

鹿茸多肽对四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化的保护作用及其机制研究

周霖^{1,2}, 王肖辉³, 荆自伟^{1,2}, 杜秋争^{1,2}, 师莹莹^{1,2}, 孙志^{1,2}, 洪晋⁴, 赵杰^{1,2} (1. 郑州大学第一附属医院药学部, 河南 郑州 450052; 2. 河南省精准医学临床质谱工程研究中心, 河南 郑州 450052; 3. 郑州大学第一附属医院超声科, 河南 郑州 450052; 4. 郑州大学第一附属医院心血管内科, 河南 郑州 450052)

摘要: **目的** 研究鹿茸多肽(Velvet Antler Polypeptides, VAP)对四氯化碳(CCl_4)诱导的小鼠肝纤维化的保护作用及其机制。**方法** 采用腹腔注射四氯化碳法诱导小鼠肝纤维化动物模型。将小鼠随机分为正常组、四氯化碳组、四氯化碳+鹿茸多肽组($20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、阳性对照组(水飞蓟宾组, SB, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。各组动物每天给予相应剂量药物灌胃, 连续干预6周。采用HE染色法观察病理组织形态; 采用ELISA法检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)及炎症因子($\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6)的含量; 采用免疫组化法检测肝纤维化标志物($\alpha\text{-SMA}$, Col-I)的蛋白表达水平; 采用Western Blot法检测肝脏MAPK和PI3K/Akt信号蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠肝脏出现大量脂肪变性和炎性浸润, 肝脏纤维化标志物 $\alpha\text{-SMA}$ 、Col-I明显高表达, 肝损伤指标ALT、AST水平均明显升高($P < 0.01$), 促炎因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 水平均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 鹿茸多肽组能明显降低 $\alpha\text{-SMA}$ 、Col-I的表达水平, 改善肝脏纤维化病理改变, 降低ALT、AST、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 血清含量($P < 0.01$), 并逆转肝脏MAPK和PI3K/Akt的信号蛋白表达水平。**结论** 鹿茸多肽可能是通过干预MAPK和PI3K/Akt信号传导路径, 从而实现对四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化的保护作用。

关键词: 肝纤维化; 四氯化碳; 鹿茸多肽; MAPK; PI3K/Akt; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)03-0338-08

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.03.006

Study on the Protective Effect of Velvet Antler Polypeptides on Liver Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Mice and Its Mechanism

ZHOU Lin^{1,2}, WANG Xiaohui³, JING Ziwei^{1,2}, DU Qiuzheng^{1,2}, SHI Yingying^{1,2}, SUN Zhi^{1,2}, HONG Jin⁴, ZHAO Jie^{1,2} (1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052 Henan, China; 2. Henan Precision Medicine Clinical Mass Spectrometry Engineering Research Center, Zhengzhou 450052 Henan, China; 3. Department of Ultrasonography, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052 Henan, China; 4. Department of Cardiovascular Medicine, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052 Henan, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effect of velvet antler polypeptide (VAP) on carbon tetrachloride induced liver fibrosis in mice and its mechanism. **Methods** The rat liver fibrosis model was induced by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride. Mice were randomly divided into normal group, carbon tetrachloride group, carbon tetrachloride + VAP group ($20, 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and positive control group (Silybin group, SB, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). The animals in each group were given the corresponding dose of drugs daily by gavage, and the intervention was continued for 6 weeks. HE staining was applied to observe the pathological morphology. The serum levels of ALT, AST and pro-inflammatory cytokines ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6) were measured by ELISA. Immunohistochemical

收稿日期: 2020-05-28

作者简介: 周霖, 男, 主管药师, 研究方向: 中药药理。Email: fcczhoul@zzu.edu.cn。共同第一作者: 王肖辉, 女, 主治医师, 研究方向: 中药药理。Email: fccwangxh2@zzu.edu.cn。通信作者: 赵杰, 男, 主任药师, 研究方向: 医院药学。Email: zhaojie@zzu.edu.cn。洪晋, 女, 主治医师, 研究方向: 中药药理。Email: xyhongjin@126.com。

基金项目: 国家重点研发计划“精准医学研究”重点专项(2017YFC0909900); 河南省科技攻关重点研发与推广专项(202102310191); 河南省高等学校重点科研项目基础研究计划(19A320070); 郑州市协同创新重大专项(郑州大学)项目(20XTZX08017)。

method was used to detect the protein expression level of liver fibrosis markers (α -SMA, Col-I). Western blot was used to detect the expression of MAPK and PI3K/Akt signal proteins in liver. **Results** Compared with the control group, there was extensive steatosis and inflammatory infiltrates in the liver of the model group, the biomarkers level of α -SMA, Col-I, ALT, AST, TNF- α , IL-1 β , IL-6 significantly increased ($P < 0.01$); In the treatment group, VAP significantly reduced the expression of liver fibrosis markers (α -SMA, Col-I) and improved the pathological changes of liver fibrosis. It was also found that the serum levels of liver injury indicators (ALT, AST) and pro-inflammatory factors (TNF- α , IL-1, IL-6) were decreased ($P < 0.01$), and the signaling protein expression levels of MAPK and PI3K/Akt in the liver were reversed. **Conclusion** VAP may protect liver fibrosis in mice induced by CCl₄ via interfering MAPK and PI3K/Akt signal transduction pathways.

Keywords: Liver fibrosis; carbon tetrachloride; velvet antler polypeptides; MAPK; PI3K/Akt; mice

肝纤维化是对慢性肝脏炎症性疾病伤口愈合的反应,其特征是细胞外基质的过度积累^[1]。在生理条件下,肝星状细胞可维持细胞外基质的稳态并积累细胞质脂滴中的视黄酯形式的维生素 A^[2]。但作为对病理损伤的反应,静止的肝星状细胞将会失去脂滴,变得更具增殖性,并转分化为成肌纤维母细胞,其特征在于 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和 I 型胶原蛋白(Col-I)明显上调^[3]。有研究^[4]表明,肝纤维化是动态变化的,在一定程度上具有可逆性。因此,逆转或抑制活化肝星状细胞的增殖可能是抑制细胞外基质沉积从而抑制肝纤维化的潜在策略^[5]。肝纤维化可以逐渐发展为肝硬化,最终导致器官衰竭和死亡,是威胁人类生命健康的常见疾病^[6]。研究^[7-8]表明,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和磷酸肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B/Akt(PI3K/Akt)信号通路参与肝星状细胞增殖和肝纤维化的改善密切相关。相关报道指出,抑制 MAPK 信号通路可下调炎症因子的表达,可有效治疗多数炎症性疾病^[9];同时,PI3K/Akt 通路参与调节肝星状细胞活化、细胞增殖和胶原合成,能够促进肝纤维化的进展^[10]。因此,MAPK 及 PI3K/Akt 通路可能是治疗肝纤维化的重要关键靶点通路,是当前解决这一难题的明星机制。

鹿茸具有延年益寿、补血养颜、强身健体的功效,药性甘、咸、温,归肾、肝经,是传统医学中经典的补阳益血药物^[11]。鹿茸多肽(Velvet Antler Polypeptide, VAP)是从梅花鹿茸中提取的一种多肽物质。据报道^[12-13]鹿茸多肽具有多种生物活性,如抗炎、抗压力和抗衰老作用等,尤其对慢性炎症和氧化损伤具有明显的治疗优势,可能对肝纤维化具有较好的逆转调节作用。有研究^[14]报道,鹿茸多肽可增加 I、IV 型胶原降解,下调 TGF- β 1 蛋白表达,减少

肝星状细胞活化,提高机体对自由基的清除能力,缓解调节炎症反应,从而起到抗纤维化的作用。PI3K/Akt 信号通路主要参与肝星状细胞的活化反应,MAPK 信号通路与炎症反应密切相关^[15-16]。因此,MAPK 及 PI3K/Akt 可能是鹿茸多肽治疗肝纤维化的重要途径。目前,基于 MAPK、PI3K/Akt 信号通路研究鹿茸多肽对于四氯化碳(CCl₄)诱导的肝脏纤维化的治疗效果及作用机制尚未有相关报道。

本研究采用四氯化碳诱导建立肝纤维化小鼠模型,观察鹿茸多肽对肝纤维化小鼠的肝功能指标(ALT、AST),纤维化指标(α -SMA、Col-I),炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)及 MAPK、PI3K/Akt 信号通路的影响,探讨鹿茸多肽的抗炎、调节胶原形成及逆转肝纤维化等作用机制,为今后肝纤维化的治疗提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 C57BL/6 小鼠 50 只,8 周龄,20~22 g,购自卡文斯实验动物有限公司,动物质量合格证号:202011741,动物许可证号:SCXK(苏)2016-0010。所有动物实验操作均按照《药理实验动物操作指南》规范进行。

1.2 药物及试剂 鹿茸多肽(VAP),纯度:97%,批号:110608,天津万象恒远科技有限公司;四氯化碳(色谱级,纯度:99%,批号:205948)、水飞蓟宾(SB,纯度 98%,批号:s161348),均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;橄榄油,纯度 99%,批号:JM120,吉安骏马香料有限公司;IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 酶联免疫试剂盒,武汉 Elabscience 公司,批号分别为:Ex210904、Ex201905、Ex201909;ALT(批号:C009-2-1)与 AST(批号:C010-2-1)试剂

盒、BCA 蛋白提取及浓度测定试剂盒(批号: PC0020), 均购自南京建成生物有限公司; p-JNK、JNK、p-ERK、ERK、p-P38、P38、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 和 GAPDH 抗体, 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。丙酮, 批号: 100004-1, 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇, 批号: 130100-201302, 中国食品药品检定研究院; 甲基纤维素钠(CMC-Na)、苏木精-伊红(HE)染色试剂及聚丙烯酰胺凝胶等其余常用试剂, 均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司; 实验用水为三级水。

1.3 仪器 LabsystemsMK2 型酶联免疫检测仪, 上海众声声明科学发展有限公司; Elx-800 型台式高速微量离心机, 美国 SCILOGEX 公司; MLS-3750 型 Tanon 5200 曝光仪、EPS300 型电泳仪, 上海天能科技有限公司; WPC65 型 DYC 系列电泳仪, 北京市六一仪器厂; BX53P 型奥林巴斯光学显微镜, 奥林巴斯(中国)有限公司。

1.4 动物分组、模型复制及给药 将小鼠随机分为 5 组: 正常组、四氯化碳组、四氯化碳+鹿茸多肽($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、四氯化碳+鹿茸多肽($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、四氯化碳+水飞蓟宾($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组, 每组 10 只。

剂量的算法: 以每千克体质量小鼠的给药量为正常人给药量的 6.3 倍、每次小鼠给药量为正常人给药量的等效量或 1/2 等效量计算, 并参照本研究前期基础综合评定, 为使药效达到最大而毒副反应最低, 鹿茸多肽剂量分别定为 40 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 水飞蓟宾剂量定为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [17-20]。

肝纤维化模型建立方法: 除正常组外, 其余各组每周腹腔注射 2 次(每周一及每周五)10%四氯化碳橄榄油混合液, 持续 3 周; 然后 1 周注射 1 次(每周一)10%四氯化碳橄榄油混合液, 持续 3 周[21]。正常组则注射相应体积的生理盐水, 其余操作同其他各组。在模型复制结束后, 给药组小鼠灌胃给予相应剂量的水飞蓟宾(溶解在含 2%吐温 80 的生理盐水中)或鹿茸多肽(溶解在含 5% CMC-Na 的生理盐水中), 正常组及模型组则均灌胃给予相同体积的生理盐水。连续 6 周, 每天 1 次。

1.5 样本采集 在第 6 周给药结束时, 禁食 6 h 后处死小鼠, 收集血液和组织样本。通过眼眶静脉收集的血液样品在 4°C 下以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心 10 min, 取上清后于 -80°C 下储存。小鼠用生理盐水洗涤肝组织样品去除血液, 用滤纸吸干去除剩余的

缓冲液, 并称质量。肝脏组织分为 2 份, 其中一份用 10%甲醛固定、脱水、包埋在石蜡中, 切片; 另一份保存于 -80°C 环境下, 后期进行免疫印迹实验。

1.6 血清 AST、ALT 检测 采用试剂盒检测血清谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)含量水平, 操作方法严格按照试剂盒使用说明方法进行。

1.7 血清炎症因子检测 采用 ELISA 试剂盒检测血清炎症因子: 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)以及白细胞介素 6(IL-6)的含量水平, 操作方法严格按照试剂盒使用说明方法进行。

1.8 组织病理学检测 将石蜡切片切成 $4 \mu\text{m}$ 厚的切片, 用 0.1%的苏木精-伊红染色, 并在奥林巴斯光学显微镜下观察组织病理切片。

1.9 免疫组织化学检查 冰冻切片($5 \mu\text{m}$)在丙酮/甲醇(1:1)中充分混合, 并与正常山羊血清一起孵育以减少非特定结合。组织切片与抗 Col I(1:200)和抗 α -SMA 抗体一起孵育, 于 4°C 湿度室中过夜。在室内, 辣根过氧化物酶标记的二抗体孵育 30 min, 然后在室温下培养二氨基联苯胺(DAB)显色剂显色, 组织切片用苏木精复染, 并在显微镜下观察不同组之间的蛋白表达情况。

1.10 蛋白印迹法检测肝脏中 MAPK 及 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的水平 收集肝组织并用蛋白裂解液(RIPA)裂解, 然后用 12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶分离提取的蛋白质, 并电吸到聚偏二氟乙烯膜上。膜与封闭溶液一起孵育(5%脱脂奶)在室温下保温 1 h, 然后孵育相应的一抗, 并在 4°C 环境下过夜。第 2 天用 TBST 洗涤 4 次, 每次 8 min。然后将 PVDF 膜置于二抗溶液中于室温摇床孵育 2 h。取出 PVDF 膜用 TBST 清洗 4 次, 每次 8 min。使用 ELC 试剂盒在凝胶成像系统曝光并扫描条带分析各条带灰度值。

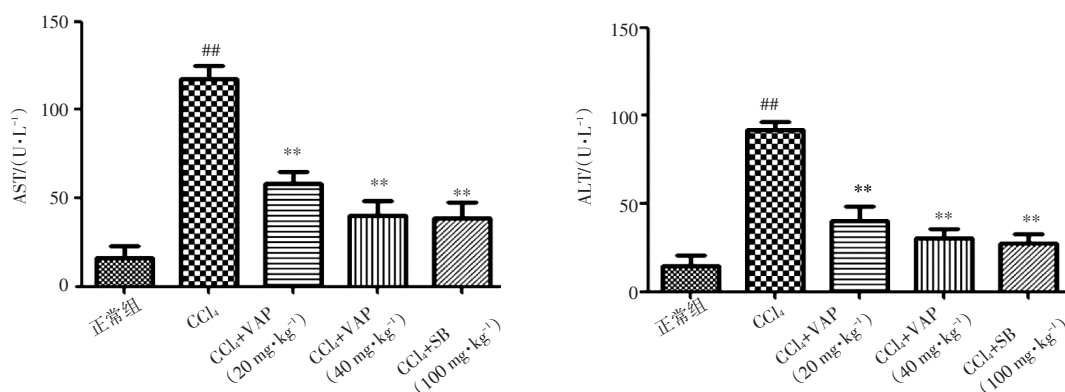
1.11 统计学处理方法 所有实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 运用统计学软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义; 方差齐性采用 Levene 法检验, $P > 0.10$ 表示总体方差齐同。

2 结果

2.1 鹿茸多肽对肝纤维化小鼠血清 AST、ALT 的影响 经 Levene 法方差齐性检验, AST 的 Levene 统计量为 0.486, $P=0.746 > 0.10$; ALT 的 Levene 统计量为 0.538, $P=0.708 > 0.10$, 表明总体方差齐, 可进

一步进行方差分析。与正常组比较,四氯化碳组小鼠血清 AST、ALT 含量均明显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。与四氯化碳组小鼠比较,鹿茸

多肽(20、40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及水飞蓟宾(100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组均可明显降低血清 AST、ALT 含量,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。



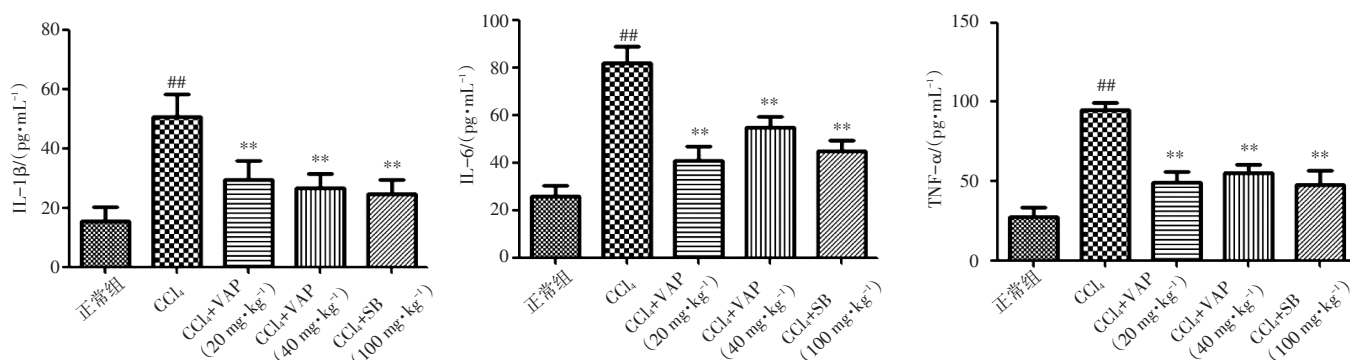
注:与正常组比, ^{##} $P < 0.01$;与四氯化碳(CCl_4)组比, ^{**} $P < 0.01$ 。VAP, 鹿茸多肽; SB, 水飞蓟宾

图 1 各组小鼠血清中谷草转氨酶(AST)与谷丙转氨酶(ALT)含量表达的比较

Figure 1 The expression levels of AST and ALT in serum of mice in different experimental groups

2.2 鹿茸多肽对肝纤维化小鼠血清 IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 的影响 经 Levene 法方差齐性检验, IL-1 β 的 Levene 统计量为 0.869, $P=0.490 > 0.10$; IL-6 的 Levene 统计量为 0.753, $P=0.561 > 0.10$; TNF- α 的 Levene 统计量为 0.555, $P=0.696 > 0.10$, 表明总体方差齐, 可进一步进行方差分析。与正常组比较, 四

氯化碳组小鼠血清 IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 均明显升高, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。与四氯化碳组比较, 鹿茸多肽(20、40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组及水飞蓟宾(100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组均可明显降低血清中 IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 水平, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。



注:与正常组比, ^{**} $P < 0.01$;与四氯化碳(CCl_4)组比, ^{##} $P < 0.01$ 。VAP: 鹿茸多肽; SB: 水飞蓟宾

图 2 各组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 含量表达的比较

Figure 2 The expression levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum of mice in different groups

2.3 鹿茸多肽对肝纤维化小鼠肝脏病理改变的影响

见图 3。HE 染色显示, 与正常组小鼠肝组织比, 四氯化碳组小鼠肝脏中出现大量脂肪变性和炎性浸润; 鹿茸多肽各组及水飞蓟宾组均有所减轻, 有效改善了肝脏组织的病理学变化。

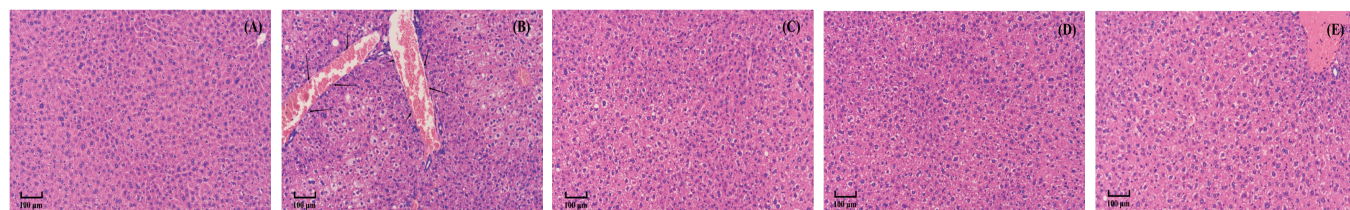
2.4 鹿茸多肽对肝纤维化小鼠肝脏 α -SMA 和 I 型胶原 Col-I 蛋白表达水平的影响 见图 4。免疫组化结果显示, 与正常组小鼠肝组织比, 四氯化碳导致小

鼠肝脏中 α -SMA 和 I 型胶原 Col-I 的蛋白水平表达均明显增加; 鹿茸多肽组及水飞蓟宾组均可明显降低肝纤维化模型小鼠肝脏中 α -SMA 和 I 型胶原 Col-I 蛋白的表达水平。

2.5 鹿茸多肽对肝纤维化小鼠肝脏 MAPK 信号通路蛋白表达的影响 经 Levene 法方差齐性检验, p-JNK 的 Levene 统计量为 0.522, $P=0.720 > 0.10$; p-ERK 的 Levene 统计量为 0.592, $P=0.670 > 0.10$;

p-P38 的 Levene 统计量为 1.101, $P=0.368>0.10$, 表明总体方差齐, 可进一步进行方差分析。蛋白印迹结果显示, 与正常组小鼠肝组织比, 四氯化碳组小鼠肝脏中 p-JNK、p-ERK 和 p-P38 的蛋白水平表达

均明显增加, 差异均具有统计学意义($P<0.01$); 鹿茸多肽组及水飞蓟宾组均可明显降低肝纤维化小鼠肝脏中 p-JNK、p-ERK 和 p-P38 的蛋白表达水平, 差异均具有统计学意义($P<0.01$)。见图 5。



a. 正常组

b. 四氯化碳组

c. 鹿茸多肽(20 mg·kg⁻¹)组

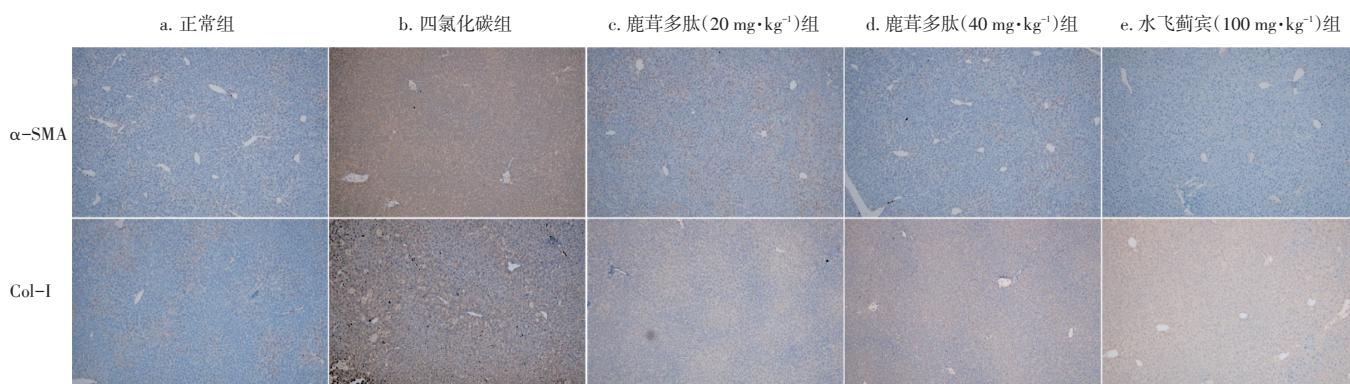
d. 鹿茸多肽(40 mg·kg⁻¹)组

e. 水飞蓟宾(100 mg·kg⁻¹)组

注: 黑色箭头示炎症浸润

图 3 各组小鼠肝脏组织的病理改变(×200)

Figure 3 Pathological changes of liver tissues in different experimental groups(×200)



a. 正常组

b. 四氯化碳组

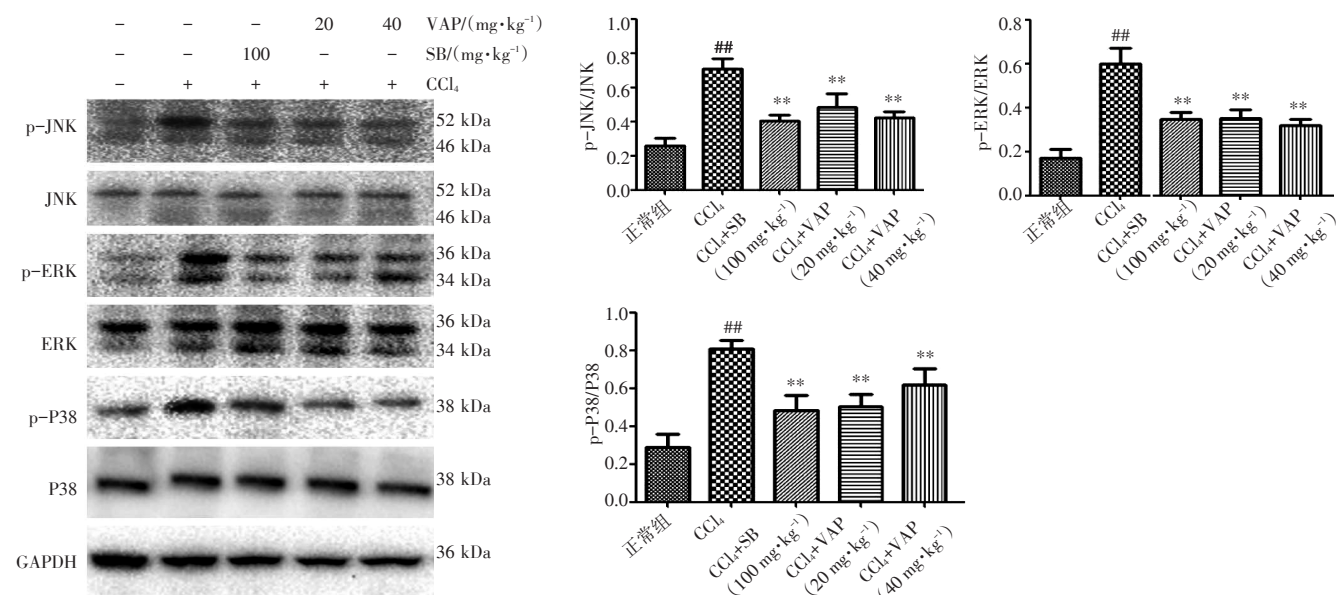
c. 鹿茸多肽(20 mg·kg⁻¹)组

d. 鹿茸多肽(40 mg·kg⁻¹)组

e. 水飞蓟宾(100 mg·kg⁻¹)组

图 4 各组小鼠肝脏组织中 α-SMA 和 I 型胶原 Col-I 蛋白的表达水平(×100)

Figure 4 The protein expression levels of α-SMA and Col-I collagen in liver tissues of different experimental groups(×100)



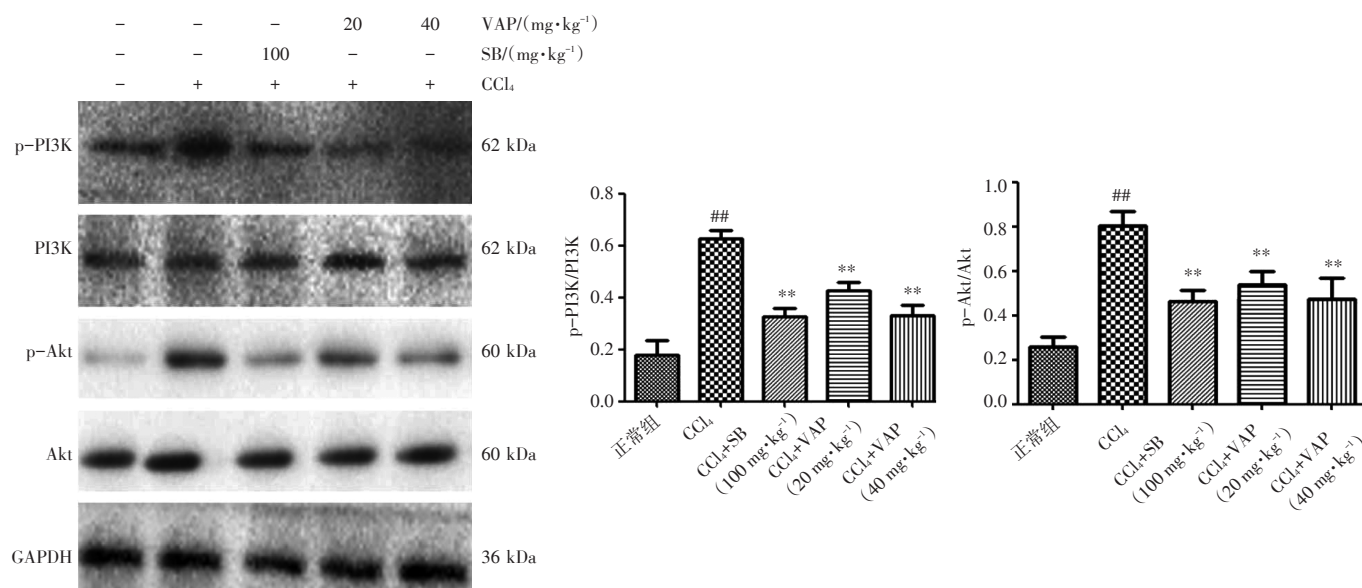
注: 与正常组比, ^{##} $P<0.01$; 与四氯化碳(CCl₄)组比, ^{**} $P<0.01$ 。VAP: 鹿茸多肽; SB: 水飞蓟宾

图 5 各组小鼠肝脏组织中 MAPK 信号通路蛋白的表达水平

Figure 5 The MAPK signaling protein expression levels in liver tissues of mice in different experimental groups

2.6 鹿茸多肽对肝纤维化小鼠肝脏 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响 经 Levene 法方差齐性检验, p -PI3K 的 Levene 统计量为 1.656, $P=0.177 > 0.10$; p -Akt 的 Levene 统计量为 0.836, $P=0.509 > 0.10$, 表明总体方差齐, 可进一步进行方差分析。蛋白印迹结果显示, 与正常组小鼠肝组织比, 四氯化碳组小鼠

肝脏中 p -PI3K、 p -Akt 蛋白水平表达均明显增加, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$); 鹿茸多肽与水飞蓟宾组均可明显降低肝纤维化小鼠肝脏中 p -PI3K、 p -Akt 蛋白的表达水平, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 6。



注: 与正常组比, ^{##} $P < 0.01$; 与四氯化碳(CCl_4)组比, ^{**} $P < 0.01$ 。VAP: 鹿茸多肽; SB: 水飞蓟宾

图 6 各组小鼠肝脏组织中 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的水平

Figure 6 The PI3K/Akt signaling protein expression levels in liver tissues of mice in different experimental groups

3 讨论

肝细胞在受到一定的损伤后, 会释放出大量炎症因子如 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 及 IL-6 , 炎症因子可进一步刺激肝星状细胞的活化、增殖、分裂甚至转化成肌成纤维细胞, 释放 Col-I 及 α -SMA, 加剧肝纤维化的形成, 引起肝功能的障碍和异常, 导致 ALT、AST 水平明显升高^[22-24]。同时, MAPK 信号通路密切参与肝星状细胞的增殖与活化, PI3K/Akt 信号通路主要参与调控和介导肝星状细胞的分裂与凋亡, 成为肝纤维化形成的重要关键靶点通路, 对于肝纤维化的发生、发展起着至关重要的作用^[15,25]。

有研究^[26]表明, 炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 是调节肝纤维化发展的重要因素, $\text{TNF-}\alpha$ 表达水平的增高与肝纤维化形成密切相关, 是重要的肝纤维化临床诊断指标; $\text{IL-1}\beta$ 及 IL-6 是一种多功能细胞因子, 具有炎症介质的作用, 是肝纤维化起始的重要因素。受到炎症因子刺激活化的肝星状细胞, 会释放出细胞外基质(主要成分是 I 型胶原蛋白 Col-I), 导致胶原因

子的大量活化和过度沉积; 同时会加速其增生、分裂的速度和进程, 甚至逆转化为肌成纤维细胞, 导致胞质内的 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)含量升高, 最终形成肝纤维化^[27]。因此, 炎症因子的表达水平、细胞外基质的产生与降解对于肝纤维化的形成与逆转具有重要影响, 对炎症因子、Col-I 及 α -SMA 等肝纤维化指标的检测可以直观反映这一动态过程^[28]。

本研究结果显示, 与正常组比, 四氯化碳组小鼠炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 及 IL-6 水平明显升高; 鹿茸多肽干预后, 炎症因子含量明显下降, 提示鹿茸多肽具有较强的抗炎作用。免疫组织化学结果显示, 小鼠肝纤维化模型中肝细胞多数呈现形状各异的片状坏死现象, 肝小叶周围出现结缔组织增生, 肝小叶间的胆管数目明显增加, 细胞质中 α -SMA 含量升高, 细胞外基质中 Col-I 水平上升; 以鹿茸多肽干预后, 肝纤维化小鼠肝细胞坏死情况有所缓解, 肝小叶周围结缔增生现象得到改善, 肝小叶间

的胆管数目相应减少, 细胞质中 α -SMA 含量降低, 细胞外基质中 Col-I 水平降低。

肝纤维化是肝脏在受到不同的致病性因素影响后, 组织在自我修复过程中, 由于代偿反应而导致肝内纤维结缔组织异常增生的生理病理过程, 是慢性肝脏疾病向肝硬化甚至肝功能衰竭等恶性疾病发展的必由之路^[29]。AST、ALT 是反映肝脏正常代谢功能的重要生化指标, 当肝脏受损而导致功能出现异常时, AST 及 ALT 将会从肝细胞中外排到血液循环, 从而呈现血液中这两种指标含量升高的现象。本研究结果显示, 与对照组比, 四氯化碳组小鼠血液中 AST、ALT 含量急剧升高, 表明四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型的肝功能严重受损; 鹿茸多肽干预后, 两种指标的含均明显下降, 提示肝脏功能较模型组有明显恢复。HE 染色结果表明, 四氯化碳组小鼠肝脏病理切片出现脂肪变性和炎症性浸润; 相比四氯化碳组, 鹿茸多肽干预后肝脏炎症细胞浸润明显减少, 细胞结构及细胞形态较完整, 分布排列较整齐。病理组织切片的 HE 染色结果与肝功能代谢生化指标的结果相一致, 相互验证, 表明实验结果的可靠性。

已有各种证据表明, MAPK 信号通路密切参与肝星状细胞的增殖与活化, 加重肝纤维化发展进度和程度^[30-31]。MAPK 家族包括有 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、P38 MAPK (P38) 以及细胞外信号调节激酶 (ERK) 等^[32]。本研究结果显示, 四氯化碳诱导的肝纤维化模型组, p-JNK、p-P38 和 p-ERK 的蛋白水平表达明显升高; 鹿茸多肽干预组可明显下调以上 3 种关键蛋白。该结果提示, MAPK 信号通路的激活可有效介导四氯化碳诱导的肝纤维化进程, 鹿茸多肽能够明显减轻四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化状态, 其抗肝纤维化作用机制可能与 MAPK 信号通路有关。

肝纤维化的另外一条关键通路, PI3K/Akt 信号通路主要参与调控和介导肝星状细胞的增殖与凋亡。肝星状细胞的增殖是肝纤维化发生、发展的重要关键步骤, 抑制 PI3K/Akt 信号通路, 可抑制肝星状细胞的活化和促进其凋亡, 从而起到抑制肝纤维化的作用^[33-34]。本研究结果显示, 四氯化碳组 PI3K 及 Akt 蛋白表达量均明显升高, 而鹿茸多肽治疗组则明显下降, 表明鹿茸多肽可抑制 PI3K/Akt 信号通路, 促进肝星状细胞凋亡或抑制其增殖, 从而抑制肝纤维化的病理进程。

综上所述, 鹿茸多肽可以明显降低肝脏纤维化标志物(α -SMA、Col-I)的表达水平; 改善肝脏纤维化的病理改变; 降低肝损伤指标(ALT、AST)及炎症因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)的血清含量, 并通过调节 MAPK 和 PI3K/Akt 的信号通路起到抑制肝纤维化进程的作用。本研究将为肝纤维化的治疗提供新的治疗思路和科学的理论依据。

参考文献:

- [1] SEBASTIANI G, GKOUVATSOS K, PANTOPOULOS K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(32): 11033-11053.
- [2] FRIEDMAN S L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev, 2008, 88(1): 125-172.
- [3] 付月月. 夏枯草硫酸多糖对大鼠肝纤维化的保护作用及部分机制的研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2018.
- [4] 吴立兵, 申力军, 楚金东, 等. 肝纤维化诊断及治疗研究进展[J]. 中国实用医药, 2019, 14(10): 189-191.
- [5] FRIEDMAN S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury[J]. J Biol Chem, 2000, 275(4): 2247-2250.
- [6] ELPEK G Ö. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: an update[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(23): 7260-7276.
- [7] SHU M, HUANG D D, HUNG Z A, et al. Inhibition of MAPK and NF- κ B signaling pathways alleviate CCl₄-induced liver fibrosis in Toll-like receptor 5 (TLR5) deficiency mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 471(1): 233-239.
- [8] XIAO Y, WANG J, CHEN Y, et al. Up-regulation of miR-200b in biliary atresia patients accelerates proliferation and migration of hepatic stellate cells by activating PI3K/Akt signaling[J]. Cell Signal, 2014, 26(5): 925-932.
- [9] LI B, YANG Y A, CHEN L Z, et al. 18 α -Glycyrrhetic acid monoglucuronide as an anti-inflammatory agent through suppression of the NF- κ B and MAPK signaling pathway[J]. Medchemcomm, 2017, 8(7): 1498-1504.
- [10] 陈艳梅, 洪汝涛, 岳彩飞. 褪黑素对肝星状细胞中PI3K/AKT信号通路的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(12): 1908-1912.
- [11] 钟礼伦, 彭颖君, 林志东, 等. 鹿茸对骨代谢的影响及相关研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(12): 1861-1863, 1872.
- [12] 刘琳玲, 丛波, 姜洪梅, 等. 鹿茸多肽功能的研究进展[J]. 特产研究, 2009, 31(2): 67-70.
- [13] 李琳, 叶彤, 陈文凤, 等. 鹿茸多肽功能的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(1): 54-56.
- [14] 段冷昕. 梅花鹿茸多肽的化学结构及其抗肝纤维化作用[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [15] 罗晓旭, 肖蕾, 艾尼瓦尔·艾木都拉, 等. PI3K/Akt信号通路与

- 肝星状细胞活化的关系及其在放射性肝纤维化中的作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2015, 35(9): 652-656.
- [16] 罗煜, 吴嘉思, 朱正文, 等. 盐酸巴马汀抑制NF- κ B/p38 MAPK 信号通路及NLRP3炎症小体抗炎机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(7): 762-768.
- [17] 李朝政, 徐岩, 朱佳旭, 等. 鹿茸多肽对东莨菪碱所致大鼠学习记忆障碍作用及脑内ACh和AChE影响[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(3): 9-11.
- [18] 龚庆, 宋秋莹, 邱莉晶, 等. PLGA微球搭载鹿茸多肽对去卵巢骨质疏松大鼠保护作用研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(6): 813-817.
- [19] 孙成涛, 杨鹤祥, 于冬冬, 等. 基于BMP-2/Runx2信号通路探讨鹿茸多肽防治PMOP机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8): 1943-1946, 2060-2062.
- [20] 梁基智, 林洁茹, 谭海荣, 等. 水飞蓟宾对抗大鼠酒精性脂肪肝改善肝功能的作用(英文)[J]. 中国临床康复, 2006(7): 183-185.
- [21] 张立平, 赵晶晶, 郭子宁, 等. 芪莲纤化汤减轻大鼠慢性肝损伤的动态观察[J]. 天津中医药, 2010, 27(3): 230-232.
- [22] 吴聪, 张荣臻, 王挺帅, 等. 细胞因子对肝纤维化发展影响的研究进展[J/OL]. 海南医学院学报: 1-10[2020-12-03]. <https://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20200706.001>.
- [23] 方涵, 杨再兴. 肝纤维化的血清学诊断研究进展[J]. 浙江实用医学, 2020, 25(1): 76-78.
- [24] 王肖辉, 周霖, 杜秋争, 等. 五味子甲素对四氯化碳诱导小鼠肝纤维化的保护作用及其机制研究[J]. 中国药房, 2020, 31(22): 2725-2730.
- [25] 张琴, 黄涛, 卓强, 等. 肝纤维化中MAPK信号转导通路对肝星状细胞活性的影响[J]. 成都医学院学报, 2014, 9(4): 493-496.
- [26] 张智伟, 张生彬, 云哲琳. 细粒棘球蚴感染对小鼠肝纤维化及炎症因子水平的影响[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(1): 43-47.
- [27] 钟伟超, 周楚莹, 高磊, 等. 大黄蛰虫丸对小鼠酒精性肝纤维化损伤的保护作用[J]. 中成药, 2017, 39(12): 2475-2480.
- [28] 高雅, 韦日明, 黄思茂, 等. 基于TGF- β 1/Notch信号通路研究杠板归对二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化的作用机制[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 5(23): 2318-2321.
- [29] 李艳, 伊航, 蔡轶伦, 等. 黄芪总黄酮对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响[J]. 中成药, 2019, 41(7): 1710-1713.
- [30] LI X, WANG X, HAN C, et al. Astragaloside IV suppresses collagen production of activated hepatic stellate cells via oxidativestress-mediated p38 MAPK pathway[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 60(5): 168-176.
- [31] LIU Y, WEN X M, LU L H, et al. Therapeutic targeting of thePDGF and TGF- β -signaling pathways in hepatic stellate cells by PTK787/ZK22258[J]. Laboratory Investigation, 2009, 89(7): 1152-1160.
- [32] 孙雪梅, 黄秀昆, 朱勋帅, 等. 基于MAPK信号通路研究4-羟基苯并恶唑-2-酮抗肝纤维化的作用机制[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(1): 25-28.
- [33] 李娜, 肖倩. PI3K抑制剂对肝星状细胞PI3K/AKT通路及Ⅲ型胶原表达的影响[J]. 现代预防医学, 2014, 41(18): 3377-3380.
- [34] 阳光. PI3K/AKT信号通路及内质网应激在肝纤维化大鼠肝细胞凋亡中的作用[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(5): 614-618.

(编辑: 修春)