拳卷地钱总黄酮抗小鼠肝纤维的作用及机制研究Δ

梁　爽[1,2*]，朱　华[1,2]，黄健军[1,2#]，张文涛[2]，卢森华[3]，陈诗曼[2]（1.广西民族大学民族学与社会学学院，南宁 530006；2.广西中医药大学药学院，南宁　530200；3.玉林市食品药品检验检测中心食品室，广西 玉林 537000）

中图分类号　R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2021）19-2363-08
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2021.19.10

摘　要　目的：研究拳卷地钱总黄酮抗小鼠肝纤维化的作用及可能机制。方法：将72只小鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组（秋水仙碱0.2 mg/kg）和卷拳地钱总黄酮高、中、低剂量组（300、150、75 mg/kg），每组12只。除空白组外，其余各组小鼠均于背部皮下注射25%四氯化碳-花生油溶液复制肝纤维化模型；于造模的同时，空白组和模型组小鼠灌胃水，其余各组小鼠灌胃相应药物，灌胃体积均为20 mL/kg，每天1次，连续10周。末次灌胃后，检测小鼠血清中丙氨酸转氨酶（ALT）和天冬氨酸转氨酶（AST）的水平；观察小鼠肝组织病理学变化；检测小鼠肝组织中Ⅰ型胶原蛋白（COL-Ⅰ）、COL-Ⅲ、转化生长因子β_1（TGF-β_1）水平；检测小鼠肝组织中α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、TGF-β_1、Smad2、Smad4、Smad7蛋白的表达水平；检测小鼠肝组织中TGF-β_1、Smad2、Smad4、Smad7 mRNA的表达水平。结果：与空白组比较，模型组小鼠血清中ALT、AST水平，肝组织中COL-Ⅰ、COL-Ⅲ、TGF-β_1水平以及α-SMA、TGF-β_1、Smad2、Smad4的蛋白表达水平和TGF-β_1、Smad2、Smad4的mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），肝组织中Smad7的mRNA及其蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$）；肝组织损伤及胶原纤维增生较明显。与模型组比较，阳性对照组和拳卷地钱总黄酮高剂量组小鼠上述指标均显著逆转（$P<0.05$或$P<0.01$）；拳卷地钱总黄酮中剂量组小鼠血清中ALT水平，肝组织中COL-Ⅰ水平和TGF-β_1、Smad2、Smad4的mRNA及其蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；拳卷地钱总黄酮低剂量组小鼠肝组织中Smad2、Smad4蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$）；各给药组小鼠肝组织的损伤及纤维化程度均有所减轻。结论：拳卷地钱总黄酮具有抗小鼠肝纤维化的作用，其作用机制可能与调节TGF-β/Smad信号通路中TGF-β_1、Smad2、Smad4、Smad7的mRNA及其蛋白的表达相关。

关键词　拳卷地钱；总黄酮；肝纤维化；TGF-β/Smad信号通路；小鼠

Study on the Effect and Mechanism of Total Flavonoids from *Marchantia convoluta* on the Anti-hepatic Fibrosis in Mice

LIANG Shuang[1,2], ZHU Hua[1,2], HUANG Jianjun[1,2], ZHANG Wentao[2], LU Senhua[3], CHEN Shiman[2] (1. School of Ethnology and Sociology, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China; 2. College of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China; 3. Food Laboratory, Yulin Center for Food and Drug Control, Guangxi Yulin 537000, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To study the effect and potential mechanism of the total flavonoids from *Marchantia convoluta* on anti-hepatic fibrosis in the mice. METHODS: Seventy-two mice were randomly divided into blank group, model group, positive control group (colchicine 0.2 mg/kg) and *M. convoluta* total flavonoids high-dose, medium-dose and low-dose groups (300, 150, 75 mg/kg), with 12 mice in eac group. Except for blank group, other groups were subcutaneously given 25% CCl_4-peanut oil solution on the back to induce liver fibrosis model. At the same time, blank group and model group were given water intragastrically, while other groups were given relevant medicine intragastrically 20 mL/kg, once a day, for consecutive 10 weeks. After last administration, the serum levels of ALT and AST were detected. Histopathological changes of liver tissue in mice was observed. The levels of COL-Ⅰ, COL-Ⅲ and TGF-β_1 in liver tissue were detected. The protein expression levels of α-SMA and TGF-β_1, Smad2, Smad4 and Smad7 in liver tissue were detected. The expression levels of TGF-β_1, Smad2, Smad4 and Smad7 mRNA in liver tissue were detected. RESULTS: Compared with blank group, the serum levels of ALT and AST in model group, the levels of COL-Ⅰ, COL-Ⅲ and TGF-β_1 in liver tissue, protein expression levels of α-SMA, TGF-β_1, Smad2 and Smad4, mRNA expression levels of TGF-β_1, Smad2 and Smad4 were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$).

Δ 基金项目：广西高校中青年教师基础能力提升项目（No. 2018KY0303）

＊高级实验师，博士研究生。研究方向：中药、民族药化学成分及药效物质基础。E-mail：1160666186@qq.com

＃通信作者：高级实验师，博士研究生。研究方向：中药、民族药的开发。电话：0771-3922715。E-mail：hjj198110@163.com

The mRNA and protein expression levels of Smad7 in liver tissue were decreased significantly ($P<0.05$). The degree of liver tissue injury and collagen fiber hyperplasia were serious. Compared with model group, above indexes of mice were reversed significantly in positive control group and *M. convoluta* total flavonoids high-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Serum level of ALT, the levels of COL-Ⅰ, mRNA and protein expression of TGF-β_1, Smad2 and Smad4 in liver tissue were decreased significantly in *M. convoluta* total flavonoids medium-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Protein expression of Smad2 and Smad4 in liver tissue were decreased significantly in *M. convoluta* total flavonoids low-dose group ($P<0.05$). The liver injury and fibrosis of mice were relieved in administration groups. CONCLUSIONS: *M. convoluta* total flavonoids possess the effect of anti-hepatic fibrosis, the mechanism of which is related to the regulation of mRNA and protein expression of TGF-β_1, Smad2, Smad4 and Smad7 in the signaling pathway of TGF-β/Smad.

KEYWORDS *Marchantia convoluta*; Total flavonoids; Hepatic fibrosis; TGF-β/Smad signaling pathway; Mice

肝纤维是多种慢性肝脏疾病所伴随的一种病理改变。在慢性肝脏疾病的发生发展过程中，若肝细胞外基质蛋白（ECM）过度沉积便会造成肝纤维化，并同时伴有炎症反应[1]。若肝纤维化得不到有效控制，便会发展成肝硬化[2-3]。肝纤维化的发展过程涉及多条细胞信号通路，其中转化生长因子β（TGF-β）/Smad通路是最主要的信号通路之一[4]，阻断或调控该信号通路的传导已成为防治肝纤维化药物研究的热点。

拳卷地钱*Marchantia convoluta* Gao et Chang.为广西常见中草药，民间多用于治疗烫伤、骨折、体癣、疮病不敛及黄疸型肝炎[5]。拳卷地钱中的主要活性成分为黄酮类化合物[6]。相关研究表明，拳卷地钱总黄酮具有体外抗乙型肝炎病毒以及保护四氯化碳所致大鼠急性肝损伤等药理活性[7-8]。本课题组前期预实验发现，拳卷地钱总黄酮可抑制大鼠肝星状细胞（HSC）的增殖，提示其可能具有抗肝纤维化作用。鉴于此，本研究拟以肝纤维化小鼠为动物模型，以秋水仙碱为阳性对照药物（秋水仙碱主要是通过抑制HSC的活化、增殖而起到有效的抗肝纤维化作用[9]，为肝纤维化模型实验中常用阳性对照药[10-11]），研究拳卷地钱总黄酮的抗肝纤维化作用，并从TGF-β/Smad信号通路角度探讨其抗肝纤维化的可能作用机制，为进一步开发拳卷地钱的药用价值提供药理学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

Infinite M200pro型连续波长酶标仪购自瑞士Tecan公司；DMIRB型倒置显微镜购自日本Leica公司；SST16型离心机、Shandon Histocentre 3型组织包埋机均购自美国Thermo Fisher Scientific公司；TGL-20M型低温高速离心机购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；Tgrodient型梯度聚合酶链式反应（PCR）仪、GAS7300B型凝胶成像仪均购自美国Bio-Rad公司。

1.2 主要药品与试剂

拳卷地钱药材于2019年10月采自广西壮族自治区上林县，经广西中医药大学壮医药学院韦松基教授鉴定为地钱科植物拳卷地钱*M. convoluta* Gao et Chang.的幼嫩叶；秋水仙碱原料药（批号505A0361，纯度98%）购自北京索莱宝科技有限公司；柱层析硅胶（粒径200～300目）购自青岛海洋化工有限公司；丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）试剂盒（批号均为20190219）均购自南京建成生物科技有限公司；Ⅰ型胶原蛋白（COL-Ⅰ）、COL-Ⅲ、TGF-β_1酶联免疫吸附检测（ELISA）试剂盒（批号均为201901）均购自武汉华联科生物技术有限公司；TGF-β_1、Smad2、Smad4、Smad7、α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）的兔单克隆抗体（批号分别为EPR21143、EP567Y、EP618Y、ab216428、GR212262-3）均购自美国Abcam公司；总RNA提取试剂盒（批号04015）、cDNA第一链合成试剂盒（批号03529）均购自天根生化科技（北京）有限公司；其余试剂均为分析纯或实验室常用规格，水为超纯水。PCR引物由生工生物（上海）股份有限公司设计并合成。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级KM小鼠72只，体质量18～22 g，雌雄兼用，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物生产许可证号为SCXK（湘）2016-0002。小鼠购入后先在广西中医药大学动物实验中心适应性饲养3 d，然后再进行正式实验。本实验动物方案已获得广西中医药大学实验动物伦理委员会批准。

2 方法

2.1 拳卷地钱总黄酮的制备

取拳卷地钱药材干燥品200 g，加入80%乙醇1 000 mL，在74 ℃下加热回流提取2 h，重复提取3次；合并3次提取液，减压蒸馏回收乙醇（蒸至约400 mL），待用。取浓缩后提取液50 mL，依次用等体积石油醚、乙酸乙酯萃取3次；合并乙酸乙酯萃取液并拌入硅胶，干法装柱，然后用70%甲醇500 mL进行洗脱；收集洗脱液，减压蒸馏回收甲醇，即得拳卷地钱总黄酮干燥品，其纯度为96.15%。经高效液相色谱法测定，拳卷地钱总黄酮干燥

品中有效成分芹菜素的含量为0.782 1 mg/g。

2.2 分组、造模与给药

将72只KM小鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组（秋水仙碱0.2 mg/kg，按人临床使用剂量的等效剂量设定）和卷拳地钱总黄酮高、中、低剂量组（300、150、75 mg/kg，剂量参考文献[8]及前期预实验结果设定），每组12只。空白组小鼠在背部皮下注射花生油，其余各组小鼠均于背部皮下注射25%四氯化碳-花生油溶液以复制肝纤维化模型，注射体积均为2 mL/kg，每3天注射1次，连续10周[12]。在造模的同时，空白组和模型组小鼠灌胃水，其余各给药组小鼠灌胃相应药物（均以水溶解），灌胃体积均为20 mL/kg，每天1次，连续10周。

2.3 样本取材及处理

实验结束前1天，小鼠禁食不禁水12 h。末次灌胃1 h后，摘小鼠眼球取血，将血液在4 ℃静置2 h后，以3 000 r/min离心10 min，取上层血清，置于－80 ℃冰箱中保存，备用。将小鼠处死，取出其肝组织，分批剪取适量组织装入冻存管并迅速浸入液氮中，然后放入－80 ℃冰箱中保存，备用；另取一部分肝脏左叶浸入4%多聚甲醛溶液中固定，备用。

2.4 血清中ALT、AST水平测定

取冻存的血清，常温解冻后，采用微板法测定各组小鼠血清中ALT、AST水平，具体操作按照相应试剂盒说明书方法进行。

2.5 肝组织病理学观察

取4%多聚甲醛溶液中固定的肝组织，常规制备石蜡切片后（厚度为5 μm），分别进行常规苏木精-伊红（HE）染色和Masson染色，然后在倒置显微镜下观察各组小鼠肝组织的病理学改变情况。

2.6 肝组织中COL-Ⅰ、COL-Ⅲ、TGF-β_1水平测定

取冻存的肝组织，室温解冻后，称取1 g组织剪碎，然后在冰水浴中研磨制成10%组织匀浆液；将匀浆液以2 500 r/min离心10 min，收集上清液，采用ELISA法检测各组小鼠肝组织上清液中COL-Ⅰ、COL-Ⅲ、TGF-β_1水平，具体操作按照相应试剂盒说明书方法进行。

2.7 肝组织中α-SMA蛋白及TGF-β/Smad信号通路相关蛋白表达水平的测定

采用免疫组织化学法（ICH）进行测定。取4%多聚甲醛溶液中固定的肝组织，常规制作石蜡切片（厚度为5 μm）并进行脱蜡、H_2O_2灭活后，室温孵育20 min。将切片置于微波炉中进行抗原修复10 min，取出，以5%牛血清封闭，然后分别加入α-SMA、TGF-β_1、Smad2、Smad4、Smad7的兔单克隆抗体（稀释比例均为1∶100），4 ℃孵育过夜；然后用磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗3次、每次5 min，每张切片滴加即用型MaxVison™试剂50 μL，室温孵育10 min；再将切片经二氨基联苯胺（DBA）显色、梯度乙醇脱水干燥、二甲苯透明、中性树胶封固后，置于显微镜下观察（组织切片中目标蛋白阳性表达处呈黄褐色）。每张切片随机选取5个视野进行拍照，采用Image J2×（2.1.4.7版）软件进行扫描，分析5个视野下图片的光密度值，并计算其平均光密度作为目标蛋白的表达水平，其值越大表明蛋白的表达水平越高。各组均选择8个组织样本进行测定，最后以各目标蛋白表达水平的平均值进行统计学分析。

2.8 肝组织中TGF-β/Smad信号通路相关基因mRNA表达水平的测定

采用逆转录（RT）-PCR法进行测定。称取冻存肝组织约15 mg，采用Trizol法提取细胞中总RNA；在验证RNA的浓度及纯度后，按照cDNA第一链合成试剂盒方法合成cDNA。然后以cDNA为模板，采用两步法进行PCR扩增。扩增条件为：95 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，然后以72 ℃延伸10 min，共30个循环。反应体系总体积为20 μL。取5 μL PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳（电压为100 V，电泳时间为45 min）后，用凝胶成像系统拍照。以Image J2×（2.1.4.7版）软件测定条带灰度值，以目的基因条带灰度值与内参基因*GAPDH*条带灰度值的百分比值表示目的基因的mRNA表达水平。各组均选择3个组织样本进行测定。RT-PCR引物序列及产物长度见表1。

表1 RT-PCR引物序列及产物长度

Tab 1 Primer sequence and product length for RT-PCR

基因	引物序列	产物长度，bp
TGF-β_1	上游：5′-CATCCGTGGCCAGATCCTGT-3′	487
	下游：5′-TTGGTTCAGCCACTGCCGTA-3′	
Smad2	上游：5′-GCTCTCCGGCTGAACTGTCT-3′	377
	下游：5′-GTGCCAGCCGTATCTCTGGT-3′	
Smad4	上游：5′-TGCATGCCGAGGAGAGTCAG-3′	541
	下游：5′-ACAGTGAAGCAGCAGGCAGA-3′	
Smad7	上游：5′-TGCGAGGAGGTGGTGTGTTT-3′	379
	下游：5′-CCTACAGTGGCTCCCGAGTG-3′	
GAPDH	上游：5′-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3′	496
	下游：5′-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3′	

2.9 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。数据均以$\bar{x} \pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 小鼠血清中ALT、AST水平测定结果

与空白组比较，模型组小鼠血清中ALT、AST水平均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，阳性对照组和卷拳地钱总黄酮高剂量组小鼠血清中ALT、AST水平以及卷拳地钱总黄酮中剂量组小鼠血清中ALT水平均显著

降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。各组小鼠血清中ALT、AST水平测定结果见表2。

表2　各组小鼠血清中ALT、AST水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=12$，U/L）

Tab 2　Serum levels of ALT and AST of mice in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=12$，U/L）

组别	ALT	AST
空白组	31.38±13.89	29.93±9.76
模型组	285.10±89.72**	178.79±60.34**
阳性对照组	60.90±34.53##	61.14±39.43##
卷拳地钱总黄酮高剂量组	102.42±53.00##	120.86±53.54#
卷拳地钱总黄酮中剂量组	166.40±79.69#	142.05±29.79
卷拳地钱总黄酮低剂量组	226.11±85.44	167.54±75.91

注：与空白组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$

Note：vs. blank group，**$P<0.01$；vs. model group，#$P<0.05$，##$P<0.01$

3.2　小鼠肝组织病理学观察结果

3.2.1　HE染色结果　空白组小鼠肝细胞与肝血窦结构完整、大小均一，细胞核清晰可见。模型组小鼠肝细胞大小不一，细胞质疏松化或呈颗粒状，部分细胞核位置偏移或消失，细胞内有大小不一的空泡；肝血窦中有红细胞，肝组织中有炎症因子大量浸润，并伴有细胞水样变性、气球样变性及脂肪变性。阳性对照组和卷拳地钱总黄酮各剂量组小鼠肝组织中炎症因子浸润以及细胞水样变性、气球样变性和脂肪变性等情况均明显轻于模型组。各组小鼠肝组织HE染色的显微图见图1。

3.2.2　Masson染色结果　空白组小鼠肝组织切片中细胞结构完整，未见明显的胶原纤维形成。模型组小鼠肝组织切片中汇管区和中央静脉均明显可见增生的胶原纤维，并有纤维架桥形成。阳性对照组和拳卷地钱总黄酮各剂量组小鼠的肝组织中虽也有一定量的胶原纤维形成，但纤维化程度均较模型组轻。各组小鼠肝组织Masson染色的显微图见图2。

3.3　小鼠肝组织中COL-Ⅰ、COL-Ⅲ、TGF-β_1水平测定结果

与空白组比较，模型组小鼠肝组织中COL-Ⅰ、COL-Ⅲ、TGF-β_1水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）；与模型组比较，阳性对照组和卷拳地钱总黄酮高剂量组小鼠肝组织中COL-Ⅰ、COL-Ⅲ、TGF-β_1水平以及卷拳地钱总黄酮中剂量组小鼠肝组织中COL-Ⅰ水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。各组小鼠肝组织中COL-Ⅰ、COL-Ⅲ、TGF-β_1水平测定结果见表3。

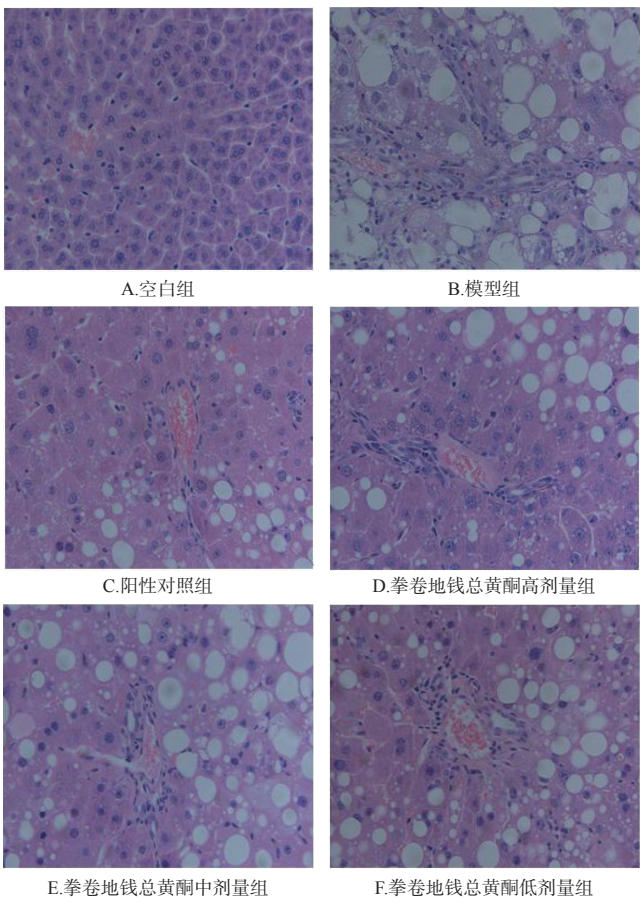


图1　各组小鼠肝组织HE染色的显微图（×400）

Fig 1　HE staining micrograph of liver tissue of mice in each group（×400）

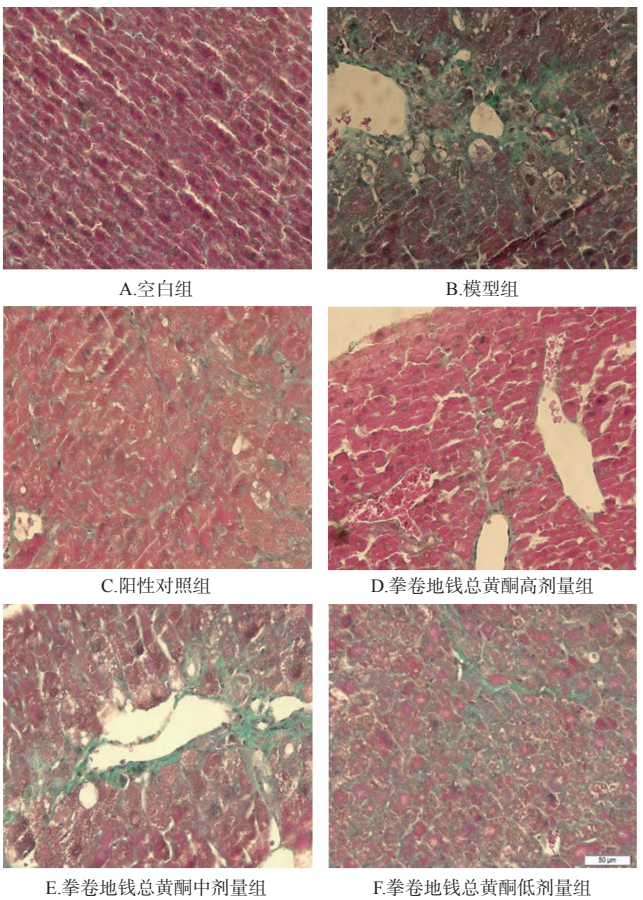


图2　各组小鼠肝组织Masson染色的显微图（×400）

Fig 2　Masson staining micrograph of liver tissue of mice in each group（×400）

表3　各组小鼠肝组织中COL-Ⅰ、COL-Ⅲ、TGF-β_1水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

Tab 3　Levels of COL-Ⅰ，COL-Ⅲ and TGF-β_1 in liver tissue of mice in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	COL-Ⅰ，ng/mL	COL-Ⅲ，ng/mL	TGF-β_1，pg/mL
空白组	8.01±1.15	6.32±0.82	184.48±29.77
模型组	9.76±1.26**	7.33±1.13*	229.70±37.03**
阳性对照组	8.13±1.00##	6.38±0.74#	191.57±28.05##
卷拳地钱总黄酮高剂量组	8.28±1.05##	6.32±0.90#	198.78±29.50#
卷拳地钱总黄酮中剂量组	8.69±1.78#	6.46±1.05	206.68±41.89
卷拳地钱总黄酮低剂量组	9.21±1.77	7.10±0.88	213.90±36.81

注：与空白组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$

Note：vs. blank group，*$P<0.05$，**$P<0.01$；vs. model group，#$P<0.05$，##$P<0.01$

3.4　小鼠肝组织中α-SMA蛋白及TGF-β/Smad信号通路相关蛋白表达水平测定结果

与空白组比较，模型组小鼠肝组织中α-SMA、TGF-β_1、Smad2、Smad4蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$），Smad7蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照组和卷拳地钱总黄酮高剂量组小鼠肝组织中α-SMA、TGF-β_1、Smad2、Smad4蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），Smad7蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；卷拳地钱总黄酮中剂量组小鼠肝组织中TGF-β_1、Smad2、Smad4蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；卷拳地钱总黄酮低剂量组小鼠肝组织中Smad2、Smad4蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。各组小鼠肝组织中α-SMA蛋白及TGF-β/Smad信号通路相关蛋白表达的显微图见图3～图7，蛋白表达水平测定结果见表4。

3.5　小鼠肝组织中TGF-β/Smad信号通路中相关基因mRNA表达水平测定结果

与空白组比较，模型组小鼠肝组织中TGF-β_1、Smad2、Smad4 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.01$），Smad7 mRNA表达水平显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，阳性对照组和卷拳地钱总黄酮高剂量组小鼠肝组织中TGF-β_1、Smad2、Smad4 mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），Smad7 mRNA表达水平均显著

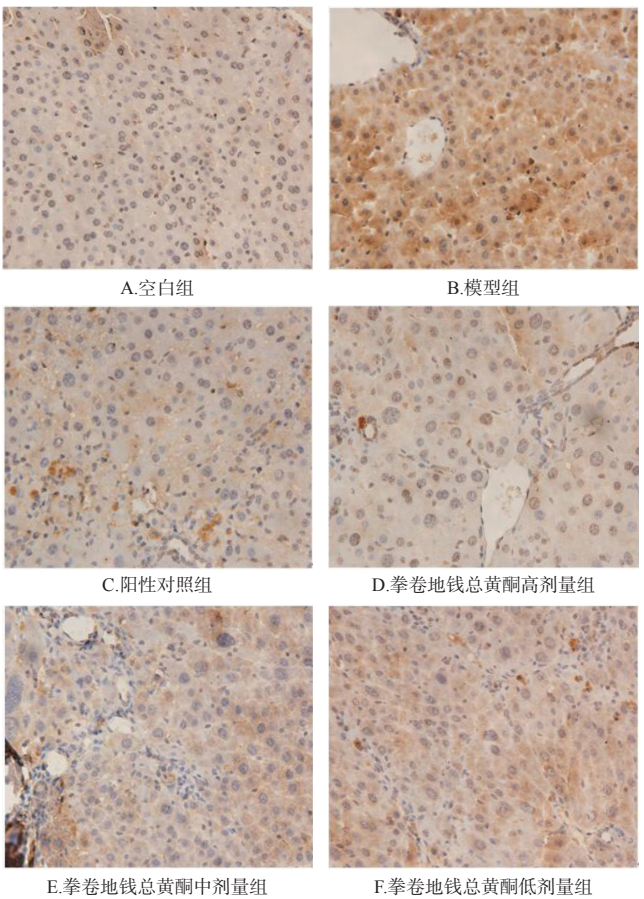


图3　各组小鼠肝组织中α-SMA蛋白表达的显微图（ICH染色，×400）

Fig 3　Micrograph of protein expression of α-SMA in liver tissue of mice in each group（ICH staining，×400）

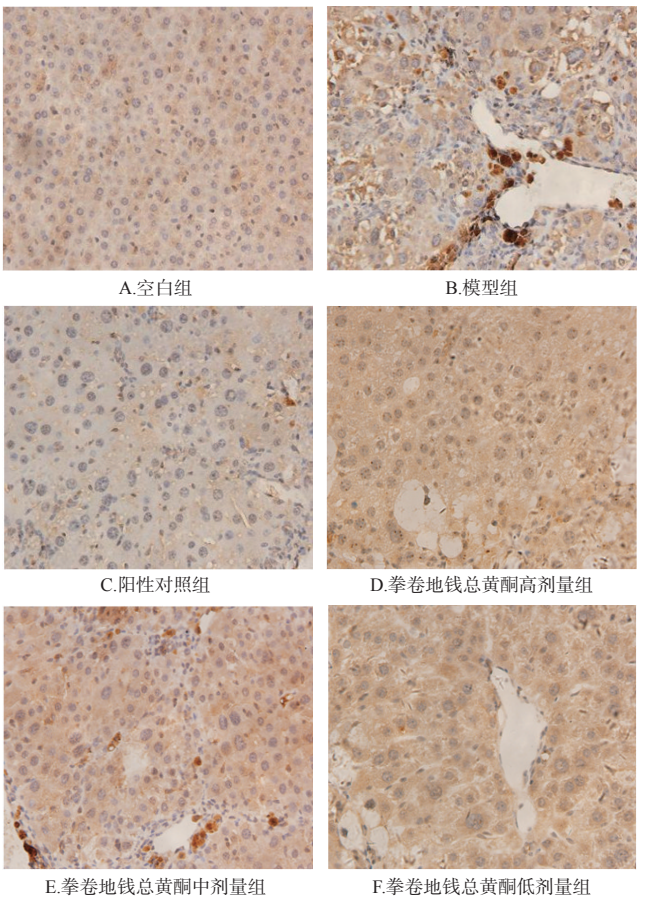


图4　各组小鼠肝组织中TGF-β_1蛋白表达的显微图（ICH染色，×400）

Fig 4　Micrograph of protein expression of TGF-β_1 in liver tissue of mice in each group（ICH staining，×400）

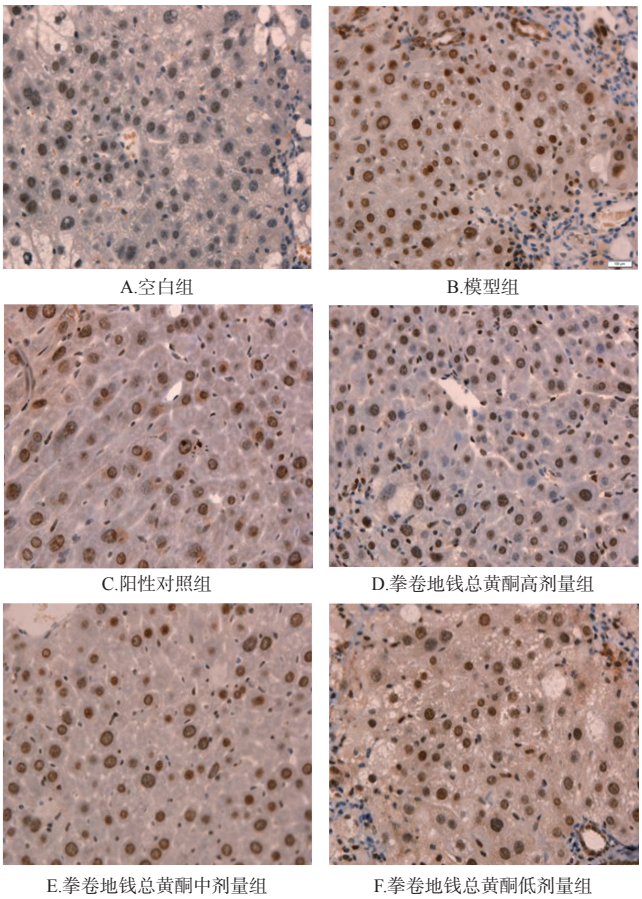


图5　各组小鼠肝组织中Smad2蛋白表达的显微图（ICH染色，×400）

Fig 5　Micrograph of protein expression of Smad2 in liver tissue of mice in each group (ICH staining, ×400)

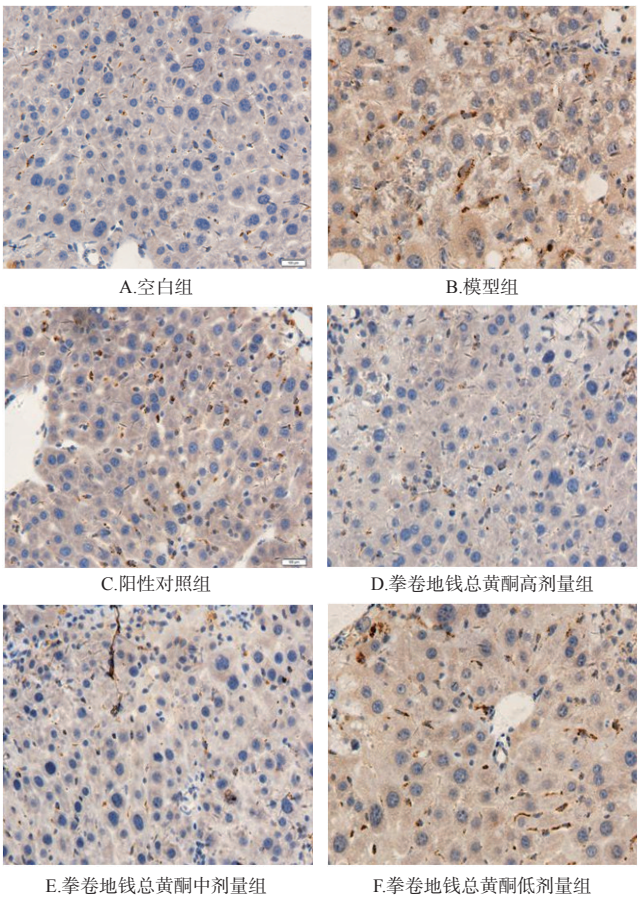


图6　各组小鼠肝组织中Smad4蛋白表达的显微图（ICH染色，×400）

Fig 6　Micrograph of protein expression of Smad4 in liver tissue of mice in each group (ICH staining, ×400)

升高（$P<0.05$）；卷拳地钱总黄酮中剂量组小鼠肝组织中TGF-β_1、Smad2、Smad4 mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。各组小鼠肝组织中TGF-β/Smad信号通路相关基因mRNA表达的电泳图见图8，mRNA表达水平测定结果见表5。

4　讨论

AST、ALT主要由肝细胞合成和分泌，当肝细胞由于各种原因受到损伤或死亡时，AST、ALT将从肝细胞中直接释放进入血液，导致血液中AST、ALT水平升高[13]。因此，血清中AST、ALT水平是直接反映肝细胞损伤最敏感的指标，其含量与肝脏损伤程度呈正相关[14]。本研究结果显示，不同剂量卷拳地钱总黄酮组小鼠血清中AST、ALT水平均不同程度地降低，提示其对小鼠肝损伤具有一定的改善作用。

当受损伤的肝脏被刺激后引起的HSC活化是肝纤维化形成的主要原因[15]。HSC活化后会转化成肌成纤维样细胞（MFC），继而产生大量的ECM，引起ECM过度沉积，最终导致肝纤维化[15]。ECM中的主要成分为COL，此外还包括糖蛋白、蛋白聚糖和糖胺多糖等[16]。在肝组织中COL含量较高的有5个亚型，其中又以Ⅰ、Ⅲ型的含量最高[17]。同时，活化后的HSC还会大量表达α-SMA。在正常情况下，α-SMA仅在血管壁表达；当发生肝纤维化时，α-SMA的表达量会明显增加，在假小叶及纤维纵隔内均有大量表达[18]。因此，α-SMA的过表达被认为是HSC活化的标志[19]。本研究结果显示，不同剂量拳卷地钱总黄酮组小鼠肝组织中COL-Ⅰ、COL-Ⅲ水平及α-SMA的蛋白表达水平与模型组比较均不同程度地降低，表明拳卷地钱总黄酮能有效抑制肝纤维的形成。

TGF-β超家族是一类比较重要的细胞因子，负责调控细胞的生长、凋亡、分化以及ECM合成与沉积、胚胎发生、组织修复、炎症反应及纤维化等，具有广泛的生物学活性[20]。在肝纤维化过程中，TGF-β超家族中TGF-β_1的含量会明显升高[21]。TGF-β受体（TβR）包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型，其中Ⅰ型TGF-β受体（TβR-Ⅰ）与Ⅱ型TGF-β受体（TβR-Ⅱ）会形成异源二聚体，TGF-β_1与该异源二聚体的亲和力最高，当两者结合后，TβR-Ⅰ近膜区的GS结构域

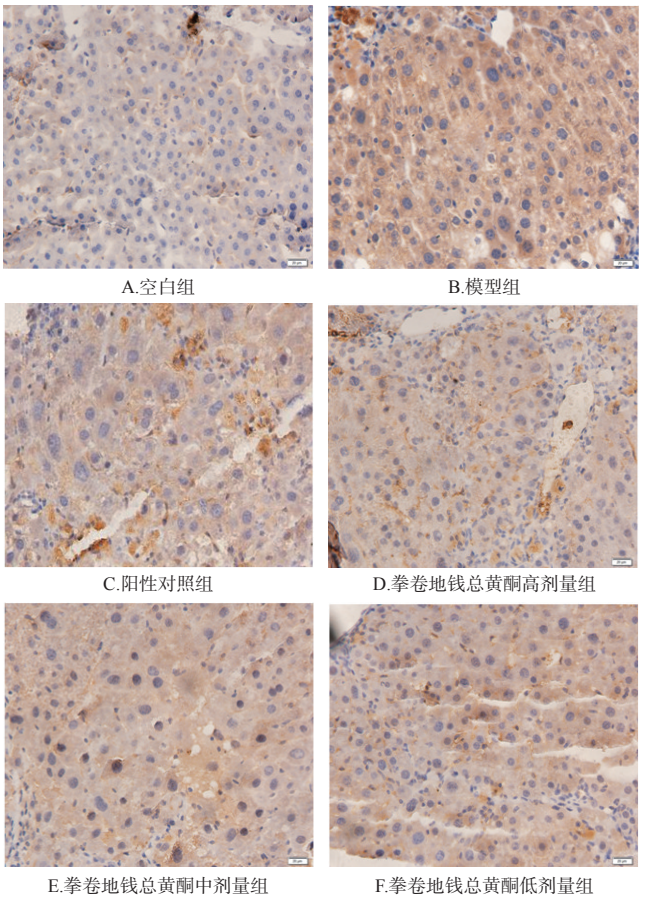


图7　各组小鼠肝组织中Smad7蛋白表达的显微图（ICH染色，×400）

Fig 7　Micrograph of protein expression of Smad 7 in liver tissue of mice in each group (ICH staining, ×400)

表4　各组小鼠肝组织中α-SMA及TGF-β/Smad信号通路相关蛋白表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 4　Protein expression of α-SMA and TGF-β/Smad signaling related protein in liver tissue of mice in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	α-SMA	TGF-β_1	Smad2	Smad4	Smad7
空白组	0.051±0.006	0.081±0.009	0.098±0.007	0.060±0.013	0.114±0.012
模型组	0.077±0.012**	0.097±0.010**	0.117±0.015**	0.095±0.014**	0.099±0.011*
阳性对照组	0.063±0.008#	0.087±0.005#	0.102±0.008#	0.069±0.011##	0.112±0.013#
卷拳地钱总黄酮高剂量组	0.065±0.007#	0.084±0.007#	0.099±0.010#	0.070±0.010##	0.110±0.009#
卷拳地钱总黄酮中剂量组	0.066±0.009	0.086±0.004#	0.101±0.011#	0.074±0.012##	0.105±0.013
卷拳地钱总黄酮低剂量组	0.069±0.008	0.088±0.010	0.100±0.013#	0.080±0.015#	0.107±0.014

注：与空白组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$

Note：vs. blank group，*$P<0.05$，**$P<0.01$；vs. model group，#$P<0.05$，##$P<0.01$

发生磷酸化而被激活[22]。Smad蛋白家族是TGF-β_1下游的胞内信号分子，分为受体调节型、通用型和抑制型3类。当TβR-Ⅰ活化后，受体调节型Smad（Smad2、Smad3）分子上的丝氨酸残基被磷酸化，再与通用型Smad（Smad4）结合，然后进入细胞核并调节与肝纤维化

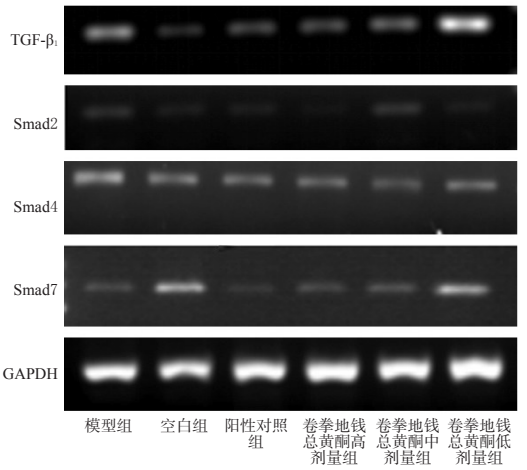


图8　各组小鼠肝组织中TGF-β/Smad信号通路相关基因mRNA表达的电泳图

Fig 8　Electrophoretograms of mRNA expression of TGF-β/Smad signaling related gene in liver tissue of mice in each group

表5　各组小鼠肝组织中TGF-β/Smad信号通路相关基因mRNA表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

Tab 5　mRNA expression of TGF-β/Smad signaling related gene in liver tissue of mice in each group（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

组别	TGF-β_1/GAPDH	Smad2/GAPDH	Smad4/GAPDH	Smad7/GAPDH
空白组	10.7±7.2	31.7±8.7	33.7±4.5	30.3±4.7
模型组	53.3±14.2*	76.3±12.2**	65.7±7.0**	17.7±5.5*
阳性对照组	22.7±9.6#	37.7±6.0#	38.0±14.0#	40.7±8.1#
卷拳地钱总黄酮高剂量组	21.0±11.5#	24.7±10.7##	40.7±8.0##	40.7±7.5#
卷拳地钱总黄酮中剂量组	23.0±7.9#	29.0±8.5##	45.3±10.1#	37.3±18.3
卷拳地钱总黄酮低剂量组	31.3±8.3	51.3±29.2	50.7±7.5	33.3±9.3

注：与空白组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$

Note：vs. blank group，*$P<0.05$，**$P<0.01$；vs. model group，#$P<0.05$，##$P<0.01$

相关的靶基因的转录[23]。抑制型Smad（Smad7）与受体调节型Smad的结构相似，其可与受体型蛋白竞争性地结合TGF-β_1受体，阻止受体调节型Smad的磷酸化，从而阻断其进入细胞核内及进行信号转导，最终起到抑制肝纤维化的作用[24-25]。本研究结果显示，不同剂量拳卷地钱总黄酮组小鼠肝组织中TGF-β_1、Smad2、Smad4的mRNA及其蛋白表达水平均不同程度地降低，Smad7的mRNA及其蛋白表达水平均不同程度地升高，表明拳卷地钱总黄酮抗纤维化作用机制与调节TGF-β/Smad信号通路相关mRNA及其蛋白的表达有关。

综上所述，本研究证实了卷拳地钱总黄酮对肝纤维化具有一定的改善作用，并初步证实了该作用可能与调节TGF-β/Smad信号通路中TGF-β_1、Smad2、Smad4、Smad7的mRNA及其蛋白的表达相关，但其更多的作用机制有待进一步研究。

参考文献

[1] 谢爱泽，吕超，石清兰，等.中医药防治肝纤维化机制的研究进展[J].中国医药导报，2020，17(17)：34-37.

[2] 徐列明，刘平，沈锡中，等.肝纤维化中西医结合诊疗指南：2019版[J].中国中西医结合杂志，2019，39(11)：1286-1295.

[3] VILLESEN I F，DANIELS S J，LEEMING D J，et al. Review article：the signalling and functional role of the extracellular matrix in the development of liver fibrosis[J]. Aliment Pharmacol Ther，2020，52(1)：85-97.

[4] 李倩，闫曙光，惠毅，等.柔木丹改善小鼠肝纤维化的TGF-β_1/Smad4信号通路机制[J].中国应用生理学杂志，2020，36(6)：576-581.

[5] 国家中医药管理局《中华本草》编写组.中华本草：下册[M].上海：上海科学技术出版社，1998：324-325.

[6] 朱华，肖建波，周春山，等.地钱总黄酮提取的研究[J].林产化学与工业，2004，24(2)：69-72.

[7] 朱华，梁东艳，笪舫芳.拳卷地钱总黄酮提取物抗乙型肝炎病毒体外实验研究[J]. 大众科技，2013，15 (4)：110-111.

[8] 王跃峰，张可锋，周雨晴，等.拳卷地钱总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤大鼠的保护作用及其作用机制[J].时珍国医国药，2017，28 (2)：277-279.

[9] 吕霞，舒建昌，何雅军，等.秋水仙碱抑制肝星状细胞活化与抗肝纤维化的作用[J].广东医学，2006，27(12)：1796-1798.

[10] 黄古叶，龙富立，毛德文，等.健肝颗粒对大鼠肝纤维化脂质过氧化物生成的影响[J].中华中医药学刊，2012，30(10)：2232-2234.

[11] 邵志祥，汤伟.抗纤胶囊对实验性大鼠肝纤维化的治疗作用[J].中国实验方剂学杂志，2012，18(11)：212-215.

[12] 张文涛，吴先昊，梁冰洁，等.藤茶总黄酮调控TGF-β_1/Smad信号通路抗肝纤维化机制的研究[J].重庆医学，2019，48 (9)：1493-1499.

[13] 李飞，陆伦根.肝功能异常的评估及临床意义[J].临床肝胆病杂志，2015，31(9)：1543-1546.

[14] 蔚晓晖.肝功能相关指标在中药肝毒性损伤中作用与毒性相关程度分析[J].中医临床研究，2019，11(13)：10-12.

[15] 左雁，陈文玲，胡严匀，等.细胞自噬、肝星状细胞活化与肝纤维化的关系[J].山西中医学院学报，2016，17(6)：68-70.

[16] 孔德松，张自力，雷娜，等.姜黄素对血小板衍生生长因子诱导活化的肝星状细胞细胞外基质的影响[J].中草药，2013，44(1)：70-75.

[17] 王乾宇，王文佳，奚锦，等.杜仲多糖对肝纤维化模型大鼠Ⅰ，Ⅲ型胶原蛋白，MMP-1，TIMP-1及TGF-β_1 mRNA表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24(23)：153-158.

[18] 谭雅超，李亮，李智德，等.泡球蚴感染小鼠肝脏α-SMA和Ⅰ型胶原的表达及其意义[J].中国病原生物学杂志，2020，15(11)：1324-1327.

[19] 彭婕，李弼民，雷宇鹏.四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠肝组织和HSC-T6细胞NOX4基因及其蛋白表达的变化[J].实用肝脏病杂志，2021，24(3)：319-322.

[20] 付玲珠，郑婷，张永生. TGF-β/Smad信号转导通路与肝纤维化研究进展[J].中国临床药理学与治疗学，2014，19(10)：1189-1195.

[21] 李园园，苏峰，王艳，等. b-FGF、TGF-β_1、microRNA-34a与慢性乙型肝炎肝纤维化程度的相关性[J].分子诊断与治疗杂志，2021，13 (6)：1002-1005.

[22] 孙大业，崔素娟，孙颖.细胞信号转导：基础篇[M]. 4版.北京：科学出版社，2010：245-248.

[23] HELDIN C H，MOUSTAKA S A. Signaling receptors for TGF-β family members[J]. C S H Perspect Biol，2016，8(8)：22-53.

[24] MACIAS M J，MARTIN-MALPARTIDA P，MASSAGUE J，et al. Structural determinants of Smad function in TGF-β signaling[J]. Trends Biochem Sci，2015，40(6)：296-308.

[25] MATSUZAKI K. Smad phosphoisoform signals in acute and chronic liver injury：similarities and differences between epithelial and mesenchymal cells[J]. Cell Tissue Res，2012，347(1)：225-243.

（收稿日期：2021-03-25　修回日期：2021-08-11）

（编辑：林　静）

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊，欢迎投稿、订阅