

基于Notch/eNOS信号通路探讨加味桃核承气汤改善 肝窦毛细血管化的作用机制

邵畅, 孙希光, 黄家欣, 叶林茂, 梁小凡, 何怡, 张俊杰*

(浙江中医药大学基础医学院, 杭州 310053)

[摘要] **目的:**探讨加味桃核承气汤(JTCT)是否通过抑制肝窦毛细血管化治疗肝纤维化,并验证其具体机制是否与果蝇双翅边缘缺刻同源基因(Notch)信号通路及内皮型一氧化氮合酶(eNOS)信号通路相关。**方法:**将50只C57BL/6小鼠随机分为正常组,模型组($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 3\text{ d}^{-1}$),加味桃核承气汤低、中、高(JTCT-L、JTCT-M、JTCT-H)剂量组(16.6 、 33.3 、 $66.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。除正常组外,其余小鼠每3 d腹腔注射20%四氯化碳(CCl_4)橄榄油溶液,持续4周诱导肝纤维化模型。同时,JTCT-L、JTCT-M、JTCT-H组分别按剂量每日灌胃给药,连续干预4周(正常组和模型组给予等体积生理盐水灌胃)。采用胶原酶体外原位灌注、Percoll密度梯度离心联合选择性去除Kupffer细胞的方法,从大鼠肝脏中分离原代肝窦内皮细胞(LSECs),经细胞表型验证后用于实验。细胞培养至对数生长期后,使用小干扰核糖核酸(siRNA)试剂盒进行瞬时转染以敲低可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)的表达。随后使用siRNA试剂盒对细胞进行瞬时转染,用于敲低可溶性鸟苷酸环化酶(sGC),并在此基础上使用Notch激动剂Jagged-1。采用细胞增殖活性检测试剂盒(CCK-8)检测JTCT对LSECs的细胞增殖抑制作用,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Notch信号通路和eNOS信号通路相关基因和蛋白的表达,采用荧光探针荧光钙指示剂4/乙氧基氧甲基酯(Fluo-4/AM)标记细胞内二价钙离子(Ca^{2+})。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠肝组织出现脂肪样变性、炎症细胞浸润、肝细胞变性坏死、小叶结构紊乱及纤维组织增生;血清羟脯氨酸(Hyp)含量及丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平均显著升高($P<0.01$);Notch1、多毛分裂增强子1(Hes1)、分化簇31(CD31)、血管性血友病因子(vWF)表达显著升高($P<0.01$),磷酸化(p)-eNOS/eNOS和sGC表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,JTCT各剂量组小鼠血清Hyp含量及ALT、AST水平均显著降低($P<0.01$);肝组织Notch1、Hes1、CD31、vWF表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),p-eNOS/eNOS和sGC表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),其中以JTCT-H组改善效果最显著($P<0.01$)。体外实验,与LSEC-1day组比较,LSEC-5day组Notch1、Hes1、CD31、vWF表达显著升高($P<0.01$),p-eNOS/eNOS和sGC表达显著降低($P<0.01$);细胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高($P<0.01$)。与LSEC-5day组比较,JTCT组Notch1、Hes1、CD31、vWF表达显著降低($P<0.01$),p-eNOS/eNOS表达显著升高($P<0.01$);细胞内 Ca^{2+} 浓度显著降低($P<0.01$)。Jagged1组与Jagged1+JTCT组比较,Notch1、Hes1、eNOS、p-eNOS、CD31、vWF、sGC表达及 Ca^{2+} 浓度差异均无统计学意义。与LSEC-5day组比较,sGC敲除组(sGC-KO)CD31、vWF表达显著升高($P<0.01$)。sGC-KO组与sGC-KO+JTCT组比较,CD31、vWF表达差异无统计学意义。**结论:**JTCT通过抑制Notch信号通路的激活、恢复eNOS信号通路活性以抑制LSECs毛细血管化,从而治疗肝纤维化。

[关键词] 加味桃核承气汤;肝窦毛细血管化;果蝇双翅边缘缺刻同源基因(Notch)信号通路;内皮型一氧化氮合酶(eNOS)信号通路;肝纤维化

[中图分类号] R543;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)19-0042-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251319

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20251013.1822.004>

[网络出版日期] 2025-10-14 16:51:24 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Modified Taohe Chengqitang Regulates Notch/eNOS Signaling Pathway to Inhibit Hepatic Sinusoidal Capillarization

SHAO Chang, SUN Xiguang, HUANG Jiaxin, YE Linmao, LIANG Xiaofan, HE Yi, ZHANG Junjie*

[收稿日期] 2025-06-26

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973736);浙江省基础公益研究计划项目(LY23H270008);浙江省新苗人才计划项目(2023R410027);浙江中医药大学研究生拔尖创新人才培育计划项目(2025YJSBJ001)

[第一作者] 邵畅,在读博士,从事消化系统疾病的中药防治及实验研究,E-mail:scscscscsc@163.com

[通信作者] *张俊杰,教授,博士生导师,从事消化系统疾病的中药防治及实验研究,E-mail:junjiezhang199610@163.com

(School of Basic Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether modified Taohe Chengqitang (JTCT) treats liver fibrosis by inhibiting hepatic sinusoidal capillarization, and to verify whether its specific mechanism is related to the Homologous genes responsible for the notches along the edges of *Drosophila* wings(Notch) signaling pathway and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) signaling pathway. **Methods:** Fifty C57BL/6 mice were randomized into 5 groups: Control, model ($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 3\text{ d}^{-1}$), low-dose JTCT, medium-dose JTCT, and high-dose JTCT (JTCT-L, JTCT-M, JTCT-H). Except the control group, the other groups were intraperitoneally injected with 20% carbon tetrachloride (CCl_4) olive oil solution every 3 days for 4 weeks to induce liver fibrosis. Meanwhile, JTCT-L, JTCT-M, and JTCT-H groups were administrated with JTCT by gavage at doses of 16.6, 33.3, and $66.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, respectively, for 4 consecutive weeks (the control and model groups received equal volumes of normal saline by gavage). Primary liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) were isolated from rat livers through *in situ* perfusion of collagenase, Percoll density gradient centrifugation, and selective removal of Kupffer cells. After verification of cell phenotype, LSECs were used for experiments. For cells at the logarithmic growth phase, the small interfering RNA(siRNA) kit was used to knock down the expression of soluble guanylate cyclase (sGC) through transient transfection. Subsequently, the Notch agonist Jagged-1 was applied. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to examine the cytotoxicity of JTCT on LSECs. Real-time PCR and Western blot were employed to measure the expression of molecules in the Notch and eNOS signaling pathways at mRNA and protein levels, respectively. Intracellular Ca^{2+} was labeled with the fluorescent probe Fluo-4 acetoxymethyl ester (Fluo-4/AM). **Results:** The animal experiment showed that compared with the control group, the model group exhibited hepatic steatosis, inflammatory cell infiltration, hepatocyte degeneration and necrosis, lobular structural disorder, and fibrous tissue hyperplasia in the mouse liver tissue, significantly elevated serum levels of hydroxyproline (Hyp), alanine transaminase (ALT), and aspartate transaminase (AST) ($P<0.01$), significantly upregulated expression levels of Notch1, Hes family bHLH transcription factor 1(Hes1), Cluster of Differentiation 31 (CD31), and von Willebrand factor (vWF) ($P<0.01$), and significantly downregulated phosphorylate (p)-eNOS/eNOS ratio and sGC expression ($P<0.01$). Compared with the model group, all the JTCT groups showed significantly reduced serum Hyp, ALT, and AST levels ($P<0.01$), downregulated expression of Notch1, Hes1, CD31, and vWF ($P<0.05$, $P<0.01$), and upregulated p-eNOS/eNOS ratio and sGC expression ($P<0.05$, $P<0.01$) in the liver tissue, with the JTCT-H group showing the most significant changes ($P<0.01$). The cell experiment showed that compared with the LSEC-1day group, the LSEC-5day group exhibited significantly increased expression of Notch1, Hes1, CD31, and vWF ($P<0.01$), significantly decreased p-eNOS/eNOS ratio and sGC expression ($P<0.01$), and elevated intracellular Ca^{2+} concentration ($P<0.01$). Compared with the LSEC-5day group, the JTCT group showed decreased expression of Notch1, Hes1, CD31, and vWF ($P<0.01$), significantly increased p-eNOS/eNOS ratio ($P<0.01$), and significantly reduced intracellular Ca^{2+} concentration ($P<0.01$). No significant differences were observed in the expression of Notch1, Hes1, eNOS, p-eNOS, CD31, vWF, sGC, or intracellular Ca^{2+} concentration between the Jagged1 group and the Jagged1+JTCT group. Compared with the LSEC-5day group, the sGC knockout group (sGC-KO) showed significantly increased expression of CD31 and vWF ($P<0.01$). There was no significant difference in CD31 or vWF expression between the sGC-KO group and the sGC-KO+JTCT group. **Conclusion:** JTCT inhibits the activation of the Notch signaling pathway and restores the activity of the eNOS signaling pathway to suppress sinusoidal capillarization of LSECs, thereby treating liver fibrosis.

[Keywords] modified Taohe Chengqitang; hepatic sinusoidal capillarization; Homologous genes responsible for the notches along the edges of *Drosophila* wings(Notch) signaling pathway; endothelial nitric oxide synthase(eNOS) signaling pathway; liver fibrosis

肝纤维化是肝脏在慢性损伤过程中发生的病理性修复反应,其典型组织病理学特征包括胶原蛋白过度生成、细胞外基质沉积及肝窦毛细血管化导致的血管网络重构^[1-3]。早期肝纤维化具有可逆性病理特征,但其持续进展可诱发肝硬化及肝细胞癌,全球每年约38.3万例死亡归因于肝硬化相关并发症(占终末期肝病死亡率的45%),其中发达国家肝硬化特异性死亡率高达43.7%^[4]。目前临床仍缺乏特异性抗纤维化药物^[5],故阐明其分子机制并探索潜在干预靶点具有重要临床价值。

肝窦内皮细胞(LSECs)是构成肝窦的主要细

胞,肝损伤期间会从无基底膜的窗孔状表型转变为有基底膜的毛细血管样状态,这一过程被称为肝窦毛细血管化,可激活肝星状细胞,从而促进肝纤维化^[6-8]。内皮型一氧化氮合酶(eNOS)信号通路在肝窦毛细血管化中起关键调控作用:LSECs内的eNOS催化生成一氧化氮(NO),后者通过激活其受体可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)启动蛋白激酶级联反应^[9-10];该信号通路可降低细胞内二价钙离子(Ca^{2+})水平,从而维持LSECs窗孔结构开放及正常分化状态与功能特性^[11]。果蝇双翅边缘缺刻同源基因(Notch)信号通路主要由Notch1、Notch2等受体,

Jagged1等配体及毛状分裂增强子家族(Hes)家族转录因子(如Hes1)组成,其中Hes家族可调控下游靶基因表^[12]。最新研究证实,Notch信号通路激活是肝纤维化的重要驱动因素,其关键分子Notch1的下游效应因子Hes1可通过结合eNOS基因启动子抑制其转录,进而阻断eNOS信号通路,最终诱导LSECs毛细血管瘤化^[13-15]。

中医对肝纤维化研究历史悠久,可将其归属于“癥瘕”“积聚”“胁痛”等病证的范畴^[16-17]。该病多因湿热疫毒侵袭肝脏,久稽不去则壅遏气机,致肝失疏泄;气机不畅进一步引发气血生化不足、肝血亏虚及津液输布失常,最终形成“气滞血瘀”的核心病机,而这一病理过程与肝窦毛细血管瘤化密切相关^[18]。加味桃核承气汤(JTCT),又名疏肝健脾活血方,是以《伤寒论》中治疗太阳病蓄血证的经典方剂桃核承气汤(由桃仁、大黄、桂枝、芒硝、甘草组成)为基础,加用鳖甲、三七等药物,结合多年临床实践化裁而成,常用于肝纤维化治疗,具有“气血同治、攻补兼施”的特点,临床多用于慢性病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病等慢性肝病发展至肝纤维化阶段,表现为胁肋隐痛或刺痛、腹胀纳差、神疲乏力、面色晦暗,舌有瘀斑或瘀点、苔白腻或黄腻,脉弦细或涩等,且辨证属肝郁脾虚、瘀血内停证型的患者,通过调理气血、兼顾攻邪与扶正,延缓肝纤维化进展,改善患者临床症状^[19-23]。本课题组前期研究发现,JTCT在肝星状细胞与LSECs共培养体系中可下调Notch信号通路活性,但其调控LSECs毛细血管瘤化的具体分子机制仍不明确^[24]。因此,本研究拟采用CCl₄诱导的肝纤维化小鼠模型,结合体外细胞实验,深入探讨JTCT通过调控Notch/eNOS信号通路抑制肝窦毛细血管瘤化的具体分子机制。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6雄性小鼠50只,6~8周龄,体质量(22±4)g,SPF级SD大鼠40只,8~10周龄,体质量(200±20)g,购自浙江中医药大学实验动物中心,实验动物许可证号SYXK(浙)2021-0012。实验人员持有动物实验从业人员资格证书(X1902833)。购入后置于符合GB 14925-2010《实验动物环境及设施》标准的SPF级实验动物房内适应喂养7d,自由摄食饮水,环境条件,温度(22±2)℃,相对湿度50%~60%,光照周期12h/12h光照/黑暗(光照强度150-300 lx)。

1.2 伦理 本实验方案遵循《实验动物福利伦理审

查指南》(GB/T35892-2018)及中国生理学会《实验动物护理与使用指南》,已通过浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审查批准(伦理批准号20210201-06)。

1.3 药物 JTCT由桃仁15g、桂枝10g、甘草8g、制大黄6g、大枣30g、三七粉3g(冲服)、香附10g、白术10g、莪术10g、醋鳖甲15g(先煎)、茯苓15g、丹参30g组成,购自浙江中医药大学中医门诊部。JTCT分离纯化过程:先将草药粉碎,在50~80℃下用蒸馏水按料液比10:1~20:1提取2~6h,过滤离心后得粗提物;再经高效液相色谱室温分离纯化,30~60min内完成成分分离;最后在25℃下用高效液相色谱法(HPLC)检测纯度,与对照品色谱图比对^[23]。

1.4 试剂 Anti-Hes1、Anti-Notch1、Anti-血小板内皮细胞黏附分子1(CD31)、Anti-血管性血友病因子(vWF)、Anti-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号分别为ET1610-97、ET1606-55、ET1608-48、ET1701-87、ET1601-4);Anti-eNOS抗体、Anti-磷酸化(p)-eNOS抗体、山羊抗兔二抗(英国Abcam公司,批号分别为ab252439、ab184154、ab6721);重组Jagged1蛋白、胎牛血清、Dulbecco改良Eagle(DMEM)培养基(美国Gibco公司,批号分别为ab109346、10270-106、C11995500BT);荧光探针荧光钙指示剂4/乙氧基酯(Fluo-4/AM,上海碧云天生物技术有限公司,批号S1060);快速细胞RNA提取试剂盒、天狼星红染色试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司,批号分别为RN002、36324ES60];SYBR Green Pro-Taq HS预混实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,批号A4A1398);苏木素、伊红染色试剂(珠海贝索生物技术有限公司,批号分别为BA-5、BA-4041);马松(Masson)三色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司,批号MST-8003/8004);羟脯氨酸(Hyp)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A030-2-1、C009-2-1、C010-2-1)。

1.5 仪器 Synergy H1型多功能酶标仪(美国伯腾公司);ChemiDoc Touch型ChemiDoc™成像系统、165-8001型蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司);Nanodrop one型微量核酸蛋白分析仪(美国赛默飞世尔科技有限公司);7500型Real-time PCR仪(美国ABI公司);Axio Observer.A1型荧光倒置显微活细胞系统(德国徕卡显微系统有限公司);MD ImageXpress Micro型

高内涵细胞成像分析系统(美国MD公司);RM2245型组织切片机(德国Lecia公司)。

2 方法

2.1 动物分组及造模方法 根据课题组前期建立的方法^[23],将50只SPF级C57BL/6雄性小鼠采用随机数字表法分为5组(每组10只):正常组,模型组, JTCT低剂量组、中、高剂量(JTCT-L、JTCT-M、JTCT-H)组(16.6、33.3、66.6 g·kg⁻¹·d⁻¹)。除正常组外,其余小鼠每3 d腹腔注射20%CCl₄橄榄油溶液(剂量为5 mL·kg⁻¹体重),持续4周以诱导肝纤维化模型,方案参照肝纤维化病理相关文献^[25]。成模参考指标如下,①一般状态:观察小鼠精神状态、活动度、毛发光泽度及体质量变化,模型组小鼠需出现精神萎靡、活动减少、毛发枯槁、体质量增长迟缓或下降等肝损伤相关表现;②肝功能指标:检测血清羟脯氨酸(Hyp)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)活性,模型组需显著高于正常组,提示肝细胞受损;③肝脏病理形态:通过苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织是否出现肝细胞变性坏死、炎症细胞浸润,Masson染色及天狼星红染色观察胶原纤维沉积情况,模型组需出现典型肝纤维化病理改变(如汇管区胶原增生、纤维间隔形成等)。造模开始同时, JTCT-L、JTCT-M、JTCT-H组分别按相应剂量每日灌胃给药(给药量为0.01 mL·g⁻¹体重);正常组和模型组每日灌胃等体积蒸馏水,连续干预4周。各组动物分别于实验的第4周末,于末次给药12 h后(均禁食不禁水),腹腔注射舒泰50注射液(75 mg·kg⁻¹体重)进行麻醉,待小鼠角膜反射消失后开始后续操作。称体质量后,摘取小鼠肝脏并称重,迅速将肝脏分为3部分:①取肝左叶组织约0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm,置于10%甲醛溶液中固定(组织与固定液体积比1:10),用于组织病理学检测;②取肝中叶组织约100 mg,立即置于液氮中速冻,随后转移至-80℃超低温冰箱保存,用于蛋白质和RNA提取;③剩余组织标记后置于-80℃保存备用。同时收集各组小鼠血清(眼眶取血后3 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径8 cm,下同),取上清),用于生化指标检测。

2.2 药物制备及给药方法 JTCT所有药物用1 000 mL蒸馏水浸泡1 h,将鳖甲煎煮30 min,再将剩余药物共同煎煮60 min,煮沸后文火煮30 min,将药液倒出,再加入400 mL继续煎煮20 min,合并2次煎煮液,用4层纱布过滤2次,弃去药渣;待滤液冷却至室温后,加入三七粉搅拌至完全溶解;将药

液置于旋转蒸发器(水浴温度60℃,真空度0.08 mPa)浓缩至500 mL,分装于无菌离心管中,4℃冰箱保存;使用前取出复温至室温,充分混匀。JTCT临床成人每日用量为162 g(按成人平均体质量60 kg计算,即2.7 g·kg⁻¹)。小鼠平均体质量为20 g(0.02 kg),根据人和动物体表面积换算公式(体表面积比值=K×体质量比值,小鼠K=0.006,人K=0.1)^[26],计算得小鼠中剂量给药量为33.3 g·kg⁻¹·d⁻¹,低、高剂量分别为中剂量的1/2和2倍(即16.6、66.6 g·kg⁻¹·d⁻¹)。

2.3 含药血清制备 20只8周龄雄性SPF级SD大鼠,体质量(200±20) g,采用随机数字表法分为2组,每组10只:空白组(Blank)、加味桃核承气汤组(JTCT)。动物饲养于SPF级实验动物房,适应性喂养3 d(自由摄食饮水)后开始实验。参照文献^[26]中人与大鼠体表面积换算公式(体表面积比值=K×体质量比值,大鼠K=0.018,人K=0.1),结合JTCT临床成人每日用量(如162 g/60 kg),换算得大鼠每日给药剂量为15.26 g·kg⁻¹·d⁻¹。JTCT组按15.26 g·kg⁻¹·d⁻¹剂量每日灌胃2次(早8:00、晚18:00),单次灌胃量为20 mL·kg⁻¹体重(每日总灌胃量40 mL·kg⁻¹);空白组给予等体积蒸馏水,灌胃频率及体积同JTCT组,连续干预5 d。实验第6天晨8:00, JTCT组按单次剂量(7.63 g·kg⁻¹)灌胃1次,空白对照组给予等体积蒸馏水;末次灌药后1 h,腹腔注射舒泰50注射液(75 mg·kg⁻¹)麻醉大鼠,待角膜反射消失后(10~15 min),通过腹主动脉取血。采集的血液置于促凝管中,室温静置2 h后,于4℃、3 000 r·min⁻¹离心15 min,分离血清;取上清液置于56℃水浴灭活30 min,随后用0.22 μm无菌微孔滤膜过滤除菌,分装于无菌离心管中,标记后置于-80℃超低温冰箱保存备用。

2.4 原代LSECs细胞提取 采用随机数字表法选取20只8周龄雄性SPF级SD大鼠,实验前适应性喂养3 d,禁食12 h(不禁水)后用于细胞提取。通过胶原酶原位离体灌注、Percoll密度梯度离心及选择性去除Kupffer细胞的方法^[27-28],从肝脏中分离原代LSECs。分离的LSECs在含10%胎牛血清的DMEM培养基中置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,24 h后更换培养基以去除未贴壁细胞,当细胞汇合度达到70%~80%时进行传代,传代1次后进行后续实验。

2.5 细胞小干扰核糖核酸(siRNA)转染 使用siRNA试剂盒按说明书进行细胞瞬时转染。转染前

24 h制备24孔细胞板,每孔接种 $0.5\sim 2\times 10^5$ 个细胞于400 μL 无抗生素培养基中。当细胞融合度达30%~50%时,按照siRNA试剂盒说明书制备转染复合物,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养18~48 h。转染4~6 h后更换新鲜培养基,24 h内通过Real-time PCR评估siRNA转染效率,使用快速细胞RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,再通过SYBR Green Pro-*Taq* HS预混Real-time PCR试剂盒完成逆转录及Real-time PCR扩增反应(扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸30 s,共40个循环)。24 h后通过Real-time PCR检测siRNA沉默效率。以GAPDH为内参,相关引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,siRNA序列见表1。

表1 sGC siRNA 序列
Table 1 sGC siRNA sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
si-sGC-1	上游 CGCGCTACTGTGATGCTTTA (dt)(dt)	123
	下游 TAGCAGTGGCGTTGTGGTAG (dt)(dt)	
si-sGC-2	上游 CAACCCACTGCTAACTCCT (dt)(dt)	104
	下游 CACGCCGAATGATGGCACAT (dt)(dt)	
si-sGC-3	上游 ATCGTCCGGGGTGTCAGTA (dt)(dt)	155
	下游 TCCTTCCAACGCCTCTAGGG (dt)(dt)	
GAPDH	上游 GCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA (dt)(dt)	124
	下游 TGGTAACCAGGCGTCCGATA (dt)(dt)	

2.6 细胞内 Ca^{2+} 浓度测定 用荧光探针Fluo-4/AM标记细胞内 Ca^{2+} 。加入 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fluo-4/AM 0.2 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,孵育结束后,小心吸弃染色液,每孔加入预温至37 $^{\circ}\text{C}$ 的Hanks平衡盐溶液0.5 mL后进行检测。通过高强度成像扫描细胞内荧光强度变化,以平均荧光强度变化反映细胞内游离 Ca^{2+} 相对水平,采用Image-Pro Plus软件分析荧光强度。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达水平 采用聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度:按照试剂盒说明书配制工作液,100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴加热10 min使蛋白充分变性,随后置于冰上冷却5 min。随后置于10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶上进行电泳分离。采用湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,用5%脱脂奶粉(溶于TBST)或5%牛血清白蛋白(BSA)(溶于TBST)室温封闭1 h以减少非特异性结合。封闭后,膜与一抗溶液在4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜,Notch1、Hes1、CD31、vWF、GAPDH、

eNOS和p-eNOS(1:1 000)。次日弃去一抗,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗溶液共同孵育1 h。采用ECL化学发光试剂盒显影,使用Image J软件分析,测定条带灰度值以计算相对表达量,实验重复3次取均值。

2.8 Real-time PCR检测 采用快速细胞RNA提取试剂盒从肝组织或培养的LSECs中提取总RNA。采用NanoDrop 2000分光光度计检测RNA浓度及纯度。取总RNA 500 ng进行逆转录,逆转录总反应体系20 μL :RNA模板、 $5\times$ 逆转录缓冲液4 μL 、逆转录酶混合液1 μL 、引物1 μL 、无核酸酶水补足至20 μL ;逆转录反应程序:25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min,42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录30 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 灭活5 min,冰浴冷却得到cDNA,稀释5倍备用。定量Real-time PCR使用ABI7500仪器和SYBR Green Pro-*Taq* HS预混Real-time PCR试剂盒进行,程序为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s,随后95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸30 s,共40个循环,最后进行熔解曲线分析。以GAPDH为内参,相关引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,引物序列见表2。

表2 sGC引物序列
Table 2 Primer sequences of sGC

引物	序列(5'-3')	长度/bp
sGC(小鼠)	上游 CTGCTGGTGATCCGCAATTAT	126
	下游 GATGGTATCATAGCCAGACTCCT	
sGC(大鼠)	上游 CTCAACAGATACACGGCACTG	142
	下游 GCTGATACGTGATTCTGGGT	
GAPDH(小鼠)	上游 AGGTCGGTGTGAACGGATTG	122
	下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
GAPDH(大鼠)	上游 GCTCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA	124
	下游 TGGTAACCAGGCGTCCGATA	

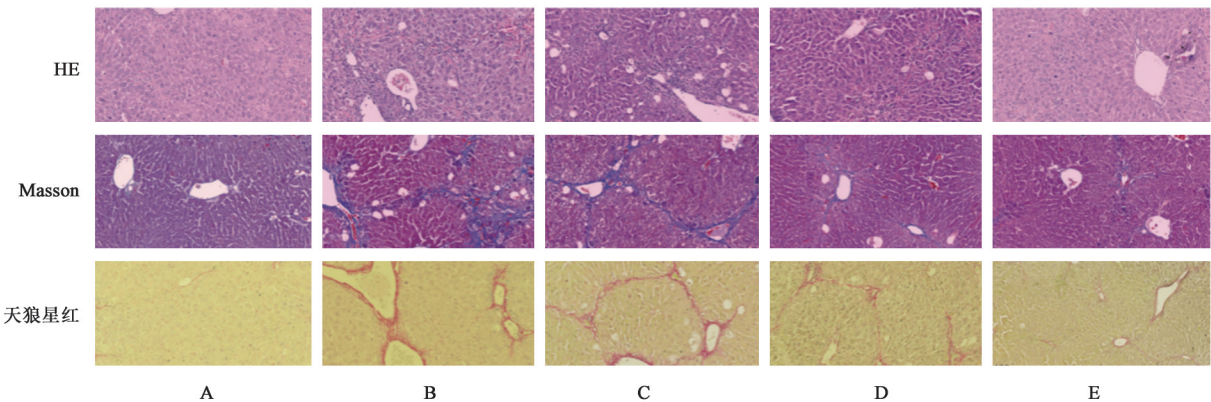
2.9 组织病理学与免疫组化(IHC)染色 将肝左叶浸入4%多聚甲醛固定超过48 h。随后,肝组织按试剂说明书进行苏木素和伊红染色。制备4 μm 厚的肝组织切片用于形态学分析。采用HE染色评估肝组织是否出现肝细胞变性坏死、炎症细胞浸润,采用Masson和天狼星红染色评估胶原表达,分别使用HE试剂盒、Masson三色试剂盒和天狼星红染色试剂盒操作。通过IHC染色鉴定靶蛋白表达:脱蜡和抗原修复后,切片样本采用CD31抗体(1:100)、vWF抗体(1:150)于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育8 h。次日,切片在二氨基联苯胺混合液中进行二抗处理30 min,苏木素复染后采用中性树脂封片。

2.10 Hyp、ALT及AST含量测定 按照试剂盒说明书分别检测各组小鼠血清中HYP、ALT及AST含量。

2.11 统计学分析 采用SPSS 26.0软件进行统计分析。计量资料符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间等方差样本均值比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验;方差不齐的多组样本均值比较采用Kruskal Wallis *H*检验,两两比较采用Dunnett's *T*检验。所有假设检验均为双侧检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 JTCT对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠肝脏组织病理形态的影响 HE、Masson、天狼星红结果显示,正常组肝组织排列整齐,无炎症及坏死,无纤维组织增生。模型组小鼠出现脂肪样变性、炎症细胞浸润、肝细胞变性坏死、小叶结构紊乱及纤维组织增生,提示肝损伤严重。JTCT各剂量组对小鼠肝纤维化均有显著改善,其中以JTCT-H组(高剂量组)效果更显著。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.JTCT-L组;D.JTCT-M组;E.JTCT-H组(图2、图3同)

图1 JTCT对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠肝脏组织病理形态的影响(×100)

Fig. 1 Effect of JTCT on hepatic histopathological morphology in CCl₄-induced liver fibrosis mice (×100)

3.2 JTCT对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠血清Hyp含量及ALT、AST水平的影响 生化结果显示,与正常组相比,模型组小鼠血清Hyp含量及ALT、AST水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,JTCT各

剂量组小鼠血清Hyp含量及ALT、AST水平均显著降低($P<0.01$),且呈现一定的剂量依赖性,其中以高剂量组效果更显著($P<0.01$),差异具有统计学意义。见表3。

表3 JTCT对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠血清Hyp含量及ALT、AST水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of JTCT on Hyp, ALT and AST content in mice with CCl₄-induced liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Hyp/mg·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
正常组		235.16±41.57	33.03±3.98	118.30±15.67
模型组		816.25±53.00 ¹⁾	862.29±148.35 ¹⁾	936.47±126.96 ¹⁾
JTCT-L组	16.6	633.98±56.20 ²⁾	655.64±88.97 ²⁾	724.09±109.16 ²⁾
JTCT-M组	33.3	412.71±51.99 ²⁾	492.07±105.07 ²⁾	576.25±113.22 ²⁾
JTCT-H组	66.6	273.26±52.07 ²⁾	384.37±111.59 ²⁾	408.93±121.51 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾表示 $P<0.01$

3.3 JTCT对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠肝脏组织CD31及vWF的影响 IHC结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝组织中LSECs毛细血管化标志物CD31和vWF表达均升高,并且主要集中在肝窦区。JTCT各剂量组显著抑制CD31和vWF的表达,其中以高剂量组效果最显著。见图2。

3.4 JTCT对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠肝脏Notch1/Hes1通路相关蛋白表达的影响 Western

blot结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝组织Notch1、Hes1、CD31、vWF表达显著升高($P<0.01$),p-eNOS/eNOS表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,JTCT各剂量组小鼠肝组织Notch1、Hes1、CD31、vWF表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),p-eNOS/eNOS表达显著升高($P<0.01$),其中以高剂量组效果更显著($P<0.01$)。见表4、图3。

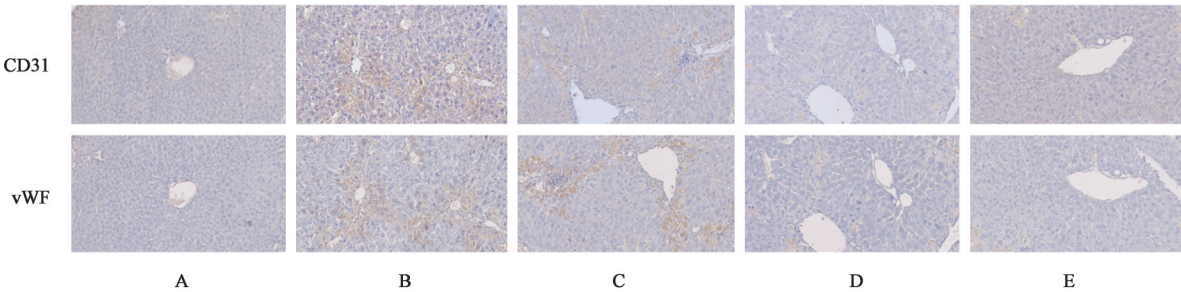


图2 JTCT对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠肝脏组织CD31及vWF的影响(免疫组化,×100)

Fig. 2 Effect of JTCT on CD31 and vWF in liver tissues of CCl₄-induced liver fibrosis mice (IHC, ×100)

表4 JTCT对CCl₄肝纤维化小鼠肝组织Notch1、Hes1、eNOS等相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of JTCT on expression of Notch1, Hes1, eNOS and other related proteins in liver tissue of CCl₄-induced liver fibrosis mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Notch1/GAPDH	Hes1/GAPDH	p-eNOS/eNOS	CD31/GAPDH	vWF/GAPDH
正常组		0.31±0.11	0.41±0.16	0.46±0.15	0.33±0.01	0.29±0.05
模型组		2.18±0.19 ¹⁾	2.27±0.22 ¹⁾	0.07±0.02 ¹⁾	2.48±0.18 ¹⁾	2.58±0.17 ¹⁾
JTCT-L组	16.6	1.79±0.25 ²⁾	1.14±0.20 ³⁾	0.28±0.14 ³⁾	1.55±0.14 ³⁾	0.89±0.15 ³⁾
JTCT-M组	33.3	1.62±0.21 ²⁾	1.15±0.18 ³⁾	0.56±0.15 ³⁾	1.11±0.15 ³⁾	0.77±0.13 ³⁾
JTCT-H组	66.6	0.29±0.12 ³⁾	0.58±0.55 ³⁾	0.68±0.27 ³⁾	0.59±0.13 ³⁾	0.27±0.12 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾表示 $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表5同)

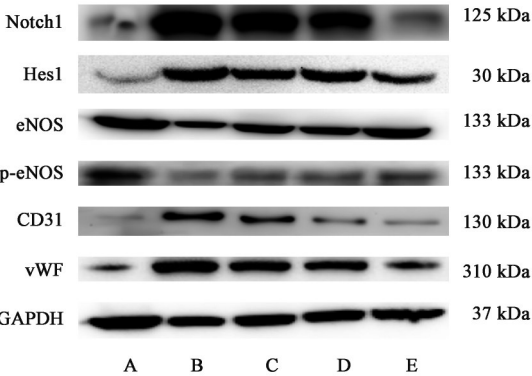


图3 各组小鼠肝组织Notch1、Hes1、eNOS、p-eNOS、CD31及vWF蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis for protein expression of Notch1, Hes1, eNOS, p-eNOS, CD31, and vWF in liver tissues of liver fibrosis mice in each group

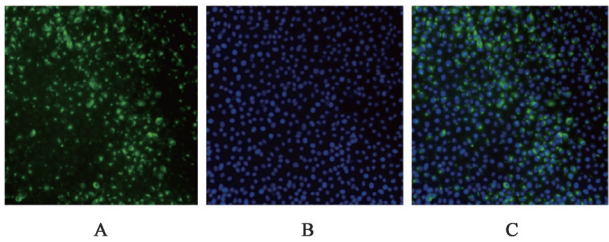
3.5 JTCT对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠肝脏组织sGC mRNA表达的影响 结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肝组织sGC转录水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,JTCT各剂量组小鼠肝组织sGC转录水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),其中以高剂量组效果最显著($P<0.01$)。见表5。

3.6 原代LSECs细胞鉴定 免疫荧光结果显示,从大鼠肝脏中分离原代LSECs,并鉴定为特异性标志物淋巴管内皮受体-1(Lyve-1)阳性。见图4。

表5 JTCT对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠肝脏组织sGC mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of JTCT on sGC mRNA expression in liver tissues of CCl₄-induced liver fibrosis mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	sGC
正常组		1.08±0.13
模型组		0.29±0.11 ¹⁾
JTCT-L组	16.6	0.50±0.28 ²⁾
JTCT-M组	33.3	0.60±0.18 ³⁾
JTCT-H组	66.6	0.97±0.33 ³⁾



注:A.Lyve-1;B.DAPI;C.Merge

图4 原代LSECs细胞鉴定(IF,×200)

Fig. 4 Identification of primary LSECs cells (IF, ×200)

3.7 JTCT对Notch激动剂处理的原代LSECs中Notch1、Hes1、eNOS、p-eNOS、CD31及vWF蛋白表达的影响 与LSEC-1day组比较,LSEC-5day组Notch1、Hes1、CD31、vWF表达显著升高($P<0.01$),p-eNOS/eNOS表达显著降低($P<0.01$)。与LSEC-

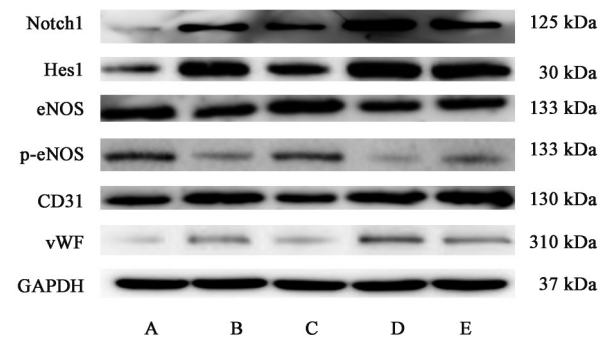
表6 JTCT对Notch激动剂处理原代LSECs细胞Notch1、Hes1、eNOS等相关蛋白表达的影响 [$M(P_{25}, P_{75}), n=3$]

Table 6 Effect of JTCT on expression of Notch1, Hes1, eNOS and other related proteins in primary LSECs treated with Notch agonist [$M(P_{25}, P_{75}), n=3$]

组别	Notch1/GAPDH	Hes1/GAPDH	p-eNOS/eNOS	CD31/GAPDH	vWF/GAPDH
LSEC-1day组	0.203(0.202, 0.260)	0.154(0.146, 0.202)	1.083(1.039, 1.096)	0.448(0.441, 0.544)	0.315(0.304, 0.365)
LSEC-5day组	0.580(0.578, 0.622) ¹⁾	0.703(0.683, 0.714) ¹⁾	0.514(0.493, 0.561) ¹⁾	1.055(0.971, 1.067) ¹⁾	1.262(1.257, 1.288) ¹⁾
JTCT组	0.255(0.239, 0.268) ²⁾	0.311(0.244, 0.313) ²⁾	1.077(1.005, 1.098) ²⁾	0.405(0.392, 0.446) ²⁾	0.633(0.625, 0.692) ²⁾
Jagged1组	1.046(1.042, 1.096) ²⁾	0.986(0.908, 0.987) ²⁾	0.179(0.154, 0.198) ²⁾	2.243(2.098, 2.273) ²⁾	2.308(2.188, 2.368) ²⁾
Jagged1+JTCT组	1.119(1.088, 1.195)	1.032(1.012, 1.049)	0.178(0.174, 0.228)	2.069(1.998, 2.183)	2.174(2.025, 2.187)

注:JTCT组体积分数20%含药血清;Jagged1组质量浓度25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Jagged1溶液;Jagged1+JTCT组体积分数20%含药血清+25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Jagged1溶液(表7-表10同)。与LSEC-1day组比较¹⁾ $P<0.01$;与LSEC-5day组比较²⁾ $P<0.01$ (表7、表8同)

5day组比较,JTCT组Notch1、Hes1、CD31、vWF表达显著降低($P<0.01$),p-eNOS/eNOS表达显著升高



注:A.LSEC-1day组;B.LSEC-5day组;C.JTCT组;D.Jagged1组;E.Jagged1+JTCT组(图6同)

图5 各组原代LSECs细胞Notch1、Hes1、eNOS、p-eNOS、CD31及vWF蛋白电泳

Fig. 5 Protein electrophoresis of Notch1, Hes1, eNOS, p-eNOS, CD31 and vWF proteins in primary LSECs of each group

3.8 JTCT对Notch激动剂处理的原代LSECs中sGC mRNA表达的影响 Real-time PCR结果显示,与LSEC-1day组比较,LSEC-5day组sGC转录水平显著降低($P<0.01$)。与LSEC-5day组比较,JTCT组sGC转录水平显著升高($P<0.01$),Jagged1组sGC转录水平显著降低($P<0.01$)。Jagged1组与Jagged1+JTCT组之间差异无统计学意义。见表7。

3.9 JTCT对Notch激动剂处理的原代LSECs中 Ca^{2+} 水平的影响 免疫荧光结果显示,与LSEC-1Day组比较,LSEC-5Day组 Ca^{2+} 浓度显著升高($P<0.01$)。与LSEC-5Day组比较,JTCT组的 Ca^{2+} 浓度显著降低($P<0.01$),Jagged1组与Jagged1+JTCT组之间差异无统计学意义。见表8、图6。

3.10 JTCT对sGC敲低原代LSECs中CD31及vWF蛋白表达的影响 LSEC-5day组即体外培养5天的原代LSECs搭载空白质粒组,JTCT组即加味桃核承气汤含药血清搭载空白质粒组,sGC-KO组

($P<0.01$)。Jagged1组与Jagged1+JTCT组之间差异无统计学意义。见表6、图5。

表7 JTCT对Notch激动剂处理的原代LSECs中sGC mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of JTCT on sGC mRNA expression in primary LSECs treated with Notch agonist ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	sGC
LSEC-1day组	1.00±0.03
LSEC-5day组	0.58±0.05 ¹⁾
JTCT组	0.84±0.02 ²⁾
Jagged1组	0.26±0.04 ²⁾
Jagged1+JTCT组	0.28±0.04

表8 JTCT对Notch激动剂处理的原代LSECs中 Ca^{2+} 荧光强度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of JTCT on Ca^{2+} fluorescence intensity in primary LSECs treated with Notch agonist ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Ca^{2+}
LSEC-1day组	77.37±1.15
LSEC-5day组	117.00±1.97 ¹⁾
JTCT组	87.43±2.50 ²⁾
Jagged1组	128.70±2.83 ²⁾
Jagged1+JTCT组	126.60±3.35

为sGC敲低组,sGC-KO+JTCT组即sGC敲低与加味桃核承气汤含药血清共孵育组。Western blot结果显示,与LSEC-5day组比较,JTCT组CD31、vWF表达显著降低($P<0.01$),sGC-KO组CD31、vWF表达显著升高($P<0.01$)。sGC-KO组与sGC-KO+JTCT组比较,CD31、vWF表达差异无统计学意义。见图7、表9。

3.11 JTCT对sGC敲低原代LSECs中 Ca^{2+} 水平的影响 免疫荧光结果显示,与LSEC-5day组比较,JTCT组 Ca^{2+} 浓度显著降低($P<0.01$),sGC-KO组

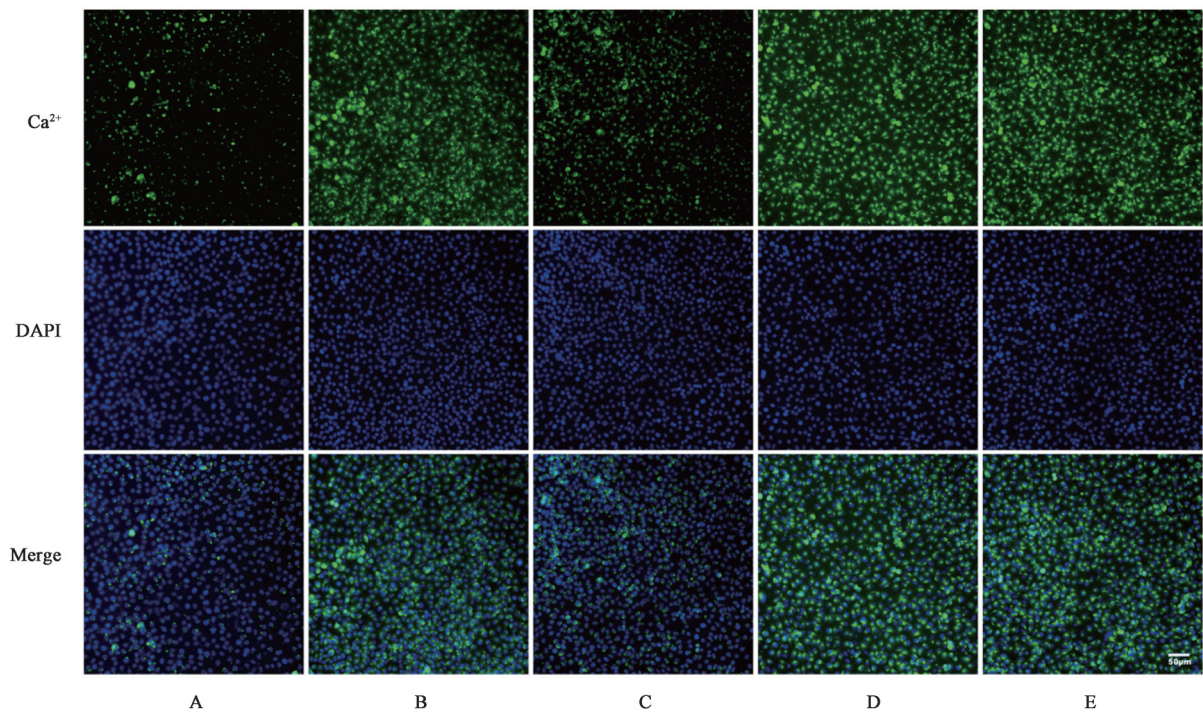
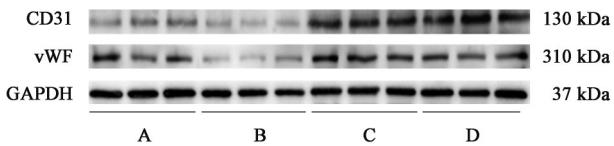


图6 JTCT对Notch激动剂处理的原代LSECs中Ca²⁺水平的影响(IF,×50)

Fig. 6 Effect of JTCT on Ca²⁺ levels in primary LSECs treated with Notch agonist (IF,×50)



注：A. LSEC-5day组；B. JTCT组；C. sGC-KO组；D. sGC-KO+JTCT组(图8同)

图7 JTCT对sGC敲低原代LSECs中CD31及vWF蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of CD31 and vWF protein expression in primary LSECs with sGC knockdown treated with JTCT

表9 JTCT对sGC敲低原代LSECs中CD31及vWF蛋白表达的影响 [M(P₂₅,P₇₅),n=3]

Table 9 Effect of JTCT on protein expressions of CD31 and vWF in sGC-knockdown primary LSECs [M(P₂₅,P₇₅),n=3]

组别	CD31/GAPDH	vWF/GAPDH
LSEC-5day组	0.464(0.446,0.483)	0.505(0.481,0.522)
JTCT组	0.149(0.136,0.171) ¹⁾	0.213(0.207,0.252) ¹⁾
sGC-KO组	0.948(0.932,0.949) ¹⁾	0.826(0.775,0.864) ¹⁾
sGC-KO+JTCT组	0.917(0.860,0.949)	0.754(0.726,0.775)

注：与LSEC-5day组比较¹⁾P<0.01(表10同)

Ca²⁺浓度显著升高(P<0.01)。sGC-KO组与sGC-KO+JTCT组比较, Ca²⁺浓度差异无统计学意义。见图8、表10。

4 讨论

肝纤维化在中医属“积聚”“臌胀”等范畴,其病因涉及情志内伤、湿热侵袭等,病位主要在肝,涉及

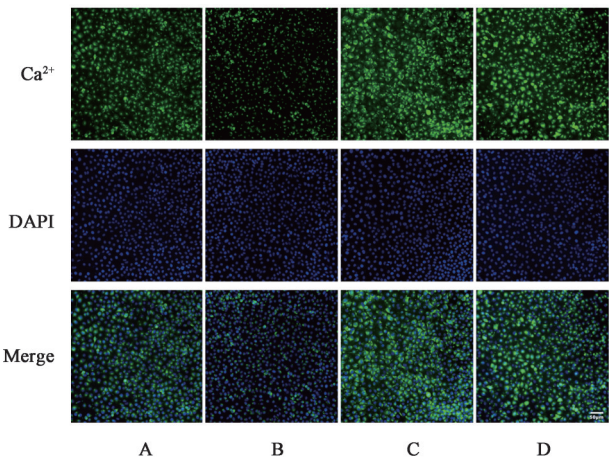


图8 JTCT对sGC敲低原代LSECs中Ca²⁺水平的影响(IF,×50)

Fig. 8 Effect of JTCT on Ca²⁺ levels in sGC-knockdown primary LSECs(IF,×50)

表10 JTCT对sGC敲低原代LSECs中Ca²⁺荧光强度的影响(̄x±s,n=3)

Table 10 Effect of JTCT on Ca²⁺ fluorescence intensity in sGC-knockdown primary LSECs (̄x±s,n=3)

组别	Ca ²⁺
LSEC-5day组	121.30±0.93
JTCT组	88.19±1.07 ¹⁾
sGC-KO组	140.50±2.06 ¹⁾
sGC-KO+JTCT组	137.30±2.60

脾。情志不舒或湿热稽留,致肝失疏泄,气机郁滞,进而血行涩滞,形成气滞血瘀,肝络瘀阻;同时,肝木乘脾,肝病日久穷必及脾,致脾失健运,水湿不化,聚而为痰,痰湿与瘀血搏结,形成痰瘀互结之病理产物,壅滞肝络,胶结难解,终致肝络痹阻、肝体失于濡养^[29]。此病理过程中,肝失疏泄为痰瘀生成之始动环节——气机郁滞既可直接致瘀,又可因木不疏土间接引发脾虚生湿;而脾虚湿盛则为痰瘀迁延之基础——水湿内停既助痰浊滋生,又可阻滞血行加重瘀血。二者互为因果,终致肝络阻滞日增,纤维组织渐生,最终发展为肝纤维化^[30]。JTCT基于“气血同治、攻补兼施”的治则,通过化痰通络以攻其实、健脾益气以补其虚,在肝纤维化临床治疗中已显示出确切疗效^[31]。

eNOS主要表达于血管内皮细胞,生理状态下以L-精氨酸为底物,在辅酶(如NADPH、四氢生物蝶呤等)参与下,催化生成NO和L-瓜氨酸。NO作为eNOS的主要功能产物,可从内皮细胞扩散至血管平滑肌细胞,激活sGC,催化三磷酸鸟苷(GTP)生成环磷酸鸟苷(cGMP)^[32]。cGMP通过激活蛋白激酶G(PKG),抑制钙内流并促进钙外流,降低胞内Ca²⁺浓度,从而维持LSECs窗孔结构的开放与稳定^[33]。此外,NO缺乏使LSECs窗孔闭合,内皮细胞间隙消失,逐渐转化为“连续型内皮”(毛细血管化),阻碍物质交换^[34]。CD31在肝脏中主要表达于肝窦内皮细胞表面,参与内皮细胞间连接及血管新生调控^[35]。正常状态下,LSECs呈“多孔非连续型”结构,CD31低表达;肝损伤(如纤维化)时,LSECs发生去分化并向毛细血管内皮表型转化,CD31表达显著上调,成为肝窦毛细血管化的标志性分子^[36]。vWF在正常LSECs中几乎不表达,当肝窦内皮受损激活时,vWF合成与释放增加,不仅参与内皮修复,其血清水平亦为肝内皮细胞损伤的特异性生物标志物(如肝硬化患者血清vWF显著升高)^[37]。本研究中,Western blot结果表明,JTCT可上调小鼠肝组织及原代LSECs中p-eNOS/eNOS的蛋白值,同时下调CD31、vWF的蛋白表达,并减少胞内Ca²⁺内流。Real-time PCR结果显示,JTCT增加了小鼠体内和LSECs中sGC的mRNA水平。机制验证实验中,在LSECs中敲低sGC可阻断eNOS信号通路,且能逆转JTCT对LSECs毛细血管化的抑制作用。上述结果表明,JTCT通过激活eNOS信号通路抑制LSECs毛细血管化,但其上游调控机制仍需深入探讨。

Notch信号通路是一条高度保守的细胞间信号传导途径,Notch信号激活(如Notch1/Hes1信号通路)可诱导LSECs表达促纤维化因子(如纤连蛋白、层粘连蛋白),促进基底膜形成和细胞外基质沉积,加剧肝窦结构破坏,导致肝细胞缺氧和纤维化^[38]。在血管内皮细胞中,Notch1激活可通过下游转录因子Hes1直接结合eNOS启动子区域,抑制其转录,从而减少NO生成^[15]。Western blot结果表明,JTCT可抑制LSECs中Notch1、Hes1的蛋白表达,同时下调毛细血管化标志物CD31、vWF的水平,并上调p-eNOS/eNOS的磷酸化比值。机制验证实验中,采用Notch通路特异性激动剂Jagged1与JTCT共同处理LSECs后,JTCT对Notch1-Hes1的抑制作用及对eNOS-NO通路的激活作用均被逆转,其逆转LSECs毛细血管化的效应也显著减弱。上述结果提示,JTCT可能通过抑制Notch通路解除对eNOS的转录抑制,从而激活eNOS/NO信号通路,最终恢复LSECs的正常表型。见增强出版附加材料。

JTCT由周庚生教授基于肝纤维化“气滞血瘀、痰瘀互结”的核心病机,在《伤寒论》桃核承气汤基础上,合《金匱要略》鳖甲煎丸中鳖甲、莪术等软坚散结之品化裁而成^[39],全方位紧扣“气血同治、攻补兼施”的治则。方中以桃仁为君,破血行滞而通肝络;辅以莪术逐瘀通经、丹参活血养血、三七散瘀定痛,三药共为臣,四者相伍,既增活血之力,又因丹参、三七的养血之性而避逐瘀伤正之弊。香附疏肝理气为佐,与活血药相配,契合“气行则血行”之理,以解瘀血阻滞之气机郁滞。制大黄苦寒沉降,专“破留血,行瘀血”(《神农本草经》),能引瘀浊从二便而出,为佐使药。同时,针对“脾虚失运、肝体失养”,配白术健脾燥湿、桂枝温通经脉,二药辛温相济,一补一通,既助脾胃生化气血,又通利血脉壅滞;鳖甲咸寒软坚,《神农本草经》言其“主心腹癥瘕坚积”,其性滋阴不腻、散瘀护正,与莪术、丹参相须为用,共消肝络痰瘀微结。更佐茯苓渗湿健脾,助白术培补后天;使以甘草、大枣甘温益气,既充气血生化之源,又缓诸药攻伐之性,固护正气。现代药理学研究表明,JTCT中桃仁的主要成分苦杏仁苷可抑制血小板聚集、扩张肝内血管,其作用可能与改善肝窦血流瘀滞、缓解LSECs缺氧微环境有关,从而减轻毛细血管化^[40]。大黄中的蒽醌类成分(如大黄素)可通过抑制Kupffer细胞活化及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)等促纤维化细胞因子的释放,减轻LSECs的炎症损伤^[41-42]。

此外,桂枝中的桂皮醛及甘草酸可能通过上调血管内皮生长因子(VEGF)表达、激活eNOS信号通路,增加LSECs窗孔密度、改善内皮通透性,从而逆转毛细血管化表型,其机制与“温通经脉”的功效密切相关。

本研究通过体内外实验证实,JTCT作为治疗肝纤维化的有效方剂,其作用机制可能通过抑制Notch信号通路、激活eNOS信号通路,协同改善肝窦微环境并恢复LSECs正常表型。团队前期研究已证实,JTCT的抗纤维化疗效显著优于阳性对照药秋水仙碱^[22],故本研究未再设置秋水仙碱对照组,重点聚焦其作用机制探索。既往研究多聚焦于LSECs单一信号通路(如单独Notch信号通路或eNOS信号通路)或关键分子的调控作用^[43-44],而本研究证实了Notch与eNOS信号通路在LSECs毛细血管化过程中存在交互调控,并创新性揭示JTCT可通过协同抑制Notch通路、激活eNOS信号通路发挥综合调控效应,为肝纤维化的多通路靶向干预提供了新视角。相较于雷公藤红素(Celastrol)^[45]、姜黄素^[46]或 β -连环蛋白(β -catenin)/T细胞因子4(TCF4)抑制剂^[47]等单一成分的效应研究,本研究探索了JTCT复方对多途径的协同影响。未来研究将聚焦于JTCT有效成分的分离与鉴定:针对已知的丹酚酸A、甘草酸等主要成分,将结合色谱分离、质谱分析等技术,进一步筛选和确证其他潜在活性成分。上述研究不仅有助于明确JTCT的临床应用潜力,更为开发基于JTCT的创新疗法提供科学依据。通过多维度研究,有望全面阐明JTCT多组分调控信号通路的分子机制,为肝脏疾病及免疫调节异常相关疾病的治疗提供新策略。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues[J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 37-55.
- [2] BATALLER R, BRENNER D A. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209-218.
- [3] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-166.
- [4] ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. Cells, 2020, 9(4): 875.
- [5] STEFAN N, YKI-JÄRVINEN H, NEUSCHWANDER-TETRI B A. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease;

Heterogeneous pathomechanisms and effectiveness of metabolism-based treatment[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2025, 13(2): 134-148.

- [6] GAO J, LAN T, KOSTALLARI E, et al. Angiocrine signaling in sinusoidal homeostasis and liver diseases[J]. J Hepatol, 2024, 81(3): 543-561.
- [7] GRACIA-SANCHO J, CAPARRÓS E, FERNÁNDEZ-IGLESIAS A, et al. Role of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(6): 411-431.
- [8] CHEN T, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Autophagic degradation of MVBs in LSECs promotes aldosterone induced-HSCs activation[J]. Hepatol Int, 2024, 18(1): 273-288.
- [9] JIN H, LI J, WANG S, et al. Vasodilatory effect of *n*-butanol extract from *Sanguisorba officinalis* L. and its mechanism[J]. Plants (Basel), 2025, 14(7): 1095.
- [10] GONZALEZ M, CLAYTON S, WAUSON E, et al. Promotion of nitric oxide production: Mechanisms, strategies, and possibilities[J]. Front Physiol, 2025, 16: 1545044.
- [11] CARLSTRÖM M, WEITZBERG E, LUNDBERG J O. Nitric oxide signaling and regulation in the cardiovascular system: Recent advances[J]. Pharmacol Rev, 2024, 76(6): 1038-1062.
- [12] LI H, LIU D, GONG M, et al. ZLY032 mediated activation of Notch1/Hes1 signaling inhibits cardiomyocyte ferroptosis to protect against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Biochem Pharmacol, 2025, 239: 117039.
- [13] HUANGFU Q, ZHANG J, XU J, et al. Mechanosensitive Ca^{2+} channel TRPV1 activated by low-intensity pulsed ultrasound ameliorates acute kidney injury through Notch1-Akt-eNOS signaling[J]. FASEB J, 2025, 39(1): e70304.
- [14] ZHANG L, WANG G, LI Z, et al. Molecular pharmacology and therapeutic advances of monoterpene perillyl alcohol[J]. Phytomedicine, 2024, 132: 155826.
- [15] ELEY L, RICHARDSON R V, ALQAHTANI A, et al. eNOS plays essential roles in the developing heart and aorta linked to disruption of Notch signalling[J]. Dis Model Mech, 2024, 17(1): dmm050265.
- [16] 黄淑霞, 吕文良. 基于“主客交”理论探讨慢性乙型肝炎肝纤维化的中医治疗[J]. 湖北中医药大学学报, 2025, 27(2): 53-56.
HUANG S X, LYU W L. Discussion on TCM treatment of chronic hepatitis B liver fibrosis based on the theory of "host-guest interaction"[J]. J Hubei Univ Tradit Chin Med, 2025, 27(2): 53-56.
- [17] 陈东方, 郑丽红. 中医药调控Notch信号通路治疗肝纤维化的研究概况[J]. 中西医结合肝病杂志, 2025, 35(2): 260-264.
CHEN D F, ZHENG L H. General situation of research on Notch signaling pathway regulated by traditional Chinese medicine in the treatment of hepatic fibrosis[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2025, 35(2): 260-264.

- [18] 陈静,徐蕾,曹正民,等. 中医药抗肝纤维化细胞分子机制研究进展[J]. 中华中医药杂志,2022,37(3):1564-1569.
CHEN J, XU L, CAO Z M, et al. Research progress on cell and molecular mechanism of traditional Chinese medicine against liver fibrosis [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022,37(3):1564-1569.
- [19] 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.
ZHOU N, YANG X, XIA X J, et al. Effect of serum containing Shugan Jianpi Huoxue decoction on the proliferation of HSC based on TGF- β_1 /Smads pathway [J]. Zhejiang Chin J Integr Tradit West Med, 2018, 28 (4) : 267-270.
- [20] 夏雪皎,林庚庭,滕飞,等. 疏肝健脾活血方对肝纤维化大鼠肝组织 HIF-1 α 蛋白及 VEGF mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2018,33(4):1357-1360.
XIA X J, LIN G T, TENG F, et al. Effects of Shugan Jianpi Huoxue decoction on hypoxia inducible factor-1 α protein and vascular endothelial growth factor mRNA on liver fibrosis in rats [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33 (4) : 1357-1360.
- [21] 夏雪皎,黄桢,鲁军,等. 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[J]. 中医杂志,2018,59(23):2037-2042.
XIA X J, HUANG Y, LU J, et al. Effects of serum containing Shugan Jianpi Huoxue decoction on defenestration of sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis model rats [J]. J Tradit Chin Med, 2018, 59(23):2037-2042.
- [22] SHAO C, LAN W, DING Y, et al. JTCT attenuates HF by inhibiting activation of HSCs through PPAR α -TFEB axis-mediated lipophagy [J]. Phytomedicine, 2025, 139:156501.
- [23] HUANG Y, WANG Z, HE Y, et al. Jiawei Taohe Chengqitang attenuates hepatic fibrosis by preventing activation of HSCs through regulating Src/ERK/Smad3 signal pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 305:116059.
- [24] 黄桢,鲁军,夏雪皎,等. 疏肝健脾活血方对 Notch-Hes1 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志,2019,34(8):3443-3446.
HUANG Y, LU J, XIA X J, et al. Effects of Shugan Jianpi Huoxue decoction on Notch-Hes1 signal pathway [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(8):3443-3446.
- [25] CHO K, LIM G, JOO S, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl $_4$ -induced liver fibrosis in mice [J]. Liver Int, 2011, 31(7):932-939.
- [26] 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.
HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2004, 9(9):1069-1072.
- [27] 贺云,黄敏健,陈艺生. HBV 转基因小鼠肝原代细胞分离纯化及其在肝损伤研究中的应用[J]. 中国实验动物学报,2022,30(4):526-532.
HE Y, HUANG M J, CHEN Y S. Isolation and purification of primary hepatocytes from HBV transgenic mice and their application in the study of liver injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(4):526-532.
- [28] 陈明发,谢琼,杜展,等. 二氨基庚二酸激活小鼠原代肝窦内皮细胞中 NOD1 信号通路[J]. 实验动物科学,2025,42(2):21-25.
CHEN M F, XIE Q, DU Z, et al. Activation of NOD1 signaling by diaminopimelic acid in mouse primary liver sinusoidal endothelial cells [J]. Lab Anim Sci, 2025, 42(2):21-25.
- [29] 邝鸣,汤洋,宋浩,等. 从“虚损生积”论治肝纤维化[J]. 湖南中医药大学学报,2025,45(4):753-756.
KUANG M, TANG Y, SONG H, et al. Treating liver fibrosis from the perspective of "deficiency and impairment leading to abdominal masses" [J]. J Hunan Univ Tradit Chin Med, 2025, 45(4):753-756.
- [30] 王姝婷,徐晓梅. 基于肠肝轴理论从肝脾论治肝纤维化研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育,2024,22(20):102-104.
WANG S T, XU X M. Research progress of treating liver fibrosis from the perspective of liver and spleen based on the theory of gut-liver axis [J]. Chin Med Mod Dis Educ China, 2024, 22(20):102-104.
- [31] 杨欣,周凝,徐明英,等. 疏肝健脾活血方对肝星状细胞增殖的影响[J]. 中医学报,2017,32(4):582-585.
YANG X, ZHOU N, XU M Y, et al. The effect of Shugan Jianpi Huoxue decoction on hepatic stellate cell proliferation [J]. Acta Chin Med, 2017, 32(4):582-585.
- [32] SPLENDORE C O, SILVEIRA T H R, PEREIRA D A, et al. Resveratrol attenuates the priapism phenotype in sickle cell mice by restoring NO-cGMP-PDE5 signaling and reducing NADPH oxidase 2 expression [J]. Front Pharmacol, 2025, 16:1551533.
- [33] IWAKIRI Y, TREBICKA J. Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy [J]. JHEP Rep, 2021, 3(4):100316.
- [34] JUNG E, BAEK E B, HONG E, et al. TXNIP in liver sinusoidal endothelial cells ameliorates alcohol-associated liver disease via nitric oxide production [J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(2):606-620.
- [35] LI F, ZHAO S, FANG Q, et al. Tanshinone II $_A$ improved psychological stress-induced embryo implantation disorders by inhibiting GC/GR signaling and promoting angiogenesis [J]. Phytomedicine, 2025, 144:156946.
- [36] GAO F, MU W, FAN J, et al. β -arrestin2 promotes angiogenesis of liver sinusoidal endothelial cells through the VEGF/VEGFR2 pathway to aggravate cirrhosis [J]. Toxicol Lett, 2024, 401:1-12.

- [37] MASUDA H, KAJI K, NISHIMURA N, et al. Recombinant human ADAMTS13 attenuates LPS-induced acute kidney injury and renal microangiopathy in murine advanced liver fibrosis by cleaving vWF[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2025, 1872(7):120000.
- [38] BHANDARI S, KYRRETTAD I, SIMÓN-SANTAMARÍA J, et al. Mouse liver sinusoidal endothelial cell responses to the glucocorticoid receptor agonist dexamethasone [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1377136.
- [39] 张俊杰. 周庚生教授运用《伤寒论》方治验举隅[J]. *浙江中医学院学报*, 2004, 2004(6):37-38.
- ZHANG J J. Professor Zhou Gengsheng's clinical cases of treating diseases with prescriptions from Shanghan Lun[J]. *J Zhejiang Univ Tradit Chin Med*, 2004, 2004(6):37-38.
- [40] 李洪波, 倪慧慧. 复方桃仁胶囊对乙型肝炎肝硬化患者炎性相关细胞因子及 Treg/Th17 比率的影响[J]. *中外医疗*, 2023, 42(32):23-26x.
- LI H B, NI H H. Effect of compound Taoren capsule on inflammatory cytokines and Treg/Th17 ratio in patients with hepatitis B liver fibrosis[J]. *Chin Foreign Med Treat*, 2023, 42(32):23-26x.
- [41] 马琦阳, 潘高展. 大黄素对肝硬化大鼠肝功能及肠黏膜屏障损伤的改善作用[J]. *国际检验医学杂志*, 2025, 46(8):960-964.
- MA Q Y, PAN G Z. Improvement effect of emodin on the hepatic function and intestinal mucosal barrier damage in cirrhotic rats[J]. *Int J Lab Med*, 2025, 46(8):960-964.
- [42] 李果. 桃仁承气汤加味联合乳果糖在肝硬化合并肝性脑病患者安全性、肝功能及认知功能的临床研究[J]. *新疆中医药*, 2025, 43(2):35-38.
- LI G. Clinical study on safety, liver function and cognitive function of modified Taoren Chengqitang combined with lactulose in patients with liver cirrhosis complicated with hepatic encephalopathy [J]. *Xinjiang J Tradit Chin Med Pharm*, 2025, 43(2):35-38.
- [43] LUO M, DU Y, LIU X, et al. Fecal microbiota transplantation alleviates cirrhotic portal hypertension in rats via butyrate-mediated HDAC3 inhibition and PI3K/Akt/eNOS signaling regulation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2025, 1002:177781.
- [44] WANG S, SERR I, DIGIGOW R, et al. Nanoparticle platform preferentially targeting liver sinusoidal endothelial cells induces tolerance in CD4⁺ T cell-mediated disease models[J]. *Front Immunol*, 2025, 16:1542380.
- [45] LI D, CHEN J, YE C, et al. Celastrol ameliorates fibrosis in Western diet/tetrachloromethane-induced nonalcoholic steatohepatitis by suppressing Notch/osteopontin signaling [J]. *Phytomedicine*, 2025, 137:156369.
- [46] MA J, CHEN W, VAISHNANI D K, et al. Curcumin analog J7 attenuates liver fibrosis and metabolic dysregulation in a rat model of type 2 diabetes via modulation of TGF- β /Smad and NF- κ B/Bcl-2/Bax pathways[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2025, 19:2411-2432.
- [47] GAO Y, FAN S, ZHAO P, et al. β -catenin/TCF4 inhibitors ICG-001 and LF3 alleviate BDL-induced liver fibrosis by suppressing LECT2 signaling[J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 371:110350.

[责任编辑 顾雪竹]