

## · 中药药理与质量 ·

## 小檗碱对肝硬化大鼠肝功能的保护及炎症抑制作用

窦芊, 李赢, 王园园, 赵巍峰

(新乡医学院第三附属医院感染科, 河南新乡 453000)

**摘要:**【目的】观察小檗碱对肝硬化大鼠肝功能的保护及炎症抑制作用,并探讨其相关机制。【方法】从60只SD大鼠中随机抽取10只设为正常组,其余建立肝硬化模型。将建模成功的40只大鼠随机分为肝硬化组、激活剂组、小檗碱组、激活剂+小檗碱组,每组10只。激活剂组给予SRI-011381 30 mg/kg灌胃,小檗碱组给予小檗碱200 mg/kg灌胃,激活剂+小檗碱组给予SRI-011381(30 mg/kg)合小檗碱(20 mg/kg)灌胃,正常组、模型组给予等体积生理盐水灌胃,1次/d,连续2周。末次给药后次日测定血清肝功能指标、炎症因子指标、肝纤维化程度指标,采用免疫组织化学染色法测定肝脏组织 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达,苏木素-伊红(HE)染色法观察肝组织病理变化,蛋白免疫印迹(Western Blot)法测定肝脏组织转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、Smad4、Smad7蛋白表达。【结果】与正常组比较,肝硬化组血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平,白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IV型胶原(IV-C)、III型前胶原(PC III)、透明质酸(HA)水平,肝脏组织 $\alpha$ -SMA免疫组织化学染色光密度(IOD)值,TGF- $\beta$ 1、Smad4蛋白表达量升高,白蛋白(ALB)水平、Smad7蛋白表达量降低(均 $P < 0.05$ );与肝硬化组比较,激活剂组血清AST、ALT、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IV-C、PC III、HA水平及 $\alpha$ -SMA IOD值,TGF- $\beta$ 1、Smad4蛋白表达量升高,ALB水平、Smad7蛋白表达量降低(均 $P < 0.05$ );与激活剂组比较,小檗碱组血清AST、ALT、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IV-C、PC III、HA水平及 $\alpha$ -SMA IOD值,TGF- $\beta$ 1、Smad4蛋白表达量降低,ALB水平、Smad7蛋白表达量升高(均 $P < 0.05$ );与小檗碱组比较,激活剂+小檗碱组血清AST、ALT、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IV-C、PC III、HA水平及 $\alpha$ -SMA IOD值,TGF- $\beta$ 1、Smad4蛋白表达量升高,ALB水平、Smad7蛋白表达量降低( $P < 0.05$ )。HE染色结果显示,肝硬化组与激活剂组可见明显肝纤维化表现,小檗碱组肝组织病理变化及纤维化程度较肝硬化组、激活剂组明显改善,激活剂+小檗碱组肝组织病理变化及纤维化程度较肝硬化组、激活剂组有所改善,但不及小檗碱组。【结论】小檗碱可抑制肝硬化大鼠炎症反应,促进肝脏胶原降解,降低肝纤维化程度,保护肝功能,其机制可能与抑制TGF- $\beta$ 1/Smads信号通路有关。

**关键词:** 小檗碱;肝硬化;肝功能;炎症;TGF- $\beta$ 1/Smads信号通路;大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)12-2708-08

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.12.027

## Effect of Berberine on Protecting Liver Function and Inhibiting Inflammation in Cirrhotic rats

DOU Qian, LI Ying, WANG Yuan-Yuan, ZHAO Wei-Feng

(Dept. of Infectious Disease, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000 Henan, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the effects of berberine on protecting liver function and inhibiting inflammation in cirrhotic rats, and to explore the related mechanisms. **Methods** Ten of 60 SD rats were randomly selected as normal group, and the rest were established as cirrhosis models. Forty successfully modeled rats were randomly divided into cirrhosis group, activator group, berberine group and activator plus berberine group, with 10 rats in each group. The activator group was given intragastric administration of 30 mg/kg of SRI-011381, the berberine group was given intragastric administration of 200 mg/kg of berberine, the activator plus berberine group was given intragastric administration of SRI-011381 (30 mg/kg) combined with berberine (20 mg/kg), the normal group and model group were given intragastric administration of equal volume of normal saline. The administration placed

收稿日期: 2021-02-23

作者简介: 窦芊(1980-),男,硕士,副主任医师; E-mail: leilei\_2122@tom.com

基金项目: 国家科技重大专项课题(编号: 2013ZX10002005)

once a day for 2 consecutive weeks. Serum liver function indexes, inflammatory factor indexes and liver fibrosis degree indexes were measured on the next day after the last administration. The expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in liver tissue was measured by immunohistochemical staining, and the pathological changes of liver tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), Smad4 and Smad7 in liver tissue was determined by Western Blot. **Results** Compared with the normal group, the levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), type IV collagen (IV-C), type III procollagen (PC III) and hyaluronic acid (HA) in serum, immunohistochemical optical density (IOD) value of  $\alpha$ -SMA in liver tissues, and protein expression levels of TGF- $\beta$ 1 and Smad4 in liver tissues in the cirrhosis group were significantly increased, and the serum albumin (ALB) level and Smad7 protein expression level were decreased ( $P < 0.05$ ); Compared with the cirrhosis group, the AST, ALT, IL-6, TNF- $\alpha$ , IV-C, PC III and HA levels,  $\alpha$ -SMA IOD, TGF- $\beta$ 1 and Smad4 protein expression levels in the activator group were increased, while the ALB level and Smad7 protein expression level were decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the activator group, the AST, ALT, IL-6, TNF- $\alpha$ , IV-C, PC III and HA levels,  $\alpha$ -SMA IOD, and TGF- $\beta$ 1 and Smad4 protein expression levels in the berberine group were decreased, while the ALB level and Smad7 protein expression level were increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the berberine group, the AST, ALT, IL-6, TNF- $\alpha$ , IV-C, PC III and HA levels,  $\alpha$ -SMA IOD, TGF- $\beta$ 1 and Smad4 protein expression levels were increased, while the ALB level and Smad7 protein expression level were decreased in the activator plus berberine group ( $P < 0.05$ ). HE staining results showed that liver fibrosis was obvious in the cirrhosis group and activator group. The pathological changes of liver tissues and degree of fibrosis in the berberine group were significantly improved as compared with the cirrhosis group and activator group. The pathological changes of liver tissues and degree of fibrosis in the activator plus berberine group were improved as compared with the cirrhosis group and the activator group, but not as good as the berberine group. **Conclusion** Berberine can inhibit the inflammatory response in cirrhotic rats, promote the degradation of liver collagen, reduce the degree of liver fibrosis, and protect liver function. It is speculated that its mechanism is related to the inhibition of TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway.

**Keywords:** berberine; liver cirrhosis; liver function; inflammation; rats

肝硬化是慢性肝病发展至晚期的一种肝纤维化疾病,以肝功能损伤、门脉高压等为主要临床表现,并累及多系统,逐渐并发肝性脑病、继发性感染、上消化道出血、水电解质紊乱、肝腹水及癌变等严重并发症<sup>[1-2]</sup>。目前,临床治疗肝硬化主要有对症消除病因、保肝、营养支持等保守治疗方式以及肝移植。但保守治疗仅能阻滞肝纤维化进程;而肝移植虽然效果明显,但成本高昂、供肝数量有限,且涉及伦理问题,限制了其临床应用<sup>[3]</sup>。因此,亟待探寻临床综合收益较高的肝硬化治疗方式。中药单体是研究的热点之一。小檗碱(berberine),又名黄连素,是从毛茛科植物黄连、芸香科植物黄檗、小檗科植物小檗等植物中得到的季胺型异喹啉类生物碱,具有抗炎、抗

菌、抗病毒等药理活性<sup>[4-9]</sup>。已有研究证实,小檗碱对肝硬化大鼠肝脏、肠黏膜具有保护作用<sup>[10]</sup>。本研究通过建立肝硬化大鼠模型,进一步观察小檗碱对其肝功能的影响,并探讨其相关机制,以期为临床该病治疗提供参考,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 60只SPF级SD雄性大鼠,6周龄,体质量( $170 \pm 20$ )g,购自北京抗创联生物制药技术研究有限公司,使用许可证号:SYXK(京)2020-0046。颗粒饲料,自由饮食、饮水,适宜温、湿度,自然光照,适应性饲养1周。

1.2 药物、试剂与仪器 小檗碱(纯度 $> 98\%$ ,成都瑞芬思生物科技有限公司生产,批号: CAS

2086-83-1)。转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )/Smads信号通路特异性激活剂SRI-011381[纯度为99.78%, MedChemexpress 安诺伦(北京)生物科技有限公司产品]; 四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )溶液(上海研生生化试剂有限公司); 白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(上海晶抗生物工程技术有限公司); 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、白蛋白(ALB)试剂盒(德国默克集团); IV型胶原(IV-C)、III型前胶原(PC III)、透明质酸(HA)试剂盒(北方生物技术研究所); 兔抗 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)多克隆抗体, 兔抗TGF- $\beta 1$ 、Smad4、Smad7单克隆抗体(美国Santa Cruz公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)抗体(上海联迈生物工程技术有限公司)。Cobas8000全自动生化分析仪(瑞士罗氏集团); Multiskan Sky全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司); GC-1500  $\gamma$ 放射免疫计数器(安徽中科中佳科学仪器有限公司); RM2265病理切片仪(德国徕卡微系统有限公司); DSX100光学显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

**1.3 模型建立与分组** 从60只大鼠中随机抽取10只不作处理, 设为正常组, 其余50只建立肝硬化模型。造模方法<sup>[11]</sup>: 第1周用苯巴比妥钠溶液(0.35 g/L)作为饮用水进行诱导, 第2、3周分别采用40%、50%  $\text{CCl}_4$ 菜籽油溶液(分别量取40、50 mL  $\text{CCl}_4$ 溶液, 用菜籽油定容至100 mL)行皮下多点注射, 第4~14周用60%  $\text{CCl}_4$ 菜籽油溶液(量取60 mL  $\text{CCl}_4$ 溶液, 用菜籽油定容至100 mL)行皮下多点注射, 每只每次3 mL/kg, 2次/周, 且第2~14周采用10%食用酒精作为唯一饮用水。第14周结束后, 大鼠表现为毛发稀疏、无光泽、干枯, 食欲下降, 活动量减少, 反应迟钝, 有黑便排出, 且与正常组指标对照有明显差异, 可判断建模成功<sup>[12]</sup>。建模成功大鼠共40只, 将其随机分为肝硬化组、激活剂组、小檗碱组、激活剂+小檗碱组, 每组10只。

**1.4 干预方式** 确定建模成功后开始干预。激活剂组: SRI-011381(30 mg/kg)与生理盐水混合后灌胃, 1次/d, 连续2周<sup>[13]</sup>; 小檗碱组: 小檗碱(200 mg/kg)与生理盐水混合后灌胃, 1次/d, 连续2周<sup>[10]</sup>; 激活剂+小檗碱组: SRI-011381合小檗碱灌胃, 用法及用量同激活剂组、小檗碱组。正常组、模型组: 等体积生理盐水灌胃。

**1.5 组织取材** 末次给药后禁食不禁水24 h, 用戊巴比妥钠50 mg/kg腹腔注射麻醉, 经腹主动脉取血10 mL, 静置30 min, 以3 500 r/min离心(离心半径=10 cm)15 min, 分离血清保存于-80  $^{\circ}\text{C}$ 备用。分离大鼠肝脏, 取肝左叶, 一部分固定于40 g/L多聚甲醛中留待免疫组织化学染色及苏木素-伊红(HE)染色, 其余保存于-80  $^{\circ}\text{C}$ 用于蛋白免疫印迹(Western Blot)实验。

## 1.6 观察指标与方法

**1.6.1 血清肝功能指标测定** 取冷冻保存血清, 分别采用赖氏法、乳酸脱氢酶速率法、溴甲酚绿法测定血清AST、ALT、ALB水平, 严格按照试剂盒及全自动生化分析仪使用说明书要求设计操作流程。实验重复3次取均值。

**1.6.2 血清炎症因子指标测定** 取冷冻保存血清, 采用ELISA法测定血清IL-6、TNF- $\alpha$ 水平, 严格按照大鼠IL-6、TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒说明书操作。应用酶标仪于570 nm波长处测定吸光度值, 以标准品浓度和吸光度值绘制标准曲线, 计算IL-6、TNF- $\alpha$ 含量。实验重复3次取均值。

**1.6.3 血清肝纤维化程度指标测定** 取冷冻保存血清, 采用放射免疫法测定血清IV-C、PC III、HA水平。严格按照试剂盒及 $\gamma$ 放射免疫计数器说明书要求设计操作流程。实验重复3次取均值。

**1.6.4 免疫组织化学染色测定肝脏组织 $\alpha$ -SMA表达** 取固定于40 g/L多聚甲醛中的肝脏组织, 在恒冷箱冰冻切片中行连续冠状切片, 厚度10  $\mu\text{m}$ , 常规脱蜡至水。放置于柠檬酸抗原修复缓冲液, 于微波炉中温火8 min至沸腾, 停火8 min再次温火沸腾8 min行抗原修复, 自然冷却, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤5 min  $\times$  3次; 切片置于3%过氧化氢溶液中室温避光孵育30 min, 消除内源性过氧化物酶活性, PBS洗涤5 min  $\times$  3次; 滴加3%牛血清白蛋白(BSA), 37  $^{\circ}\text{C}$ 封闭30 min; 自封闭液中取出切片, 稍干后滴加兔抗 $\alpha$ -SMA多克隆抗体(1:200稀释), 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 切片于PBS中摇床洗涤, 5 min  $\times$  3次, 滴加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:200稀释), 室温孵育1 h; PBS洗涤切片5 min  $\times$  3次, 滴加DAB显色液至显微镜下可观察到棕褐色颗粒; 苏木素复染5 min, 自来水冲洗并经分化液分化2 s, 自来水冲洗, 苏木素返蓝60 s, 自来水冲洗; 常规脱水、封片, 显微镜下观察, 随机选取5个不相邻视野, 以IPP 6.0软件对阳性区域积

分光密度(OD)值进行分析。OD值越大,表明 $\alpha$ -SMA表达越高。实验重复3次取平均值。

1.6.5 HE染色观察肝脏病理变化 取固定于40 g/L多聚甲醛溶液中的肝脏组织,蒸馏水冲洗,常规脱水、透明、石蜡,于包埋机包埋,将包埋组织置于冰箱中冷冻,冷却后制作成厚度为4  $\mu$ m的连续切片。42  $^{\circ}$ C展片,82  $^{\circ}$ C烘烤3 h,常规脱蜡至水,苏木素染色5 min,自来水冲洗去除多余苏木素染色。随后,返蓝10 min,脱水、透明、封片,风干24 h,光学显微镜观察肝脏组织病理变化。

1.6.6 Western Blot法测定肝脏组织TGF- $\beta$ 1、Smad4、Smad7蛋白表达 取冷冻保存肝脏组织40 mg,充分匀浆后移至离心管;裂解液提取蛋白,二喹啉甲酸(BCA)试剂盒定量后配平;取40  $\mu$ g样本混合等量上样缓冲液,100  $^{\circ}$ C金属浴煮5 min,以12 000 r/min离心(离心半径8 cm)15 min;取上清,恒压电泳后以湿转法转至硝酸纤维素膜上,封闭液封闭2 h;加入兔抗TGF- $\beta$ 1(1:100稀释)、Smad4(1:50稀释)、Smad7(1:50稀释)一抗,4  $^{\circ}$ C摇床孵育过夜,TBST洗膜3次;加入山羊抗兔IgG二抗(1:1 000稀释),室温孵育2 h,TBST洗膜3次;加入电化学发光(ECL)显色剂于暗室中曝光,凝胶成像系统分析。以TGF- $\beta$ 1、

Smad4、Smad7灰度值与内参GAPDH灰度值的比值表示各目的蛋白表达量。实验重复3次取均值。

1.7 统计方法 采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多样本资料比较应用单因素方差分析。Levene检验方差齐时,以单因素方差分析比较均值,以LSD-*t*检验行两两比较。Levene检验方差不齐时,以Welch检验比较总体均值,以Dunnett's T3检验两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠肝功能指标比较 表1结果显示:血清AST、ALT、ALB水平组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与正常组比较,肝硬化组血清AST、ALT水平升高,ALB水平降低( $P < 0.05$ );与肝硬化组比较,激活剂组血清AST、ALT水平升高,ALB水平降低( $P < 0.05$ );与激活剂组比较,小檗碱组血清AST、ALT水平降低,ALB水平升高( $P < 0.05$ );与小檗碱组比较,激活剂+小檗碱组血清AST、ALT水平升高,ALB水平降低( $P < 0.05$ )。

表1 各组大鼠血清AST、ALT、ALB水平比较

Table 1 Comparison of serum AST, ALT and ALB levels of rats in various groups

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	AST(U·L <sup>-1</sup> )	ALT(U·L <sup>-1</sup> )	ALB(g·L <sup>-1</sup> )
正常组	10	70.54 $\pm$ 8.93	36.60 $\pm$ 5.59	35.20 $\pm$ 4.12
肝硬化组	10	177.30 $\pm$ 19.75 <sup>①</sup>	76.65 $\pm$ 8.51 <sup>①</sup>	23.65 $\pm$ 3.91 <sup>①</sup>
激活剂组	10	208.41 $\pm$ 23.57 <sup>①②</sup>	92.24 $\pm$ 10.33 <sup>①②</sup>	18.82 $\pm$ 2.25 <sup>①②</sup>
小檗碱组	10	112.52 $\pm$ 20.28 <sup>①②③</sup>	50.37 $\pm$ 6.60 <sup>①②③</sup>	30.30 $\pm$ 4.10 <sup>①②③</sup>
激活剂+小檗碱组	10	145.82 $\pm$ 26.62 <sup>①②③④</sup>	63.39 $\pm$ 8.55 <sup>①②③④</sup>	27.11 $\pm$ 2.30 <sup>①②③④</sup>
F值		67.838	72.404	32.872
P值		<0.001	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$ ,与正常组比较;② $P < 0.05$ ,与肝硬化组比较;③ $P < 0.05$ ,与激活剂组比较;④ $P < 0.05$ ,与小檗碱组比较

2.2 各组大鼠血清炎症因子水平比较 表2结果显示:血清IL-6、TNF- $\alpha$ 水平组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与正常组比较,肝硬化组血清IL-6、TNF- $\alpha$ 水平升高( $P < 0.05$ );与肝硬化组比较,激活剂组血清IL-6、TNF- $\alpha$ 水平升高( $P < 0.05$ );与激活剂组比较,小檗碱组血清IL-6、TNF- $\alpha$ 水平降低( $P < 0.05$ );与小檗碱组比较,激活剂+小檗碱组血清IL-6、TNF- $\alpha$ 水平升高( $P <$

0.05)。

2.3 各组大鼠肝纤维化程度比较 表3结果显示:血清IV-C、PC III、HA水平组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与正常组比较,肝硬化组血清IV-C、PC III、HA水平升高( $P < 0.05$ );与肝硬化组比较,激活剂组血清IV-C、PC III、HA水平升高( $P < 0.05$ );与激活剂组比较,小檗碱组血清IV-C、PC III、HA水平降低( $P < 0.05$ );与小

表2 各组大鼠血清IL-6、TNF- $\alpha$ 水平比较Table 2 Comparison of serum IL-6 and TNF- $\alpha$  levels of rats in various groups ( $\bar{x} \pm s$ , pg·mL<sup>-1</sup>)

组别	鼠数(只)	IL-6	TNF- $\alpha$
正常组	10	70.21 $\pm$ 9.45	18.57 $\pm$ 2.61
肝硬化组	10	209.56 $\pm$ 23.92 <sup>①</sup>	66.71 $\pm$ 8.52 <sup>①</sup>
激活剂组	10	251.40 $\pm$ 32.96 <sup>①②</sup>	79.95 $\pm$ 9.33 <sup>①②</sup>
小檗碱组	10	116.93 $\pm$ 18.50 <sup>①②③</sup>	32.80 $\pm$ 4.97 <sup>①②③</sup>
激活剂+小檗碱组	10	170.30 $\pm$ 21.14 <sup>①②③④</sup>	51.13 $\pm$ 6.80 <sup>①②③④</sup>
F值		102.316	129.588
P值		<0.001	<0.001

① $P < 0.05$ , 与正常组比较; ② $P < 0.05$ , 与肝硬化组比较; ③ $P < 0.05$ , 与激活剂组比较; ④ $P < 0.05$ , 与小檗碱组比较

小檗碱组比较, 激活剂+小檗碱组血清IV-C、PC III、HA水平升高( $P < 0.05$ )。

2.4 各组大鼠肝脏组织 $\alpha$ -SMA免疫组织化学染色结果比较 图1、表4结果显示: 正常组肝组织中仅可观察到少量棕色颗粒; 肝硬化组与激活剂组汇管区与胞浆中可观察到阳性颗粒显著增多; 与肝硬化组及激活剂组比较, 小檗碱组、激活剂+小檗碱组阳性颗粒显著减少。IOD值半定量分析结

果显示: IOD值组间比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与正常组比较, 肝硬化组IOD值升高( $P < 0.05$ ); 与肝硬化组比较, 激活剂组IOD值升高( $P < 0.05$ ); 与激活剂组比较, 小檗碱组IOD值升高降低( $P < 0.05$ ); 与小檗碱组比较, 激活剂+小檗碱组IOD值升高( $P < 0.05$ )。

2.5 各组大鼠肝脏组织病理变化比较 图2结果显示: 正常组肝细胞形态规则, 未观察到坏死、变性等病理改变, 肝窦无淤血, 肝板走行清晰、整齐, 汇管区无明显炎性细胞浸润、纤维性扩展; 肝硬化组与激活剂组肝细胞形态不规则, 部分发生肿胀及坏死, 并可观察到散在的空泡样脂肪变性, 汇管区及中央静脉区纤维性扩展, 伴有炎性细胞浸润, 汇管区-中央静脉、汇管区-汇管区形成粗大桥接纤维间隔及假小叶; 小檗碱组肝细胞形态基本规则, 部分肿胀、坏死, 肝索略模糊, 小叶结构尚存, 汇管区基本形成桥接纤维间隔, 少量炎性细胞浸润, 病理变化及纤维化程度较肝硬化组、激活剂组明显改善; 激活剂+小檗碱组病理变化及纤维化程度较肝硬化组、激活剂组有所改善, 但不及小檗碱组。

表3 各组大鼠血清IV-C、PC III、HA水平比较

Table 3 Comparison of serum IV-C, PC III and HA levels of rats in various groups ( $\bar{x} \pm s$ , ng·mL<sup>-1</sup>)

组别	鼠数(只)	IV-C	PC III	HA
正常组	10	2.01 $\pm$ 0.36	1.26 $\pm$ 0.22	5.17 $\pm$ 0.63
肝硬化组	10	14.95 $\pm$ 1.82 <sup>①</sup>	6.51 $\pm$ 0.75 <sup>①</sup>	24.30 $\pm$ 3.82 <sup>①</sup>
激活剂组	10	19.33 $\pm$ 2.14 <sup>①②</sup>	8.97 $\pm$ 1.04 <sup>①②</sup>	31.42 $\pm$ 4.95 <sup>①②</sup>
小檗碱组	10	6.23 $\pm$ 0.72 <sup>①②③</sup>	3.15 $\pm$ 0.43 <sup>①②③</sup>	12.54 $\pm$ 2.38 <sup>①②③</sup>
激活剂+小檗碱组	10	10.02 $\pm$ 1.86 <sup>①②③④</sup>	4.90 $\pm$ 0.55 <sup>①②③④</sup>	17.65 $\pm$ 2.09 <sup>①②③④</sup>
F值		196.167	203.291	104.518
P值		<0.001	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$ , 与正常组比较; ② $P < 0.05$ , 与肝硬化组比较; ③ $P < 0.05$ , 与激活剂组比较; ④ $P < 0.05$ , 与小檗碱组比较

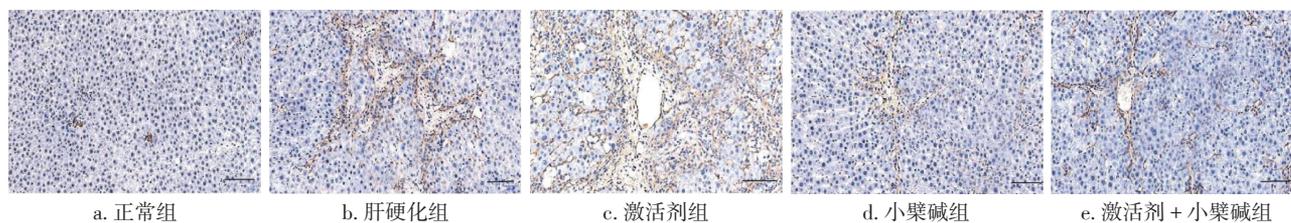
图1 各组大鼠肝组织 $\alpha$ -SMA阳性表达分布比较(免疫组织化学染色法,  $\times 200$ )Figure 1 Comparison of positive expression distribution of  $\alpha$ -SMA in liver tissues of rats in various groups (by Immunohistochemical staining,  $\times 200$ )

表 4 各组大鼠肝组织  $\alpha$ -SMA 的 IOD 值比较  
Table 4 Comparison of IOD value of  $\alpha$ -SMA in liver tissues of rats in various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	IOD 值
正常组	10	0.85 ± 0.12
肝硬化组	10	8.36 ± 0.85 <sup>①</sup>
激活剂组	10	10.22 ± 1.34 <sup>①②</sup>
小檗碱组	10	3.11 ± 0.52 <sup>①②③</sup>
激活剂 + 小檗碱组	10	5.30 ± 0.71 <sup>①②③④</sup>
F 值		218.512
P 值		<0.001

①P < 0.05, 与正常组比较; ②P < 0.05, 与肝硬化组比较; ③P < 0.05, 与激活剂组比较; ④P < 0.05, 与小檗碱组比较

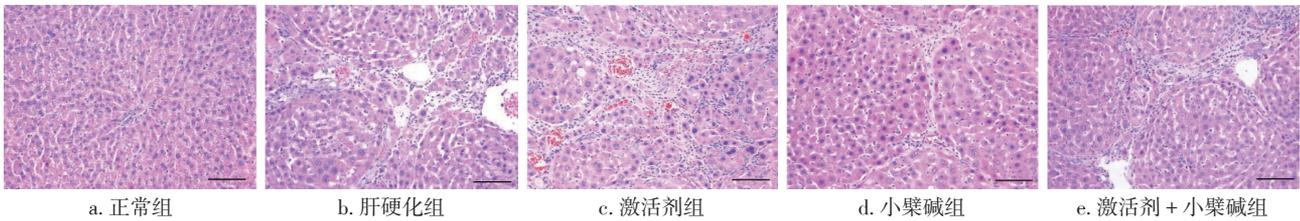


图 2 各组大鼠肝脏组织病理变化比较(HE 染色法, ×200)

Figure 2 Comparison of pathological changes of liver tissues of rats in various groups (by HE staining, ×200)

表 5 各组大鼠肝脏组织 TGF- $\beta$ 1、Smad4、Smad7 蛋白表达比较

Table 5 Comparison of protein expression of TGF- $\beta$ 1, Smad4 and Smad7 in liver tissues in various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	TGF- $\beta$ 1	Smad4	Smad7
正常组	10	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.59 ± 0.06
肝硬化组	10	0.71 ± 0.08 <sup>①</sup>	0.60 ± 0.07 <sup>①</sup>	0.20 ± 0.03 <sup>①</sup>
激活剂组	10	0.92 ± 0.08 <sup>①②</sup>	0.86 ± 0.09 <sup>①②</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>①②</sup>
小檗碱组	10	0.31 ± 0.04 <sup>①②③</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>①②③</sup>	0.40 ± 0.05 <sup>①②③</sup>
激活剂 + 小檗碱组	10	0.57 ± 0.06 <sup>①②③④</sup>	0.42 ± 0.05 <sup>①②③④</sup>	0.31 ± 0.04 <sup>①②③④</sup>
F 值		252.255	213.526	180.167
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

①P < 0.05, 与正常组比较; ②P < 0.05, 与肝硬化组比较; ③P < 0.05, 与激活剂组比较; ④P < 0.05, 与小檗碱组比较

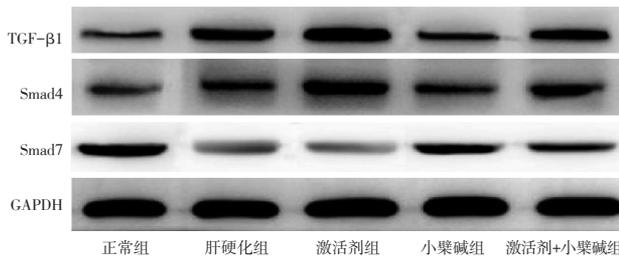


图 3 各组大鼠肝组织 TGF- $\beta$ 1、Smad4、Smad7 的 Western Blot 电泳条带图

Figure 3 Western Blot diagram of TGF- $\beta$ 1, Smad4, Smad7 protein expression in liver tissues of rats in various groups

2.6 各组大鼠肝脏组织 TGF- $\beta$ 1、Smad4、Smad7 蛋白表达比较 表 5、图 3 结果显示: TGF- $\beta$ 1、Smad4、Smad7 蛋白表达量组间比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与正常组比较, 肝硬化组 TGF- $\beta$ 1、Smad4 蛋白表达量升高, Smad7 蛋白表达量降低 ( $P < 0.05$ ); 与肝硬化组比较, 激活剂组 TGF- $\beta$ 1、Smad4 蛋白表达量升高, Smad7 蛋白表达量降低 ( $P < 0.05$ ); 与激活剂组比较, 小檗碱组 TGF- $\beta$ 1、Smad4 蛋白表达量降低, Smad7 蛋白表达量升高 ( $P < 0.05$ ); 与小檗碱组比较, 激活剂 + 小檗碱组 TGF- $\beta$ 1、Smad4 蛋白表达量升高, Smad7 蛋白表达量降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

肝硬化是一种或多种病因导致的一种弥漫性、进行性慢性炎症肝损伤, 以肝细胞大量变性、坏死及凋亡, 残留肝细胞形成再生结节, 结缔组织弥漫性增生、形成纤维隔等为主要病理改变, 进而形成假小叶并破坏肝小叶结构, 肝脏变形、变硬, 逐渐发展为肝硬化<sup>[14]</sup>。尽管临床已意识到早期干预肝硬化的必要性, 但由于其病因复杂, 尚缺少除肝移植以外的有效治疗方式<sup>[15]</sup>。肝纤维化是多种慢性肝病共同的病理特征, 且是向肝

硬化发展的必经途径。因此, 积极开发抑制肝纤维化及炎性反应药物是临床干预肝硬化的主要思路。

肝脏纤维化过程中生成大量胶原, 形成PC Ⅲ, 可反映Ⅲ型胶原合成情况, IV-C是基底膜的主要成分, 检测两者血清含量已成为判断肝硬化的重要指标。HA是一种由间质细胞合成的高分子多糖, 参与蛋白聚糖多糖体的形成, 具有维持组织体积、形态及抗压缩、抗张力等作用, 常作为肝脏疾病肝纤维化程度的血清标志物, 其与PC Ⅲ、IV-C的升高提示细胞外基质的降解减少或沉积增加。 $\alpha$ -SMA蛋白主要分布于肌成纤维细胞及平滑肌细胞中, 肝脏组织中仅活化的肝星状细胞可表达该蛋白, 因此其被视为肝星状细胞激活的标志物。本研究结果显示: 与正常组比较, 肝硬化组血清AST、ALT、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IV-C、PC Ⅲ、HA水平及 $\alpha$ -SMA IOD值升高, ALB水平降低( $P < 0.05$ ); 与肝硬化组比较, 激活剂组血清AST、ALT、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IV-C、PC Ⅲ、HA水平及 $\alpha$ -SMA IOD值升高, ALB水平降低( $P < 0.05$ ); 与激活剂组比较, 小檗碱组血清AST、ALT、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IV-C、PC Ⅲ、HA水平及 $\alpha$ -SMA IOD值降低, ALB水平升高( $P < 0.05$ ); 与小檗碱组比较, 激活剂+小檗碱组血清AST、ALT、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IV-C、PC Ⅲ、HA水平及 $\alpha$ -SMA IOD值升高, ALB水平降低( $P < 0.05$ )。HE染色结果亦显示, 相较于肝硬化组, 小檗碱组肝组织病理变化有所减轻。提示小檗碱可保护肝硬化大鼠肝功能, 抑制炎性反应, 促进胶原降解, 抑制肝纤维化。

TGF- $\beta$ 可诱导多种细胞基质胶原蛋白表达, 且是重要的促纤维化生长因子, 可导致肝、肺、肾等多种器官纤维化。TGF- $\beta$ 1是目前最重要的致肝纤维化细胞因子, 其通过自分泌、旁分泌等调控方式刺激肝星状细胞基质蛋白质过度合成、沉积, 引发纤维化与器官衰竭。Smads位于TGF- $\beta$ 信号通路下游, 其中Smad4是信号中转分子, 虽不直接与受体发生作用, 但可通过结合DNA调控相关因子的表达。Smad7是TGF- $\beta$ 信号通路的抑制元件, 可特异并竞争性结合TGF- $\beta$ 受体复合物, 阻断其对细胞质中Smads蛋白的激活作用, 进而抑制该细胞通路传导<sup>[16]</sup>。Yang等<sup>[17]</sup>研究显示, 阻断

TGF- $\beta$ 1/Smads信号通路可有效改善硫代乙酰胺注射液所致的大鼠肝纤维化, 抑制人肝星状细胞LX-2中胶原I、 $\alpha$ -SMA表达, 提示TGF- $\beta$ 1/Smads信号通路在治疗肝硬化中的潜力。SRI-011381是TGF- $\beta$ 1/Smads信号通路的特异性激活剂, 可通过强化TGF- $\beta$ 1信号传导提升该通路活性。本研究结果显示, 与正常组比较, 肝硬化组TGF- $\beta$ 1、Smad4蛋白表达量升高, Smad7蛋白表达量降低( $P < 0.05$ ); 与肝硬化组比较, 激活剂组TGF- $\beta$ 1、Smad4蛋白表达量升高, Smad7蛋白表达量降低( $P < 0.05$ ); 与激活剂组比较, 小檗碱组TGF- $\beta$ 1、Smad4蛋白表达量降低, Smad7蛋白表达量升高( $P < 0.05$ ); 与小檗碱组比较, 激活剂+小檗碱组TGF- $\beta$ 1、Smad4蛋白表达量升高, Smad7蛋白表达量降低( $P < 0.05$ )。提示SRI-011381的使用可导致肝硬化病程加重, 且在一定程度上减弱小檗碱的效果, 推测小檗碱对肝硬化大鼠的治疗作用可能是通过抑制TGF- $\beta$ 1/Smads信号通路来实现的。

综上所述, 小檗碱可抑制肝硬化大鼠炎性反应, 促进肝脏胶原降解, 降低肝纤维化程度, 保护肝功能, 其作用机制与抑制TGF- $\beta$ 1/Smads信号通路有关。

#### 参考文献:

- [1] BARNETT R. Liver cirrhosis[J]. Lancet, 2018, 392(10144): 275.
- [2] DREW L. Liver cirrhosis: scar wars[J]. Nature, 2018, 564(7736): S73.
- [3] STINE J G, INTAGLIATA N M, SHAH N L, et al. Clinical cirrhosis dilemmas: survey of practice from the 7th international coagulation in liver disease conference[J]. Dig Dis Sci, 2020, 65(5): 1334-1339.
- [4] WAROWICKA A, NAWROT R, GOŹDZICKA-JÓZEFIAK A. Antiviral activity of berberine[J]. Arch Virol, 2020, 165(9): 1935-1945.
- [5] HOU Q, HE W J, WU Y S, et al. Berberine: a traditional natural product with novel biological activities[J]. Altern Ther Health Med, 2020, 26(S2): 20-27.
- [6] LI S, WANG N, TAN H Y, et al. Modulation of gut microbiota mediates berberine-induced expansion of immunosuppressive cells to against alcoholic liver disease[J]. Clin Transl Med, 2020, 10(4): e112.
- [7] LU Z, HE B, CHEN Z, et al. Anti-inflammatory activity of berberine in non-alcoholic fatty liver disease via the Angptl2 pathway[J]. BMC Immunol, 2020, 21(1): 28.
- [8] FENG X, SUREDA A, JAFARI S, et al. Berberine in cardiovascular

- and metabolic diseases: from mechanisms to therapeutics [J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1923-1951.
- [9] LIN X, ZHANG N. Berberine: pathways to protect neurons [J]. *Phytother Res*, 2018, 32 (8): 1501-1510.
- [10] 雍陟, 沈曼茹, 高振军, 等. 小檗碱对肝硬化大鼠肠粘膜及肝脏保护作用的研究[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 20(5): 23-27.
- [11] 宾文婷, 常加松, 吴剑平. 四氯化碳加乙醇复合法诱导肝硬化大鼠模型的建立及验证[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(20): 3224-3229.
- [12] 段文彪, 吴伟斌, 张贵锋, 等. 鳖甲煎丸对肝硬化模型大鼠糖脂代谢紊乱和肝纤维化的影响[J]. *解剖学研究*, 2020, 42(4): 10-14+20.
- [13] 刘世政, 凌再芹, 林爱清. 小柴胡汤通过TGF- $\beta$ 1/Smad通路改善大鼠肝纤维化[J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 49(1): 58-62.
- [14] D' AMICO G, MORABITO A, D' AMICO M, et al. Clinical states of cirrhosis and competing risks [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(3): 563-576.
- [15] SMITH A, BAUMGARTNER K, BOSITIS C. Cirrhosis: diagnosis and management [J]. *Am Fam Physician*, 2019, 100(12): 759-770.
- [16] 廖丹, 江建宁. 肝纤维化形成的机制——信号转导通路TGF- $\beta$ /smad的作用概论[J]. *国外医学·流行病学传染病学分册*, 2004, 31(3): 170-172.
- [17] YANG H Y, KIM K S, LEE Y H, et al. *Dendropanax moribifera* ameliorates thioacetamide-induced hepatic fibrosis via TGF- $\beta$ 1/Smads pathways [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(4): 800-811.

【责任编辑：侯丽颖】

## 基于Wnt/ $\beta$ -catenin通路探讨益气活血方对急性心肌梗死大鼠心肌损伤的修复作用

李伟艺, 刘红松, 高山璞, 苏志强

(汉中市人民医院中医康复科, 陕西汉中 723000)

**摘要:**【目的】探讨益气活血方对急性心肌梗死(AMI)大鼠心肌损伤的修复作用及机制。【方法】将60只大鼠随机分为假手术组、模型组、中药组、Wnt-C59(Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路抑制剂)组, 每组15只。模型组、中药组、Wnt-C59组大鼠采用冠状动脉前降支结扎法建立AMI模型, 假手术组大鼠仅打开胸腔后缝合。成功造模后, 中药组大鼠灌胃益气活血方药液 $6.48\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , Wnt-C59组大鼠灌胃Wnt-C59 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , 假手术组和模型组大鼠灌胃0.9%氯化钠(NaCl)溶液 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 共4周。给药结束后, 评价大鼠心功能变化, 采用苏木素-伊红(HE)法和Masson染色法观察大鼠心肌组织病理学改变, 脱氧核糖核酸末端转移酶(TdT)介导的核苷酸(dUTP)缺口末端标记法(TUNEL)染色检测心肌细胞凋亡情况, 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(RT-qPCR)法检测心肌组织半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)、B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)mRNA表达, 酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测血清心肌损伤指标乳酸脱氢酶(LDH)、磷酸肌酸激酶(CK)、CK同工酶(CK-MB)的含量, 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测心肌组织Wnt3a、 $\beta$ -catenin及 $\beta$ -catenin靶基因细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、C-myc蛋白表达水平。【结果】与正常组比较, 模型组大鼠心功能显著降低, 出现明显心室扩张和重构, 心肌组织排列紊乱、纤维化明显、细胞凋亡增加, Caspase-3、Bax mRNA表达水平上调, Bcl-2 mRNA表达水平下调, 血清心肌损伤因子含量显著升高, 心肌组织Wnt3a、 $\beta$ -catenin、Cyclin D1、C-myc蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较, 中药组和Wnt-C59组大鼠心功能指标得到显著改善, 心肌组织排列较为整齐, 胶原纤维沉积减少, 细胞凋亡减少, Caspase-3、

收稿日期: 2021-04-17

作者简介: 李伟艺(1978-), 男, 中医主治医师; E-mail: f123my@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 8177052088)