

柴胡疏肝散对肝纤维化大鼠 TGF- β_1 /Smad 信号通路的影响

尚立芝, 王付*, 王琦, 苗小玲, 甘陈菲, 张慧娜, 王帮众
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**探讨柴胡疏肝散对肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 的作用机制。**方法:**60 只 Wistar 大鼠被随机均分为 6 组:正常组、模型组、柴胡疏肝散高、中、低剂量组、柴胡疏肝散预防组。除正常组外,其余各组均采用猪血清 ip 诱发 HF, 0.5 mL/只,2 次/周,连续 10 周,5 周后即可形成 HF。预防组于造模同时给药(以柴胡疏肝散 6.3 g·kg⁻¹),柴胡疏肝散高、中、低剂量组[(12.6,6.3,3.15) g·kg⁻¹]于造模第 6 周给药,连续 10 周。采用 RT-PCR 法检测各组肝组织转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), Smad2, Smad3, Smad4 和 Smad7 的 mRNA 表达,免疫组化法分别检测肝组织 TGF- β_1 , 磷酸化 Smad 2/3 (p-Smad 2/3) 和 Smad7 蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 的 mRNA 和 TGF- β_1 , p-Smad 2/3 蛋白表达均显著增加(均 $P < 0.01$), Smad7 基因表达显著降低(均 $P < 0.01$);与模型组比较,柴胡疏肝散中剂量组 TGF- β_1 和 Smad3 mRNA 表达均显著降低, p-Smad 2/3 和 TGF- β_1 蛋白表达显著减弱($P < 0.05$, $P < 0.01$), Smad7 基因表达显著增加($P < 0.01$)。**结论:**柴胡疏肝散有明显的抗 HF 作用,其机制可能与抑制 TGF- β_1 /Smad 信号通路有关。

[关键词] 柴胡疏肝散; 肝纤维化; 转化生长因子- β_1 ; Smad 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0125-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120125

Effects and Mechanism of Chaihu Shugan Powder on TGF- β_1 /Smad Signaling Pathways in Hepatic Fibrosis Model Rats SHANG Li-zhi, WANG Fu*, WANG Qi, MIAO Xiao-ling, GAN Chen-fei, ZHANG Hui-na, WANG Bang-zhong (Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects and mechanism of Chaihu Shugan powder (CHSGS) on hepatic fibrosis in rats. **Method:** Sixty Wistar rats were randomly divided into 6 groups: normol group, model group, Chaihu Shugan powder high-dose, mediate-dose, low-dose, and prevention group, except the normol group, all the other groups were injected with pig's serum without inactivation into abdominal cavity, twice per week and 0.5 mL each time, persisting for 10 weeks. The prevention groups were injected the stomach with the medicines (Chaihu Shugan powder 6.3 g·kg⁻¹, 10 weeks) at the same time when models began to be made, the other treatment groups were dealt with just as the prevention groups 6 weeks later persisting for 4 weeks. Then rats were randomly taken for decollation in all 6 groups at the end of 10th week. Chaihu Shugan powder high-dose group 12.6 g·kg⁻¹, mediate-dose group 6.3 g·kg⁻¹, low-dose group 3.15 g·kg⁻¹. RT-PCR assay were used to detect the expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), Smad2, Smad3, Smad4 and Smad7 mRNA. The expression of TGF- β_1 , p-Smad 2/3 and Smad7 protein in hepatic fibrosis tissues was detected by immunohistochemical techniques. **Result:** The expression of TGF- β_1 , Smad2, Smad3 mRNA and the expression of TGF- β_1 , p-Smad 2/3 protein were markedly higher, while the expression of Smad7 gene were significantly lower in the model group than those in normal group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of TGF- β_1 and Smad3 mRNA were markedly lower, but the expression of Smad7 gene were significantly higher, the expression of p-Smad 2/3 and TGF- β_1 protein were markedly lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

[收稿日期] 20141209(003)

[基金项目] 河南省教育厅科学技术研究重点项目(12B360010);河南省重点科技攻关项目(132102310099);郑州市科技领军人才项目(112PLJRC360)

[第一作者] 尚立芝,副教授,从事经方配伍及基础研究,E-mail:1357865736@qq.com

[通讯作者] *王付,教授,从事经方配伍及临床应用研究,E-mail:1034383171@qq.com

in Chaihu Shugan powder mediate-dose group. **Conclusion:** Chaihu Shugan powder have a positive action on hepatic fibrosis model rats. The mechanism of its effect is related with its inhibiting the expression of TGF- β_1 , Smad3 genes, and p-Smad 2/3 protein, and enhancing the expression of Smad7 gene in rats liver.

[**Key words**] Chaihu Shugan powder; hepatic fibrosis; transforming growth factor- β_1 ; Smad protein

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)的实质是细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)的过量沉积,肝星状细胞(HSC)的激活是 HF 形成的中心环节。转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 是刺激 HSC 活化和分泌 ECM 作用最强的细胞因子, TGF- β /Smad 信号通路被认为介导 TGF β 信号进入细胞核内的最主要途径^[1]。以 TGF- β /Smad 通路为靶点的抗 HF 治疗,已成为药物开发的一个新热点^[2]。中医认为肝纤维化的成因在于肝气不畅,经脉郁滞,脾气虚弱所致。柴胡疏肝散是疏肝理气代表方。研究证实柴胡疏肝散对改善肝功能、抗肝纤维化有显著疗效,但其作用机制有待研究^[3-7]。本研究制备猪血清免疫损伤性 HF 大鼠模型,旨在研究柴胡疏肝散对 TGF- β_1 及其下游信号转导分子 Smads 表达的影响,探讨柴胡疏肝散抗 HF 的作用机制。

1 材料

1.1 药物与动物 柴胡疏肝散(CHSGS):柴胡(批号 1211004H)10 g,陈皮(批号 1209002S)10 g,川芎(批号 1209001S)10 g,醋香附(批号 1206001H)10 g,枳壳(批号 1204001S)6 g,白芍(批号 1201004H)6 g,炙甘草(批号 1206001S)2 g,以上药物用三九中药配方颗粒。

6月龄雄性 Wistar 大鼠,SPF 级,体重(300 ± 20) g,由郑州大学河南医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(豫)2010-0001。

1.2 试剂 RNA 提取 Trizol 试剂、逆转录试剂盒(日本 Toyobo 公司,批号 FSK-100, QPK212plus), PCR 引物引物由上海博亚生物技术有限公司合成, TGF- β_1 (批号 BA0290),磷酸化 Smad2/3 (p-Smad2/3,批号 BA1395), Smad7 (批号 BA1399)兔抗大鼠一抗和 SABC 免疫组化染色试剂盒(批号 SA1025), DAB 显色试剂盒(批号 ED1022),均为武汉博士德生物技术有限公司产品。

1.3 仪器 Pico™ 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Helixis 公司), Powerwave XS 型全波长扫描酶标仪(美国 Bio-tek 公司), 1575 型全自动酶标洗板机(美国伯乐公司), ABI 9700 型普通 PCR 仪(美国 ABI 公司), Ettan Ipphphor 3 型双向电泳(美国 GE 公司),

TGL-16GA 型低温高速离心机(上海安亭仪器厂), Biofuge Stratos 型多用途 4 °C 离心机(美国热电公司), DU640 型紫外分光光度计(美国 Beckman), U-CMAD3 型显微镜,显微摄像仪, GX51 型全自动图像分析系统(均为日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠随机分为:正常组,模型组,柴胡疏肝散高、中、低剂量组,柴胡疏肝散预防组,每组 10 只。

2.2 模型制备与给药 参考文献方法制备模型与给药^[4,6-11]。除正常组外,其余各组均用猪血清复制免疫损伤性肝纤维化模型。用未灭活猪血清腹腔注射,每次 0.5 mL/只,2 次/周,连续 10 周,5 周后即可形成肝纤维化。CHSGS 预防组于造模同时给药,每天下午 6:00 *ig* 1 次,以 CHSGS 6.3 g·kg⁻¹,连续 10 周。各治疗组于第 6 周给药,CHSGS 按 12.6, 6.3, 3.15 g·kg⁻¹ 剂量,每天下午 6:00 *ig* 1 次^[4],模型组给予等量的生理盐水 *ig*,至第 10 周结束。

2.3 组织病理 取左叶新鲜肝组织,福尔马林固定,常规包埋切片,各组行常规 HE 染色及胶原纤维染色,肝组织病理组织学分级标准参照文献[8],将肝纤维化分为 0~4 期。0 期:无肝纤维化;1 期:纤维化仅局限于门管区或汇管区扩大;2 期:纤维化由门管区进入肝小叶 2/3;3 期:桥状纤维化伴结构扭曲,但无明显硬化;4 期:假小叶形成,肝硬化。

2.4 检测 TGF- β_1 , Smad7, p-Smad2/3 蛋白表达 用免疫组化 S-P 法检测步骤参考文献[9-10]。结果判定:所有切片均以有棕黄色颗粒为阳性表达,以不着色为阴性。每张切片随机选取 10 个高倍视野(×400),以全自动图像分析系统检测阳性染色吸光度 A,取平均值进行统计。

2.5 检测 Smad2, Smad3, Smad4 和 Smad7 的 mRNA 水平 β -actin 上游引物 5'-GTGACGAGCCCC AGAGCAAGAG-3',下游引物 5'-AGGGGCCGGACTC ATCGTA-3',扩增片段 940 bp; TGF- β_1 上游引物 5'-CGCAACAACGCAATCTATG-3',下游引物 5'-ACCAAGGT AACGCCAGGA-3',扩增片段 1173 bp; Smad2 上游引物 5'-GGAAAGGGTTGCCACATGTT-3',下游引物 5'-AGAATCTCCGTGTGCCGAGG-3',扩

增片段 200 bp; Smad3 上游引物 5'-AAATGACAG-CAGCAGGGACAC-3', 下游引物 5'-GAGGTAGGAC-CCACAGTAGAGC-3', 扩增片段 172 bp; Smad4 上游引物 5'-ACGGCCATCTTCAGCACCAC-3', 下游引物 5'-AGAATGCACAATCGCCGGAG-3', 扩增片段 648 bp; Smad7 上游引物 5'-TGGTGCGTGGTGGCATACT-3', 下游引物 5'-CAGCCGATCTTGCTCCTCA-3', 扩增片段 176 bp。肝脏组织总 RNA 的提取和纯化参照试剂盒说明书进行。

2.6 统计学处理 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用方差分析。数据处理在 SPSS 11.5 中进行统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 实验结束, 正常组皮毛光亮, 喜活动, 体重增长, 无死亡。模型组皮毛干枯稀疏无光泽, 反应迟钝, 体重较造模前略有增加, 死亡 2 只。高、中、低治疗组大鼠皮毛尚可, 活动力强, 体重增加明显, 高、低剂量治疗组各死亡 1 只。

3.2 对肝组织结构的影响 肝组织病理改变已报道^[6]。与模型组比较, CHSGS 预防组, CHSGS 高、中

剂量组肝小叶结构破坏轻微。肝纤维化分期比较见表 1。

表 1 CHSGS 对肝纤维化大鼠肝纤维化分期的影响

Table 1 Effects of Chaihu Shugan powder on stage of hepatic fibrosis model rats

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	肝纤维化分期				
			0	1	2	3	4
正常	-	10	10	0	0	0	0
模型	-	8	0	1	2	4	1
CHSGS	12.6	9	2	3	3	1	0 ¹⁾
	6.3	10	6	3	1	0	0 ¹⁾
	3.15	9	2	2	2	3	0
CHSGS 预防	6.3	10	7	2	1	0	0 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 对各组肝组织中 TGF- β_1 , Smad2, 3, 4, 7 的 mRNA 水平的影响 与正常组比较, 模型组 TGF- β_1 , Smad2 和 Smad3 的 mRNA 表达均显著增加 (均 $P < 0.01$), Smad7 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 柴胡疏肝散中剂量组 TGF- β_1 , Smad3 mRNA 表达均显著降低, Smad7 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 CHSGS 对大鼠肝组织中 TGF- β_1 , Smad2, 3, 4, 7 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Chaihu Shugan powder on level of TGF- β_1 , Smad2, 3, 4, 7 mRNA in hepatic fibrosis model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TGF- β_1	Smad2	Smad3	Smad4	Smad7
			/ β -actin	/ β -actin	/ β -actin	/ β -actin	/ β -actin
正常	-	10	0.84 ± 0.51 ²⁾	0.05 ± 0.21 ²⁾	0.16 ± 0.13 ²⁾	0.85 ± 0.26	0.63 ± 0.39 ²⁾
模型	-	8	9.92 ± 2.57	0.59 ± 0.23	0.83 ± 0.19	1.23 ± 0.42	0.10 ± 0.53
CHSGS	12.6	9	5.48 ± 2.31 ¹⁾	0.57 ± 0.16	0.72 ± 0.16	1.12 ± 0.17 ¹⁾	0.53 ± 0.36 ¹⁾
	6.3	10	5.01 ± 1.39 ¹⁾	0.58 ± 0.24	0.69 ± 0.06 ¹⁾	1.21 ± 0.24	0.60 ± 0.42 ²⁾
	3.15	9	8.21 ± 0.49	0.55 ± 0.15	0.78 ± 0.07	1.10 ± 0.13 ¹⁾	0.28 ± 0.46
预防	6.3	10	4.16 ± 0.36 ¹⁾	0.58 ± 0.41	0.62 ± 0.03 ¹⁾	1.22 ± 0.31	0.62 ± 0.21 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.4 对各组肝组织中 TGF- β_1 , p-Smad 2/3 和 Smad7 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组 p-Smad2/3 和 TGF- β_1 蛋白阳性表达显著增强 ($P < 0.01$), Smad7 显著减弱 ($P < 0.01$); 与模型组比较, CHSGS 高、中剂量组, CHSGS 预防组中 p-Smad2/3 和 TGF- β_1 蛋白表达较模型组显著减弱 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Smad7 蛋白表达显著增强 ($P < 0.01$), 见表 3。

3.5 TGF- β_1 与 Smad 7 基因, TGF- β_1 与 p-Smad 2/3 蛋白表达的相关性 应用非参数 Spearman 等级相关分析, 在模型组中 Smad7 mRNA 与 Smad7 蛋白表达呈正相关 ($r_s = 0.784$, $P = 0.000$), TGF- β_1 mRNA 与 Smad7 mRNA 表达呈负相关 ($r_s = -0.491$, $P = 0.028$), TGF- β_1 蛋白与 Smad7 蛋白表达呈负相关

表 3 CHSGS 对肝组织中 TGF- β_1 , p-Smad 2/3, Smad7 蛋白质表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Chaihu Shugan powder on level of TGF- β_1 , Smad2, 3, 4, 7 protein in hepatic fibrosis model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	TGF- β_1	p-Smad 2/3	Smad7
			/A	/A	/A
正常	10	-	0.75 ± 0.25 ²⁾	8.95 ± 4.21 ²⁾	34.53 ± 6.24 ²⁾
模型	8	-	8.67 ± 0.64	28.78 ± 5.39	7.51 ± 1.36
CHSGS	9	12.6	5.37 ± 3.46 ¹⁾	21.76 ± 7.13 ²⁾	29.37 ± 5.33 ²⁾
	10	6.3	5.19 ± 2.33 ¹⁾	14.52 ± 5.37 ²⁾	30.71 ± 3.58 ²⁾
	9	3.15	7.17 ± 3.28	25.97 ± 8.63	9.15 ± 3.39
CHSGS 预防	10	6.3	4.89 ± 0.34 ¹⁾	13.45 ± 6.21 ²⁾	32.71 ± 3.58 ²⁾

($r_s = -0.658$, $P = 0.000$)。CHSGS 中剂量组中 TGF- β_1 蛋白与 p-Smad2/3 ($r_s = 0.651$, $P = 0.000$) 蛋白

表达均呈正相关,与 Smad7 蛋白表达呈负相关($r_s = -0.694, P = 0.000$)。

4 讨论

TGF- β_1 是目前发现的最强的致纤维化细胞因子, TGF- β_1 与下游的 Smad 蛋白结合, 形成 TGF- β /Smad 信号通路, 该通路是肝纤维化药物作用机制研究的重要靶标^[12]。TGF- β_1 与 HSC 膜 $T\beta_2R$ 受体 (TGF- β_2 receptor, $T\beta_2R$) 结合, 并磷酸化 $T\beta_1R$, 活化的 $T\beta_1R$ 再磷酸化激活 Smad (1, 2, 3, 5, 8) 某一成员, 该成员再和 Smad4 结合形成复合物转入核内, 激活的复合物和两类 DNA 结合辅助因子 (共抑制子、共激活子) 结合决定靶基因的转录活性^[13]。磷酸化的 Smad2, Smad3 诱导 $T\beta_1R$ /Smad 复合物形成, 致使 HSC 活化为成纤维细胞 (myofibroblaster, MFB)^[14], 同时增加合成 I 型胶原、蛋白多糖、细胞纤连蛋白等多种 ECM, HSC 又以自分泌和旁分泌方式, 上调 TGF- β_1 的表达, 加速 HF 的进展。而 Smad7 属于抑制型 Smad, 是负调控因子, 即 Smad7 的表达上调, 通过抑制 Smad2, Smad3 磷酸化而阻止 HSC 转型^[15]。由于 TGF- β /Smad 信号通路在 HSC 激活中的重要意义, 用药物干预该信号通路可望为 HF 的防治提供新的思路^[16]。

本研究旨在探讨 CHSGS 对 TGF- β_1 及下游信号转导分子的影响。结果显示, 与正常组比较, 模型组 TGF- β_1 , Smad2 和 Smad3 的 mRNA, p-Smad 2/3, Smad7 mRNA 表达显著减弱; 与模型组比较, CHSGS 中剂量组 TGF- β_1 和 Smad3 mRNA 表达均显著降低, Smad7 基因表达显著增加。提示 CHSGS 对 HF 具有显著地预防和治理作用, 其机制可能促进 Smad7 的表达, 高表达的 Smad7 抑制 Smad2/3 的活性, 减弱了肝星状细胞内 TGF- β_1 /Smad 信号转导, 阻止胶原蛋白合成。CHSGS 方由柴胡、醋香附、川芎、枳壳、陈皮、芍药、炙甘草组成, 方中柴胡疏肝解郁为君药, 香附和川芎理气疏肝, 助柴胡疏肝解郁, 二药相合, 增其行气之功; 枳壳和陈皮理气行滞, 白芍与甘草养血柔肝, 甘草兼调诸药, 亦为使药。此疏肝理气, 兼以健脾通络。CHSGS 抗肝纤维化, 其机制可能通过干预 TGF- β /Smad 信号转导途径, 抑制 TGF- β_1 基因表达, 阻止肝纤维化进展。本研究虽了解 CHSGS 抑制 TGF- β 和 Smad3, 上调 Smad7 表达, 但对于 CHSGS 是否影响 TGF- β_1 配体-受体结合和 Smads 分子的磷酸化与核移位等, 均有待研究。

[参考文献]

[1] 黄越龙, 周春光, 陈燕, 等. TGF/Smad 信号通路与 HF

的研究进展 [J]. 实用医学杂志, 2011, 27 (10): 1883-1884.

- [2] Hong S W, Jung K H, Lee H S, et al. Suppression by fucoidan of liver fibrogenesis via the TGF- β /Smad pathway in protecting against oxidative stress [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75 (5): 833-840.
- [3] 范建高, 施军平. 2011 年非酒精性脂肪性肝病流行病学与无创诊断研究进展 [J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15 (2): 81-82
- [4] 李丹, 江涛, 范华倩, 等. 柴胡疏肝散对非酒精性脂肪肝大鼠脂质代谢及肝功能的影响 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29 (3): 8-11
- [5] 孙丽霞, 周玲玲, 袁冬平, 等. 柴胡疏肝散对大鼠免疫性肝损伤的防治作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33 (5): 629-630.
- [6] 王琦, 季书, 尚立芝, 等. 柴胡疏肝散对免疫性肝纤维化的防治作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (24): 160-163.
- [7] 尚立芝, 季书, 王琦, 等. 柴胡疏肝散的肝纤维化作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30 (5): 8-11.
- [8] Scheuer P J. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment [J]. J Hepatol, 1991, 13 (3): 372-374.
- [9] 尚立芝, 王付, 苗小玲, 等. 四逆散加味抗大鼠肝纤维化作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (18): 194-197.
- [10] 尚立芝, 王付, 苗小玲, 等. 四逆散加味抗大鼠肝纤维化作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (5): 207-211.
- [11] 都广礼, 刘平, 王磊, 等. 猪血清肝纤维化大鼠肝组织基质金属蛋白酶-9/13 和基质金属蛋白酶组织抑制因子-1/2 表达的动态变化及下瘀血汤对其影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15 (11): 48-50.
- [12] 喻勤, 傅向阳, 罗伟生, 等. 荔枝核总黄酮对大鼠肝纤维化 TGF- β /Smad 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (18): 223-227.
- [13] Massague J, Blain S W, Lo R S. TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders [J]. Cell, 2000, 103 (2): 295-309.
- [14] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets [J]. J Cell Mol Med, 2006, 10 (1): 76-79.
- [15] Lonn P, Moren A, Raja E, et al. Regulating the stability of TGF beta receptors and Smads [J]. Cell Res, 2008, 19 (1): 21-35.
- [16] Tian X P, Yin Y Y, Li X. Effects and mechanisms of acremoniumterricola milleretal mycelium on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. Am J Chin Med, 2011, 39 (3): 537-550.

[责任编辑 聂淑琴]