中图分类号:R932;R285.5　　文献标志码:A　　文章编号:1006－4931(2025)09－0058－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.09.012

基于NLRP3信号通路探讨黑果小檗提取物对模型小鼠肝纤维化的影响*

李　渊,顾伟萍,孙吉祥,毕　慧,刘　菁

(新疆维吾尔自治区人民医院,新疆 乌鲁木齐　830011)

摘要:目的　基于核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(NLRP3)信号通路探讨黑果小檗提取物(BHSTA)对模型小鼠肝纤维化的影响。**方法**　将35只雄性小鼠随机分为正常对照组(A组,等量蒸馏水),模型对照组(B组,等量蒸馏水),秋水仙碱组(C组,2 mg/kg秋水仙碱),BHSTA低、高剂量组(D_1组、D_2组,10,40 mg/mL BHSTA),各7只。B组、C组、D_1组、D_2组小鼠均腹腔注射3 μL/g四氯化碳(CCl_4)油剂(CCl_4:橄榄油=1∶4,*V*/*V*)4周,每周2次,复制肝纤维化小鼠模型,A组小鼠仅腹腔注射3 μL/g CCl_4 4周,每周2次。之后各组小鼠每天灌胃1次相应药物,连续4周。观察小鼠的一般情况(包括精神状态、饮水量、饮食量、体质量、活动量);肝脏组织经苏木精－伊红(HE)染色,观察肝脏病理形态变化;检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平和NLRP3、凋亡相关微粒蛋白(ASC)、白细胞介素1β(IL－1β)、胱天蛋白酶1(caspase－1)的蛋白表达水平。**结果**　与B组比较,D_1组、D_2组小鼠的精神状态尚可,饮食量、饮水量尚可,体质量增加,活动量正常;肝脏细胞形态趋于正常,炎性细胞浸润减少;ALT,AST水平及NLRP3,ASC,IL－1β,caspase－1蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。**结论**　BHSTA可有效抑制肝纤维化模型小鼠肝星状细胞的活化,改善肝脏功能,减轻炎性反应,其作用机制可能与抑制NLRP3信号通路相关。

关键词:黑果小檗提取物;肝纤维化;核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3;肝星状细胞;炎性反应;作用机制

Effect of *Berberis Heteropoda* Extract on Liver Fibrosis in Model Mice Based on the NLRP3 Signaling Pathway

LI Yuan, GU Weiping, SUN Jixiang, BI Hui, LIU Jing

(Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi, Xinjiang, China　830011)

Abstract: Objective　To investigate the effect of *Berberis heteropoda* extract (BHSTA) on liver fibrosis in mice model based on the NLRP3 signaling pathway. **Methods**　A total of 35 male mice were randomly divided into the normal control group (group A, equal volume of distilled water), the model control group (group B, equal volume of distilled water), the colchicine group (group C, 2 mg/kg colchicine), and BHSTA low- and high-dose groups (groups D_1, D_2; 10, 40 mg/mL BHSTA), with seven mice in each group. Mice in groups B, C, D_1, and D_2 were intraperitoneally injected with 3 μL/g carbon tetrachloride (CCl_4) oil (CCl_4: olive oil = 1∶4, *V*/*V*) twice a week for four weeks to replicate mice model with liver fibrosis. Mice in group A were only intraperitoneally injected with 3 μL/g CCl_4 twice a week for four weeks. Afterwards, mice in each group were orally administered with the corresponding drug once a day for four weeks. The general condition of mice (mental state, water intake, diet, body weight, and activity level) was observed. The liver tissue was stained with hematoxylin-eosin (HE) to observe pathological changes in the liver. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), as well as the expression levels of NLRP3, apoptosis-related microglobulin (ASC), interleukin-1β (IL-1β), and caspase-1 proteins were detected. **Results**　Compared with those in group B, the mental state, diet, and water intake of mice in groups D_1 and D_2 were still acceptable, their body weight increased, and their activities were normal; the morphology of liver cells tended to be normal, and the infiltration of inflammatory cells decreased in groups D_1 and D_2; the levels of ALT and AST, as well as the expression levels of NLRP3, ASC, IL-1β, and caspase-1 protein in groups D_1 and D_2 significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion**　BHSTA can effectively inhibit the activation of hepatic stellate cells in model mice with liver fibrosis, improve liver function, and alleviate inflammatory reactions. Its mechanism may be related to the inhibition of the NLRP3 signaling pathway.

Key words: *Berberis heteropoda* extract; liver fibrosis; NLRP3; hepatic stellate cells; inflammatory reaction; mechanism

肝纤维化是指肝内结缔组织因各种致病因素异常增生,导致肝内弥漫性细胞外基质过度沉淀的病理过程[1]。肝纤维化长期存在会发展成肝硬化,甚至引发肝癌[2]。若患者得到及时、有效治疗,肝纤维化可逆转,但

*基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金[2021D01C177]。

第一作者:李渊,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)502321150@qq.com。

肝硬化较难逆转[3]。目前，针对该类疾病尚无特殊治疗方法，通常针对抗纤维化及病因进行治疗，以缓解炎性反应及肝功能损伤。研究显示，核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3（NLRP3）的激活在炎性反应中起重要作用，其对肝纤维化进程有直接影响[4]。黑果小檗 *Berberis atrocarpa* Schneid. 为小檗科小檗属的常绿灌木植物，其果实具有清热解毒、生津止渴、健胃和中等功效[5]。黑果小檗果实中存在5种花色苷，花色苷在调血脂、保护心血管、抗氧化、抗炎等方面均有显著效果，其对延缓肝纤维化也有一定效果[6-7]。故本研究中基于NLRP3信号通路探讨了黑果小檗提取物（BHSTA）对模型小鼠肝纤维化的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器：AU480型全自动生化分析仪（美国Beckman Coulter公司）；Chemi-Scopemini型化学发光仪（上海勤翔科学仪器有限公司）；JXFSTPRP-24型粉碎机（上海净信实业发展有限公司）；AL204型天平（梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司，精度为0.1 mg）；DM4000B型显微镜（徕卡显微系统有限公司）。

试药：秋水仙碱片（云南植物药业有限公司，国药准字H53020166，规格为每片0.5 mg）；四氯化碳（CCl_4，广州光华化学厂有限公司，批号为H31020240）；黑果小檗果实购自新疆乌鲁木齐；苏木精-伊红（HE）复染液（北京百奥莱博科技有限公司，货号为GL0658）；NLRP3一抗（货号为ab214185），凋亡相关微粒蛋白（ASC）一抗（货号为ab175107），白细胞介素1β（IL-1β）一抗（货号为ab9722），胱天蛋白酶1（caspase-1）一抗（货号为ab179515），均购自美国Abcam公司；放射免疫沉淀试验（RIPA）裂解液（上海弘顺生物科技有限公司，货号为BR-000134）；0.1%苯甲基磺酰氟（北京百奥莱博科技有限公司，货号为A00002）。

动物：35只雄性小鼠，周龄（5.19±1.24）周，体质量（19.13±1.07）g。分笼饲养于温度19~21 ℃、相对湿度45%~55%、昼夜12 h/12 h交替的环境中，按标准量给予饲料，水量充足，适应性喂养5 d后开展动物实验，实验动物使用许可证号为SYXK（新）2021-0005。本研究方案获我院实验动物学伦理委员会批准。

1.2 方法

BHSTA溶液制备：取黑果小檗果皮，用粉碎机粉碎，过20目筛，保存于-20 ℃冰箱，经XDA-7A大孔树脂纯化处理，分别取1.0，4.0 g纯化后的BHSTA，加100 mL水，制成质量浓度分别为10，40 mg/mL的BHSTA溶液。

分组、建模与给药：将35只小鼠随机分为正常对照组（A组，等量蒸馏水），模型对照组（B组，等量蒸馏水），秋水仙碱组（C组，2 mg/kg秋水仙碱），BHSTA低、高剂量组（D_1组、D_2组，10，40 mg/mL BHSTA溶液），各7只。B组、C组、D_1组、D_2组小鼠均腹腔注射3 μL/g CCl_4油剂（CCl_4∶橄榄油=1∶4，*V*/*V*）4周、每周2次，以复制肝纤维化小鼠模型，A组小鼠仅腹腔注射3 μL/g橄榄油4周、每周2次。之后各组小鼠分别灌胃相应药物干预4周，每天1次。

小鼠一般情况：观察并记录小鼠的精神状态、饮水量、饮食量、体质量、活动量。

肝脏病理形态变化：各组随机选取3只小鼠，取出肝右叶，用质量浓度为40 ng/L的多聚甲醛固定，石蜡包埋，切片，脱蜡，脱水，用HE染色，置显微镜下观察。

肝功能指标检测：小鼠眼球取血，离心（转速为3 000 r/min）15 min，取血清，用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）水平。

肝脏组织NLRP3及其下游靶基因蛋白表达水平检测：取各组剩余4只小鼠的肝右叶，液氮速冻后转移至-80 ℃保存，检测前于冰上称取100 mg组织，用预冷的生理盐水冲洗，用滤纸吸干表面水分，用消毒剪刀剪碎，加9倍体积预冷的RIPA裂解液（含0.1%苯甲基磺酰氟），冰上匀浆至完全裂解，离心（转速为12 000 r/min，温度为4 ℃）10 min，收集上清液，采用BCA法测定蛋白浓度，用RIPA裂解液将各组蛋白浓度调至一致，按4∶1比例加5倍上样缓冲液，95 ℃煮沸5 min使蛋白变性，分装并保存于-20 ℃，用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）配胶试剂盒（含12%分离胶、5%浓缩胶）分离蛋白，转移至聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，用5% TBST封闭，室温摇床1 h，加NLRP3（1∶1 000）、ASC（1∶1 000）、caspase-1（1∶500）、IL-1β（1∶500）、GAPDH（1∶5 000）一抗4 ℃孵育12~16 h，TBST洗膜3次，每次10 min，加辣根过氧化物酶（HRP）标记二抗（1∶5 000），室温孵育1 h，TBST洗膜3次，每次10 min，ECL试剂均匀覆盖膜，化学发光仪采集图像（避免过度曝光），采用Image J 1.8.0软件分析条带灰度值。目标蛋白表达量=目标蛋白灰度值/GAPDH灰度值。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件分析。符合正态分布的计量资料以$\bar{X} \pm s$表示，组间数据经Levene检验方差齐时，各组数据总体比较采用多组间单因素方差分析，组间的多重比较采用LSD-*t*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

A组小鼠精神状态良好，饮水量、饮食量正常，活泼好动；B组小鼠精神状态变差，饮水量、饮食量减少，活动量下降；C组、D_1组、D_2组小鼠上述表现较B组小鼠改善。与A组比较，B组小鼠体质量显著减轻（$P < 0.05$）；与B组比较，C组、D_1组、D_2组小鼠体质量均显著增加（$P < 0.05$）；与C组比较，D_1组、D_2组小鼠体质量均显著减轻（$P < 0.05$）；与D_1组比较，D_2组小鼠体质量显著增加（$P < 0.05$）。详见表1。

表1 各组小鼠不同时间点体质量比较（$\bar{X} \pm s$，$n = 7$）

Tab. 1 Comparison of mice's body weight at different time points in each group（$\bar{X} \pm s$，$n = 7$）

组别	给药前	给药后			
		1周	2周	3周	4周
A组	19.54±0.72	22.03±1.07	26.16±0.54	27.13±0.50	28.48±1.55
B组	20.84±0.84	20.36±0.64*	21.17±0.94*	22.34±0.84*	23.51±2.66*
C组	20.18±0.58	21.51±0.80#	25.01±0.37*#	25.39±0.73*#	27.38±2.68*#
D_1组	19.25±0.84	21.10±0.63#	22.33±0.90*#△	23.20±0.72*#△	24.64±2.83*#△
D_2组	20.51±0.87	21.37±0.74#	25.09±0.95*#△▲	24.37±0.56*#△▲	26.25±1.43*#△▲

注：与A组同时点比较，$^{*}P < 0.05$；与B组同时点比较，$^{\#}P < 0.05$；与C组同时点比较，$^{\triangle}P < 0.05$；与D_1组同时点比较，$^{\blacktriangle}P < 0.05$。

Note: Compared with those in group A at the same time point, $^{*}P < 0.05$; Compared with those in group B at the same time point, $^{\#}P < 0.05$; Compared with those in group C at the same time point, $^{\triangle}P < 0.05$; Compared with those in group D_1 at the same time point, $^{\blacktriangle}P < 0.05$.

2.2 肝脏病理形态

A组小鼠肝细胞正常，未发现炎性细胞浸润，无变性坏死；B组小鼠肝细胞形态紊乱，伴炎性细胞浸润；C组、D_1组、D_2组小鼠肝细胞形态趋于正常，炎性细胞浸润减少，表明BHSTA对肝纤维化模型小鼠的炎性反应有一定改善作用。详见图1。

2.3 肝功能指标

与A组比较，B组小鼠AST和ALT水平均显著升高（$P < 0.05$）；与B组比较，C组、D_1组、D_2组小鼠AST和ALT水平均显著降低（$P < 0.05$）；与C组比较，D_1组、D_2组小鼠AST和ALT水平均显著升高（$P < 0.05$）；与D_1组比较，D_2组小鼠AST和ALT水平均显著降低（$P < 0.05$）。详见表2。

表2 各组小鼠肝功能指标比较（$\bar{X} \pm s$，U/L，$n = 7$）

Tab. 2 Comparison of mice's liver function of mice in each group（$\bar{X} \pm s$，$n = 7$）

组别	AST	ALT
A组	88.54±14.29	49.26±6.84
B组	309.17±70.62*	276.35±87.19*
C组	128.35±17.83*#	89.46±10.27*#
D_1组	210.94±65.74*#△	186.73±34.48*#△
D_2组	146.29±15.47*#△▲	101.85±10.61*#△▲

注：与A组比较，$^{*}P < 0.05$；与B组比较，$^{\#}P < 0.05$；与C组比较，$^{\triangle}P < 0.05$；与D_1组比较，$^{\blacktriangle}P < 0.05$。表3同。

Note: Compared with those in group A, $^{*}P < 0.05$; Compared with those in group B, $^{\#}P < 0.05$; Compared with those in group C, $^{\triangle}P < 0.05$; Compared with those in group D_1, $^{\blacktriangle}P < 0.05$ (for Tab. 2 - 3).

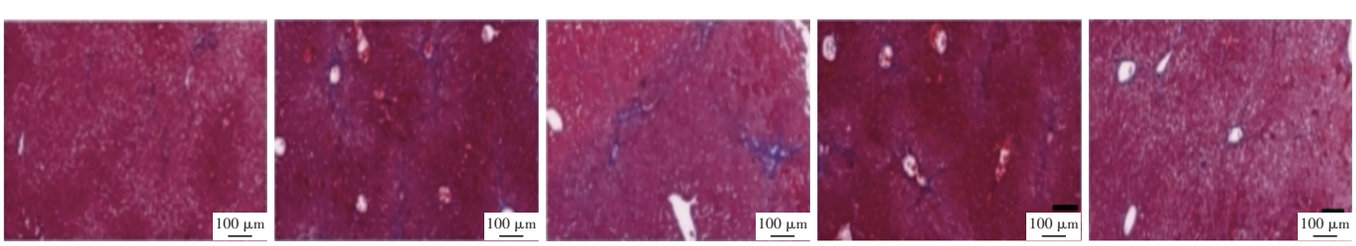
2.4 NLRP3及其下游靶基因蛋白表达水平

与A组比较，B组小鼠NLRP3、ASC、IL-1β、caspase-1蛋白表达水平均显著升高（$P < 0.05$）；与B组比较，C组、D_1组、D_2组小鼠ASC、IL-1β、caspase-1蛋白表达水平均显著降低（$P < 0.05$），D_1组、D_2组小鼠NLRP3蛋白表达水平均显著降低（$P < 0.05$）；与C组比较，D_1组小鼠NLRP3、ASC、IL-1β、caspase-1蛋白表达水平均显著升高（$P < 0.05$），D_2组小鼠上述指标均无显著差异（$P > 0.05$）；与D_1组比较，D_2组小鼠NLRP3、ASC、IL-1β、caspase-1蛋白表达水平均显著降低（$P < 0.05$）。详见表3和图2。

表3 各组小鼠NLRP3、ASC、IL-1β、caspase-1蛋白表达水平比较（$\bar{X} \pm s$，$n = 7$）

Tab. 3 Comparison of expression levels of mice's NLRP3, ASC, IL-1β, and caspase-1 protein in each group（$\bar{X} \pm s$，$n = 7$）

组别	NLRP3	ASC	IL-1β	caspase-1
A组	0.62±0.02	0.71±0.03	0.78±0.02	0.71±0.04
B组	1.11±0.05*	1.09±0.04*	1.21±0.04*	1.13±0.06*
C组	1.09±0.04*	0.85±0.03*#	0.91±0.04*#	0.79±0.04*#
D_1组	0.95±0.05*#△	0.95±0.05*#△	0.99±0.05*#△	0.94±0.04*#△
D_2组	0.74±0.04*#▲	0.88±0.04*#▲	0.93±0.03*#▲	0.84±0.04*#▲



A组 B组 C组 D_1组 D_2组

图1 各组小鼠肝脏病理形态（HE，×100，$n = 3$）

Fig. 1 Pathological morphology of mice's liver in each group（HE，× 100，$n = 3$）

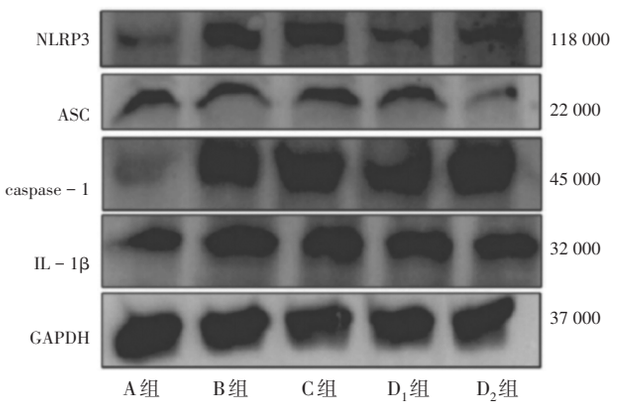


图2 各组小鼠NLRP3，ASC，IL－1β，caspase－1蛋白表达凝胶电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis map of mice's NLRP3, ASC, IL－1β, caspase－1 protein expression in each group

3 讨论

肝纤维化若不干预会发展为肝癌，甚至会导致死亡。据统计，亚洲肝癌患者约占全球的75%，其中我国占50%[8]。有研究表明，肝纤维化是可控的，甚至可逆[9]。故有效的干预方式对缓解我国医疗压力和社会负担有积极意义。因此，本研究中构建了肝纤维化模型小鼠，并予不同质量浓度BHSTA治疗，以探讨BHSTA对该类小鼠肝脏炎性反应的作用。

CCl_4是一种对肝细胞有严重毒性作用的化学物质，可诱导肝纤维化的发生[10]。本研究结果显示，与A组比较，B组小鼠的肝细胞形态紊乱，伴炎性细胞浸润，表明肝纤维化模型小鼠构建成功。肝纤维化小鼠的肝细胞会变形或坏死，肝细胞膜的通透性增加，AST和ALT随之被释放出来[11]。秋水仙碱可改善肝纤维化[12]，故选择其为阳性对照药物。本研究结果显示，与A组比较，B组小鼠的体质量显著减轻（$P < 0.05$），AST和ALT水平均显著升高（$P < 0.05$）；与B组比较，C组、D_1组、D_2组小鼠的体质量均显著增加（$P < 0.05$），AST和ALT水平均显著降低（$P < 0.05$）；与D_1组比较，D_2组小鼠的体质量显著增加（$P < 0.05$），AST和ALT水平均显著降低（$P < 0.05$）。表明BHSTA可有效改善肝纤维化模型小鼠的体质量和肝功能，其中高剂量BHSTA的改善效果更佳，与文献[13－14]的研究结果一致。

肝星状细胞（HSC）受到外界刺激活化时，会促使肝纤维化的发生，也是细胞外基质沉淀的主要来源。肝纤维化的发生、发展中，炎性反应起关键作用，故抑制HSC活化和减轻炎性反应对肝纤维化的治疗十分重要。NLRP3炎性小体被激活后，释放炎性因子，诱导炎性细胞凋亡[15]。研究表明，药物通过抑制NLRP3炎性小体，可减轻炎性反应，进而减缓肝纤维化进程[16－17]。秋水仙碱有显著抗炎作用，其通过抑制炎性反应而减轻肝脏炎症，进而延缓疾病的进展[18]。本研究结果显示，与A组比较，B组小鼠的NLRP3，ASC，IL－1β，caspase－1蛋白表达水平均显著升高（$P < 0.05$）；与B组比较，C组、D_1组、D_2组小鼠NLRP3，ASC，IL－1β，caspase－1蛋白表达水平均显著降低（$P < 0.05$）；与D_1组比较，D_2组上述指标均显著降低（$P < 0.05$）。表明BHSTA可有效抑制HSC活化，改善炎性反应，其中高剂量BHSTA的效果更佳，其作用机制可能与抑制NLRP3信号通路相关。

综上所述，BHSTA可有效抑制肝纤维化模型小鼠HSC的活化，改善肝功能，减轻炎性反应，其作用机制可能与抑制NLRP3信号通路相关。

参考文献

[1] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151－166.

[2] HAN X, WU Y, YANG Q, et al. Peroxisome proliferatoractivated receptors in the pathogenesis and therapies of liver fibrosis[J]. Pharmacol Ther, 2021, 222: 107791.

[3] OAKLEY F. Interrogating mechanisms of liver fibrosis with omics[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(2): 89－90.

[4] INZAUGARAT ME, JOHNSON CD, HOLTMANN TM, 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.

[5] 谭 为，张兰兰，庞市宾，等. 黑果小檗果实的色素提取与纯化工艺[J]. 中国民族民间医药，2019，28(7)：42－46.

[6] 陈 玲，包海燕，阳 莹，等. 一测多评法测定黑果小檗果实中5种花色苷含量[J]. 化学试剂，2023，45(2)：148－154.

[7] 杨 静. 黑果腺肋花楸花色苷对肝纤维化的防治作用及机制研究[D]. 沈阳：辽宁大学，2021.

[8] 周 鑫，王 智，何雪茹，等. 潜在抗肝纤维化药物与靶点相关信号通路研究进展[J]. 临床肝胆病杂志，2023，39(12)：2932－2941.

[9] 吾斯曼·艾海提，艾则孜江·艾尔肯. 枳椇子抗肝纤维化作用网络药理学研究[J]. 中国药业，2022，31(16)：36－40.

[10] LIEM IK, ZAKIYAH Z, OKTAVINA R, et al. Comparison of two methods of 2AAF/CCl4 exposure to induce rat animal model control of chronic liver injury[J]. eJKI, 2021, 8(3): 164－171.

[11] 杨武斌，唐金凤，米本中. 柴胡疏肝散对四氯化碳诱导的早期大鼠肝纤维化的治疗作用[J]. 山西医科大学学报，2022，53(9)：1096－1102.

[12] 章 波，麦琬婷，檀燕君，等. 秋水仙碱治疗肝纤维化的网络药理学研究[J]. 广西医科大学学报，2020，37(3)：372－379.

[13] GAO J, YANG J, YU W, et al. Gooseberry anthocyanins protect mice hepatic fibrosis by inhibiting TGF－β/Smad pathway[J]. Food Bioscience, 2020, 54: 37.

[14] YANG J, GAO J, YU WC, et al. The effects and mechanism of *Aronia melanocarpa* elliot anthocyanins on hepatic fibrosis[J].