

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.13.015

疏肝健脾活血方对肝纤维化模型小鼠肝组织 CUG 结合蛋白 1 表达及 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响

揭阳, 黄棧, 王志丽, 叶林茂, 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防治肝纤维化的可能作用机制。**方法** 48 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为正常组、模型组、疏肝健脾活血方组、CUGBP1 敲减组, 每组 12 只。CUGBP1 敲减组一次性尾静脉注射 CUGBP1 敲减腺相关病毒, 其余各组尾静脉注射对照腺相关病毒, 每只小鼠注射量为 100 μ l, 病毒滴度不少于 1×10^{12} vg/ml。4 周后, 除正常组外, 其余各组小鼠腹腔注射 20% 四氯化碳 (CCl_4) 2.5 ml/kg, 每 3 天注射 1 次, 连续 4 周, 诱导肝纤维化模型; 同时疏肝健脾活血方组小鼠予 33.3 g/(kg·d) 疏肝健脾活血方药液灌胃, 正常组、模型组及 CUGBP1 敲减组予 10 ml/kg 蒸馏水灌胃, 每天 1 次, 连续 4 周。末次给药 12 h 后取材, 采用 HE 染色、Masson 染色、天狼星红染色进行肝脏病理学观察; 检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平及肝组织中羟脯氨酸 (HYP) 含量; 检测肝组织中 I 型胶原 (Collagen I)、 α 平滑肌激动蛋白 (α -SMA)、磷酸化 Smad2 (p-Smad2)、磷酸化 Smad3 (p-Smad3)、Smad7、CUG 结合蛋白 1 (CUGBP1) 蛋白表达, 肝组织中转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、Collagen I、 α -SMA、Smad7、CUGBP1 mRNA 表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织病理显示肝细胞排列紊乱, 有大量炎性细胞浸润与大量胶原纤维沉积, 并且形成明显的纤维间隔; 血清中 ALT、AST 水平及肝组织中 HYP 含量上升, 肝组织中 Collagen I、CUGBP1、p-Smad2、p-Smad3、 α -SMA 蛋白表达升高, TGF- β 1、Collagen I、CUGBP1、 α -SMA mRNA 表达升高, Smad7 蛋白及 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 疏肝健脾活血方组和 CUGBP1 敲减组小鼠肝组织病理显示有少量炎性细胞浸润, 纤维组织增生不明显, 纤维间隔稀疏; 血清中 ALT、AST 水平及肝组织中 HYP 含量下降, 上述蛋白及 mRNA 水平均有所改善 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与疏肝健脾活血方组比较, 除 Smad7 mRNA 表达升高外, CUGBP1 敲减组其余各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 疏肝健脾活血方可能通过抑制肝组织 CUGBP1 表达, 从而阻断 TGF- β 1/Smads 信号后续转导, 进而抑制肝纤维化进展。

[关键词] 肝纤维化; 疏肝健脾活血方; CUG 结合蛋白 1; TGF- β 1/Smads 信号通路

目前我国肝纤维化患病率、死亡例数均有所增加, 且趋于年轻化^[1]。肝纤维化主要特点是以 I 型胶原 (Collagen I) 为主的细胞外基质 (ECM) 过度沉积而破坏了正常的肝脏结构, 导致肝脏异常病理状态即纤维瘢痕的形成^[2]。肝星状细胞的活化是肝纤维化形成的关键环节^[3], 最近研究表明 CUG 结合蛋白 1 (CUGBP1) 调节肝脏中许多 mRNAs 的剪接、翻译和稳定性^[4], 且 CUGBP1 能够刺激转化

生长因子 β 1 (TGF- β 1) /Smad 蛋白 (Smads) 信号转导而进一步激活肝星状细胞的活化^[5], 这提示抑制 CUGBP1 从而减少 TGF- β 1/Smads 信号后续转导可能是治疗肝纤维化的途径。

疏肝健脾活血方是课题组总结多年临床经验, 在《伤寒论》桃核承气汤基础上化裁而成, 有疏肝健脾、软坚散结、活血化瘀之效。前期研究^[6]发现, 疏肝健脾活血方能够抑制肝纤维化大鼠肝星状细胞中 TGF- β 1/Smads 信号通路。本实验在以腺相关病毒构建 CUGBP1 敲减模型的基础上, 建立肝纤

基金项目: 国家自然科学基金 (81973736)

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

维化小鼠模型, 观察 CUGBP1 敲减对肝纤维化的影响以及疏肝健脾活血方对 CUGBP1 的干预作用。本实验通过浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准(批准号: IACUC-20210201-06)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 48 只, 体质量 (18 ± 2) g, 4~5 周龄, 由浙江中医药大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号: SYXK(浙) 2018-0012。饲养条件: 12 h 光照/12 h 黑暗交替, 自由进食、饮水, 温度 (22 ± 2) °C, 适应性饲养 1 周进行实验。

1.2 药物

疏肝健脾活血方组成: 桃仁 15 g, 醋鳖甲 15 g, 桂枝 10 g, 酒大黄 6 g, 大枣 30 g, 三七粉 3 g, 香附 10 g, 白术 10 g, 莪术 10 g, 茯苓 15 g, 丹参 30 g, 甘草 8 g, 饮片由浙江中医药大学中医门诊部药房提供。根据人与小鼠体表面积等效换算^[7], 药物经水煎后, 浓缩成含生药量为 3.3 g/ml 的药液, 4 °C 冰箱保存。

1.3 腺相关病毒构建与纯化

利用携带 U6 启动子的腺相关病毒载体构建 CUGBP1 敲减腺相关病毒 (AAV9-shRNA-CUGBP1) 及其对照腺相关病毒 (AAV9-Control), 腺相关病毒的包装与纯化均委托汉恒生物科技(上海)有限公司完成。

1.4 试剂及仪器

四氯化碳 (CCl₄, 上海凌峰化学试剂有限公司, 批号: 20170215); 橄榄油(北京华威锐科化工有限公司, 货号: O815211); 水合氯醛(麦克林生化科技有限公司, 货号: C804539); HE 染色试剂盒、Masson 三色染色液试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司, 货号分别为 G1120、G1340), 天狼星红染色液试剂盒(北京金克隆生物技术有限公司, 货号: RS1220); 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 检测试剂盒、门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 检测试剂盒(美康生物, 货号分别为 H001、H002); 小鼠羟脯氨酸 (HYP) ELISA 试剂盒(泉州睿信生物科技有限公司, 批号: RXJ202684M); Collagen I、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、磷酸化 Smad3 (p-Smad3)、Smad3、CUGBP1、Smad7 一抗(英国 Abcam 公司, 货号分别为 ab138492、ab32575、

ab52903、ab40854、ab129115、ab216428); 磷酸化 Smad2 (p-Smad2)、Smad2 一抗(美国 CST 公司, 货号分别为 18338、5339); BCA 法蛋白浓度测定试剂盒(上海生工生物工程有限公司, 货号: C503021); 总 RNA 提取液(上海奕杉科技有限公司, 货号: RN002plus); RT-PCR 反转录试剂盒与荧光定量试剂(湖南艾科瑞生物工程有限公司, 货号分别为 AG11706、AG11701)。

倒置显微镜(日本 Nikon 公司, 型号: DS-Ri2); 全自动生化分析仪(日本 HITACHI 公司, 型号: 3100); 多模式酶标仪(美国 PerkinElmer 公司, 型号: EnSpire); 成像系统(美国 Bio-Rad 公司, 型号: ChemiDoc™); 微量核酸蛋白分析仪(美国 Thermo 公司, 型号: Nanodrop one); 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司, 型号: Light-Cycler480)。

1.5 动物分组、造模及给药

将 48 只 C57BL/6 小鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组、疏肝健脾活血方组、CUGBP1 敲减组, 每组 12 只。正常组、模型组、疏肝健脾活血方组一次性尾静脉注射 AAV9-Control 腺相关病毒, CUGBP1 敲减组一次性尾静脉注射 AAV9-shRNA-CUGBP1 腺相关病毒, 每只小鼠注射量为 100 μ l, 病毒滴度不少于 1×10^{12} vg/ml。根据药物厂家说明及前期预实验结果, 4 周后通过 RT-PCR 鉴定 CUGBP1 敲减成功^[5]。敲减成功后, 除正常组外, 模型组、疏肝健脾活血方组、CUGBP1 敲减组分别以 20% CCl₄ (用橄榄油以 1:4 比例稀释) 腹腔注射 2.5 ml/kg, 每 3 天注射 1 次, 连续 4 周, 诱导肝纤维化模型^[8-9]。造模同时, 疏肝健脾活血方组小鼠予 33.3 g/(kg·d) 疏肝健脾活血方药液灌胃, 正常组、模型组及 CUGBP1 敲减组予 10 ml/kg 蒸馏水灌胃, 均每天 1 次, 连续 4 周。

1.6 观察指标及检测方法

各组小鼠于末次给药(均禁食不禁水) 12 h 后, 采用随机数字表法选取 6 只用 2.5% 水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔注射麻醉, 下颌静脉取血, 分离血清, -80 °C 冰箱保存备用; 剩余 6 只取出肝组织分为三部分: 一部分固定在 10% 中性福尔马林液体中, 用于病理观察; 一部分用于 Western blot 实验及 HYP 含量检测; 一部分用于 RT-PCR 实验。

1.6.1 肝脏病理学观察 采用 HE 染色、Masson 染色、天狼星红染色, HE 染色用于观察肝细胞形态是否完整, 肝小叶结构是否完整, 有无炎性细胞

浸润的情况; Masson 与天狼星红染色用于观察有无胶原纤维沉积, 沉积程度以及有无纤维间隔形成。对肝组织常规固定、脱水、包埋、切片、染色、中性树脂封片, 在光学显微镜下观察肝组织形态变化, 并利用 Image J 8.0 软件对天狼星红染色阳性区域进行胶原沉积半定量分析。

1.6.2 血清 ALT、AST 水平检测 采用全自动生化分析仪检测小鼠血清 ALT、AST 的变化, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.6.3 肝组织 HYP 含量检测 利用 ELISA 法, 严格按照试剂盒说明书步骤进行, 对肝组织中 HYP 含量进行检测。

1.6.4 肝组织 Collagen I、 α -SMA、p-Smad2、p-Smad3、Smad7、CUGBP1 蛋白表达检测 采用 Western blot 检测方法, 取 15 mg 左右的肝组织提取总蛋白, BCA 法检测蛋白表达。按照蛋白变性、凝胶、蛋白上样、电泳、转膜、封闭、孵育一抗及二抗步骤, 各抗体按照 Collagen I (1:4000)、 α -SMA (1:5000)、p-Smad2 (1:1000)、Smad2 (1:1000)、p-Smad3 (1:2000)、Smad3 (1:2000)、Smad7 (1:1000)、CUGBP1 (1:1000)、GAPDH (1:1000) 比例稀释, 最后显影测出目的蛋白条带。获得目的图像后采用 Image J 8.0 软件测量各指标蛋白条带的灰度值, 磷酸化蛋白以其总蛋白为参考, 其余以 GAPDH 为参考, 计算 Collagen I、 α -SMA、p-Smad2、p-Smad3、Smad7、CUGBP1 蛋白相对表达量, 以 3 个样本为最小统计量进行分析。

1.6.5 肝组织 TGF- β 1、Collagen I、 α -SMA、Smad7、CUGBP1 mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 检测方法, 取 10 mg 左右的肝组织提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以此为模板, 采用 SYBR Green 进行两步法实时荧光定量 PCR 扩增反应, 引物由上海生物工程技术有限公司合成, 引物序列见表 1, 反应

体系严格按照说明书进行。扩增后得到样本 Ct 值, 样本目的基因的计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 26.0 统计处理, 计量资料均符合正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组数据比较采用单因素方差分析, 两两比较若方差齐运用 LSD 法进行分析, 若方差不齐则用 Dunnett T^s 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肝组织病理变化

HE 染色结果显示, 正常组小鼠肝组织可见肝小叶结构清晰, 肝细胞及肝血窦以中央静脉为中心成放射状排列, 肝细胞呈多边形、有 1~2 个圆形细胞核, 无肝细胞变性、坏死情况。与正常组比较, 模型组肝细胞排列紊乱, 肝小叶区内可见大量肝细胞变性、肿胀、坏死, 并有大量脂肪空泡形成, 中央静脉区与汇管区有大量炎性细胞浸润。与模型组比较, 疏肝健脾活血方组与 CUGBP1 敲减组中央静脉区与汇管区有少量炎性细胞浸润, 肝小叶区内亦有脂肪空泡形成。与疏肝健脾活血方组比较, CUGBP1 敲减组肝组织中炎性细胞浸润的数量无显著差异。

Masson 染色与天狼星红染色结果显示, 正常组小鼠肝组织无纤维组织增生及假小叶形成。与正常组比较, 模型组肝组织中央静脉区与汇管区有大量胶原纤维沉积, 并且形成明显的纤维间隔。与模型组比较, 疏肝健脾活血方组与 CUGBP1 敲减组肝组织中央静脉区与汇管区纤维组织增生不明显, 纤维间隔稀疏。表 2 示, 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织中胶原沉积明显增多 ($P<0.01$); 与模型组比较, 疏肝健脾活血方和 CUGBP1 敲减组小鼠肝组织中胶原沉积明显减少 ($P<0.01$); 疏肝健脾活血方组与 CUGBP1 敲减组小鼠肝组织中胶原沉积比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组小鼠肝组织 TGF- β 1、Collagen I、 α -SMA、Smad7、CUGBP1 mRNA 表达检测 RT-PCR 引物序列信息

基因	上游 (5'-3')	下游 (5'-3')	长度 (bp)
Collagen I	AATCGACTGTCCCAACCCC	TCCCTCGACTCTACATCTTCTG	101
α -SMA	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	102
CUGBP1	GTTCCAAGGACCTGGTCTGAC	GGGTTTTGGCTCCTATCCCTTA	98
Smad7	GCATTCTCGGAAGTCAAGAG	CCAGGGGCCAGATAATTCGT	222
TGF- β 1	CCACCTGCAAGACCATCGAC	CTGGCGAGCCTTAGTTTGAC	91
GAPDH	GGTGTCTCCTGCGACTTCA	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	183

注: Collagen I, I 型胶原; α -SMA, α 平滑肌肌动蛋白; CUGBP1, CUG 结合蛋白 1; TGF- β 1, 转化生长因子 β 1。

表 2 各组小鼠肝组织天狼星红染色后胶原沉积
半定量分析结果比较 (x̄±s)

组别	鼠数	胶原面积/总面积
正常组	6	0.42±0.15
模型组	6	5.15±0.86 ^{a)}
疏肝健脾活血方组	6	1.63±0.52 ^{b)}
CUGBP1 敲减组	6	2.43±0.71 ^{b)}

注：CUGBP1，CUG 结合蛋白 1。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

2.2 各组小鼠血清 ALT、AST 水平及肝组织 HYP 含量比较

表 3 示，与正常组比较，模型组小鼠血清 ALT、AST 水平及肝组织 HYP 含量均显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，疏肝健脾活血方组与 CUGBP1 敲减组小鼠血清 ALT、AST 水平及肝组织 HYP 含量显著降低 ($P<0.01$)；与疏肝健脾活血方组比较，CUGBP1 敲减组小鼠血清 ALT、AST 水平及肝组织 HYP 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各组小鼠血清 ALT、AST 水平及肝组织
HYP 含量比较 (x̄±s)

组别	鼠数	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	HYP/μg·L ⁻¹
正常组	6	39.8±3.69	141.9±33.35	0.62±0.04
模型组	6	898.7±201.10 ^{a)}	524.9±199.20 ^{a)}	0.85±0.02 ^{a)}
疏肝健脾活血方组	6	434.9±86.99 ^{b)}	197.9±10.03 ^{b)}	0.74±0.03 ^{b)}
CUGBP1 敲减组	6	372.9±98.29 ^{b)}	209.0±40.28 ^{b)}	0.71±0.04 ^{b)}

注：ALT，丙氨酸氨基转移酶；AST，门冬氨酸氨基转移酶；HYP，羟脯氨酸。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

表 4 各组小鼠肝组织 TGF-β1、Collagen I、α-SMA、CUGBP1、Smad7 mRNA 表达比较 (2^{-ΔΔCt}，x̄±s)

组别	鼠数	TGF-β1	Collagen I	CUGBP1	Smad7	α-SMA
正常组	6	1.09±0.43	0.90±0.24	1.05±0.32	1.04±0.27	0.97±0.34
模型组	6	1.97±0.47 ^{a)}	2.33±0.73 ^{a)}	2.05±0.51 ^{a)}	0.49±12.00 ^{b)}	2.88±0.75 ^{a)}
疏肝健脾活血方组	6	1.06±0.30 ^{c)}	1.24±0.16 ^{c)}	0.62±0.13 ^{c)}	1.03±0.30 ^{d)}	1.21±0.28 ^{c)}
CUGBP1 敲减组	6	1.07±0.37 ^{c)}	1.23±0.26 ^{c)}	0.40±0.15 ^{c)}	1.68±0.51 ^{c)} e)	1.22±0.25 ^{c)}

注：TGF-β1，转化生长因子 β1；Collagen I，Ⅰ型胶原；CUGBP1，CUG 结合蛋白 1；α-SMA，α 平滑肌肌动蛋白。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与正常组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ ；e) 与疏肝健脾活血方组比较， $P<0.05$ 。

表 5 各组小鼠肝组织中 Collagen I、CUGBP1、p-Smad2、p-Smad3、Smad7、α-SMA 蛋白表达比较 (x̄±s)

组别	鼠数	Collagen I /GAPDH	CUGBP1 /GAPDH	p-Smad2 /Smad2	p-Smad3 /Smad3	Smad7 /GAPDH	α-SMA /GAPDH
正常组	3	0.45±0.17	0.16±0.08	0.65±0.11	0.46±0.18	0.91±0.11	0.20±0.10
模型组	3	1.02±0.06 ^{a)}	1.11±0.09 ^{a)}	1.07±0.18 ^{b)}	1.03±0.28 ^{b)}	0.56±0.08 ^{b)}	1.05±0.20 ^{a)}
疏肝健脾活血方组	3	0.78±0.05 ^{c)}	0.51±0.14 ^{d)}	0.62±0.11 ^{c)}	0.43±0.15 ^{c)}	0.90±0.08 ^{c)}	0.56±0.11 ^{c)}
CUGBP1 敲减组	3	0.70±0.07 ^{d)}	0.49±0.31 ^{d)}	0.51±0.23 ^{d)}	0.42±0.10 ^{c)}	0.95±0.16 ^{d)}	0.38±0.24 ^{d)}

注：Collagen I，Ⅰ型胶原；CUGBP1，CUG 结合蛋白 1；p-Smad2，磷酸化 Smad2；p-Smad3，磷酸化 Smad3；α-SMA，α 平滑肌肌动蛋白。
a) 与正常组比较， $P<0.01$ ；b) 与正常组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

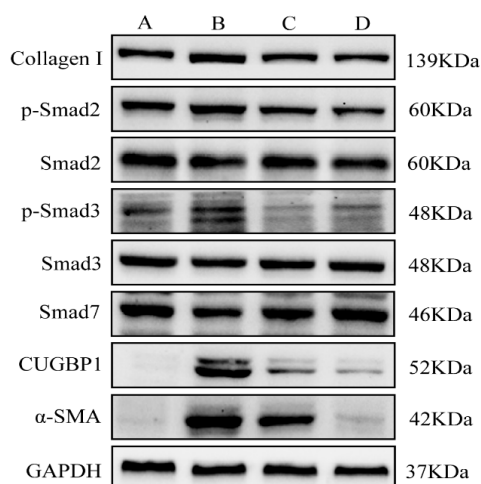
2.3 各组小鼠肝组织 TGF-β1、Collagen I、α-SMA、CUGBP1、Smad7 mRNA 表达比较

表 4 示，与正常组比较，模型组肝组织中 TGF-β1、Collagen I、CUGBP1、α-SMA mRNA 表达升高，Smad7 mRNA 表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，疏肝健脾活血方组与 CUGBP1 敲减组肝组织中 TGF-β1、Collagen I、CUGBP1、α-SMA mRNA 表达降低，而 Smad7 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与疏肝健脾活血方组比较，CUGBP1 敲减组肝组织中 TGF-β1、Collagen I、CUGBP1、α-SMA mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)，Smad7 mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。

2.4 各组小鼠肝组织 Collagen I、CUGBP1、p-Smad2、p-Smad3、Smad7、α-SMA 蛋白表达比较

表 5 示，与正常组比较，模型组小鼠肝组织中 Collagen I、CUGBP1、p-Smad2、p-Smad3、α-SMA 蛋白表达升高，Smad7 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，疏肝健脾活血方组与 CUGBP1 敲减组肝组织中 Collagen I、CUGBP1、p-Smad2、p-Smad3、α-SMA 蛋白表达降低，Smad7 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；疏肝健脾活血方组与 CUGBP1 敲减组小鼠肝组织中各蛋白表达比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

各组小鼠肝组织 Collagen I、CUGBP1、p-Smad2、p-Smad3、Smad7、α-SMA 蛋白电泳图见图 1。



注：A，正常组；B，模型组；C，疏肝健脾活血方组；D，CUGBP1 敲减组；Collagen I，I 型胶原；p-Smad2，磷酸化 Smad2；p-Smad3，磷酸化 Smad3；CUGBP1，CUG 结合蛋白 1；α-SMA，α 平滑肌肌动蛋白。

图 1 各组小鼠肝组织中 Collagen I、p-Smad2、p-Smad3、Smad7、CUGBP1、α-SMA 蛋白电泳图

3 讨论

肝纤维化多以乏力、纳差、胁下胀痛、胁下积块等症状为主，根据临床表现，可将其归属于中医学“癥瘕”“积聚”“胁痛”等范畴。其主要病因是“瘀”与“虚”，故临床多以活血化瘀为基本治则，并在此基础上兼顾补益之法^[10-11]。疏肝健脾活血方以鳖甲、桃仁为君，具有活血化瘀、软坚散结之效；酒大黄、莪术、丹参、三七为臣，针对血瘀病机加强君药化瘀散结之效；佐以白术、茯苓、大枣健脾化湿，先安未受邪之地，兼取桂枝温通经脉、宣通阳气、调和阴阳，合用香附疏肝理气，肝郁得疏则气机调畅，气行则血行；甘草为使，调和诸药。全方具有活血化瘀、软坚散结、疏肝解郁、健脾化湿之效。本研究通过病理染色观察发现，模型组小鼠肝组织中肝细胞大量变性、肿胀、坏死，可见大量的脂肪空泡与炎性细胞浸润且大量胶原纤维沉积。经疏肝健脾活血方干预后，小鼠肝脏组织中炎性反应减轻，纤维间隔稀疏，胶原沉积显著减少。HYP 是胶原组织的主要成分之一，是反映肝纤维化程度的直接指标，模型组肝组织中 HYP 含量较正常组显著增多，经疏肝健脾活血方治疗后小鼠肝组织中 HYP 含量显著减少。另外，模型组小鼠血清 ALT、AST 水平显著升高，而疏肝健脾活血方能够显著降低 ALT、AST 水平，表明疏肝健脾活血方具有良好的抗肝纤维化作用，可能是通过减轻肝脏炎症、减少胶原沉积从而保护肝功能实现的。

目前 TGF-β1 被认为是加速肝纤维化的主要因素，其主要通过 TGF-β1/Smads 信号通路激活肝星状细胞，合成 I、Ⅲ和Ⅳ型胶原，从而促进肝纤维化的发展^[12-13]。其中膜受体激活的 Smad 蛋白与抑制型 Smad 蛋白表达水平失衡可能是肝纤维化发生发展的分子基础之一。Smad7 作为抑制型 Smad 蛋白可以负反馈调节 TGF-β1，通过与激活的 TGF-β1 的受体 I (TβRI) 稳定结合，阻止 Smad2、Smad3 磷酸化，继而阻断信号的后续转导，使 TGF-β1/Smads 信号通路恢复平衡状态，从而抑制肝纤维化的发生发展^[14]。

CUGBP1 是人类结合蛋白，可与 mRNA 3'-非翻译区结合影响 mRNA 的稳定性以调节细胞增殖、降解和凋亡^[15]。老年人肝脏中 CUGBP1 表达增加，而肝脏中 CUGBP1 的激活是肝功能紊乱的主要原因之一^[16]。CUGBP1 在正常肝组织中呈低表达，但在原发性肝癌患者和二乙基亚硝胺介导的肝癌小鼠中高表达，且 CUGBP1 表达与肝癌的发生发展密切相关，其高表达可促进肝癌细胞的增殖^[17]。

本研究发现，正常小鼠 CUGBP1 mRNA 表达较高，而蛋白表达较低，mRNA 表达与蛋白表达不一致时，可能存在转录后修饰调控，其具体机制有待进一步探索。与正常组比较，模型组肝组织中 Collagen I、α-SMA、p-Smad2、p-Smad3、CUGBP1 蛋白表达与 TGF-β1、Collagen I、α-SMA、CUGBP1 mRNA 表达上调，而 Smad7 蛋白与 mRNA 表达显著下降，表明在小鼠肝纤维化过程中，CUGBP1 异常高表达，TGF-β1/Smads 信号通路被激活。α-SMA 是肝星状细胞活化的标志物，与肝纤维化程度呈正相关^[18]，其导致以 Collagen I 为主的 ECM 过量沉积，促使肝纤维化的形成。模型组肝组织中 α-SMA 蛋白与 mRNA 水平显著上升，表明在肝纤维化过程中肝星状细胞被激活。与模型组比较，疏肝健脾活血方组与 CUGBP1 敲减组肝组织中 Collagen I、α-SMA、p-Smad2、p-Smad3、CUGBP1 蛋白水平与 TGF-β1、Collagen I、α-SMA、CUGBP1 mRNA 水平显著降低，Smad7 蛋白与 mRNA 表达水平显著上升。除上调 Smad7 基因外，疏肝健脾活血方组与 CUGBP1 敲减组在改善其余各指标方面比较差异无统计学意义，表明疏肝健脾活血方可抑制 TGF-β1/Smads 信号转导，且疏肝健脾活血方组与 CUGBP1 敲减组效果相当。

本研究初步证实，疏肝健脾活血方防治肝纤维

化的机制可能是通过抑制肝组织 CUGBP1 表达, 提高 Smad7 表达, 减少 TGF- β 1/Smads 信号后续传导, 进而抑制肝纤维化进展。由于在体内实验中影响因素较多, 故 CUGBP1 具体以何种方式抑制 Smad7 的表达以及二者之间的关系仍需进一步研究加以验证。

参考文献

- [1] 单姗, 赵连晖, 马红, 等. 肝硬化的定义、病因及流行病学[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(1): 14-16.
- [2] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-166.
- [3] HIGASHI T, FRIEDMAN SL, HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 121: 27-42. doi: 10.1016/j.ad-dr. 2017. 05. 007.
- [4] FRANZINI M, FORNACIARI I, SICILIANO G, et al. Serum gamma-glutamyltransferase fractions in myotonic dystrophy type I: differences with healthy subjects and patients with liver disease [J]. Clin Biochem, 2010, 43(15): 1246-1248.
- [5] WU X, WU X, MA Y, et al. CUG-binding protein 1 regulates HSC activation and liver fibrogenesis [J]. Nat Commun, 2016, 7: 13498. doi: 10.1038/ncomms13498.
- [6] 周凝, 杨欣, 夏雪皎, 等. 疏肝健脾活血方对大鼠肝星状细胞 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 28(4): 267-270.
- [7] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [8] 陈刚, 李宏波, 邱少敏. CCl₄ 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.
- [9] SCHOLTEN D, TREBICKA J, LIEDTKE C, et al. The carbon tetrachloride model in mice [J]. Lab Anim, 2015, 49(1 suppl): 4-11.
- [10] 刘雪冰, 李幸, 吴玉潇, 等. 中医从“瘀”与“虚”论治肝纤维化的研究进展[J]. 中医临床研究, 2020, 12(22): 137-142.
- [11] 骆欢欢, 王新华. 从肝瘀正虚论肝纤维化治疗思路[J]. 中医杂志, 2010, 51(5): 463-465.
- [12] DEWIDAR B, MEYER C, DOOLEY S, et al. TGF- β 1 in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-updated 2019 [J]. Cells, 2019, 8(11): 1419.
- [13] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis [J]. J Histochem Cytochem, 2016, 64(3): 157-167.
- [14] KAMATO D, BURCH ML, PIVA TJ, et al. Transforming growth factor- β signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation [J]. Cell Signall, 2013, 25(10): 2017-2024.
- [15] VLASOVA-ST LI, BOHJANEN PR. Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1 [J]. Curr Opin Genet Dev, 2011, 21(4): 444-451.
- [16] JONES K, TIMCHENKO L, TIMCHENKO NA. The role of CUGBP1 in age-dependent changes of liver functions [J]. Ageing Res Rev, 2012, 11(4): 442-449.
- [17] LEWIS K, VALANEJAD L, CAST A, et al. RNA binding protein CUGBP1 inhibits liver cancer in a phosphorylation-dependent manner [J]. Mol Cell Biol, 2017, 37(16): e00128-17. doi: 10.1128/MCB. 00128-17.
- [18] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues [J]. Mol Aspect Med, 2019, 65: 37-55. doi: 10.1016/j.mam. 2018. 09. 002.

Effect of Shugan Jianpi Huoxue Formula (疏肝健脾活血方) on the CUG Binding Protein 1 Expression and TGF- β 1/Smads Signaling Pathway in the Liver Tissue of Liver Fibrosis Model Mice

JIE Yang, HUANG Yan, WANG Zhili, YE Linmao, ZHANG Junjie

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, 310053

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Shugan Jianpi Huoxue Formula* (疏肝健脾活血方, SJHF) in preventing and treating hepatic fibrosis. **Methods** Forty-eight C57BL/6 male mice were randomly divided into normal group, model group, SJHF group and CUG binding protein 1 (CUGBP1) knockout group, with 12 mice in each group. CUGBP1 knockout group was injected with CUGBP1 knockout adeno-associated virus (AAV9-shRNA-CUGBP1), while the other three groups were injected with control adeno-associated virus (AAV9-control) through tail vein in volume of 100 μ l with viral titers greater than 1×10^{12} vg/ml. Four weeks later, except for the normal group, mice were injected with 2.5 ml/kg of 20% carbon tetrachloride (CCl₄) intraperitoneally, once every three days for four weeks to induce hepatic fibrosis model; simultaneously, the SJHF group was given 33.3 g/(kg·d) of SJHF liquid by gavage, while the other three groups were given 100 ml/kg of distilled water by gavage, once a day for four weeks.

Materials were collected 12 hours after the last medication, and the pathological morphology of the liver tissue was observed through HE staining, Masson staining and Sirius red staining. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum, and the hydroxyproline (HYP) content in the liver tissue were detected. The protein expression of type I collagen (Collagen I), α -smooth muscle actin (α -SMA), phosphorylated Smad2 (p-Smad2), phosphorylated Smad3 (p-Smad3), Smad7, CUG binding protein 1 (CUGBP1), as well as the mRNA expression of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), Collagen I, α -SMA, Smad7, and CUGBP1 in the liver tissue were detected. **Results** Compared to those in the normal group, the pathology of the liver tissue in the model group was characterized by disordered arrangement of hepatocytes, a large amount of infiltrated inflammatory cells and deposited collagen fibers, and obvious fibrous septa; the levels of ALT and AST in serum and the content of HYP in liver tissue increased; the Collagen I, CUGBP1, p-Smad2, p-Smad3, and α -SMA protein expressions, as well as TGF- β 1, Collagen I, CUGBP1, and α -SMA mRNA expressions increased, while Smad7 protein and mRNA expressions decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the liver pathology in the SJHF group and the CUGBP1 knockout group showed a small amount of inflammatory cell infiltration, no obvious proliferation of fibrous tissue, and sparse fibrous septa; the levels of ALT and AST in serum, as well as the content of HYP in liver tissue decreased significantly, while all measured protein and mRNA expressions were improved ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the SJHF group, the CUGBP1 knockout group had higher Smad7 mRNA expression, but no significant differences in other outcomes were found between the groups ($P > 0.05$). **Conclusion** SJHF may inhibit the progression of hepatic fibrosis by inhibiting the expression of CUGBP1 in the liver tissue and blocking the subsequent transduction of TGF- β 1/Smads signal.

Keywords hepatic fibrosis; *Shugan Jianpi Huoxue Formula* (疏肝健脾活血方); CUG binding protein 1; TGF- β 1/Smads signaling pathway

(收稿日期: 2021-12-27; 修回日期: 2022-03-23)

[编辑: 邓媛]

广告

欢迎订阅 2022 年《中医杂志》

《中医杂志》(ISSN 1001-1668, CN 11-2166/R)是由中华中医药学会和中国中医科学院主办的全国性中医药综合性学术期刊。1955 年创刊以来始终坚持“以提高为主, 兼顾普及”的办刊方针, 是我国中医药界创刊早、发行量大、具有较高权威性和学术影响力的国家级中医药期刊之一, 是中文核心期刊和科技核心期刊、中国精品科技期刊、首届国家期刊奖获得者和中国期刊方阵双奖期刊、新中国 60 年有影响力的期刊、中国百强科技期刊、中国百种杰出学术期刊, 中医药科技期刊分级目录 T1 级期刊。荣获第五届中国出版政府奖期刊奖, 第二届、第三届、第四届中国出版政府奖期刊奖提名奖。

《中医杂志》主要栏目中当代名医和临证心得分别介绍名老中医和临床医生辨证用药治疗疑难病的经验; 临床研究介绍中医药治疗的新方法、新成果; 学术探讨、思路与方法、循证中医药、病例讨论、综述、百家园等栏目, 提供最新学术观点、研究成果与治疗方法, 成为学习中医药、研究中医药, 不断提高临床及研究水平的良师益友。

《中医杂志》为半月刊, 每月 2 日和 17 日出版, 每期定价 30.00 元, 全年 720 元。国内读者可以到全国各地邮局办理订阅手续(邮发代号: 2-698), 也可以与本刊读者服务部联系邮购, 邮购免邮费。电话: 010-64035632, 010-64089195。国外发行: 中国国际图书贸易集团有限公司(北京 399 信箱, 邮编: 100044, 代号: SM140)。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。网址: <http://www.jtcm.net.cn>。

