

叶下珠抗肝纤维化机制的作用研究进展*

★ 杨浩然** 沈志强*** (昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室 昆明 650500)

摘要: 叶下珠是分布于我国南方地区广泛应用于临床的一种传统中草药,近年来国内外对叶下珠及其复方制剂抗肝纤维化作用实验研究有较多报道。肝纤维化是肝硬化的前期阶段,肝硬化是不可逆转的严重的肝脏病变,但现代研究说明肝纤维化也是可以逆转的。本文就叶下珠及其复方制剂抗肝纤维化的作用机制文献进行整理和分类,为相关研究提供借鉴。

关键词: 抗肝纤维化; 叶下珠; 作用机制

中图分类号: R285 文献标识码: A

The Study Progress of *Phyllanthus Urinaria* Anti-hepatic Fibrosis

YANG Hao-ran, SHEN Zhi-qiang

College of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.

Abstract: *Phyllanthus urinaria* is a kind of traditional Chinese medicine in China, widely distributed in southern China. In recent years at home and abroad, *Phyllanthus urinaria* and its compound preparation of anti liver fibrosis experimental research were reported. Liver fibrosis is the early stage of cirrhosis, which is a serious and irreversible disease of the liver, but modern studies have shown that liver fibrosis is reversible. The mechanism of the *Phyllanthus urinaria* and its compound anti hepatic fibrosis by sorting and classification can provide the reference for the related research.

Key words: Anti Hepatic Fibrosis; *Phyllanthus Urinaria*; Mechanism of Action

肝纤维化是肝脏对各类慢性刺激损伤进行修复的反应,其表现为肝细胞外基质的过多沉积。肝纤维化是肝硬化的前期过程^[1],如果纤维化形成的原因被削弱或消除,肝纤维化是可以逆转的^[2],这为延缓/阻止肝硬化形成具有重要意义。最近研究发现,中药在治疗肝纤维化和肝硬化等疾病具有独特的优势,许多中药已经广泛地应用于临床,并取得了一些较好的疗效^[3]。

叶下珠是大戟科叶下珠属的植物,广泛散布于南北回归线之间的热带和亚热带地区^[4],在我国长江以南地区广为分布。叶下珠常用于治疗痢疾泄泻、黄疸淋病、目赤痞积、肾炎和肝炎等疾病^[5-6]。

印度研究者首次发现叶下珠可促使患者的乙肝表面抗原(HBsAg)转阴,并且转阴率达到50%及以上。因此,叶下珠的相关研究逐渐深入,许多国内外研究学者逐步发现其具有预防抗癌、延缓肝损伤、抑制病毒等药理作用^[7]。

1 叶下珠抗肝纤维化的机制

1.1 保肝降酶 丙氨酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸转氨酶(AST)是肝病患者实验室检查的重要标志物,与肝脏细胞坏死变性程度相关。AST分布于肝细胞的线粒体和细胞质中,ALT只分布于细胞的细胞质中,当肝细胞损伤、坏死时转氨酶ALT、AST水平显著增高^[8],所以在肝炎状态下,由于氧化应激

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(8156130093)。

** 第一作者: 杨浩然(1991),男,在读硕士。研究方向: 中药。E-mail: 89797221@qq.com。

*** 通信作者: 沈志强(1965),男,教授,博士生导师。研究方向: 心脑血管药理。E-mail: 704896604@qq.com。

和组织损伤,血清中AST、ALT活性明显升高。超氧化物歧化酶(SOD)是一种抗氧化酶,有消除自由基、保护细胞结构的作用,自由基的清除与SOD的活性相关密切^[9]。范适等^[10]通过动物试验结果表明,叶下珠有效部位提取物对化学因素CCL₄引起的大鼠肝细胞破坏具有保护作用,肝功能检测发现血清中的AST、ALT浓度显著下降,肝组织的SOD水平提高,减轻肝脏病变,预防肝纤维化。

1.2 抑制脂质过氧化损伤和清除自由基 丙二醛(MDA)是脂质过氧化代谢的副产物,可以反映体内活性氧化物(ROS)程度,从而表现机体受过氧化损伤状况。谷胱甘肽(GSH)与超氧化物歧化酶(SOD)为机体抗过氧损伤的重要物质,其GSH可直接还原过氧化氢或还原过氧化脂质还原为醇类物质^[11],GSH在有过氧化应激时水平减少。SOD是一种抗氧化酶,有消除自由基、保护细胞结构的作用,自由基的清除与SOD的活性相关密切^[9]。SOD可将活性较大的过氧化物质催化为过氧化氢而被机体清除^[12]。陈斯泰等^[13]通过实验研究结果显示,相较模型对照组,叶下珠复方各剂量组对CCL₄引起的肝组织GSH,SOD,MDA水平改变有恢复作用,相较低、中剂量组,高剂量组肝组织病理损伤均有减轻,高、中剂量组损伤减轻明显,说明叶下珠复方II号颗粒对CCL₄造成的急性肝损伤的保护作用机制可能与改善脂质过氧化损伤有关。

1.3 下调信号通路TGF- β 1 转化生长因子- β 1(TGF- β 1)是一种多功能的细胞生长因子,在细胞外基质合成、免疫抑制、损伤修复和组织纤维化中起着重要作用^[14]。目前学者们较为普遍的共识是TGF- β 1是最强的肝纤维化促进因子,它既可以抑制肝细胞、促进细胞外基质(ECM)的生物合成,又可以诱导肝细胞的凋亡,是肝星状细胞(HSC)活化向肌成纤维样细胞(MFB)转化的最重要的促进剂^[15]。其中TGF- β I型受体激活素受体样激酶5(ALK-5)是一种特异性因子,主要与TGF- β 结合,它能够活化TGF- β 并磷酸化信号传导蛋白Smad2和Smad3^[16],磷酸化的Smad2和Smad3与Smad4形成异源复合体,随即转入细胞核内,这又导致了許多靶蛋白质如胶原的转录,从而引起纤维化的发生^[17]。Rajesh Krithika等^[18]的研究发现叶下珠中叶下珠脂素对其TGF- β 1/Smad介导信号通路有下调作用,通过分子对接试验表明叶下珠脂素对TGF- β I型受体有抑制作用。此外在体内的研究结果确定叶下珠素就抑制ALK-5与Smad2、3的结合可将TGF- β 信号向细胞核的传导通路阻断。

转录因子Kruppel Like Factor 6(KLF6)在锌指蛋白家族中广泛表达的一种核转录因子,是二十世纪末美国一个研究小组利用消减杂交技术从大鼠HSC克隆并激活的诱导基因^[19]。在大鼠实验的发现激活态的HSC中miR-122等基因有表达^[20],而在小鼠miR-122基因敲出模型中在发现了KLF6和TGF- β 1,miR-122表达增加时,KLF6 mRNA和TGF- β 1mRNA的表达增加时出现了纤维化过程^[21]。罗来育等^[22]研究结果表明:叶下珠复方II号对HSC-T6细胞的增殖抑制作用表现出明显的量效关系,且叶下珠复方II号低剂量组和高剂量组均可降低miR-122的表达,高剂量组作用更加显著。从而保护和逆转肝的纤维化程度。

1.4 抑制肝星状细胞(HSC-T6)增殖和胶原合成 有许多文献都说明,HSC的增殖是肝纤维化的关键环节。因此,抑制HSC细胞的激活,减少其增殖与活化是治疗HF非常有效的作用靶点^[23]。赵敏等^[24]实验研究通过在体外培养的HSC-T6细胞通过叶下珠复方II号药物处理后细胞的增殖受到了明显的抑制且浓度越高抑制越明显,并且该药物可以显著抑制I型胶原蛋白表达从而抑制I型胶原合成,起到抗肝纤维化的作用。

1.5 促进HSC凋亡 许多研究表明:肝纤维化消退的主要机制就是活化的HSC通过凋亡途径消除^[25]。调节肝细胞发生凋亡的重要蛋白为Bcl-2家族,Bcl-2作为Bcl-2家族中抗凋亡的代表蛋白,是细胞凋亡途径中重要的调控因子^[26-27],又有研究发现miR-16参与HSC活化过程中的凋亡调控机制^[28]。夏曦等^[29]实验研究表明叶下珠复方II号能够明显抑制HSC-T6细胞的增殖,而且高、中、低各剂量组miR-16的表达提高、Bcl-2 mRNA的蛋白表达明显下降从而诱导其HSC-T6细胞凋亡达到抗纤维化的作用。

1.6 促肝组织内细胞外基质(ECM)降解作用 大量的研究说明肝纤维化发生过程是动态的,其发生的病理基础是因为ECM的合成与降解二者的失衡^[30],而维持二者平衡的主要因子是基质金属蛋白酶(MMPs)和组织金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)^[31]。与肝纤维化密切相关的因子有MMP-1(大鼠为MMP-13)、MMP-2、MMP-9等。MMP-2、MMP-9降解正常肝窦内皮细胞下基底膜中IV型胶原,改变肝细胞内环境,并激活HSC和肝巨噬细胞(即Kupffer细胞),使其分泌大量的TIMPs、MMP-2及I、III型胶原,I型胶原降解主要由MMP-13来完成。TIMP-1的表达增强而MMP-13的活性受到

抑制,降低了 MMP-13 对 I 型胶原的降解作用,从而导致肝纤维化^[32]。盛扬等^[33]对叶下珠复方 II 号抗肝纤维化进行了研究,结果表明该复方制剂各剂量组药物均可直接抑制 TIMP-1,促进 ECM 降解,抑制 HSC-T6 细胞的增殖,从而发挥抗纤维化作用。

1.7 抗病毒作用 全世界存在着几亿乙肝病毒(HBV)的携带者,HBV 的携带者发生肝硬化和肝癌的几率远高于非乙型肝炎病毒(HBV)感染者,而肝纤维化又是肝硬化和肝癌发生的先导病理变化,所以抗病毒治疗是可以治疗 HBV 感染引起的肝纤维化。李彩东等^[34]对云南产苦味叶下珠对抗 HBV 的实验研究,实验结果说明它具有抗 DHBV 作用,可以在体外清除病毒感染,减轻肝损伤。鲁玉辉等^[35]使用叶下珠的复方作用于 HePG2. 2.15 细胞,结果显示在 HePG2. 2.15 细胞中 HBV-DNA 含量随药物浓度升高而下降,说明叶下珠复方可用于抗 HBV 的防治。叶下珠治疗慢性乙型肝炎其机制除直接抗病毒外,还可能参与免疫调节,协同发挥抗病毒作用,减轻肝细胞病变,预防和延缓 HBV 肝炎患者向肝纤维化发展^[36]。

2 叶下珠抗肝纤维化的中医机制

在传统中医中没有“肝纤维化”这一病症,但根据研究发现此病与中医中的“癥积”“膨胀”“胁痛”等病症相近。传统中医理论认为肝藏血,主疏泄,肝受邪必将导致血运异常,血滞经脉,成为瘀血形成的生理基础。根据中医肝肾同源理论,肝病日久累及肾脏。肝纤维化以湿热多见,热毒易损伤阴液,患者也多见肾阴亏损。中医治疗肝纤维化在治疗上除了健脾燥湿、化痰通络外,滋补肝肾之阴也很重要。湿热毒邪是导致肝纤维化的重要原因之一,肝纤维化患者常兼有湿热毒邪未尽,因此在活血化瘀的同时,常配以清热解毒之法。肝纤维化发病机制为毒邪内侵,肝络阻滞,毒滞经络,日久化热,灼津成痰,加之毒邪留恋,蕴于脾胃,水湿不化,而致痰瘀互结,最终导致肝纤维化。因此肝纤维化的中医治疗常以活血、益气、滋阴、清热解毒、化痰为要旨。

孟月珍^[37]以临床经验总结:肝纤维化是因为湿热毒邪停滞于肝脏,阻止了肝脏的疏泄,人体气机紊乱,致使肝脏气血失调而得病。叶永安^[38]的观点认为肝纤维化的病机是“脾虚湿毒”。虽然中医学界对肝纤维化病因病机的观点各有不同,但治疗方法通常以扶正祛邪、理气活血及清热解毒为原则。叶下珠微苦性凉,入肝、脾、肾三经;主治功能:平肝清热、解毒消肿,治痢疾,肝炎等疾病^[39]。黄远媛^[40]

运用叶下珠汤临床研究表明:叶下珠汤具有清热平肝、疏肝清淤、益气消癥,具有较好的改善肝脏功能,可防止和延缓,甚至逆转乙肝患者向肝纤维化发展。

综上所述,叶下珠在抗肝纤维化上的研究取得了很大的进展,研究其药物抗肝纤维化的机制可以为其临床上预防肝损伤/肝纤维化方面提供理论基础。虽然在非临床实验中叶下珠及其复方具备抗肝纤维化能力,且叶下珠在预防和阻止肝纤维化发生可能与抗脂质过氧化损伤、清除体内自由基,抑制肝星状细胞活化和增殖、促进 HSC 凋亡,下调信号通路 TGF- β 1 和抑制 TIMP-1 mRNA 的表达等方面有关。而中医学家临床研究认为叶下珠抗肝纤维化作用可能与其清热解毒,利胆祛湿功作用相关。但叶下珠抑制肝纤维化的机制远非这样简单,其作用机制研究尚不明确。所以叶下珠抗肝纤维化的机制需要更进一步研究,为临床研究提供药理学依据。

参考文献

- [1] 夏超,王佳佳,李芳群,等. 美洲大蠊水提取物对免疫性肝纤维化大鼠的保护作用[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(2): 199-204.
- [2] Hansen T, Christensen E. Cirrhosis and liver fibrosis are potentially reversible[J]. Ugeskrift for Laeger, 2015, 177(48): V06 150-527.
- [3] 赵嗣霞,张如松,杨苏蓓,积雪草苷抗大鼠免疫性肝纤维化作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 666-670.
- [4] Sekaran SD, Tang YQ, Lee SH. Phyllanthus spalocal plant with multiple medicinal properties[J]. Journal of Health and Translational Medicine, 2014, 17(2): 1-8.
- [5] 戴卫波,肖文娟. 叶下珠药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 498-500.
- [6] 杨孟妮,张慧,刘娟,等. 叶下珠化学成分研究[J]. 中草药, 2016, 47(20): 3 573-3 577.
- [7] 程艳刚,裴妙荣,孔祥鹏,等. 叶下珠化学成分和药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(4): 238-242.
- [8] Girish C, Pradhan SC. Hepatoprotective activities of picroliv, curcumin, and ellagic acid compared to silymarin on carbon-tetrachloride-induced liver toxicity in mice[J]. Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics, 2012, 3(2): 149-155.
- [9] 尹连红,于浩,彭金咏. 四氯化碳诱导肝损伤的分子机制及中药干预的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(9): 1 147-1 155.
- [10] 范适,左家喙,饶力群. 叶下珠提取物对 CCl₄ 致小鼠化学性肝损伤保护作用[J]. 江苏建筑职业技术学院学报, 2016, 16(3): 27-31.
- [11] Elliott SJ, Koliwad SK. Redox control of ion channel activity in vascular endothelial cells by glutathione[J]. Microcirculation, 1997, 4(3): 341-347.
- [12] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84.

- [13]陈斯泰,何素,李常青. 叶下珠复方Ⅱ号对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国热带医学, 2016, 16(8): 766-769.
- [14]Kitaura Y, Chikazawa N, Tasaka T, et al. Transforming growth factor β 1 contributes to the invasiveness of pancreatic ductal adenocarcinoma cells through the regulation of CD24 expression. *Pancreas*. 2011, 40(7): 1034-1042.
- [15]Valcourt U, Carthy J, Okita Y, et al. Analysis of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor β [J]. *Methods Mol Biol* 2016(1344): 147-181.
- [16]Gauldie J, Bonniaud P, Sime P, et al. TGF- β , Smad3 and the process of progressive fibrosis, *Biochem Soc Trans* [J]. 2007, 35(4): 661-664.
- [17]Gouville ACD, Boullay V, Krysa G, et al. Inhibition of TGF- β signaling by an ALK5 inhibitor protects rats from dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 145(2): 166-177.
- [18]Krithika R, Jyothilakshmi V, Prashantha K, et al. Mechanism of protective effect of phyllanthin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and experimental liver fibrosis in mice [J]. *Toxicology Mechanisms & Methods*, 2015, 25(9): 1-10.
- [19]Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis [J]. *Journal of Hepatology*, 1998, 29(5): 836.
- [20]Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis [J]. *J Clin Invest* 2012, 122(8): 2884-2897.
- [21] Vincent R, Sanyal A. Recent Advances in Understanding of NASH: MicroRNAs as Both Biochemical Markers and Players [J]. *Current Pathobiology Reports*, 2014, 2(3): 109-116.
- [22]罗来育,李常青,李小翥,等. 叶下珠复方Ⅱ号对肝星状细胞增殖和 miR-122/KLF6 表达的影响[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(1): 8-12.
- [23]时博,史晶晶,秦华珍. 郁金含药血清对 HSC-T6 细胞增殖抑制作用的影响[J]. 中医学报, 2017, 32(5): 789-792.
- [24]赵敏,李常青,赵舫,等. 叶下珠复方Ⅱ号对肝星状细胞 TGF- β 1 及 I 型胶原的影响[J]. 中国热带医学, 2012, 12(5): 538-541.
- [25]杨新疆,齐翠花,郑勇,等. SB203580 对肝纤维化大鼠肝脏 I、III 型胶原蛋白表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(3): 310-318.
- [26]古晓娜,刘占旗,战景明,等. MAPKs 在 Bel-2 家族调控细胞凋亡中的作用[J]. 环境卫生学杂志, 2008, 35(2): 65-69.
- [27]Yu FX, Teng YY, Zhu QD, et al. Inhibitory effects of capsaicin on hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. *Biochem Cell Biol*, 2014, 92(5): 406-412.
- [28]Guo CJ, Pan Q, Li DG, et al. miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: An essential role for apoptosis [J]. *Journal of Hepatology*, 2009, 50(4): 766-778.
- [29]夏曦,赵敏,李常青,等. 叶下珠复方Ⅱ号对肝星状细胞凋亡和 miR-16/Bcl-2 表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(5): 86-92.
- [30]Duval F, Morenocuevas JE, Maldonadobernal C, et al. Liver Fibrosis and Mechanisms of the Protective Action of Medicinal Plants Targeting Inflammation and the Immune Response [J]. *International Journal of Inflammation*, 2015(4): 943-957.
- [31]孙华丽,张建军. 组织金属蛋白酶及其抑制因子与肝纤维化[J]. 西南军医, 2010, 12(1): 81-83.
- [32]钱鹏,陈剑群. 青蒿琥酯抗肝纤维化作用机制的研究进展[J]. 重庆医学, 2017, 46(2): 269-271.
- [33]盛扬,李常青,刘妮,等. 叶下珠复方Ⅱ号对 HSC-T6 增殖及 TIMP-1 mRNA 表达的影响[J]. 中国热带医学, 2008, 8(2): 204-205.
- [34]李彩东,梁云,吴斌,等. 复方苦味叶下珠胶囊对实验性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(2): 53-54.
- [35]鲁玉辉,符林春. 叶下珠复方在体外细胞培养中抗 HBV 活性的研究[J]. 中国热带医学, 2007, 7(2): 196-197.
- [36]蒋菁蓉,张天洪,钟森. 叶下珠治疗慢性乙型肝炎研究概况[J]. 实用中医内科杂志, 2013(4): 151-154.
- [37]孟月珍,陈宝明. 略论刘渡舟教授治疗肝病特色[J]. 山西中医学院学报, 2002, 3(3): 29-30.
- [38]叶永安. 慢性乙型肝炎的中西医结合治疗[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(1): 8-9.
- [39]黄桥华,郭晓静,刘小云. 叶下珠抑制人肾癌 786-0 细胞增殖作用的研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(11): 145-146.
- [40]黄远媛. 叶下珠汤治疗乙肝肝纤维化 50 例临床观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2003, 10(9): 55-56.

(收稿日期: 2018-02-10) 编辑: 翟兴英