

本文引用格式:宋海容,邱建利,李灿灿,等.丹参酮IIA对胆道闭锁肝纤维化大鼠SMAD4 SMAD7及I型胶原蛋白的影响[J].安徽医学,2024,45(5):537-541.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2024.05.001

· 基础医学 ·

丹参酮IIA对胆道闭锁肝纤维化大鼠SMAD4 SMAD7及I型胶原蛋白的影响

宋海容 邱建利 李灿灿 华春兰 段 昱

[摘要] **目的** 探讨丹参酮IIA通过调控SMAD4、SMAD7蛋白延缓胆道闭锁肝纤维化的机制。**方法** 30只雄性SD大鼠按照随机数字表法分为正常组、假手术组、模型组、吡非尼酮组(300 mg/kg)和丹参酮IIA组(20 mg/kg),每组6只。除正常组和假手术组外,其余各组鼠采用胆总管注射无水乙醇的方法复制胆道闭锁肝纤维化模型,造模后第1天,吡非尼酮组和丹参酮IIA组鼠给予相应药物灌胃,假手术组和模型组鼠给予等体积生理盐水(10 mL/kg)灌胃。给药20 d后,采用戊巴比妥钠过量麻醉动物留取标本,比较各组间大鼠血液生化指标及肝脏组织病理学改变;检测血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总胆红素水平;Western blot检测肝组织SMAD4、SMAD7的表达以及肝组织中collagen I的表达。**结果** 与正常组相比,模型组大鼠血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、总胆红素升高($P<0.05$),肝组织呈明显的纤维化改变,肝组织SMAD4、collagen I蛋白表达水平升高,SMAD7表达降低($P<0.05$);丹参酮IIA治疗后,SMAD4、collagen I表达水平下降,SMAD7表达升高($P<0.05$),且大鼠肝纤维化较吡非尼酮组明显减轻。**结论** 丹参酮IIA可以有效延缓胆道闭锁肝纤维化进展,其机制可能通过调节TGF- β /Smads中关键蛋白SMAD4及SMAD7的表达,从而减少肝组织中collagen I的沉积。

[关键词] 丹参酮IIA;胆道闭锁;肝纤维化;TGF- β 1/Smads通路

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2024.05.001

Mechanism of ligustrazine retards hepatic fibrosis via TGF- β /Smad channelin biliary atresia

SONG Hairong¹, QIU Jianli², LI Cancan², HUA Chunlan¹, DUAN Yu¹

1.First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

2.The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

Funding project: National Natural Science Foundation of China (No.81804142)

Corresponding author: DUAN Yu, zzduanyu@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of tanshinone II A delaying hepatic fibrosis in biliary atresia by regulating SMAD4 and SMAD7 proteins. **Methods** Thirty male SD rats were divided into the normal group, sham operation group, model group, pirfenidone group (300 mg/kg) and tanshinone II A group (20 mg/kg) according to random number table, with six rats in each group. In addition to the normal group and sham operation group, the other groups of rats were injected with anhydrous ethanol in the common bile duct to replicate the biliary atresia liver fibrosis model. On the first day after modeling, the rats in the pirfenidone group and tanshinone II A group were given corresponding drugs, and the rats in the sham operation group and model group were given equal volume normal saline (10 mL/kg). After 20 days of administration, specimens were taken from animals overanesthetized with pentobarbital sodium, biochemical indexes and histopathological changes of liver were compared. Serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and total bilirubin levels were detected. Western blot analysis was performed to detect the expression of SMAD4 and SMAD7 and collagen I in liver tissue. **Results** Compared with normal group, serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and total bilirubin in model group were increased ($P<0.05$), liver tissue showed obvious fibrosis changes, collagen I and SMAD4 expression were increased, and SMAD7 expression was decreased ($P<0.05$). However, the expressions of SMAD4 and collagen I in the pirfenidone group and tanshinone II A group decreased, while the expression of SMAD7 increased ($P<0.05$), and tanshinone II A group had obvious advantages in improving liver fibrosis compared with pirfenidone group. **Conclusions** Tanshinone II A can effectively delay the progression of liver fibrosis in biliary atresia, possibly by regulating the expression of key pro-

基金项目:国家自然科学基金(编号:81804142)

作者单位:450000 河南郑州 郑州大学第一附属医院检验科(宋海容,华春兰,段昱)

450000 河南郑州 河南中医药大学第一附属医院儿科(邱建利,李灿灿)

通信作者:段昱, zzduanyu@163.com

teins SMAD4 and SMAD7 in TGF- β /Smads, thereby reducing the deposition of collagen I in liver tissue.

[Key words] Tanshinone II A; Biliary atresia; Liver fibrosis; TGF- β 1/Smads pathway

胆道闭锁(biliary atresia, BA)是婴幼儿时期胆汁淤积性肝病的主要病因之一,主要累及肝内、外胆管系统^[1],是导致肝移植的病因之一临床主要以结合胆红素升高、陶土样大便、不同程度的肝脾大、肝纤维化、肝硬化以及进行性肝衰竭为主要特征^[2]。本病受多种因素如种族、基因、环境以及感染病原等影响,发病率存在一定地域差异^[3]。此病病因具有明显异质性,可能由多种致病因素如围生期感染、遗传、环境等相互作用导致生命早期胆管树阻塞,进而引发本病。葛西术的开展可在一定程度上改善患儿生存质量,但依然未能阻止疾病进展^[1]。研究表明,TGF- β /Smad 信号通路的活化在肝纤维化进展中起到关键作用,通过调节其关键蛋白的表达,可有效延缓甚至逆转肝纤维化进展^[4]。目前已证实多种活血化瘀中药可以调节 TGF- β /Smad 信号通路中关键蛋白表达,其中丹参酮ⅡA 可以改善肝纤维化的进程,但其具体机制不详,本研究采用无水乙醇构建大鼠 BA 肝纤维化模型,探讨丹参酮ⅡA 延缓 BA 肝纤维化的具体机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 30 只 SPF(specific pathogen free, SPF)级 SD 雄性大鼠(体质量 200~250 g),购自三峡大学动物实验中心[SCXK(鄂)2017-0012],大鼠饲养于郑州大学医学科学研究所。本研究经郑州大学第一附属医院实验动物伦理委员会审查批准(2022-KY-0281-016)。饲养环境为温度 22~26℃,相对湿度 50%~60%,人工光照明暗各 12 h,适应性喂养 5 天。将 30 只大鼠按照随机数字表法分为正常组、假手术组、模型组、吡非尼酮组和丹参酮ⅡA 组,每组 6 只。

1.1.2 实验药物 丹参酮ⅡA(批号:T101150, HPLC $\geq$ 98%)及吡非尼酮(批号:P129335)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 4% 多聚甲醛(G1101-500ML)、伊红(Solarbio, E8090)、苏木素(Solarbio, G1140)、蛋白质 Marker(Helix, P12103)、十二烷基硫酸钠(solarbio, S8010)、PVDF 转移膜(millipore, IPVH00010)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(solarbio, PC0020)、兔抗鼠 SMAD4(abcam, ab63399)、兔抗鼠 SMAD7(novus, NBP2-67372)、兔抗鼠 collagen I(abcam, ab34710)、兔抗鼠 GAPDH(bioswamp, PAB36269)、山羊抗兔 IgG(bio-

swamp, SAB43714)。

1.2.2 主要仪器 全自动生化分析仪(罗氏, cobas8000)、石蜡切片机(Leica, RM2235)、生物组织包埋机(泰维科技, TB-718D)、超薄切片机(Leica, S6E)、酶标仪(杭州奥盛, AMR-100)、生物安全柜(Spantech 公司, BSC-1300 II B2)、自动组织脱水机(湖北康强医疗器械有限公司, TKD-TSF)。

1.3 方法

1.3.1 模型制备 以 40 mg/kg 戊巴比妥钠(10 g/L)腹腔注射方式进行麻醉,大鼠取仰卧位固定于手术台。沿大鼠剑突及左右肋缘逐层切开,找到肝十二指肠韧带分离胆总管。采用微量调节注射器缓慢注入无水乙醇(无水乙醇的注射剂量主要根据前期研究发现注入肝脏 0.18 mL 黑墨水^[4],可以在肝脏表面看到黑色颗粒,故根据大鼠体质量计算剂量为 1.2 μ L/g);注射完成后停留 5 min 后拔去注射器;用生物胶封闭注射创口,逐层缝合皮肤^[5]。

1.3.2 给药方法 正常组鼠:正常饲养,不做处理;丹参酮ⅡA 组和吡非尼酮组鼠分别于造模后第 1 天开始用盐酸丹参酮ⅡA(20 mg/kg)、吡非尼酮(300 mg/kg)溶液灌胃治疗,每日 1 次,连续 20 d;给药剂量参照文献[6]确定。假手术组和模型组鼠给予生理盐水(10 mL/kg)灌胃。

1.3.3 标本采集 采用戊巴比妥钠过量麻醉动物,采用腹主动脉取血的方法,血液静置 1 h 后离心(3 000 r/min)15 min 分离血清备用,取血后留取大鼠肝脏组织。

1.4 观察指标

1.4.1 肝功能分析 于 4℃解融血清标本后,生化分析仪检测用罗氏 cobas8000 全自动生化分析仪,检测总胆红素(Total bilirubin, TBil)、谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(Aspartate transaminase, AST)变化。

1.4.2 肝组织病理学变化 采用 HE 染色、Masson 染色观察肝纤维化以及肝脏坏死程度,肝脏汇管区炎症改变以及组织中胶原蛋白沉积情况;大鼠肝组织固定后按照病理操作规范进行脱水、透明、包埋等处理后进行相关的染色操作;根据文献报道中肝纤维化评分进行分级^[7]:0,无明显纤维化;1,轻度纤维化(门脉纤维化没有间隔);2,轻度纤维化(门脉纤维化伴少间隔);3,中度纤维化(大量间隔,无肝硬化);4,肝硬化。

1.4.3 Western blot 检测 SMAD4、SMAD7、collagen I 蛋白的表达 采用手术剪将肝组织剪成碎片,每 20 mg

肝脏组织加入 200 μ L 裂解液,然后采用匀浆器匀浆直至肝组织完全裂解。匀浆液离心(4 $^{\circ}$ C 12 000 g)15 min 后取上清液,按照 BCA 试剂盒检测目标蛋白浓度,然后进行蛋白变性处理;按照流程进行 SDS-PAGE 电泳、转膜和封闭程序;加入兔抗鼠 SMAD4(1:1 000)、SMAD7(1:1 000)、collagen I(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;羊抗兔 IgG(1:20 000)室温孵育 30 min,最终进行显影以及定影,使用 Alpha 软件处理系统分析灰度值,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白相对表达量。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 进行统计分析,正态分布计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型鉴定 动物模型的制备参照文献[5]和[8],大鼠出现皮肤、巩膜黄染,大便陶土样改变,转氨酶及胆红素(结合胆红素升高为主),提示模型成功。见图 1。

2.2 丹参酮 II A 对大鼠肝功能 TBil、ALT、AST 影响与正常组比较,假手术组大鼠血清 ALT、AST、TBil 水平

无变化($P>0.05$);模型组大鼠血清 ALT、AST、TBil 水平较正常组及假手术组升高($P<0.05$);应用丹参酮 II A 治疗后,与模型组比较,大鼠血清 ALT、AST、TBil 水平均降低($P<0.05$),且低于吡非尼酮组大鼠血清 ALT、AST、TBil 水平($P<0.05$)。见表 1。

表 1 丹参酮 II A 对肝纤维化大鼠肝功能的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBil(μ mol/L)
正常组	7.61 $\pm$ 2.72 ^④	40.6 $\pm$ 5.25 ^④	0.42 $\pm$ 0.08 ^④
假手术组	6.62 $\pm$ 2.34 ^④	48.91 $\pm$ 4.32 ^④	0.37 $\pm$ 0.06 ^④
模型组	263.50 $\pm$ 20.71 ^①	272.12 $\pm$ 21.41 ^①	162.21 $\pm$ 14.23 ^①
吡非尼酮组	170.11 $\pm$ 22.24 ^②	184.24 $\pm$ 18.21 ^②	114.58 $\pm$ 12.10 ^②
丹参酮 II A 组	109.42 $\pm$ 17.41 ^③	118.84 $\pm$ 20.14 ^③	68.91 $\pm$ 10.07 ^③
F 值	115.405	98.506	105.561
P 值	0.003	0.002	0.004

注:与正常组及假手术组相比,^① $P<0.05$;与模型组相比,^{②③} $P<0.05$;与吡非尼酮组相比,^{③④} $P<0.05$;与丹参酮 II A 组相比,^{①②④} $P<0.05$ 。ALT 为谷丙转氨酶,AST 为谷草转氨酶,Tbil 为总胆红素。

2.3 丹参酮 II A 对大鼠肝形态及组织学结构的影响 正常组及假手术组鼠肝组织大小、形态正常,表面无结节;模型组鼠肝脏外观呈淡黄色,表面呈结节状改变;丹参酮 II A 和吡非尼酮治疗组鼠肝组织结节较模型组减少,其中丹参酮 II A 减少明显。见图 2。HE 和 Masson 染色显示,及假手术组鼠肝细胞排列整齐,形态正常,无纤维组织增生,肝血窦以小叶中心静脉为中心呈放射状排列分布;模型组鼠肝组织出现结缔组织增生,纤维间隔形成,胶原蛋白沉积,肝细胞脂肪样变,假小叶形成;与模型组比较,吡非尼酮组及丹参酮 II A 组肝结缔组织增生改善,胶原蛋白沉积减少,肝细胞脂肪样变程度减轻。见图 3、4。

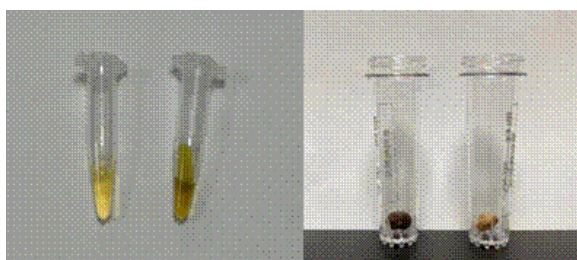
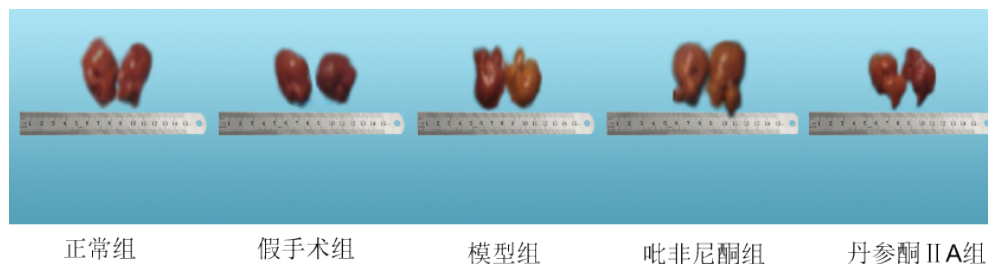


图 1 正常组(左)与模型组(右)血清及大便外观



正常组

假手术组

模型组

吡非尼酮组

丹参酮 II A 组

图 2 各组大鼠肝脏大体外观

2.4 丹参酮 II A 对大鼠肝 SMAD4、SMAD7、collagen I 蛋白表达的影响 与正常组比较,假手术组肝 SMAD4、SMAD7、collagen I 蛋白表达水平无差异($P>0.05$),模型组 SMAD4、collagen I 表达水平升高($P<0.05$),SMAD7 表达降低($P<0.05$);与模型组比较,丹参酮 II A 组及吡非尼酮组 collagen I、SMAD4 蛋白表达

水平下降($P<0.05$),SMAD7 水平升高($P<0.05$);丹参酮 II A 组 collagen I、SMAD4、SMAD7 表达水平分别较吡非尼酮组降低或升高($P<0.05$)。见图 5。

3 讨论

目前 BA 具体发病机制尚不明确,虽已进行大量临

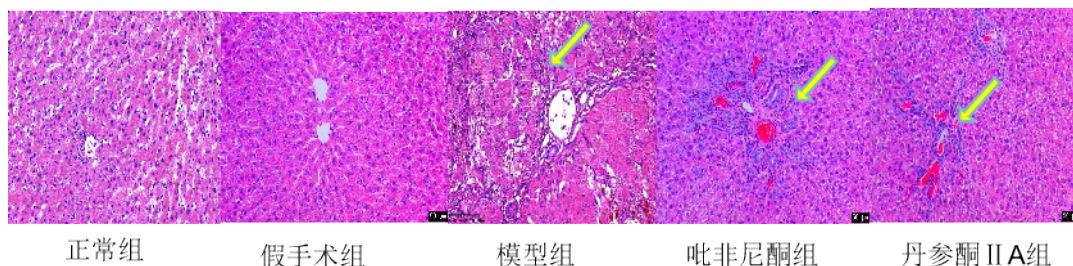


图 3 各组大鼠肝组织病理切片(HE×200)

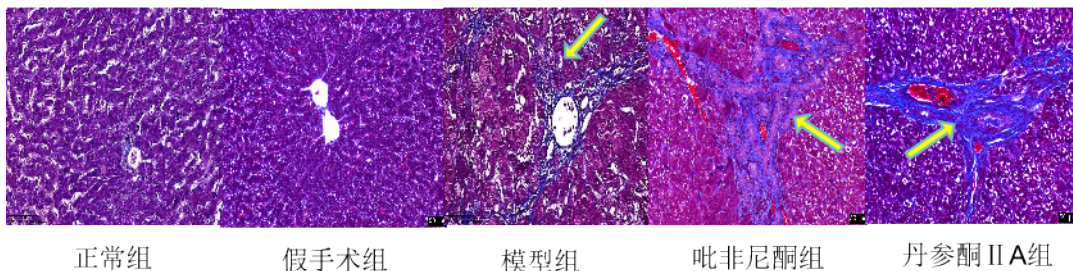
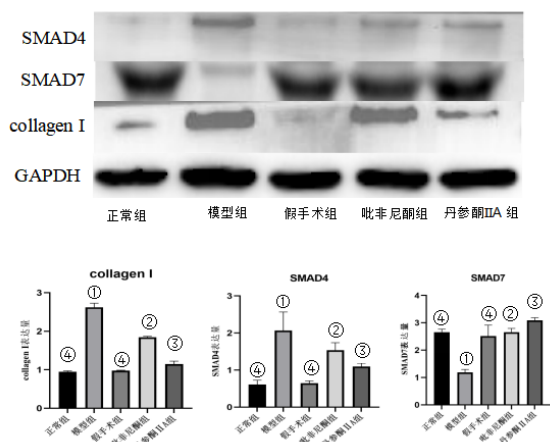


图 4 各组大鼠肝组织 Masson 染色(×200)



注:与正常组及假手术组相比,① $P<0.05$;与模型组相比,②③ $P<0.05$;与吡非尼酮组相比,③④ $P<0.05$;与丹参酮 II A 组相比,①②④ $P<0.05$ 。

图 5 丹参酮 II A 对大鼠肝 SMAD4、SMAD7、collagen I 蛋白表达的影响

床及实验研究,并提出了许多可能的病因及发病机制,如病毒感染、毒素、遗传变异、免疫异常或自身免疫功能失调、母体微嵌合、血管紊乱和形态发育的先天缺陷等,但仍未完全阐明。肝门空肠吻合术(Kasai 术)的开展,使患儿胆汁流阻塞的症状得到有效缓解,极大的改善了患儿生存质量,但因受到手术日龄、诊断延迟、胆红素水平等因素影响,即使行 Kasai 术后,多数患儿不可避免的出现肝纤维化及肝硬化,肝移植是其最终的治疗方案^[9]。为此,本研究构建大鼠 BA 肝纤维化模型,观察丹参酮 II A 对大鼠 BA 肝纤维化病理进程的影响,为临床应用丹参酮 II A 防治 BA 肝纤维化提供理论

依据。

研究表明,转化生长因子 TGF- β 在肝脏从单纯损伤到纤维化、肝硬化甚至肝癌的发生中均发挥着重要的调节作用^[10]。其中 TGF- β /Smad 信号通路在纤维化和炎症中起着关键作用。其活化过程中,TGF- β II 型受体(T β R2)招募 I 型受体组装成异质激酶复合体,磷酸化 I 型受体的 Gly-Ser-rich 结构域并诱导构象变化。激活的 I 型受体随后磷酸化受体调控 Smads 的羧基端 Ser-Ser-X-Ser 基序(R-Smads),如 Smad2 和 Smad3。磷酸化的 Smad2/3 与 Smad4 结合转移至细胞核,在核内与靶基因形成转录复合体,调节基因表达,导致胶原蛋白的降解和沉积失衡,最终导致肝纤维化的形成^[11]。它们和其他辅助因子一起调节多种靶基因(如 I 型胶原蛋白, α -平滑肌肌动蛋白)的转录,最后呈现出许多生物学功能^[12]。相反,Smad7 在该通道中起着负性调节作用,可以拮抗 R-Smads 和 co-Smad 的形成,进而抑制磷酸化介导信号转导 R-Smads 并促进受体复合物的降解^[13-14]。

本研究选取 TGF- β /Smad 信号通路中关键蛋白 Smad4、Smad7 为研究切入点,发现采用无水乙醇胆总管注射构建的 BA 肝纤维化模型中,丹参酮 II A 不仅可以有效改善肝纤维化大鼠的表型变化,降低转氨酶及胆红素的水平,说明可以通过抑制炎症反应,起到保护肝细胞的作用。Smad4 是 TGF- β 信号通路的核心介质,可与 Smad2/3 相互作用,传递上游 Smad 信号,促进肝纤维化的发生发展^[15]。研究表明,阿魏酸^[16]、异甘草酸镁^[17]等药物可抑制 TGF- β 信号通路中 Smad4 的表达,从而抑制肝纤维化^[18]。本研究结果提示,模型组肝

中 Smad4 明显升高,而给予吡非尼酮组及丹参酮 II A 后其表达量明显下降,且丹参酮 II A 组下降更明显,说明其可以通过调节 Smad4 的表达调控肝纤维化。Smad7 是 TGF- β 1/Smads 信号通路的重要组成部分。Smad7 是一种负调节因子,其过表达可阻断 HSC 活化和肝纤维化进展,甚至逆转肝纤维化^[19],本研究结果显示,吡非尼酮及丹参酮 II A 组均可促进其表达,并且丹参酮 II A 组上升更明显,且相关研究也证实,Smad7 可逆转 TGF- β 1 信号,达到抗纤维化作用^[20]。Smad7 过表达抑制 TGF- β 1 受体的磷酸化,阻止 TGF- β 1 信号的激活。Smad7 通过逆转 TGF- β 1/Smads 信号通路,降低活化 HSC 中 I 型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的表达。因此,Smad7 具有重要的抗纤维化作用^[21]。

综上所述,丹参酮 II A 可通过调节 TGF- β /Smads 通路中 Smad4 和 Smad7 蛋白的表达,减少胶原蛋白在肝脏中的沉积,从而减缓 BA 肝纤维化的进程。

参考文献

- [1] ANTALA S, TAYLOR S A. Biliary atresia in children: update on disease mechanism, therapies, and patient outcomes [J]. Clin Liver Dis, 2022, 26(3):341-354.
- [2] JIANG J H, TASI Y W, LEE S Y, et al. Biliary atresia associated with small-intestine atresia: a condition of high morbidity and mortality [J]. Asian J Surg, 2022, 45(10):1897.
- [3] VIJ M, RELA M. Biliary atresia: pathology, etiology and pathogenesis [J]. Future Sci Oa, 2020, 6(5): FSO466.
- [4] QIU J L, ZHANG G F, CHAI Y N, et al. Ligustrazine attenuates liver fibrosis by targeting mir-145 mediated transforming growth factor- β /Smad signaling in an animal model of biliary atresia [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2022, 381(3):257-265.
- [5] 葛军涛,李龙,魏延栋,等.胆总管内注射无水乙醇致胆道闭锁动物模型的建立[J].中国实验动物学报,2014,22(3):50-52.
- [6] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
- [7] DONG R, YANG Y, SHEN Z, et al. Forkhead box A3 attenuated the progression of fibrosis in a rat model of biliary atresia [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3):e2719.
- [8] KYOKANE T, NAGINO M, ODA K, et al. An experimental study of selective intrahepatic biliary ablation with ethanol [J]. J Surg Res, 2001, 96(2):188-196.
- [9] SOHN H, PARK S, KANG Y, et al. Predicting variceal bleeding in patients with biliary atresia[J]. Scand J Gastroenterol, 2019, 54(11):1385-1390.
- [10] FABREGAT I, CABALLERO-DIAZ D. Transforming growth factor- β -induced cell plasticity in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis[J]. Front Oncol, 2018,8:357.
- [11] HATA A, CHEN Y G. TGF- β signaling from receptors to Smads[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(9): a022061.
- [12] WEI X, XIA Y, LI F, et al. Kindlin-2 mediates activation of TGF- β /Smad signaling and renal fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2013,24(9):1387-1398.
- [13] WU B, TIAN X, WANG W, et al. Upregulation of cadherin-11 contributes to cholestatic liver fibrosis[J]. Pediatr Investig, 2022,6(2):100-110.
- [14] SUN P, XIAO M, CHEN H, et al. A joint transcriptional regulatory network and protein activity inference analysis identifies clinically associated master regulators for biliary atresia [J]. Front Pediatr, 2022,10:1050326.
- [15] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF- β /Smad pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. J Histochem Cytochem, 2016,64(3):157-167.
- [16] MU M, ZUO S, WU R M, et al. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation via inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2018,12:4107-4115.
- [17] TEE J K, PENG F, TAN Y L, et al. Magnesium isoglycyrrhizinate ameliorates fibrosis and disrupts TGF- β -mediated SMAD pathway in activated hepatic stellate cell line LX2[J]. Front Pharmacol, 2018,9:1018.
- [18] WEI M, YAN X, XIN X, et al. Hepatocyte-specific Smad4 deficiency alleviates liver fibrosis via the p38/p65 pathway [J]. Int J Mol Sci, 2022,23(19):11696.
- [19] YANG P C, BAI W Z, WANG J, et al. Sedum sarmentosum total flavonoids alleviate schistosomiasis-induced liver fibrosis by altering TGF- β 1 and Smad7 expression[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020:2083697.
- [20] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF- β /Smad pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. J Histochem Cytochem, 2016,64(3):157-167.
- [21] HU H H, CHEN D Q, WANG Y N, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis[J]. Chem Biol Interact, 2018, 292:76-83.

(2023-10-29收稿)

(本文编校:刘菲,胡欣)