

叶提取液的体内抗氧化活性。

4.2 体内抗氧化实验

纵观 3 个指标的显示结果,红腺忍冬叶水提醇沉分离后所得各部分中,多个部分均具有较好的活性效果,但大多为沉淀的活性较高,且 30% 沉淀高剂量组的每个指标效果都较好,说明提取物中不同极性部位均具有一定的抗氧化活性,但以其中极性较大的部位的活性更为显著。参考对金银花多糖的相关研究^[13],推测此部分的主要活性成分可能为多糖部分。后期可以对山银花叶的水提物和 30%醇沉沉淀中的多糖进行相关测定和比较,以进一步明晰其抗氧化作用的有效成分。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 28-29.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2015: 30-31.
- [3] ZHU Y, XU Z L. Studies on correlation between bacteriostasis and total flavonoids, chlorogenic acid content in leaves of *Lonicera hypoglauca* Miq. [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol(中国中医药科技), 2014, 21(1): 39-41.
- [4] 朱英, 李姗姗. 红腺忍冬叶抗炎解热作用的实验研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2014, 31(3): 12-17.

- [5] ZHU Y, LI J. Experimental study of antioxidant effect on leaves of *Lonicera hypoglauca* Miq. [J]. J Zhejiang Chin Med Univ(浙江中医药大学学报), 2012, 36(10): 1117-1122.
- [6] ZHAO D B, LIU X H, WANG H Q. Scavenging activity of *Dioscorea oppositifolia* to DPPH free radicals [J]. Nat Prod Res Dev, 2005, 17: 272-274.
- [7] MAU J L, TSAI S Y, TSENG Y H, et al. Antioxidant properties of hot water extracts from *Ganoderma tsugae* Murrill [J]. Food Sci Tech/LWT, 2005(38): 589-597.
- [8] SUJA K P, JAYALEKSHMY A, ARUMUGHAN C. Antioxidant activity of sesame cake extract [J]. Food Chem, 2005(91): 213-219.
- [9] ZOVKO KONCIC M, KREMER D, GRUZ J, et al. Antioxidant and antimicrobial properties of *Moltkia petraea* (Tart.) Griseb. flower, leaf and stem infusions [J]. Food Chem. Toxicol, 2010, 48(6): 1537-1542.
- [10] MITSUYOSHI M, NAKO S, KOTARO S, et al. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells [J]. Bio Pharm Bull, 2005, 28(2): 253.
- [11] 曾伟成, 蔡钦榕, 杨辉, 等. 虎杖鞣质抗脂质过氧化作用研究[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(6): 18-19.
- [12] ZHANG X, XU J K, WANG N L, et al. Studies on antioxidant activity of bibenzyls and phenolic components from *Dendrobium nobile* [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2008, 43(11): 829-832.
- [13] 李尔春. 金银花多糖的分离纯化与生物活性研究[D]. 陕西师范大学, 2008.

收稿日期: 2016-06-17

N-乙酰半胱氨酸活性炭缓释微囊对大鼠肝纤维化中细胞内成纤维信号分子表达的影响

缪樑斌^{1,2}, 包剑锋², 刘寿荣², 方红英², 杨宗信², 黄从想², 潘熠健², 高建青^{1*} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 浙江中医药大学附属杭州西溪医院, 杭州 310023)

摘要: 目的 研究口服 N-乙酰半胱氨酸活性炭缓释微囊(N-acetylcysteine activated carbon microcapsules, ACNAC)在大鼠肝纤维化治疗中肝细胞内成纤维信号分子表达的影响。方法 以明胶包裹吸附 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)的载药活性炭制备得到 ACNAC, 以四氯化碳(CCl₄)制备大鼠肝纤维化模型, ACNAC 高、中、低剂量组(80, 40, 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 按照 N-乙酰半胱氨酸计算)进行灌胃给药, NAC、水飞蓟宾为阳性对照药物。治疗 8 周后处死大鼠, 通过大鼠肝功能指标、病理切片、免疫组织化学法评价 ACNAC 对胞内信号分子表达中的影响。结果 CCl₄ 大鼠肝纤维化模型制备成功, 其大鼠肝组织病理切片 HE 染色和网状纤维染色表明其肝纤维化程度为 III~IV 期, 免疫组化显示胞内 TGF-β₁/Tβ-R₁ 和 Smad2/3 大量表达。ACNAC、NAC 和 SM 对肝纤维化大鼠血清 ALT、AST 及 Tbil 有显著的治疗作用, ACNAC 高剂量组效果明显优于 NAC 和 SM (P<0.05)。ACNAC 各治疗组大鼠肝组织病理切片表明肝纤维化好转, 免疫组化显示胞内 TGF-β₁/Tβ-R₁ 和 Smad2/3 表达减少, ACNAC 高剂量组表达具显著性差异(P<0.05)。结论 ACNAC 对大鼠肝纤维化胞内成纤维信号分子 TGF-β₁/Tβ-R₁ 和 Smad2/3 有明显抑制作用, 对抗大鼠肝纤维化的疗效明显, 且较等剂量的 NAC 及对照药物水飞蓟宾有更显著的疗效。

关键词: N-乙酰半胱氨酸活性炭缓释微囊; 肝纤维化; 成纤维信号分子

基金项目: 浙江省科技计划项目(2013C33094); 杭州市医药卫生科技计划项目(2011A043)

作者简介: 缪樑斌, 硕士生, 中药师 Tel: 13588743818 E-mail: alex_x2@163.com *通信作者: 高建青, 博士, 教授, 博导 Tel: (0571)88208437 E-mail: gaojianqing@zju.edu.cn

Effect of *N*-Acetylcysteine Activated Carbon Sustained-release Microcapsules on the Expression of Intracellular Fibroblast Signaling Molecules in Rat Liver Fibrosis

MIAO Liangbin^{1,2}, BAO Jianfeng², LIU Shourong², FANG Hongying², YANG Zongxin², HUANG Congxiang², PAN Yijian², GAO Jianqing^{1*} (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Xixi Hospital of Hangzhou, Affiliated to Zhejiang Chinese Medicine University, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of *N*-acetylcysteine activated carbon sustained-release microcapsule (ACNAC) by oral administration on hepatic fibroblast signaling molecule expression in rats with hepatic fibrosis. **METHODS** ACNAC was prepared by gelatin entrapping with acetylcysteine-loaded activated carbon. The rat model of liver fibrosis was prepared with carbon tetrachloride (CCl₄). The rats were given ACNAC high, middle and low dose of 80 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 40 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (calculated according to acetylcysteine), NAC and silybin as the positive control drug by gavage administration. Rats were sacrificed after 8 weeks of treatment. The effects of ACNAC on the expression of intracellular signal molecules were evaluated by rat liver function, pathological sections and immunohistochemistry. **RESULTS** CCl₄-induced rat liver fibrosis model was successfully established. The pathological changes of liver tissue were observed by HE staining and reticular fiber staining. The degree of hepatic fibrosis was grade III–IV, and immunohistochemistry showed that TGF-β₁/Tβ-R₁ and Smad2/3 were abundantly expressed. ACNAC, NAC and SM had significant therapeutic effects on serum ALT, AST and Tbil in rats with hepatic fibrosis. The ACNAC high dose group was superior to NAC and SM (*P*<0.05). The pathological sections of liver tissue with treatment groups showed improvement of hepatic fibrosis. Immunohistochemistry showed that TGF-β₁/Tβ-R₁ and Smad2/3 expression were decreased in the NCSM group, and the NCSM high dose group (80 mg·kg⁻¹·d⁻¹) expression was significantly different (*P*<0.05). **CONCLUSION** ACNAC could significantly inhibit the expression of TGF-β₁/Tβ-R₁ and Smad2/3 in rat liver fibrosis. The effect of ACNAC on liver fibrosis was significantly improved, and has a better therapeutic effect than of NAC and the control drug silybin.

KEY WORDS: *N*-acetylcysteine activated carbon sustained-release microcapsules (ACNAC); hepatic fibrosis; fibroblast signaling molecules

近年来研究发现, *N*-乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC)对肝纤维化形成关键环节肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的异常活化及细胞外(extracellular matrix, ECM)生成有较好的阻断作用。其机制为 NAC 的抗氧化作用能显著清除肝脏自由基, 阻断 TGF-β/Smads 蛋白纤维信号分子信号通路的激活转导^[1-2], 从而抑制 HSC 的活化和 ECM 的生成。NAC 在肝病和肝纤维化的临床治疗中, 均为静脉注射, 存在着代谢快, 药效持续时间极短、生物利用度低的问题, 致使临床需用大剂量给药, 不良反应超过 10%, 限制了其临床应用; 肝纤维化病程较长, 需要长期用药, 如能通过口服方式给药, 并对药物进行缓释, 将提高患者依从性。前期研究显示, 使用明胶包裹吸附 NAC 的活性炭载药微囊在药动学研究中, 有着较好的缓释和提高生物利用度的作用。本研究采用制备明胶为囊材包裹的 NAC 活性炭缓释微囊(*N*-acetylcysteine activated carbon microcapsules, ACNAC), 通过口服给药方式, 对大鼠肝纤维化模型进行治疗, 观察治疗后肝组织中细胞内成纤维

号分子表达的影响, 验证 ACNAC 在对大鼠肝纤维化的治疗效果。

1 仪器和材料

Zenyth340-st 酶标仪(ANTHOS LAB tec, 奥地利); Leica2235 轮转式切片机(德国); 日立 7060 全自动生化分析仪(日本日立); Biofuge28RS 低温高速离心机(德国 Heraeus 公司); B41 显微镜(日本 Olympus); HPIAS-1000 彩色病理分析系统(武汉同济医科大学)。

NAC(武汉远大弘元股份有限公司, 批号: 20110607); 水飞蓟宾(江苏镇江第三制药厂, 批号: 20100827); 针用活性炭(杭州木材厂, 批号: 120907); 四氯化碳(CCl₄, 国药集团, 批号: 120503); 橄榄油, 血清等各指标试剂盒由南京建成生物有限公司提供, TGF-β₁ 抗体(批号: 20130815)、Tβ-R₁ 抗体(批号: 20130703)、Smad2/3 抗体(批号: 20130819)、多聚体抗兔 IgG-HRP(批号: 20130730)免疫组织试剂盒均由武汉博士德生物有限公司提供。

清洁级, SD 大鼠, ♂, (125±5)g, 由浙江省

医学科学院实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK 浙-20080033。

2 方法

2.1 ACNAC 制备

精密称取明胶, 加水 10 mL, 恒温至 55 °C, 1 000 r·min⁻¹ 搅拌充分溶胀。精密称取载药活性炭 0.1 g 加入明胶溶液中, 在 55 °C 搅拌 20 min 成混悬液作为水相; 取液体石蜡 50 mL, 加入司盘-80 混匀作为油相。将水相线状加入油相, 继续搅拌 15 min, 加异丙醇 15 mL 脱水 3 min, 用戊二醛 10 mL 固化 5 min, 搅拌, 于 4 °C 放置 24 h, 异丙醇洗涤 3 次, 过滤, 水洗涤 3 次, 过滤, 干燥即得。光镜形态观察: 在光学显微镜下用测微尺目测 3 批明胶微囊的粒径; 电镜观察: 另取少量干燥微囊, 经喷金后, 在电子扫描显微镜下观察, 记录扫描电镜图谱。取室温下 ≥ 500 个的微囊, 轻涂载玻片上, 滴少许液体石蜡分散, 在光学显微镜下进行形态观察, 同时根据下列公式计算微球的平均粒径(d)和粒径分布。

$$d = (\sum_{i=1}^{500} n_i d_i) / (\sum_{i=1}^{500} n_i)$$

式中 $d_1, d_2 \cdots d_i$ 为微囊的粒径, $n_1, n_2 \cdots n_i$ 分别为具有粒径为 $d_1, d_2 \cdots d_i$ 的微囊的个数。

2.2 动物实验

将 125 只大鼠随机分为 2 组, 正常对照组大鼠 10 只, 造模组大鼠 115 只, 每笼 5 只进行饲养, 模型组进行造模, 造模期间标准大鼠饲料进行饲养。造模组给予 40% CCl₄ 橄榄油溶液 1 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 进行皮下注射制备肝纤维化模型, 每周 3 次, 连续 4 周; 正常对照组给予 0.9% 生理盐水 1 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 皮下注射, 每周 3 次, 连续 4 周; 造模实验期间密切观察大鼠体质量、饮食、精神、毛色变化。第 4 周对造模组大鼠随机选取 6 只, 进行肝组织网状纤维染色, 观察肝脏纤维化程度。模型制备成功后, 对适宜进一步进行实验的大鼠随机分成 6 组, 其中 ACNAC 高、中、低剂量组各 16 只, NAC 对照组、水飞蓟宾(SM)组各 15 只, 模型组 14 只。药物实验阶段所有大鼠以每笼 4 只或每笼 5 只进行饲养。ACNAC 低、中、高剂量组分别给予 ACNAC 水混悬液(持续仪器震荡形成并抽取)灌胃给药(按 NAC 计, 等体积相应浓度)20, 40, 80 mg·kg⁻¹·d⁻¹, NAC 组以 NAC 水溶液灌胃给药 80 mg·kg⁻¹·d⁻¹, SM 组以 SM 水混悬液(持续

仪器震荡形成并抽取)灌胃给药 80 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 模型组和正常对照组灌胃给药等体积的 0.9% 生理盐水, 每日 1 次, 连续给药治疗 8 周, 于末次给药 24 h 后, 处死各组大鼠, 同时取血样 1 000 g 离心 10 min 分离血清, 用于测定 ALT、AST、Tbil 指标; 取肝组织分 2 份, 一份用于 HE 染色和网状纤维染色, Smad2、Smad3、TGF-β₁、Tβ-R₁ 等免疫组织化学指标的测定, 另一份用于肝脏组织匀浆后测定 TGF-β₁。

2.3 数据统计分析

肝功能血清学指标 ALT、AST、Tbil 指标, 肝组织 TGF-β₁ 指标, 数据结果使用 SPSS 16.0 进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验作统计分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。肝组织病理学运用多组等级分组资料的两两比较统计, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

3 结果

3.1 ACNAC 形态及粒径

光镜形态观察结果显示, 微囊呈黑色, 微囊外形圆整, 粒径较均匀, 分散性好, 粒径分布在 80~140 μm 的微囊占总数 81.9%, 平均粒径为 110.4 μm, SD 为 13.59 μm, 结果见图 1。电镜观察结果显示, 在扫描电镜下观察, 含药微囊表面光滑, 未见有药物附着于表面, 结果见图 2。粒径分布见图 3。

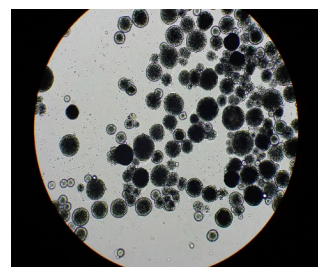


图 1 ACNAC 的光镜图(200×)

Fig. 1 Optical microscopy of ACNAC(200×)

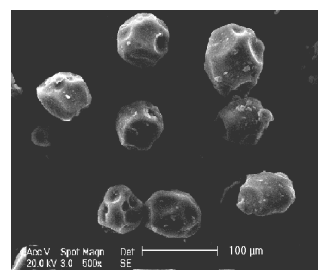


图 2 ACNAC 的扫描电镜图

Fig. 2 Scanning electron microscope of ACNAC

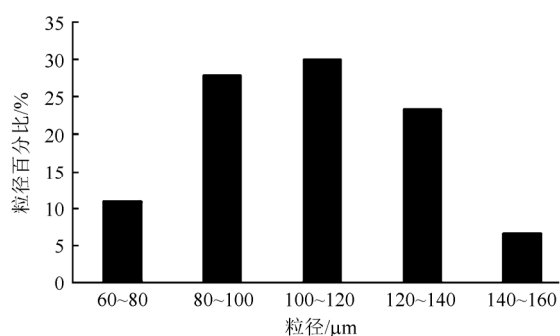


图3 ACNAC的粒径分布图

Fig. 3 Particle size distribution of ACNAC

3.2 大鼠一般情况

模型制备阶段, 正常对照组大鼠毛白, 有光泽, 精神状态佳, 活动敏捷, 摄食饮水量和二便呈正常状态。模型组皮毛显黄色、油腻、粗糙, 精神萎靡, 行动较迟缓, 腹圆鼓胀, 解剖可见浮水, 摄食饮水偏少, 在造模过程中大鼠死亡12只, 另有8只造模组大鼠因处于严重消瘦且濒死状态, 故被剔除出实验; 实验阶段模型组大鼠因未给予治疗出现2只死亡, NAC组和SM组各出现1只死亡。给药实验阶段, 正常对照组大鼠无异样, 各药物组大鼠一般情况较模型对照组有不同程度改善。

3.3 血清学指标结果

与正常对照组比较, 模型组大鼠血清学指标明显升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$); ACNAC、NAC和SM对大鼠肝纤维血清学指标、Tbil有显著的治疗作用, 结果说明药物对大鼠肝纤维化均有一定的治疗作用, ACNAC中、高剂量给药组效果明显优于NAC和SM($P<0.05$), 提示ACNAC在本研究中为对肝纤维化治疗的较好作用, 指标数据结果见表1。

表1 ACNAC对肝纤维化血清学指标的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of ACNAC on serum indexes of liver fibrosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	Tbil/μmol·L ⁻¹
正常对照组	10	56.84±5.73	119.70±9.03	1.61±0.26
模型组	12	258.11±7.31 ¹⁾	212.08±8.54 ¹⁾	2.15±0.13 ¹⁾
ACNAC低剂量组	15	231.67±4.01 ²⁾	179.47±6.14 ²⁾	1.86±0.18 ²⁾
ACNAC中剂量组	15	206.39±6.76 ²⁾³⁾	151.23±8.01 ²⁾³⁾⁴⁾	1.70±0.21 ²⁾
ACNAC高剂量组	15	174.67±7.42 ²⁾³⁾⁴⁾	141.43±7.89 ²⁾³⁾⁴⁾	1.56±0.18 ²⁾³⁾⁴⁾
NAC组	14	266.13±9.75 ²⁾	179.37±6.91 ²⁾	1.88±0.26 ²⁾
SM组	14	203.79±8.97 ²⁾	160.16±8.29 ²⁾	1.72±0.31 ²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与NAC组比较, ³⁾ $P<0.05$; 与SM组比较, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the NAC group, ³⁾ $P<0.05$; compared with SM group, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

3.4 肝组织病理学结果(HE染色、网状纤维染色)

通过对实验中各组大鼠的肝脏组织进行染色后镜检, 发现HE染色的肝组织, 模型组大鼠的肝组织中出现大量的细胞炎性灶和坏死灶, 且大量集中于汇管区周围, 治疗组的大鼠肝组织炎性灶和坏死灶较模型组减少, 且各组间有一定的差异, ACNAC组优于NAC和SM对照组, 尤其是ACNAC高剂量治疗组, 炎性灶和坏死灶显著减少。网状纤维染色显示模型组大鼠肝组织肝纤维化评分集中为IV级, 治疗组大鼠肝纤维化基本为I~V, 而随着用药剂量组的不同, ACNAC各剂量组, 随着剂量的增大, 肝纤维化程度降低, 结果见表2。

表2 各组肝纤维化评级分布情况

Tab. 2 The distribution of liver fibrosis in each group

组别	n	肝纤维化级别分布数量/n				
		0	I~II	III	IV~V	VI
正常对照组	10	10	0	0	0	0
模型组	12	0	0	3	9	0
ACNAC低剂量组	15	0	1	9	5	0
ACNAC中剂量组	15	0	4	8	3	0
ACNAC高剂量组	15	0	6	6	3	0
NAC组	14	0	1	5	8	0
SM组	14	0	1	8	5	0

根据表2的数据, 按照刘勖^[3-5]多组等级分组资料的两两比较统计($H=37.8531$, $C=0.8853$, $H_c=42.7590$), 得出模型组与ACNAC中剂量组比较 $P<0.05$, 与ACNAC高剂量组比较 $P<0.01$, 均呈显著差异。ACNAC各剂量组之间比较差异不明显, 但ACNAC中剂量组和ACNAC高剂量组分别与NAC组比较, 肝纤维化程度呈显著差异($P<0.01$); ACNAC高剂量与SM组肝纤维化程度呈显著差异($P<0.05$)。

3.5 肝组织TGF-β₁

TGF-β₁的标准曲线为 $y=0.00127x+0.04958$, $S=0.0379$, $r=0.9981$ 。将样本所测定的数值代入上述标准曲线方程计算, 得出其测试样品的TGF-β₁数据($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 根据各份肝匀浆的匀浆组织量折算成肝内TGF-β₁的含量($\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$)。本实验中, 模型组肝纤维化大鼠TGF-β₁的表达水平明显高于正常对照组水平, 达 $(4649.14 \pm 67.33) \text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$; 肝纤维化大鼠经过ACNAC、NAC和SM治疗后, 肝组织TGF-β₁的表达明显受到抑制, 尤其是高剂

量的 ACNAC 治疗后,对 TGF- β_1 的表达抑制显著,可见 ACNAC 对肝纤维化重要指标 TGF- β_1 有明显的改善作用,且 ACNAC 中高剂量组疗效明显优于 NAC 组,结果见表 3。

表 3 肝纤维化 TGF- β_1 指标结果($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Results of TGF- β_1 in liver fibrosis($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	TGF- β_1 /pg·g ⁻¹
正常对照组	10	1 486.07±58.77
模型组	12	4 649.14±67.33 ¹⁾
ACNAC 低剂量组	15	3 633.75±89.02 ²⁾³⁾
ACNAC 中剂量组	15	3 217.21±73.68 ²⁾³⁾⁴⁾
ACNAC 高剂量组	15	2 894.52±69.34 ²⁾³⁾⁴⁾
NAC 组	14	4 116.93±56.05 ²⁾
SM 组	14	3 102.63±97.09 ²⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$;与 NAC 组比较,³⁾ $P<0.05$;与 SM 组比较,⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the NAC group, ³⁾ $P<0.05$; compared with the SM group, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

3.6 肝组织免疫组织化学

通过对各组大鼠的肝组织进行免疫组织化学检测。结果显示,与正常对照组比较,其他所有组别的大鼠组织中 TGF- β_1 、T β -R₁、SMAD2/3 均有一定面积的显著表达。其中正常对照组表达量最少,模型组表达量最大,其余各治疗组的表达量较少,其中 ACNAC 高、中、低剂量组以上指标的表达呈量效关系,ACNAC 高剂量组的 TGF- β_1 、T β -R₁、Smad2/3 的表达与各治疗组中以上指标的表达有显著差异。结果见图 4 和表 4。

表 4 肝组织免疫组织化学表达面积($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Immunohistochemical expression area of liver tissue($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	TGF- β_1 /%	T β -R ₁ /%	Smad2/3/%
正常对照组	10	2.13±0.23	1.68±0.91	2.09±0.32
模型组	12	9.97±0.57 ¹⁾	8.45±0.41 ¹⁾	8.21±0.65 ¹⁾
ACNAC 低剂量组	15	6.27±0.53 ²⁾	6.12±0.57 ²⁾	6.31±0.36 ²⁾
ACNAC 中剂量组	15	4.78±0.34 ²⁾³⁾⁴⁾	5.33±0.31 ²⁾³⁾⁴⁾	4.98±0.48 ²⁾³⁾⁴⁾
ACNAC 高剂量组	15	3.96±0.27 ²⁾³⁾⁴⁾	3.07±0.22 ²⁾³⁾⁴⁾	3.27±0.41 ²⁾³⁾⁴⁾
NAC 组	14	6.39±0.31 ²⁾	4.77±0.47 ²⁾	5.95±0.71 ²⁾
SM 组	14	6.16±0.34 ²⁾	5.98±0.67 ²⁾	6.01±0.45 ²⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较,²⁾ $P<0.05$;与 NAC 组比较,³⁾ $P<0.05$;与 SM 组比较,⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with the NAC group, ³⁾ $P<0.05$; compared with the SM group, ⁴⁾ $P<0.05$ 。

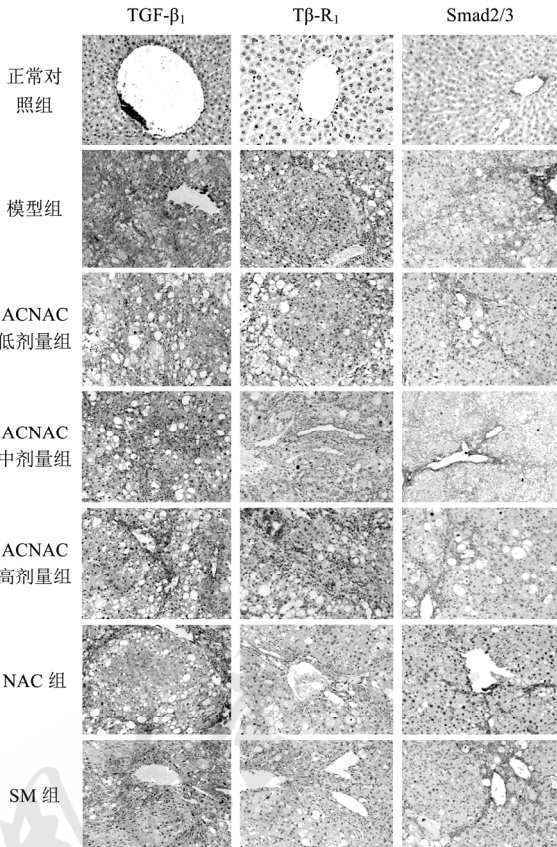


图 4 大鼠肝纤维化 TGF- β_1 、T β -R₁、Smad2/3 免疫组织化学情况(100×)

Fig. 4 Results of TGF- β_1 , T β -R₁, Smad2/3 immunohistochemistry in rat liver fibrosis tissue(100×)

4 讨论

NAC 作为谷胱甘肽的前体,具有独特的抗氧化性能,能清除体内各种自由基,调节配体依赖信号传导和细胞生长。在目前临床应用中,NAC 口服或呼吸道雾化吸入,治疗支气管炎肺结核,肺气肿等引起的痰液黏稠和咯痰;在治疗肝脏疾病,如病毒性肝病、肝纤维化,其给药途径为静脉注射。本研究中的 ACNAC 通过明胶形成的微囊和 NAC 载药活性炭,使得 NAC 通过胃肠途径口服给药,并持续进行缓慢释放,通过胃肠毛细血管吸收进入血循环,形成较稳定的血药浓度,作用于肝脏,小鼠体内药动学研究显示 NAC 能在消化道内进行缓释, $T_{1/2}$ 由 NAC 的(1.42±0.22)h 提升到(4.71±0.36)h,在体内形成较为稳定的血药浓度,减轻了 NAC 在体内的快速、广泛的代谢,提升 NAC 的药效。

有研究报道证实,在肝脏组织的肝纤维化过程中,TGF- β_1 、Smad2/3 作为肝脏中成纤维的肝星状细胞(HSC)激活的重要标志,在肝纤维化形成的过

程中会出现显著升高的现象。在此过程中, TGF- β_1 /Smads 蛋白家族三者形成了一个完整的信号通路。TGF- β_1 的分泌直接关系到 HSC 的激活和 HSC 自分泌 TGF- β_1 效应以及 Smad2、Smad3 磷酸化和 Smad 蛋白家族中的 Smad4 形成异源寡聚物, 使得 TGF- β_1 由细胞质向细胞核转移聚集、堆积。同时, 在肝纤维化形成和发展过程中, Smad2、Smad3、TGF- β_1 、T β -R $_1$ 会出现协同作用, 导致 HSC 不断激活并分泌 ECM, 使肝纤维化不断加剧^[6-8]。本研究结果显示, ACNAC 对大鼠肝纤维化有较好的治疗作用, 能抑制 HSC 形成, 减少 Smad2/3、TGF- β_1 、T β -R $_1$ 和 ECM 的分泌, 对大鼠肝纤维化胞内成纤维信号分子 TGF- β_1 /T β -R $_1$ 和 Smad2/3 有明显抑制作用, 显著改善肝组织纤维化程度, 并抑制肝纤维化引起的肝细胞炎症和坏死的出现。且较等剂量的 NAC 及对照药物水飞蓟宾有更显著的疗效, 同时也可能减轻较大剂量 NAC 在用药中因代谢中出现的不良反应。

REFERENCES

- [1] 魏琳琳, 段钟平. N-乙酰半胱氨酸药物作用机制实验研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(1): 887-889.
- [2] SEVGILER Y, PINER P, DURMAZ H, et al. Effects of N-acetylcysteine on oxidative responses in the liver of fenthion exposed *Cyprinus carpio* [J]. Pest BiochemPhysiol, 2007(87): 248-254.
- [3] 刘勖, 李晓茹. 常用的等级分组资料假设检验方法之一: Ridit 分析[J]. 临床荟萃, 1996, 11(20): 958-960.
- [4] 刘勖, 陈立丰. 常用的等级分组资料检验方法之二: 秩和检验[J]. 临床荟萃, 1996, 11(22): 1054-1055.
- [5] 刘勖. 常用等级分组资料假设检验方法之三: Cpd 分析[J]. 临床荟萃, 1996, 11(24): 1151-1152.
- [6] ZHUANG R X, WANG F G, ZHOU H P, et al. Role of N-acetylcysteine and magnesium on liver fibrosis [J]. Chin J Hepatol(中华肝脏病杂志), 2012, 20(7): 549-550.
- [7] ZHANG S P, HE Y, XU T, et al. Regulatory effects of total triterpenoid of *Prunella vulgaris* L. on activities of ERK and TGF- β_1 /Smad signaling pathway in protecting hepatic fibrosis in rats [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2015, 31(2): 261-266.
- [8] LIU X, HU H, YIN J Q. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis [J]. Liver Int, 2006, 26(1): 8-22.

收稿日期: 2016-03-22

补阳还五汤联合依达拉奉对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

钟芳芳, 吴承龙, 孙新芳, 王赵伟(绍兴市人民医院神经内科, 浙江 绍兴 312000)

摘要: 目的 研究补阳还五汤联合依达拉奉对小鼠脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响。方法 60 只小鼠随机分为假手术组(Sham), 模型组(I/R), 补阳还五汤组(BYHWD), 依达拉奉组(ED), 补阳还五汤+依达拉奉组(BYHWD+ED), 每组再分 2 个亚组: 1 d 组和 7 d 组。采用改良线栓法制作小鼠大脑中动脉缺血再灌注模型, 分别给药。TUNEL 法观察神经细胞凋亡率; 进一步 Western blot 检测大脑皮质缺血区 bcl-2 和 bax 的蛋白的定量表达。结果 BYHWD+ED 组较其他组能更明显地降低神经细胞凋亡指数($P<0.01$), 且较其他组可更明显地升高凋亡相关蛋白 bcl-2 的表达和下调 bax 的表达($P<0.05$)。结论 补阳还五汤与依达拉奉联用能降低脑缺血再灌注损伤后小鼠脑组织细胞中促凋亡蛋白 bax 的表达, 增加具有神经元保护作用的抑凋亡蛋白 bcl-2 的表达, 从而抑制神经细胞凋亡, 加速神经功能的恢复, 协同发挥脑保护作用。

关键词: 补阳还五汤; 依达拉奉; 脑缺血再灌注; 细胞凋亡; bcl-2/bax

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)11-1392-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.009

Effects of Buyang Huanwu Decoction Combined with Edaravone on the Apoptosis of Neuron and Expression of Bcl-2 and Bax Following Cerebral Ischemia-reperfusion in Mice

ZHONG Fangfang, WU Chenglong, SUN Xinfang, WANG Zhaowei(Department of Neurology, Shaoxing People's

基金项目: 浙江省绍兴市公益性技术应用研究计划项目(2013B70076)

作者简介: 钟芳芳, 女, 硕士, 副主任医师 Tel: 13867536519 E-mail: yangmum@126.com