

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.10.015

鳖甲煎丸对肝纤维化模型大鼠肝组织中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白及其靶基因表达的影响孙海涛¹, 文彬², 陈冠新¹, 贾文燕³, 孙嘉玲¹, 安海燕¹, 庞杰¹, 杨雪梅¹, 贺松其^{*}

(1. 南方医科大学中医药学院, 广东省广州市白云区白云大道北 1838 号, 510515; 2. 中国人民解放军四五八医院; 3. 珠海市中西医结合医院)

摘要 目的 探讨鳖甲煎丸治疗肝纤维化的可能作用机制。方法 48 只大鼠随机分为空白对照组、模型组、秋水仙碱组和鳖甲煎丸低、中、高剂量组, 每组 8 只。除空白对照组外其余各组大鼠腹腔注射四氯化碳 (CCl₄) 建立肝纤维化模型。首次注射后第 2 天开始给药, 鳖甲煎丸低、中、高剂量分别给予为鳖甲煎丸混悬液 0.55、1.1、2.2 g/(kg·d) 灌胃, 秋水仙碱组给予秋水仙碱片混悬液 0.11 mg/(kg·d) 灌胃, 空白对照组和模型组给予 2 ml 生理盐水灌胃, 共 8 周。Masson 染色观察肝脏病理形态学改变; 检测各组大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 等肝功能指标, 及超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、羟脯氨酸 (HYP)、转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、结缔组织生长因子 (CTGF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 水平; Western blot 法检测大鼠肝组织中 β -链蛋白 (β -catenin)、糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)、磷酸化糖原合成酶激酶 3 β (p-GSK-3 β)、蛋白激酶 B (AKT) 和磷酸化蛋白激酶 B (p-AKT) 的表达。结果 与模型组比较, 鳖甲煎丸各剂量组均不同程度纤维组织增生明显减少, 血清 ALT、AST 含量及 MDA、HYP、TGF- β 1、CTGF、TNF- α 、VEGF 水平降低, SOD 水平升高 ($P < 0.05$), 肝组织中 β -catenin、p-GSK-3 β 和 p-AKT 蛋白表达明显减少, 且以鳖甲煎丸高剂量组效果更佳 ($P < 0.05$)。各组大鼠肝组织中 GSK-3 β 和 AKT 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 鳖甲煎丸能够显著减轻 CCl₄ 致大鼠肝纤维化的程度, 可能与其抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化、减少其下游靶基因的表达水平有关。

关键词 肝纤维化; 鳖甲煎丸; 肝功能; 氧化应激; Wnt/ β -catenin 信号通路; 靶基因

肝纤维化是肝脏对各种原因所致慢性肝损伤的创伤愈合反应, 导致肝小叶内和汇管区大量纤维组织增生和沉淀, 病理学特点是以胶原蛋白为主的细胞外基质各种成分合成增多, 降解相对不足, 但并未形成小叶内间隔 (再生结节)^[1]。肝纤维化可进一步发展为肝硬化, 并产生肝细胞功能障碍及门静脉高压等一系列并发症, 是导致肝细胞癌发生的重要病理基础。鳖甲煎丸出自东汉张仲景所著《金匮要略》, 具有益气养血、软坚散结、活血化瘀等作用。前期体外实验表明, 鳖甲煎丸可通过调控 Wnt 信号通路抑制肝星状细胞的活化、增殖, 从而达到抗肝纤维化的目的^[2]。在此基础上, 本

实验采用四氯化碳 (CCl₄) 腹腔注射制备大鼠肝纤维化模型, 进一步探讨鳖甲煎丸抗肝纤维化的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 48 只, 体重 (200 ± 20) g, 由南方医科大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SYXK (粤) 2016-0167。

1.2 实验药品

鳖甲煎丸购自武汉中联药业集团股份有限公司 (批号: 160560), 组成: 鳖甲胶、阿胶、蜂房 (炒)、土鳖虫 (炒)、鼠妇虫、蜣螂、大黄、桃仁、牡丹皮、射干、黄芩、柴胡、干姜、白芍 (炒)、桂枝、葶苈子、石韦、厚朴 (姜制)、瞿

基金项目: 国家自然科学基金 (81373807)

* 通讯作者: hesongqijz@126.com

麦、制半夏、硝石（精制）、党参。秋水仙碱片购自西双版纳药业有限公司（批号：130390）。

1.3 主要试剂及仪器

CCl_4 （批号：20161015），广州光华科技股份有限公司；Masson 染色试剂盒（批号：0901A16），北京雷根生物技术有限公司；超氧化物歧化酶（SOD，批号：2016117）、丙二醛（MDA，批号：2016117）和羟脯氨酸（HYP，批号：20131220）试剂盒，均购自南京建成生物工程研究所；转化生长因子 $\beta 1$ （TGF- $\beta 1$ ，批号：CSB-E04727r）、结缔组织生长因子（CTGF，批号：CSB-E07876r）、肿瘤坏死因子 α （TNF- α ，批号：CSB-E11987r）和血管内皮生长因子（VEGF，批号：CSB-E04757r）ELISA 试剂盒，均购自武汉基因美科技有限公司； β -链蛋白（ β -catenin，批号：8480s）、糖原合成酶激酶 3β （GSK- 3β ，批号：12456s）、磷酸化糖原合成酶激酶 3β （p-GSK- 3β ，批号：5558s）、蛋白激酶 B（AKT，批号：2920s）和磷酸化蛋白激酶 B（p-AKT，批号：15116s）抗体，均购自 CST 公司；RIPA 裂解液（批号：P0013B），上海碧云天生物技术有限公司；BCA 法蛋白浓度测定试剂盒（批号：RD232685），美国 Thermo 公司；ECL 发光试剂盒（批号：1627007），密理博中国有限公司。

HF-220 型全自动生化分析仪，山东海力孚企业管理有限公司；MULTISKAN GO 型酶标仪，美国 Thermo 公司；Mini-Protein 电泳槽，美国 Bio-Rad 公司；PVDF 膜，广州浩玛生物科技有限公司；Kodak Image Station 2000MM 成像系统，美国 KODAK 公司；H600L 型光学显微镜，日本尼康公司。

1.4 模型制备及给药

48 只大鼠按随机数字表法分为空白对照组、模型组、秋水仙碱组和鳖甲煎丸低、中、高剂量组，每组 8 只。除空白对照组外其余各组大鼠首次腹腔注射含 40% 的 CCl_4 花生油 3 ml/kg，以后每 3 日注射 2 ml/kg，共 8 周建立肝纤维化模型^[3]，空白对照组腹腔注射等体积花生油。首次注射后第 2 天开始给药。鳖甲煎丸低、中、高剂量分别给予鳖甲煎丸混悬液 0.55、1.1、2.2 g/(kg·d) 灌胃，相当于人体日用剂量的 3.5、7、14 倍；秋水仙碱组给予秋水仙碱片混悬液 0.11 mg/(kg·d) 灌胃，相当于人体日用剂量的 7 倍。空白对照组和模型组给予 2 ml 生理盐水灌胃。每 3 天称重 1 次以调整药量，共 8 周。

1.5 观察指标及方法

第 8 周末次给药后，使用 2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉，腹主动脉采血，4℃ 静置 4h，3000 r/min 离心 20 min，分离血清，-80℃ 冷藏备用。取肝左叶，一部分 10% 福尔马林固定，一部分 -80℃ 分装冷藏备用。

1.5.1 肝组织病理学观察及分级标准 取肝组织石蜡切片行常规 Masson 染色。梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树脂封片，在光学显微镜下观察组织损伤情况。肝纤维化程度分级^[4]：0 级：正常肝脏，未见肝纤维化；I 级：包括汇管区、汇管区周围纤维化和窦周纤维化，或小叶内纤维瘢痕，二者均不影响小叶结构的完整性；II 级：可见纤维间隔即桥接纤维化，虽有纤维间隔形成，但小叶结构大部仍保留；III 级：大量纤维间隔，分隔并破坏肝小叶，致小叶结构紊乱，但尚无肝硬化；IV 级：早期肝硬化，肝实质广泛破坏，弥漫性纤维增生，被分隔的肝细胞团呈不同程度的再生及假小叶形成。

1.5.2 肝功能指标 包括丙氨酸氨基转移酶（ALT）、门冬氨酸氨基转移酶（AST）、血清总蛋白（TP）、球蛋白（GLB）、白蛋白（ALB），由南方医科大学中西医结合医院检测。

1.5.3 相关血清氧化应激指标及细胞因子表达 氧化应激指标包括 SOD、MDA、HYP，细胞因子包括 TGF- $\beta 1$ 、CTGF、TNF- α 和 VEGF，均采用 ELISA 法检测，按照试剂盒说明书步骤进行。

1.5.4 肝组织 β -catenin、GSK- 3β 、p-GSK- 3β 、AKT 和 p-AKT 的表达水平 采用 Western blot 法检测，取大鼠肝组织，按照试剂盒说明书提取总蛋白。BCA 蛋白定量法测各组蛋白浓度。用细胞裂解液将各组蛋白稀释至等浓度，与 $5 \times$ 上样缓冲液按 4 : 1 混合，98℃ 变性 5 min。每组取蛋白 60 μ g，12% SDS-PAGE 凝胶电泳（100V，100 min），转膜以恒流 300 mA，转移 100 min 至 PVDF 膜；5% 脱脂奶粉室温摇床上封闭 1 h，孵一抗（1 : 1000）4℃ 过夜，TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，封闭液稀释二抗（1 : 5000）后，常温下孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次，每次 10 min，ECL 发光试剂盒在曝光仪中进行曝光，以内参 GAPDH 为对照，采用 Image J 1.42q 软件进行灰度分析。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 19.0 进行统计分析，计量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用单因素方差分析，等级资料采用秩和检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏组织病理形态学改变

空白对照组大鼠肝细胞完整, 仅于汇管区及中央静脉有少量胶原纤维存在, 肝细胞以中央静脉为中心呈条索状放射排列, 无炎性细胞浸润, 无纤维组织增生; 模型组大鼠肝组织中大量胶原纤维增生, 肝细胞肿胀坏死, 脂肪变性使得细胞呈空泡状, 汇管区呈明显的桥样纤维化, 并向肝小叶内延伸, 形成较粗大的纤维间隔; 秋水仙碱组及鳖甲煎丸高、中剂量组大鼠肝组织中胶原纤维增生较模型组明显减少, 仅分布于汇管区及血管周围, 且纤维间隔薄, 不完全分割肝小叶, 但秋水仙碱组的肝细胞气球样变性坏死比鳖甲煎丸组明显。表 1 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠肝纤维化程度分级升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸高剂量组及秋水仙碱组肝纤维化程度分级降低 ($P < 0.05$); 鳖甲煎丸低、中剂量组较鳖甲煎丸高剂量

表 1 各组大鼠肝纤维化程度分级比较 (只)

组别	鼠数	0	I	II	III	IV
空白对照组	8	8	0	0	0	0
模型组	8	0	0	1	3	4
鳖甲煎丸低剂量组	8	0	0	6	1	1
鳖甲煎丸中剂量组	8	0	3	4	1	0
鳖甲煎丸高剂量组	8	1	5	2	0	0
秋水仙碱组	8	0	5	3	0	0

组肝纤维化程度分级升高 ($P < 0.05$), 而鳖甲煎丸高剂量组与秋水仙碱组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠肝功能指标比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠 ALT、AST 水平升高, TP、ALB、GLB 降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组 ALT、AST 水平下降 ($P < 0.05$), 且与空白对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 秋水仙碱组 ALT、AST 水平较模型组亦下降, 但仍较空白对照组高 ($P < 0.05$)。鳖甲煎丸低、中、高剂量组和秋水仙碱组大鼠 TP、ALB、GLB 水平均低于空白对照组 ($P < 0.05$), 但中药低剂量组 TP、ALB 水平较模型组升高, 秋水仙碱组 TP、ALB、GLB 亦较模型组升高 ($P < 0.05$)。鳖甲煎丸高、中、低剂量组及与秋水仙碱组各指标组间两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠血清中相关氧化应激指标水平比较

表 3 示, 与空白对照组比较, 模型组大鼠血清 MDA、HYP 水平升高, SOD 水平降低 ($P < 0.05$); 鳖甲煎丸低、中、高剂量组和秋水仙碱组大鼠血清 HYP 水平均高于空白对照组 ($P < 0.05$)。与模型组和鳖甲煎丸低剂量组比较, 鳖甲煎丸中、高剂量组及秋水仙碱组 MDA、HYP 水平降低, SOD 水平显著增高 ($P < 0.05$); 鳖甲煎丸高剂量组与秋水仙碱组 MDA、HYP 水平均低于鳖

表 2 各组大鼠肝功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	GLB (g/L)
空白对照组	8	52.90 ± 12.56	160.77 ± 30.15	76.00 ± 9.89	47.88 ± 5.55	28.12 ± 4.91
模型组	8	147.33 ± 64.80*	480.35 ± 264.51*	45.18 ± 8.97*	29.25 ± 6.09*	15.93 ± 4.38*
鳖甲煎丸低剂量组	8	75.00 ± 11.48 [△]	206.57 ± 66.70 [△]	57.87 ± 4.69* [△]	38.87 ± 4.21* [△]	19.00 ± 2.48*
鳖甲煎丸中剂量组	8	75.14 ± 29.19 [△]	195.74 ± 57.14 [△]	51.74 ± 8.04*	33.59 ± 4.80*	18.15 ± 4.60*
鳖甲煎丸高剂量组	8	84.33 ± 19.90 [△]	186.57 ± 72.40 [△]	46.67 ± 3.00*	31.43 ± 2.77*	15.24 ± 1.19*
秋水仙碱组	8	87.81 ± 17.69* [△]	304.52 ± 133.14* [△]	56.88 ± 12.53* [△]	36.20 ± 7.68* [△]	20.68 ± 5.98* [△]

注: ALT, 丙氨酸氨基转移酶; AST, 门冬氨酸氨基转移酶; TP, 血清总蛋白; GLB, 球蛋白; ALB, 白蛋白; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 各组大鼠血清 SOD、MDA、HYP 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)	HYP (μg/L)
空白对照组	8	185.084 ± 6.522	4.480 ± 0.428	199.449 ± 17.892
模型组	8	102.887 ± 12.688*	14.840 ± 2.377*	347.528 ± 18.675*
鳖甲煎丸低剂量组	8	129.992 ± 15.852	12.040 ± 2.016	289.092 ± 19.795* [△]
鳖甲煎丸中剂量组	8	159.948 ± 8.775 [△]	10.140 ± 1.251 [△]	260.985 ± 15.573* [△]
鳖甲煎丸高剂量组	8	167.448 ± 6.576 [△]	6.220 ± 0.995 [△]	234.502 ± 12.283* [△]
秋水仙碱组	8	162.716 ± 9.629 [△]	6.380 ± 0.809 [△]	243.661 ± 15.531* [△]

注: SOD, 超氧化物歧化酶; MDA, 丙二醛; HYP, 羟脯氨酸; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与鳖甲煎丸低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与鳖甲煎丸中剂量组比较, # $P < 0.05$

甲煎丸中剂量组 ($P < 0.05$)。鳖甲煎丸低剂量组 HYP 水平低于模型组 ($P < 0.05$)。鳖甲煎丸高剂量组与秋水仙碱组大鼠血清 SOD、MDA、HYP 水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

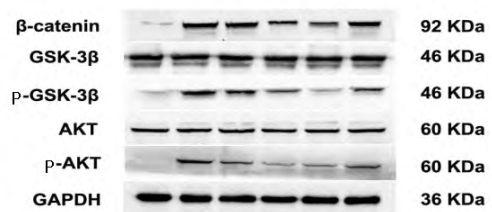
2.4 各组大鼠血清中相关细胞因子水平比较

表 4 示, 除鳖甲煎丸高剂量组血清 TNF- α 水平与空白对照组差异无统计学意义外, 其余各组血清 CTGF、TGF- β 1、TNF- α 、VEGF 水平均高于空白对照组 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组及秋水仙碱组血清 CTGF、TGF- β 1、TNF- α 、VEGF 水平均降低 ($P < 0.05$), 且鳖甲煎丸各剂量组两两比较差异有统计学意义, 以鳖甲煎丸高剂量组降低最明显 ($P < 0.05$)。鳖甲煎丸高剂量组大鼠血清 CTGF、VEGF 水平与秋水仙碱组比较差异无统计学意义组 ($P > 0.05$), 而 TGF- β 1 水平高于秋水仙碱组, TNF- α 水平低于秋水仙碱组 ($P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠肝组织 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达比较

表 5 示, 与空白对照组比较, 其余各组大鼠肝组织 β -catenin、p-GSK-3 β 和 p-AKT 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组和秋水仙碱组大鼠肝组织 β -catenin、p-GSK-3 β 和 p-AKT 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$), 且

鳖甲煎丸各剂量组组间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 除秋水仙碱组 p-AKT 蛋白表达与鳖甲煎丸低剂量组差异无统计学意义外, β -catenin、p-GSK-3 β 和 p-AKT 蛋白表达与鳖甲煎丸各剂量组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组大鼠肝组织 GSK-3 β 和 AKT 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠肝组织 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白电泳图见图 1。



注: β -catenin, β -链蛋白; GSK-3 β , 糖原合成酶激酶 3 β ; p-GSK-3 β , 磷酸化糖原合成酶激酶 3 β ; AKT, 蛋白激酶 B; p-AKT, 磷酸化蛋白激酶 B;

图 1 各组大鼠肝组织 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白电泳图

3 讨论

肝纤维化根据其病因、病机以及临床表现, 可归属于中医学“胁痛”“积聚”等范畴。多由外感湿热、感染疫毒或饮酒过度酿生湿热, 湿热羁留不去, 导致气滞血瘀, 津液涩滞, 肝络瘀阻而成。鳖

表 4 各组大鼠血清 CTGF、TGF- β 1、TNF- α 、VEGF 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CTGF	TGF- β 1	TNF- α	VEGF
空白对照组	8	10.111 $\pm$ 1.615	30.138 $\pm$ 8.339	8.832 $\pm$ 2.084	7.012 $\pm$ 1.232
模型组	8	82.079 $\pm$ 8.508*	239.774 $\pm$ 1.827*	23.297 $\pm$ 1.883*	151.193 $\pm$ 8.236*
鳖甲煎丸低剂量组	8	57.045 $\pm$ 4.050* Δ	127.418 $\pm$ 10.106* Δ	17.257 $\pm$ 0.625* Δ	110.460 $\pm$ 9.754* Δ
鳖甲煎丸中剂量组	8	32.602 $\pm$ 3.985* Δ $\blacktriangle$	101.803 $\pm$ 1.992* Δ $\blacktriangle$	15.571 $\pm$ 0.436* Δ $\blacktriangle$	81.417 $\pm$ 13.374* Δ $\blacktriangle$
鳖甲煎丸高剂量组	8	16.461 $\pm$ 2.138* Δ $\blacktriangle$ $\#$	71.047 $\pm$ 12.174* Δ $\blacktriangle$ $\#$	11.862 $\pm$ 0.638* Δ $\blacktriangle$ $\#$	23.106 $\pm$ 3.754* Δ $\blacktriangle$ $\#$
秋水仙碱组	8	16.734 $\pm$ 2.299* Δ $\blacktriangle$ $\#$ $\star$	42.175 $\pm$ 3.216* Δ $\blacktriangle$ $\#$ $\star$	14.337 $\pm$ 0.909* Δ $\blacktriangle$ $\#$ $\star$	29.431 $\pm$ 5.896* Δ $\blacktriangle$ $\#$

注: CTGF, 结缔组织生长因子; TGF- β 1, 转化生长因子 β 1; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; VEGF, 血管内皮生长因子; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与鳖甲煎丸低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与鳖甲煎丸中剂量组比较, $\# P < 0.05$; 与鳖甲煎丸高剂量组比较, $\star P < 0.05$

表 5 各组大鼠肝组织 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	β -catenin	p-GSK-3 β	p-AKT	GSK-3 β	AKT
空白对照组	8	0.089 $\pm$ 0.013	0.091 $\pm$ 0.001	0.141 $\pm$ 0.036	0.657 $\pm$ 0.044	0.444 $\pm$ 0.010
模型组	8	0.733 $\pm$ 0.034*	0.615 $\pm$ 0.023*	0.544 $\pm$ 0.028*	0.671 $\pm$ 0.062	0.450 $\pm$ 0.029
鳖甲煎丸低剂量组	8	0.578 $\pm$ 0.012* Δ	0.420 $\pm$ 0.027* Δ	0.314 $\pm$ 0.021* Δ	0.623 $\pm$ 0.025	0.471 $\pm$ 0.014
鳖甲煎丸中剂量组	8	0.368 $\pm$ 0.034* Δ $\blacktriangle$	0.340 $\pm$ 0.012* Δ $\blacktriangle$	0.220 $\pm$ 0.022* Δ $\blacktriangle$	0.711 $\pm$ 0.060	0.462 $\pm$ 0.027
鳖甲煎丸高剂量组	8	0.293 $\pm$ 0.019* Δ $\blacktriangle$ $\#$	0.147 $\pm$ 0.014* Δ $\blacktriangle$ $\#$	0.247 $\pm$ 0.025* Δ $\blacktriangle$ $\#$	0.628 $\pm$ 0.095	0.447 $\pm$ 0.023
秋水仙碱组	8	0.421 $\pm$ 0.055* Δ $\blacktriangle$ $\#$ $\star$	0.284 $\pm$ 0.012* Δ $\blacktriangle$ $\#$ $\star$	0.345 $\pm$ 0.054* Δ $\blacktriangle$ $\#$ $\star$	0.599 $\pm$ 0.050	0.431 $\pm$ 0.021

注: β -catenin, β -链蛋白; GSK-3 β , 糖原合成酶激酶 3 β ; p-GSK-3 β , 磷酸化糖原合成酶激酶 3 β ; AKT, 蛋白激酶 B; p-AKT, 磷酸化蛋白激酶 B; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与鳖甲煎丸低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与鳖甲煎丸中剂量组比较, $\# P < 0.05$; 与鳖甲煎丸高剂量组比较; $\star P < 0.05$

甲煎丸具有益气养血、软坚散结、活血化瘀等作用,临床主要用于治疗肝纤维化、肝硬化及肝癌,疗效确切^[1]。秋水仙碱用于抗肝纤维化治疗,可抑制肝细胞内微血管形成,干扰胶原分泌,促进胶原降解,从而达到抗肝纤维化的目的,但在临床中由于其副作用较大而不能广泛使用,故选其作为阳性对照药^[2]。肝纤维化病理本质是肝星状细胞被激活,以胶原为主的细胞外基质合成增多,降解相对减少,两者失去动态平衡,致使过多的细胞外基质沉积于肝内引起肝纤维化^[3]。本研究秋水仙碱组及鳖甲煎丸高、中剂量组大鼠肝组织中胶原纤维增生较模型组明显减少,仅分布于汇管区及血管周围,且纤维间隔薄,表明鳖甲煎丸和秋水仙碱均可明显改善 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化。

肝纤维化有明显的脂质过氧化损害,MDA 是氧自由基与细胞膜表面不饱和脂肪酸脂质过氧化反应的终末产物,而 SOD 是细胞内天然的氧自由基清除剂^[4]。HYP 是胶原蛋白的主要成分之一,当肝纤维化时,肝功能受损,胶原蛋白合成增加,故 HYP 含量变化是反映肝纤维化程度的直接指标^[5]。本实验结果显示,鳖甲煎丸可降低大鼠血清 ALT、AST 水平,且效果等同于秋水仙碱片,并能够改善大鼠血清中 TP、ALB 的表达水平。同时,鳖甲煎丸可提高大鼠血清中 SOD 表达,抑制 MDA 及 HYP 的表达,说明其能提高肝组织的抗氧化酶 SOD 活性,并能抑制氧自由基引起的脂质过氧化反应,使 MDA 及 HYP 生成减少,从而对肝组织起保护作用,使大鼠肝纤维化减轻。

现代研究表明,多条细胞信号通路参与了肝纤维化的发生发展,Wnt/ β -catenin 信号通路与肝纤维化间的密切关系也日益受到重视^[6]。Wnt 信号转导通路是一种高度保守的信号转导通路,对个体的生长、发育、代谢等生物学过程具有主导调节作用,其异常激活与各种疾病的发生发展有着密切的联系^[7]。 β -catenin 是一种具有介导细胞黏附与信号转导双重活性的多功能蛋白^[8]。 β -catenin 在活化的肝星状细胞中高表达,在其他肝星状细胞参与的许多病理生理过程中, β -catenin 也表达异常^[9]。研究表明,GSK-3 β 磷酸化后,使 β -catenin 避免被 GSK-3 β 磷酸化,导致 β -catenin 在细胞质中逐渐堆积,当积累到一定程度,则向细胞核内转移,进一步导致 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化^[10]。AKT 为蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 家族成员,AKT 磷酸化后活化,AKT 活化后能够使 GSK-3 β 磷酸化并失活,从而丧失诱导细胞凋亡的作用^[11]。本实验结果表明,鳖甲

煎丸可以降低大鼠肝脏组织中 β -catenin 的表达,同时可减少 p-GSK-3 β 和 p-AKT 的表达水平,但对 GSK-3 β 及 AKT 的表达水平无显著影响,其机制可能与抑制 AKT 的活化,从而减少 GSK-3 β 磷酸化,进一步促进 β -catenin 的降解,达到抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化有关。

Wnt/ β -catenin 信号通路活化后,可调控下游一系列靶基因的转录与表达,从而参与肝纤维化的发生发展。TGF- β 1 可促使肝星状细胞转化为肌成纤维细胞并分泌胶原纤维,具有强烈促进细胞外基质合成的作用,可促进胶原沉积以及静息肝星状细胞的激活^[12]。CTGF 被认为是 TGF- β 1 发挥生物学效应的下游因子,介导 TGF- β 1 促进细胞外基质的合成、抑制细胞外基质分解的作用,从而导致细胞外基质的过度沉积^[13]。TNF- α 能介导肝细胞、肝星状细胞产生 TGF- β 1,增强肝间质细胞分泌和合成细胞外基质,促进肝星状细胞的活化与增殖^[14]。同时,Wnt/ β -catenin 信号通路活化后可显著上调下游靶基因 VEGF 的表达,而在肝纤维化大鼠的肝组织及体外培养的肝细胞和活化的肝星状细胞中 VEGF 表达增加,并能够促进活化的肝星状细胞增殖及表达 I 型前胶原^[15]。本研究结果表明,鳖甲煎丸可显著抑制肝纤维化大鼠血清中 TGF- β 1、CTGF、TNF- α 及 VEGF 的表达水平,这可能与鳖甲煎丸能够抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化有关。

参考文献

- [1] FRIEDMAN SL. Liver fibrosis—from bench to bedside [J]. J Hepatol, 2003, 38(Suppl 1): S38-S53.
- [2] 孙海涛,贺松其,文彬,等. 鳖甲煎丸对肝星状细胞中 β -catenin 及 NF- κ B 信号通路活化的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 2-6.
- [3] 邵佳亮,万赞燕,胡国信. 四氯化碳诱导大鼠肝纤维化模型改良的研究 [J]. 南昌大学学报(医学版), 2011, 51(7): 40-42.
- [4] 中华肝脏病学肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识 [J]. 中华肝病杂志, 2002, 10(5): 8-9.
- [5] 钱彦方,腰向颖. 中医药论治肝癌 21 例分析 [J]. 河北中医药学报, 2010, 25(3): 13-14.
- [6] 夏海珊,陈少茹,钟月春,等. 肝纤维化的发病机制和药物治疗现状 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(18): 162-165.
- [7] YANG Y, KIM B, PARK YK, et al. Astaxanthin prevents TGF β 1-induced pro-fibrogenic gene expression by inhibiting Smad3 activation in hepatic stellate cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(1): 178-185.
- [8] 周宗灿. 氧化还原信号和氧化应激/还原应激 [J]. 毒理

学杂志, 2015, 29(1): 1-14.

- [9] CAVIGLIA GP, CIANCIO A, ROSSO C, et al. Non-invasive methods for the assessment of hepatic fibrosis: transient elastography, hyaluronic acid, 13C-aminopyrine breath test and cytokeratin 18 fragment [J]. Ann Hepatol, 2013, 13(1): 91-97.
- [10] BATALLER R, BRENNER DA. Liver fibrosis [J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209-218.
- [11] 尹定子, 宋海云. Wnt 信号通路: 调控机理和生物学意义 [J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(2): 103-111.
- [12] VEEMAN MT, AXELROD JD, MOON RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling [J]. Dev Cell, 2003, 5(3): 367-377.
- [13] MIKULA M, PROELL V, FISCHER AN, et al. Activated hepatic stellate cells induce tumor progression of neoplastic hepatocytes in a TGF-beta dependent fashion [J]. J Cell Physiol, 2006, 209(2): 560-567.
- [14] CADIGAN KM. Wnt/beta-catenin signaling: turning the

switch [J]. Dev Cell, 2008, 14(3): 322-323.

- [5] XU G, LI Y, YOSHIMOTO K, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin stimulates proliferation of HAPI microglia by affecting the Akt/GSK-3beta/cyclin D1 signaling pathway [J]. Toxicol Lett, 2014, 224(3): 362-370.
- [6] 王岁霞. 转化生长因子 β_1 在肝纤维化中的作用 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2007, 28(10): 1225-1227.
- [7] GRESSNER OA, LAHME B, SILUSCHEK M, et al. Connective tissue growth factor is a Smad2 regulated amplifier of transforming growth factor beta actions in hepatocytes—but without modulating bone morphogenetic protein 7 signaling [J]. Hepatology, 2009, 49(6): 2021-2030.
- [8] 陈晓红, 何有成, 周元平, 等. TGF- β_1 、TNF- α 及 IL-6 与肝纤维化的关系 [J]. 上海免疫学杂志, 2001, 21(6): 364-365.
- [9] ZHANG X, GASPARD JP, CHUNG DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia [J]. Cancer Res, 2001, 61(16): 6050-6054.

Effect of *Biejiajian Pill* (鳖甲煎丸) on Wnt/ β -catenin Pathway Associated Protein and its Target Gene Expression in Liver Tissue of Hepatic Fibrosis Model Rats

SUN Haitao¹, WEN Bin², CHEN Guanxin¹, JIA Wenyan³, SUN Jialing¹, AN Haiyan¹, PANG Jie¹, YANG Xuemei¹, He Songqi¹

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, 510515; 2. Hospital of 448 Chinese People's Liberation Army; 3. Zhuhai Integrative Medicine Hospital)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Biejiajian Pill* (鳖甲煎丸, BJJP) in the treatment of hepatic fibrosis. **Methods** Forty-eight rats were randomly divided into blank control group, model group, colchicine group, and BJJP low, medium, and high dose groups, with 8 rats in each group. Except the blank control group, rats in the other groups were injected intraperitoneally with carbon tetrachloride (CCl₄) to establish a hepatic fibrosis model. On the 2nd day after the first injection, the low, medium, and high doses of BJJP were administered to BJJP 0.55, 1.1, and 2.2 g/(kg · d) gavage, respectively. The colchicine group was given Colchicine tablets suspension 0.11 mg / (kg · d) gavage. Blank control group and model group were given 2 ml saline gavage, for a total of 8 weeks. Masson staining was used to observe the pathological changes of liver. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), liver function index and superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), hydroxyproline (HYP), transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1), connective tissue growth factor (CTGF), tumor necrosis factor α (TNF- α), and vascular endothelial growth factor (VEGF) level were detected. Western blot was used to detect the expression of β -catenin, glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), phosphorylated glycogen synthase kinase 3 β (p-GSK-3 β), protein kinase B (AKT) and phosphorylated protein kinase B (p-AKT). **Results** Compared with the model group, the fibrous tissue hyperplasia was significantly reduced in different doses of BJJP groups. Serum ALT, AST levels and levels of MDA, HYP, TGF- β_1 , CTGF, TNF- α and VEGF were decreased and SOD levels were increased ($P < 0.05$). The expression of β -catenin, p-GSK-3 β and p-AKT protein in liver tissue was significantly reduced, and the effect of high dose of BJJP was better ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of GSK-3 β and AKT protein of the liver tissues in each group ($P > 0.05$). **Conclusion** BJJP can significantly reduce the degree of hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats, which may be related to its inhibition of the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway and the decrease of its downstream target gene expression. **Keywords** liver fibrosis; *Biejiajian Pill* (鳖甲煎丸); liver function; oxidative stress; Wnt/ β -catenin signaling pathway; target gene

(收稿日期: 2017 - 10 - 19; 修回日期: 2018 - 02 - 04)

编辑: 邓 媛