

益气活血利水汤对肝纤维化模型大鼠 Necdin-Wnt 信号通路的影响

戴琦^{1*}, 罗勇兵², 李梦乔², 刘宇翔²

(1. 江西中医药大学附属医院, 南昌 330006; 2. 江西中医药大学, 南昌 330006)

[摘要] 目的:观察益气活血利水汤对肝纤维化模型大鼠 necdin-Wnt 信号通路的影响,探讨益气活血利水汤抗肝纤维化的作用机制。方法:60只SD大鼠中随机抽取12只为正常组,造模成功的45只大鼠随机分为益气活血利水汤(9.6 g·kg⁻¹)组(n=12),益气活血利水汤(14.4 g·kg⁻¹)组(n=11),秋水仙碱组(Col组,n=11)和模型组(n=11)。正常组和模型组灌胃(ig)生理盐水,益气活血利水汤组 ig 益气活血利水汤 9.6,14.4 g·kg⁻¹·d⁻¹,Col组 ig Col 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹。10周后观察两组的血清透明质酸(hyaluronan acid, HA),层黏蛋白(laminin, LN),Ⅲ型前胶原(type Ⅲ procollagen, PCⅢ),Ⅳ型胶原(type Ⅳ collagen, CⅣ)水平;苏木精-伊红(HE)染色观察其病理表现,Masson染色观察胶原蛋白变化,观察各组 necdin,β-链蛋白(β-catenin),过氧化物增殖激活受体(PPARγ)蛋白和 mRNA 表达水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清 HA, LN, PCⅢ, CⅣ水平,纤维化分期的标准(Metavir)评分,胶原纤维含量, necdin,β-catenin 蛋白及 mRNA 表达显著升高(P<0.01);与模型组比较,Col组 HA, LN, PCⅢ, CⅣ水平, METAVIR 评分,胶原纤维含量, necdin,β-catenin 蛋白及 mRNA 表达显著降低(P<0.01);与Col组比较,益气活血利水汤(9.6 g·kg⁻¹)组 HA, LN, PCⅢ, CⅣ水平, METAVIR 评分,胶原纤维含量, necdin,β-catenin 蛋白及 mRNA 表达显著降低(P<0.01);与益气活血利水汤(9.6 g·kg⁻¹)组比较,益气活血利水汤(14.4 g·kg⁻¹)组 HA, LN, PCⅢ, CⅣ水平, Metavir 评分,胶原纤维含量, necdin,β-catenin 蛋白及 mRNA 表达显著降低(P<0.01)。与正常组比较,模型组 PPARγ 蛋白及 mRNA 表达显著降低(P<0.01);与模型组比较,Col组 PPARγ 蛋白及 mRNA 表达显著升高(P<0.01);与益气活血利水汤(9.6 g·kg⁻¹)组比较,益气活血利水汤(14.4 g·kg⁻¹)组 PPARγ 蛋白及 mRNA 表达明显升高(P<0.05, P<0.01)。结论:益气活血利水汤可抑制 necdin-Wnt/β-catenin 通路的活性,解除 Wnt/β-catenin 对 PPARγ 的抑制,具有抗肝纤维化的效果。

[关键词] 益气活血利水汤; 肝纤维化; necdin; Wnt/β-catenin; 过氧化物增殖激活受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0134-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070134

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1357.056.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 13:57

Effect of Yiqi Huoxue Lishui Decoction on Necdin-Wnt Signal Pathway in Rats with Hepatic Fibrosis

DAI Qi^{1*}, LUO Yong-bing², LI Meng-qiao², LIU Yu-xiang²

(1. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Yiqi Huoxue Lishui decoction on necdin-Wnt signal pathway in rats with hepatic fibrosis, and explore its mechanism in treating hepatic fibrosis. **Method:** The 12 SD rats were selected from 60 SD rats as normal group, and 45 successfully modeled SD rats were randomly divided into Yiqi Huoxue Lishui decoction standard dose group (standard group, n=12), Yiqi Huoxue Lishui decoction high dose group (high dose group, n=11), colchicine group (Col group, n=11) and model group (n=11). The rats in normal group and model group received intragastric administration of normal saline, rats in standard

[收稿日期] 20160919(010)

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(20142BAB205103)

[通讯作者] *戴琦,副主任中医师,从事肝胆脾胃疾病研究, Tel:13607082205, E-mail:zp1970zp@163.com

group received intragastric administration of $9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Yiqi Huoxue Lishui decoction, rats in high dose group received intragastric administration of $14.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Yiqi Huoxue Lishui decoction, and the rats in Col group received intragastric administration of $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ colchicine. After ten weeks, the level of hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III Procollagen (PC III), and type IV collagen (C IV) in serum were observed in all the groups. Hematoxylin-eosin staining (HE) was used to observe their pathologic manifestation, and Masson staining was used to observe the collagen changes. The protein and mRNA expression levels of necdin, β -catenin, and peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) were observed. **Result:** As compared with the normal group, the levels of HA, LN, PC III and C IV in serum, Metavir scores in fibrosis stage, content of collagen fibers, levels of necdin and β -catenin protein and mRNA expression levels were significantly higher in model group ($P < 0.01$). As compared with the model group, the levels of HA, LN, PC III and C IV, Metavir scores, content of collagen fibers, levels of necdin and β -catenin protein and mRNA expression levels were significantly lower ($P < 0.01$). As compared with the Col group, the levels of HA, LN, PC III and C IV, Metavir scores, content of collagen fibers, level of necdin and β -catenin protein and mRNA expression levels were significantly lower in standard group ($P < 0.01$). As compared with standard group, the levels of HA, LN, PC III and C IV, Metavir scores, content of collagen fibers, levels of necdin and β -catenin protein and mRNA expression levels were significantly lower in high dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with normal group, the PPAR γ protein and mRNA expression levels were significantly lower in model group ($P < 0.01$). As compared with the model group, the PPAR γ protein and mRNA expression levels were significantly higher in Col group ($P < 0.01$). As compared with Col group, the PPAR γ protein and mRNA expression levels were significantly higher in standard group ($P < 0.01$). As compared with the standard group, the PPAR γ protein and mRNA expression levels were significantly higher in high dose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The Yiqi Huoxue Lishui decoction can inhibit the activity of necdin-Wnt/ β -catenin pathway, relieve the inhibition of Wnt/ β -catenin on PPAR γ , and have the effect of antihepatic fibrosis.

[Key words] Yiqi Huoxue Lishui decoction; hepatic fibrosis; necdin; Wnt/ β -catenin; peroxisome proliferator activated receptor γ

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是肝脏慢性损伤发展到肝硬化的中间环节, 肝星状细胞 (HSC) 活化是肝纤维化形成的关键^[1]。过氧化物增殖激活受体 (PPAR γ) 可抑制 HSC 的活化, 使 HSC 处于静止状态^[2-3]。necdin 由 325 个氨基酸残基组成, 可通过分泌型糖蛋白 (Wnt) 信号通路抑制 PPAR γ 的活性, 促进 HSC 的活化和 HF 的发生^[4]。因此, necdin-Wnt 信号通路可能是防治 HF 的新靶点。近年来, 中药抗肝纤维化的基础和临床研究广泛开展, 显示了良好的效果, 但中药对 necdin-Wnt 信号通路的影响国内尚未见报道^[5-7]。肝纤维化属于积聚水臌病, 中医治疗多从肝硬变的整体入手, 辨证施治, 国家级名老中医陈昆山教授结合临床治疗经验, 认为其基本病机为气滞血瘀水饮互结, 肝脾肾三脏失调, 究其病机, 肝病日久, 疏泄失职, 气机不调, 三焦雍滞不通, 脾胃运化失常, 病久累及肾, 气化不利, 水湿停聚于腹内, 日久成臌, 久病入络, 日久成瘀, 血积久, 化为痰水, 影响气机, 气、血、水错杂为患, 治益气

活血利水^[8]。益气活血利水汤取自古方五苓散, 是国家级名老中医陈昆山 50 年治疗肝硬化腹水的临证经验基本方, 立意主治各种肝病水臌属于气虚血瘀水停者, 适当加减治疗肝硬化轻、中度腹水无需西药利尿药即可取得良效^[9-10]。虽然益气活血利水汤临床应用取得了良好的效果, 但其作用机制尚未阐明, 本研究以腹腔注射猪血清诱导大鼠化学性肝纤维化为模型, 研究益气活血利水汤对其治疗作用及对 necdin-Wnt 信号通路的影响, 探讨益气活血利水汤的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 180 ~ 220 g, 由江西中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(湘)2013-0004, 本实验经江西中医药大学伦理委员会批准, 实验动物符合伦理委员会规定。

1.2 药物与试剂 益气活血利水汤组成: 黄芪 50 g, 白术 30 g, 茯苓(连皮) 30 g, 当归 12 g, 赤芍 12 g, 三七(粉) 3 g, 丹参 20 g, 柴胡 10 g, 郁金 12 g,

车前子 15 g, 葫芦壳(陈)30 g, 猪苓 30 g, 泽泻 20 g, 桂枝 10 g, 上述药材均购自北京同仁堂药业有限公司, 并经由江西省中医学院附属医院制剂室陆浩伟主管药师鉴定符合 2015 年版《中国药典》, 经 10 倍量 75% 乙醇回流提取 2 h 后, 滤药液, 再用 8 倍量 75% 乙醇回流提取 2 h, 合并 2 次提取液, 浓缩成棕褐色药液, 每 100 mL 含生药 265 g; 猪血清取新鲜猪血离心过滤除菌自制; 秋水仙碱 (colchicines, Col) 片 (云南昊邦制药有限公司, 批号 H53021798); 透明质酸 (hyaluronan acid, HA), 层黏蛋白 (type III procollagen, LN), III 型前胶原 (type III procollagen, PC III), IV 型胶原 (type IV collagen, C IV) 酶联免疫吸附试验试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 批号分别为 L150603185, L150603194, L150603170, L150603174); RNA 提取试剂盒 (上海捷瑞生物工程有限公司, 批号 GK3016); 逆转录试剂盒 (日本 TakaRa 公司, 批号 RP036A); 逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 试剂盒 (北京天根生化科技公司, 批号 FP215); PPAR γ , β -链蛋白 (β -catenin), necdin, 磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号分别为 SC-7274, SC-7283, SC-7308, SC-7469)。necdin, β -catenin, PPAR γ 引物由大连宝生物工程有限公司设计及合成, necdin (296 bp): 上游 5'-CGACTCGAGATGTCGGAACAAAGTAAGGACC-3', 下游 5'-CAGGAATTCTTAGTCCTCAGAGACTGCTG-3'; β -catenin (192 bp): 上游 5'-GCTGACCAA ACTGCTAAATGACGA-3', 下游 5'-TGTAGGGTCCCA GCGGTACAA-3'; PPAR γ (319 bp): 上游 5'-CCTTT ACCACGGTTGATTTCTC-3', 下游 5'-TTCAATCGG ATGTTCTTCG-3'; GAPDH (472 bp): 上游 5'-GTG CTGAGTATGTCGTGGAGTCT-3', 下游 5'-GTGGAA GAATGGGAGTTGCTGT-3'。

1.3 仪器 Mini-Proten Tetra System 型电泳仪, trans-blot turbo system 690BR3215 型转膜仪系统, Chemi Doc XRS + System, miniopticon 48 孔, CFX connect 96 孔凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司) TU-10 型恒温金属浴 (上海一恒仪器公司); SMA4000 型微光分光光度计 (美国 Merinton 公司); CFX Connect Real-time System 定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组及模型建立 60 只大鼠适应性饲养 1 周, 然后随机选取 12 只做为正常组, 其余 48 只进行造模。造模方法参考文献 [11-12], 建立免疫诱导肝

纤维化模型, 对造模大鼠腹腔注射猪血清 0.5 mL, 每周注射 2 次, 连续注射 12 周, 正常组注射等量生理盐水。48 只大鼠造模过程中死 2 只, 12 周末随机处死 1 只大鼠, 苏木素伊红 (HE) 染色后观察到肝小叶结构紊乱, 结缔组织增生, 侵入肝小叶并分割肝小叶, 可见炎症细胞浸润, 汇管区明显等表现为造模成功, 45 只造模成功大鼠被随机分为益气活血利水汤 (9.6 g·kg⁻¹) 组 12 只, 益气活血利水汤 (14.4 g·kg⁻¹) 组 11 只, Col 组 11 只, 模型组 11 只。

2.2 治疗方法 分组后的大鼠分别接受以下治疗, 益气活血利水汤 (9.6 g·kg⁻¹) 组参照徐叔云等主编《药理学实验方法学》^[13] 第 3 版中等效剂量比值表计算大鼠给药剂量, 取标准剂量 9.6 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃 (*ig*); 益气活血利水汤 (14.4 g·kg⁻¹) 组采用益气活血利水汤 (9.6 g·kg⁻¹) 1.5 倍 *ig*; 正常组和模型组 *ig* 等量生理盐水; Col 组 *ig* 秋水仙碱, 参照有关文献采用秋水仙碱 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹^[14]。各组均连续用药 10 周。

2.3 取材 最后 1 次 *ig* 后, 所有大鼠禁食 8 h, 股动脉放血处死大鼠, 收集血清进行透明质酸, 层黏蛋白, III 型前胶原酶, IV 型胶原酶检测, 迅速解剖肝脏, 将肝脏组织分为两部分, 一部分采用 10% 甲醛溶液固定; 另一部分采用液氮冷冻后, 转至 -80 °C 低温保存。

2.4 酶联免疫吸附法检测血清相关因子表达 HA, LN, PC III, C IV 水平检测参照试剂盒说明书进行, 检测相关蛋白表达。

2.5 HE 染色检测相关病理学形态 10% 甲醛溶液固定肝脏组织后, 石蜡包埋, 切片, 进行 HE 染色, 光镜下观察肝组织病理形态。

2.6 Masson 染色观察细胞胶原纤维表达 肝脏石蜡切片, 进行 Masson 染色, 在 DFC420c 光学显微镜下观察各组大鼠肝脏纤维化的程度, 纤维化程度分级参照 Metavir 评分^[15] 进行分级: 无纤维化表现为 F0, 汇管区纤维化但不伴有分隔为 F1, 汇管区纤维化同时可见少量分隔为 F2, 间隔纤维化为 F3, 肝硬化为 F4, 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对 Masson 染色照片进行半定量分析, 100 倍下测定蓝色胶原总面积占视野总面积的百分比, 蓝色胶原总面积取随机 3 个视野的总面积的平均值^[16]。

2.7 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 测定肝组织中 necdin, β -catenin, PPAR γ 蛋白表达 取肝组织 1 g 左右, 按照试剂盒说明书提取蛋白并定量, 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 用

necdin, β -catenin, PPAR γ 抗体(1:1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(1:1 万)室温孵育 2 h,ECL 曝光,用凝胶电泳成像分析系统扫描制成的 X 光片,红外线照射可见目的条带,Quantity One 4.6 进行分析,采用目的条带/GAPDH 条带表示蛋白相对表达量。

2.8 RT-PCR 测定肝组织 necdin, β -catenin, PPAR γ mRNA 表达 按说明书采用 Trizol 试剂提取肝组织总 RNA,分光光度法测定吸光度 A_{260}/A_{280} 。按试剂盒说明书完成 RT-PCR。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物 8 μ L 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳拍照分析。采用 Quantityone 4.6 分析软件进行分析,采用目的条带/GAPDH 条带表示 mRNA 相对表达量。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件,计量

资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差比较,进一步两两比较采用 LSD 法,多组间等级资料采用多组单向有序资料的 Ridit 分析,计算合并方差,采用 LSD 法计算两两间统计学差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 益气活血利水汤对血清 HA, LN, PC III 和 C IV 含量的影响 与正常组比较,模型组血清 HA, LN, PC III, C IV 水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,Col 组血清 HA, LN, PC III, C IV 水平显著降低($P < 0.01$);与 Col 组比较,益气活血利水汤($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组血清 HA, LN, PC III, C IV 水平显著降低($P < 0.01$);与益气活血利水汤($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组比较,益气活血利水汤($14.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组 HA, LN, PC III, C IV 水平显著降低($P < 0.01$)。见表 1。

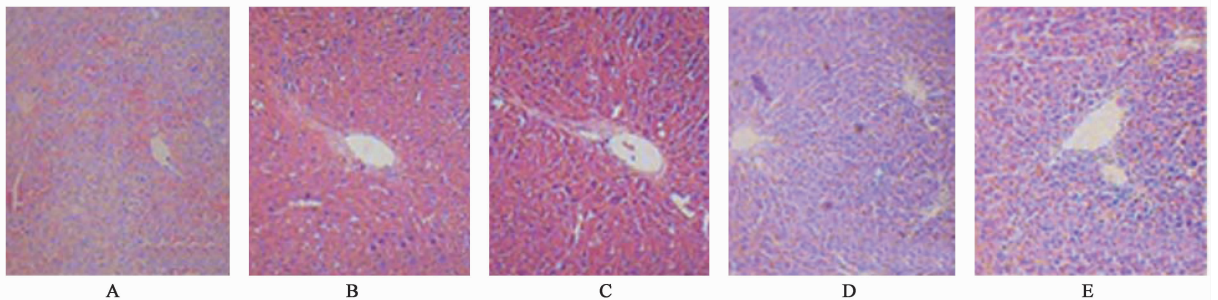
表 1 益气活血利水汤对血清 HA, LN, PC III 和 C IV 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	HA	LN	PC III	C IV
正常	12	-	98.45 \pm 22.01	117.45 \pm 14.05	62.27 \pm 35.62	72.06 \pm 11.13
模型	11	-	218.29 \pm 19.32 ²⁾	269.56 \pm 18.37 ²⁾	124.25 \pm 26.33 ²⁾	137.52 \pm 13.01 ²⁾
Col	11	0.1	151.45 \pm 24.05 ^{2,3)}	192.05 \pm 17.25 ^{2,3)}	99.52 \pm 14.08 ^{2,3)}	108.32 \pm 14.18 ^{2,3)}
益气活血利水汤	12	9.6×10^3	134.38 \pm 17.32 ^{2,3,4)}	157.25 \pm 12.57 ^{2,3,4)}	84.16 \pm 8.16 ^{2,3,4)}	93.05 \pm 8.14 ^{2,3,4)}
	11	14.4×10^3	112.15 \pm 19.83 ^{1,3,4,5)}	130.70 \pm 15.13 ^{1,3,4,5)}	73.05 \pm 7.28 ^{1,3,4,5)}	80.29 \pm 7.24 ^{1,3,4,5)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$;与 Col 组比较⁴⁾ $P < 0.01$;与益气活血利水汤($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组比较⁵⁾ $P < 0.01$ (表 2,4 同)。

3.2 益气活血利水汤对大鼠肝脏病理学改变的影响 正常组肝小叶完整,肝细胞无变性、坏死,核仁明显,多位于细胞中央;模型组肝小叶结构紊乱,结缔组织增生,侵入肝小叶并分割肝小叶,可见炎症

细胞浸润,汇管区明显;Col 组有脂肪变性,汇管区见结缔组织增生,少量炎症细胞浸润;益气活血利水汤($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组汇管区结缔组织增生较 Col 组轻,少量炎细胞浸润。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. Col 组;D. 益气活血利水汤($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组;E. 益气活血利水汤($14.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组(图 2~4 同)

图 1 益气活血利水汤对肝纤维化大鼠肝脏病理学改变的影响(HE, $\times 100$)

Fig.1 Effect of Yiqi Huoxue Lishui decoction on liver histopathology in rats of liver fibrosis(HE, $\times 100$)

与正常组比较,模型组胶原纤维含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,Col 组胶原纤维含量显著降低($P < 0.01$);与 Col 组比较,益气活血利

水汤($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组胶原纤维含量显著降低($P < 0.01$);与益气活血利水汤($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组比较,益气活血利水汤($14.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组胶原纤维含量

显著降低 ($P < 0.01$) Metavir 评分显示,与正常组比较,模型组 Metavir 评分显著增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,Col 组 Metavir 评分显著降低 ($P < 0.01$);与 Col 组比较,益气活血利水汤 (9.6

$g \cdot kg^{-1}$) 组 Metavir 评分显著降低 ($P < 0.01$);与益气活血利水汤 ($9.6 g \cdot kg^{-1}$) 组比较,益气活血利水汤 ($14.4 g \cdot kg^{-1}$) 组 Metavir 评分显著降低 ($P < 0.01$)。见图 2,见表 2。

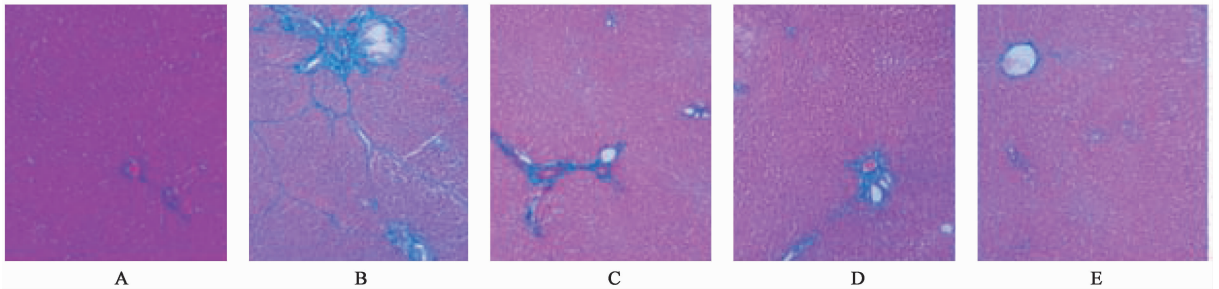


图 2 益气活血利水汤对肝纤维化大鼠肝脏病理学改变的影响 (Masson, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of Yiqi Huoxue Lishui decoction on liver histopathology in rats of liver fibrosis (Masson, $\times 100$)

表 2 4 组 Metavir 评分和胶原纤维半定量的比较

Table 2 Comparison of Metavir score and semi quantitative analysis of collagen fiber in four groups

组别	n	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	METAVIR 评分/只					Ridit 值 ($\bar{x} \pm s$)	胶原纤维 ($\bar{x} \pm s$)/%
			F0	F1	F2	F3	F4		
正常	12	-	12	0	0	0	0	0.149 ± 0.000	6.52 ± 1.03
模型	11	-	0	0	0	7	4	$0.850 \pm 0.084^{2)}$	$34.25 \pm 2.81^{2)}$
Col	11	0.1	0	2	4	4	1	$0.661 \pm 0.175^{2,3)}$	$21.23 \pm 1.13^{2,3)}$
益气活血利水汤	12	9.6×10^3	1	5	4	2	0	$0.508 \pm 0.183^{2,3,4)}$	$14.45 \pm 1.42^{2,3,4)}$
	11	14.4×10^3	4	5	1	1	0	$0.363 \pm 0.206^{2,3,4,5)}$	$9.27 \pm 1.35^{1,3,4,5)}$

3.3 益气活血利水汤对大鼠肝组织 necdin, β -catenin 和 PPAR γ 蛋白水平的影响 与正常组比较,模型组 necdin, β -catenin 蛋白水平显著升高 ($P < 0.01$), PPAR γ 蛋白水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,Col 组 necdin, β -catenin 蛋白水平显著降低 ($P < 0.01$), PPAR γ 蛋白水平显著升高 ($P < 0.01$);与 Col 组比较,益气活血利水汤 ($9.6 g \cdot kg^{-1}$) 组 necdin, β -catenin 蛋白水平显著降低 ($P < 0.01$), PPAR γ 蛋白水平显著升高 ($P < 0.01$);与益气活血利水汤 ($9.6 g \cdot kg^{-1}$) 组比较,益气活血利水汤 ($14.4 g \cdot kg^{-1}$) 组 necdin, β -catenin 蛋白水平显著降低 ($P < 0.01$), PPAR γ 蛋白水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图 3 和表 3。

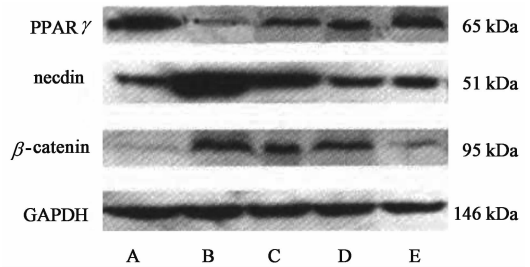


图 3 大鼠肝组织 necdin, β -catenin 和 PPAR γ 蛋白电泳

Fig. 3 Protein levels of necdin, β -catenin and PPAR γ in rat liver tissues

3.4 益气活血利水汤对大鼠肝组织 necdin, β -catenin 和 PPAR γ mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组 necdin, β -catenin mRNA 表达显著升高

表 3 四益气活血利水汤对大鼠肝组织 necdin, β -catenin 和 PPAR γ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Yiqi Huoxue Lishui decoction on necdin, β -catenin and PPAR γ protein expression levels in liver tissues ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	necdin/GAPDH	β -catenin/GAPDH	PPAR γ /GAPDH
正常	12	-	0.21 ± 0.06	0.05 ± 0.02	0.58 ± 0.08
模型	11	-	$0.62 \pm 0.03^{1)}$	$0.38 \pm 0.05^{1)}$	$0.22 \pm 0.05^{1)}$
Col	11	0.1	$0.49 \pm 0.04^{1,2)}$	$0.26 \pm 0.04^{1,2)}$	$0.33 \pm 0.06^{1,2)}$
益气活血利水汤	12	9.6×10^3	$0.37 \pm 0.06^{1,2,3)}$	$0.18 \pm 0.04^{1,2,3)}$	$0.42 \pm 0.04^{1,2,3)}$
	11	14.4×10^3	$0.31 \pm 0.04^{1,2,3,5)}$	$0.11 \pm 0.03^{1,2,3,5)}$	$0.49 \pm 0.05^{1,2,3,4)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与 Col 组比较³⁾ $P < 0.01$;与益气活血利水汤 ($9.6 g \cdot kg^{-1}$) 组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$ 。

($P < 0.01$), PPAR γ mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, Col 组 *necdin*, β -catenin mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$), PPAR γ mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与益气活血利水汤 ($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组比较, 益气活血利水汤 ($14.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组 *necdin*, β -catenin mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$), PPAR γ mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。见图 4 和表 4。

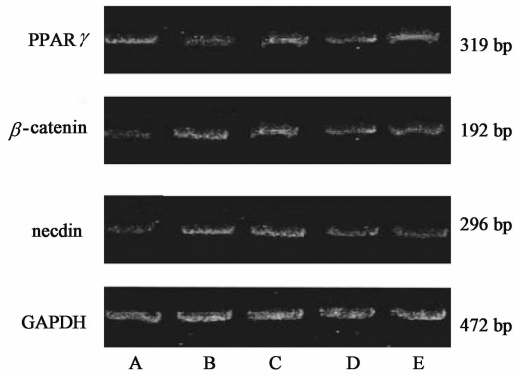


图 4 大鼠肝组织 *necdin*, β -catenin 和 PPAR γ mRNA 表达电泳
Fig. 4 mRNA expression levels of *necdin*, β -catenin and PPAR γ in rat liver tissues

表 4 四益气活血利水汤对大鼠肝组织 *necdin*, β -catenin 和 PPAR γ mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Yiqi Huoxue Lishui decoction on *necdin*, β -catenin and PPAR γ mRNA expression levels in liver tissues ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>necdin</i> /GAPDH	β -catenin/GAPDH	PPAR γ /GAPDH
正常	12	-	0.18 ± 0.06	0.08 ± 0.03	0.61 ± 0.08
模型	11	-	0.58 ± 0.04 ²⁾	0.51 ± 0.06 ²⁾	0.31 ± 0.07 ²⁾
Col	11	0.1	0.41 ± 0.09 ^{2,3)}	0.32 ± 0.05 ^{2,3)}	0.42 ± 0.05 ^{2,3)}
益气活血利水汤	12	9.6×10^3	0.33 ± 0.07 ^{2,3,4)}	0.25 ± 0.04 ^{2,3,4)}	0.51 ± 0.07 ^{2,3,4)}
	11	14.4×10^3	0.25 ± 0.06 ^{2,3,4,5)}	0.16 ± 0.07 ^{2,3,4,5)}	0.57 ± 0.04 ^{2,3,4)}

的表达,通过 β -catenin 依赖信号通路的 Wnt 的经典信号通路,抑制 PPAR γ 的表达,促进 HSC 活化^[27]。

秋水仙碱对胶原合成具有抑制作用,可通过损害微管系统、干扰胶原分泌、抑制细胞因子分泌等多种机制发挥抗炎和抗肝纤维化的作用,是常用的阳性对照药物^[28]。本研究对益气活血利水汤的抗肝纤维化作用机制进行了研究,本研究显示 Col 组血清 HA, LN, PC III, C IV 水平明显低于模型组,纤维化程度低于模型组,说明 Col 具有一定的抗肝纤维化作用,益气活血利水汤组 HA, LN, PC III, C IV 水平明显低于 Col 组,纤维化程度低于 Col 组,且益气活血利水汤 ($14.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组改善效果优于益气活血利水汤 ($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组,说明益气活血利水汤抗肝纤维化效果优于 Col,高剂量治疗效果更佳。

本研究选取经典 *necdin*-Wnt/ β -catenin 通路进行研究,结果显示,模型组 *necdin*, β -catenin 蛋白和

4 讨论

HF 是多种慢性肝病向肝硬化进展的病理过程,对肝纤维化的干预和治疗成为防治肝硬化研究的热点。PPAR 是核转录因子的一类,共有 3 种亚型 $\alpha, \gamma, \delta/\beta$, 其中 PPAR γ 可参与转化生长因子- β (TGF- β), 核转录因子- κ B (NF- κ B), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 血小板衍生因子 (PDGF), 瘦素等多个与 HSC 活化有关的信号转导通路^[17-18]。PPAR γ 在 HSC 的活化、增殖和肝纤维化的发展中发挥着重要的调控作用^[19]。研究显示,PPAR γ 及激动剂可阻止 HSC 的活化增殖,PPAR γ 可能是肝纤维化的治疗方向^[20]。PPAR γ 可被 *necdin*-Wnt 信号通路抑制^[4],经典的 Wnt 通路又成为 β -catenin 依赖信号通路,Wnt 信号通路被激活时,Wnt10b 可通过 β -catenin 抑制 PPAR γ 的功能,促进 HSC 的活化,在这一信号通路中使用阻断剂,可逆转 HSC 活化^[21-22]。*necdin* 是一种蛋白质,由 325 个氨基酸残基组成,具有促进神经元、骨骼肌、平滑肌分化和抑制脂肪细胞分化的功能^[23-26]。目前研究已经证实,Wnt10b 为 *necdin* 的靶基因,*necdin* 可通过上调 Wnt10b

mRNA 表达水平明显高于正常组,PPAR γ 蛋白和 mRNA 水平明显低于正常组,说明模型组中 *necdin*-Wnt 信号通路激活,抑制 PPAR γ ,导致 HSC 活化增殖,肝纤维化形成;Col 组 *necdin* 和 β -catenin 蛋白和 mRNA 水平低于模型组,PPAR γ 蛋白和表达水平高于模型组;益气活血利水汤组 *necdin* 和 β -catenin 蛋白和 mRNA 水平均低于 Col 组,PPAR γ 蛋白和 mRNA 表达水平均高于 Col 组,且益气活血利水汤 ($14.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组控制效果优于益气活血利水汤 ($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组,说明 Col 具有一定抑制 *necdin*-Wnt/ β -catenin 信号通路的功能,益气活血利水汤 ($9.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 对 *necdin*-Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制作用强于 Col,益气活血利水汤 ($14.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组对 *necdin*-Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制效果更佳。

综上所述,益气活血利水汤为国家级名老中医

陈昆山治疗肝硬化腹水的基本方,具有抗肝纤维化的效果,抑制 *necdin-Wnt/ β -catenin* 通路的活性,解除 *Wnt/ β -catenin* 对 *PPAR γ* 的抑制是益气活血利水汤发挥治疗作用的重要途径。

[参考文献]

[1] HE J, GONG J, DING Q, et al. Suppressive effect of SATB1 on hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats [J]. FEBS Lett, 2015, 589 (12): 1359-1368.

[2] Ramani K, Tomasi M L. Transcriptional regulation of methionine adenosyltransferase 2A by peroxisome proliferator-activated receptors in rat hepatic stellate cells[J]. Hepatol, 2012, 55(6): 1942-1953.

[3] YANG M D, Chiang Y M, Higashiyama R, et al. Rosmarinic acid and baicalin epigenetically derepress peroxisomal proliferator-activated receptor γ in hepatic stellate cells for their antifibrotic effect [J]. Hepatol, 2012, 55(4): 1271-1281.

[4] D'Ambrosio D N, Walewski J L, Clugston R D, et al. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24993.

[5] 林远灿, 骆海莺, 陈红淑. 垂盆草总黄酮对肝纤维化大鼠肝组织 TGF- β_1 和 Smad7 表达的影响[J]. 中国药师, 2015, 18(12): 2021-2024.

[6] 谢红东, 侯伟, 杨亦德, 等. 参七内金散对四氯化碳肝纤维化模型大鼠肝星状细胞活化及凋亡的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(8): 1913-1915.

[7] 包剑锋, 蔡兆斌, 刘寿荣, 等. 纤愈方对 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化疗效研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(10): 2446-2449.

[8] 罗勇兵, 刘宇翔, 李梦乔, 等. 陈昆山运用益气活血利水汤治疗肝硬化腹水经验拾零[J]. 实用中西医结合临床, 2016, 16(4): 56-58.

[9] 李邦华, 陈昆山. 益气活血利水汤为主治疗肝硬化腹水 41 例[J]. 中西医结合肝病杂志, 1997, 7(2): 117-118.

[10] 戴琦, 陈山. 陈昆山治疗肝硬化腹水的思路及临证经验[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(11): 1297-1298.

[11] Bhunchet E, Eishi Y, Wake K. Contribution of immune response to the hepatic induced by porcine [J]. J Hepatol, 1996, 23(4): 811-817.

[12] 张帅, 古维立, 黄迪, 等. 四氯化碳、硫代乙酰胺和猪血清诱导大鼠肝纤维化模型的比较[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(1): 71-76.

[13] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1861.

[14] 孙嘉临, 王先化. 秋水仙碱对实验性大鼠肝纤维化的影响[J]. 中国现代医生, 2012, 50(14): 1-2.

[15] Bedossa P. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic

hepatitis C [J]. Hepatol, 1994, 20(1): 15-20.

[16] Bataller R, Brenner D A. Liverfibrosis [J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209-218.

[17] LIN J, ZHENG S, CHEN A. Curcumin attenuates the effects of insulin on stimulating hepatic stellate cell activation by interrupting insulin signaling and attenuating oxidative stress [J]. Lab Invest, 2009, 89(12): 1397-1409.

[18] ZHOU Y, JIA X, QIN J, et al. Leptin inhibits PPAR γ gene expression in hepatic stellate cells in the mouse model of liver damage [J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 323(2): 193-200.

[19] WANG Z, XU J, ZHENG Y, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits hepatic fibrosis in rats [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2011, 10(1): 64-71.

[20] Shafiee M S, Shetty S, Scherer P E, et al. Adiponectin regulation of stellate cell activation via PPAR γ -dependent and-independent mechanisms [J]. Am J Pathol, 2011, 178(6): 2690-2699.

[21] Ross S E, Hemati N, Longo K A, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling [J]. Science, 2000, 289(5481): 950-953.

[22] CHENG J H, SHE H, HAN Y P, et al. Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 294(1): G39-49.

[23] Kuwajima T, Nishimura I, Yoshikawa K. Necdin promotes GABAergic neuron differentiation in cooperation with Dlx homeodomain proteins [J]. J Neurosci, 2006, 26(20): 5383-5392.

[24] Kuwajima T, Taniura H, Nishimura I, et al. Necdin interacts with the Msx2 homeodomain protein via MAGED1 to promote myogenic differentiation of C2C12 cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279(39): 40484-40493.

[25] Brunelli S, Tagliafico E, De Angelis F G, et al. Msx2 and necdin combined activities are required for smooth muscle differentiation in mesoangioblast stem cells [J]. Circ Res, 2004, 94(12): 1571-1578.

[26] Tseng Y H, Butte A J, Kokkotou E, et al. Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin [J]. Nat Cell Biol, 2005, 7(6): 601-611.

[27] ZHU N L, WANG J, Tsukamoto H. The necdin-Wnt pathway causes epigenetic peroxisome proliferator-activated receptor γ repression in hepatic stellate cells [J]. J Biol Chem, 2010, 285(40): 30463-30471.

[28] Muntoni S, Rojkind M, Muntoni S. Colchicine reduces procollagen III and increases pseudocholinesterase in chronic liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(23): 2889-2894.

[责任编辑 张丰丰]