

文章编号 1006-8147(2018)02-0112-04

论著

蒿鳖养阴软坚方对刀豆球蛋白 A 诱导的肝纤维化 Nrf2/HO-1 信号通路影响

卢娜, 方步武

(天津医科大学药理学系, 天津 300070)

摘要 目的:探讨蒿鳖养阴软坚方对刀豆球蛋白 A(ConA)诱导的肝纤维化 Nrf2/HO-1 信号通路的影响。方法:Balb/c 小鼠随机分为正常、模型、秋水仙碱和蒿鳖养阴软坚方低、中、高剂量(1.16 g/kg、3.36 g/kg、11.58 g/kg)组。除正常组外,剩余各组均尾静脉注射 1.5 mg/mL ConA,每周 1 次,持续 10 周。取小鼠肝脏作病理切片,观察肝脏的病理变化,检测肝组织羟脯氨酸浓度,免疫组化法检测肝组织 Nrf2、HO-1 蛋白的表达情况。结果:与模型组比较,蒿鳖养阴软坚方各剂量组能不同程度地减轻肝组织的炎症反应和降低肝组织羟脯氨酸的浓度,显著减轻肝纤维化程度($P<0.05$);随着蒿鳖养阴软坚方浓度增加,Nrf2 和 HO-1 的阳性表达逐渐增强。结论:蒿鳖养阴软坚方对 Nrf2/HO-1 信号通路具有激活作用,且该作用可能为其抗肝纤维化机制之一。

关键词 肝纤维化;蒿鳖养阴软坚方;刀豆球蛋白 A;Nrf2;HO-1

中图分类号 R575

文献标志码 A

Effect of Haobie yangyin ruanjian prescription on Nrf2/HO-1 signaling pathway in ConA-induced hepatic fibrosis

LU Na, FANG Bu-wu

(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To explore the effect of Haobie yangyin ruanjian prescription (HYRP) on Nrf2/HO-1 signaling pathway in ConA-induced hepatic fibrosis. **Methods:** Balb/c mice were randomly divided into normal control group, model control group, colchicine group, and HYRP groups (1.16 g/kg, 3.36 g/kg, 11.58 g/kg). Except for the normal control group, 1.5 mg/mL ConA was given to each mouse through the tail vein once a week for 10 weeks. The concentration of hydroxyproline (Hyp) and observing liver pathological changes in liver tissues were measured, and the expression of Nrf2 and HO-1 protein in liver tissues were detected by immunohistochemistry. **Results:** Compared with model control group, groups of 1.16 g/kg, 3.36 g/kg and 11.58 g/kg of HYRP could reduce the inflammatory reaction and decrease the concentration of Hyp in liver tissues, and significantly reduce the degree of hepatic fibrosis ($P<0.05$). With the increase of HYRP concentration, the positive expressions of Nrf2 and HO-1 gradually increased. **Conclusion:** HYRP can activate the expression of Nrf2/HO-1 signaling pathway in liver fibrosis induced by ConA, which may be related the anti-fibrotic effects of HYRP.

Key words hepatic fibrosis; Haobie yangyin ruanjian prescription; ConA; Nrf2; HO-1

肝纤维化是肝脏对持续性肝损伤的创伤再修复反应的病理产物,其病理特征主要表现为肝脏内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度异常沉积^[1]。肝纤维化是慢性肝病发展为肝硬化甚至是肝癌的必经阶段,美国 Friedman 等^[2]指出肝纤维化是一个可逆的过程,因而通过有效的抗肝纤维化治疗,早期的肝纤维化可以得到很好地逆转。氧化应激是肝纤维化发生的重要机制,Nrf2、HO-1 蛋白是调节氧化应激的关键蛋白^[3]。蒿鳖养阴软坚方(HYRP)是一种养阴活血软坚、凉血清热解毒的中药复方。本课题组以往研究发现,HYRP 可以抑制肝星状细胞活化,降低肝细胞的炎症反应和氧化应激水平^[4-5]。我国是乙肝大国,目前,多数学者认为乙型

肝炎病毒感染引起的肝损伤主要与机体免疫应答有关,免疫性肝损伤是多种急慢性肝病和继发的肝纤维化发生的共同病理基础,刀豆球蛋白 A(ConA)诱导的小鼠急性肝损伤模型已被证实为以 T 淋巴细胞为主介导的免疫性肝损伤^[6]。因此,本实验拟通过蒿鳖养阴软坚方对 ConA 诱导小鼠肝纤维化模型中肝脏组织病理及肝纤维化指标、Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达作用,探讨该方是否能够激活 Nrf2/HO-1 信号通路,降低肝纤维化水平,抑制免疫性肝损伤。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Balb/c 小鼠 240 只,SPF 级,雌雄各半,体质量为 18~22 g,购自解放军军事医学科学院实验动物中心。饲养过程中自由进食水和食物,室温 20~22 ℃,适应环境 3 d 后用于实验。

作者简介 卢娜(1992-),女,硕士在读,研究方向:中药药理;通信作者:方步武,E-mail:fangdch@aliyun.com。

1.1.2 仪器设备 CX31-12C04 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),VIS-7220 紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司),HZS-H 型水浴振荡器,电热鼓风干燥箱。

1.1.3 试剂 葛藟养阴软坚方制备成原料药粉,用前配成混悬液;ConA、秋水仙碱和 L-羟脯氨酸(Hyp)均为美国 Sigma 公司产品,批号分别为:C5275, C391, 56250;乌来糖:上海润捷化学试剂有限公司;氯胺 T:天津市化学试剂一厂,批号 010708;高氯酸、对二甲氨基苯甲醛:天津市光复精细化工研究所;DAB 显色试剂盒:博士德生物,批号 AR1002;超敏二步法免疫组化检测试剂盒:北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 PV-9001;Nrf2 兔源多克隆抗体:北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs-1074R;HO-1 鼠源单克隆抗体:美国 Santa Cruze 公司,批号 sc-390991;二甲苯、无水乙醇:天津市天新精细化工开发中心;过氧化氢、磷酸氢二钠、氯化钠:天津市江天化工技术有限公司;枸橼酸、磷酸二氢钠、三水醋酸钠、盐酸:天津市光复科技发展有限公司;异丙醇、柠檬酸三钠:天津市风船化学试剂科技有限公司;中性树脂:国药集团化学试剂有限公司,批号 10004160;生物染色剂:Mayer 苏木素染液、苏木精染液、伊红染液、天狼猩红-饱和苦味酸液、天青石蓝液。

1.2 方法

1.2.1 ConA 模型制备及实验分组 实验分为 6 组,即正常、模型、秋水仙碱(0.13 g/kg)和葛藟养阴软坚方低、中、高剂量(1.16 g/kg³、.36 g/kg、11.58 g/kg)组,ConA 用量 15 mg/kg,溶解于无菌无热源的 0.9% NaCl 生理盐水注射液中,配制成 1.5 mg/mL,经 0.22 μ m 微孔滤器过滤除菌。尾静脉注射 10 μ L/g ConA 进行造模,每周 1 次,持续 10 周,末次注射后 1 周内处死小鼠。各组复制模型开始即同时经口灌胃相应药物,灌胃体积为 0.1 mL/10 g 体质量,正常组和模型组均经口灌胃相应体积的蒸馏水,每日 1 次,每周用药 6 d 至实验结束。

1.2.2 标本采集 末次用药 24 h 后,小鼠用乙醚麻醉,留取肝右叶组织(1.0 cm \times 1.0 cm)2 块。一部分以 10%福尔马林中性缓冲液固定后石蜡包埋切片;另一部分置于氯仿-甲醇脱水脱蜡液(V/V=2:1)中,每天换液 1 次,持续 6 d,备测 Hyp 浓度。

1.3 指标测定

1.3.1 小鼠一般状态 每日注意观察小鼠的精神状态、活动、进食量、体质量变化等情况。

1.3.2 肝组织病理学观察 常规石蜡切片做 HE 染色检查肝组织结构和 Siriusred 染色观察胶原纤维

形成的情况。

1.3.3 肝组织羟脯氨酸浓度测定 采用 Jamall 氏法^[7]。

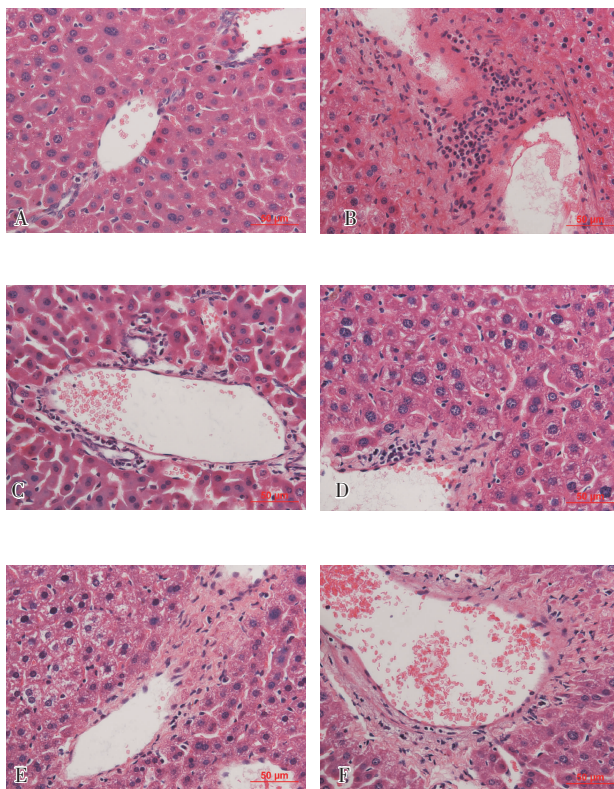
1.3.4 肝组织 Nrf2、HO-1 蛋白的表达情况 采用免疫组化法,光镜下观察 Nrf2、HO-1 蛋白的表达情况。

1.4 统计学分析 利用 SPSS 16.0 软件分析处理数据,各项计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间样本比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 时,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况及死亡情况 正常组小鼠一般状态良好,皮毛柔顺有光泽,饮食量正常;模型组小鼠随着给药时间延长,活动量减少,精神萎靡,皮毛松弛无光泽,饮食量减少,体质量减轻;各治疗组小鼠一般状态明显好于 ConA 模型组,皮毛少光泽,体质量减轻。

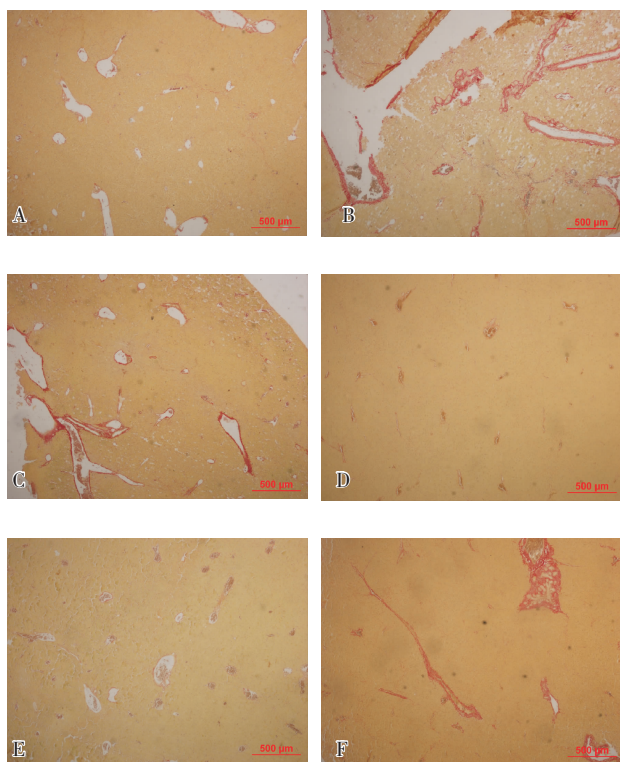
2.2 葛藟养阴软坚方对 ConA 模型小鼠肝组织病理学的影响 HYRP 对 ConA 模型小鼠肝组织形态的影响见图 1;HYRP 对 ConA 模型小鼠肝脏胶原纤维的影响见图 2。



A. 正常对照组; B. 模型组; C. HYRP 低剂量组; D. HYRP 中剂量组; E. HYRP 高剂量组; F.秋水仙碱组

图1 HYRP 对 ConA 诱导肝纤维化小鼠肝组织形态的影响 (HE 染色, $\times 200$)

Fig 1 Effect of HYRP on histological profiles of liver tissues in mice with hepatic fibrosis induced by ConA(HE staining $\times 200$)



A. 正常对照组; B. 模型组; C. HYRP 低剂量组; D. HYRP 中剂量组; E. HYRP 高剂量组; F. 秋水仙碱组

图2 HYRP对ConA模型小鼠肝脏胶原纤维的影响(Siriusred染色, $\times 500$)

Fig 2 Effect of HYRP on hepatic fibrosis induced by ConA (Siriusred staining, $\times 500$)

HE染色和Siriusred染色显示正常组小鼠肝细胞形态大小正常,肝小叶结构正常,无炎性细胞浸润,汇管区纤维组织无增生。模型组小鼠肝组织出现严重的损伤性病理改变,少数细胞肿胀及嗜酸性变,散在不同程度的小叶内坏死,有较多炎性细胞浸润,肝小叶结构紊乱,肝细胞索排列紊乱,汇管区纤维组织增生,并可见厚薄不一的纤维间隔形成。与模型组比较,蒿鳖养阴软坚方各剂量组和秋水仙碱组小鼠肝组织损伤性病理改变明显减轻,炎性细胞浸润和坏死减少,肝小叶结构接近正常,肝细胞索排列接近正常,汇管区纤维组织增生减少。

2.3 蒿鳖养阴软坚方对ConA模型小鼠肝组织羟脯氨酸浓度的影响 与正常组相比,模型组小鼠肝组织羟脯氨酸浓度显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各治疗组羟脯氨酸浓度均有不同程度的降低($P<0.05$)。结果见表1。

2.4 蒿鳖养阴软坚方对ConA模型小鼠肝组织Nrf2、HO-1蛋白表达的影响 与模型组Nrf2细胞核内浅棕红着色比较,蒿鳖养阴软坚方各剂量组大部分细胞核内均呈较深棕红色着色,且随着药物浓

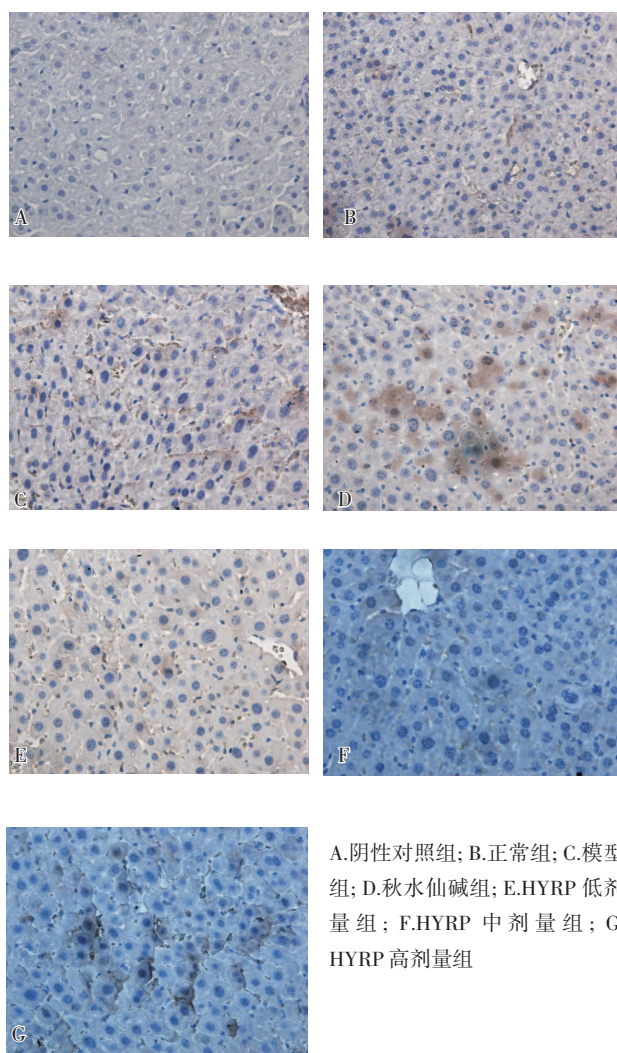
表1 HYRP对ConA模型小鼠肝组织羟脯氨酸浓度的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of HYRP on hydroxyproline concentration in mice with hepatic fibrosis induced by ConA ($\bar{x}\pm s$)

实验分组	n	羟脯氨酸浓度/($\mu\text{g/mL}$)
正常组	6	0.23 ± 0.04
模型组	10	$0.70\pm 0.35^{**}$
蒿鳖养阴软坚方低剂量组	12	0.46 ± 0.19
蒿鳖养阴软坚方中剂量组	9	$0.41\pm 0.18^{\#}$
蒿鳖养阴软坚方高剂量组	6	$0.37\pm 0.15^{\#}$
秋水仙碱组	7	$0.39\pm 0.18^{\#}$

与正常组比较, $**P<0.01$; 与模型组比较, $^{\#}P<0.05$

度的升高, Nrf2在胞核内的表达逐渐增强,甚至出现棕褐色着色(图3)。与模型组HO-1细胞浆的微棕色着色比较,蒿鳖养阴软坚方各剂量组大部分细胞胞浆内均呈较深棕黄着色,且随着药物浓度的升高,HO-1在胞浆内的表达逐渐增强(图4)。



A. 阴性对照组; B. 正常组; C. 模型组; D. 秋水仙碱组; E. HYRP 低剂量组; F. HYRP 中剂量组; G. HYRP 高剂量组

图3 HYRP对ConA模型小鼠肝组织Nrf2蛋白表达的影响($\times 40$)

Fig 3 Effect of HYRP on expression of Nrf2 protein in liver tissues of ConA-induced hepatic fibrosis ($\times 40$)

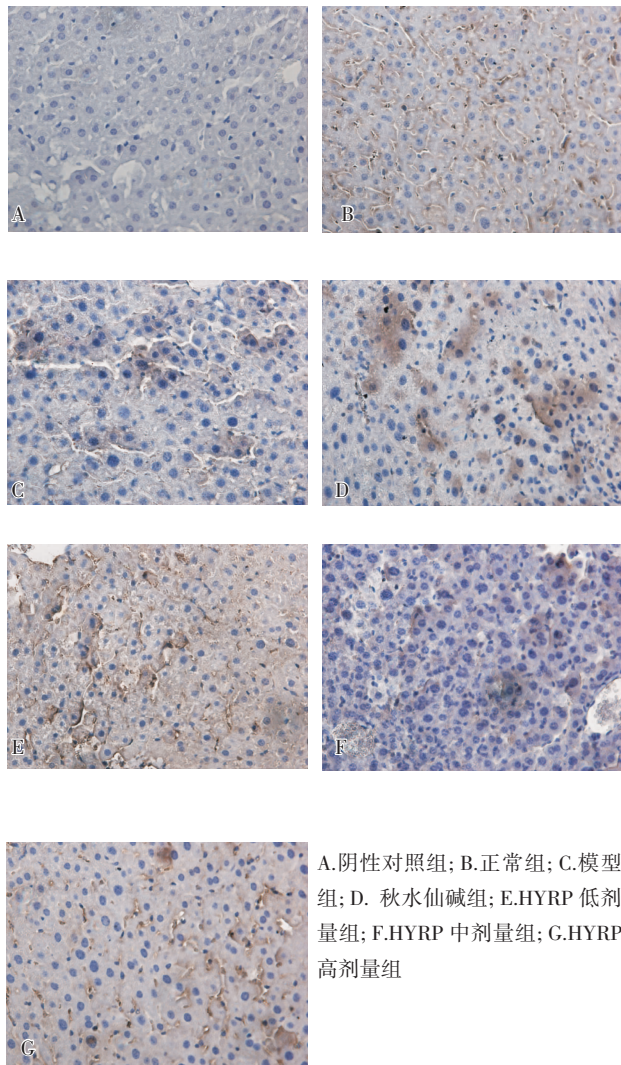


图4 HYRP对ConA模型小鼠肝组织HO-1蛋白表达的影响($\times 40$)
Fig 4 Effect of Haobie yangyin ruanjian prescription on expression of HO-1 protein in liver tissues of ConA-induced hepatic fibrosis

3 讨论

在肝纤维化发展过程中,多种信号转导通路的平衡被打破,多种促纤维化因子的合成增多、活性发生改变,而抗肝纤维化因子的作用减弱或受到抑制,最终导致细胞外基质代谢失衡而过度沉积,诱发肝纤维化的发生。

氧化应激是肝纤维化发生的重要机制。肝损伤时,细胞内活性氧(ROS)浓度显著升高破坏了机体的氧化/抗氧化系统平衡,诱导肝细胞释放大量的炎症细胞因子,进而活化肝星状细胞,加剧肝纤维化的演变。Nrf2属于Capncollar转录因子家族成员,具有亮氨酸拉链结构蛋白,可与细胞核内的小Maf蛋白形成异源二聚体,经乙酰化等结构修饰后实现其高活性状态,进而与抗氧化反应元件ARE结合启动下游II相解毒酶及抗氧化蛋白基因的转录^[8]。

HO-1是II相解毒酶中最容易被诱导的抗氧化酶,它能够将衰老或破损的红细胞释放的血红素降解为胆绿素、 Fe^{2+} 和一氧化碳,而这3种催化产物对于维持细胞内氧化平衡均有重要的作用^[9-11]。

本研究选择ConA作为诱导剂,建立小鼠自身免疫性肝纤维化动物模型。ConA诱导小鼠肝纤维化模型更适合用于研究人类自身免疫性肝病的病理机制和进行抗肝损伤的药物筛选^[12]。研究结果显示,正常组小鼠肝小叶结构正常,模型组肝小叶结构紊乱,汇管区可见大量炎症细胞浸润,纤维组织增生,Nrf2、HO-1弱阳性表达,而与模型组相比,蒿鳖养阴软坚方治疗组大部分肝小叶结构接近正常,肝细胞索排列接近正常,汇管区有少量炎症细胞浸润,纤维组织增生减少,Nrf2、HO-1在细胞浆中的阳性表达明显升高,呈深棕色,且Nrf2在细胞核中也有阳性表达,呈剂量依赖性。

蒿鳖养阴软坚方为养阴活血软坚、凉血清解解毒中药复方,由青蒿、鳖甲、生地、丹参、虎杖、白花蛇舌草等9味中药组成,上述药物在慢性肝病(肝纤维化、肝硬化等)的临床治疗上使用频率较高、疗效好。前期研究表明,蒿鳖养阴软坚方对牛血清白蛋白、血吸虫病、酒精、 CCl_4 复合因素所致的肝纤维化均有预防和治疗作用^[4-5,13-16]。本次研究发现,蒿鳖养阴软坚方能够减轻ConA诱导的肝纤维化增生程度,降低肝组织中羟脯氨酸浓度,抑制炎症反应,诱导Nrf2和HO-1蛋白的表达。

综上所述,蒿鳖养阴软坚方具有改善ConA模型小鼠的临床症状和病理学变化及对抗免疫性肝损伤的作用,其机制可能与蒿鳖养阴软坚方能够激活Nrf2/HO-1信号通路有关,这为临床上治疗肝纤维化提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Seki E, Brenner D A. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015, 22(7): 512
- [2] Friedman S L. Hepatic fibrosis: emerging therapies[J]. Dig Dis, 2015, 33(4): 504
- [3] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E A, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(17): 3221
- [4] 刘红艳,方步武,率红莉,等.蒿鳖养阴软坚方对肝纤维化大鼠抗氧化损伤与诱导凋亡的作用[J].天津医药,2010,38(10):884
- [5] 张永进,方步武.蒿鳖养阴软坚方药物血清对肝星状细胞的作用[J].中药药理与临床,2011,27(1):89
- [6] Ren F, Chen X, Hesketh J, et al. Selenium promotes T-cell response

- acetylcysteine in a rat model of myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. *Atherosclerosis*, 2014,237(2):760
- [6] 郭丽蓉,孙常青.盐酸曲美他嗪对心肌缺血再灌注大鼠 Fas、FasL 基因表达的影响[J].*中国生化药物杂志*, 2014, 34(9):27
- [7] Wei B R,Young R F, Shen X, et al. Brief myocardial ischemia produces cardiac troponin I release and focal myocyte apoptosis in the absence of pathological infarction in swine[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2017,2(2):105
- [8] Tsioufis K, Andrikopoulos G, Manolis A. Trimetazidine and cardioprotection: facts and perspectives[J]. *Angiology*, 2015,66(3):204
- [9] Danikiewicz A, Szkodziński J, Hudzik B, et al. Effects of trimetazidine on interleukin-2 and interleukin-8 concentrations in patients with coronary artery disease[J].*Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 95(6):759
- [10] Ma N, Bai J, Zhang W, et al. Trimetazidine protects against cardiac ischemia/reperfusion injury via effects on cardiac miRNA Θ 21 expression, Akt and the Bcl2/Bax pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5):4216
- [11] Liu Z, Chen J M, Huang H, et al. The protective effect of trimetazidine on myocardial ischemia/reperfusion injury through activating AMPK and ERK signaling pathway[J]. *Metabolism*, 2016,65(3):122
- [12] McCarthy C P, Mullins K V, Kerins D M. The role of trimetazidine in cardiovascular disease: beyond an anti-anginal agent[J]. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2016, 2(4):266
- [13] Zhang N, Lei J, Liu Q, et al. The effectiveness of preoperative trimetazidine on myocardial preservation in coronary artery bypass graft patients: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cardiology*, 2015,131(2):86
- [14] 赵艳芳,秦永文,王学敏,等.曲美他嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24(3):324
- [15] 颜永进,张跃明,陆洋,等.曲美他嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *江苏医药*, 2011, 37(1):20
- [16] 王健,黄元伟,魏经汉,等.曲美他嗪对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].*浙江大学学报医学版*, 2003, 32(3):219
- [17] Maximilian Buja L. Mitochondria in ischemic heart disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 982:127
- [18] Li Q, Guo Y, Li X, et al.The interference of picoside II on the expressions of caspase -3 and PARP following cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010,26(3):342
- [19] Kumar P,Coltas I K,Kumar B, et al. Bcl -2 protects endothelial cells against gamma-radiation via a Raf-MEK-ERK surviving signaling pathway that is independent of cytochrome c release[J]. *Cancer Res*, 2007,67(3):1193
- [20] Cook A S, Sugden P H, Clerk A. Regulation of Bcl-2 family protein during development and in response to oxidative stress in cardiac myocyte:association with changes in mitochondrial membrane potential[J]. *Circ Res*, 1999,85:940
- [21] Sun J P, Liu J H, Recent advance of Apaf-1, Caspase-9 and apoptotic mechanisms[J]. *China J General Practice*, 2013,11(7):1102

(2017-08-16 收稿)

.....

(上接第 115 页)

- to TCR-stimulation and ConA, but not PHA in primary porcine splenocytes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35375
- [7] Jamall I S, Finelli V N, Que Hee S S. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues[J]. *Anal Biochem*, 1981, 112(1): 70
- [8] Chen B, Lu Y, Chen Y, et al. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries[J]. *J Endocrinol*, 2015, 225(3): 83
- [9] Tell G, Gustincich S. Redox state, oxidative stress, and molecular mechanisms of protective and toxic effects of bilirubin on cells[J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(25): 2908
- [10] Farina M, Avila D S, Da Rocha J B, et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury [J]. *Neurochem Int*, 2013, 62(5): 575
- [11] Fireman E. Ultrafine and nanoparticles-induced oxidative stress: the role of heme oxygenase-1 and carbon monoxide as anti-inflammatory pathways[J]. *J Asthma*, 2012, 49(1): 8
- [12] Wang H X, Liu M, Weng S Y, et al. Immune mechanisms of concanavalin A model of autoimmune hepatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(2): 119
- [13] 邢伟,孔维涵,方步武.葛鳖养阴软坚方对免疫性肝纤维化大鼠的治疗作用[J].*中草药*, 2010, 10(41): 1667
- [14] 寇咏梅,刘洁莹,方步武.葛鳖养阴软坚方抗小鼠血吸虫病肝纤维化及其机制的研究[J].*现代药物与临床*, 2013, 3(28): 288
- [15] 赵敏,郭娟,方步武,等.葛鳖养阴软坚方对大鼠酒精性肝损伤的预防作用[J].*时珍国医国药*, 2010, 11(21): 2887
- [16] 杨凤蕊,娄建石,方步武.葛鳖养阴软坚方抗 CCL₄ 复合因素所致大鼠肝纤维化的作用[J].*中草药*, 2011, 3(42): 530

(2017-07-11 收稿)