基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001221

莪术含药血清抑制大鼠 HSC 中 Gli1 和 β-catenin 表达的机制研究

冯藜枥[1]，曹文富[1]，叶　凤[2]

（1. 重庆医科大学附属第一医院中西医结合科，重庆　400016；2. 重庆市长寿区人民医院中西医结合科，重庆　401220）

【摘　要】目的：研究莪术含药血清调节瘦素活化的大鼠肝星状细胞（hepatic stellate cells，HSC）中刺猬（hedgehog，Hh）信号通路锌指转录因子-1（glioma-associated oncogene homolog-1，Gli1）和 Wnt 信号通路关键因子 β-连环蛋白（β-catenin）表达的机制。**方法**：按随机数字表法将 30 只清洁级 sprague-dawley（SD）大鼠均分 3 组，分别给予莪术水煎剂、秋水仙碱、生理盐水灌胃取血制备含药血清。经高效液相色谱法（HPLC）检测血清中莪术成分。体外培养大鼠 HSC，分为 8 组：空白组、模型组、Hh 通路抑制剂组、莪术组、Hh 通路抑制剂+莪术组、Hh 通路激动剂组、Hh 通路激动剂+莪术组、秋水仙碱组。除空白组外，其余各组均给予 100 ng/mL 瘦素诱导后，各组再给予相应药物干预 24 h，MTT 法检测 HSC 增殖情况，RT-PCR 法检测 Gli1 mRNA 和 β-catenin mRNA 表达，Western blot 及免疫荧光法检测 Gli1 和 β-catenin 蛋白表达。**结果**：与空白组比较，经瘦素活化的大鼠 HSC 中 Gli1、β-catenin 的 mRNA 和蛋白表达均明显增高（均 P=0.000）。与模型组比较，Hh 通路抑制剂、莪术含药血清分别干预及莪术含药血清与 Hh 通路抑制剂协同干预后，Gli1、β-catenin 的 mRNA 和蛋白表达均明显降低（均 P=0.000）；秋水仙碱含药血清干预后，Gli1 mRNA 和蛋白明显降低（P=0.000，P=0.007），β-catenin mRNA 和蛋白表达均明显降低（均 P=0.000）；Hh 通路激动剂干预后，Gli1、β-catenin 的 mRNA 和蛋白表达均明显增高（均 P=0.000）。与 Hh 通路激动剂组比较，用莪术含药血清干预 Hh 通路激动剂组后，Gli1、β-catenin 的 mRNA 和蛋白表达均明显降低（均 P=0.000）。**结论**：莪术含药血清可通过下调瘦素诱导活化的大鼠 HSC 中 Gli1 的表达，参与 Hh 信号通路抑制 HSC 的活化与增殖，并能通过下调 Gli1 的表达而下调 Wnt 信号通路关键因子 β-catenin 的表达，抑制 HSC 活化与增殖，从而抑制肝纤维化。

【关键词】莪术含药血清；肝星状细胞；刺猬信号通路；锌指转录因子-1；Wnt 信号通路；β-连环蛋白

【中图分类号】R285.5　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-06-09

Mechanism of Ezhu-containing serum inhibiting the expression of Gli1 and β-catenin in hepatic stellate cells

Feng Lili[1]，*Cao Wenfu*[1]，*Ye Feng*[2]

（1. Department of Integration of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University；2. Department of Integration of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine，People's Hospital of Changshou of Chongqing）

【Abstract】*Objective*：To explore the mechanism of Ezhu-containing serum inhibiting the expression of glioma-associated oncogene homolog-1（Gli1，the nuclear transcription factor of hedgehog signaling pathway）and β-catenin（the core factor of wnt signaling pathway）in hepatic stellate cells（HSC）stimulated by leptin. ***Methods***：Thirty sprague-dawley（SD）rats were randomLy divided into 3 groups（n=10），which were treated with Ezhu-decoction，colchicine and physiological saline by gavage for 10 d in order to prepare drug-containing serums. The method of high performance liquid chromatography（HPLC）was used to detect the composition of Ezhu in serum. The HSC during the exponential growth phase were divided into 8 groups：blank control group，model group，hedgehog pathway inhibitors（cyclopamine）group，ezhu group，Ezhu and cyclopamine group，hedgehog pathway agonost（pumorphamine）group，Ezhu and purmorphamine group，colchicine group. HSC were cultured *in vitro* and stimulated with 100 ng/mL leptin（except for the blank control group），then were treated separately with the corresponding drug for 24 h. After cells being collected，HSC proliferation was detected using MTT colorimetric assay；

作者介绍：冯藜枥，Email：371611972@qq.com，研究方向：中西医结合临床（肾病与内分泌代谢病、器官纤维化）。

通信作者：曹文富，Email：caowenfu9316@163.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81573860）。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1605.107.html（2017-03-13）

the expressions of Gli1 and β-catenin were determined by PT-PCR, Western blot and immunofluorescence, respectively. ***Results***: Compared with those of blank control group, the expressions of Gli1 mRNA and Gli1 proteins and β-catenin mRNA and β-catenin proteins were obviously increased after stimulating the HSC of rats by leptin (All P=0.000). Compared with those of model group, the expressions of Gli1 mRNA and Gli1 proteins and β-catenin mRNA and β-catenin proteins were decreased obviously (All P=0.000) after being interfered by Hh pathway (cyclopamine) and ezhu-containing serum. Compared with the model group, using ezhu-containing serum to interfere the Hh pathway inhibitors group can make the expression of Gli1 mRNA and Gli1 proteins and β-catenin mRNA and β-catenin proteins decreased obviously (All P=0.000). Compared with those of the model group, after being interfered by colchicines, the expressions of Gli1 mRNA and Gli1 proteins were decreased obviously (P=0.000, P=0.007), and β-catenin mRNA and β-catenin proteins were decreased obviously (All P=0.000). Compared with those of model group, the expressions of Gli1 mRNA and Gli1 proteins and β-catenin mRNA and β-catenin proteins were increased obviously (All P=0.000) after adding Hh pathway agonist (purmorphamine). Compared with those of purmorphamine group, the expressions of Gli1 mRNA and Gli1 proteins and β-catenin mRNA and β-catenin proteins decreased obviously (All P=0.000) after using ezhu-containing serum to interfere the purmorphamine group. ***Conclusion***: Ezhu-containing serum plays an important part in inhibition of HSC activation and increment by taking part in hedgehog signaling pathway to regulate the expression of Gli1. Ezhu-containing serum could inhibit the expression of β-catenin (the key factor of Wnt signaling pathway) by regulating the expression of Gli1 in leptin-induced HSC, thus inhibiting liver fibrosis.

【Key words】ezhu-containing serum; hepatic stellate cell; hedgehog signaling pathway; glioma-associated oncogene homolog-1; Wnt signaling pathway; β-catenin

肝纤维化（hepatic fibrosis, HF）是各种致病因素长期刺激肝组织后的损伤修复反应，是慢性肝病发展为肝硬化的必经阶段和共同病理途径[1]。其主要特征是肝星状细胞（hepatic stellate cells, HSC）的活化与增殖，导致细胞外基质（extracellular matrix, ECM）生成多于降解，并过度沉积。肝纤维化在进入肝硬化之前，尚可逆转。目前，抑制 HSC 的活化与增殖，诱导其凋亡是肝纤维化研究的重点[2]。刺猬（hedgehog, Hh）信号通路异常激活与肝纤维化的发生发展密切相关，Hh 信号通路可调控 HSC 的活化[3]。另有研究表明，Wnt 信号可提高 HSC 激活和生存能力，促进肝纤维化发展[4]。但 Hh 信号通路和 Wnt 信号通路在肝纤维化过程中是否存在相互关系尚不清楚。

目前西医针对肝纤维化的治疗还缺乏明确有效的化学或生物药物[5]，因此，探索有效的抗纤维化中药具有重要意义。中医认为肝血瘀阻是肝纤维化的根本病机，通过活血化瘀改善肝微循环是治疗肝纤维化的重要途径[6]。莪术作为传统的活血化瘀中药，具有行气破血、消积止痛之功，是中医临床治疗肝纤维化、肝硬化的常用中药。但目前对于莪术抗肝纤维化的基础研究报道尚少。本实验通过观察莪术含药血清对瘦素活化的大鼠 HSC 增殖及 Hh、Wnt 信号通路关键因子锌指转录因子-1（glioma-associated oncogene homolog-1, Gli1）、β-连环蛋白（β-catenin）表达的影响，探讨在活化的 HSC 中 Hh 信号通路与 Wnt 信号通路的相互关系，以及莪术抑制大鼠 HSC 活化增殖而抗肝纤维化可能的作用机制，为临床应用莪术治疗肝纤维化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 sprague-dawley（SD）大鼠 30 只，体质量 190~220 g，由重庆医科大学实验动物中心提供，动物许可证号：SYXK（渝）2012-0001。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 实验细胞 大鼠肝星状细胞由重庆医科大学附属第二医院消化科提供。

1.1.3 实验药物 莪术购自重庆医科大学附属第一医院药房（重庆慧远药业有限公司生产，批号 141201）。生理盐水购自重庆医科大学附属第一医院。秋水仙碱购自西双版纳版纳药业有限责任公司（国药准字 H53021369，货号B1420002334，纯度 0.5 mg/片）。

1.1.4 主要试剂与器材 姜黄素对照品（上海源叶，货号 R29J6S1，规格 20 mg）；莪术醇对照品（上海源叶，货号 P22D5R1，规格 20 mg）；瘦素（PeproTech 公司，货号 400-21-1000，规格 200 μg）；Hh 通路抑制剂（Cyclopamine，Selleck 公司，货号 S3042，规格 10 mg）；Hh 通路激动剂（Purmorphamine，Selleck 公司，货号 S1146，规格 5 mg）；兔抗鼠 Gli1 多克隆抗体（Santa

Cruz公司，货号 sc-20687，规格 200 μg/mL）；羊抗鼠 β-catenin 多克隆抗体（Santa Cruz 公司，货号 sc-1496，规格 200 μg/mL）；Cy3 标记山羊抗兔 IgG（碧云天生物公司，编号 A0516，规格 0.1 mL）；FITC 标记山羊抗小鼠 IgG（碧云天生物公司，编号 A0568，规格 0.1 mL）；Hypersil ODS2 色谱柱（大连伊利特，型号 E2117074，批号 10643）；岛津高效液相色谱仪（日本岛津 LC-20A）；逆转录试剂盒（TOYOBO 公司）；PCR 仪（Applied Biosy Stems）；核酸蛋白分析仪（BECKMAN DU640）；SDS-PAGE 凝胶试剂盒（碧云天生物公司）；倒置相差显微镜（型号 CXX41，Olympus）；CO_2 细胞孵箱（Thermo）；超净工作台（AIRTECH）；HH-W600 型恒温水浴锅（江苏荣华仪器制造有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 含药血清制备 莪术的临床人用剂量为 250 mg/kg，按“动物与人体的千克体质量折算系数表”成人与大鼠的折算系数为 6.25，换算成 SD 大鼠的临床剂量为 1.562 5 g/kg，以临床剂量作为低剂量，按照该剂量的 2、4 倍分别为中、高剂量，本实验选择高剂量 6.25 g/kg 为大鼠灌胃剂量。125 g莪术生药加水浸泡煎煮，浓缩定容至 200 mL，即得 625 mg/mL 莪术水煎剂灌胃。秋水仙碱用纯水溶解，灌胃剂量为 0.1 mg/kg。SPF 级 SD 大鼠随机分为 3 组（每组 10 只）：空白组、莪术组、秋水仙碱组。各组均按相应灌胃浓度分别予生理盐水、莪术水煎剂、秋水仙碱溶液灌胃，每天 1 mL/100 g 给药，1 次/d，连续 10 d，最后 1 次灌胃 2 h 后用水合氯醛麻醉，无菌条件下心脏采血。血液静置于 4 ℃冰箱过夜后离心（3 000 r/min，10 min），收集血清经水浴灭活（56 ℃，30 min），0.22 μm 滤器过滤，即为含药血清，置于-80 ℃冰箱中保存备用。

1.2.2 高效液相色谱法（HPLC）对含药血清中姜黄素、莪术醇定性检测 取含药血清 200 μL，加入 300 μL 乙腈沉淀蛋白，涡旋 1 min，离心（13 000 r/min）15 min，取上清液。色谱条件：Hypersil ODS2 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm，大连伊利特）；柱温：25 ℃，流动相：乙腈-1%乙酸水（63:37），流速：1.0 mL/min，检测波长：214 nm；进样量：20 μL。

1.2.3 细胞干预与实验分组 将生长状态良好、处于指数生长期的 HSC 分为 8 组：空白组、模型组、Hh 通路抑制剂组、莪术组、Hh 通路抑制剂+莪术组、Hh 通路激动剂组、Hh 通路激动剂+莪术组、秋水仙碱组。空白组给予含 10%空白鼠血清的 RPMI1640 培养基；模型组给予含 100 ng/mL 瘦素和 10%空白鼠血清的 RPMI1640 培养基；Hh 通路抑制剂组给予含 20 μmol/L Hh 通路抑制剂、100 ng/mL 瘦素及 10%空白鼠血清的 RPMI1640 培养基；莪术组给予含 10%莪术含药血清和 100 ng/mL 瘦素的 RPMI1640 培养基；Hh 通路抑制剂+莪术组给予含 20 μmol/L Hh 通路抑制剂、10%莪术含药血清及 100 ng/mL 瘦素的 RPMI1640 培养基；Hh 通路激动剂组给予含 1 μmol/L Hh 通路激动剂、100 ng/mL 瘦素及 10%空白鼠血清的 RPMI1640 培养基；Hh 通路激动剂+莪术组给予含 1 μmol/L Hh 通路激动剂、10%莪术含药血清及 100 ng/mL 瘦素的 RPMI1640 培养基；秋水仙碱组给予含 10%秋水仙碱含药血清和 100 ng/mL 瘦素的 RPMI1640 培养基。各组细胞经相应药物干预后，培养于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中，24 h 后收集细胞。

1.2.4 MTT 法检测 HSC 增殖活性 对数生长期的 HSC 按 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板，每孔 100 μL，分为 8 组，每组 6 个复孔。培养在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱内孵育，24 h 后弃上清，各组加入相应血清及试剂继续培养，24 h 后于各孔分别加入 0.5% MTT 溶液 20 μL，4 h 后弃上清，每孔加入 150 μL DMSO，置摇床上低速振荡 10 min，用全自动酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔吸光度（absorbance，A）值。

1.2.5 RT-PCR 检测 HSC 内 Gli1 mRNA、β-catenin mRNA 表达 HSC 按 5.0×10^5 个/mL 接种于 6 孔板，每孔 2 mL，待细胞生长至 70%~80%融合时，吸弃培养基，按分组条件加入干预因素作用 24 h 后收集细胞。提取细胞总 RNA；用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度。按 RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录反应和 PCR 反应，PCR 反条件为：94 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 30 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，32 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。反应结束后取 PCR 产物 15 μL于 1%琼脂糖凝胶上进行电泳分析。采用 Flour-S 成像仪分析软件测定 A 值。实验过程中以 GAPDH 作内参对照。Gli1 和 β-catenin 基因上下游引物序列均由上海生工生物工程有限公司合成（表 1）。

表 1 Gli1、β-catenin 与内参基因引物序列及产物大小

Tab.1 Primer sequences and product sizes

基因	引物序列	产物大小（bp）
Gli1	上游：5'-GCCCCCGCTACCACCTTG-3'	315
	下游：5'-CCAGGCAGAGACCCCAGTAAGAC-3'	
β-catenin	上游：5'-TTGCGGGAACAGGGTGCG-3'	111
	下游：5'-GCCCTCCACGAACTGCTGCT-3'	
GAPDH	上游：5'-GGTGCCGAGTACGTGGTGC-3'	782
	下游：5'-CCCAGCATCGAAGGTAGAGGT-3'	

1.2.6 Western-blot 法检测 HSC 内 Gli1、β-catenin 蛋白表达情况 HSC 接种、培养以及药物处理同 1.2.5。用蛋白裂解液裂解收集的细胞，采用 BCA 法测定蛋白浓度。分别取蛋白质样品 50 mg 上样，行 10%SDS-PAGE 电泳分离条带，转膜，封闭，TBS-T 洗膜，分别用 Gli1 抗体（1:1 000），β-catenin 抗体（1:1 000）4 ℃反应过夜，洗涤，二抗室温下孵育 1 h，洗涤，ECL 曝光显影，图片扫描保存，Quantity One 软件分析结果，以 GAPDH 表达水平作为内参照，计算 Gli1/GAPDH，β-catenin/GAPDH 值作为目标蛋白的表达量。

1.2.7 免疫荧光法检测 HSC 内 Gli1、β-catenin 蛋白表达情况 取对数生长期 HSC 接种于装有小载玻片的 6 孔板中，培养及相应组别处理同 1.2.5，制备细胞爬片。弃上清液，PBS

洗 3 min×3 次，4%多聚甲醛室温固定 15 min，PBS 洗 3 min×3 次，4 ℃、0.1% Triton-X 打孔 30 min，0.5% BSA 封闭，一抗（1:50）4 ℃孵育过夜，空白对照以 PBS 孵育过夜。PBS 洗 3 min×3 次，滴加荧光二抗，37 ℃孵育 1 h，DAPI（1:100）室温染核 10 min，荧光封片剂封片，荧光显微镜观察、拍照。摄取图片均通过 Image-ProPlus6.0 软件计算 A 值。

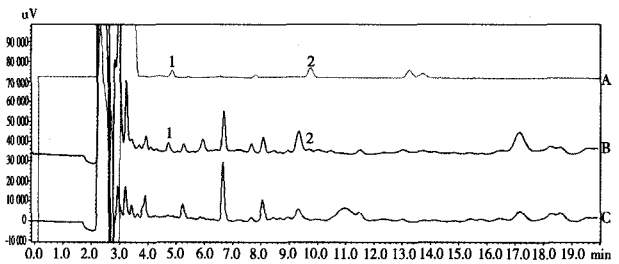
1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 19.0 统计软件分析。所有数据以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，各组样本间的比较采用单因素方差分析；组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验进行统计学分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 HPLC 定性分析结果

高效液相色谱图显示对照品姜黄素、莪术醇色谱峰保留时间分别为 4.7 min、9.7 min。莪术含药血清组色谱图在与对照品相应保留时间处出现姜黄素、莪术醇的色谱峰，空白血清组的色谱图在相同的保留时间处未出现上述色谱峰（图1）。



A. 姜黄素、莪术醇混合对照品；B. 莪术含药血清；C. 空白血清；1. 姜黄素；2. 莪术醇

图 1 姜黄素、莪术醇混合对照品、莪术含药血清及空白血清的 HPLC 图

Fig.1 HPLC chromatograms of hybrid reference substance, ezhu drug-containing serumand normal saline serum

2.2 莪术含药血清对 HSC 增殖的影响

与空白组相比，模型组 A 值明显增高（P=0.000）。与模型组相比，Hh 通路抑制剂组、莪术组、Hh 通路抑制剂+莪术组 A 值均明显降低（均 P=0.000），秋水仙碱组的 A 值明显降低（P=0.012），Hh 通路激动剂组 A 值明显增高（P=0.000）。与 Hh 通路激动剂组相比，Hh 通路激动剂+莪术组的 A 值明显降低（P=0.007），见表 2。

表 2 莪术含药血清对瘦素活化的 HSC 增殖的影响（$\bar{x} \pm s$，n=6）

Tab.2 Effects of Ezhu-containing serum on HSC proliferation stimulated by leptin（$\bar{x} \pm s$，n=6）

组别	剂量	A 值
空白	-	0.474 ± 0.043
模型	100 ng/mL	0.629 ± 0.033[a]
Hh通路抑制剂	20 μmol/L	0.533 ± 0.013[c]
莪术	6.25 g/kg	0.508 ± 0.025[c]
Hh通路抑制剂 + 莪术	20 μmol/L+6.25 g/kg	0.486 ± 0.027[c]
Hh 通路激动剂	1 μmol/L	0.714 ± 0.059[c]
Hh 通路激动剂 + 莪术	1 μmol/L+6.25 g/kg	0.657 ± 0.031[d]
秋水仙碱	0.1 mg/kg	0.576 ± 0.028[b]
F 值		37.804
P 值		0.000

注：a，与空白组比较，P<0.01；b：与模型组比较，P<0.05；c：与模型组比较，P<0.01；d：与激动剂组比较，P<0.01

2.3 莪术含药血清对大鼠 HSC 中 Gli1 mRNA、β-catenin mRNA 表达的影响

与空白组比较，模型组 Gli1 mRNA 和 β-catenin mRNA 显著增高（均 P=0.000）。与模型组比较，Hh 通路抑制剂组、莪术组、Hh 通路抑制剂+莪术组、秋水仙碱组 Gli1mRNA 和 β-catenin mRNA 明显降低（均 P=0.000），Hh 通路激动剂组 Gli1 mRNA 和 β-catenin mRNA 明显增高（均 P=0.000）。与 Hh 通路激动剂组比较，Hh 通路激动剂+莪术组 Gli1mRNA 和 β-catenin mRNA 明显降低（均 P=0.000），见表 3。

表 3 莪术含药血清对大鼠 HSC 中 Gli1 mRNA、β-catenin mRNA 表达的影响（$\bar{x} \pm s$，n=5）

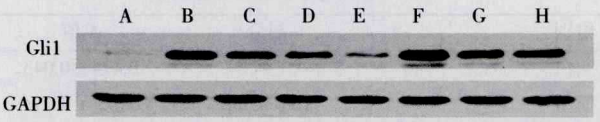
Tab.3 Effects of Ezhu-containing serum on expression of Gli1 mRNA and β-catenin mRNA in HSC（$\bar{x} \pm s$，n=5）

组别	剂量	Gli1 mRNA	β -cateninmRNA
空白	-	0.454 ± 0.010	0.351 ± 0.005
模型	100 ng/mL	0.804 ± 0.013[a]	0.669 ± 0.016[a]
Hh通路抑制剂	20 μmol/L	0.552 ± 0.019[b]	0.586 ± 0.008[b]
莪术	6.25 g/kg	0.517 ± 0.015[b]	0.472 ± 0.007[b]
Hh通路抑制剂 + 莪术	20 μmol/L+6.25 g/kg	0.401 ± 0.012[b]	0.372 ± 0.007[b]
Hh 通路激动剂	1 μmol/L	1.004 ± 0.036[b]	0.696 ± 0.011[b]
Hh 通路激动剂 + 莪术	1 μmol/L+6.25 g/kg	0.702 ± 0.010[c]	0.556 ± 0.008[c]
秋水仙碱	0.1 mg/kg	0.505 ± 0.008[b]	0.541 ± 0.012[b]
F 值		687.974	848.223
P 值		0.000	0.000

注：a，与空白组比较，P<0.01；b：与模型组比较，P<0.01；c：与激动剂组比较，P<0.01

2.4　Western-blot 法检测莪术含药血清对大鼠 HSC 中 Gli1 蛋白和 β-catenin 蛋白表达的影响

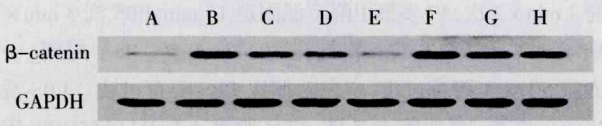
与空白组比较，模型组 Gli1 蛋白和 β-catenin 蛋白表达明显增高（均 P=0.000）。与模型组比较，Hh 通路抑制剂组、莪术组、Hh 通路抑制剂+莪术组的 Gli1 蛋白和 β-catenin 蛋白表达明显降低（均 P=0.000），秋水仙碱组 Gli1 蛋白和 β-catenin 蛋白表达明显降低（P=0.007，P=0.000），Hh 通路激动剂组 Gli1 蛋白和 β-catenin 蛋白表达明显增高（均 P=0.000）。与 Hh 通路激动剂组比较，Hh 通路激动剂+莪术组表达明显降低（均 P=0.000）（图 2，图 3，表 4）。



A. 空白组；B. 模型组；C. Hh 通路抑制剂；D. 莪术；E. Hh 通路抑制剂 + 莪术；F. Hh 通路激动剂；G. Hh 通路激动剂 + 莪术；H. 秋水仙碱

图 2　莪术含药血清对大鼠 HSC 中 Gli1 蛋白的影响

Fig.2　Effects of Ezhu-containing serum on expression of Gli1 protein in HSC



A. 空白组；B. 模型组；C. Hh 通路抑制剂；D. 莪术；E. Hh 通路抑制剂 + 莪术；F. Hh 通路激动剂；G. Hh 通路激动剂 + 莪术；H. 秋水仙碱

图 3　莪术含药血清对大鼠 HSC 中 β-catenin 蛋白的影响

Fig.3　Effects of Ezhu-containing serum on expression of β-catenin protein in HSC

2.5　免疫荧光法检测莪术含药血清对大鼠肝星状细胞 Gli1、β-catenin 蛋白表达的影响

用红色荧光标记 Gli1 蛋白，绿色荧光标记 β-catenin 蛋白。与空白组相比，模型组和 Hh 通路激动剂组中 Gli1、β-catenin 在 HSC 细胞株胞膜及胞浆中呈高表达，荧光显微镜下可见明显特异性红色荧光和绿色荧光。与模型组比较，Hh 通路抑制剂组、莪术组、Hh 通路抑制剂+莪术组、秋水仙碱组 Gli1、β-catenin 表达明显减弱。与 Hh 通路激动剂组比较，Hh 通路激动剂+莪术组 Gli1、β-catenin 表达明显减弱，如图 4、图 5 所示。

表 4　莪术含药血清对大鼠 HSC 中 Gli1、β-catenin 蛋白表达的影响（$\bar{x} \pm s$，n=5）

Tab.4　Effects of Ezhu-containing serum on expression of Gli1 protein and β-catenin protein in HSC（$\bar{x} \pm s$，n=5）

组别	剂量	Gli1蛋白	β-catenin 蛋白
空白	-	0.197 ± 0.007	0.746 ± 0.038
模型	100 ng/mL	1.401 ± 0.047[a]	1.902 ± 0.011[a]
Hh通路抑制剂	20 μmol/L	1.096 ± 0.054[b]	1.640 ± 0.030[b]
莪术	6.25 g/kg	1.005 ± 0.037[b]	1.522 ± 0.017[b]
Hh通路抑制剂 + 莪术	20 μmol/L+6.25 g/kg	0.307 ± 0.012[b]	0.742 ± 0.031[b]
Hh 通路激动剂	1 μmol/L	1.709 ± 0.053[b]	1.985 ± 0.043[b]
Hh 通路激动剂 + 莪术	1 μmol/L+6.25 g/kg	1.320 ± 0.044[c]	1.724 ± 0.027[c]
秋水仙碱	0.1 mg/kg	1.327 ± 0.044[b]	1.755 ± 0.040[b]
F值		855.337	1 207.769
P值		0.000	0.000

注：a，与空白组比较，P<0.01；b：与模型组比较，P<0.01；c：与激动剂组比较，P<0.01

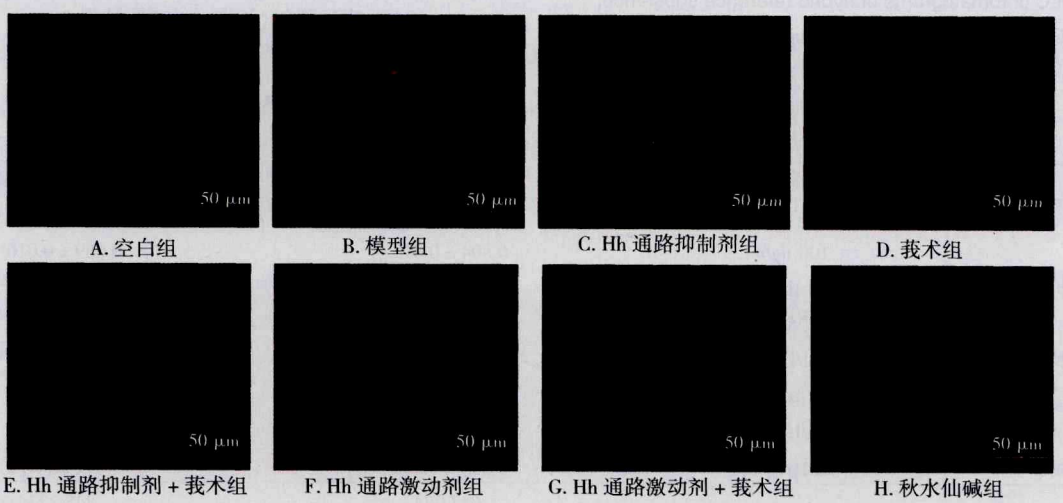


图 4　不同组别的 HSC 中 Gli1 的免疫荧光表达（400×）

Fig.4　Immunofluorescence expression of Gli1 in different groups of HSC（400×）

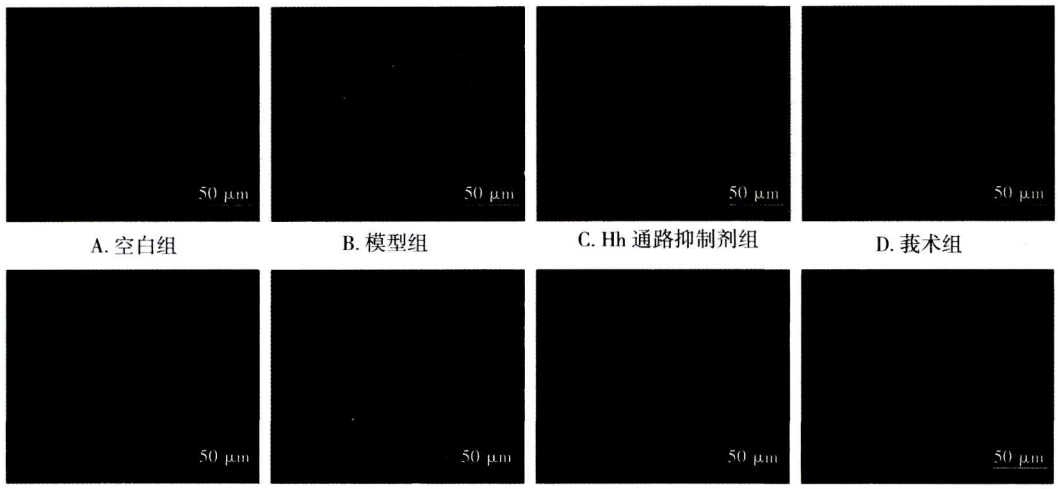


图 5 不同组别的 HSC 中 β-catenin 的免疫荧光表达（400×）

Fig.5 Immunofluorescence expression of β-catenin in different groups of HSC（400×）

3 讨 论

肝纤维化系各种慢性肝损伤发展为肝硬化的必经阶段，有效预防与逆转肝纤维化可以延缓、防止肝硬化的发生。HSC 是肝组织损伤修复的关键细胞，是肝纤维化时 ECM 产生过多和沉积的主要来源细胞，其活化增殖是肝纤维化的关键[2]。因此，抑制 HSC 的活化与增殖是抗肝纤维化的重要环节。

中医认为肝纤维化多因湿热、寒湿、疫疠、虫毒等病因长期反复刺激肝组织，致使肝络窒塞、功能受损，形成“本虚标实”之证。“本虚”多为气血亏虚，“标实”为久病致气滞、血瘀、痰浊，甚至形成积块[6]。临床出现肋胁胀痛、舌质紫暗有瘀点瘀斑、脉涩等瘀血阻滞的表现，若进一步发展可出现肝脾肿大、黄疸、肝掌、蜘蛛痣等肝硬化表现。血瘀在纤维化发病中起重要作用，并贯穿整个发生发展过程[7]，治疗上当以活血化瘀为基本治法。近年来，对于活血化瘀中药桃仁、丹参、川芎等抗肝纤维化的作用研究较多[8]，而对临床常用的莪术抗肝纤维化作用的研究少见。莪术辛、苦、温，归肝、脾经，能破血祛瘀、软坚散结和消积止痛，是临床上常用的活血化瘀药物，具有保肝、降酶、抗病毒、抗炎、抗凝血等功用[9]。

现代研究表明，莪术的主要成分为姜黄素和挥发油两大类[10]。姜黄素具有抗肿瘤、护肝、调节免疫功能、抗炎和降血脂等多重药理作用，临床上广泛用于治疗肿瘤、肝炎、高血脂等疾病[11]。莪术挥发油（莪术油）具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、降酶等作用，其主要成分包括莪术醇、莪术二酮、β 榄香烯等，2010 年版《中国药典》明确指出以莪术醇作为莪术油的质量控制指标[12]。因此，本实验选择姜黄素、莪术醇为对照，用 HPLC 技术对莪术含药血清定性。结果提示，莪术含药血清中含有莪术主要成分姜黄素、莪术醇，表明所制备的莪术含药血清能够较真实地反映莪术的药效。中药经口服后其有效成分必须经消化道吸收并通过血液输送到靶点才能发挥作用。因而口服给药后的血清中含有的相应成分才是中药在体内直接作用的物质[13]。因此运用血清药理学方法，用含药血清干预 HSC 来研究莪术治疗肝纤维化的机制。

Hh 信号通路、Wnt 信号通路都是调节胚胎发育的经典通路，在胚胎发育、组织损伤后的干细胞增殖分化中起重要作用。肝组织受损时，Hh 信号通路被激活，参与修复反应过程中 HSC 增殖，肌成纤维细胞转化与生成。Gli 蛋白作为 Hh 通路末端的转录调控因子，在 HSC 激活过程中必不可少[14]，Gli1 是一种直接的转录激活因子，常被视作 Hh 通路激活的标志[15]。有研究表明，Wnt 信号通路为 Hh 信号通路的下游信号[16]。Hh 转录因子可影响 Wnt 信号通路相关因子的表达，Hh 信号通路与 Wnt 信号通路共同参与调节肝组织损伤修复过程[17]。β-catenin 是经典的 Wnt 信号途径重要的第二信使，其在细胞质中稳定表达是经典 Wnt 通路被激活的重要标志[18]。经典 Wnt 信号通路通过激活 HSC 参与肝纤维化的形成。Ge 等[19]通过 RNA 干扰抑制 HSC-T6 细胞中 β-catenin 的表达后，发现可以明显抑制 HSC-T6 细胞

的增殖，促进其凋亡，并抑制胶原沉积。在活化的 HSC 中，Hh 和 Wnt 信号通路可能存在协同作用，其关键因子 Gli1 和 β-catenin 的表达可能存在一定的关系，共同促进肝纤维化进程。本实验研究结果显示，用 Hh 通路特异性抑制剂干预后，Gli1 表达下调，β-catenin 表达也相应下调。用 Hh 通路特异性激动剂干预后，Gli1 表达上调，β-catenin 表达也随之上调。而莪术含药血清显示出与 Hh 通路特异性抑制剂相同的作用趋势。

本实验结果显示，瘦素能刺激 HSC 活化和增殖。Hh 通路抑制剂、莪术含药血清、秋水仙碱能有效抑制大鼠 HSC 的增殖。Hh 通路抑制剂和莪术协同干预，可显著抑制 HSC 的增殖，提示莪术与 Hh 通路抑制剂能协同抑制活化的 HSC。瘦素和 Hh 通路激动剂协同干预可高度活化 HSC，再应用莪术干预高度活化的 HSC，显示 Gli1、β-catenin 表达明显减少，说明在不同活化状态的 HSC 中均能被莪术所抑制。莪术抑制 Hh 通路核转录因子 Gli1 表达后，能有效阻止 Hh 信号通路下游靶基因的转录。Wnt 信号通路作为 Hh 信号通路的下游靶标，随着 Hh 信号通路被抑制，β-catenin 表达减少，从而抑制 Wnt信号通路的激活。因此，推测在活化的 HSC 中，Gli1 与 β-catenin 可能存在正相关关系。莪术可能通过下调瘦素诱导活化的 HSC 中 Gli1 的表达，参与 Hh 信号通路抑制 HSC 的活化，并通过下调 Gli1 的表达继而下调 Wnt 通路关键因子 β-catenin 的表达以抑制 HSC 的活化，从而减少 ECM 的产生，发挥抗肝纤维化的作用。

Hh 通路抑制剂（Cyclopamine）对 Hh 信号通路具有特异性的抑制作用[20]，本实验中莪术和秋水仙碱也显示出与其类似的作用。Cyclopamine 具有致畸性，限制了该抑制剂的临床应用，目前仍处于实验阶段。秋水仙碱不良反应较多，包括皮肤黏膜损害、神经系统损害、血液系统损害、泌尿系统损害等多方面，临床上应用受到很大限制。莪术是临床治疗肝纤维化、肝硬化的常用中药，功效好、应用广、价格低廉、安全性高，本实验显示其具有与特异性抑制剂 Cyclopamine 相似的效应，为临床应用莪术治疗肝纤维化提供了新的依据。

参 考 文 献

[1] Saxena NK, Anania FA. Adipocytokines and hepatic fibrosis[J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(3): 153-161.

[2] Yin C, Evason KJ, Asahina K, et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer[J]. J Clin Invest, 2013, 123(5): 1902-1910.

[3] Lian N, Jiang Y, Zhang F, et al. Curcumin regulates cell fate and metabolism by inhibiting hedgehog signaling in hepatic stellate cells[J]. Lab Invest, 2015, 95(7): 790-803.

[4] Miao CG, Yang YY, He X, et al. Wnt signaling in liver fibrosis: progress, challenges and potential directions[J]. Biochimie, 2013, 95(12): 2326-2335.

[5] 刘 平. 肝纤维化肝硬化的中西医结合诊疗发展问题[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(3): 268-271.

[6] 李吉彦, 滕 娆. 肝纤维化的中医临证思辨[J]. 光明中医, 2015, 30(3): 584-585.

[7] 朱 锐, 杨 玲, 沈 霖, 等. 莪术提取物对肝纤维化大鼠血液流变学指标的影响[J]. 中西医结合研究, 2009, 1(3): 117-120.

[8] 罗小闯. 近 30 年肝纤维化中医证候及方药规律分析[J]. 中医学报, 2015, 30(6): 891-894.

[9] 刘 迟, 郭 刚, 胡仲仪. 莪术对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(12): 71-73.

[10] 成晓静, 刘华钢, 赖茂祥. 莪术的化学成分及药理作用研究概况[J]. 广西中医学院学报, 2007, 10(1): 79-82.

[11] 李 琦, 金 剑, 许 颖. 姜黄素的药理作用及其临床应用进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(12): 1366-1368.

[12] 曾建红, 黄凤香, 廖 迎. 莪术油的含量测定和抗肿瘤作用的新进展[J]. 肿瘤药学, 2012, 2(1): 19-22.

[13] 张爱华, 孙 晖, 闫广利, 等. “血清药物化学-药代(效)动力学-系统生物学”三维整合体系研究中药复方的构建及其在茵陈蒿汤分析中的应用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3786-3789.

[14] Kasper M, Regl G, Frisechauf AM, et al. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signaling[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(4): 437-445.

[15] Chandra V, Das T, Gulati P, et al. Hedgehog signaling pathway is active in GBM with GLI1 mRNA expression showing a single continuous distribution rather than discrete high/low clusters[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0116390.

[16] Xuan YH, Jung HS, Choi YL, et al. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions[J]. Mod Pathol, 2006, 19(8): 1139-1147.

[17] 连娜琦, 吴夏飞, 陆春风, 等. Hedgehog 信号通路与肝损伤：可能的药物作用靶点[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(4): 460-464.

[18] Arauz J, Zarco N, Seqovia J, et al. Caffeine prevents experimental liver fibrosis by blocking the expression of TGF-β[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2014, 26 (2): 164-173.

[19] Ge WS, Wang YJ, Wu JX, et al. β-catenin is overexpressed in hepatic fibrosis and blockage of Wnt/β-catenin signaling inhibits hepatic stellate cell activation[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(6): 2145-2151.

[20] Heretsch P, Büttner A, Tzagkaroulaki L, et al. Exo-cyclopamine—a stable and potent inhibitor of hedgehog-signaling[J]. Chem Commun (Camb), 2011, 47(26): 7362-7364.

（责任编辑：张辉洁）