

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2023.01.005

• 实验研究 •

抗纤软肝颗粒对肝纤维化大鼠 Hedgehog 通路核转录因子 Gli1 的影响*

张 爽¹ 江诗怡² 高 翔² 詹 磊² 陆定波^{2△}¹湖北中医药大学第一临床学院, 武汉 430061²湖北省中医院肝病科, 武汉 430074

摘要 目的 观察抗纤软肝颗粒对肝纤维化模型大鼠 Hedgehog 通路核转录因子 Gli1 的影响。
方法 将 60 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分成空白对照组, 模型组, 抗纤软肝颗粒低、中、高剂量组和环靶明对照组。除空白对照组外, 所有实验大鼠均以四氯化碳(CCl_4)复合因素法诱导肝纤维化模型 8 周。第 9 周开始给药干预, 抗纤软肝颗粒低、中、高剂量组分别给予 1.125 g/kg、2.5 g/kg、5 g/kg 相应药物灌胃, 环靶明对照组给 10 mg/kg 环靶明灌胃; 均连续灌胃 2 周, 灌胃期间造模继续。采用酶联免疫吸附试验检测各组大鼠肝功能指标及 I 型胶原水平; 采用 Gomori 银染法观察各组肝脏组织病理学改变; 采用 Real-time PCR 法检测各组大鼠肝组织 Gli1 mRNA 表达水平, Western-blot 法检测各组大鼠肝组织 Gli1 蛋白质表达水平, 免疫组化法检测各组大鼠肝组织 Gli1 表达。**结果** Gomori 银染显示, 模型组大鼠肝组织中胶原纤维广泛增生, 纤维间隔相互连接, 假小叶形成; 抗纤软肝颗粒各剂量组大鼠肝脏组织纤维化程度较模型组减轻, 但不如环靶明对照组。与模型组比较, 抗纤软肝颗粒中、高剂量组、环靶明组血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平显著降低($P < 0.05$), 且高剂量组显著低于低剂量组($P < 0.05$); 与模型组比较, 抗纤软肝颗粒低、中、高剂量组 I 型胶原含量明显降低($P < 0.01$), 且高剂量组明显低于低、中剂量组($P < 0.05$); 与环靶明对照组比较, 抗纤软肝颗粒高剂量组 ALT、AST 水平及 I 型胶原含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较, 抗纤软肝颗粒各剂量组 Gli1 mRNA 及蛋白表达均降低($P < 0.01$); 与环靶明对照组比较, 抗纤软肝颗粒中、高剂量组 Gli1 mRNA 差异无统计学意义($P > 0.05$), 而抗纤软肝颗粒各剂量组 Gli1 蛋白表达均增加($P < 0.05$)。免疫组化结果显示, 抗纤软肝颗粒各剂量组大鼠肝脏组织 Gli1 的表达较模型组出现不同程度减少, 其中以高剂量组减少最显著, 但各剂量组减少程度均不如环靶明对照组。**结论** 抗纤软肝颗粒对 CCl_4 复合因素法所致的大鼠肝纤维化有保护作用, 其作用机制可能与下调 Hedgehog 通路核转录因子 Gli1 有关。

关键词 肝纤维化; 抗纤软肝颗粒; Hedgehog 通路; Gli1

中图分类号 R575.2; R285.5 **文献标志码** A

Effect of Kangxian Ruangan Granule on the Nuclear Transcription Factor Gli1 of Hedgehog Pathway in Rats with Hepatic Fibrosis

ZHANG Shuang¹, JIANG Shiyi², GAO Xiang², ZHAN Lei², LU Dingbo²¹the First Clinical College, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China²Department of Hepatology, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430074, China

Abstract Objective To observe the effect of Kangxian Ruangan granule on the nuclear transcription factor Gli1 of Hedgehog pathway in rats with hepatic fibrosis. **Methods** Sixty SPF Wistar rats were randomly divided into blank control group, model group, low, middle and high dose groups of Kangxian Ruangan granule and cyclopam-

* 湖北省卫生厅中医药、中西医结合科研一般重点项目(No. 2012Z-Y01)

△通信作者, Corresponding author, E-mail: ludingbo64@163.com

ine control group. Except the blank control group, all experimental rats were induced by carbon tetrachloride(CCl_4) compound factor method for 8 weeks. At the 9th week, the drug administration intervention was started. The low, middle and high dose groups of Kangxian Ruangan granule were given corresponding drugs of 1.125 g/kg, 2.5 g/kg and 5 g/kg respectively by gavage, and the cyclopamine group was given 10 mg/kg of cyclopamine by gavage. The rats were gavaged continuously for 2 weeks, and the modeling continued during gavage. The liver function indexes and the level of type I collagen were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Gomori silver staining was used to observe the histopathological changes of liver in each group. Real-time PCR method was used to detect the expression level of Gli1 mRNA in liver tissue of rats in each group. Western-blot method and immunohistochemistry were used to detect the expression of Gli1 protein in liver tissue of rats in each group. **Results** Gomori silver staining showed that the collagen fibers in the liver tissues of rats in the model group were extensively proliferated. Besides, fiber septa were interconnected, and pseudolobules were formed. The degree of fibrosis in the liver histology of rats in each dose group of Kangxian Ruangan granule was less than that in the model group, but not as good as that in the cyclopamine control group. Compared with the model group, the levels of serum alanine aminotransferase(ALT) and aspartate aminotransferase(AST) in the middle and high dose groups of Kangxian Ruangan granule and the cyclopamine group were significantly decreased($P < 0.05$), and the high dose group was significantly lower than the low dose group($P < 0.05$). Compared with the model group, the content of type I collagen in the low, middle and high dose groups of Kangxian Ruangan granule were significantly decreased($P < 0.01$), and the high dose group was significantly lower than the low and middle dose groups($P < 0.05$). There was no significant difference in ALT, AST levels and type I collagen content between the high dose group and the cyclopamine control group($P > 0.05$). Compared with the model group, the mRNA and protein expression of Gli1 in each dose group of Kangxian Ruangan granule was decreased($P < 0.01$). There was no significant difference in Gli1 mRNA among the middle and high dose groups of Kangxian Ruangan granule and the cyclopamine control group($P > 0.05$), while the expression of Gli1 protein in each dose group of Kangxian Ruangan granule was increased($P < 0.05$). Immunohistochemical results showed that the expression of Gli1 in liver tissue of rats in each dose group of Kangxian Ruangan granule was reduced to varying degrees compared with the model group. Among them, the high dose group decreased the most significantly. However, the reduction degree of each dose group was not as good as that of the cyclopamine control group. **Conclusion** Kangxian Ruangan granule had a protective effect on hepatic fibrosis induced by CCl_4 compound factor method in rats, and its mechanism may be related to the down-regulation of nuclear transcription factor Gli1 in Hedgehog pathway.

Key words hepatic fibrosis; Kangxian Ruangan granule; Hedgehog pathway; Gli1

抗纤软肝颗粒系本院名中医肝病专家张赤志教授创立的经验方。张教授根据自己长期治疗肝硬化的经验和体会,认为肝纤维化是肝硬化“证未显现”阶段,痰瘀互结为其总病机,治疗当以化痰软坚、活血化瘀为法。前期临床观察发现,抗纤软肝颗粒对降低肝纤维化相关的血清学指标透明质酸酶(hyaluronidase, HA)、层黏连蛋白(laminin, LN)、Ⅲ型前胶原(procollagen type Ⅲ, PC-Ⅲ)、Ⅳ型胶原(type Ⅳ collagen, Ⅳ-C)等效果显著,对肝功能和肝脏硬度值亦有较明显改善^[1-2]。人肝星状细胞系 HSC-LX2 体外实验研究表明:抗纤软肝颗粒能够下调 HSC-LX2 细胞 Hedgehog(Hh)信号通路核转录因子 Gli1 表达,从而抑制肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化^[3],这可能是其减轻肝纤维化程度、延缓病程进展的作用机制之

一。为深入研究抗纤软肝颗粒在肝纤维化方面的治疗作用,本研究以四氯化碳(CCl_4)复合因素法诱导肝纤维化大鼠模型,探讨抗纤软肝颗粒对肝纤维化模型大鼠 Hedgehog 信号通路核转录因子 Gli1 的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要实验用品

1.1.1 实验动物 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 190 g~210 g,由湖北省实验动物研究中心提供,实验动物合格证号:SCXK(鄂)2015-0018。

1.1.2 药物及试剂 抗纤软肝颗粒(批准文号:鄂药制字 Z201313145),由海藻、醋鳖甲、牡蛎、莪术、丹参、净山楂、地骷髅等组成,由湖北省中医院制剂中心生

产,生药含量为 2 g/100 g;环靶明(S1146,美国 Selleckchem 公司)。丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)检测试剂盒(C073-a,长春汇力公司)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)检测试剂盒(C072-a,长春汇力公司);Gli1 兔多抗(DF7523,Affinity 公司)。

1.1.3 仪器设备 全自动生化分析仪(Chemray240, Rayto 公司),实时荧光定量 PCR 仪(QuantStudio 6, 美国 ABI 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物的造模与给药 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,标准饲料喂养,自由饮水。将大鼠随机分成 6 组,分别为空白对照组、模型组、环靶明对照组(10 mg/kg)、抗纤软肝颗粒低、中、高、剂量(1.125 g/kg、2.5 g/kg、5 g/kg)组,每组 10 只。除空白对照组外,所有实验大鼠采用 40% CCL₄ 橄榄油溶液行背部皮下注射造模,按 3 mL/kg/次的剂量(首次剂量为 5 mL/kg/次),每周 2 次;同时辅以低蛋白、低胆碱、高脂肪(饲料中含猪油 10%)、高胆固醇(饲料中含胆固醇 0.5%)饮食,造模 8 周。第 9 周开始灌胃给药,抗纤软肝颗粒低、中、高剂量组分别给予相应的药物及剂量灌胃,环靶明对照组给予环靶明灌胃。按大鼠体质量灌胃,灌

胃容量为 10 mL/kg,1 次/d,连续 2 周(灌胃期间继续给予 40% CCL₄ 橄榄油溶液皮下注射)。

1.2.2 动物处置及标本制备 第 10 周末处死大鼠。末次给药后,禁食不禁水 12 h,大鼠称重后以 10%水合氯醛进行麻醉,腹主动脉取血后,颈椎脱臼处死,手术摘取肝脏,用预冷的生理盐水清洗,拭干,称重。将收集的全血离心分离血清,置于-20℃冰箱保存备用。取大鼠左叶肝脏约 1 cm×1 cm×1 cm 大小固定于 4%多聚甲醛固定液中,以制备石蜡切片,余下肝组织置于-80℃液氮速冻保存备测。

1.2.3 肝脏组织病理检测 采用 Gomori 银染法观察各组肝脏组织病理学改变。

1.2.4 肝功能指标检测 采用酶联免疫吸附试验检测各组大鼠血清 ALT、AST、I 型胶原水平。

1.2.5 肝脏组织 Gli1 mRNA 及蛋白质表达水平检测 Real-time PCR 法检测各组大鼠肝组织 Gli1 mRNA 表达水平,引物序列见表 1。反应条件为 50℃ 2 min,95℃ 10 min;95℃ 30 sec,60℃ 30 sec,40 cycles;绘制溶解曲线,采用 2^{-ΔΔCt} 方法分析目的基因 mRNA 相对表达量。Western-blot 法检测各组大鼠肝组织 Gli1 蛋白质表达水平。免疫组化法检测各组大鼠肝组织 Gli1 表达。

表 1 引物序列

基因名		引物序列(5'→3')	产物大小
Gli1	Forward	TATGTCAGGGTCCCAGGGTTATG	112 bp
	Reverse	GAGCCCGCGCTTCTTAGTCAGTTTG	
GAPDH	Forward	ACAGCAACAGGGTGGTGAC	253 bp
	Reverse	TTGAGGGTGCAGCGAACTT	

1.3 统计学方法

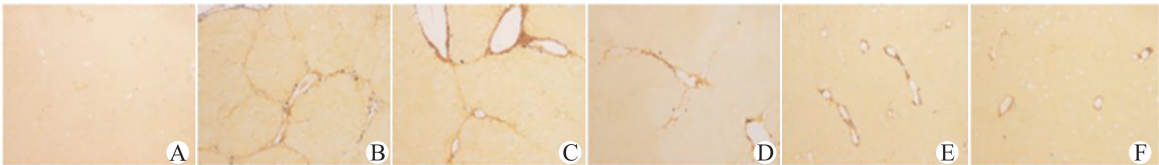
采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据统计分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏组织病理学改变

Gomori 银染后,空白对照组可见肝小叶结构完

整、肝细胞排列整齐;而模型组大鼠肝组织中胶原纤维广泛增生,纤维间隔相互连接,假小叶形成;环靶明对照组大鼠肝细胞无显著纤维化,且肝小叶相对结构完整、肝细胞排列相对整齐;随着抗纤软肝颗粒浓度的升高,抗纤软肝颗粒各剂量组大鼠肝细胞纤维化程度依次逐渐减轻,但各剂量组改善幅度均低于环靶明对照组。见图 1。



A:空白对照组;B:模型组;C:抗纤软肝颗粒低剂量组;D:抗纤软肝颗粒中剂量组;E:抗纤软肝颗粒高剂量组;F:环靶明对照组。

图 1 各组大鼠肝组织 Gomori 银染图(×100)

2.2 各组大鼠肝功能指标及 I 型胶原变化

与空白对照组比较,模型组、抗纤软肝颗粒低剂量组 ALT、AST 水平均显著增高($P<0.01$),而抗纤软肝颗粒中、高剂量组 ALT、AST 水平差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,抗纤软肝颗粒中、高剂量组、环靶明组 ALT、AST 水平均显著降低($P<0.05$),且高剂量组显著低于低剂量组($P<0.05$);与环靶明对照组比较,抗纤软肝颗粒高剂量组 ALT、

AST 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

与空白对照组比较,模型组及抗纤软肝颗粒各剂量组 I 型胶原含量均有明显升高($P<0.05$);与模型组比较,抗纤软肝颗粒低、中、高剂量组 I 型胶原含量明显降低($P<0.01$),其中与低、中剂量组相比,高剂量组降低更为明显($P<0.05$);与环靶明对照组比较,抗纤软肝颗粒高剂量组 I 型胶原含量差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠 ALT、AST、I 型胶原变化($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	I 型胶原(ng/mL)
空白对照组	72.30±11.13	121.14±12.07	19.48±2.73
模型组	124.34±17.43**	181.00±19.86**	56.06±6.13**
抗纤软肝颗粒低剂量组	107.14±9.38**▲	155.59±14.89**▲	42.39±4.84**△▲
抗纤软肝颗粒中剂量组	95.90±16.52▲	137.82±20.49△▲	34.41±2.23**△▲□
抗纤软肝颗粒高剂量组	80.05±13.88△□	111.74±11.61△□	27.47±2.34*△□■
环靶明对照组	67.14±9.95△	97.57±6.29△	22.88±2.31△

与空白对照组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与环靶明对照组比较▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与抗纤软肝颗粒低剂量组比较□ $P<0.05$,□□ $P<0.01$;与抗纤软肝颗粒中剂量组比较■ $P<0.05$,■■ $P<0.01$

2.3 各组大鼠肝组织 Gli1 mRNA 及蛋白表达

Real-time PCR 检测结果:与空白对照组比较,模型组、抗纤软肝颗粒低剂量组大鼠肝组织 Gli1 mRNA 均增高($P<0.01$),而抗纤软肝颗粒中、高剂量组 Gli1 mRNA 差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,抗纤软肝颗粒低、中、高剂量组 Gli1 mRNA 均降低($P<0.01$);与环靶明对照组比较,抗纤软肝颗粒中、高剂量组 Gli1 mRNA 差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

Western-blot 检测结果:与空白对照组相比,模型组、抗纤软肝颗粒低、中、高剂量组 Gli1 蛋白表达均增高($P<0.01$);与模型组比较,抗纤软肝颗粒低、中、高

剂量组 Gli1 蛋白表达量均降低($P<0.01$),其降低程度依剂量呈正相关;与环靶明对照组比较,抗纤软肝颗粒低、中、高剂量组 Gli1 蛋白表达均增加($P<0.05$),且增加程度依剂量呈负相关。见图 2 及表 3。

Gli1 免疫组化结果:空白对照组大鼠肝脏组织 Gli1 着色较浅,仅有微量表达;模型组大鼠肝脏组织 Gli1 着色较深,汇集大量 Gli1。环靶明对照组大鼠较模型组而言,Gli1 着色明显变浅,Gli1 表达明显减弱。在抗纤软肝颗粒的干预下,各剂量组大鼠肝脏组织 Gli1 的表达较模型组出现不同程度减轻,其中以高剂量组改善最显著,但各剂量改善幅度均低于环靶明对照组。见图 3。

表 3 各组大鼠肝组织 Gli1 mRNA 及蛋白表达比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Gli1 mRNA 相对表达量	Gli1 蛋白质相对表达量
空白对照组	0.897±0.100	0.109±0.023
模型组	5.535±0.998**	0.705±0.061**
抗纤软肝颗粒低剂量组	2.435±0.225**△▲	0.575±0.041**△▲
抗纤软肝颗粒中剂量组	1.572±0.160△	0.468±0.039**△▲□
抗纤软肝颗粒高剂量组	1.339±0.055△	0.273±0.024**△▲□■
环靶明对照组	1.239±0.042△	0.169±0.010△

与空白对照组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与环靶明对照组比较▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与抗纤软肝颗粒低剂量组比较□ $P<0.05$,□□ $P<0.01$;与抗纤软肝颗粒中剂量组比较■ $P<0.05$,■■ $P<0.01$

- 2017,8:1450.
- [6] Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog signal transduction network[J]. *Sci Signal*, 2012, 5(246):re6.
- [7] 罗秀芳, 陈菊屏. Hedgehog 信号通路与纤维化疾病的研究进展[J]. *现代临床医学*, 2016, 42(2):99-101.
- [8] 孙艳. 2,5-己二酮致人卵巢颗粒细胞凋亡及 Sonic hedgehog 信号通路调控机制的研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2012.
- [9] Jiayuan S, Junyan Y, Xiangzhen W, et al. Gant61 ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis by inhibition of Hedgehog signaling activity[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 387:114853.
- [10] Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the hedgehog signaling pathway[J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(18):6613-6624.
- [11] Lee ST, Welch KD, Panter KE, et al. Cyclopamine: from cyclops lambs to cancer treatment[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(30):7355-7362.
- [12] 程良斌. 张赤志教授从痰论治肝硬化的经验[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2011, 21(2):108-109.
- [13] 王祺瑶, 卢畅, 彭婵妮, 等. 海藻岩藻多糖抗肿瘤活性研究新进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(7):2043-2050.
- [14] Tang Y, Hu C, Liu Y. Effect of bioactive peptide of Carapax Trionycis on TGF- β 1-induced intracellular events in hepatic stellate cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(1):69-73.
- [15] Hu Z, You P, Xiong S, et al. Carapax Trionycis extracts inhibit fibrogenesis of activated hepatic stellate cells via TGF- β 1/Smad and NF- κ B signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95:11-17.
- [16] Sun H, Chen G, Wen B, et al. Oligo-peptide I-C-F-6 inhibits hepatic stellate cell activation and ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis by suppressing NF- κ B signaling and Wnt/ β -catenin signaling[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 136(3):133-141.
- [17] 杨勇进, 张翠萍, 张民生, 等. 牡蛎提取物对酒精性肝损伤大鼠 IL-17 与 TNF- α 的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(2):177-180.
- [18] Gupta SC, Patchva S, Koh W, et al. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(3):283-299.
- [19] 戴新新, 宿树兰, 郭盛, 等. 丹参酮类成分的生物活性与应用开发研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(7):1442-1448.
- [20] 乔靖怡, 李汉伟, 付双楠, 等. 山楂总黄酮对四氯化碳致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(5):52-55.

(收稿日期: 2022-09-19)

(上接第 12 页)

- [14] Rossetti HC, Lacritz LH, Cullum CM, et al. Normative data for the Montreal cognitive assessment (MoCA) in a population-based sample[J]. *Neurology*, 2011, 77(13):1272-1275.
- [15] 杨蓉, 陆媛, 葛许华, 等. 轻度认知障碍的中医治疗及预防进展[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2019, 27(6):74-77.
- [16] 王威, 第五永长, 杨谦, 等. 轻度认知障碍与老年期痴呆患者中医证候要素及影响因素的横断面调查[J]. *中医杂志*, 2022, 63(11):1064-1072.
- [17] 骆进, 杨志新. 卒中后血管性轻度认知功能障碍的中医证候及其相关因素分析[J]. *中医药临床杂志*, 2019, 31(9):1682-1685.
- [18] 王凌雪, 李双阳, 梁岚, 等. 血管性认知障碍的中西医结合治疗进展[J]. *实用中医内科杂志*, 2020, 34(3):90-94.
- [19] Nakao S, Yamamoto T, Kimura S, et al. Brain white matter lesions and postoperative cognitive dysfunction: a review[J]. *J Anesth*, 2019, 33(2):336-340.
- [20] Barry Erhardt E, Pesko JC, Prestopnik J, et al. Biomarkers identify the Binswanger type of vascular cognitive impairment[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(8):1602-1612.
- [21] Li M, Hu X, Fan Y, et al. Hyperuricemia and the risk for coronary heart disease morbidity and mortality a systematic review and dose-response meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:19520.

(收稿日期: 2022-09-05)