

论文题目

Title in English

姓 名: _____

学 号: _____

班 级: _____

指导教师姓名: _____

指导教师职称: _____

类 别: _____ 继续教育

年 月 日

填规范的班级名称
如: 2021 中药学高起本 1
班或 2023 中药学专升本
1 班
全部居中

目录

摘 要	I
ABSTRACT	II
中英文缩略语对照表	III
1 引言	1
2 实验材料及仪器	2
2.1 实验动物	2
2.2 药物与主要试剂	2
2.3 主要仪器	2
3 实验方法与结果	3
3.1 实验方法	3
3.1.1 动物分组及模型制备	3
3.1.2 XXXXXXXX 含量测定	3
3.1.3 XXXXXXXXXXXX 观察	3
3.1.4 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 蛋白的表达	3
3.1.5 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 表达	3
3.1.6 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 表达	3
3.1.7 统计学方法	4
3.2 实验结果	4
3.2.1 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 的影响	4
3.2.2 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 病理学的影响	4
3.2.3 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 的影响	5
3.2.4 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 的影响	5
3.2.5 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 的影响	5
4 分析与讨论	6

5 全文小结及展望	7
参考文献	8
附录	9
致谢	10

摘 要

目的: 探讨小柴胡汤 (XCHD) 对四氯化碳 (CCl_4) 诱发的肝纤维化 (HF) 小鼠的保护作用。

方法: 采用持续 12 周, 2 次/周, 20% CCl_4 小鼠背部皮下注射的方法, 复制 HF 小鼠模型。造模首日起, 每天 1 次, 持续 12 周, 灌胃给予 3.90、7.80、15.60 g/kg XCHD 和 0.1 g/kg 水飞蓟宾。实验结束后, 处置小鼠, 检测血清中 ALT、AST 含量; HE、Masson、天狼猩红染色以及透射电镜观察肝脏病理组织学损伤情况, 并进行 HF 分级评分; 免疫荧光、RT-qPCR 和免疫印迹技术检测肝组织中 α -肌动蛋白 (α -SMA) 和 I 型胶原 (Collagen I) 水平。

结果: XCHD (7.80、15.60 g/kg) 组不仅可明显降低血清中 ALT、AST 水平 ($p < 0.05$), 减轻肝脏病理学损伤程度, 减少胶原纤维沉积, 还可显著抑制 α -SMA、Collagen I mRNA 和蛋白表达水平($p < 0.05$)。

结论: XCHD 对化学性 HF 小鼠具有很好的保护作用。

关键词: 小柴胡汤; 肝纤维化; 四氯化碳; 小鼠

Abstract

Objective: To observe the protective effects of Xiaochaihu Decoction (XCHD) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis (HF) in mice.

Methods: HF was induced in male mice by 20% CCl₄ twice a week for 12 weeks. XCHD (3.90, 7.80, 15.60 g/kg) and Silybin (0.1 g/kg) were administrated via gavage once a day starting from the CCl₄ treatment for subsequent 12 weeks. Then, the levels ALT and AST in serum were assayed, liver samples were taken to examine the degree of HF by HE, Masson, Sirius Red staining and Electron microscope. Moreover, the protein and mRNA expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA) and Collagen I were determined by RT-qPCR, immunofluorescence and Western blot.

Results: The data demonstrated that XCHD (7.80, 15.60 g/kg) effectively reduced histopathological changes, such as steatosis, collagen deposition, meanwhile the histopathological analysis suggested that XCHD obviously alleviated the degree of HF. Furthermore, XCHD significantly reduced the levels of ALT, AST ($p < 0.05$), and attenuated the expressions of α -SMA, Collagen I both of protein and mRNA levels ($p < 0.05$).

Conclusion: XCHD has protective effect on chemical HF in mice.

Key words: Xiaochaihu Decoction, Hepatic fibrosis, Carbon tetrachloride, Mice

中英文缩略语对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
HF	Hepatic fibrosis	肝纤维化

1 引言

肝纤维化 (Hepatic fibrosis, HF) 以细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 过度沉积为其主要病理学特征, 肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 活化为其核心事件, 是一切慢性肝病转变为肝硬化, 甚至肝癌的共同阶段, 已成为严重危害人类健康的世界性问题^[1-3]。小柴胡汤 (Xiaochaihu Decoction, XCHD) 源于《伤寒论》, 是和解少阳的经典方剂, 广泛应用于临床^[4, 5]。方中重用柴胡, 芳香疏泄, 润畅气机, 祛散少阳之邪;切中肝纤维化中医“肝失疏泄, 气机郁滞, 肝郁克脾, 脾失健运”之病机, 治疗肝纤维化疗效确切^[6-8]。然而, 目前关于小柴胡汤对化学性肝纤维化小鼠防治作用的文献鲜有报道。因此, 本研究通过复制四氯化碳 (Carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导的化学性 HF 小鼠模型, 观察小柴胡汤对其的保护作用, 以期小柴胡汤进一步开发提供药理学实验依据。

2 实验材料及仪器

2.1 实验动物

昆明种、SPF 级、雄性小鼠，体质量 (20 ± 2) g，济南朋悦实验动物繁育有限公司，许可证号：SCXK(鲁)2019-003。小鼠饲养于 $22 \sim 26^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 40%~60%环境中，自由摄食、饮水。

2.2 药物与主要试剂

XCHD：柴胡（陕西）、黄芩（内蒙古）、人参（吉林）、半夏（甘肃）、炙甘草（甘肃）、生姜（云南）、大枣（山东）购自.....医院中草药房，按照处方称量药材，参照文献^[9]优选方法制备而成；水飞蓟宾；.....制药有限公司，批号：850.....；AST、ALT 试剂盒：.....生物工程研究所，批号：20191023、20191025；Trizol 试剂盒；美国 Life.....公司，批号：20443；PrimeScript TM RT 试剂盒：日本.....公司，批号：AJ51485A； α -肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原 (Collagen I) 抗体：英国.....公司，批号：GR3252482-9、GR3192783。

2.3 主要仪器

BioTek Epoch 2 型多功能酶标仪，美国 BioTek 公司；K960 型 PCR 仪，杭州晶格科学仪器有限公司；PIKOREAL 96 型荧光定量 PCR 仪，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；Chem-Studio 515 型化学发光仪：德国 analytikjena 公司。

3 实验方法与结果

3.1 实验方法

3.1.1 动物分组及模型制备

适应性饲养后,小鼠随机分为正常组、模型组、XCHD (3.90、7.80、15.60 g/kg) 组和水飞蓟宾 (0.10 g/kg) 组, 10 只/组。参考文献^[10]方法, 持续 12 周, 2 次/周, 20% CCl₄ 小鼠背部皮下注射, 诱导 HF 小鼠模型。于造模第一天, 每天按 3.90、7.80、15.60 g/kg 灌胃给予 XCHD 和水飞蓟宾, 持续 12 周。

3.1.2 血清中 ALT、AST 含量测定

摘眼球法取血, 静置, 分离血清, 检测 ALT、AST 含量。

3.1.3 肝脏病理组织学观察

颈椎脱臼处死小鼠, 分离肝脏, 取相同部位肝组织, 甲醛固定, HE 染色观察其损伤程度; Masson 和天狼猩红染色观察其胶原纤维沉积情况, 并按照文献^[11]方法, 对 HF 程度进行评分; 透射电镜观察肝组织超微结构。

3.1.4的表达

石蜡切片脱蜡水化、抗原修复、BSA 封闭、加 α -SMA (1:200)、Collagen I (1:2000) 一抗、加荧光二抗、DAPI 复染、封片、观察并拍照。

3.1.5表达

....

3.1.6表达

.....

3.1.7 统计学方法

SPSS 19.0 软件处理数据，计量数据采用单因素方差分析进行多组间比较，并用 LSD 进行两两比较，结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示；等级资料采用 Ridit 分析， $p < 0.05$ 为有统计学意义。

3.2 实验结果

3.2.1 XCHD 对 HF 小鼠血清 ALT、AST 的影响

相比于正常组，ALT、AST 水平在 HF 小鼠血清中明显升高 ($p < 0.01$)；XCHD (7.80、15.60 g/kg) 和水飞蓟宾连续给药 12 周后，其 ALT、AST 含量显著下降 ($p < 0.05$)；XCHD (3.90 g/kg) 组 ALT、AST 含量虽有所减少，但不具有统计学意义。结果如 Tab.3.2 所示。

表 3.2 小柴胡汤对肝纤维化小鼠血清 ALT、AST 的影响

Tab.3.2 Effects of Xiaochaihu Decoction on serum ALT and AST in hepatic fibrosis mice
($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose (g/kg)	n	ALT (U/L)	AST (U/L)
Control	—	10	43 $\pm$ 9	51 $\pm$ 10
Model	—	10	88 $\pm$ 21 ^c	109 $\pm$ 16 ^c
XCHD	3.90	10	76 $\pm$ 12	99 $\pm$ 17
XCHD	7.80	10	72 $\pm$ 14 ^e	93 $\pm$ 17 ^e
XCHD	15.60	10	70 $\pm$ 12 ^f	87 $\pm$ 15 ^f
Silybin	0.10	10	65 $\pm$ 15 ^f	89 $\pm$ 15 ^f

XCHD: Xiaochaihu Decoction; ^c $P < 0.01$, compared with control group; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$, compared with model group.

3.2.2影响

.....

3.2.3影响

.....

3.2.4 XCHD 对 HF 小鼠肝组织超微结构的影响

.....

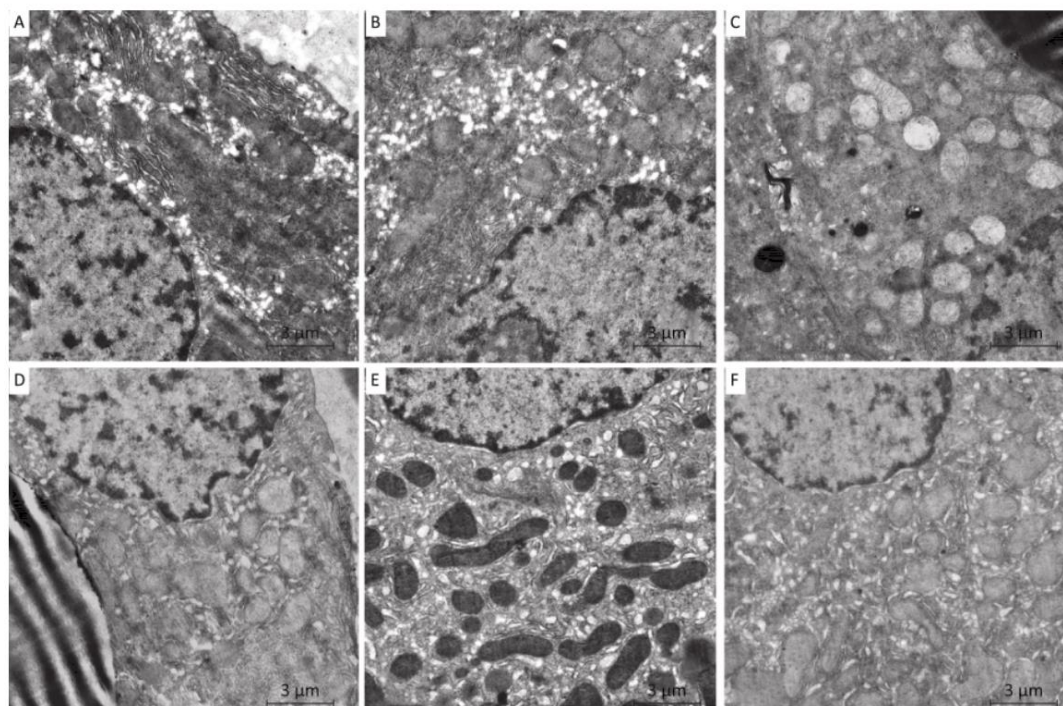


Fig.3.4 Effects of Xiaochaihu Decoction on ultrastructure of liver tissues in hepatic fibrosis mice
XCHD: Xiaochaihu Decoction; A: Control group; B: Model group; C: XCHD (3.90 g/kg) group;
D: XCHD (7.80 g/kg) group; E: XCHD (15.60 g/kg) group; F: Silybin (0.10 g/kg) group.

图 3.4 小柴胡汤对肝纤维化小鼠肝脏组织超微结构的影响

XCHD: 小柴胡汤; A: 正常对照组; B: 模型组; C: XCHD (3.90 g/kg) group; D: XCHD (7.80 g/kg) group; E: XCHD (15.60 g/kg) group; F: 水飞蓟宾 (0.10 g/kg) group。

3.2.5影响

.....

4 分析与讨论

HF 是不同损伤因素引起肝脏急、慢性损伤后向肝硬化、肝癌发展的重要环节，具有一定的可逆性，受到学者的普遍关注。CCl₄ 皮下注射是诱导化学性 HF 动物模型的经典方法之一，具有与人类 HF 相似的病理特征、成模率较高、操作简单等优势，广泛应用于 HF 发病机制与药物筛选相关研究^[12-14]。病理组织学检查是评判模型成功与否以及药物防治效果的金标准^[15]。本研究借助不同病理染色方法以及透射电镜发现，.....提示 XCHD 对 HF 具有很好的保护作用。研究表明，HF 发生时，多伴有肝功能损伤^[16]。

正常情况下，作为临床评判肝功能的重要指标 ALT、AST 储存于肝细胞内；当肝脏受到物理、化学、病毒等因素损伤刺激后，肝细胞遭到破坏，ALT、AST 释放入血，其血清水平显著增加。本研究发现，连续给药 12 周后，.....，改善其肝功能。

ECM 主要由胶原纤维尤其是 Collagen I 组成，其过度沉积为 HF 的主要病理学特征。HSCs 作为 ECM 的主要来源细胞，其过度激活是 HF 形成的细胞学基础。正常情况下，.....，在多种损伤因素作用下.....。因此， α -SMA 阳性可作为 HSCs 活化的相对特异性标志。本研究表明，经药物干预后，.....

5 全文小结及展望

XCHD 对化学性 HF 小鼠具有一定的保护作用，其具体作用机制尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Bataller, R. and D.A. Brenner. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, **115**(2):209-18.
- [2] Balsano, C., A. Alisi, and V. Nobili. Liver fibrosis and therapeutic strategies: the goal for improving metabolism[J]. Curr Drug Targets, 2009, **10**(6):505-12.
- [3] Koyama, Y., et al. New Developments on the Treatment of Liver Fibrosis[J]. Dig Dis, 2016, **34**(5):589-96.
- [4] Czaja, A.J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2014, **20**(10):2515-32.
- [5] Cusi, K., et al. Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial[J]. Annals of Internal Medicine, 2016, **165**(5):305.
- [6] Tacke, F. and C. Trautwein. Mechanisms of liver fibrosis resolution[J]. Journal of Hepatology, 2015, **63**(4):1038-1039.
- [7] Rosenbloom, J., F.A. Mendoza, and S.A. Jimenez. Strategies for anti-fibrotic therapies[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, **1832**(7):1088-103.
- [8] Zhao, C.Q., et al. Traditional Chinese medicine for treatment of liver diseases: progress, challenges and opportunities[J]. J Integr Med, 2014, **12**(5):401-8.
- [9] Li, X.M., et al. Chinese medicine CGA formula ameliorates DMN-induced liver fibrosis in rats via inhibiting MMP2/9, TIMP1/2 and the TGF-beta/Smad signaling pathways[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, **37**(6):783-93.
- [10] Choi, J.H., et al. Platycodi Radix attenuates dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes[J]. Food & Chemical Toxicology, 2013, **56**(2):231-239.
- [11]

附录

如无附录，此部分可不要。

致谢

在上海中医药大学学习的四年时间，给我留下了深刻的印象。我得到了许多老师和同学们的帮助和支持，值此论文完成之际，特向他们表示由衷的感谢。

此部分可自由发挥