

基于 LIN28A/NF- κ B 信号通路研究狗肝菜多糖 缓解肝纤维化的作用机制

郑董璇¹, 张可锋¹, 晋玲², 钟明利¹, 赵唐莲¹, 曹后康², 段小群^{1*}, 高雅^{1*}

¹桂林医学院药学院, 桂林 541004; ²甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000

摘要:探讨狗肝菜多糖(DCP)通过 LIN28A/NF- κ B 信号通路改善大鼠肝纤维化(HF)。将 60 只雄性 SD 大鼠以每组 10 只, 随机分成正常组、模型组、秋水仙素组和 DCP 低中高剂量(50、100、200 mg/kg)组。通过每周进行腹腔注射 40% 的四氯化碳(CCl₄)橄榄油溶液(1 mL/kg)2 次, 建立 HF 大鼠模型, 正常组按照相同剂量注射橄榄油; 每日根据体重给予秋水仙素组和 DCP 低中高剂量组大鼠相应的药物进行治疗, 正常组与模型组大鼠按照相同计算方式灌胃蒸馏水, 造模与治疗过程持续 6 周。实验终点, 使用 HE 染色和 Masson 染色观察和评价大鼠肝脏组织病变程度; 使用 ELISA 法检测大鼠血清中 HA、LN、PC III、IV-C 含量和肝脏组织中炎症因子(IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)水平; 使用 PCR 和 Western blot 检测和分析大鼠肝脏组织中 α -SMA、TGF- β 1、LIN28A、NF- κ Bp65、MMP9、COX-2、iNOS 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示, 秋水仙素和各剂量的 DCP 均可以降低大鼠血清中 HA、LN、PC III 和 IV-C 含量, 且 DCP 高剂量组效果明显; 病理结果显示, 与模型组相比 DCP 组和秋水仙素组可以明显缓解大鼠肝脏的病变程度; 肝脏组织中的 α -SMA、TGF- β 1、LIN28A、NF- κ Bp65、MMP9、COX-2 和 iNOS 的表达均有不同程度的下降。综上所述, DCP 对大鼠 HF 具有明显改善作用, 其机制与抑制 NF- κ Bp65 蛋白表达, 减少下游炎症因子的释放而发挥抗 HF 作用。

关键词:狗肝菜多糖(DCP); 肝纤维化; CCl₄; LIN28A/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)3-0386-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.3.005

Study on the mechanism of polysaccharides from *Dicliptera chinensis* in alleviating liver fibrosis based on LIN28A/NF- κ B signaling pathway

ZHENG Dong-xuan¹, ZHANG Ke-feng¹, JIN Ling²,

ZHONG Ming-li¹, ZHAO Tang-lian¹, CAO Hou-kang², DUAN Xiao-qun^{1*}, GAO Ya^{1*}

¹Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

²Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: To study the effect of polysaccharide from *Dicliptera chinensis* (DCP) on LIN28A/NF- κ B signaling pathway in liver fibrosis. Sixty male SD rats were randomly divided into normal group, model group, colchicine group and DCP low, medium and high dose (50, 100 and 200 mg/kg) groups with 10 rats in each group. The liver fibrosis rat model was established by intraperitoneal injection of 40% CCl₄ olive oil solution (1 mL/kg) twice a week. The normal group was injected with olive oil at the same dose. The rats in the colchicine group and the DCP low, medium and high dose group were given the corresponding drugs every day according to their body weight. The rats in the normal group and the model group were given distilled water according to the same calculation method. The modeling and treatment process lasted 6 weeks. At the end point of the experiment, HE staining and Masson staining were used to observe and evaluate the degree of liver tissue lesions in rats. The levels of HA, LN, PC III, IV-C in serum and inflammatory factors (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) in liver tissue were detected by ELISA. The mRNA and protein expression levels of α -SMA, TGF- β 1, LIN28A, NF- κ Bp65, MMP9, COX-2 and iNOS in rat liver tissue were detected and analyzed by PCR and Western blot. The results showed that the contents of HA, LN, PC III and IV-C in rat serum in colchicine and various doses of DCP groups, and the effect was obvious in DCP high dose group. The

收稿日期: 2020-09-01

接受日期: 2021-02-01

基金项目: 国家自然科学基金(81760114, 81960779); 广西自然科学基金(2017GXNSFAA198218, 2018GXNSFAA281040)

* 通信作者 Tel: 86-013457684046; E-mail: xueshengcailiao@163.com

pathological results showed that the degree of liver lesions in DCP group and colchicine group were significantly relieved compared with that in model group. The expression of α -SMA, TGF- β 1, LIN28A, NF- κ Bp65, MMP9, COX-2 and iNOS in liver tissue was decreased in different degrees. To sum up, DCP can obviously improve HF in rats, and its mechanism is related to the inhibition of NF- κ B signaling pathway by DCP.

Key words: *Dicliptera chinensis* polysaccharide (DCP); liver fibrosis; CCl₄; LIN28A/NF- κ B signal pathway

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是由各种有害刺激,包括病毒感染、药物毒性、酒精和自身免疫性肝病的持续伤口愈合反应对肝脏损伤所致^[1]。它是慢性肝病的重要病理标志,是肝硬化发生的关键事件,也是终末期肝细胞癌和晚期肝硬化的主要病因^[2,3]。秋水仙素作为肝纤维化和肝硬化的临床用药,主要抑制肝星状细胞早期的活化与增殖,促进肝星状细胞凋亡,干扰胶原代谢,针对不同病因导致的 HF 秋水仙素治疗效果不一,并且秋水仙素会引起许多副作用,例如腹痛、恶心、食欲不振等,高剂量服用后还会导致肝肾功能衰竭^[4],因此仍需研究并开发新的安全有效的治疗药物。狗肝菜(*Dicliptera chinensis* (L.) Juss)作为中国传统中药材,味甘性凉,具有清热、凉血、利尿、解毒平肝等功效,对 CCl₄、D-氨基半乳糖盐酸和脂多糖等多种类型的肝损伤模型具有缓解作用^[5];本课题组在先前研究中发现,狗肝菜多糖(DCP)对肝脏脂质代谢紊乱尚有良好的抑制作用,其机理主要与缓解炎症反应和抑制氧化应激有关^[6]。LIN28A 是一种高度保守的 RNA 结合蛋白,在诱导多能干细胞、调节发育、细胞生长和代谢等方面发挥着重要作用,在诸如食道癌^[7]、卵巢癌^[8]等多种癌细胞中,均发现存在 LIN28A 的过表达现象。有研究表明,肝脏特异性缺失 LIN28A 可缓解小鼠肝细胞癌并有效延长患癌小鼠寿命^[9],这提示 LIN28A 可能成为治疗肝细胞癌或肝脏疾病的潜在靶点。但目前尚无文献报道其与 HF 的关联性,此文章旨在探索 LIN28A 与 HF 的关联性并研究 DCP 能否通过抑制 LIN28A 起到保护肝脏的作用。

1 材料与试剂

1.1 试验药物与试剂

狗肝菜多糖(由本课题组所在实验室提取制备^[6]);分析纯 CCl₄(广东汕头市西陇化工厂);SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(南通市碧云天生物技术研究);秋水仙素(上海如吉科技发展有限公司,纯度 > 99%);PVDF 膜(Bio-Rad 公司,美国);LIN28A 抗体、核因子- κ B p65 (NF- κ Bp65)抗体、转

化生长子- β 1 (TGF- β 1)、抗体基质金属蛋白酶-9 (MMP9)抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、环氧合酶-2 (COX-2)抗体和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)抗体(Abcam, 英国);GAPDH 抗体(Abcam, 英国);辣根标记的山羊抗兔二抗、辣根标记的山羊抗鼠二抗(Bioworld, 美国);Super ECL Plus 超敏发光液(上海雅酶生物科技有限公司);PCR 检测试剂盒(EZbioscience, 美国);透明质酸(HA)ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司);IV型胶原蛋白(IV-C)、III型前胶原(PC III)ELISA 试剂盒(上海赛默生物科技发展有限公司);层粘连蛋白(LN)ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);PMSF(北京索莱宝科技有限公司)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 动物

60 只 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重 180 ~ 220 g, 购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号 SCXK(湘)2016-0002。

1.3 仪器

ZD-9550 台式振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Centrifuge 5424R 台式高速冷冻离心机(Eppendorf 公司,德国);Olympus BX51 显微镜(奥林巴斯公司,日本);SpectraMax i3X 酶标仪(美谷分子仪器(上海)有限公司);电泳基础电源(Bio-Rad 公司,美国);7500 RT-PCR system(ThermoFisher 公司,美国);CLINX 化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 造模与给药

60 只雄性 SD 大鼠适应性喂食 1 周后,随机分成 6 组,即正常组、模型组、秋水仙素(0.12 mg/kg)组、DCP 低剂量(DCP low dose, DCP-L; 50 mg/kg)组、DCP 中剂量(DCP medium dose, DCP-M; 100 mg/kg)组和 DCP 高剂量(DCP high dose, DCP-H; 200 mg/kg)组,每组 10 只。除正常组外,其余大鼠均每周腹腔注射 2 次 40% 的 CCl₄ 橄榄油溶液(1 mL/

kg),建立 HF 大鼠模型,正常组大鼠以相同剂量腹腔注射纯橄榄油。每日根据体重,给予秋水仙素组和 DCP 低中高剂量组大鼠相应的药物治疗,正常组与模型组大鼠按照相同计算方式灌胃蒸馏水,持续 6 周。末次给药后,所有大鼠禁食不禁水 16 h,乙醚麻醉后腹腔静脉取血,收集肝脏。

2.2 检测肝脏病理学

取各组大鼠相同位置 1 cm 正方大小的肝脏,浸泡于 4% 多聚甲醛组织固定液中 48 h,进行包埋切片后,摊片烘片,脱蜡至水,苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色和 Masson 染色后在 Olympus BX51 光学显微镜下观察组织病理变化。

2.3 DCP 对 HF 大鼠血清 HA、LN、PC III 和 IV-C 的影响

大鼠血液室温静置 2 h 后,于 4 °C 条件下,4 500 rpm 离心 10 min 后取上层血清。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA),严格按照检测试剂盒说明书测定血清中 HA、LN、PC III 和 IV-C 含量。

2.4 检测肝脏炎症因子

采用酶联免疫吸附测定法(ELISA),严格按照检测试剂盒说明书(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)测定大鼠肝脏中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量。称取肝脏组织(80 ~ 100 mg),按质量体积比 1:9 加入

裂解液,冰水浴中电动匀浆机破碎,于 4 °C 条件下,12 000 rpm 离心 15 min 后取上清保存作为检测样品。严格按照试剂盒说明书进行肝脏组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量测定。

2.5 测定 mRNA 相对含量

采用聚合酶链式反应(PCR)测定肝脏组织中 α -SMA、TGF- β 1、LIN28A、NF- κ Bp65、MMP9、COX-2 和 iNOS 的相对含量。取各组大鼠肝脏组织约 100 mg,准确加入 1 mL Trizol(ThermoFisher 公司,美国),冰上研磨。加入 0.2 mL 氯仿剧烈震荡后静置 5 min,4 °C 下 10 000 rpm 离心 15 min,取上层水相加入等体积的异丙醇,静置 10 min 后 4 °C 下 10 000 rpm 离心 10 min,弃上清并用预冷 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀,4 °C 下 5 000 rpm 离心 5 min,弃上清。离心管干燥 5 min 后加入 0.2 mL 去酶水,置于 55 °C 水浴锅中 10 min,制备 RNA 样品。上机逆转录制备 cDNA 样品,严格按照试剂盒要求,以 GAPDH 作为内参,进行肝脏组织中 α -SMA、TGF- β 1、LIN28A、NF- κ Bp65、MMP9、COX-2 和 iNOS 的相对含量测定。各基因的引物序列见表 1。

2.6 测定大鼠肝脏蛋白表达

采用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定肝组织中 LIN28A、 α -SMA、TGF- β 1、NF- κ Bp65、MMP9、

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	
α -SMA	Forward	GACAATGGCTCTGGGGCTCTGTA
	Reverse	TTTGGCCCATCCAACCATTA
TGF- β 1	Forward	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC
	Reverse	GCCTTAGTTTGACAGGATCTG
LIN28A	Forward	CGGGCATCTGTAAGTGGTTC
	Reverse	CAGACCCTTGGCTGACTTCT
NF- κ Bp65	Forward	CCCTGAGAAAGAAACACAAGGT
	Reverse	ATGAAGGTGGATGATGGCTAAG
MMP9	Forward	ACGACGCTTCCAGTACCGA
	Reverse	TTGGTCCACCTGGTTCAACT
COX-2	Forward	TTCCAATCCATGTCAAACCCT
	Reverse	AGTCCGGG TACAGTCACACTT
iNOS	Forward	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA
	Reverse	GTGGACGGGTCGATGTCAC
GAPDH	Forward	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	Reverse	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

COX-2 和 iNOS 蛋白的表达水平。取各组大鼠肝组织约 60 mg,加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液 1 mL 冰上研磨至无肉眼可见组织,4 °C 条件下 12 000 rpm 离心 10 min 后收集上清液。另取少量上清,按照试剂盒说明书通过 BCA 法测定蛋白含量。按相应比例加入 Loading buffer,沸水浴 10 min 后备用。

根据蛋白含量测定结果,调整蛋白样品上样量后进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。于 200 mA 冰水浴转膜 2 h,5% 封闭液封闭 2 h。加入相应一抗(稀释比例均为 1:1 000),4 °C 下摇床过夜;次日,TBST 洗涤,条件同上,根据一抗基源动物加入山羊抗兔或山羊抗鼠二抗(稀释比例为 1:5 000),室温下孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,滴加显色液,使用 CLINX 化学发光成像系统显影,使用 Quantity One 对条带进行灰度分析并计算蛋白相对表达量。

2.7 数据统计学分析

实验数据通过 SPSS 19.0 软件统计分析,各组数据均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用单因素方差分析进行多组间比较,使用独立样本 *t* 检验进行两组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异标准,判断其统计学意义。

3 结果与分析

3.1 DCP 对 HF 大鼠肝脏形态的影响

H&E 染色结果显示,正常组大鼠肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐且饱满。模型组大鼠肝小叶结构受损,且伴大量炎性细胞浸润。相较于模型组,秋水仙素组和 DCP 低中高剂量大鼠肝小叶清晰,肝细胞变性现象有所改善,表明 DCP 可改善 CCl_4 造成的大鼠肝脏损伤进而减缓纤维化进程(见图 1)。

Masson 染色结果显示,正常组大鼠肝脏肝细胞

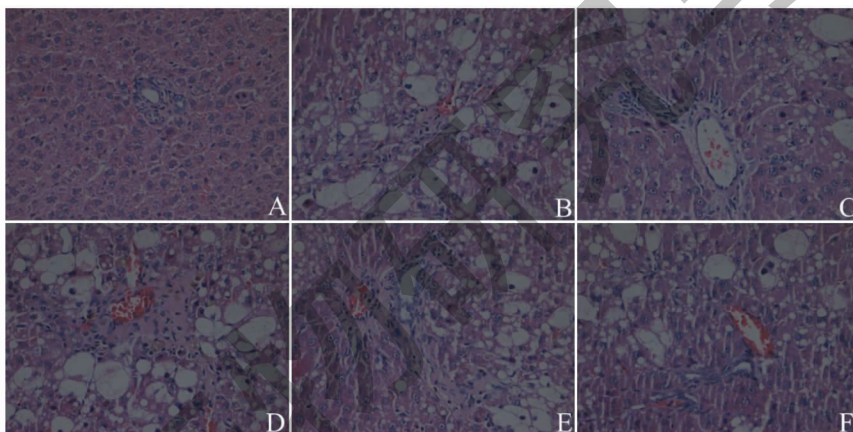


图 1 大鼠肝脏切片的 HE 染色 ($\times 200$)

Fig. 1 Photomicrograph of rats liver sections stained with H&E ($\times 200$)

注:A:正常组;B:模型组;C:秋水仙素组;D:DCP-L;E:DCP-M;F:DCP-H;下同。Note:A:Normal group;B:Model group;C:Colchicine group;D:DCP-L;E:DCP-M;F:DCP-H;The same below.

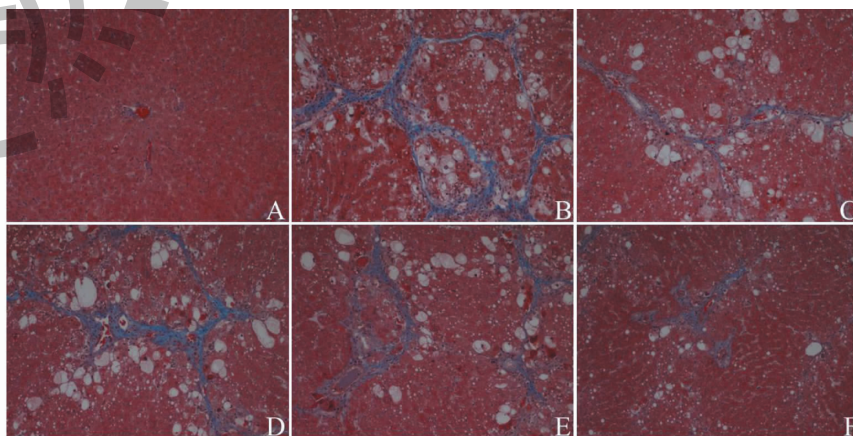


图 2 大鼠肝脏切片的 Masson 染色 ($\times 100$)

Fig. 2 Photomicrograph of rats liver sections stained with Masson ($\times 100$)

致密排列,无明显蓝色胶原沉积。模型组大鼠肝组织出现大量胶原沉积,有严重的纤维化现象。相较于模型组,秋水仙素组和 DCP 低中高剂量组肝脏病变有不同程度的减轻,且 DCP 高剂量组减轻程度明显(见图 2)。

3.2 DCP 对 HF 大鼠血清 HA、LN、PC III 和 IV-C 的影响

相较于正常组,模型组大鼠血清中 HA、LN、PC

表 2 DCP 对血清中 HA、LN、PC III 和 IV-C 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 The effects on the serum HA, LN, PC III and IV-C of DCP ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	HA (ng/mL)	LN (ng/mL)	PC III (ng/mL)	IV-C (ng/mL)
正常 Normal	-	101.83 ± 9.58	104.89 ± 11.54	66.57 ± 6.89	213.32 ± 18.89
模型 Model	-	251.85 ± 22.53 ^{##}	276.46 ± 28.13 ^{##}	187.31 ± 19.12 ^{##}	354.24 ± 33.35 ^{##}
秋水仙素 Colechicine	0.12	153.13 ± 16.33 ^{**}	193.65 ± 21.25 ^{**}	149.23 ± 18.07	289.63 ± 28.16
DCP 低剂量 DCP-L	50	225.89 ± 18.95	233.85 ± 24.11	168.05 ± 18.79	332.66 ± 28.73
DCP 中剂量 DCP-M	100	187.86 ± 18.74 ^{**}	208.62 ± 21.63 [*]	159.34 ± 15.39	293.98 ± 28.65
DCP 高剂量 DCP-H	200	148.85 ± 13.42 ^{**}	186.21 ± 22.63 ^{**}	145.23 ± 18.16 [*]	280.35 ± 27.85 [*]

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

Note: Compared with normal group, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; The same below.

3.3 DCP 对 HF 大鼠肝脏中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的影响

模型组大鼠肝脏中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量较正常组大鼠均有显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。DCP 低中高剂量组大鼠肝脏中 IL-1 β 、

III 和 IV-C 含量均有显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$),说明肝细胞通透性改变,提示造模成功。相较于模型组大鼠,DCP 低中高剂量组大鼠血清中上述指标均有不同程度的降低,且 DCP 高剂量组各指标均有明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示 DCP 可缓解由 CCl₄ 造成的大鼠肝细胞损伤(见表 2)。

IL-6 和 TNF- α 的含量较模型组大鼠均有不同程度的降低,且 DCP 高剂量组各指标均有明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),此结果表示 DCP 可缓解 CCl₄ 引起的肝脏炎症反应和炎症介质的释放(见表 3)。

表 3 DCP 对肝脏中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 The effects of DCP on IL-1 β , IL-6 and TNF- α in liver ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
正常 Normal	-	142.1 ± 10.3	46.3 ± 3.5	75.3 ± 6.3
模型 Model	-	375.3 ± 32.5 ^{##}	123.5 ± 9.5 ^{##}	239.4 ± 21.3 ^{##}
秋水仙素 Colchicine	0.12	266.2 ± 23.3 ^{**}	92.7 ± 8.3 ^{**}	192.3 ± 15.9 ^{**}
DCP 低剂量 DCP-L	50	312.8 ± 29.2 ^{**}	113.6 ± 10.8	221.6 ± 19.7
DCP 中剂量 DCP-M	100	289.7 ± 25.9 ^{**}	105.3 ± 9.9 ^{**}	206.2 ± 18.8 ^{**}
DCP 高剂量 DCP-H	200	260.3 ± 22.9 ^{**}	86.7 ± 8.2 ^{**}	187.3 ± 17.9 ^{**}

3.4 PCR 检测 LIN28A、 α -SMA、TGF- β 1、NF- κ Bp65、MMP9、COX-2 和 iNOS

相较于正常组,模型组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β 1、LIN28A、NF- κ Bp65、MMP9、COX-2 和 iNOS 的 mRNA 相对含量均显著升高,差异均具有统计学

意义($P < 0.01$);相较于模型组大鼠,DCP 低中高剂量组均可明显抑制上述蛋白的 mRNA 相对含量,差异均具有统计学意义($P < 0.01$),此结果表明 DCP 抗肝纤维化可能与 LIN28A/NF- κ Bp65 信号通路有关(见表 4、5)。

表 4 DCP 对肝脏中 α-SMA 和 TGF-β1 mRNA 相对含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of DCP on relative mRNA levels of α-SMA and TGF-β1 in liver ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	α-SMA	TGF-β1
正常 Normal	-	1	1
模型 Model	-	5.33 ± 0.51 ^{##}	8.95 ± 0.77 ^{##}
秋水仙素 Colchicine	0.12	2.95 ± 0.24 ^{**}	6.46 ± 0.59 ^{**}
DCP 低剂量 DCP-L	50	4.42 ± 0.48 ^{**}	7.46 ± 0.68 ^{**}
DCP 中剂量 DCP-M	100	3.38 ± 0.39 ^{**}	6.88 ± 0.48 ^{**}
DCP 高剂量 DCP-H	200	2.65 ± 0.23 ^{**}	5.79 ± 0.61 ^{**}

表 5 DCP 对肝脏中 LIN28A、NF-κBp65、MMP9、COX-2 和 iNOS mRNA 相对含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of DCP on relative mRNA levels of LIN28A, NF-κBp65, MMP9, COX-2 and iNOS in liver ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	LIN28A	NF-κBp65	MMP9	COX-2	iNOS
正常 Normal	-	1	1	1	1	1
模型 Model	-	12.65 ± 0.81 ^{##}	5.32 ± 0.34 ^{##}	6.78 ± 0.44 ^{##}	11.11 ± 0.26 ^{##}	13.21 ± 1.03 ^{##}
秋水仙素 Colchicine	0.12	7.12 ± 0.76 ^{**}	2.68 ± 0.21 ^{**}	3.83 ± 0.33 ^{**}	7.51 ± 0.63 ^{**}	9.21 ± 0.89 ^{**}
DCP 低剂量 DCP-L	50	11.78 ± 0.95	3.91 ± 0.33 ^{**}	6.21 ± 0.63	9.95 ± 0.85 [*]	12.02 ± 0.98
DCP 中剂量 DCP-M	100	9.09 ± 0.79 ^{**}	3.21 ± 0.31 ^{**}	5.03 ± 0.53 ^{**}	8.44 ± 0.66 ^{**}	10.26 ± 0.82 ^{**}
DCP 高剂量 DCP-H	200	5.54 ± 0.36 ^{**}	2.41 ± 0.22 ^{**}	3.37 ± 0.34 ^{**}	6.26 ± 0.46 ^{**}	8.26 ± 0.75 ^{**}

3.5 Western blot 检测 LIN28A、α-SMA、TGF-β1、NF-κBp65、MMP9、COX-2 和 iNOS

相较于正常组,模型组大鼠肝组织中 LIN28A、α-SMA、TGF-β1、NF-κBp65、MMP9、COX-2 和 iNOS 蛋白表达量均显著升高,差异均具有统计学意义(P

< 0.01); DCP 低中高剂量组较模型组大鼠均可不同程度抑制上述蛋白的表达,差异均具有统计学意义(P < 0.01),此结果再次验证 DCP 可能通过 LIN28A/NF-κB 信号通路起到抗肝纤维化作用(见图 3)。

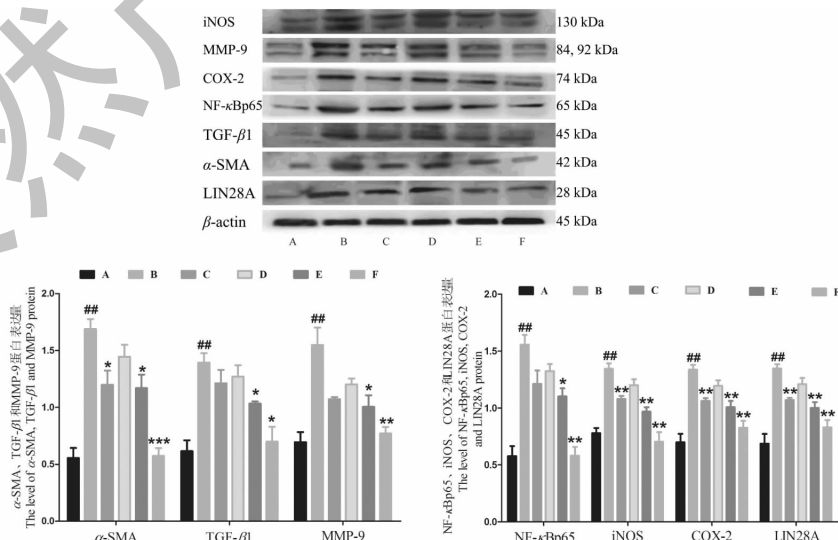


图 3 DCP 对 TGF-β1、α-SMA、LIN28A、NF-κBp65、MMP9、COX-2 和 iNOS 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect on the TGF-β1, α-SMA, LIN28A, NF-κBp65, MMP9, COX-2 and iNOS protein of DCP

4 讨论

肝纤维化是一种病理病变,以细胞外基质(ECM)在肝周隙的进行性积聚为特征,是慢性肝病的主要问题^[10]。由于其最终会导致肝硬化,成为世界范围内发病和死亡的主要原因,据估计全球2%的人口会受到肝硬化的影响^[11]。因此,研究DCP对肝脏的保护作用具有重要意义。

该实验采用CCl₄诱导肝纤维化,其造成的病理改变与人体临床HF极为相似^[12,13]。HA、LN、PC III和IV-C是肝细胞外基质的主要成分,在肝纤维化中由于细胞外基质合成增多、降解不足,故其指标水平升高程度与肝纤维化程度呈现正相关^[14]。本研究中,模型组大鼠HA、LN、PC III和IV-C含量明显上升,H&E染色与Masson染色结果显示模型组大鼠肝脏组织脂肪变性和胶原沉积现象明显,提示造模成功。DCP给药后,大鼠血清中HA、LN、PC III和IV-C含量显著下降,H&E染色病理改变有所缓解,显示DCP对肝脏以及肝细胞具有保护作用。

NF- κ B是一种核转录因子,调控大量对细胞凋亡和炎症的调节有重要作用的基因^[15]。当肝脏发生炎症反应时,NF- κ B被激活并释放TNF- α 、IL-6和IL-1 β 等炎症因子,导致肝组织炎症反应加剧^[16]。在炎症部位诱导酶COX-2和iNOS表达也会提高,产生过度的炎症反应,也作为炎症标志物。实验结果显示,模型组大鼠肝组织NF- κ Bp65、COX-2和iNOS的mRNA相对含量和蛋白表达水平显著提高,并且TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的mRNA相对含量也有明显升高;相较于模型组,DCP低中高剂量各组大鼠肝组织NF- κ Bp65、COX-2和iNOS的mRNA相对含量和蛋白表达水平显著降低,炎症因子TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的mRNA相对含量也有不同程度下降。此结果表明DCP可通过抑制NF- κ Bp65蛋白表达,减少下游炎症因子的释放而发挥抗炎作用。

TGF- β 1是一种多效细胞因子(促纤维化和炎症因子),参与免疫反应和肝纤维化的发展。TGF- β 1可导致肝星状细胞(HSCs)的活化、增殖和纤维化过程^[17]。 α -SMA可反映HSC的活化情况,作为HSC激活的标志性蛋白,同时也可用于评估肝纤维化程度。基质金属蛋白酶(MMPs)是细胞外基质降解和重构的关键因素。MMP9是降解正常肝基质最相关的MMPs之一,可促进肝纤维化的发展^[18]。Western Blot分析显示,模型组大鼠肝组织TGF- β 1、 α -SMA和MMP9的蛋白表达水平显著提高;相较于模型

组,DCP低中高剂量各组大鼠肝组织TGF- β 1、 α -SMA和MMP9的蛋白表达水平显著降低。此结果表明DCP可通过减少CCl₄引起的肝组织TGF- β 1和MMP9蛋白表达,减缓肝脏内胶原沉积的速度,从而起到缓解HF的作用。

LIN28A基因可以通过其独特的冷休克结构域(CSD)和半胱氨酸半胱氨酸组氨酸半胱氨酸锌指结构域的配对被识别,在序列特异性mRNA结合、miRNA结合、miRNA前处理以及miRNA调控基因沉默中起着重要的作用^[19]。已有研究证明LIN28A通过NF- κ Bp65信号通路参与炎症反应^[19],并且降低NF- κ Bp65的表达有助于缓解HF。在实验中,相较于正常组,模型组大鼠肝脏中LIN28A和NF- κ Bp65的蛋白表达水平和mRNA相对含量显著提高,且DCP低中高剂量各组大鼠肝组织中LIN28A和NF- κ Bp65的蛋白表达水平和mRNA相对含量显著降低且呈现出浓度依赖性。以上结果表明HF炎症产生的过程可能与LIN28A的激活有关,结合DCP可以抑制LIN28A和NF- κ Bp65的表达,并抑制NF- κ Bp65下游COX-2、iNOS、TNF- α 、IL-6和IL-1 β 等炎症因子的表达,推测DCP抗炎和治疗HF的机制可能与通过抑制LIN28A/NF- κ B信号通路有关。

综上所述,DCP对大鼠HF具有明显改善作用,其药效作用机制可能通过调控LIN28A/NF- κ B信号通路,阻止炎症反应实现。

参考文献

- Zhang Y, Li XM, Zhang FK, et al. Activation of canonical Wnt signaling pathway promotes proliferation and self-renewal of rat hepatic oval cell line WB-F344 *in vitro* [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14: 6673-6680.
- Dongiovanni P, Romeo S, Valenti L. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver: role of environmental and genetic factors [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20: 12945-12955.
- Friedman SL, Rockey DC, Bissell DM. Hepatic fibrosis 2006: report of the Third AASLD Single Topic Conference [J]. Hepatology, 2007, 45(1): 242-249.
- Jiang J, Zhong C, Yu Y, et al. Colchicine reduces hepatic fibrosis in mice infected with *Schistosoma japonicum* [J]. Chin Med J, 1996, 109: 795-800.
- Xu YR, Zhang KF, Zhong ML, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Dicliptera chinensis* (L.) Juss [J]. J China Pharm, 2015, 26:

- 4862-4865.
- 6 Zhang K, Xu Q, Gao Y, et al. Polysaccharides from *Dicliptera chinensis* ameliorate liver disturbance by regulating TLR-4/NF- κ B and AMPK/Nrf2 signalling pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24:6397-6409.
 - 7 Xu M, Bian S, Li J, et al. MeCP2 suppresses LIN28A expression via binding to its methylated-CpG islands in pancreatic cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7:14476-14485.
 - 8 Zhong Y, Cao L, Ma H, et al. Lin28A regulates stem-like properties of ovarian cancer cells by enriching RAN and HSBP1 mRNA and up-regulating its protein expression[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16:1941-1953.
 - 9 Nguyen LH, Robinton DA, Seligson MT, et al. Lin28b is sufficient to drive liver cancer and necessary for its maintenance in murine models[J]. *Cancer Cell*, 2014, 26:248-261.
 - 10 Ezhilarasan D, Sokal E, Najimi M. Hepatic fibrosis: It is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets [J]. *Hepatob Pancreat Dis*, 2018, 17:192-197.
 - 11 Chang ML, Yang SS. Metabolic signature of hepatic fibrosis: from individual pathways to systems biology[J]. *Cells*, 2019, 8(11):1423.
 - 12 Doustimotlagh AH, Dehpour AR, Nourbakhsh M, et al. Alteration in membrane protein, antioxidant status and hexokinase activity in erythrocytes of CCl₄-Induced cirrhotic rats [J]. *Acta Med Iran*, 2014, 52:795-803.
 - 13 Jin ML, Pan ZH, Shu J, et al. Study on different stages of hepatic fibrosis induced by different injection of carbon tetrachloride in rats [J]. *Sichuan Med J (四川医学)*, 2018, 39:270-272.
 - 14 Xiao M, Qu XH, Lv JP, et al. Effects of pirfenidone on hepatic fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride [J]. *Chinese J Physiol (中国应用生理学杂志)*, 2016, 32:378-382.
 - 15 Zhang KF, Gao Y, Zhong ML, et al. Hepatoprotective effects of *Dicliptera chinensis* polysaccharides on dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis rats and its underlying mechanism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179:38-44.
 - 16 Xi BT, Zhong ML, Cao HK, et al. Hepatoprotective effects and mechanism of *Cyclea hypoglauca* (Schauer) Diels total flavonoids on mice with acute liver injury induced by carbon tetrachloride [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2018, 30:1208-1213.
 - 17 Ma JQ, Sun YZ, Ming QL, et al. Ampelopsin attenuates carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis and hepatic stellate cell activation associated with the SIRT1/TGF- β 1/Smad3 and autophagy pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 77:105984.
 - 18 Roderfeld M, Weiskirchen R, Wagner S, et al. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice [J]. *FASEB J*, 2006, 20:444-454.
 - 19 Venugopal P, Koshy T, Lavu V, et al. Differential expression of microRNAs let-7a, miR-125b, miR-100, and miR-21 and interaction with NF- κ B pathway genes in periodontitis pathogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233:5877-5884.