

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.23.015

## 实验研究

# 疏肝健脾活血方含药血清对肝纤维化模型大鼠肝窦内皮细胞失窗孔化的影响

夏雪皎, 黄桢, 鲁军, 杨东升, 周凝, 张俊杰\*

(浙江中医药大学, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053)

**摘要** 目的 探讨疏肝健脾活血方治疗肝纤维化的可能作用机制。方法 10 只 SD 大鼠以 10 ml/kg 疏肝健脾方浓缩液 (浓度 2.7 g/ml) 灌胃, 每日 1 次, 连续 3 天后制备含药血清。中药血清设 5%、10%、15%、20%、25% 共 5 个浓度, 采用 MTT 法筛选实验药物浓度。采用四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 腹腔注射建立肝纤维化大鼠模型后分离肝纤维化肝窦内皮细胞 (SEC), 同时集正常大鼠肝星状细胞 (HSC) 和 SEC。实验分为正常组、模型组、DAPT 组、NF 组、中药组、中药加 DAPT 组、中药加 NF 组, 共 7 组。各组均加入 HSC, 正常组加入正常大鼠 SEC, 其余组加入肝纤维化大鼠 SEC, 常规培养 24 h。吸出上清液, DAPT 组、中药加 DAPT 组加入 0.2 μmol/L DAPT (Notch 通路阻断剂), NF 组、中药加 NF 组加入 1 gsu/ml rhNF-κB (Notch 通路激动剂)。前 4 组加入含 10% FBS DMEM/12 培养基, 后 3 组加入含预筛选浓度中药血清、10% FBS DMEM/12 培养基, 培养 72 h 后 MTT 法检测各组 HSC 活力, Western Blot 法检测 SEC 中 CD31、vWF 蛋白表达情况。结果 筛选出 10% 浓度的中药血清对细胞增殖有抑制作用。与正常组比较, 造模 2、4、8 周模型组 HSC 活力上升, 造模 4、8 周 CD31 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, NF 组 HSC 活力上升, DAPT 组和中药组 HSC 活力、CD31、vWF 蛋白表达下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与 NF 组比较, 中药加 NF 组 HSC 活力、CD31、vWF 蛋白表达下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与 DAPT 组比较, 中药加 DAPT 组 HSC 活力、CD31、vWF 蛋白表达均下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 疏肝健脾活血方可通过干预 Notch 通路, 抑制 HSC 活力及 SEC 失窗孔化, 可能是其治疗肝纤维化的作用机制之一。

**关键词** 肝纤维化; 疏肝健脾活血方; 肝星状细胞; 肝窦内皮细胞; 失窗孔化; Notch 通路

肝纤维化特征为细胞外基质过度沉积<sup>[1]</sup>, 目前认为肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 是细胞外基质的主要来源, 是肝纤维化形成和逆转的中心环节<sup>[2]</sup>。肝窦内皮细胞 (sinusoidal endothelial cell, SEC) 生理状态下具有特征性窗孔, 通过分隔肝窦腔与窦周间隙而控制肝细胞与血液的物质交换, 调节肝脏代谢<sup>[3]</sup>。慢性肝病的主要特征为肝内病理性血管重建, 包括肝窦毛细血管化及肝内分流; 前者即 SEC 失窗孔化, 通过影响肝脏代谢、加重肝细胞供养障碍而促进肝纤维化发展<sup>[4]</sup>。因此, 有效抑制 HSC 活化及 SEC 失窗孔将对逆转肝纤维化起积极作用。本实验通过分离正常大鼠 HSC、SEC 及肝纤维化大鼠 SEC 进行培养, 激活或

阻断 Notch 通路及应用疏肝健脾活血方含药血清进行干预, 检测 HSC 活力及 SEC 中 CD31、vWF 蛋白表达量变化, 探讨疏肝健脾活血方对 HSC 活化及 SEC 失窗孔化的影响。本实验方案经浙江中医药大学伦理审批, 批号: ZSLL-2016-430。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 8 周龄, 体质量 (220 ± 20) g, 由浙江中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2013-0016。所有大鼠适应性饲养 1 周后进行实验。

### 1.2 药品

疏肝健脾活血方组成: 桃仁 15 g, 桂枝 10 g, 大黄 6 g, 甘草 8 g, 莪术 10 g, 白术 10 g, 香附 10 g, 鳖甲 15 g, 三七 3 g, 茯苓 15 g, 丹参 30 g,

基金项目: 国家自然科学基金 (81473647)

\* 通讯作者: zhangjunjie70@aliyun.com, (0571) 86633105

大枣 30 g。由浙江中医药大学门诊部提供, 经 2 次水煎, 合并煎出液, 水浴浓缩至含原生药 2.7 g/ml, 纱布过滤, 4℃ 分装保存。

### 1.3 主要试剂及仪器

水合氯醛 (批号: 30247-0), 上海麦克林生化科技有限公司; 四氯化碳 ( $\text{CCl}_4$ , 批号: P1203309), Adamas Reagent 公司; 胎牛血清 (FBS, 批号: 1414426)、DMEM/F12 培养基 (批号: 8116105), 均购自 Gibco 公司; 二甲基亚砜 (DMSO, 批号: RNBF0274)、IV 型胶原酶 (批号: 20170611), 均购自 Sigma 公司; DNase I (批号: 2017040101), Thermo 公司; Percoll 分离液 (批号: 20170416)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: 20170502)、台盼蓝染色液 (批号: 20170204)、噻唑兰 (MTT, 批号: 20170111), 均购自 Solarbio 公司; 兔抗大鼠 CD14 (批号: 873703757705)、兔抗大鼠  $\alpha$  平滑肌激动蛋白 ( $\alpha$ -SMA, 批号: 873703275691), 均购自 CST 公司; Alexa Fluor 488 二抗 (批号: 20170516)、rhNF- $\kappa$ B (批号: 20170523), 均购自 Promega 公司; DAPT (批号: 20170418), Medchem Express 公司; GAPDH 一抗 (批号: GR290250-1), Abcam 公司; 兔抗大鼠 CD31 (批号: 04/2017)、兔抗大鼠 vWF (批号: 06/2017), CST 公司。

3111 型细胞培养箱, Heraeus Multifuge 公司; X1R 型高速离心机, Thermo 公司; 0.4  $\mu\text{m}$  Transwell 半透膜, Corning 公司; DS-Ri2 型高级分析免疫显微镜, Nikon 公司; IX73 型倒置荧光显微镜, 奥林巴斯公司; 30050303 型多功能酶标仪, TECAN 公司。

## 2 方法

### 2.1 含药血清制备

采用随机数字表法选取 10 只正常 SD 大鼠按 10 ml/kg 灌胃疏肝健脾活血方浓缩液, 每日 1 次, 连续 3 天。末次灌胃后禁食不禁水 12 h, 取 10% 水合氯醛按 0.35 ml/100 g 腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 分离血清, 经水浴灭活、微孔膜过滤, -70℃ 冻存备用。

### 2.2 肝纤维化模型建立

采用随机数字表法选取 10 只正常 SD 大鼠, 以 0.3 ml/100 g 腹腔注射 40%  $\text{CCl}_4$  (与花生油按 2:3 配制), 每 4 天 1 次, 连续 8 周建立肝纤维化大鼠模型<sup>[8]</sup>。分别于 2、4、8 周取材镜下观察肝

组织病理变化, 参照文献 [6] 进行肝纤维化病理分期。

### 2.3 HSC、SEC 提取及鉴定

采用随机数字表法选取 20 只正常 SD 大鼠分离正常原代 HSC、SEC, 10 只模型大鼠用于分离肝纤维化 SEC。按吕文良等<sup>[9]</sup>方法进行, 经胶原酶原位结合离体灌注、Percoll 不连续密度梯度离心及 Kupffer 细胞选择性贴壁后, 分离得到原代 SEC、HSC, 用含 10% FBS DMEM/12 培养基培养。台盼蓝染色检测细胞得率及活率, 倒置相差显微镜下观察 SEC、HSC 形态, 328nm 紫外光观察 HSC 胞浆中  $\text{V}_A$  脂滴荧光。以 CD14、 $\alpha$ -SMA 分别鉴定 SEC、HSC: 细胞按  $2 \times 10^4$  个/孔密度接种, 爬片过夜; 4% PFA 4℃ 固定 20 min, 玻片封闭液室温通透 20 min, 10% 山羊血清室温封闭 30 min, 加 50  $\mu\text{l}$  一抗稀释液 4℃ 孵育过夜; 加二抗、DAPI 混合液室温避光孵育 2 h, 封片, 免疫荧光显微镜下采集图像。

### 2.4 中药含药血清浓度筛选

收集 HSC 对数期细胞, 数量调至 6000 个/孔, 以 0 浓度为对照组, 中药血清设 5%、10%、15%、20%、25% 共 5 个浓度, 按比例与含 10% FBS DMEM/F12 培养基混合, 设 5 个复孔。采用 MTT 法分别在 24、48、72 h 后检测各孔吸光度 (OD) 值,  $\text{HSC 生长抑制率} = (\text{对照孔 OD 值} - \text{实验孔 OD 值}) / \text{对照孔 OD 值} \times 100\%$ 。按最佳抑制率配制含相应筛选浓度中药血清的完全培养基。

### 2.5 细胞分组及药物干预

实验分为正常组、模型组、DAPT 组、NF 组、中药组、中药加 DAPT 组、中药加 NF 组, 共 7 组。各组均加入 HSC, 正常组加入正常大鼠 SEC, 其余组加入肝纤维化大鼠 SEC; 以 Transwell 半透膜分隔共培养, 上层 3000 个 HSC, 下层 2000 个 SEC, 常规培养 24 h。吸出上清液, DAPT 组、中药加 DAPT 组加入 0.2  $\mu\text{mol/L}$  DAPT (Notch 通路阻断剂), NF 组、中药加 NF 组加入 1 gsu/ml rhNF- $\kappa$ B (Notch 通路激动剂); 前 4 组加入含 10% FBS DMEM/12 培养基, 后 3 组加入含预筛选浓度中药血清、10% FBS DMEM/12 培养基, 继续共培养 72 h。

### 2.6 观察指标及方法

2.6.1 HSC 活力检测 采用 MTT 法检测, 以无干预单独培养 HSC 为对照组, 上述各组药物干预后培养 24 h, 每孔加 50  $\mu\text{l}$  MTT 溶液, 继续培养 4 h。弃去培养液, 每孔加 150  $\mu\text{l}$  DMSO, 振荡 10 min, 在酶标仪 450 nm 处测量各孔 OD 值, 计算 HSC 生长抑制率。

2.6.2 SEC 中 CD31、vWF 蛋白表达 采用 Western Blot 法检测,按 BCA 蛋白定量试剂盒说明测定蛋白浓度,按常规步骤进行凝胶电泳,5% 脱脂奶粉封闭液封闭 2 h。一抗 (1 : 200) 室温封闭 2 h,洗膜后加入二抗 (1 : 4000);显色,曝光,扫描胶片,结果用 Image Pro Plus 6.0 分析目的条带 IOD 值,目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白 IOD 值/内参 IOD 值。

## 2.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 纤维化模型大鼠肝脏组织病理分期结果

造模 2 周时可见广泛的肝细胞水肿,小叶内变性及少数点状坏死,部分汇管区少量炎性细胞浸润,窦周隙及小叶内纤维组织增生,处于 S1 期。造模 4 周时小叶内灶状坏死,汇管区内可见较多炎性细胞浸润,周围弥漫性纤维组织增生,肝索排列紊乱,肝小叶结构破坏,可见细而疏松的纤维间隔,处于 S2 期。造模 8 周时肝细胞肿胀明显,汇管区扩大,炎性细胞聚集,肝细胞再生明显,纤维间隔形成,且粗而致密,相互融合,处于 S3 - S4 期。

### 3.2 SEC、HSC 生长状态观察及鉴定

SEC、HSC 得率为 (5.7 ~ 6.3) × 10<sup>5</sup> / 只,细胞活率在 94% 左右。镜下观察正常大鼠 SEC 初接种

呈椭圆形,见少量血细胞及组织碎片漂浮,4 ~ 5 天呈梭形,生长较为分散;HSC 初接种呈圆形,3 ~ 4 天细胞呈梭形、多边形等,紫外光激发下可见多数 HSC 有弱蓝绿色自发荧光。2 周时,肝纤维化模型大鼠 SEC 呈梭形、菱形,生长较为紧密,HSC 呈梭形生长,SEC 中 CD14 及 HSC 中  $\alpha$ -SMA 表达呈阳性;4 周与 8 周时,肝纤维化模型大鼠 SEC 互相重叠且交织成网状,传代 2 次后细胞生长状态明显变差,大部分 HSC 已活化且细胞纯度较高,SEC 中 CD14 及 HSC 中  $\alpha$ -SMA 90% 以上呈阳性表达。

### 3.3 中药含药血清浓度筛选结果

表 1 示,与对照组比较,培养 24 h 时除 10% 浓度外,其他浓度含药血清培养下 OD 值均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),培养 48 h 时 10% 浓度下 OD 值降低,而其他各浓度下 OD 值升高 ( $P < 0.01$ ),培养 72 h 时仅 10% 浓度下 OD 值降低 ( $P < 0.01$ )。且 10% 浓度对 HSC 增殖抑制率为正,说明此浓度对细胞增殖有抑制作用。

### 3.4 不同造模时间条件下各组细胞 HSC 活力比较

表 2 示,在造模 2、4、8 周条件下,与正常组比较,模型组 HSC 活力均上升 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,NF 组 HSC 活力上升,DAPT 组及中药组 HSC 活力下降 ( $P < 0.01$ );与 DAPT 组比,中药加 DAPT 组 HSC 活力下降 ( $P < 0.01$ );与 NF 组比,中药加 NF 组 HSC 活力下降 ( $P < 0.01$ )。

表 1 不同浓度中药含药血清在不同时间对肝星状细胞生长抑制情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 血清浓度 | 样本数 | 24 h            |                | 48 h            |                | 72 h            |               |
|------|-----|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------|
|      |     | OD 值            | 抑制率 (%)        | OD 值            | 抑制率 (%)        | OD 值            | 抑制率 (%)       |
| 对照组  | 5   | 40.133 ± 0.011  | —              | 0.172 ± 0.005   | —              | 0.182 ± 0.002   | —             |
| 5%   | 5   | 0.159 ± 0.008** | -18.98 ± 5.75  | 0.214 ± 0.018** | -24.22 ± 10.34 | 0.224 ± 0.013   | -23.01 ± 6.87 |
| 10%  | 5   | 0.128 ± 0.009   | 4.32 ± 6.61    | 0.148 ± 0.006** | 13.92 ± 3.53   | 0.155 ± 0.004** | 15.00 ± 2.12  |
| 15%  | 5   | 0.167 ± 0.017** | -25.05 ± 12.65 | 0.231 ± 0.008** | -34.46 ± 4.93  | 0.244 ± 0.008   | -33.66 ± 4.22 |
| 20%  | 5   | 0.151 ± 0.010*  | -13.35 ± 7.55  | 0.215 ± 0.015** | -24.69 ± 8.57  | 0.224 ± 0.009   | -22.80 ± 5.15 |
| 25%  | 5   | 0.160 ± 0.008** | -19.95 ± 5.89  | 0.219 ± 0.008** | -27.42 ± 4.48  | 0.231 ± 0.007   | -26.73 ± 3.70 |

注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$

表 2 不同造模时间条件下各组肝星状细胞活力比较 (OD 值,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | 样本数 | 造模 2 周                     | 造模 4 周                     | 造模 8 周                     |
|------------|-----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常组        | 5   | 0.255 ± 0.007              | 0.255 ± 0.007              | 0.252 ± 0.002              |
| 模型组        | 5   | 0.305 ± 0.007*             | 0.303 ± 0.006*             | 0.302 ± 0.002*             |
| DAPT 组     | 5   | 0.205 ± 0.005 <sup>△</sup> | 0.203 ± 0.003 <sup>△</sup> | 0.202 ± 0.008 <sup>△</sup> |
| NF 组       | 5   | 0.356 ± 0.006 <sup>△</sup> | 0.353 ± 0.002 <sup>△</sup> | 0.352 ± 0.002 <sup>△</sup> |
| 中药组        | 5   | 0.256 ± 0.009 <sup>△</sup> | 0.253 ± 0.002 <sup>△</sup> | 0.252 ± 0.007 <sup>△</sup> |
| 中药加 DAPT 组 | 5   | 0.156 ± 0.005 <sup>▲</sup> | 0.153 ± 0.003 <sup>▲</sup> | 0.152 ± 0.003 <sup>▲</sup> |
| 中药加 NF 组   | 5   | 0.306 ± 0.002 <sup>#</sup> | 0.303 ± 0.007 <sup>#</sup> | 0.303 ± 0.002 <sup>#</sup> |

注:与正常组比较,\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.01$ ;与 DAPT 组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.01$ ;与 NF 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.01$

### 3.5 不同造模时间条件下各组 SEC 中 CD31、vWF 蛋白表达比较

表 3 示, 与同期正常组比较, 造模 4 周、8 周时模型组 CD31 蛋白表达量上升 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与同期模型组比较, DAPT 组造模 2、4、8 周时 CD31、vWF 蛋白表达量均下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); NF 组造模 2 周 vWF 蛋白表达量上升, 造模 2 周、4 周 CD31 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 中药组造模 2、4 周 vWF 蛋白表达量下降, 造模 8 周 CD31 蛋白表达量下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与同期 NF 组比较, 中药加 NF 组造模 2、4、8 周 CD31、vWF 蛋白表达量均下降 ( $P < 0.01$ ); 与同期 DAPT 组比较, 中药加 DAPT 组造模 2、4、8 周 CD31、vWF 蛋白表达量均下降 ( $P < 0.01$ )。不同造模时间条件下各组细胞 SEC 中 CD31、vWF 蛋白电泳图见图 1。

### 4 讨论

慢性肝病均有不同程度肝细胞损害及结缔组织增生, 正常 HSC 处于静息状态, 仅产生少量细胞外基质组分。肝损伤后 HSC 活化并向肌成纤维细胞转化, 可分泌大量胶原、纤维蛋白及组织抑制因子, 导致细胞外基质生成增多、降解不足, 引发并加重肝纤维化进展<sup>[8]</sup>。CD31、vWF 作为连续性内皮细胞标志物, 正常 SEC 在胚胎发育时窗孔结构已形成而

不表达 CD31, vWF 提示微血管密度增加即血管新生, 随肝纤维化进程加重而表达上升<sup>[9]</sup>, 二者异常升高提示 SEC 失窗孔。SEC 失窗孔直接导致肝细胞供养不足及代谢障碍, 同时通过分泌细胞纤连蛋白促进 HSC 活化, 而细胞外基质在窦周异常沉积形成连续性基底膜导致 SEC 失窗孔, 即“肝窦毛细血管瘤化”<sup>[10]</sup>。

Notch 通路作为经典的信号转导通路, 涉及各类细胞生命活动, 其在肝脏发育、代谢、损伤修复中起着重要作用, 通过激活 HSC、影响巨噬细胞极化命运以及协同转化生长因子  $\beta 1$  诱导上皮细胞-间充质转化过程, 促进肝纤维化进展<sup>[11-14]</sup>。DAPT 可阻断  $\gamma$ -分泌酶作用而抑制 Notch 通路活化<sup>[15]</sup>, rh-NF- $\kappa$ B 可促进配体 Jagged1 表达而间接激活 Notch 通路<sup>[16]</sup>。研究发现, Notch 通路可维持 SEC 稳态, 抑制内皮细胞异常分化; 其阻断剂 DAPT 可降低 SEC 中血管内皮生长因子受体表达量而影响 SEC 增殖<sup>[17-18]</sup>。

肝纤维化属中医学“胁痛”“癥瘕”等病证范畴, 多因湿热疫毒停留于肝, 日久肝脾失养, 疏泄失调, 气滞血瘀; 继发痰、湿等病理产物, 加重肝络痹阻。肝纤维化本虚标实、虚实夹杂, 瘀、郁、虚、湿之间互为致病因果, 故疏肝健脾活血法为其治疗大法<sup>[19]</sup>。疏肝健脾活血方是浙江省名中医周

表 3 不同造模时间条件下各组细胞肝窦内皮细胞中 CD31、vWF 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别         | 样本数 | 造模 2 周                         |                                | 造模 4 周                         |                                | 造模 8 周                         |                          |
|------------|-----|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
|            |     | CD31                           | vWF                            | CD31                           | vWF                            | CD31                           | vWF                      |
| 正常组        | 3   | 1.63 $\pm$ 0.16                | 1.33 $\pm$ 0.07                | 3.01 $\pm$ 0.16                | 1.00 $\pm$ 0.04                | 1.26 $\pm$ 0.08                | 0.77 $\pm$ 0.07          |
| 模型组        | 3   | 1.72 $\pm$ 0.10                | 1.31 $\pm$ 0.04                | 3.57 $\pm$ 0.21*               | 1.09 $\pm$ 0.06                | 2.01 $\pm$ 0.12**              | 0.93 $\pm$ 0.07          |
| DAPT 组     | 3   | 1.30 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$ | 1.13 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$ | 2.58 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$ | 0.80 $\pm$ 0.00 $\Delta\Delta$ | 1.38 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$ | 0.73 $\pm$ 0.09 $\Delta$ |
| NF 组       | 3   | 1.47 $\pm$ 0.02 $\Delta$       | 1.78 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$ | 3.15 $\pm$ 0.02 $\Delta$       | 1.16 $\pm$ 0.01                | 1.86 $\pm$ 0.00                | 1.01 $\pm$ 0.02          |
| 中药组        | 3   | 1.55 $\pm$ 0.06                | 0.73 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$ | 3.28 $\pm$ 0.21                | 0.89 $\pm$ 0.05 $\Delta$       | 1.20 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$ | 0.82 $\pm$ 0.06          |
| 中药加 DAPT 组 | 3   | 0.81 $\pm$ 0.01 $\Delta$       | 0.52 $\pm$ 0.01 $\Delta$       | 2.24 $\pm$ 0.03 $\Delta$       | 0.26 $\pm$ 0.01 $\Delta$       | 0.91 $\pm$ 0.07 $\Delta$       | 0.49 $\pm$ 0.02 $\Delta$ |
| 中药加 NF 组   | 3   | 1.28 $\pm$ 0.00 $\#$           | 1.47 $\pm$ 0.00 $\#$           | 2.57 $\pm$ 0.02 $\#$           | 0.62 $\pm$ 0.01 $\#$           | 1.49 $\pm$ 0.01 $\#$           | 0.71 $\pm$ 0.01 $\#$     |

注: 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与 DAPT 组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与 NF 组比较,  $\#P < 0.01$

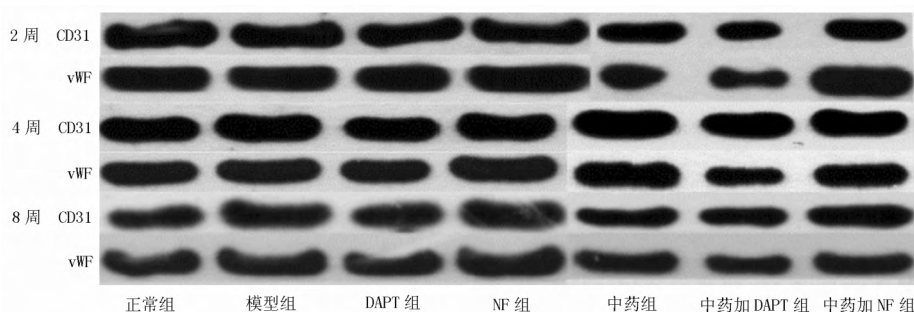


图 1 不同造模时间条件下各组肝窦内皮细胞中 CD31、vWF 蛋白电泳图

庚生教授经多年抗肝纤维化临床实践,以《伤寒论》太阳病蓄血证主方桃核承气汤为基础,临床加减治疗肝纤维化的验方,有疏肝健脾、软坚散结、活血化瘀之效。本课题组既往研究发现,疏肝健脾活血方可改善肝纤维化大鼠肝组织病理变化,抑制肾素-血管紧张素系统激活及影响大鼠转化生长因子- $\beta 1$ /Smad 信号通路,具有较好的抗肝纤维化作用<sup>[20]</sup>。

本实验以 CCl<sub>4</sub> 腹腔注射制备大鼠肝纤维化模型,造模 2 周时肝细胞水肿及点状坏死;4 周组纤维间隔细而疏松,小叶内灶状坏死,肝索排列紊乱;8 周时纤维间隔较粗,有假小叶形成,肝细胞形态异常。HSC 细胞纯度较高, $\alpha$ -SMA 表达呈 90% 以上,大量活化的 HSC 导致细胞外基质生成与降解失衡,致纤维结缔组织在肝内异常沉积,SEC 互相重叠且交织成网状。有研究发现,原代 SEC 不能在体外长期存活,分裂 2~3 代后开始死亡,正常细胞约在 50~60 代,这种内皮细胞死亡与体内某种条件下血管重建过程很相似<sup>[21]</sup>。

本研究通过 Notch 通路激动剂 rhNF- $\kappa$ B、阻断剂 DAPT 及疏肝健脾活血方含药血清作用于共培养的 HSC 与 SEC,发现模型组及 NF 组 HSC 活力、CD31 及 vWF 蛋白表达量在一定程度上升,提示 SEC 失窗孔化,激活 Notch 通路可促进 HSC 活化。DAPT 组 HSC 活力、CD31 及 vWF 蛋白表达量均在一定程度下降,提示阻断 Notch 通路可抑制 HSC 活化及 SEC 失窗孔化。推测 CCl<sub>4</sub> 损伤肝脏后,SEC 因调控肝脏微循环而首先受损发生失窗孔化,通过旁分泌作用促进 HSC 活化;此过程伴随 Notch 通路激活,加重 HSC 活化及 SEC 失窗孔化,形成恶性循环,因此阻断 Notch 通路可抑制 HSC 活化及 SEC 失窗孔化。而中药组、中药加 NF 组及中药加 DAPT 组 HSC 活力、CD31 及 vWF 蛋白表达量在一定程度下降,提示疏肝健脾活血方可通过阻断 Notch 通路而抑制 HSC 活化及 SEC 失窗孔化,其具体干预机制有待于进一步研究。

## 参考文献

[1] 张晨曦,卞勉励,陈星燃,等. 肝窦内皮细胞在肝脏疾

病中的作用 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(2): 149-153.

[2] DELEVE LD. Hepatic microvasculature in liver injury [J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(4): 390-400.

[3] 陈刚,李宏波,邱少敏. CCl<sub>4</sub> 皮下注射制备大鼠肝纤维化模型的研究 [J]. 现代医学, 2010, 38(3): 225-229.

[4] 中华肝脏病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识 [J]. 中华肝脏病杂志, 2002, 10(5): 8-9.

[5] 吕文良,徐晨光,张莎莎,等. 肝窦内皮细胞的分离培养及体外生长规律的观察 [J]. 中华生物医学工程杂志, 2015, 21(1): 20-25.

[6] 顾妍秋,原永芳. 肝纤维化与炎性细胞因子介导的相关信号通路的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(9): 1670-1674.

[7] 吕靖,陆雄,陶艳艳,等. 肝纤维化小鼠肝组织血管新生特点及其形成机制 [J]. 肝脏, 2011, 16(1): 35-40.

[8] 赵海军,郭顺根,贾文婷,等. 肝纤维化肝窦内皮细胞对肝星状细胞的影响 [J]. 解剖学杂志, 2006(4): 514-516.

[9] GEISLER F, STRAZZABOSCO M. Emerging roles of Notch signaling in liver disease [J]. Hepatology, 2015, 61(1): 382-392.

[10] CHEN Y, ZHENG S, QI D, et al. Inhibition of Notch signaling by a  $\gamma$ -secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats [J]. PLOS One, 2012, 7(10): e46512.

[11] BANSAL R, VAN BAARLEN J, STORM G, et al. The interplay of the Notch signaling in hepatic stellate cells and macrophages determines the fate of liver fibrogenesis [J]. Sci Rep, 2015, 5: 18272. doi: 10.1038/srep18272.

[12] 张秋霞,孔心涓,姜英俊,等. Notch 通路在大鼠肝纤维化发生发展中作用的初探 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(11): 2046-2048.

[13] 张衣北,陈安民,郭风劲,等. 激活的 Notch1 信号系统抑制前软骨干细胞凋亡及其机制研究 [J]. 中华小儿外科杂志, 2006, 27(11): 592-595.

[14] LI Z, WANG J, ZHAO C, et al. Acute blockage of notch signaling by DAPT induces neuroprotection and neurogenesis in the neonatal rat brain after stroke [J]. Transl Stroke Res, 2016, 7(2): 132-140.

[15] DILL MT, ROTHWEILER S, DJONOV V, et al. Disruption of Notch1 induces vascular remodeling, intussusceptive angiogenesis, and angiosarcomas in livers of mice [J]. Gastroenterology, 2012, 142(4): 967-977.

[16] 金超,任凯夕,晏贤春,等.  $\gamma$  分泌酶抑制剂对肝窦内皮细胞的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(16): 3019-3023.

[17] 张俊杰. 中医药在抗肝纤维化过程中对病理性血管新

生干预作用的研究进展 [J]. 中国当代医药, 2013, 20 (11): 22-24.

[20] 杨欣, 李清林, 陈卓辉, 等. 疏肝健脾活血方对肝纤维化过程中大鼠 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的影响 [J].

中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1694-1698.

[21] 朱瑾, 陈平, 李晓武, 等. 原代培养大鼠肝窦内皮细胞凋亡的检测及意义 [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(6): 515-517.

## Effects of Serum Containing *Shugan Jianpi Huoxue Decoction* (疏肝健脾活血方) on Defenestration of Sinusoidal Endothelial in Hepatic Fibrosis Model Rats

XIA Xuejiao, HUANG Yan, LU Jun, YANG Dongsheng, ZHOU Ning, ZHANG Junjie

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

**ABSTRACT** **Objective** To explore the possible mechanism of *Shugan Jianpi Huoxue Decoction* (疏肝健脾活血方) (STHD) in treating hepatic fibrosis. **Methods** Ten SD rats were orally administered with 10 ml/kg *Shugan Jianpi Huoxue Decoction* (concentration 2.7 g/ml) once a day for 3 consecutive days to prepare drug-containing serum. The serum of traditional Chinese medicine is set at 5 concentrations of 5%, 10%, 15%, 20% and 25%. The concentration of the experimental drug was screened by MTT method, and the liver fibrosis sinusoidal endothelial cells (SEC) were isolated by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ). The normal rat hepatic stellate cells (HSC) and SEC were collected. In this experiment, the rats were divided into 7 groups including normal group, model group, DAPT group, NF group, Chinese medicine group, Chinese medicine plus DAPT group and Chinese medicine plus NF group. HSC was added to each group, and SEC of normal rats was added to the normal group, and SEC of liver fibrosis rats were added to the other groups for 24 hours. The supernatant was aspirated, and the DAPT group, the Chinese medicine plus DAPT group were added with Notch pathway blocker DAPT 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , and the NF group and the Chinese medicine plus NF group were added with Notch pathway agonist rhNF- $\kappa\text{B}$  1 gsu/ml. The first 4 groups were added with 10% FBS DMEM/12 medium, and the last 3 groups were added with pre-screened concentration Chinese medicine serum, 10% FBS DMEM/12 medium. After 72 hours of culture, the MTC activity of each group was detected by MTT method, and the expression of CD31 and vWF proteins in SEC was detected by Western Blot method. **Results** The screening out 10% concentration of traditional Chinese medicine in serum had an inhibitory effect on cell proliferation. Compared with the normal group, the HSC activity of the model group was increased after 2, 4, and 8 weeks, and the CD31 protein expression was increased after 4 and 8 weeks since model establishment ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the HSC activity of the NF group was increased. The HSC activity, CD31 and vWF protein expression were decreased in DAPT group and Chinese medicine group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the NF group, the HSC activity, CD31 and vWF protein expression decreased in traditional Chinese medicine plus NF group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the DAPT group, the expression of HSC, CD31 and vWF protein in Chinese medicine plus DAPT group were decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Shugan Jianpi Huoxue Decoction* could inhibit HSC activity and the defenestration of SEC by interfering plu Notch pathway, which may be one of the mechanisms of its treatment of liver fibrosis.

**Keywords** hepatic fibrosis; *Shugan Jianpi Huoxue Decoction*; hepatic stellate cell; sinusoidal endothelial cell; defenestration; Notch pathway

(收稿日期: 2018-05-20; 修回日期: 2018-08-17)

编辑: 邓 媛