

· 基础研究 ·

疏肝健脾方对肝纤维化大鼠自噬蛋白
Beclin-1 和 LC3-II 的影响姜 辉^{1,2} 张家富¹ 高家荣¹ 秦秀娟¹ 王 婷¹ 李竹青²

摘要 **目的** 观察疏肝健脾方对肝纤维化大鼠自噬蛋白 Beclin-1 和 LC3-II 的影响。**方法** 将 60 只 SD 大鼠,随机分为正常组、模型组、疏肝健脾方(1.5、3.0、6.0 g/kg)组和阳性药秋水仙碱(0.1×10^{-3} g/kg)组,每组 10 只。除正常组外,其余各组采用 50% 四氯化碳(CCl_4)每周 2 次,连续 12 周皮下注射的方法,诱导肝纤维化大鼠模型。造模后第 7 周,灌胃给予不同剂量的疏肝健脾方和秋水仙碱,正常组和模型组给予等量溶媒,每天 1 次,连续 6 周。HE 和 Masson 染色观察肝脏病理组织学损伤程度,免疫组化法检测肝组织中 I 型胶原(Collagen I)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、Beclin-1、LC3-II 蛋白的表达。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠肝脏病理组织学损伤程度明显加重,肝组织中 Collagen I、 α -SMA、Beclin-1 和 LC3-II 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,疏肝健脾方(3.0、6.0 g/kg)组和秋水仙碱组肝组织损伤减轻,胶原纤维沉积减少($P < 0.05$, $P < 0.01$),Collagen I、 α -SMA、Beclin-1、LC3-II 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 疏肝健脾方具有抗肝纤维化作用,其机制与减少细胞自噬,降低能量的生成,从而抑制肝星状细胞活化有关。

关键词 疏肝健脾方;肝纤维化;肝星状细胞;自噬

Effect of Shugan Jianpi Recipe on Autophagy Protein Beclin-1 and LC3-II in Hepatic Fibrosis Rats
JIANG Hui^{1,2}, ZHANG Jia-fu¹, GAO Jia-rong¹, QIN Xiu-juan¹, WANG Ting¹, and LI Zhu-qing² 1 Department of Pharmacy, First Hospital Affiliated to Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230031); 2 Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei (230032)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Shugan Jianpi Recipe (SGJPR) on autophagy protein Beclin-1 and LC3-II in liver fibrosis rats. **Methods** Sixty Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into six groups, the normal group, the model group, high, middle, and low dose SGJPF groups (1.5, 3.0, 6.0 g/kg), and the colchicines group (0.1×10^{-3} g/kg), 10 in each group. Except those in the normal group, liver fibrosis model was induced by subcutaneous injection of CCl_4 to rats in the rest groups, twice per week for 12 consecutive weeks. At week 7 after modeling, different doses of SGJPF and colchicines were respectively administrated to rats in corresponding groups by gastrogavage, once per day for 6 weeks. Equal volume of saline solution was administrated to rats in the normal group and the model group, once per day for 6 weeks. The pathological injury degrees of liver were observed by HE staining and Masson dyeing. Expressions of Collagen I, α -SMA, Beclin-1, and LC3-II protein were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal group, the histopathological injury degree of the liver was obviously aggravated, the expressions of Collagen I, α -SMA, Beclin-1, and LC3-II protein in liver tissue were significantly elevated in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, liver injury was attenuated and collagen deposition was reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), expressions of Collagen I, α -SMA, Beclin-1, and LC3-II protein in liver tissue were signifi-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81102874);安徽省卫生计生委中医药科研资助项目(No. 2014zy09);安徽省高校领军人才引进与培育计划资助项目(No. gxfxZD2016118)

作者单位:1. 安徽中医药大学第一附属医院药学部(合肥 230031);2. 安徽医科大学基础医学院药理教研室(合肥 230032)

通讯作者:张家富, Tel:0551-62838559, E-mail: jhanbing@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20170614. 139

cantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in middle and low dose SGJPF groups and the colchicines group.

Conclusions SGJPF could fight against liver fibrosis. Its mechanism might be associated with reducing autophagy and lowering energy generation, thus inhibiting activation of hepatic stellate cells.

KEYWORDS Shugan Jianpi Recipe; liver fibrosis; hepatic stellate cell; autophagy

肝纤维化是肝脏炎症或损伤后组织修复过程中的代偿反应,以肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化为核心事件,属于可逆病变^[1,2]。自噬是细胞接受自身微环境变化或感受外在生物、物理、化学刺激时,作出精密调控的“自我消化”过程,与 HSC 活化关系密切^[3,4]。本实验旨在前期研究的基础上^[5,6],观察疏肝健脾方对肝纤维化大鼠 I 型胶原(Collagen I)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、Beclin-1 和 LC3-II 的影响,以期从自噬的角度探讨其可能的作用机制。

材料与方法

1 动物 SD 大鼠,60 只,SPF 级,雄性,6 周龄,体重 180~220 g,由安徽省实验动物中心提供,准字号:SCXK(皖)2011-002。所有动物均饲养于标准大鼠笼中,动物自由摄食饮水,环境温度保持在 18~22℃,湿度 40%~60%,12 h 昼夜交替。研究方案经安徽中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(No. 2015AH-042)。

2 药物 疏肝健脾方,安徽中医药大学第一附属医院院内制剂,批号:20150305,由茵陈、柴胡、黄芪、白芍、枳壳、白术、猪苓、茯苓、泽兰、薏苡仁、板蓝根按 4:24:24:24:24:24:24:24:34:3 比例组成。按处方比例称取药材,第一次加 10 倍量水,煎煮 1.5 h;第二、三次加 8 倍量水,煎煮 1.0 h;合并提取液滤过,静置沉淀 48 h。吸取上清液,减压浓缩至比重为 1.15 的流浸膏,加入糊精作底料,喷雾干燥制粒即得,以黄芪甲苷和芍药苷的含量对其进行质控^[7];秋水仙碱,西双版纳版纳药业有限责任公司,批号:20140821。

3 试剂与仪器 四氯化碳(CCl_4),汕头市西陇化工厂有限公司,批号:081115;兔抗鼠 Collagen I、 α -SMA、Beclin-1、LC3-II 单克隆抗体,Bioworld 公司。高速台式冷冻离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司;万分之一电子天平,上海三发科学仪器有限公司;AE2000 显微镜,麦克奥迪实业集团有限公司;EPS300 型电泳仪、VE-180 型电泳槽、VE-186 型转膜仪,Tanon 公司;AF-10 型自动制冰机,Scotsman 公司;蛋白凝胶图像分析管理系统,珠海黑马医学仪器有限公司。

4 分组、模型制备与给药 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、疏肝健脾方低剂量组(按体人与大鼠表面积折算后,相当于等量临床给药剂量)、疏肝健脾方中剂量组(相当于 2 倍临床给药剂量)、疏肝健脾方高剂量组(相当于 4 倍临床给药剂量)和阳性药秋水仙碱组,每组 10 只。按 0.1 mL/100g 于大鼠背部皮下注射 50% CCl_4 ,2 次/周,共 12 周,复制化学性肝纤维化大鼠模型,正常组给予等量的橄榄油。造模后第 7 周,疏肝健脾方低剂量组、中剂量组、高剂量组分别给予 1.5、3.0、6.0 g/kg 不同剂的疏肝健脾方,秋水仙碱组给予秋水仙碱(0.1×10^{-3} g/kg),正常组和模型组给予等量溶媒,均 1 次/天灌胃,连续 6 周。末次给药后,禁食 8 h,处置大鼠,取相应标本待测。

5 检测指标与方法

5.1 一般形态学观察 观察大鼠毛色、活动、饮食、体质量及其死亡情况等。

5.2 肝组织病理学检查 大鼠麻醉后,腹主动脉取血,分离肝脏,取固定部分肝组织置于 10% 的甲醛溶液中,常规 HE 和 Masson 染色,光镜下拍照,并进行纤维化程度评分,分级标准为:“-”级:正常肝脏或无明显胶原纤维增生;“±”级:中央静脉或汇管区周围轻度纤维化;“+”级:中央静脉间有纤维隔形成,但尚未连接成环;“++”级:中央静脉间纤维隔相连成环形,汇管区位于其中央;“+++”级:中央静脉间纤维隔相连成环形,汇管区位于其中央,且在中央静脉和汇管区之间出现纤维隔^[8]。

5.3 免疫组化技术检测肝组织中 Collagen I、 α -SMA、Beclin-1、LC3-II 蛋白表达 采用 S-P 法进行免疫组织化学染色,具体操作按说明书进行。光镜下观察、拍照,并计算其平均光密度,进行半定量分析。

6 统计学方法 运用 SPSS 13.0 统计软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,并用 LSD 进行两两比较;等级资料采用 Ridit 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般形态学的影响 正常组大鼠毛色光滑、活泼好动,饮食、饮水正常,体质量增加;模型组大鼠毛色发黄、无光泽,有竖毛出现,进食、

饮水量减少,体重减轻,符合 CCl₄ 造模后的行为学特征;给予疏肝健脾方和秋水仙碱干预后,上述症状均有不同程度的改善。实验过程中各组大鼠无死亡。

2 各组大鼠肝脏病理组织学改变(图 1、2) HE 染色显示:正常组大鼠肝细胞大小、形态一致,肝小叶结构完整,肝索排列整齐,无胶原纤维增生;模型组大鼠出现大量的脂肪变性,部分细胞核消失,并形成空泡,以汇管区为中心,胶原结缔组织大量增生,形成条索状纤维间隔;疏肝健脾方不同剂量组和阳性药秋水仙碱组大鼠肝脏脂肪变性、胶原沉积、结缔组织增生情况均有所减轻。

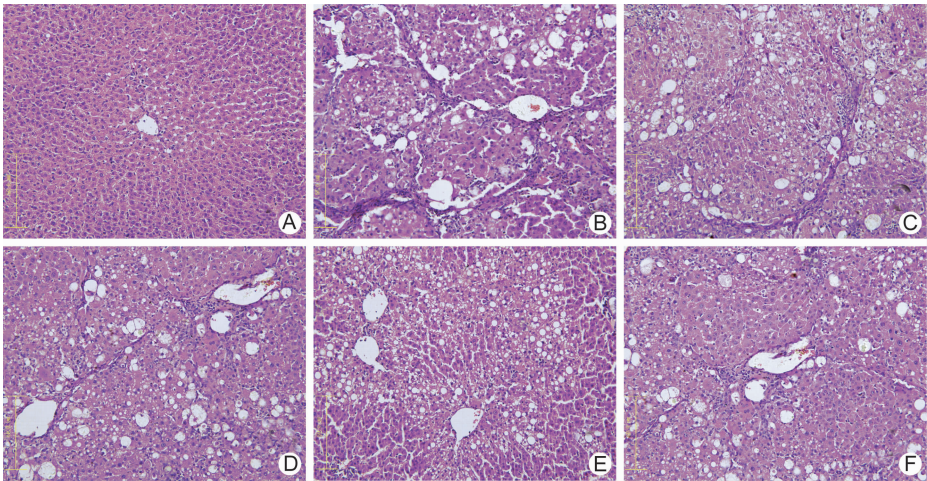
Masson 染色显示:正常组大鼠肝脏仅见汇管区周围有少量细小的蓝色胶原纤维,未见纤维增生;模

型组大鼠肝脏有大量蓝色胶原纤维增生,形成粗大的纤维间隔,将肝小叶分隔成大小不等的假小叶;经疏肝健脾方和秋水仙碱干预 6 周后,各给药组大鼠肝组织纤维增生程度减轻,假小叶形成数量减少。

3 各组大鼠肝脏组织纤维化分级比较(表 1) 与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织纤维化损伤程度明显升高($P<0.01$);与模型组比较,疏肝健脾方中、

表 1 各组大鼠肝脏组织纤维化分级比较 (只, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	-	±	+	++	+++
正常	10	-	9	1	0	0	0
模型	10	-	0	0	1	4	5
疏肝健脾方低剂量	10	1.5	0	0	4	4	2
疏肝健脾方中剂量	10	3.0	0	2	4	2	2
疏肝健脾方高剂量	10	6.0	0	4	3	2	1
秋水仙碱	10	0.1×10^{-3}	0	3	4	1	2



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为疏肝健脾方低剂量组;D 为疏肝健脾方中剂量组;E 为疏肝健脾方高剂量组;F 为秋水仙碱组;图 2-6 同

图 1 各组大鼠肝脏病理组织学变化 (HE, ×200)

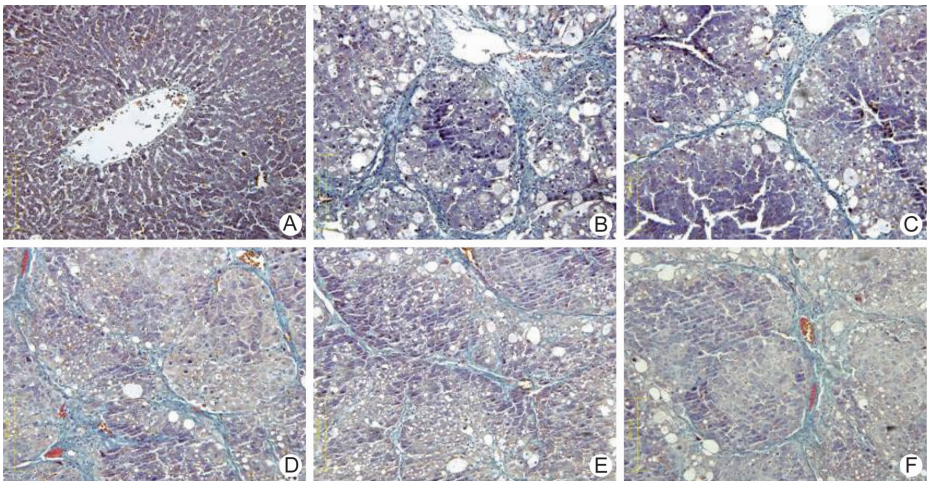


图 2 各组大鼠肝组织胶原纤维增生变化 (Masson, ×200)

高剂量组和阳性药秋水仙碱组肝脏组织纤维化损伤程度显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。疏肝健脾方低剂量组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 各组大鼠肝脏 Collagen I、 α -SMA、Beclin-1、LC3-II 蛋白表达比较(图 3-7) 免疫组化染色以棕黄色为阳性表达。光镜下观察及平均光密度

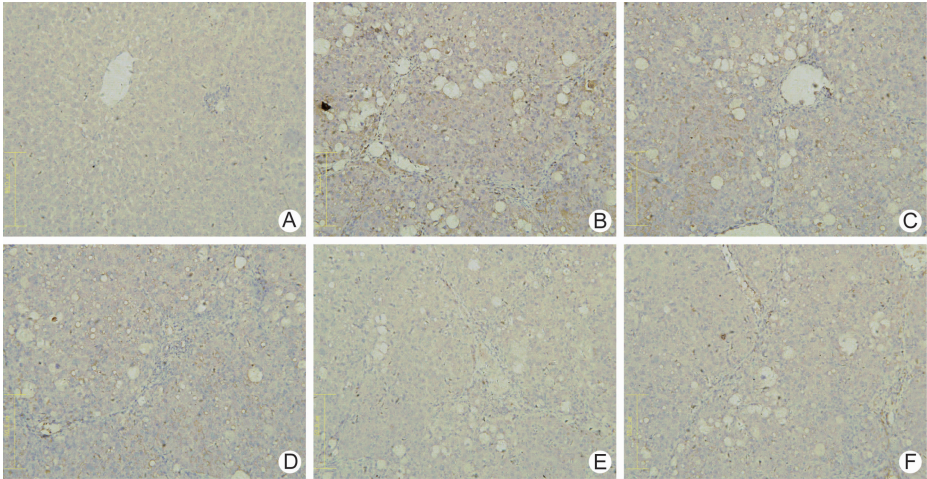


图 3 各组大鼠肝组织 Collagen I 蛋白表达 (×200)

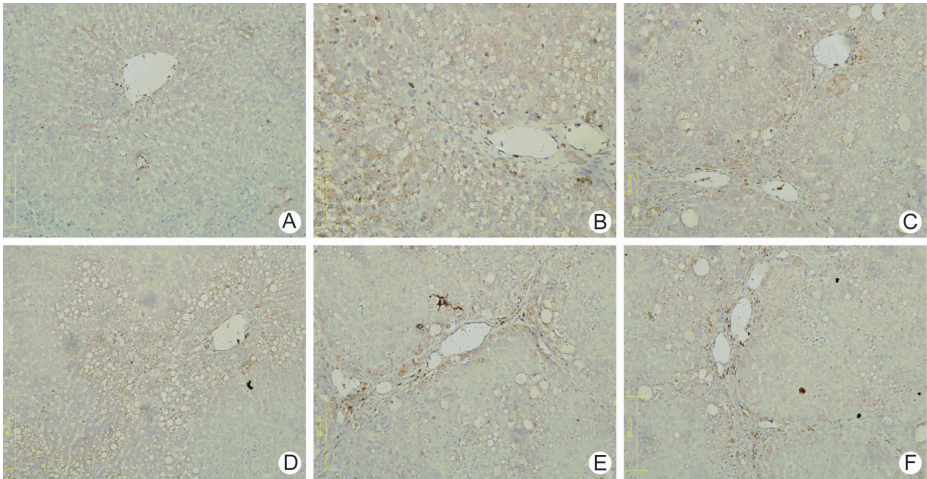


图 4 各组大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达 (×200)

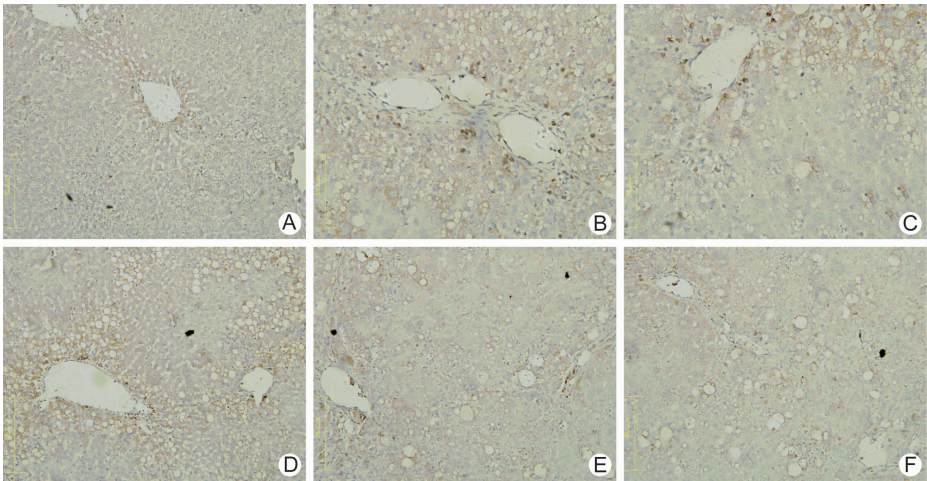


图 5 各组大鼠肝组织 Beclin-1 蛋白表达 (×200)

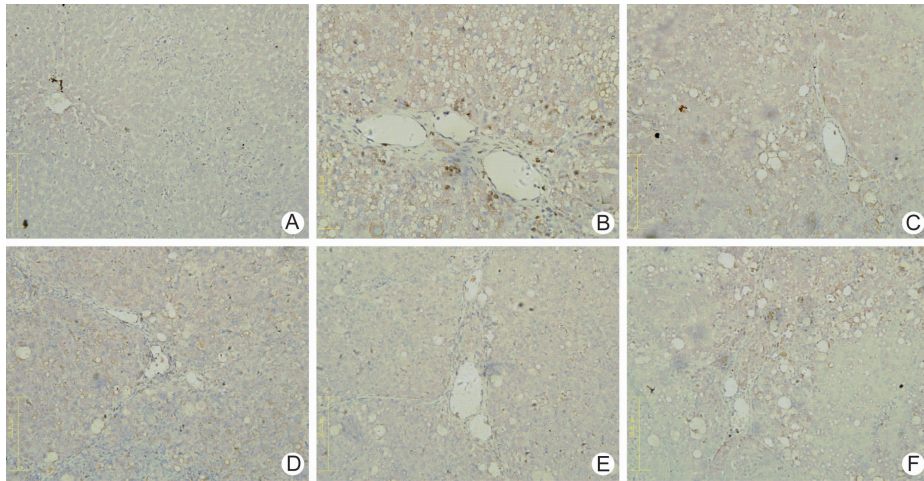
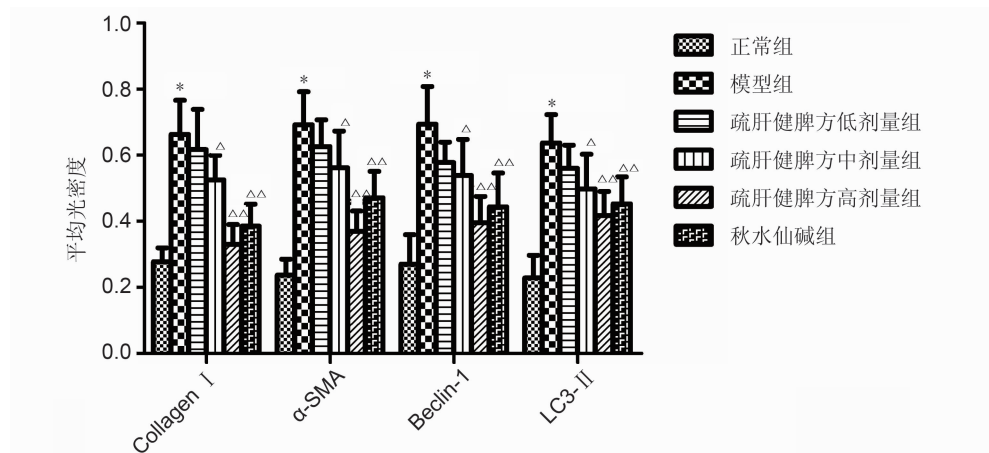


图 6 各组大鼠肝组织 LC3-II 蛋白表达 (×200)



注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,Δ $P < 0.05$,ΔΔ $P < 0.01$;n=6

图 7 各组大鼠肝脏 Collagen I、α-SMA、Beclin-1、LC3-II 蛋白表达的平均光密度分析

分析显示, Collagen I、α-SMA、Beclin-1、LC3-II 蛋白模型组表达水平较正常组显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,疏肝健脾方中、高剂量和秋水仙碱组 Collagen I、α-SMA、Beclin-1、LC3-II 蛋白的表达量显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。疏肝健脾方低剂量组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

肝脏疾病是由急性肝损伤—慢性肝损伤—肝纤维化—肝硬化—肝癌的发生、发展模式,肝硬化为不可逆阶段,而肝纤维化为一动态过程,属可逆病变^[8]。疏肝健脾方是依据中医学“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”理论创制的特色医院制剂,由茵陈、柴胡、黄芪、白芍、枳壳、白术、猪苓、茯苓、泽兰等药物组成,具有疏肝健脾、活血化瘀之功效,主治急慢性肝炎、肝纤维化,临床应用多年,具有广阔的应用价值与开发前景。本实

验发现,疏肝健脾方可改善肝纤维化大鼠一般行为学特征,显著降低肝脏病理组织学损伤程度,减少胶原纤维(尤其是 Collagen I)在肝脏的沉积,具有很好的抗肝纤维化作用。

HSC 活化是肝纤维化形成的细胞学基础,在肝纤维化发展过程中扮演重要角色^[9,10]。近年来有研究表明,不论是在 CCl₄ 诱导的化学性肝纤维化动物模型,还是在体外培养的 HSC 均发现存在细胞自噬现象,提示自噬与 HSC 活化关系密切^[11-13]。正常情况下,呈静止状态的 HSC 位于肝窦周 Disse 腔内,核周有大量富含维生素 A 酯的脂滴。在损伤因素作用下, HSC 被激活,对能量利用显著增加,为满足 HSC 活化对能量的需求,细胞自噬明显增强,大量富含维生素 A 酯的脂滴在细胞内脂肪酶的作用下分解为游离脂肪酸,经过线粒体的 β-氧化产生 ATP,以维持 HSC 的过度活化;持续活化的 HSC,迅速转化为肌成纤维细胞,

肌成纤维细胞过度增殖,同时大量合成胶原,促进肝纤维化的发生与发展^[14-16]。本研究免疫组化和 Western blot 结果均显示,模型组大鼠肝组织中 HSC 活化标志物 α -SMA,自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3-II 表达量显著升高,提示 HSC 活化水平与自噬水平具有一致性,研究结果与相关文献报道一致^[17]。给予疏肝健脾方连续干预 6 周后,可显著降低肝组织中 α -SMA、Beclin-1、LC3-II 蛋白的表达。

综上,疏肝健脾方具有很好的抗肝纤维作用,其机制可能与抑制细胞自噬,减少脂滴释放,降低能量的生成,从而抑制 HSC 活化有关。

参 考 文 献

- [1] Zhang F, Hao M, Jin H, et al. Canonical hedgehog signalling regulates hepatic stellate cell-mediated angiogenesis in liver fibrosis[J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(5): 409-423.
- [2] Hui J, Gao J, Wang Y, et al. *Panax notoginseng* saponins ameliorates experimental hepatic fibrosis and hepatic stellate cell proliferation by inhibiting the Jak2/Stat3 pathways[J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(2): 217-224.
- [3] Denardin CC, Martins LA, Parisi MM, et al. Autophagy induced by purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract triggered a cooperative effect on inducing the hepatic stellate cell death[J]. Cell Biol Toxicol, 2017, 33(2): 197-206.
- [4] Zhang Z, Zhao S, Yao Z, et al. Autophagy regulates turnover of lipid droplets via ROS-dependent Rab25 activation in hepatic stellate cell[J]. Redox Biol, 2017, 11:322-334.
- [5] 姜辉, 吴芙蓉, 高家荣, 等. 疏肝健脾方对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化的治疗作用动态观察[J]. 中药材, 2014, 37(10): 1815-1819.
- [6] 姜辉, 吴芙蓉, 高家荣, 等. 疏肝健脾方对四氯化碳诱导肝纤维化大鼠血清代谢组学的影响[J]. 中华肝病杂志, 2015, 23(2): 139-141.
- [7] 姜辉, 王斌, 高家荣. 高效液相色谱法-蒸发光散射检测器同时测定肝乐颗粒中黄芪甲苷和芍药苷的含量[J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34(3): 86-89.
- [8] Cho YA, Noh K, Jue SS, et al. Melatonin promotes hepatic differentiation of human dental pulp stem cells: clinical implications for the prevention of liver fibrosis[J]. J Pineal Res, 2015, 58(1): 127-135.
- [9] Chen Q, Chen L, Kong D, et al. Dihydroartemisinin alleviates bile duct ligation-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by interfering with the PDGF-betaR/ERK signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 34:250-258.
- [10] El Taghdouini A, van Grunsven LA. Epigenetic regulation of hepatic stellate cell activation and liver fibrosis[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 10(12): 1397-1408.
- [11] Meira Martins LA, Vieira MQ, Ilha M, et al. The interplay between apoptosis, mitophagy and mitochondrial biogenesis induced by resveratrol can determine activated hepatic stellate cells death or survival[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(2): 657-672.
- [12] He W, Wang B, Yang Jing, et al. Chloroquine improved carbon tetrachloride-induced liver fibrosis through its inhibition of the activation of hepatic stellate cells: role of autophagy[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(9): 1505-1509.
- [13] Thoen LF, Guimaraes EL, Dolle L, et al. A role for autophagy during hepatic stellate cell activation[J]. Hepatology, 2011, 55(6): 1353-1360.
- [14] Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, et al. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005, 45:605-628.
- [15] Mallat A, Lotersztajn S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis 5 Novel insights into liver fibrosis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 305(8): C789-799.
- [16] Song Y, Zhao YY, Wang F, et al. Autophagy in hepatic fibrosis[J]. Biomed Res Int, 2014: 436242-436249.
- [17] Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues[J]. Gastroenterology, 2012, 142(4): 938-946.

(收稿:2016-09-02 修回:2017-05-23)

责任编辑:李焕荣

英文责编:张晶晶