纤维增生和聚集,无肝细胞变性空泡样改变, HF 评分较模型组极显著降低( $P<0.01$ ), LM 抗 HF 病变的疗效和降低 HF 评分较秋水仙碱组有更大程度的改善, LM 中、低剂量组也能在不同程度上缓解 HF 大鼠 HF 组织病变,并极显著降低 HF 评分( $P<0.01$ )。

### 2.4 LM 降低 HF 大鼠肝纤维化指标

肝脏细胞的炎性改变可以刺激纤维组织增生,导致血清 HF 四项指标(PCIII、IV-C、LN 和 HA)的异常升高,升高的幅度随着 HF 的程度加重而增加,因此血清肝纤四项的浓度可以作为评价 HF 程度的指标<sup>[21]</sup>。HYP 是胶原纤维的主要成分之一,当肝脏内胶原纤维异常增多时,肝脏组织中的 HYP 含量也会随之升高,因此 HYP 含量与 HF 程度密切相关<sup>[22]</sup>。血清肝纤四项检测结果见表 4,与空白组比较,模型组大鼠血清肝纤四项指标和肝脏 HYP 含量都极显著高于空白组( $P<0.01$ ),表明 HF 大鼠肝纤维化病变严重。与模型组比较,秋水仙碱组肝纤四项和 HYP 浓度都显著降低( $P<0.05, P<0.01$ ),而 LM 也能够显著降低大鼠血清中肝纤四项指标和 HYP 的含量( $P<0.05, P<0.01$ ),并且呈现剂量依赖关系。整体分析, LM 高剂量组对肝纤四项和 HYP 含量的影响与秋水仙碱组相当。本结果显示 LM 能够抑制大鼠 HF 的发生和发展。

### 2.5 LM 对肝脏组织氧化应激的影响

HF 的发生与氧化应激密切相关,课题组前期已证实 LM 具有抗氧化作用<sup>[15]</sup>, LM 对 HF 大鼠肝脏氧化应激影响的结果见表 5,与空白组比较,模型组大鼠肝脏组织氧化应激指标 ROS 和 MDA 含量都极显著高于空白组( $P<0.01$ ),抗氧化酶 SOD 活力显著降低( $P<0.01$ ),表明 HF 大鼠肝脏组织处于氧化应激状态,肝脏组织抗氧化损伤能力降低。与模型组比较, LM 组大鼠肝脏组织 ROS 和 MDA 含量显著降低( $P<0.05, P<0.01$ ),肝脏 SOD 活力显著增加( $P<0.05, P<0.01$ ),表明 LM 具有抗氧化作用,可降低 HF 大鼠肝脏组织的氧化应激水平。

### 2.6 LM 对肝脏 TGF-β1/Smads 通路基因表达的影响

mRNA 检测结果见表 6,模型组大鼠肝脏组织 TGF-β1/Smads 通路基因,包括 TGF-β1、Smad2、Smad3 和 α-SMA 基因 mRNA 表达较空白组都极显著增加( $P<0.01$ )。与模型组相比,秋水仙碱组 α-SMA 基因 mRNA 表达极显著降低( $P<0.01$ ),而 TGF-β1、Smad2、Smad3 基因 mRNA 表达无明显变化; LM 高剂量组 TGF-β1 基因 mRNA 表达显著降低( $P<0.05$ ); LM 高、中剂量组 Smad2 基因 mRNA 表达显著降低( $P<0.05$ ); LM 高、中、低剂量组 Smad3 和 α-SMA 基因 mRNA 表达都显著降低( $P<0.05, P<0.01$ )。

蛋白表达检测结果见图 2,与空白组比较,模型组大鼠肝脏 TGF-β1、Smad2、Smad3 和 α-SMA 基因蛋白表达都极显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,秋水仙碱组 TGF-β1、Smad2、Smad3 和 α-SMA 蛋白表达都极显著降低( $P<0.01$ ); LM 高、中剂量组

表 4 LM 对 HF 大鼠肝纤维化指标含量的影响

Table 4 Effects of LM on the content of liver fibrosis markers in HF rats

组别	剂量(mg/kg)	PCIII (μg/L)	IV-C (μg/L)	LN (μg/L)	HA (μg/L)	HYP (μg/g)
空白	-	1.83±0.24	43.64±6.64	219.33±41.06	86.24±10.06	206.41±31.41
模型	-	3.45±0.33**	85.13±7.68**	435.24±41.38**	140.21±13.24**	328.17±25.57**
秋水仙碱	100	2.690±0.21##	64.24±9.34##	330.01±32.01##	117.06±16.24#	255.53±17.06##
LM-高	200	2.79±0.27##	61.03±9.19##	308.70±36.50##	117.56±13.19#	246.24±19.19##
LM-中	100	2.94±0.40#	61.29±9.00##	317.76±44.92##	123.85±11.87#	276.32±12.88##
LM-低	50	3.08±0.34#	70.06±8.52#	365.21±32.88#	133.76±14.99#	283.82±18.70##

注: PCIII 为 III 型前胶原; IV-C 为 IV 型胶原; LN 为层黏连蛋白; HA 为透明质酸; HYP 为羟脯氨酸。

表 5 LM 对 HF 大鼠肝脏组织氧化应激的影响

Table 5 Effects of LM on oxidative stress in liver tissue in HF rats

组别	剂量(mg/kg)	ROS 相对含量	MDA (nmol/mg prot)	SOD (U/mg prot)
空白	-	1.00±0.04	15.33±1.30	349.25±14.68
模型	-	1.43±0.11**	38.26±3.23**	227.20±10.46**
秋水仙碱	100	1.15±0.05##	26.19±4.09##	237.98±9.42##
LM-高	200	1.13±0.04##	21.79±2.61##	278.30±13.55##
LM-中	100	1.21±0.07##	24.59±2.45##	258.05±17.21##
LM-低	50	1.29±0.06#	28.15±1.74##	240.21±14.61#

表6 LM对HF大鼠肝脏TGF-β1/Smads通路基因mRNA表达的影响  
Table 6 Effects of LM on mRNA expression of TGF-β1/Smads pathway genes in the liver of HF rats

组别	剂量(mg/kg)	TGF-β1	Smad2	Smad3	α-SMA
空白	-	1.06±0.39	1.01±0.14	1.02±0.21	1.03±0.29
模型	-	2.44±0.38**	2.65±0.50**	2.97±0.25**	4.05±0.65**
秋水仙碱	100	2.21±0.57	2.34±0.53	2.70±0.35	2.63±0.49##
LM-高	200	1.68±0.55#	1.79±0.31#	1.69±0.31##	2.06±0.43##
LM-中	100	2.04±0.51	2.06±0.16#	2.12±0.50##	2.65±0.21##
LM-低	50	2.27±0.19	2.12±0.32	2.33±0.43#	2.70±0.32##

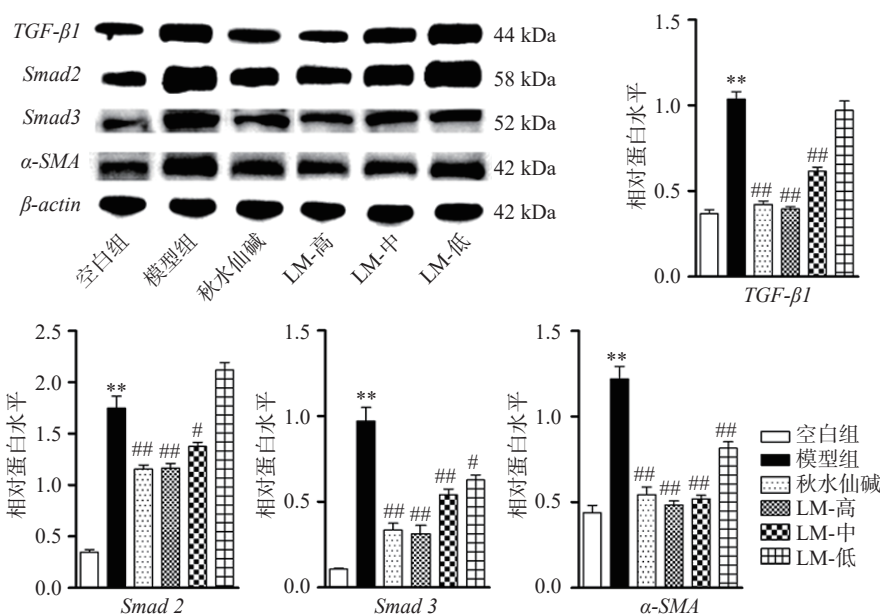


图2 LM对HF大鼠肝脏TGF-β1/Smads通路基因蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of LM on protein expression of TGF-β1/Smads pathway genes in the liver of HF rats

TGF-β1、Smad2、Smad3和α-SMA蛋白表达都显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )；LM低剂量组Smad3和α-SMA表达显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。基因表达检测结果显示模型组大鼠肝脏组织TGF-β1/Smads通路被激活，肝星状细胞被活化，而LM能够下调TGF-β1/Smads通路表达，抑制肝星状细胞的活化。

### 3 讨论与结论

HF的发生与氧化应激和炎症损伤密切相关，TGF-β1、血小板衍生生长因子(Platelet Derived Growth Factor, PDGF)、肿瘤坏死因子α(Tumor Necrosis Factor, TNF-α)等细胞因子使静息状态的HSC被激活，合成以α-SMA为标志物的活化蛋白，被活化的肝星状细胞进一步转化为肌成纤维细胞，肌成纤维细胞在各种细胞因子、趋化因子、生长因子的作用下，不断增殖并分泌ECM<sup>[23]</sup>。此外，ROS等刺激会导致ECM在肝脏组织中积累，形成纤维化瘢痕，影响肝脏的正常功能。所以消除损伤因素，降低HSC的活化和增殖，是治疗HF的主要策略之一<sup>[24]</sup>。辣木叶富含抗氧化活性物质，因此推测其可能通过抗氧化作用清除ROS等肝损伤因素，逆转肝纤维化。

肝毒试剂TAA诱导大鼠肝脏发生氧化应激，

TAA处理后大鼠肝脏ROS含量和脂质氧化产物MDA<sup>[25-26]</sup>含量都显著增加，肝脏处于氧化应激损伤状态，肝脏组织内的ALT和AST会释放进入血液中<sup>[27]</sup>，血清中ALT和AST含量可以作为评价肝脏功能的指标<sup>[28]</sup>。本研究检测也证实了TAA诱导氧化应激损伤后，肝脏ROS和MDA含量都显著增加，血清ALT和AST浓度显著增加，大鼠肝脏功能受到损伤，而LM能够显著的降低肝脏氧化应激状态，保护肝脏功能。

肝星状细胞被激活后，会大量合成、分泌PCIII、IV-C、LN、HA等肝脏胶原纤维成份，这些成份血清含量可以作为评价HF的指标<sup>[29]</sup>。HYP是胶原蛋白中特有的氨基酸成份，肝脏组织中HYP含量也可以评价HF程度<sup>[30]</sup>。本研究检测了大鼠血清PCIII、IV-C、LN、HA和肝脏HYP含量，发现模型组大鼠上述指标都显著升高，表明TAA处理成功诱导了大鼠HF的发生。LM处理后，大鼠HF指标显著降低，表明LM成功减缓了大鼠肝脏纤维组织沉积，该结果也通过Masson染色的结果得到了验证。

在HF发生过程中，ROS能显著促进TGF-β1的表达<sup>[31]</sup>，而TGF-β1可通过抑制抗氧化还原酶的表达，如谷氧还原蛋白、过氧化氢(catalase，

CAT)、SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)等,降低细胞清除 ROS 的能力,导致细胞内 ROS 进一步积累。TGF- $\beta$ 1 与受体结合后,招募 Smads 蛋白形成复合物,Smads 蛋白复合物被磷酸化后转移进入细胞核内,激活下游 HF 靶基因的表达,导致肝星状细胞活化标志物  $\alpha$ -SMA 表达上调<sup>[32]</sup>、ECM 合成和分泌增加<sup>[3]</sup>。因此,TGF- $\beta$ 1 和 ROS 协同作用,一方面促进 HSC 活化和增殖,增加 ECM 的合成;另一方面能够抑制与 ECM 降解相关的蛋白表达,抑制 ECM 的降解。本研究发现,在 TAA 诱导的纤维化肝脏组织内,肝脏组织 ROS 和 MDA 含量显著增加,TGF- $\beta$ 1/Smads 通路激活,TGF- $\beta$ 1 表达显著增加,其结合蛋白 Smad2/3 表达也显著增加,因此 ROS-TGF- $\beta$ 1/Smads 通路的激活是 HF 发生的重要因素。而 LM 处理后,大鼠肝脏组织 ROS 和 MDA 浓度都显著降低,TGF- $\beta$ 1、Smad2/3 和下游靶基因  $\alpha$ -SMA 表达都显著降低,胶原纤维含量也显著降低,表明 LM 可能通过抗氧化作用提高机体清除 ROS 的能力,抑制 ROS-TGF- $\beta$ 1/Smads 通路的激活,进而抑制下游肝星状细胞的活化和 ECM 的合成、分泌,减轻 HF 损伤。

多项研究表明,辣木叶提取物具有抗氧化、抗炎、增强免疫力等广泛的药理作用<sup>[10]</sup>,本研究结果显示 LM 能够提高机体抗氧化能力,显著降低 HF 大鼠肝脏 ROS 含量,改善大鼠 HF 损伤。作用机制研究结果显示,LM 能够显著抑制 HF 大鼠肝脏 TGF- $\beta$ 1/Smads 通路 TGF- $\beta$ 1、Smad2/3 和下游  $\alpha$ -SMA、胶原纤维基因的表达,推测 LM 可能通过调控 ROS-TGF- $\beta$ 1/Smads 通路发挥抗肝纤维化作用,但是 LM 改善 HF 的药效物质基础还需要进一步的研究。

### 参考文献

[1] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2021, 18(3): 151–166.

[2] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2019, 65: 37–55.

[3] POVERO D, BUSLETTA C, NOVO E. et al. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process[J]. *Histology & Histopathology*, 2010, 25(8): 1075–1091.

[4] KRENKEL O, TACKE F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2017, 17(5): 306–321.

[5] CHENG Q, LI C, YANG C F, et al. Methyl ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through the TGF- $\beta$ 1/Smad and NOX4/ROS pathways[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 299(1): 131–139.

[6] CENI E, MELLO T, GALLI A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(47): 17756–17772.

[7] ZHANG Y J, HUANG P, JIANG T, et al. Role of aldose reductase in TGF- $\beta$ 1-induced fibronectin synthesis in human mesangial cells[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(6): 2735–

2742.

[8] SHU G W, YUSUF A, DAI C X, et al. Piperine inhibits AML-12 hepatocyte EMT and LX-2 HSC activation and alleviates mouse liver fibrosis provoked by CCl<sub>4</sub>: roles in the activation of the Nrf2 cascade and subsequent suppression of the TGF- $\beta$ 1/Smad axis[J]. *Food & Function*, 2021, 12(22): 11686–11703.

[9] KHAN I, ZANEB H, MASOOD S, et al. Effect of *Moringa oleifera* leaf powder supplementation on growth performance and intestinal morphology in broiler chickens[J]. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition*, 2017, 101(1): 114–121.

[10] 熊凡, 刘阳. 辣木叶中活性物质及其药理功能研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(9): 212–218. [XIONG F, LIU Y. Research progress on the pharmacological functions of active components in *Moringa oleifera* leaves[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(9): 212–218.]

[11] 袁静, 梁文仪, 袁永兵, 等. 辣木叶化学成分和药理活性的研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4422–4432. [YUAN J, LIANG W Y, YUAN Y B, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Moringa oleifera* leaves[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(14): 4422–4432.]

[12] 高秋玉, 邓小宽, 刘丽琼, 等. 辣木叶抗氧化活性研究及活性成分含量测定[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(23): 325–328. [GAO Q Y, DENG X K, LIU L Q, et al. Research of antioxidative activity and determination of active ingredients in *Moringa oleifera* Lam leaves[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(23): 325–328.]

[13] SHA Z J, LI C F, TANG S H, et al. Efficacy and mechanism of new resource medicinal materia *Moringa oleifera* leaves against hyperlipidemia[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, 46(14): 3465–3477.

[14] RAKESH S, SINGH V J. *In vivo* antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf and pod extracts against carbon tetra chloride induced liver damage in albino mice[J]. *Journal of Chemical & Pharmaceutical Research*, 2010, 2: 275–283.

[15] 杨学芳, 肖蓉, 廖顺杉, 等. 辣木叶水提取物减缓奥氮平诱导的小鼠糖脂代谢紊乱[J]. *昆明医科大学学报*, 2021, 42(4): 20–27. [YANG X F, XIAO R, LIAO S S, et al. Aqueous extract of *Moringa Oleifera* leaves alleviate olanzapine-induced metabolic syndrome in mice[J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2021, 42(4): 20–27.]

[16] SADEK K, ABOUZED T, ABOUELKHAIR R, et al. The chemo-prophylactic efficacy of an ethanol *Moringa oleifera* leaf extract against hepatocellular carcinoma in rats[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2017, 55(1): 1458–1466.

[17] 刘煜, 吕若芸, 万博, 等. 硫代乙酰胺诱导肝纤维化模型及其血清学诊断数学模型的构建[J]. *药物生物技术*, 2009, 16(6): 554–558. [LIU Y, LÜ R Y, WAN B, et al. Establishment of liver fibrosis model induced by thioacetamide and its diagnosis discriminant models of the serum indexes[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2009, 16(6): 554–558.]

[18] GOODMAN Z D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases[J]. *Journal of Hepatology*, 2007, 47(4): 598–607.

[19] 陶柏楠, 王咏兰, 田梦杰, 等. 柔肝降酶方对 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化的作用[J]. *中成药*, 2023, 45(3): 741–747. [TAO B N, WANG Y L, TIAN M J, et al. Effects of Rougan Jiangmei Recipe on CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in rats[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2023, 45(3): 741–747.]

[20] 胥文娟, 李红芳, 牛媛媛, 等. 化痰软肝胶囊对四氯化碳诱导



- 肝纤维化大鼠的作用[J]. 中成药, 2023, 45(5): 1447-1454. [XU W J, LI H F, NIU Y Y, et al. Effects of Huayu Ruangan Capsules on CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in rats[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2023, 45(5): 1447-1454.]
- [21] ROSENBERG W M C, MICHAEL V, ROBERT T, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study[J]. Gastroenterology, 2019, 127(6): 1704-1713.
- [22] 徐珊, 周敏, 包剑锋, 等. 肝纤维化不同证型与肝功能和肝组织羟脯氨酸关系的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2008(9): 1855-1857. [XU S, ZHOU M, BAO J F, et al. Experimental study on difference of liver function and hydroxyproline among different tcm syndromes of liver fibrosis[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2008(9): 1855-1857.]
- [23] LIANG S, KISSELEVA T, BRENNER D. The role of NADPH oxidases (NOXs) in liver fibrosis and the activation of myofibroblasts[J]. Frontiers in Physiology, 2016, 7(33): 1-17.
- [24] BAIOCCHINI A, MONTALDO C, CONIGLIARO A, et al. Extracellular matrix molecular remodeling in human liver fibrosis evolution[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151736.
- [25] FAUZIAH P N, MASKOEN A M, YULIATI T, et al. Optimized steps in determination of malondialdehyde (MDA) standards on diagnostic of lipid peroxidation[J]. Padjadjaran Journal of Dentistry, 2018, 30(2): 136-145.
- [26] ILKAYA B. Investigating erythrocyte membrane lipid and protein oxidation with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase activity in *Caprine anaplasmosis*[J]. Large Animal Review, 2020, 26(5): 231-237.
- [27] 吴晓东, 张峰, 梁瑞峰. 大黄素与丹参素合用对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的保护作用[J]. 天津中医药, 2018, 35(2): 143-146. [WU X D, ZHANG F, LIANG R F. Effects of combination of emodin and tanshinol in hepatic fibrosis rats induced by carbon tetrachloride[J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 35(2): 143-146.]
- [28] 吴桐, 周红兵, 王佳, 等. 蒙古扁桃不同极性部位对肝纤维化大鼠的保护作用及机制研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(14): 348-355. [WU T, ZHOU H B, WANG J, et al. Effect of different solvent extracts of amygdalus mongolica on liver fibrosis rat models induced by carbon tetrachloride and its mechanisms[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(14): 348-355.]
- [29] WU J, PAN L, JIN X Q, et al. The role of oxymatrine in regulating TGF- $\beta$ 1 in rats with hepatic fibrosis[J]. Acta Cirurgica Brasileira, 2018, 33(3): 207-215.
- [30] NABIL A, ALI I S, SHIHA G, et al. Correlation between oxidative stress and hydroxyproline content in liver fibrosis[J]. Biochemistry Letters, 2021, 17(1): 22-29.
- [31] ZHOU F Y, WANG A Q, LI D, et al. Pinocembrin from penthorum chinense pursh suppresses hepatic stellate cells activation through a unified SIRT3-TGF- $\beta$ -Smad signaling pathway[J]. Toxicology Applied Pharmacology, 2018, 341: 38-50.
- [32] YONG J P, MI S J, LEE S, et al. Anti-fibrotic effects of brevilin A in hepatic fibrosis via inhibiting the STAT3 signaling pathway[J]. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, 2021, 41(12): 127989.