

·药效与毒理学研究·

扶脾柔肝方对肝纤维化大鼠转化生长因子- $\beta 1$ /Smad 信号通路的影响

安祯祥, 何远利, 王 敏, 黄 丹, 陈昱江(贵阳中医学院第一附属医院, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 目的 探讨扶脾柔肝方对肝纤维化(HF)大鼠转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)/Smad 信号通路的干预作用。方法 SD 大鼠随机分为 7 组, 正常组、模型组、秋水仙碱组($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、扶正化瘀组($0.415 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、扶脾柔肝方低、中、高剂量组($20, 40, 80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。采用大鼠背部皮下注射(sc)50%四氯化碳和灌胃(ig)乙醇诱导 HF, 造模 10 周, 成功建立大鼠 HF, 其后给予相应药物 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每日 1 次, 连续 4 周, 正常组、模型组给予生理盐水。检测大鼠血清 TGF- $\beta 1$; HE 染色和 Masson 染色观察肝组织病理学变化; 免疫组化法检测肝组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达; 同时, 采用荧光定量 PCR 方法及免疫印迹法(Western blot)检测肝组织中 TGF- $\beta 1$ 、Smad3、Smad4、Smad7 mRNA 及蛋白的表达。结果 模型组的 HF 程度较其余组明显严重, 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清 TGF- $\beta 1$ 明显升高($P < 0.01$), 肝组织 α -SMA 蛋白及 TGF- $\beta 1$ 、Smad3、Smad4 mRNA 及蛋白表达升高($P < 0.01$), Smad7 表达降低; 与模型组比较, 扶脾柔肝方各组大鼠血清 TGF- $\beta 1$ 明显降低($P < 0.05$), 肝组织 α -SMA 蛋白及 TGF- $\beta 1$ 、Smad3、Smad4 mRNA 及蛋白表达下调($P < 0.05$), Smad7 mRNA 及蛋白表达升高。结论 扶脾柔肝方下调 HF 肝组织 α -SMA 蛋白及 TGF- $\beta 1$ 、Smad3、Smad4 mRNA 及蛋白表达水平, 上调 Smad7 mRNA 及蛋白表达水平, 可能是其抗 HF 作用机制之一。

关键词: 肝纤维化; TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路; α -平滑肌肌动蛋白; 扶脾柔肝方

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)05-

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.05.0

Effect of Fupi Rougan Formula Granule on Transforming Growth Factor- $\beta 1$ /Smad signal Pathway in Rats with Liver Fibrosis

AN Zhen-xiang, HE Yuan-li, WANG Min, HUANG Dan, CHEN Yu-Jiang

(The First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou, 550001, China)

[Abstract] Objective: To discuss the Fupi Rougan formula transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) /intervention of Smads signal pathways in rats with hepatic fibrosis (HF). Methods: SD rats were randomly divided into 7 groups: normal group, model group and colchicine group ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), the fuzhenghuayu group ($0.415 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), FupiRougan formula group low, medium and high dose group ($20, 40, 80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). hypodermic injection of 50% carbon tetrachloride phenixin and alcohol in rats back to Induce liver fibrosis, for 10 weeks, successfully established rat liver fibrosis, then give medicines ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), once a day (qd), for four weeks, the normal group, model group was given normal saline (NS). Detection of rat serum TGF- $\beta 1$; HE staining and Masson staining to observe the liver tissue pathology change; Immunohistochemical method in the detection of liver tissue of α smooth muscle actin (α SMA) expression; Fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) and Western Blotting to detect liver tissue TGF- $\beta 1$, Smad3, Smad4 and Smad7 mRNA and protein expression. Results: hepatic fibrosis

收稿日期: 2017-04-20

作者简介: 安祯祥, 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 从事中西医结合防治消化系统疾病的基础及临床研究。Email: 407206115@qq.com。通信

作者: 何远利, 女, 主治医师, 研究方向: 老年疾病研究。Email: 66587934@qq.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(81460726); 贵州省卫生计生委科学技术基金项目(gzwlkj2015-1-058); 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合 KY 字[2012]041 号); 贵州省科技计划课题项目(黔科合 SY 字[2012]3146)。

degree of model group are obviously serious than others; compared with normal group, the TGF- β 1 of rats serum of model group increased significantly ($P < 0.01$), liver tissue of α -SMA protein and TGF- β 1, Smad3 and Smad4, mRNA and protein expression increased ($P < 0.01$) too, while the expression of Smad7 reduced. On the other hand, the TGF- β 1 in the fupirougan group was obviously lower ($P < 0.05$) than model group, liver tissue of α -SMA protein and TGF- β 1, Smad3 and Smad4 mRNA and protein expression lowered ($P < 0.05$) at the same time, but the expression of Smad7 mRNA and protein increased. Conclusion: Fupirougan cut liver fibrosis, the liver tissue α -SMA protein and TGF- β 1, Smad3, Smad4 mRNA and protein expression level; on the contrary, raise Smad7 mRNA and protein expression level, it may be one of the mechanism of anti-hepatic fibrosis.

[Key words]: liver fibrosis; transforming growth factor- β 1/Smad signal pathway; α -smooth muscle actin; Fupirougan formula granule

肝纤维化(HF)是慢性肝病与肝硬化的中间环节,特点是细胞外基质(ECM)的过度增生和异常沉积,是结缔组织的重构过程,常导致肝脏结构和功能的异常改变^[1]。HF是可以逆转的,及时截断HF的发展,是肝硬化诊治的关键节点。HF的防治目前仍然困难,没有真正有效的手段,深入研究HF的发病机制,寻找有效的防治措施,对疾病诊治有着重要的意义。转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/Smad信号通路是HF最关键的细胞信号通路,是TGF- β 信号进入细胞核内的主要路径,是HF防治的重要靶点。TGF- β 1是促进HF最重要的细胞因子,其特异性下游细胞因子为Smads, Smads调控TGF- β 家族的正、负反馈^[2]。

中医认为HF与肝脾功能失调密切相关,基本病机是本虚标实、正虚血瘀。临床上具有HF适应症的药物如扶正化瘀胶囊、安络化纤丸、复方鳖甲软肝片等,均是以扶正补虚,活血化瘀药物为主,因而是HF的普遍治则治法。“肝脾相关”理论是脏腑关系中最重要论述,两脏生理病理均相互关联,历经不同时代不同医家的完善总结。我院名老中医孙定隆教授依据“肝脾相关”理论,采用扶脾柔肝之法,强调“肝脾同治”,自拟“扶脾柔肝汤”为基础方治疗慢性肝病,该方益气健脾,活血柔肝,运用10余年,取得了显著的临床疗效^[3-5]。既往研究表明,扶脾柔肝方具有保肝降酶,下调HF大鼠肝组织诱导型一氧化氮合酶水平,拮抗HF的作用^[6-7]。本文探讨扶脾柔肝方对HF大鼠肝组织TGF- β 1/Smads信号通路表达的影响,为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物 SD大鼠80只,5周龄,雌雄各半,SPF级,体质量(180 ± 20)g,重庆腾鑫比实验动物销售

有限公司,动物许可证号:SCXK(渝)2012-005。实验场所贵阳中医学院实验动物中心。房间通风良好,保持清洁,温度20~25℃,空气湿度50%~70%,大鼠自由饮水、取食。

1.2 药品及试剂 扶脾柔肝方:黄芪30g(批号:1504001w)、麸炒白术30g(批号:1502001w)、苍术15g(批号:1502001w)、苡仁30g(批号:1502001s)、当归15g(批号:1502002w)、牛膝15g(批号:1502001w)、丹参30g(批号:1503002s)、莪术15g(批号:1503001w)、枳壳15g(批号:1410001w)。由华润三九医药股份有限公司制备为配方颗粒制剂,由贵阳中医学院一附院颗粒药房分发。秋水仙碱(滇虹药业集团玉溪生物制药有限公司,国药准字H53021904)。扶正化瘀胶囊(上海黄海制药有限责任公司,国药准字Z200220073)。四氯化碳(天津市光复科技发展有限公司,批号:20120506)。Masson染色试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:D026);TGF- β 1酶联免疫(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A0134);蛋白抽提试剂盒(康为世纪,批号:CW0004A);BCA试剂盒(康为世纪,批号:CW0014);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(康为世纪,批号:CW0022); β -肌动蛋白(β -actin)一抗(康为世纪,批号:CW0096A);一步法WB(HRP)快速二抗试剂盒(康为世纪,批号:CW2030, CW2029),蛋白印迹膜再生液(康为世纪,批号:CW0056),ECL荧光显影剂(康为世纪,批号:CW0048A, CW0049A); α -SMA、TGF- β 1、Smad3、Smad4、Smad7一抗(Immuno Way公司,批号分别为YT5053, YM3438, YM3666, YT4337, YN2330);免疫组化染色试剂盒(河南赛诺特生物技术有限公司);Trizol试

剂 (Life Technologies 公司); 逆转录试剂盒、PCR 试剂盒 (Fermentas 公司); 焦磷酸乙二醇、琼脂糖 (Sigma 公司)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列: TGF- β 1 (182 bp): 上游 5'-CTGGATACCAACTACTGCTTCA-3', 下游 5'-AG-GACCTTGCTGTACTGTGT-3'。Smad3 (123 bp): 上游 5'-CGTCCATCCTCCCTTCAC-3', 下游 5'-CCAAGCT-CTTGACCGCCTTC-3'。Smad4 (146bp): 上游 5'-CC-TGGACTGGAAGTAGGACTG-3', 下游 5'-GGAAATG-GGAGGCTGGAAGC-3'。Smad7 (273bp): 上游: 5'-AACTGCAGACTGTCCAGACG-3', 下游: 5'-TTGGG-AATCTGAAAGCCCCC-3'。GAPDH (252bp): 上游 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3', 下游 5'-TTTGAG-GGTGCAGCGAACTT-3'。

1.3 仪器 BX51 型显微镜 (日本奥林巴斯公司); TGL-20M 型高速低温冷冻离心机 (长沙湘仪贝康仪器仪表有限公司); 164-5050 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); ZS-2 型板式酶标仪 (北京新风公司); Nanodrop 2000 型紫外分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司); ABI7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)。

1.4 分组、模型复制及给药 造模方法^[8]: 大鼠背部皮下注射(sc) 50 % CCL₄ 橄榄油溶液, 剂量为 3 mL·kg⁻¹, 每周 2 次, 造模第 2 周开始给大鼠用 30 % 乙醇灌胃 (ig), 剂量为 10 mL·kg⁻¹, 隔日 1 次造模。正常对照组予等量橄榄油 sc 和生理盐水 ig。HF 分期标准参照《病毒性肝炎防治方案》^[9], 10 周造模成功。大鼠适应性喂养 1 周后, 按性别分层随机分为 7 组, 即正常对照组, 模型组, 秋水仙碱组 (0.2 mg·kg⁻¹), 扶正化瘀组 (0.415 g·kg⁻¹), 扶脾柔肝方低、中、高剂量组 (20, 40, 80 g·kg⁻¹, 为成人临床剂量的 1, 2, 4 倍)。10 周后造模成功, 从第 11 周至第 14 周分别给予相应药物灌胃, 每天 1 次, 连续 4 周, 正常组及模型组给予等量的生理盐水。每周根据体重调整药物剂量。末次给药后大鼠禁食 12 h, 称质量, 腹主动脉采血, 分离血清, 处死动物, 剖取肝脏, 提取肝组织, -80 °C 冰箱保存。

1.5 ELISA 法测定血清 TGF- β 1 含量 按照试剂盒说明书测定 TGF- β 1 水平, 酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的吸光度(A)。

1.6 肝组织病理学检查 肝组织常规甲醛固定, 石蜡包埋、切片, 分别作 HE 染色、Masson 染色, 制备成病理切片后, 光镜下观察病理组织学变化情况。病

理学检查均由贵阳中医一附院病理科完成, 在光镜观察下观察肝脏结构、肝细胞炎症程度、肝纤维化组织增生情况及 α -SMA 蛋白表达情况。

1.7 免疫组化法检测肝组织中 α -SMA 表达及免疫印迹法 (Western blot) 法检测肝组织 TGF β 1、Smad3、4、7 蛋白表达

1.7.1 免疫组化法检测肝组织中 α -SMA 表达 石蜡切片常规脱蜡, 梯度酒精水化, 微波抗原修复, 3 % H₂O₂ 室温去除内源性过氧化物酶, 羊血清封闭, 加 α -SMA 一抗 (1:100), 4 °C 冰箱过夜, 加二抗工作液, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水、透明、中性树胶封片, 光镜下阅片采集图片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。以表达棕黄色为阳性, 以不着色为阴性。每张切片随机选择 5 个高倍视野 (400 $\times$), 计数 100 个细胞中的阳性百分率, 取其平均值作为每张切片的结果。

1.7.2 免疫印迹法 (Western blot) 法检测肝组织 TGF β 1、Smad3、4、7 蛋白表达 每组随机选取 3 个样本, 剪取一定量的肝脏组织, 加入蛋白提取液, 匀浆, 冰浴 20 min, 4 °C, 10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后取上清, BCA 法测定蛋白含量, 加入上样缓冲液, 蛋白经 10 % SDS-PAGE 凝胶电泳, 分离后转移到 PVDF 膜, 室温封闭, 一抗 (1:500) 孵育, β -actin (1:2000), 4 °C 反应过夜, 洗涤, 二抗 (1:200) 反应 5 min, 封闭, 洗涤, ECL 化学发光和曝光显影, 扫描图像, 测定各条带的灰度值, 以 β -actin 作为内参, 用目的蛋白/ β -actin 表示该目的蛋白的相对表达。

1.8 荧光定量 PCR 法检测肝组织 TGF β 1、Smad3、Smad4、Smad7 mRNA 表达 按 Trizol 说明书提取大鼠肝脏组织样本 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 的纯度与浓度, 所有提取样 OD_{260/280} 值在 1.8~2.0 之间, 浓度均在 500~1500 ng· μ L⁻¹。1 % 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。按 RT-PCR 试剂盒说明书取 1 μ g 总 RNA, 逆转录为 cDNA。采用 SYBR Green I 试剂, cDNA 的终浓度均调为 10 ng· μ L⁻¹。荧光定量 PCR 反应体系: SYBR Green I 10 μ L, 上游引物 0.75 μ L, 下游引物 0.75 μ L, H₂O 12.5 μ L, cDNA 1 μ L。将各反应管放入荧光定量 PCR 仪。以 GAPDH 为内参基因, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法来计算目的基因 mRNA 的相对含量, $\Delta C_t = C_t$ (目的基因) - C_t (管家基因), $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (实验组) - ΔC_t (对照组), 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 表示实验组目的基因 mRNA 含量相对于对照组的相对变化倍数, 分析目的基因在不同组中的差异表达量。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS20.0 软件进行数据统计分析,实验数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 对大鼠一般情况的影响 正常对照组大鼠体质量逐渐增加,反应灵敏,皮毛有光泽。模型组大鼠体质量增长缓慢,反应迟钝,皮毛干枯,活动和饮食减少,弓背喜卧,有扎堆现象。各干预组一般状态较模型组有所改善。为明确造模是否成功,第 8 周和第 10 周各处死正常组及造模组大鼠 1 只,实验结束正常组无大鼠死亡,西药组死亡 2 只,中药大剂量组死亡 1 只,共死亡 3 只,第 14 周末全部大鼠处死。

2.2 对 HF 大鼠血清 TGF- β 1 表达的影响 与正常对照组比较,模型组 TGF- β 1 表达明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,各药物干预组 TGF- β 1 表达有不同程度减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与秋水仙碱组比较,扶正化瘀组和扶脾柔肝方高剂量组 TGF- β 1 表达均明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

2.3 对 HF 大鼠肝组织病理学变化的影响 正常对照组肝脏表面光滑,质地柔软,边缘锐利;模型组肝脏表面欠光滑,呈颗粒状,质地变硬,边缘钝圆;各药物组肝脏质地、表面光滑程度均较模型组有所好转。

2.3.1 HE 染色结果 正常对照组肝小叶结构清晰完整,肝细胞以中心静脉为中心呈放射状排列;模型

表 1 扶脾柔肝方对 HF 大鼠血清 TGF- β 1 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Fupi Rougan formula granule on TGF- β 1 expression in blood serum of rats with liver fibrosis

组别	<i>n</i>	剂量/(g·kg ⁻¹)	TGF- β 1/(ng·L ⁻¹)
正常对照组	10	—	201.36 ± 83.97
模型组	11	—	457.65 ± 118.08 [*]
秋水仙碱组	9	0.0002	366.07 ± 92.21 [△]
扶正化瘀组	11	0.415	283.64 ± 88.01 ^{△△}
扶脾柔肝方低剂量组	10	20	376.60 ± 58.76 [△]
扶脾柔肝方中剂量组	11	40	316.95 ± 93.23 ^{△△}
扶脾柔肝方高剂量组	11	80	213.70 ± 88.93 ^{△△▲▲}

注:与正常对照组比较, ^{*} $P < 0.01$;与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$;与秋水仙碱组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$ 。

组肝小叶结构破坏,肝细胞变性坏死,见大量纤维结缔组织增生,汇管区明显增宽、扩大,形成多发大小不一的假小叶结构;与模型组比较,各药物组假小叶减少,胶原纤维变细,沉积减少,较模型组有改善。见图 1。

2.3.2 Masson 染色情况 胶原纤维为蓝紫色。正常组仅于汇管区有少量蓝色胶原纤维分布,无明显胶原增生。模型组细胞变性坏死严重,汇管区和小叶间胶原纤维明显增宽、增多、粗大,分割包绕肝实质,形成多发大小不一的假小叶。与模型组比较,各药物组胶原纤维明显减少、变细,扶脾柔肝方随药物浓度变化有一个逐渐变化过程。见图 2。

2.4 对 HF 大鼠肝组织 α -SMA 表达的影响 正常对照组染色淡,表达水平低;与正常对照组比较,模型组染色主要位于汇管区纤维组织,多为棕黄色,分布广泛,呈强阳性,高水平表达($P < 0.05$);与模

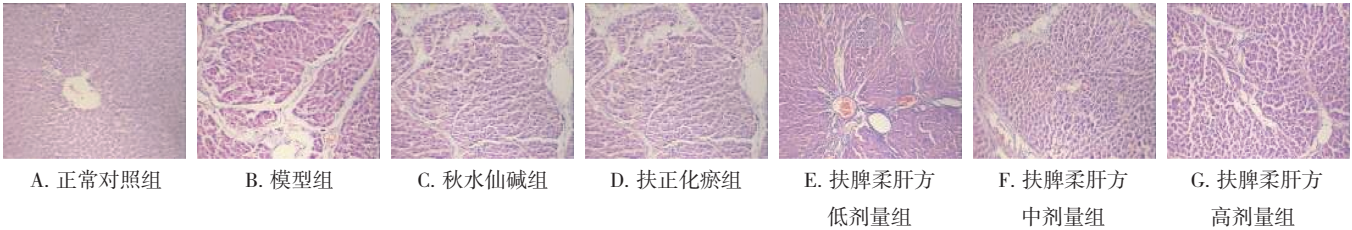


图 1 扶脾柔肝方对 HF 大鼠肝脏组织病理学变化的影响(HE, 200 ×)

Figure 1 Effects of Fupi Rougan formula granule on pathological changes in liver tissues of hepatic fibrosis rats(HE, 200 ×)

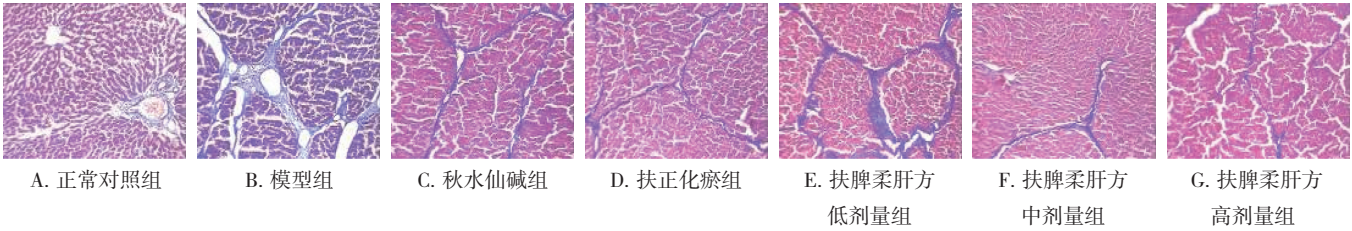


图 2 扶脾柔肝方对 HF 大鼠肝脏组织病理学变化的影响(Masson, 400 ×)

Figure 2 Effects of Fupi Rougan formula granule on pathological changes in liver tissues of hepatic fibrosis rats(Masson, 400 ×)

型组比较,各干预组阳性表达明显减少($P<0.01$);扶脾柔肝方随着浓度的增加,染色逐渐变淡、变浅。见表 2 和图 3。

2.5 对 HF 大鼠肝组织 TGF- β 1、Smad3、4、7 蛋白表达的影响 与正常对照组比较,模型组肝组织中 TGF- β 1、Smad3、Smad4 表达明显上调,Smad7 表达下调,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,各给药组肝组织中 TGF- β 1、Smad3、Smad4 表达均下调,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,除了扶脾柔肝方低剂量组之外,其余各给药组 Smad7 表达均有上调,差异有统计学意义($P<0.01$)。其中,扶脾柔肝方高剂量组作用效果最佳。见表 3 和图 4。

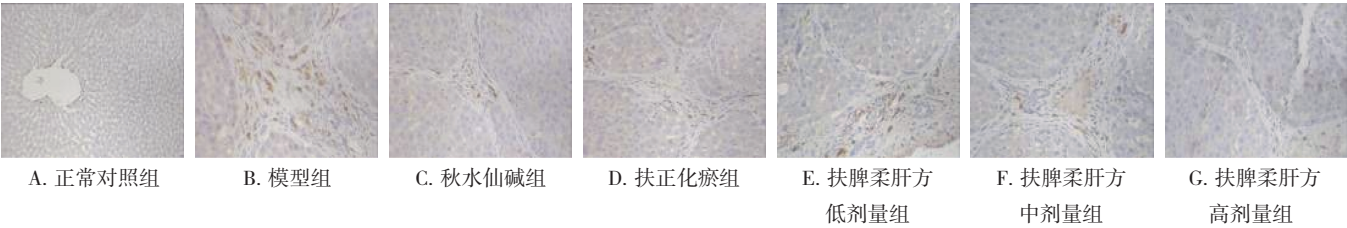


图 3 扶脾柔肝方对 HF 大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达的影响(免疫组化, 400 $\times$)

Figure 3 Effect of Fupi Rougan formula granule on expression of α -SMA in liver tissue of rats with liver fibrosis

表 3 扶脾柔肝方对 HF 大鼠肝组织 TGF- β 1、Smad3、Smad4、Smad7 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of Fupi Rougan formula granule on expression of TGF- β 1, smad3, 4, 7 protein in liver tissue of rats with liver fibrosis

组别	剂量/(g $\cdot$ kg $^{-1}$)	TGF- β 1/ β -actin	Smad3/ β -actin	Smad4/ β -actin	Smad7/ β -actin
正常对照组	—	0.578 $\pm$ 0.019	0.353 $\pm$ 0.016	0.163 $\pm$ 0.016	1.015 $\pm$ 0.341
模型组	—	0.926 $\pm$ 0.109*	0.985 $\pm$ 0.052*	0.400 $\pm$ 0.040*	0.450 $\pm$ 0.056*
秋水仙碱组	0.0002	0.808 $\pm$ 0.101	0.236 $\pm$ 0.099 $\Delta\Delta$	0.389 $\pm$ 0.010	0.808 $\pm$ 0.090 Δ
扶正化瘀组	0.415	0.832 $\pm$ 0.071	0.272 $\pm$ 0.119 $\Delta\Delta$	0.262 $\pm$ 0.012 $\Delta\Delta\Delta$	0.815 $\pm$ 0.095 Δ
扶脾柔肝方低剂量组	20	0.836 $\pm$ 0.141	0.101 $\pm$ 0.011 $\Delta\Delta\Delta$	0.179 $\pm$ 0.021 $\Delta\Delta\Delta$	0.706 $\pm$ 0.269
扶脾柔肝方中剂量组	40	0.690 $\pm$ 0.036 $\Delta\Delta$	0.091 $\pm$ 0.011 $\Delta\Delta\Delta$	0.282 $\pm$ 0.017 $\Delta\Delta\Delta$	0.789 $\pm$ 0.122 Δ
扶脾柔肝方高剂量组	80	0.053 $\pm$ 0.006 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.066 $\pm$ 0.006 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.049 $\pm$ 0.009 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.977 $\pm$ 0.099 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与秋水仙碱组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与扶正化瘀组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

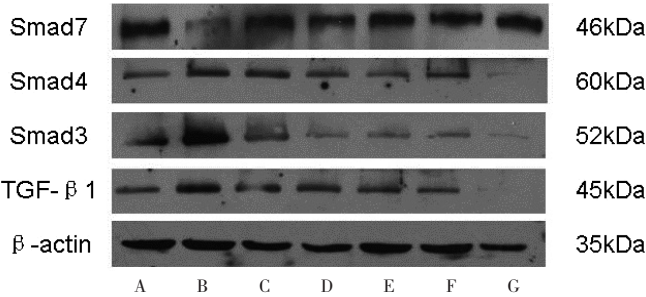


图 4 扶脾柔肝方对 HF 大鼠肝组织 TGF- β 1、Smad3、4、7 蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of Fupi Rougan formula granule on expression of TGF- β 1、Smad3、4、7 protein in liver tissue of rats with liver fibrosis

表 2 扶脾柔肝方对 HF 大鼠肝组织 α -SMA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of Fupi Rougan formula granule on expression of α -SMA in liver tissue of rats with liver fibrosis

组别	n	剂量/(g $\cdot$ kg $^{-1}$)	α -SMA/%
正常对照组	10	—	4.134 $\pm$ 2.379
模型组	11	—	53.269 $\pm$ 15.393*
秋水仙碱组	9	0.0002	12.962 $\pm$ 3.190 $\Delta\Delta$
扶正化瘀组	11	0.415	13.184 $\pm$ 5.119 $\Delta\Delta$
扶脾柔肝方低剂量组	10	20	24.598 $\pm$ 7.630 $\Delta\Delta$
扶脾柔肝方中剂量组	11	40	13.842 $\pm$ 6.964 $\Delta\Delta$
扶脾柔肝方高剂量组	11	80	10.341 $\pm$ 4.226 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.6 对 HF 大鼠肝组织 TGF- β 1、Smad3、4、7 mRNA 表达的影响

与正常对照组比较,模型组肝组织中 TGF- β 1、Smad3、Smad4 表达明显上调,Smad7 表达下调,差异均具有统计学意义($P<0.01$);各用药组肝组织中 TGF- β 1、Smad3、Smad4 表达下调,其中,扶正化瘀组、扶脾柔肝中、高剂量组 TGF- β 1、Smad3、Smad4 表达,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);扶脾柔肝低剂量组 TGF- β 1 和 Smad4 下调明显,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,各干预组 Smad7 表达均有上调,其中,扶正化

瘀组,扶脾柔肝方中、高剂量较为明显,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表4。

表4 扶脾柔肝方对HF大鼠肝组织TGF- β 1、Smad3、Smad4、Smad7 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of Fupi Rougan formula granule on expression of TGF- β 1, smad3, 4, 7 mRNA in liver tissue of rats with liver fibrosis

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TGF- β 1	Smad3	Smad4	Smad7
正常对照组	-	1.045 ± 0.442	1.021 ± 0.296	0.994 ± 0.556	1.026 ± 0.055
模型组	-	2.104 ± 0.511*	3.013 ± 0.205*	2.503 ± 0.787*	0.306 ± 0.065
秋水仙碱组	0.0002	1.586 ± 0.159	2.122 ± 0.791 [△]	0.088 ± 0.136 ^{△△}	1.128 ± 0.565
扶正化瘀组	0.415	1.048 ± 0.204 ^{△△}	1.348 ± 0.737 ^{△△}	0.187 ± 0.148 ^{△△}	1.396 ± 1.101 [△]
扶脾柔肝方低剂量组	20	1.367 ± 0.415 [△]	2.232 ± 0.447	0.928 ± 0.723 ^{△△}	1.296 ± 0.492
扶脾柔肝方中剂量组	40	1.236 ± 0.447 [△]	1.777 ± 0.423 [△]	0.789 ± 0.315 ^{△△}	1.680 ± 0.899 [△]
扶脾柔肝方高剂量组	80	0.982 ± 0.290 ^{△△}	1.151 ± 0.354 ^{△△}	0.312 ± 0.370 ^{△△}	2.286 ± 1.099 ^{△△}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

3 讨论

前期研究,我们采用四氯化碳腹腔注射联合乙醇灌胃造模,死亡率较高,本研究则采用较为温和的皮下注射四氯化碳联合乙醇灌胃造模,适当延长造模时间,降低死亡率。关于阳性对照药物的选择,扶正化瘀胶囊是临床上治疗肝纤维化的常用药物之一。研究表明,扶正化瘀胶囊能多环节、多层次、多靶点干预纤维化过程,通过阻断TGF- β 1/Smad通路,对TGF- β 1 mRNA、肝星状细胞I型前胶原和 α -SMA的表达进行调节,并已取得明确的临床疗效^[7],故本研究选取扶正化瘀胶囊作为阳性对照。另外,仍然选用西药秋水仙碱作为西药对照,设置西药和中成药的双阳性对照,共同探讨扶脾柔肝方对HF大鼠肝组织TGF- β 1/Smads信号通路表达的影响,研究其抗HF的作用机制。

TGF- β 1/Smad信号通路是HSC活化、增殖的主要信号通路^[10],是HF主要的信息传导途径。Smads蛋白是TGF- β 1受体的胞内激酶底物,它将TGF- β 1与受体作用的信号由胞浆传导至胞核,从而介导TGF- β 1在细胞内的信号转导^[11]。TGF- β 1活化后与HSC细胞膜上特异性受体(TGF-R I/II)结合,将信号转导至细胞内,使Smad2/3磷酸化,再与胞浆内的Smad4形成复合体,将信号从胞浆转移到细胞核中,导致ECM等目的基因的转录并高表达,形成HF^[12]。HSC分泌TGF- β 1需要依赖细胞内信号转导分子Smads表达,Smads蛋白是TGF- β 1跨细胞膜传入细胞核的关键蛋白,是针对TGF- β 1通路调控

的重要节点,而Smad3和Smad7为其关键信号分子^[13]。Smad3为正反馈调节因子,可结合TGF- β 1与受体的复合物,磷酸化后向细胞核内转移,发生转录反应,致使HSC活化增殖,合成ECM,传递致HF信号,因此,调控Smad3蛋白可以阻断TGF- β 1信号的继续传导。Smad7为负反馈调节因子,可与活化的受体或受体激活的Smads结合,形成无活性的复合物,从而达到抑制转录的作用,具有抗HF作用。Smad7阻碍HSC的活化,抑制HF^[14]。Smad3/Smad7表达水平失衡是HF重要机制之一。Smad4通过与受体激活型Smads相连,参与TGF- β 1信号转导。本研究利用背部皮下注射50% CCL₄四氯化碳复合灌胃30%乙醇来制备模型大鼠,通过HE染色、Masson染色均表明模型组大鼠肝脏出现典型的假小叶结构,提示HF大鼠模型造模成功;经过扶脾柔肝干预后,其HF程度均低于模型组,提示该方具有一定程度的抑制HF的作用;与正常对照组比较,模型组大鼠肝组织中TGF- β 1、Smad3、Smad4 mRNA及蛋白表达均明显上调,Smad7表达下调;而扶脾柔肝方可下调TGF- β 1、Smad3、Smad4 mRNA及蛋白的表达,提高Smad7水平,表明扶脾柔肝方可调节纤维组织TGF- β 1/Smads通路表达水平,可能是其抗HF作用机制之一。

HSC是HF过程中ECM的主要来源细胞^[15]。TGF- β 1与HSC互为激活,HSC自分泌和旁分泌作用表达TGF- β 1,TGF- β 1正反馈性增加ECM大量合成,加速HF的进程^[16]。TGF- β 1激活HSC,HSC活化转变为肌成纤维细胞,表达 α -SMA,合成大量ECM,导致HF的发生,是HF正反馈的一个关键细胞因子。 α -SMA是HSC活化的标志,与HSC增殖呈正相关,可直接反映活化的HSC的数量^[17]。 α -SMA阳性细胞主要存在于间质细胞,含纤维组织丰富,随着HF的发展,阳性细胞数逐渐增多^[18]。研究表明,模型组大鼠血清TGF- β 1明显升高, α -SMA表达明显,提示HF大鼠HSC大量活化;经过扶脾柔肝干预后,血清TGF- β 1明显降低,肝脏组织中 α -SMA表达量明显降低,提示该方具有一定程度的抑制HSC活化的作用,其抗HF作用可能与降低 α -SMA表达有关。

HF时肝细胞减少及功能减退,HSC增生活化,分泌胶原,ECM在肝脏异常增生沉积,结构重构,正切合HF本虚标实、正虚血瘀这一基本病机^[19]。扶脾柔肝方以益气健脾,活血柔肝为组方原则,方中

大剂量使用黄芪、白术、苡仁益气健脾治其本，为君药，当归、丹参、牛膝、莪术活血化瘀以治其标，苍术合枳壳理气宽中，以资化源，君臣合用，益气健脾，活血柔肝，标本同治，改善 HF。本实验结果表明，模型组肝组织 HE 染色及 Masson 染色均提示形成明显 HF，血清中 TGF- β 1 明显升高，免疫组化染色提示 α -SMA 表达明显增强，肝组织 TGF- β 1、Smad3、Smad4 mRNA 及蛋白表达明显上调，Smad7 下调；扶脾柔肝方干预后，其纤维化程度均低于模型组，血清中 TGF- β 1 下降， α -SMA 明显降低，肝组织中 TGF- β 1、Smad3、Smad4 mRNA 及蛋白表达下调，Smad7 表达上调，提示该方具有一定程度的拮抗 HF 的作用，其调节 TGF- β 1/Smads 通路表达水平，降低 α -SMA，可能是其抗 HF 作用机制之一。

参考文献：

- [1] 赵志敏, 刘成海. 中医药治疗肝纤维化研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(1): 12-15.
- [2] Roberts AB, Piek E, Bottinger EP, et al. Is Smad3 and smad7 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? [J]. Chest, 2013, 120(suppl 1): S43-S47.
- [3] 孙定隆. 自拟扶脾柔肝汤治疗肝硬化 33 例小结[J]. 贵阳中医学院学报, 1998, 20(2): 21-22.
- [4] 黄丹, 孙定隆, 王敏, 等. 扶脾柔肝汤治疗肝硬化 40 例临床报道[J]. 贵阳中医学院学报, 2015, 37(5): 51-53.
- [5] 安祯祥, 何远利, 王敏. 芒硝外敷联合扶脾柔肝颗粒内服治疗肝硬化腹水的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(9): 1900-1902.
- [6] 安祯祥, 何远利, 王敏. 扶脾柔肝方配方颗粒对肝纤维化大鼠肝组织诱导型一氧化氮合酶表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(18): 100-105.
- [7] 陈晗, 杨碧伟, 袁满, 等. 扶正化瘀胶囊对肝纤维化大鼠的防治作用及对结缔组织生长因子表达的影响. 四川大学学报(医学版), 2016; 47(2): 197-202.
- [8] 安祯祥, 何远利, 王敏. 四氯化碳不同给药途径复合乙醇诱导大鼠肝纤维化模型的研究[J]. 贵州医药, 2016, 40(1): 6-8.
- [9] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(6): 324-329.
- [10] Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis[J]. Gut, 2007, 56: 284-292.
- [11] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling[J]. Nature, 2003, 425(6958): 577-584.
- [12] 吴芙蓉, 姜玲, 何晓丽, 等. 橙皮苷对肝星状细胞 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2639-2643.
- [13] 李刚, 龚全权. 肝纤维化信号传导通路研究进展[J]. 广东医学, 2014, 35(3): 453-455.
- [14] Cutroneo KR. TGF-beta-induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring[J]. Wound Repair Regen. 2007, 15 Suppl 1: S54-S60.
- [15] Mas N, Tasci I, Comert B, et al. Ursodeoxycholic acid treatment improves hepatocyte ultrastructure in rat liver fibrosis [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(7): 1108.
- [16] 秦致中, 冷希圣, 李涛, 等. 白细胞介素-10 对与枯否细胞共培养的肝星状细胞表达转移生长因子- β 和血小板源生长因子的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21: 666-668.
- [17] Carpino G, Morini S, Ginanni S C, et al. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation [J]. Dig Liver Dis. 2005, 35: 349-356.
- [18] 郑亚江, 周振华, 任朦, 等. 补肾柔肝方对肝纤维化大鼠肝组织病理学以及 α -SMA 蛋白表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(34): 3770-3773.
- [19] 慕永平, 刘平. 中西医结合抗肝纤维化的研究思路与方法[J]. 上海医药, 2016, 37(13): 8-12.

(编辑: 宋威)