

小柴胡汤通过 TGF- β 1/Smad 通路改善大鼠肝纤维化

刘世政, 凌再芹, 林爱清

(山东省胸科医院, 山东省济南市 250000)

[关键词] 肝纤维化; 小柴胡汤; TGF- β 1/Smad 通路; 大鼠

[摘要] **目的** 研究小柴胡汤通过转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)/Smad 通路改善大鼠肝纤维化的作用及机制。**方法** 雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、中药组、中药+SRI 组, 采用四氯化碳皮下注射的方式建立大鼠肝纤维化模型, 给与小柴胡汤灌胃及 Smad2/3 激活剂 SRI-011381 腹腔注射干预。比较各组大鼠肝脏病理改变、血清天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、白蛋白 (ALB)、透明质酸 (HA)、层粘连蛋白 (LN)、Ⅲ型前胶原 (PCⅢ) 含量, 以及肝脏中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 表达的差异。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠出现了典型的肝纤维化病理改变, 血清中 ALB 的含量降低, 血清中 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ 的含量及肝脏中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的表达水平增加; 与模型组比较, 中药组大鼠肝纤维化的病理改变减轻, 血清中 ALB 的含量增加, 血清中 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ 的含量及肝脏中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的表达水平降低; 与中药组比较, 中药+SRI 组大鼠肝纤维化的病理改变加重, 血清中 ALB 的含量降低, 血清中 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ 的含量及肝脏中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的表达水平增加。**结论** 小柴胡汤能够改善大鼠的肝纤维化, 抑制 TGF- β 1/Smad 通路是介导这一改善作用可能的分子机制。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Xiaochaihu decoction improves rat liver fibrosis through TGF- β 1/Smad pathway

LIU Shizheng, LING Zaiqin, LIN Aiqing

(Shandong Chest Hospital, Jinan, Shandong 250000, China)

[KEY WORDS] liver fibrosis; Xiaochaihu decoction; TGF- β 1/Smad pathway; rat

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect and mechanism of Xiaochaihu decoction on improving liver fibrosis in rats through TGF- β 1/Smad pathway. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group, model group, TCM group and TCM+SRI group. The liver fibrosis model of rats was established by subcutaneous injection of carbon tetrachloride, then intragastric administration of Xiaochaihu decoction and intraperitoneal administration of Smad2/3 activator SRI-011381 were given for intervention. The liver pathological changes, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin (ALB), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen Ⅲ (PCⅢ) in serum and TGF- β 1, Smad2 and Smad3 expression in liver were compared among the four groups. **Results** Compared with the control group, the model group showed typical pathological changes of liver fibrosis, the content of ALB in serum decreased, the content of ALT, AST, HA, LN, PCⅢ in serum and the expression level of TGF- β 1, Smad2, Smad3 in liver increased; compared with the model group, the pathological changes of liver fibrosis in the TCM group improved, the content of ALB in serum increased, the content of ALT, AST, HA, LN, PCⅢ in serum and the expression level of TGF- β 1, Smad2, Smad3 in liver decreased; compared with the TCM group, the pathological changes of liver fibrosis in the TCM+SRI group aggravated, the content of ALB in serum decreased, the content of ALT, AST, HA, LN, PCⅢ in serum and the expression level of TGF- β 1, Smad2, Smad3 in liver increased. **Conclusion** Xiaochaihu decoction can improve the liver fibrosis of rats, and the inhibition of TGF- β 1/Smad pathway is a possible molecular mechanism.

[收稿日期] 2020-10-22

[修回日期] 2020-12-11

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(2019WS527)

[作者简介] 刘世政, 硕士, 主治医师, 研究方向为消化系统疾病, E-mail 为 taonengl27795@163.com。通信作者林爱清, 硕士, 主治医师, 研究方向为呼吸与重症, E-mail 为 linaiqing8225@163.com。

肝纤维化是肝硬化发生发展过程中重要的病理改变,延缓或逆转肝纤维化是防治肝硬化的重要靶点之一。转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 是促进肝纤维化的关键细胞因子,与细胞膜上的受体结合后能够激活细胞内的 Smad2、Smad3,进而调节胶原代谢、促进纤维化^[1]。有研究报道,多种具有抗纤维化作用的药物能够抑制 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路的激活^[2-3]。

小柴胡汤是具有护肝作用的经典中药汤剂,出自《伤寒杂病论》,主要成分柴胡、黄芩均具有护肝、抗炎及抗氧化的作用。有相关动物实验报道,小柴胡汤能够改善肝纤维化大鼠的肝功能及胶原纤维堆积^[4-5];细胞实验报道,小柴胡汤含药血清能够抑制肝星状细胞增殖活化、阻碍 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路的激活^[6]。但是,小柴胡汤是否直接通过 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路改善大鼠肝纤维化尚不清楚。因此,本实验以大鼠肝纤维化模型为研究对象,研究小柴胡汤通过 TGF- $\beta 1$ /Smad 通路改善大鼠肝纤维化的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

小柴胡汤由本院中药房配置,药液的生药含量为 5 g/mL,4℃ 保存备用;四氯化碳购自 Sigma 公司;Smad2/3 激活剂 SRI-011381 购自 MCE 公司;天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate amino transferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine amino transferase, ALT)、白蛋白 (albumin, ALB) 检测试剂盒购自南京建成研究所,透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白 (laminin, LN)、Ⅲ型前胶原 (procollagen Ⅲ, PC Ⅲ) 的酶联免疫吸附试剂盒购自上海西唐公司;RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、PCR 试剂盒均购自北京康为世纪公司,RIPA 裂解液、BCA 试剂盒购自北京索莱宝公司,TGF- $\beta 1$ 、Smad2、Smad3 一抗购自 Abcam 公司。

1.2 动物分组

雄性 SD 大鼠 (上海菲诺克生物科技有限公司),8~10 周、160~200 g,生产许可 SCXK (沪) 2018-0005。32 只大鼠随机均分为对照组、模型组、中药组、中药+SRI 组,后 3 组进行肝纤维化造模,方法如下:用植物油配置含有 40% 四氯化碳的溶液,按照 0.15 mL/100 g 剂量皮下注射,2 次/周 (第 1~4 周),而后改为 0.2 mL/100 g 剂量皮下注射,2 次/周 (第 5~6 周)。中药组、中药+SRI 组在造模过程

中给与小柴胡汤 44.5 g/kg 灌胃,1 次/天;中药+SRI 组同时给与 30 mg/kg SRI-011381 腹腔注射,1 次/天;对照组和模型组给与等剂量生理盐水灌胃。

1.3 肝脏病理改变的检测

末次干预后第 2 天,断头法处死大鼠,解剖肝脏,4% 多聚甲醛固定 48 h 后石蜡包埋,切片后进行 HE 染色,在显微镜下观察肝脏的病理改变。

1.4 血清指标的检测

断头法处死大鼠时采集外周血 4~5 mL,静置 0.5 h 后自然凝血,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清后采用试剂盒检测 ALB、ALT、AST、HA、LN、PC Ⅲ 的含量,均按照试剂盒说明书进行操作。

1.5 PCR 检测肝脏 TGF- $\beta 1$ 、Smad2、Smad3 mRNA 表达

取肝脏组织适量,采用 RNA 提取试剂盒提取组织中的 RNA,采用 cDNA 第一链合成试剂盒配置反转录反应体系,将 RNA 反转录为 cDNA,采用 PCR 试剂盒配置 PCR 反应体系,对 TGF- $\beta 1$ 、Smad2、Smad3、 β -actin cDNA 进行 PCR 反应,得到循环曲线及对应的循环阈值 (Ct),以 β -actin 为内参,按照公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 TGF- $\beta 1$ 、Smad2、Smad3 的 mRNA 表达水平。

1.6 Western blot 检测肝脏 TGF- $\beta 1$ 、Smad2、Smad3 蛋白表达

取肝脏组织适量,采用 RIPA 裂解液提取组织中的蛋白,采用 BCA 法检测蛋白含量,而后取 30 μ g 蛋白与上样缓冲液混合,煮沸变性后进行 Western blot 检测。先进行电泳分离蛋白,而后将蛋白电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 PVDF 膜 1 h,1:1 000 稀释的 TGF- $\beta 1$ 、Smad2、Smad3 一抗或 1:5 000 稀释的 β -actin 一抗 4℃ 孵育 PVDF 膜过夜;次日,1:2 000 稀释的二抗室温孵育 PVDF 膜 1 h,最后在凝胶成像仪中显影得到蛋白条带,根据条带的吸光值、以 β -actin 为内参,计算 TGF- $\beta 1$ 、Smad2、Smad3 蛋白表达水平。

1.7 统计学方法

采用 SPSS21.0 软件录入数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间计量资料的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏病理改变的比较

从图 1 可见,对照组大鼠肝脏内小叶结构清晰、肝细胞排列整齐;模型组大鼠肝脏内小叶结构破

坏、肝细胞广泛脂肪变性及空泡变性,汇管区纤维结缔组织增生;中药组大鼠肝纤维化的病理改变较

模型组明显改善;中药+SRI 组大鼠肝纤维化的病理改变较中药组明显加重。

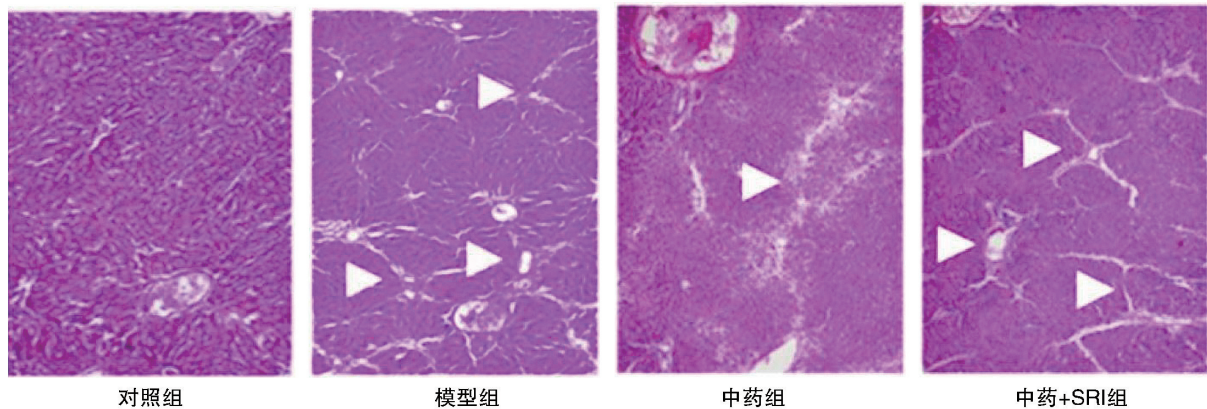


图1 各组大鼠肝脏病理改变(HE染色,400×)
白色箭头为增生的纤维结缔组织。

2.2 各组大鼠血清肝功能指标的比较

从表1可见,与对照组比较,模型组大鼠血清ALB含量明显降低,ALT、AST含量明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,中药组大鼠血清ALB含量明显增加,ALT、AST含量明显降低($P < 0.05$);与中药组比较,中药+SRI组大鼠血清ALB含量明显降低,ALT、AST含量明显增加($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠血清ALB、ALT、AST含量的比较($n=8$)

分组	ALB/(g/L)	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
对照组	34.95±4.85	36.58±7.84	32.47±6.91
模型组	26.22±3.48 ^a	162.38±22.85 ^a	150.28±24.85 ^a
中药组	32.94±3.11 ^b	56.47±8.28 ^b	49.59±8.18 ^b
中药+SRI组	27.51±2.84 ^c	121.37±17.68 ^c	132.75±17.28 ^c

注:a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与模型组比较;c为 $P < 0.05$,与中药组比较。

2.3 各组大鼠血清肝纤维化指标的比较

从表2可见,与对照组比较,模型组大鼠血清HA、LN、PCⅢ含量明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,中药组大鼠血清HA、LN、PCⅢ含量明显降低($P < 0.05$);与中药组比较,中药+SRI组大鼠血清HA、LN、PCⅢ含量明显增加($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠肝脏中TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA表达的比较

从表3可见,与对照组比较,模型组大鼠肝脏中TGF-β1、Smad2、Smad3的mRNA表达水平明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,中药组大鼠肝脏中TGF-β1、Smad2、Smad3的mRNA表达水平明显降低($P < 0.05$);与中药组比较,中药+SRI组大鼠肝脏中

0.05);与中药组比较,中药+SRI组大鼠肝脏中TGF-β1、Smad2、Smad3的mRNA表达水平明显增加($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠血清HA、LN、PCⅢ含量的比较($n=8$)

分组	HA/(mg/L)	LN/(μg/L)	PCⅢ/(μg/L)
对照组	7.85±1.15	71.94±12.62	8.93±1.35
模型组	14.42±3.42 ^a	129.63±32.45 ^a	22.73±4.58 ^a
中药组	9.28±1.45 ^b	80.14±11.73 ^b	11.75±2.06 ^b
中药+SRI组	14.29±2.74 ^c	120.37±25.28 ^c	19.75±3.27 ^c

注:a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与模型组比较;c为 $P < 0.05$,与中药组比较。

表3 各组大鼠肝脏中TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA表达的比较($n=8$)

分组	TGF-β1	Smad2	Smad3
对照组	1.00±0.18	1.00±0.21	1.00±0.18
模型组	2.09±0.32 ^a	2.21±0.34 ^a	1.89±0.34 ^a
中药组	1.14±0.19 ^b	1.30±0.25 ^b	1.21±0.22 ^b
中药+SRI组	1.78±0.15 ^c	1.91±0.25 ^c	1.81±0.29 ^c

注:a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与模型组比较;c为 $P < 0.05$,与中药组比较。

2.5 各组大鼠肝脏中TGF-β1、Smad2、Smad3蛋白表达的比较

从图2和表4可见,与对照组比较,模型组大鼠肝脏中TGF-β1、Smad2、Smad3的蛋白表达水平明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,中药组大鼠肝脏中TGF-β1、Smad2、Smad3的蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);与中药组比较,中药+SRI组大鼠肝脏中

TGF- β 1 的蛋白表达水平无明显变化, Smad2、Smad3 的蛋白表达水平明显增加($P<0.05$)。

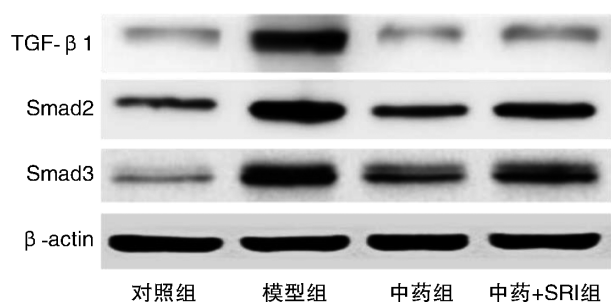


图 2 各组大鼠肝脏中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的蛋白表达

表 4 各组大鼠肝脏中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 蛋白表达的比较($n=8$)

分组	TGF- β 1	Smad2	Smad3
对照组	0.32 $\pm$ 0.08	0.45 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.05
模型组	0.92 $\pm$ 0.21 ^a	0.96 $\pm$ 0.18 ^a	0.86 $\pm$ 0.16 ^a
中药组	0.35 $\pm$ 0.07 ^b	0.51 $\pm$ 0.08 ^b	0.41 $\pm$ 0.08 ^b
中药+SRI 组	0.33 $\pm$ 0.06	0.77 $\pm$ 0.10 ^c	0.72 $\pm$ 0.11 ^c

注: a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较; c 为 $P<0.05$, 与中药组比较。

3 讨论

肝纤维化是肝硬化发生发展过程中重要的病理改变, 延缓或逆转肝纤维化的进程是肝硬化有效的防治策略。近些年, 多种中药汤剂被证实具有改善肝纤维化的作用^[7-8], 其中小柴胡汤是具有抗纤维化、改善肝功能作用的经典中药方剂, 该方剂由柴胡、黄芩、人参、甘草、生姜、大枣、半夏等 7 味中药组成, 功效为和解少阳、扶正祛邪。肝星状细胞在炎症及氧化应激等因素的刺激下发生活化是促进肝纤维化的重要环节, 多项现代药理学研究证实, 柴胡和黄芩中的活性成分能够抑制肝星状细胞活化、抑制炎症及氧化应激反应^[9-10]; 胡睿等^[6]细胞实验表明, 小柴胡汤的含药血清能够抑制肝星状细胞活化, 进而起到抑制肝纤维化的作用。基于此, 本研究提出假设: 小柴胡汤可能具有改善肝纤维化的作用。

为了验证假设, 本实验通过经典的四氯化碳皮下注射方式进行肝纤维化造模, 用以模拟肝硬化发病过程中肝纤维化的病理改变。造模后观察肝脏 HE 染色变化可知: 肝脏出现了小叶结构破坏、肝细胞广泛脂肪变性、空泡变性、汇管区纤维结缔组

织增生等肝硬化及肝纤维化特征性的病理改变, 表明造模成功。在四氯化碳皮下注射造模的过程中, 给与小柴胡汤灌胃干预后观察到肝脏纤维化的病理改变较模型组明显改善, 表明小柴胡汤能够改善大鼠的肝纤维化, 与小柴胡汤含药血清在体外抑制肝星状细胞活化的作用^[6]吻合。

在肝纤维化的进程中, 肝细胞发生损伤和破坏, 细胞外基质中胶原代谢异常、纤维结缔组织增生并形成了组织纤维化。多项肝纤维化相关的临床和基础研究表明, 肝细胞的损伤和破坏会减少 ALB 的合成, 增加 ALT、AST 的释放; 在胶原代谢异常、纤维结缔组织增生的过程中, HA、LN、PC III 的合成和释放明显增多^[11-13]。本实验观察到: 模型组大鼠血清 ALB 含量降低, ALT、AST、HA、LN、PC III 含量均增多。加用小柴胡汤灌胃干预后, 大鼠血清 ALB 含量增加, ALT、AST、HA、LN、PC III 含量均降低, 表明小柴胡汤干预能够减轻肝损害、改善肝纤维化, 与 HE 染色观察到的病理改变吻合。

TGF- β 1 是促进肝纤维化的关键细胞因子, 能够通过下游 Smad2、Smad3 进行信号转导并刺激肝星状细胞活化, 进而引起下游蛋白酶及其抑制物表达变化并促进肝纤维化的发生^[14-17]。已有细胞研究表明, 小柴胡汤显著抑制肝星状细胞中 TGF- β 1/Smad 通路的激活^[6]。本实验观察到: 模型组大鼠肝脏中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的表达增加, 而小柴胡汤干预后 TGF- β 1、Smad2、Smad3 的表达减少, 表明肝硬化大鼠存在肝脏 TGF- β 1/Smad 通路的激活, 小柴胡汤则能抑制肝脏 TGF- β 1/Smad 通路的激活。在此基础上, 小柴胡汤灌胃的同时联合使用 Smad2/3 激活剂 SRI-011381 后观察到: 大鼠肝纤维化的病理改变加重, 小柴胡汤调节血清指标的作用也明显减弱, 表明 Smad2/3 激活剂逆转了小柴胡汤抑制大鼠肝纤维化的作用, 进而提示小柴胡汤通过 TGF- β 1/Smad 通路发挥抗肝纤维化的作用。

综上所述, 小柴胡汤能够改善大鼠的肝纤维化, 抑制 TGF- β 1/Smad 通路是介导这一改善作用可能的分子机制, 未来小柴胡汤有望成为防治肝硬化、延缓肝纤维化的备选药物。

【参考文献】

- [1] Xu S, Mao Y, Wu J, et al. TGF- β /Smad and JAK/STAT pathways are involved in the anti-fibrotic effects of propylene glycol alginate sodium sulphate on hepatic fibrosis [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(9): 5224-5237.
- [2] Gong Y, Yang Y. Activation of Nrf2/AREs-mediated an-

- tioxidant signalling, and suppression of profibrotic TGF- β 1/Smad3 pathway: a promising therapeutic strategy for hepatic fibrosis-A review[J]. *Life Sci*, 2020, 5(256): 117909.
- [3] Guo XX, Yang WN, Dong BS, et al. Glycyrrhetic Acid-Induced miR-663a alleviates hepatic stellate cell activation by attenuating the TGF- β /Smad signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 11(2020): 3156267.
- [4] 张健, 杨雪亮, 张曦, 等. 小柴胡汤对实验性肝损伤大鼠的保护作用研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(20): 2147-2151.
- [5] 李晋, 徐尚福, 李远洋, 等. 小柴胡汤对肝纤维化大鼠肝脏 MMP-2, TIMP-2 表达的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(5): 1066-1068.
- [6] 胡睿, 朱志伟, 吴栋清, 等. 小柴胡汤含药血清对 HSC-T6 细胞增殖及 TGF- β /Smad 信号通路的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(9): 2149-2152.
- [7] Zhou Y, Wu R, Cai FF, et al. Xiaoyaosan decoction alleviated rat liver fibrosis via the TGF β /Smad and Akt/FoxO3 signaling pathways based on network pharmacology analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113021.
- [8] Li WC, Zhao SX, Ren WG, et al. Yiqi huoxue recipe improves liver regeneration in rats after partial hepatectomy via JNK pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 26(2020): 9085801.
- [9] Chen CH, Chen MF, Huang SJ, et al. Saikosaponin a induces apoptosis through mitochondria-dependent pathway in hepatic stellate cells[J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(2): 351-368.
- [10] Wu XJ, Zhi FC, Lun WJ, et al. Baicalin inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell proliferation, apoptosis, invasion, migration and activation via the miR-3595/ACSL4 axis[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1992-2002.
- [11] Kawashiri SY, Origuchi T, Umeda M, et al. Association of serum levels of fibrosis-related biomarkers with disease activity in patients with IgG4-related disease[J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1): 277.
- [12] Liao Y, Gong J, Zhou W, et al. Serum liver fibrosis markers discriminate significant liver inflammation in chronic hepatitis B patients with normal or near-normal alanine aminotransferase[J]. *J Med Virol*, 2019, 91(4): 642-649.
- [13] Wei W, Wang C, Li D. The content of hydrogen sulfide in plasma of cirrhosis rats combined with portal hypertension and the correlation with indexes of liver function and liver fibrosis [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 5022-5026.
- [14] Peng Y, Li L, Zhang X, et al. Fluorofenidone affects hepatic stellate cell activation in hepatic fibrosis by targeting the TGF- β 1/Smad and MAPK signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1): 41-48.
- [15] Song LY, Ma YT, Fang WJ, et al. Inhibitory effects of oxymatrine on hepatic stellate cells activation through TGF- β /miR-195/Smad signaling pathway[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 138.
- [16] Lee EH, Park KI, Kim KY, et al. Liquiritigenin inhibits hepatic fibrogenesis and TGF- β 1/Smad with Hippo/YAP signal[J]. *Phytomedicine*, 2019, 62: 152780.
- [17] 吉家兴, 马俊, 李博, 等. 黄芩素通过 Smad 信号通路抑制 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞活化[J]. *中南医学科学杂志*, 2020, 48(3): 250-253.
- (此文编辑 朱雯霞)