DOI:10.16016/j.2097-0927.202111062

柴胡皂苷 D 对大鼠免疫性肝纤维化的保护作用及其机制研究

黄 祎[1],夏 莉[1],雷青松[2],张长江[1],刘华宝[1],李 麟[1] 400021 重庆,重庆市中医院肝病科[1];400030 重庆,重庆大学附属肿瘤医院肿瘤放射治疗中心[2]

[摘要] **目的** 结合网络药理学分析与动物实验验证,探讨柴胡皂苷 D(*saikosaponin D*,SSD)对猪血清诱导的大鼠免疫性肝纤维化的保护作用及机制。**方法** 网络药理学分析方法获得 SSD 与自身免疫性肝病的潜在靶点,利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建蛋白相互作用网络图。利用 DAVID 数据库对潜在靶点进行 KEGG 通路富集分析。制备大鼠免疫性肝纤维化模型,SSD 干预后 ELISA 检测大鼠血清 ALT、AST、TNF-α、IL-1β 和 IL-18 水平,HE 染色观察大鼠肝脏病理改变,Western blot 检测大鼠肝脏组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、TLR4、Myd88、p65 及 p-p65 蛋白的表达。**结果** 通过筛选获得 SSD 与自身免疫性肝病的潜在靶点 177 个,KEGG 富集分析得到与免疫系统相关的通路主要包括 NOD 样受体信号通路等,获得潜在靶点在 NOD 样受体信号通路中的富集情况。实验研究显示与模型组比较,高剂量 SSD 可显著降低大鼠血清中 ALT 和 AST 水平($P<0.05$);病理组织学检测显示 SSD 可显著改善大鼠肝脏纤维化程度,减轻肝脏损伤;ELISA 检测显示中、高剂量 SSD 可显著降低大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-18 的水平($P<0.05$);Western blot 检测显示 SSD 可明显下调 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、TLR4、Myd88 和 p65 蛋白的水平,并抑制 p65 的磷酸化。**结论** SSD 能减少免疫性肝纤维化大鼠血清中炎性因子释放、减轻肝脏细胞损伤,其机制可能与调控 TLR4/NF-κB 和 NLRP3 炎症小体信号通路有关。

[关键词] 柴胡皂苷 D;肝纤维化;炎症反应;NOD 样受体蛋白 3 炎症小体;TLR4/NF-κB 信号通路
[中图法分类号] R282.71; R285.5; R575 [文献标志码] A

Protective effects and mechanism of saikosaponin D on immune hepatic fibrosis in rats

HUANG Yi[1], XIA Li[1], LEI Qingsong[2], ZHANG Changjiang[1], LIU Huabao[1], LI Lin[1] [1]Department of Hepatic Diseases, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, 400021; [2]Department of Radiation Oncology, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing, 400030, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effects and mechanism of saikosaponin D (SSD) on immune hepatic fibrosis induced by porcine serum in rats through network pharmacology analysis and animal experimental verification. **Methods** The potential targets for SSD and autoimmune hepatic diseases were obtained based on network pharmacology analysis, and the protein interaction network was constructed using STRING database and Cytoscape software. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was subsequently performed with DAVID database. Then the rat model of immune hepatic fibrosis was prepared and further intervened with SSD. Serum levels of ALT, AST, TNF-α, IL-1β and IL-18 were measured by ELISA. The pathological changes of rat liver were observed using HE staining; and Western blotting was conducted to detect the ptotein expression of NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation primary response 88 (Myd88), p65 and p-p65 in rat liver tissues. **Results** A total of 177 potential targets of SSD and autoimmune hepatic diseases were collected. Enrichment analysis showed that the immune system-related pathways were mainly NOD-like receptor signaling

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0049),重庆市科研院所绩效激励引导专项(jxyn2020-4)
[通信作者] 李 麟,E-mail:lilin515626@126.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

pathway, and the enrichment of potential targets in this signaling pathway was obtained. As compared with the model group, high-dose SSD significantly reduced the serum levels of ALT and AST in rats ($P<0.05$), and remarkably improved hepatic fibrosis and alleviated liver injury in rats. ELISA indicated notable declines in TNF-α, IL-1β and IL-18 levels in rats after intervention of medium- and high-dose SSD ($P<0.05$). Western blotting also suggested that SSD greatly down-regulated the protein levels of NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, TLR4, Myd88 and p65, and inhibited the phosphorylation of p65. **Conclusion** SSD reduces the release of inflammatory factors in serum and alleviates the injury of liver cells in rats with immune hepatic fibrosis, which may be related to the regulation of TLR4/NF-κB and NLRP3 inflammasome signaling pathways.

[**Key words**] saikosaponin D; hepatic fibrosis; inflammation; NOD-like receptor protein 3 inflammasome; TLR4/NF-κB signaling pathway

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-msxmX0049) and the Special Project of Performance Incentive and Guidance in Chongqing Scientific Research Institutes (jxyn2020-4). Corresponding author: LI Lin, E-mail: lilin515626@126.com

肝纤维化是指由病毒感染、免疫紊乱等各种因素所致肝内结缔组织异常增生,导致肝内弥漫性细胞外基质过度沉淀的病理过程,疾病进展可出现肝功能减退、门静脉高压等,可导致肝硬化、肝癌等严重后果[1-2]。慢性、持续性的炎性刺激介导的免疫性损伤和修复是肝纤维化形成和发展的主要推动因素。近年研究显示,NOD 样受体家族(NOD-like receptor family)成员包括 NOD 样受体蛋白 1(NOD-like receptor protein 1 inflammasome,*NLRP*1)、*NLRP*3、黑色素瘤缺如因子(Absent in melanoma 2,*AIM*2)、NLR 家族 CARD 域包含蛋白 4(NLR family CARD domain containing 4,*NLRC*4)等[3]。其中,NLRP3 炎症小体信号通路研究较多,它可通过活化肝星状细胞(hepatic stellate cells,HSCs)、促进细胞外基质沉积等方式在肝纤维化的发生发展中起重要作用[4]。Toll 样受体 4(toll like receptor 4,TLR4)/髓样分化因子(myeloid differentiation primary response 88,Myd88)/核因子 Kappa B(nuclear factor kappa B,NF-κB)信号通路活化后诱导白细胞介素 1β(interleukin 1 beta,IL-1β)和白细胞介素 18(interleukin 18,IL-18)前体的转录和表达,受刺激后 NLRP3 炎症小体的组分完成募集并组装,导致半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)前体裂解为活性形式,从而引起 IL-1β 和 IL-18 前体剪切为活性形式。NLRP3 炎症小体活化并产生有活性的 IL-1β 和 IL-18,诱导细胞焦亡,与肝脏炎症和肝纤维化密切相关[5]。因此,调控 NLRP3 炎症小体信号通路表达,抑制下游炎症因子的释放,抑制细胞焦亡,可能是减少肝脏炎性损伤、防止或逆转肝纤维化发生发展的途径之一。

中药在改善肝纤维化症状、恢复肝功能、改善肝内血液循环,甚至逆转肝纤维化、调节免疫等方面的优势已成为共识[6]。柴胡为伞形科植物柴胡(*Bupleurum Chinense DC.*)或狭叶柴胡(*Bupleurum Scorzonerifolium Willd.*)的干燥根,始载于《神农本草经》:其味苦、辛,性微寒,归肝胆经,具有解表退热、疏肝解郁、升举清气之功效[7]。柴胡的主要生物活性成分为柴胡皂苷(*saikosaponins*,SS),含量较高的 SS 包括 SSA、SSC、SSD 等,其中 SSD 被证实为药理学活性最强的成分之一。SSD 的药理作用广泛,具有抗肿瘤、抗炎、抗癫痫及雌激素样作用等[8-10]。在肝脏疾病中,近年研究表明 SSD 在抑制肝星状细胞活化、减轻肝脏炎症等方面发挥重要作用[11-12]。SSD 抗肝纤维化的作用和具体机制尚不明确,鉴于此,本研究拟通过网络药理学方法分析 SSD 对自身免疫性肝病的作用机制;采用腹腔注射猪血清诱导大鼠建立免疫性肝纤维化动物模型,观察 SSD 减轻肝脏炎症的保护性作用,探讨 SSD 对免疫性肝纤维化的作用机制,为进一步的机制研究和临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

无菌猪血清(北京索莱宝科技有限公司,中国,批号 20251113);柴胡皂苷 D(SSD,HPLC ≥98%,上海源叶生物科技有限公司,中国,批号 P26N11F132137);无水乙醇[重庆川东化工(集团)有限公司,中国,批号 20190201];0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司,中国,批号 B14200853444);水合氯醛(成都市科隆化工试剂厂,中国,批号 15050501)。一抗 NLRP3(美国 affbiotech 公司,货号 DF7438)、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing A CARD,ASC,美国 affbiotech 公司,货号 DF6304)、Caspase-1(美国 affbiotech 公司,货号 AF4005)、消皮素 D(gasdermin D,GSDMD,美国 affbiotech 公司,货号 AF4012)、TLR4(美国 affbiotech 公司,货号 AF5418)、Myd88(美国 affbiotech 公司,货号 AF5195)、转录因子 p65(transcription factor p65,p65,美国 Novus 公司,货号 NB100-2176)、p-p65(美国 Novus 公司,货号 NB100-

82088)、β-actin(美国 Santa Cruz 公司,货号 SC-47778)。大鼠 IL-1β 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号 SEKR-0002)、大鼠 IL-18 ELISA 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号 SEKR-0054)、大鼠肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor alpha,TNF-α)ELISA 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号 SEKR-0009)。蛋白提取试剂盒(碧云天生物技术,中国,货号 p0013B)、二抗(杭州联科生物,中国,货号 70-GRT007)、IumiQ 通用型 ECL 发光试剂盒(上海圣尔生物,中国,货号 SB-WB012)。丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)测试盒(南京建成生物研究所,中国,货号 C009-2-1)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase ,AST)测试盒(南京建成生物研究所,中国,货号 C010-2-1)。

1.2 实验仪器

光学显微镜(ZEISS 公司,德国,型号 Imager A2);涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,中国,型号 Vortex-5);超纯水机(重庆力德高端水处理设备研发有限公司,中国,型号 CCT-3320A);电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司,中国,型号 YP202N);恒温水浴箱(江苏金坛市华欧实验仪器厂,中国,型号 HH-601);垂直电泳转移装置(Bio-Rad 公司,美国,型号 Mini-PROTEAN Tetra 1658001)、Trans-Blot 转膜装置(Bio-Rad 公司,美国,型号 Mini Trans-Blot Module 1703935)、凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,美国,型号 CFX96);水平脱色摇床(海门市麒麟医用仪器厂,中国,型号 TS-2000A);酶标仪(Bio-Tek 仪器有限公司,美国,型号 ELX800);高速台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,中国,型号 TG16-WS);-80 ℃低温冰箱(海尔生物医疗股份有限公司,中国,型号 DW-86L388J)。

1.3 实验动物及分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体质量(200±20)g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供[实验动物生产许可证号 SCXK(京)2014 - 0004]。已通过重庆市中医院医学伦理委员会审查批准使用,符合实验室动物管理与使用准则,实验动物使用许可证号 SYXK(渝)2017-0005。实验期间实验环境温度 23~26 ℃,湿度 50%~60%。SD 大鼠 40 只,随机分为 5 组(n=8):①正常对照组;②模型组;③SSD 高剂量(3.00 mg/kg)组;④SSD 中剂量(1.50 mg/kg)组;⑤SSD 低剂量(0.75 mg/kg)组。模型组和 SSD 组大鼠予以无菌猪血清 0.5 mL/只腹腔注射,每周 2 次,连续 8 周。SSD 组从第 5 周开始每天 2 次腹腔注射各组剂量的 SSD,共 4 周。对照组和模型组腹腔注射等体积的 0.9%氯化钠注射液。观察各组大鼠的状态,记录死亡数。样本采集前大鼠禁食不禁水 12 h,称量并记录。将大鼠按 0.7 mL/100 g 注射 5%水合氯醛,腹主动脉采血 10 mL 左右置于无菌抗凝管中,3 000×g 离心 10 min,吸取血清,-80 ℃分装保存待用。将大鼠剖腹取肝脏组织,4%多聚甲醛固定用于病理学检测;-80 ℃保存用于蛋白的检测。

1.4 网络药理学分析

1.4.1 柴胡皂苷 D 治疗自身免疫性肝病潜在靶点的获取 运用 ChemDraw professional 16.0 绘制 SSD 的化合物结构,将其保存为*.mol2 格式,导入 PharmMapper(http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper)网站,采用反向分子对接的方法进行 SSD 相关靶点的预测。从 Pubchem(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)数据库获取 SSD 的 Smiles 格式,导入 SWISS target prediction(http://www.swisstargetprediction.ch)数据库预测 SSD 相关靶点。同时检索 BATMAN-TCM(http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/)、ETCM(http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/)和 Coremine medical(https://www.coremine.com/medical/#search)数据库获取 SSD 的相关靶点,选择物种为“Homo sapiens”。将以上数据库检索获得的相关靶点汇总,利用 UniProt(http:// www.uniprot.org)数据库校正为官方名称(official symbol),获得的结果作为 SSD 的相关靶点以进一步分析。

从 Drugbank(https://www.drugbank.ca)和 Genecards(https://www.genecards.org)数据库分别检索关键词“Autoimmune hepatic diseases”或“Autoimmune liver diseases”或“Primary biliary cholangitis”或“Primary sclerosing cholangitis”或“Autoimmune hepatitis”以寻找与自身免疫性肝病相关的基因,利用 Venn 图将 SSD 的相关靶点和自身免疫性肝病的相关靶点进行比对取交集,得到 SSD 治疗自身免疫性肝病的潜在靶点。

1.4.2 潜在靶点蛋白相互作用网络图的构建和信号通路分析 将 SSD 治疗自身免疫性肝病的潜在靶点导入 STRING(http://string-db.org)网站,选择物种为“Homo sapiens”,combined score>0.4,构建蛋白相互作用网络图(protein-protein interaction,PPI)。将结果导入到 Cytoscape 3.5.1 软件中进行可视化处理,网络图中节点的大小表示靶点度值的大小。利用 Network analyzer 插件进行网络拓扑学分析,寻找 PPI 中的关键节点。

将潜在靶点导入富集分析工具注释、可视化和集成发现(the database for annotation,visualization and integrated discovery,DAVID)数据库 6.8(http://david.ncifcrf.gov)进行京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)信号通路富集分析,选择“Official gene symbol”、物种为“Homo sapiens”,提交进行分析并获得结果,以 P<0.05 为有

统计学意义。

1.5　柴胡皂苷 D 抗大鼠免疫性肝纤维化的作用机制研究

1.5.1　血清生化及细胞因子的测定　　ELISA 试剂盒测量大鼠血清 ALT、AST 表达水平。全血标本于室温放置 2 h 后以 1 000×*g* 离心 20 min,取上清检测。BCA 法测定蛋白浓度,采用 ELISA 试剂盒检测大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-18 的含量。

1.5.2　肝脏 HE 病理切片观察　　4%多聚甲醛固定大鼠肝脏组织,经脱水、石蜡包埋、切片后行 HE 染色,光学显微镜镜检,图像采集分析,观察大鼠肝脏组织的形态学变化。

1.5.3　Western blot 分析　　研钵中加入液氮研磨组织至微末,收集 50~80 mg 至 1.5 mL EP 管中,每管加适量(约 100 μL/10 mg)蛋白裂解液(用前需提前加入蛋白酶抑制剂);冰上裂解 30 min,超声处理。4 ℃、12 000×*g* 离心 10 min。离心后取上清装入干净的 1.5 mL EP 管中,取一部分通过 BCA 法测定蛋白浓度,-80 ℃分装保存。取适量蛋白加入样品缓冲液于 95 ℃煮沸 10 min。上样后经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,将蛋白条带电转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入 1∶500 稀释的一抗(NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、TLR4、p65、p-p65)和 1∶1 000 稀释的一抗(β-actin)4 ℃孵育过夜,洗膜后加入 1∶1 000 稀释的二抗室温孵育 2 h,洗膜后采用 ECL 发光法检测蛋白条带,凝胶成像仪记录条带灰度值。以 β-actin 为内参,以目的蛋白/内参蛋白表示目的蛋白的相对表达水平。

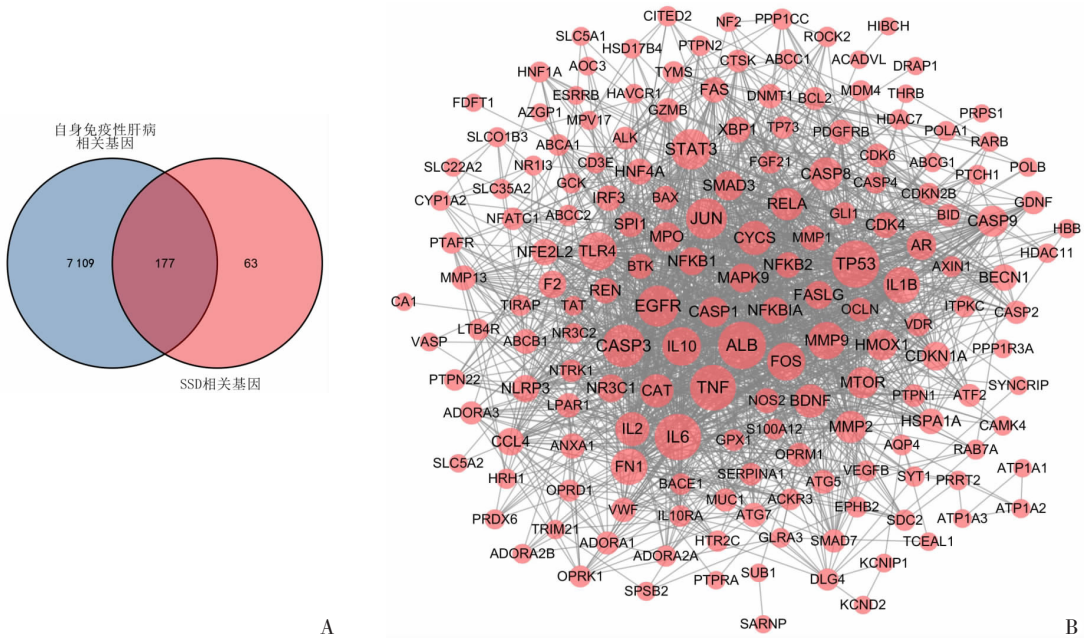
1.6　统计学分析

应用 SPSS 21.0 统计软件处理数据,计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2　结果

2.1　柴胡皂苷 D 与自身免疫性肝病的潜在靶点及蛋白相互作用网络图

通过检索 PharmMapper、Swiss target prediction、Batman-TCM、ETCM 和 Coremine medical 数据库获得 SSD 的相关靶点,将结果进行汇总、去重,最终得到 SSD 的相关靶点 240 个。在 Gencards 和 Drugbank 数据库中筛选获得自身免疫性肝病相关靶点 7 286 个,与 SSD 的相关靶点进行比对取交集后获得 SSD 与自身免疫性肝病的潜在靶点共 177 个(图 1A)。利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件构建 SSD 与自身免疫性肝病潜在靶点的 PPI(图 1B),PPI 网络图拓扑学性质分析结果显示白蛋白(albumin,*ALB*)、肿瘤蛋白 P53(tumor protein P53,*TP*53)、白细胞介素 6(interleukin 6,*IL*-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,*TNF*)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3,*CASP*3)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,*EGFR*)、转录因子 AP-1(transcription factor AP-1,*JUN*)、信号转导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3,*STAT*3)、白细胞介素 10(interleukin 10,*IL*-10)和 *TLR*4 等基因的度值(Degree)排名靠前,表明它们在网络图中处于较为重要的位置。

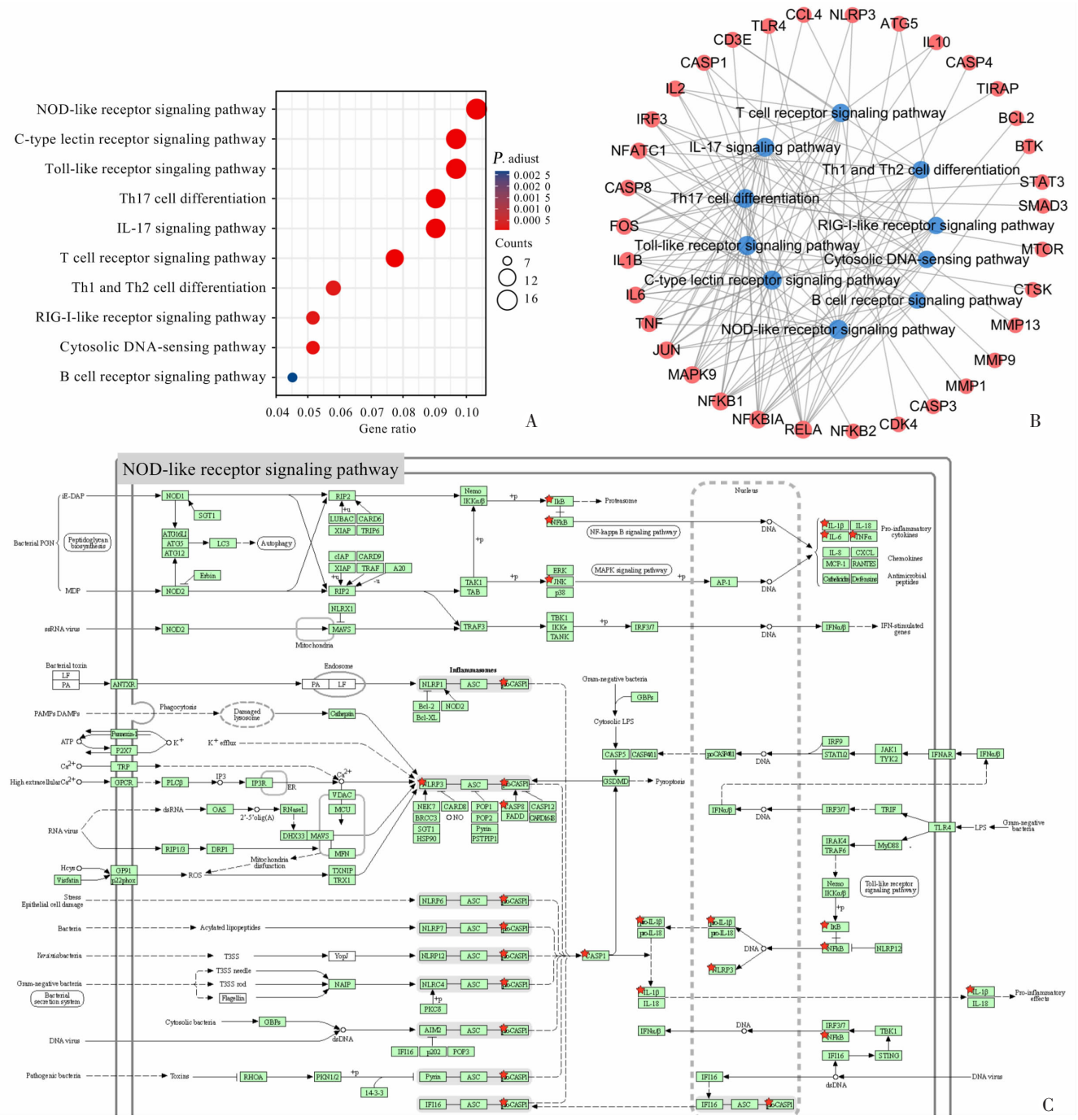


A:柴胡皂苷 D 与自身免疫性肝病潜在靶点的 Venn 图;B:潜在靶点的蛋白相互作用网络图

图 1　柴胡皂苷 D 与自身免疫性肝病潜在靶点的 Venn 图和蛋白相互作用网络图

2.2　潜在靶点的信号通路分析

利用 DAVID 数据库分析 SSD 与自身免疫性肝病潜在靶点富集的信号通路($P<0.05$),共获得 107 条富集的信号通路,筛选与免疫系统相关的信号通路,共获得 10 个相关的信号通路(图 2A)。构建免疫系统相关信号通路和潜在靶点的网络图,分析网络图拓扑学性质,结果显示核苷酸结合寡聚域受体(NOD)样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)是 SSD 治疗自身免疫性肝病的主要信号通路之一(图 2B)。进一步分析发现该信号通路中富集的潜在靶点主要包括 *NLRP3*、*CASP1*、*IL-1β*、*NF-κB*、*IL-6*、*TNF-α* 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8(Caspase-8,*CASP8*)等,这些靶点主要位于炎症小体信号通路和 TLR4/NF-κB 信号通路上(图 2C)。

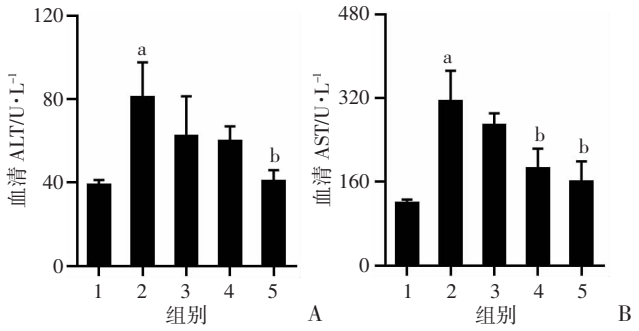


A:免疫系统相关 KEGG 通路富集分析; B: 通路-靶点网络图; C: NOD 样受体信号通路,潜在靶点用红星标注

图 2　SSD 与自身免疫性肝病潜在靶点的信号通路分析

2.3　柴胡皂苷 D 改善免疫性肝纤维化大鼠肝功能

与正常对照组比较,模型组大鼠血清中的 ALT、AST 显著升高(图 3)。与模型组比较,SSD 低、中、高剂量组大鼠肝功能均得到不同程度的改善,其中 SSD 高剂量组可显著降低大鼠血清中的 ALT 水平($P<0.05$),SSD 中、高剂量组可显著降低大鼠血清中的 AST 水平($P<0.05$),表明 SSD 可改善免疫性肝纤维化大鼠的肝功能。



a: $P<0.05$,与正常对照组比较;b: $P<0.05$,与模型组比较
1:正常对照组;2:模型组;3:SSD 低剂量(0.75 mg/kg)组;
4:SSD 中剂量(1.50 mg/kg)组;5:SSD 高剂量(3.00 mg/kg)组

图 3　柴胡皂苷 D 对免疫性肝纤维化大鼠肝功能的影响
($n=8,\bar{x}\pm s$)

2.4　大鼠肝组织病理学变化

HE 染色结果显示:正常对照组大鼠的肝小叶结构清晰完整,肝细胞排列整齐(图 4)。模型组大鼠正常小叶结构破坏,肝细胞索排列紊乱,可见灶状坏死区,炎性细胞浸润,纤维间隔形成,表明造模成功。与模型组比较,SSD 低剂量组对大鼠肝脏结构的改善不明显,SSD 中剂量组肝脏病变稍有减轻,SSD 高剂量组肝脏病变明显减轻,肝细胞索排列相对整齐,炎性细胞减少,小叶结构较完整,提示纤维化程度得到缓解,表明 SSD 对免疫性肝纤维化大鼠具有一定保护作用。

2.5　柴胡皂苷 D 减轻免疫性肝纤维化大鼠肝脏炎症

研究采用 ELISA 检测 SSD 对免疫性肝纤维化大鼠血清中炎症因子的影响,结果显示:模型组大鼠中炎症因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-18 的水平显著高于对照组(图 5,$P<0.05$)。与模型组比较,低剂量 SSD 即可显著降低大鼠中 IL-1β 的含量,SSD 中、高剂量组大鼠中 TNF-α 和 IL-18 水平均显著降低($P<0.05$),表明 SSD 可以抑制免疫性肝纤维化大鼠模型中炎症因子的释放。

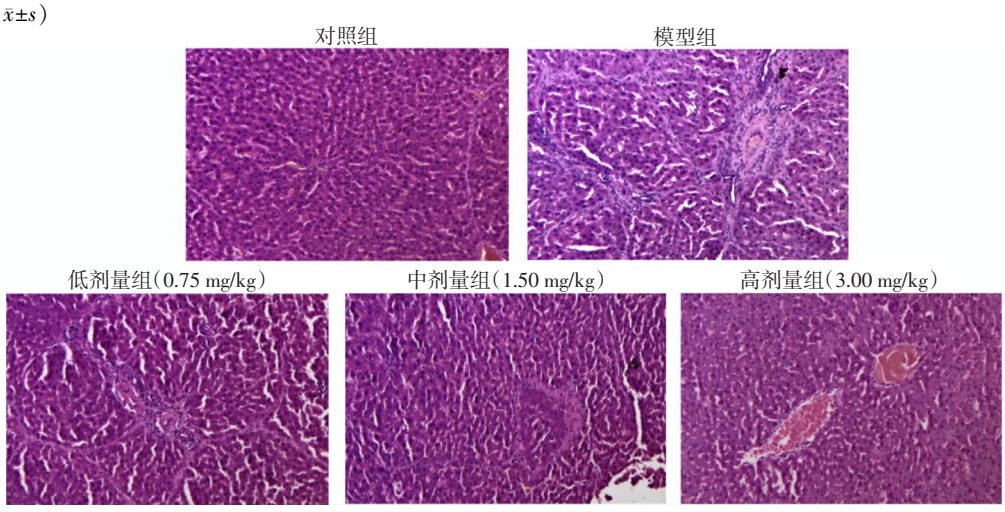
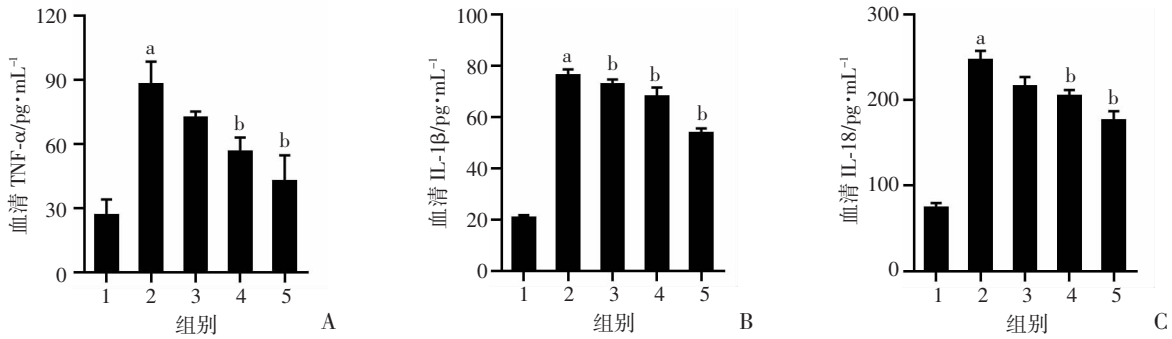


图 4　柴胡皂苷 D 对免疫性肝纤维化大鼠肝脏组织形态学的影响　(HE ×100)



A:TNF-α;B:IL-1β;C:IL-18　1:正常对照组;2:模型组;3:SSD 低剂量(0.75 mg/kg)组;4:SSD 中剂量(1.50 mg/kg)组;5:SSD 高剂量(3.00 mg/kg)组　a: $P<0.05$,与正常对照组比较;b: $P<0.05$,与模型组比较

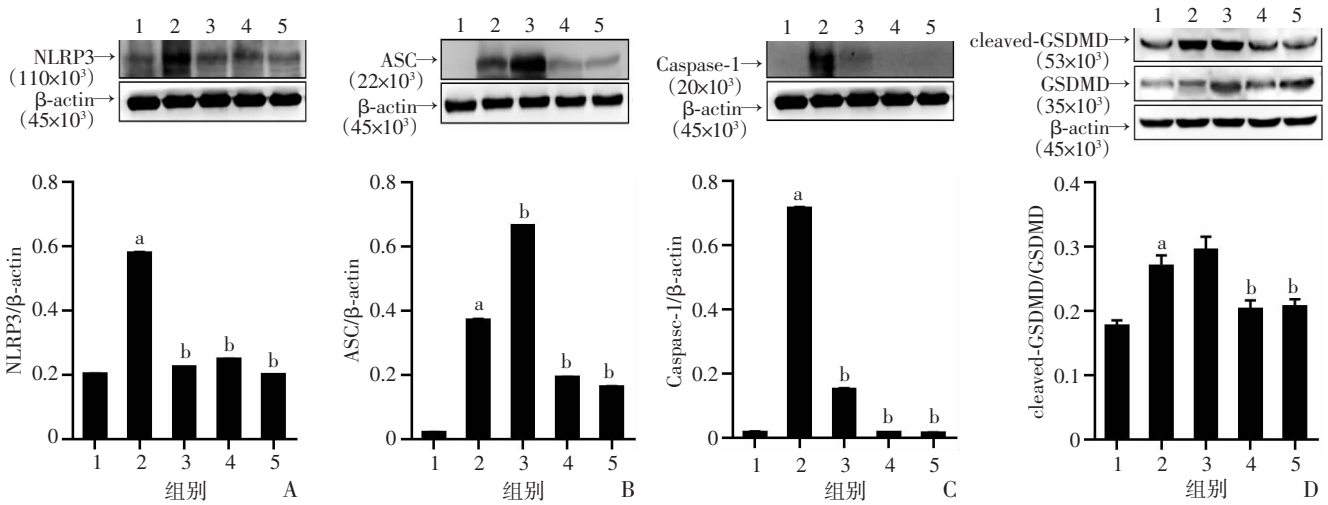
图 5　柴胡皂苷 D 对免疫性肝纤维化大鼠炎症因子的影响　($n=8,\bar{x}\pm s$)

2.6 柴胡皂苷 D 抑制免疫性肝纤维化大鼠肝脏 NLRP3 炎症小体激活和细胞焦亡

研究采用 Western blot 检测 SSD 对 NLRP3 炎症小体和细胞焦亡相关蛋白的影响,结果显示:与对照组比较,模型组大鼠肝脏组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白显著增加($P<0.05$),提示免疫性损伤促进了 NLRP3 炎症小体的激活并启动了细胞焦亡(图 6)。SSD 中、高剂量可以显著降低大鼠肝脏 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSDMD 的水平($P<0.05$),表明 SSD 可以抑制免疫性肝纤维化大鼠中 NLRP3 炎症小体的激活和细胞焦亡。

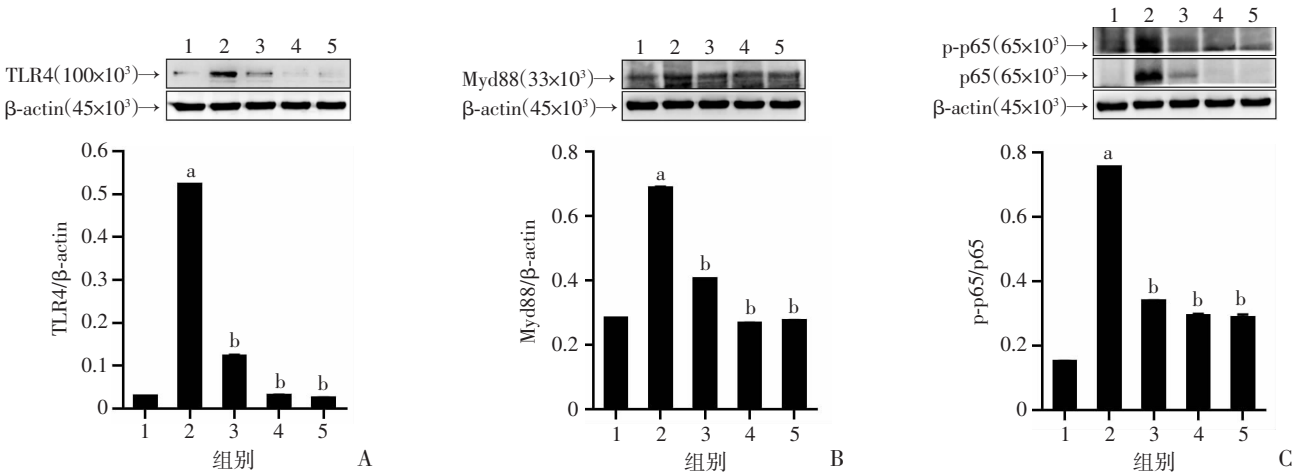
2.7 柴胡皂苷 D 抑制免疫性肝纤维化大鼠肝脏 TLR4/Myd88/NF-κB 信号通路

为进一步探究 SSD 抑制 NLRP3 炎症小体活化的机制,本研究检测了 SSD 对 TLR4/Myd88/NF-κB 信号通路的影响。结果显示,模型组大鼠肝脏组织中 TLR4、Myd88、p65 的表达水平及 p65 磷酸化水平显著高于对照组($P<0.05$),提示免疫性肝纤维化大鼠中 TLR4/ Myd88/NF-κB 信号通路被激活(图 7)。给予中、高剂量的 SSD 可明显降低 TLR4 和 Myd88 的表达水平及 p65 磷酸化水平($P<0.05$),表明 SSD 可以下调免疫性肝纤维化大鼠肝脏中的 TLR4/ Myd88/NF-κB 信号通路的活化水平。



A:NLRP3;B:ASC;C:Caspase-1;D:GSDMD 1:正常对照组;2:模型组;3:SSD 低剂量(0.75 mg/kg)组;4:SSD 中剂量(1.50 mg/kg)组;5:SSD 高剂量(3.00 mg/kg)组 a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

图 6 柴胡皂苷 D 对免疫性肝纤维化大鼠肝脏组织中 NLRP3 炎症小体和细胞焦亡蛋白的影响 ($n=8,\bar{x}\pm s$)



A:TLR4;B:Myd88;C:p65 1:正常对照组;2:模型组;3:SSD 低剂量(0.75 mg/kg)组;4:SSD 中剂量(1.50 mg/kg)组;5:SSD 高剂量(3.00 mg/kg)组 a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

图 7 柴胡皂苷 D 对免疫性肝纤维化大鼠肝脏组织中 TLR4/Myd88/NF-κB 信号通路的影响 ($n=8,\bar{x}\pm s$)

3 讨论

肝纤维化的形成由多种病理因素介导。在病毒、抗原、药物等各种因素的影响下,肝脏固有免疫和细胞免疫状态发生变化,造成肝脏细胞微环境发生变化、炎性细胞浸润、胶原沉积,进而导致肝纤维化形成。免疫诱导形成的肝纤维化是人体肝纤维化的重要病理类型,因此,免疫性肝纤维化动物模型是研究肝纤维化发病机制和治疗的重要途径。本研究采用大鼠腹腔注射猪血清构建免疫性肝纤维化动物模型,猪血清中的白蛋白可作为异种抗原,诱导机体形成免疫复合物,介导细胞毒性反应,活化肝星状细胞,对肝脏造成慢性损伤,刺激胶原纤维增生,最终引发免疫性肝纤维化[13]。既往研究显示大鼠腹腔注射猪血清与免疫性肝纤维化形成有关,于4周时肝纤维化可初步形成,8周时免疫性肝纤维化动物模型成功建立,该模型病理过程与人类慢性肝炎肝纤维化的形成过程相似,因此是研究免疫性肝纤维化的主要动物模型[14]。本研究采用无菌猪血清注射大鼠腹腔建立免疫性肝纤维化动物模型,模型建立后血清学检测显示模型组ALT、AST较对照组明显升高,差异具有统计学意义,采用病理切片染色观察大鼠肝脏的形态学变化,结果显示模型组大鼠肝脏纤维组织增生明显,假小叶形成,部分肝实质细胞出现坏死、炎性细胞浸润等表现,表明动物模型成功建立。

SSD是中药柴胡中药理活性最强的成分之一,具有抗炎抗氧化、抗肝纤维化和调节免疫等作用。本研究首先利用网络药理学的方法分析了SSD治疗自身免疫性肝病的潜在靶点,初步探索了SSD治疗自身免疫性肝病的可能作用机制。自身免疫性肝病主要包括自身免疫性肝炎、原发性胆汁性胆管炎和原发性硬化性胆管炎,发病机制涉及机体自身免疫系统的异常[15]。因此,研究免疫系统相关信号通路的活化水平与调节免疫反应的有效药物,是探索自身免疫性肝病治疗方法的重要途径。本研究获取SSD与自身免疫性肝病的潜在靶点后,分析了这些靶点富集的免疫系统相关信号通路,结果提示NOD样受体信号通路、C型凝集素受体信号通路(C-type lectin receptor signaling pathway)、Toll样受体信号通路(toll-like receptor signaling pathway)、Th17细胞分化(Th17 cell differentiation)和IL-17信号通路(IL-17 signaling pathway)等是主要富集的信号通路。既往研究表明,在细菌脂多糖(*lipopolysaccharide*,LPS)的刺激下,TLR4及其下游的信号传导被激活,促进TNF-α、IL-1β、IL-6等多种促炎因子的释放,可激活HSCs,促进纤维化的形成。在克雷白杆菌性重症肺炎大鼠模型中,SSD可明显减轻大鼠肺组织损伤和纤维化,肺组织病理结果显示加药组细胞凋亡数目显著降低,IL-6、TNF-α和一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthases,iNOS)等炎症因子水平显著降低,切割型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、切割型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(cleaved Caspase-9)水平明显下降,TLR4和磷酸化p65(p-p65)蛋白表达显著下调,提示SSD可通过调节炎症因子释放、促进细胞凋亡等机制缓解大鼠肺组织的纤维化[16]。李敏等[17]用柴胡皂苷D-黄芩苷联合干预四氯化碳(carbon tetrachloride,Ccl4)诱导的HSCs,可见细胞增殖受到抑制,TLR4、NF-κB等蛋白水平降低,透明质酸酶、层粘连蛋白、Ⅲ型前胶原、Ⅳ型胶原等肝纤维化相关因子的浓度降低,减轻了下游炎症因子的释放。郝健亨等[18]利用不同剂量SSD处理刀豆A诱导的自身免疫性肝炎小鼠模型,结果显示SSD可降低小鼠血清ALT、AST的水平,并能降低炎症因子*IL*-17 mRNA的水平,升高抗炎因子*IL*-10和细胞毒性T淋巴细胞特异性抗原-4(cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4,*CTLA*-4)的mRNA表达水平,提示SSD通过调控以上抗炎因子和促炎因子的水平,起到改善小鼠肝脏炎症的作用。以上研究结果提示SSD可通过Toll样受体信号通路、IL-17信号通路等途径发挥抗炎和调节免疫的作用,与本研究的网络药理学分析结果基本符合。

本研究结果显示:SSD能显著改善免疫性肝纤维化大鼠的肝功能,降低血清ALT和AST表达水平,减轻肝脏细胞炎性浸润,改善肝脏纤维化程度,表明SSD可有效地减轻免疫性肝纤维化大鼠中的肝脏损伤。同时,SSD可显著降低大鼠血清中TNF-α、IL-1β和IL-18的表达水平,表明SSD还可抑制免疫性肝纤维化大鼠肝脏中的炎症反应。在Ccl4诱导的急性肝损伤小鼠模型中,不同剂量SSD干预后肝脏损伤程度减轻,小鼠血清中的ALT、AST明显降低,且呈剂量依赖性,抑制氧化应激产物丙二醛(malondialdehyde,MDA)的产生,并能提高抗氧化酶超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)的活性。进一步的机制研究显示急性肝损伤小鼠Janus激酶(janus kinase,JAK)/STAT信号通路激活,下游的炎症介质高迁移率族蛋白B1

(high mobility group box 1,HMGB1)的表达水平显著升高,HMGB1 可通过刺激单核巨噬细胞产生 IL-1β 和 IL-18 等炎症因子。给予 SSD 后急性肝损伤小鼠中 JAK/STAT 信号通路的磷酸化及 HMGB1 蛋白的表达受到抑制,下游炎症因子 IL-1β 和 IL-18 表达受到抑制,且呈剂量依赖性[19]。

细胞因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-18 均是位于 TLR4/Myd88/NF-κB 及 NLRP3 炎症小体信号通路下游的促炎因子。NLRP3 炎症小体信号通路是近年来发现调控炎症的重要信号通路,对肝纤维化的形成和发现具有直接的推动作用。NLRP3 炎症小体由 NLRP3、ACS、pro-Caspase-1 组成,是最典型的炎症小体之一[20]。目前研究认为 NLRP3 炎症小体信号通路的启动和激活是两个独立的步骤,其中,启动步骤由 TLR4/Myd88/NF-κB 信号通路执行,促进 NLRP3 和 IL-1β 前体蛋白的表达,而激活步骤由病原体相关分子模式(pathogen associated molecular patterns,PAMPs)和危险信号分子模式(danger-associated molecular patterns,DAMPs)执行,促进 NLRP3 炎症小体组分的组装,活化的 Caspase-1 可促进促炎因子 IL-1β 和 IL-18 前体转变为成熟形式并分泌[21],同时也可诱导细胞焦亡的标志性蛋白 GSDMD 的裂解,破坏细胞膜,为 IL-1β 和 IL-18 的分泌提供条件[22]。因此,TLR4/Myd88/NF-κB 及 NLRP3 炎症小体信号通路介导细胞炎症反应和焦亡可推动肝脏炎性损伤和肝纤维化的形成。张娜等[23-24]报道在过氧化氢(hydrogen peroxide,H_2O_2)诱导的人肝星状细胞(LX-2)氧化应激模型中,SSD 可减少 H_2O_2 诱导的活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平,线粒体三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)水平明显下降,且炎症小体相关蛋白 NLRP3、ASC、Caspase-1 表达水平明显降低;而在 H_2O_2 诱导的人肝细胞(L02)损伤模型中,SSD 可抑制细胞焦亡相关指标 Caspase-1、IL-1β 和 IL-18 的表达,表明 SSD 可通过下调 NLRP3 炎症小体信号通路以减轻氧化应激损伤、抑制细胞焦亡,从而发挥抗肝纤维化作用。在 Ccl4 诱导的急性肝损伤细胞和动物模型中,SSD 也可抑制 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β 和 IL-18 的水平,并能升高细胞内抗氧化酶 SOD 等的活性,降低氧化应激产物 MDA 等的水平,从而减轻 Ccl4 诱导的急性肝细胞损伤[25-26]。本研究结果显示 SSD 可降低免疫性肝纤维化大鼠肝脏中 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSDMD 蛋白的表达水平,提示 SSD 对 NLRP3 炎症小体信号通路诱导的炎性反应和细胞焦亡具有抑制作用。此外,SSD 还能降低 TLR4 和 Myd88 蛋白的表达水平,抑制 p65 蛋白的磷酸化,提示 SSD 可通过抑制 TLR4/Myd88/NF-κB 信号通路从而抑制 NLRP3 炎症小体信号通路的启动。

综上所述,本研究通过网络药理学研究方法初步发现了 SSD 治疗自身免疫性肝病的可能作用机制。在免疫性大鼠肝纤维化动物模型中,SSD 可抑制 TLR4/Myd88/NF-κB 信号通路和 NLRP3 炎症小体的启动和激活,减轻下游炎症因子的释放,减轻肝脏炎症反应,起到保护性的作用。因此,本研究为 SSD 的进一步开发和临床利用提供了研究基础。

参考文献:

[1] WEISKIRCHEN R, TACKE F. Liver fibrosis: from pathogenesis to novel therapies[J]. Dig Dis, 2016, 34(4): 410-422. DOI: 10.1159/000444556.

[2] 徐列明, 刘平, 沈锡中, 等. 肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019 年版)[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(11): 1286-1295. DOI: 10.7661/j.cjim.20190916.314.
XU L M, LIU P, SHEN X Z, *et al*. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of liver fibrosis with integrated Chinese and Western medicine (2019)[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2019, 39(11): 1286-1295. DOI: 10.7661/j.cjim.20190916.314.

[3] KETELUT-CARNEIRO N, FITZGERALD K A. Inflammasomes[J]. Curr Biol, 2020, 30(12): R689-R694. DOI: 10.1016/j.cub.2020.04.065.

[4] INZAUGARAT M E, JOHNSON C D, HOLTMANN T M, *et al*. NLR family pyrin domain-containing 3 inflammasome activation in hepatic stellate cells induces liver fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2019, 69(2): 845-859. DOI: 10.1002/hep.30252.

[5] WREE A, MCGEOUGH M D, INZAUGARAT M E, *et al*. NLRP3 inflammasome driven liver injury and fibrosis: roles of IL-17 and TNF in mice[J]. Hepatology, 2018, 67(2): 736-749. DOI: 10.1002/hep.29523.

[6] 陆伦根, 尤红, 谢渭芬, 等. 肝纤维化诊断及治疗共识(2019 年)[J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(6): 793-803.
LU L G, YOU H, XIE W F, *et al*. Consensus on the diagnosis and therapy of hepatic fibrosis[J]. J Pract Hepatol, 2019, 22(6): 793-803.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 年版一部)[S]. 中国医药科技出版社, 2010: 163-164.

National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2010 Volume 1)[S]. China Medical Science and Technology Press, 2010: 163-164.

[8] 冯杰鑫, 吴雄, 陈建辉, 等. 柴胡皂苷 D 通过下调 JAK2/STAT3 通路抑制乳腺癌细胞的增殖并促进其凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(9): 852-857. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202010217.
FENG J X, WU X, CHEN J H, *et al*. Saikosaponin D inhibits proliferation and promotes apoptosis in breast cancer cells through down-regulating JAK2/STAT3 pathway[J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(9): 852-857. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202010217.

[9] JIANG J S, MENG Y F, HU S F, *et al*. Saikosaponin D: a potential therapeutic drug for osteoarthritis[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2020, 14(8): 1175-1184. DOI: 10.1002/term.3090.

[10] 阮君, 肖铁刚, 王兵. 柴胡皂苷 D 对非酒精性脂肪性肝炎大鼠糖脂代谢紊乱的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29(5): 399-401.
RUAN J, XIAO T G, WANG B. Effects of Saikosaponin-D on glucose and lipid metabolism disorder in rats with non-alcoholic steatohepatitis[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2019, 29(5): 399-401.

[11] 王祎, 庞旭, 张保财, 等. 柴胡皂苷 d 对肝星状细胞的作用分析[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2020, 47(5): 76-82. DOI: 10.13543/j.bhxbzr.2020.05.010.
WANG Y, PANG X, ZHANG B C, *et al*. Effects of saikosaponin D on hepatic stellate cells[J]. J Beijing Univ Chem Technol Nat Sci Ed, 2020, 47(5): 76-82. DOI: 10.13543/j.bhxbzr.2020.05.010.

[12] SHI Y, HUANG H H, CHEN C Y, *et al*. Reparative and toxicity-reducing effects of liposome-encapsulated saikosaponin in mice with liver fibrosis[J]. Biosci Rep, 2020, 40(8): BSR20201219. DOI: 10.1042/BSR20201219.

[13] 张艳, 都广礼, 陈德兴, 等. 猪血清致大鼠免疫性肝纤维化的动态观察[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2007, 15(2): 74-77. DOI: 10.3969/j.issn.1671-038X.2007.02.002.
ZHANG Y, DU G L, CHEN D X, *et al*. Dynamic observation of immune liver fibrosis in rats induced by porcine serum[J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2007, 15(2): 74-77. DOI: 10.3969/j.issn.1671-038X.2007.02.002.

[14] 王宪东, 石安华, 陈文玲. 肝纤维化大鼠模型的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(94): 39-30. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2016.94.028.
WANG X D, SHI A H, CHEN W L. Progress on rat model of hepatic fibrosis[J]. World Latest Med, 2016, 16(94): 39-30. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2016.94.028.

[15] 李尧, 徐晓欧. 自身免疫性肝病的发病机制及诊疗进展[J]. 医学综述, 2021, 27(9): 1707-1711.
LI Y, XU X O. Pathogenesis and diagnosis and treatment of autoimmune liver diseases[J]. Med Recapitul, 2021, 27(9): 1707-1711.

[16] 赵琼, 刘恒军. 柴胡皂苷 D 对克雷伯杆菌肺炎大鼠肺组织损伤和纤维化及免疫功能的调节作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(9): 823-829. DOI: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2019.09.010.
ZHAO Q, LIU H J. The regulating effect of saikosaponin D on lung tissue injury, fibrosis and immune function in Klebsiella pneumoniae rats[J]. J Shenyang Pharm Univ, 2019, 36(9): 823-829. DOI: 10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2019.09.010.

[17] 李敏, 高凯, 王华林, 等. 柴胡皂苷 d-黄芩苷配伍对 CCl_4 诱导大鼠 HSC 的 TLR4-NF-κB 通路作用研究[J]. 陕西中医, 2018, 39(1): 3-5.
LI M, GAO K, WANG H L, *et al*. Inhibitory effects of Saikosaponin D-Baicalin on activation of rat HSC induced by CCl_4[J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2018, 39(1): 3-5.

[18] 郝健亨, 陈浩, 高艳, 等. 柴胡皂苷 d 对自身免疫性肝炎小鼠差异表达基因 CTLA-4、IL-10 和 IL-17 的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(3): 303-309.
HAO J H, CHEN H, GAO Y, *et al*. Effects of saikosaponin D on differentially expressed genes CTLA-4, IL-10 and IL-17 in mice with autoimmune hepatitis[J]. J Shanghai Jiao tong Univ Med Sci, 2020, 40(3): 303-309.

[19] 林柳兵, 阙任烨, 李毅平, 等. 柴胡皂苷 d 对急性肝损伤小鼠高迁移率族蛋白 B1 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(3): 527-531. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2019.03.005.
LIN L B, QUE R Y, LI Y P, *et al*. Effect of Saikosaponin D on the expression of high mobility group box 1 in mice with acute liver injury[J]. Lishizhen Med Materia Medica Res, 2019, 30(3): 527-531. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2019.03.005.

[20] PLACE D E, KANNEGANTI T D. Recent advances in inflammasome biology[J]. Curr Opin Immunol, 2018, 50: 32-38. DOI: 10.1016/j.coi.2017.10.011.

[21] 王丹姝, 燕柳艳, 孙姝婵, 等. 葛根素通过 TLR4/Myd88/NF-κB 抑制 NLRP3 炎症小体抗大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. 药学学报, 2021, 56(5): 1343-1351. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0124.
WANG D S, YAN L Y, SUN S C, *et al*. Puerarin protects

against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation via TLR4/Myd88/NF-κB pathway in rats[J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(5): 1343-1351. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0124.

[22] FISCHER F A, CHEN K W, BEZBRADICA J S. Posttranslational and therapeutic control of gasdermin-mediated pyroptosis and inflammation[J]. Front Immunol, 2021, 12: 661162. DOI: 10.3389/fimmu.2021.661162.

[23] 张娜, 晏旎, 周蒙恩, 等. 柴胡皂苷d对氧化应激诱导的人肝星状细胞活化后ROS形成及NLRP3炎性小体表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(4): 805-809. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.04.010.
ZHANG N, YAN N, ZHOU M E, *et al*. Effects of Saikosaponin D on ROS formation and NLRP3 inflammasome expression after oxidative stress-induced activation of human hepatic stellate cells[J]. Lishizhen Med Materia Medica Res, 2020, 31(4): 805-809. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2020.04.010.

[24] 张娜, 李勇. 柴胡皂苷d对人肝细胞损伤的保护作用研究及抗肝纤维化机制探讨[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(12): 21-27, 275. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2021.12.005.
ZHANG N, LI Y. Study on protective effect of bupleurin D on human hepatocyte injury and mechanism of anti-liver fibrosis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2021, 39(12): 21-27, 275. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2021.12.005.

[25] LIN L B, QUE R Y, SHEN Y T, *et al*. Saikosaponin-D alleviates carbon-tetrachloride induced acute hepatocellular injury by inhibiting oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation in the HL-7702 cell line[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6): 7939-7946. DOI: 10.3892/mmr.2018.8849.

[26] CHEN Y R, QUE R Y, LIN L B, *et al*. Inhibition of oxidative stress and NLRP3 inflammasome by Saikosaponin-d alleviates acute liver injury in carbon tetrachloride-induced hepatitis in mice[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2020, 34: 2058738420950593. DOI: 10.1177/2058738420950593.

(**收稿**:2021-11-09;**修回**:2022-03-01)

(编辑 邓强庭)