

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.09.012

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190301.1343.026.html(2019-03-04)

藤茶总黄酮调控 TGF- β 1/Smad 信号通路抗肝纤维化机制的研究*张文涛¹,吴先昊²,梁冰洁¹,甘彩玉¹,郑作文¹ Δ

(1. 广西中医药大学药理教研室, 南宁 530200; 2. 江西省中医药研究院中药药理室, 南昌 330046)

[摘要] **目的** 探讨藤茶总黄酮(TF)通过调控转化生长因子 β 1(TGF- β 1)/Smad 信号通路抗小鼠肝纤维化的机制。**方法** 将 98 只昆明小鼠(雌雄兼用)分为对照组、模型组、秋水仙碱组(0.2 mg/kg), TF 高、中、低剂量组(300、150、75 mg/kg), 其中模型组 28 只(因实验过程中会有死亡), 其余各组每组 14 只。除对照组外, 给予各组小鼠背部皮下注射 25% 四氯化碳(CCl₄)花生油溶液, 每 3 天 1 次, 连续 10 周, 造成小鼠肝纤维化模型, 对照组背部皮下注射等量 100% 花生油溶液(每 3 天 1 次, 连续 10 周); 造模同时, 除对照组和模型组小鼠给予蒸馏水灌胃外, 其余各组小鼠给予相应药物灌胃给药, 每天 1 次, 连续 10 周。第 10 周末, 摘眼球取血, 处死小鼠取肝组织。生化分析法检测各组小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平。ELISA 法检测肝组织中 I 型胶原蛋白(Col I)、III 型胶原蛋白(Col III)及 TGF- β 1 的水平。制作肝组织切片 HE 染色, 免疫组织化学法检测肝组织 TGF- β 1/Smad 信号通路中主要蛋白的表达。**结果** 与模型组比较, TF 高、中、低剂量组肝纤维化小鼠血清 ALT、AST 水平和肝组织 Col I、Col III 水平明显降低($P < 0.05$); 给药各组小鼠肝组织炎症、坏死现象明显减轻, 胶原蛋白增生情况改善。**结论** TF 可通过调节 TGF- β 1/Smad 信号通路中主要蛋白的表达, 从而达到抗肝纤维化的作用。

[关键词] 转化生长因子 β 1; 肝硬化; 藤茶总黄酮**[中图分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)09-1493-07Mechanism of tengcha flavonoids on anti-hepatic fibrosis by regulating TGF- β 1/Smad signaling pathway*ZHANG Wentao¹, WU Xianhao², LIANG Bingjie¹, GAN Caiyu¹, ZHENG Zuowen¹ Δ

(1. Pharmacology Department, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530200, China;

2. Pharmacology Department of Chinese Medicine, Chinese Medicine Research Institute of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330046, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of tengcha flavonoids (TF) on anti-hepatic fibrosis by regulating TGF- β 1/Smad signaling pathway. **Methods** 98 Kunming mice (including male and female) were divided into the control group, the model group, the colchicine group (0.2 mg/kg), the TF high-, middle-, low-dose groups (300, 150, 75 mg/kg) with 14 mice in each group except 28 mice in the model group. Mice were given hypodermic 25% CCl₄ peanut oil once every 3 d for 10 weeks to establish hepatic fibrosis models except for the control group. At the same time, mice were given distilled water by intragastric administration in the control group and the model group, and corresponding drugs once a day for 10 weeks in other groups. At the end of week 10, the levels of ALT, AST in serum were detected by biochemical analysis. Collagen I (Col I), Collagen III (Col III) in liver were detected by ELISA method. The expression of the major proteins in TGF- β 1/Smad signaling pathway in liver tissues was determined by immunohistochemistry. **Results** Comparing with the model group, TF can obviously reduce the serum ALT, AST and Col I, Col III in liver tissue in mice with liver fibrosis ($P < 0.05$). The inflammation and necrosis of liver tissue significantly reduced, and collagen hyperplasia improved in the TF group. **Conclusion** TF plays an anti-fibrosis role by regulating the expression of the major proteins in TGF- β 1/Smad signaling pathway.

[Key words] transforming growth factor beta1; liver cirrhosis; tengcha flavonoids* 基金项目: 广西中药药效研究重点实验室资助项目(16-380-29); 广西科技创新平台建设示范专项(KJT16022)。 作者简介: 张文涛(1984-), 实验师, 硕士, 主要从事肝脏疾病研究。 Δ 通信作者, E-mail: zzw_nn@163.com。

藤茶总黄酮(tengcha flavonoids, TF)为葡萄科蛇葡萄属显齿蛇葡萄植物中提取的黄酮类成分。藤茶在民间常有应用,是重要的民族用药。主要用于治疗急性结膜炎、感冒发热、咽喉肿痛、肝炎等疾病^[1]。本课题组前期药理研究表明,TF 具有明显地抗肝纤维化的作用^[2],但其机制未明,本研究通过应用 TF 灌胃来干预小鼠肝纤维化模型,探讨 TF 抗肝纤维化的机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 昆明种小鼠 98 只,雌雄兼用,体质量(20±2)g,由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号:SYXK 桂 2014-002。

1.1.2 药物与试剂 TF 由广西中医药大学中药化学教研室提供;秋水仙碱购自北京索莱宝科技有限公司(批号:505A0316);金龙鱼花生油(批号:20151029),四氯化碳(CCl₄)购自广东西陇化工厂(批号:20150511);丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒(批号:20160725);天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(批号:20160723),均购自南京建成生物科技有限公司。I 型胶原蛋白(Col I)试剂盒(批号:201606),Ⅲ型胶原蛋白(ColⅢ)试剂盒(批号:201606),转化生长因子-β1(TGF-β1)试剂盒(批号:201608),均购自美国 R&D 公司。兔单克隆抗体 α-SMA Lot:GR212262-19,兔多克隆抗体 TGF-β1 Lot:GR121841-15,兔单克隆抗体 Smad2 Lot:GR269028-1,兔单克隆抗体 Smad3 Lot:GR169548-20,兔单克隆抗体 Smad4 Lot:GR261313-2,兔单克隆抗体 Smad7 Lot:GR241822-21,均购自美国 abcan 公司。MaxVison™ 试剂盒(批号:160912409C)购自福州迈新生物技术开发有限公司,DAB 显色试剂盒(批号:K165920D)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 实验仪器 EPOCH 型酶标仪购自美国 BIO-TEK 公司,ST16 型离心机购自美国 Thermo Fisher 公司,BP211D 型电子天平购自德国赛多利斯公司,明澈-D24UV 型超纯水仪购自法国默克密理博公司,Donatello 型自动组织处理机购自意大利 Diapath. S. p. A 公司,Shandon Histocentre 3 型组织包埋机购自美国 Thermo Fisher 公司,RM2235 型组织切片机构购自德国 Leica 公司,YT-7FB 型生物组织摊烤片机购自亚光医用电子技术有限公司,DM2500 型显微镜购自德国 Leica 公司,KK24T18TI 型冰箱购自德国 SIEMENS 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 取昆明种小鼠 98 只,根据性别采用“均衡随机”方法分为 6 组,分别为对照组、模型组、

秋水仙碱组(0.2 mg/kg),TF 高剂量组(300 mg/kg)、TF 中剂量组(150 mg/kg)、TF 低剂量组(75 mg/kg),其中模型组 28 只小鼠(因前期研究发现模型组小鼠实验过程中会出现死亡的现象),其余每组 14 只。除对照组外,其余各组小鼠背部皮下注射 25% CCl₄ 花生油溶液,2 mL/kg,每 3 天 1 次,连续 10 周^[3];对照组背部皮下注射等量 100%花生油溶液(每 3 天 1 次,连续 10 周)。造模同时对照组和模型组小鼠给予蒸馏水灌胃,其余各组给予相应药物灌胃给药,给药体积为 20 mL/kg,每天 1 次,连续 10 周。末次给药 1 h 后摘眼球取血,室温静置 1 h 后,2 500 r/min 离心 10 min 取上清液,分装于-80 °C 冰箱保存备用。实验结束后,各组小鼠处死,迅速取肝组织,生理盐水洗涤,取部分肝组织剪碎,匀浆,然后转入 EP 管中,静置,离心,取上清液进行分装,-80 °C 冰箱保存备用,另取肝脏左叶浸入 4%甲醛溶液中备用。

1.2.2 血清生化指标检测 血清生化指标 ALT 和 AST 水平检测严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 Col I、ColⅢ 水平检测 ELISA 法检测肝组织中 Col I,ColⅢ 水平,取分装好的肝组织匀浆,严格按照试剂盒说明书测定肝组织中 Col I,ColⅢ 水平。

1.2.4 免疫组织化学法(IHC)检测 IHC 检测肝组织中 TGF-β1、Smad2、Smad4、Smad7 及 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)蛋白的表达情况,石蜡切片常规脱蜡后,3% H₂O₂ 灭活内源性酶,室温孵育 20 min,微波进行抗原修复,10 min 后 5%牛血清封闭,加兔抗鼠一抗,4 °C 孵育过夜。TGF-β1 1:250 稀释液,Smad2 1:100 稀释液,Smad4 1:100 稀释液,Smad7 1:100 稀释液。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照,二氨基联苯胺(DAB)显色,切片经梯度乙醇脱水干燥(二甲苯透明),中性树胶封固。IHC 切片用 Leica DM2500 显微镜观察,组织中出现黄褐色为阳性,每张免疫组化切片随机选取 5 个视野拍照,用 ImageJ2x 进行扫描,以平均光密度和阳性染色面积百分比作为蛋白的相对表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析,各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先进行数据的正态性检验及方差齐性检验,符合上述条件的行单因素方差分析,组间比较采用 Dunnett-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物情况 对照组小鼠皮毛光滑油亮,浓密而有光泽,形态较为丰满,活动迅速灵敏,眼睛灵动明亮,食欲良好;模型组小鼠毛发稀疏,毛色暗黄且无光泽,体型消瘦,活动稍显迟缓,眼睛浑浊,食欲较差。TF 低剂量组小鼠被毛稍显暗淡,体型稍偏瘦,行动较

对照组小鼠稍迟钝,食欲正常,其肝脏为暗淡的红褐色,被膜欠细腻,质地稍硬,偶见边缘圆钝。TF 高、中剂量组小鼠肉眼观察毛发较为浓密,毛色光泽,体型较为丰满,食欲较好,其肝脏为红褐色,被膜较光滑细腻,质地柔软,边缘光整。第 9 周末随机取模型组、对照组小鼠各 2 只,解剖观察,制作 HE 染色,观察发现对照组小鼠肝细胞细胞质饱满,肝细胞沿肝索整齐排列。模型组的两只小鼠肝脏呈灰红色,被膜表面粗

糙,质地稍硬,边缘圆钝,肝组织中纤维化明显,有假小叶的形成。病理结果表明肝纤维化模型建立成功。第 10 周末取指标,实验过程中模型组出现 3 只小鼠死亡,其中雌性 1 只,雄性 2 只。尸检及肝脏 HE 染色检查,死因均为急性肝衰竭,死亡动物不计入统计学处理。对照组最少动物数为 12 只,其他各组根据性别采取“均衡随机”方法随机测量 12 只小鼠肝纤维化相关指标,以便后期更好分析。

表 1 各组小鼠血清 ALT,AST 活性及肝组织中 Col I,ColⅢ 水平比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

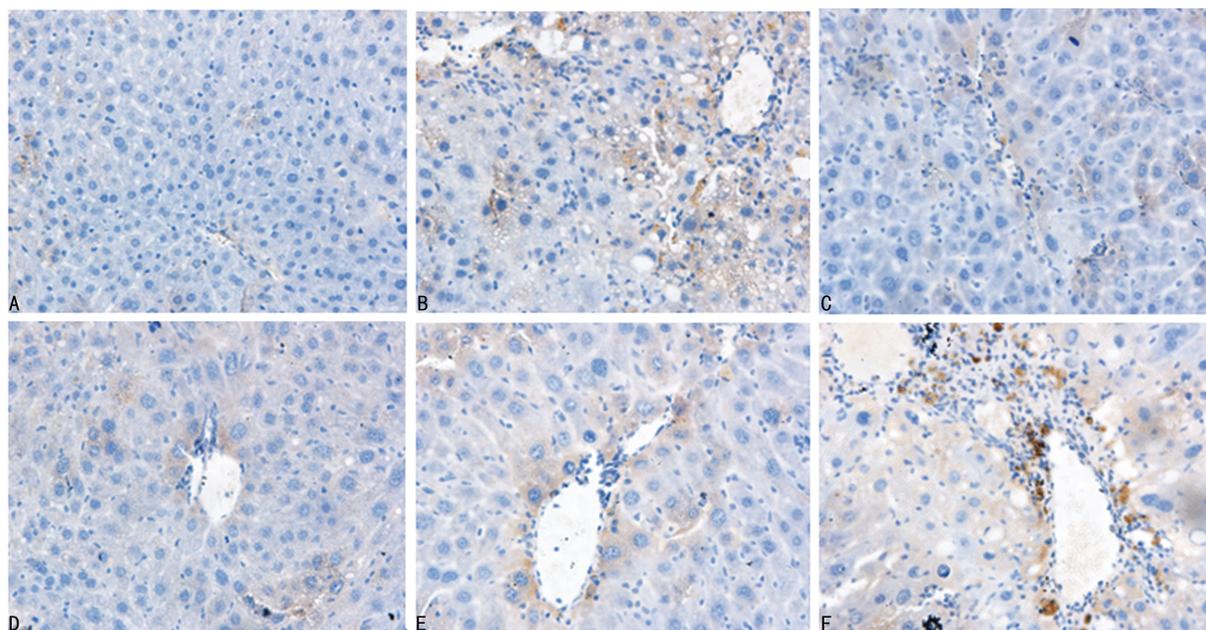
组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	Col I ($\mu\text{g/L}$)	Col Ⅲ ($\mu\text{g/L}$)
对照组	51.31±11.50	39.62±20.81	11.10±0.54	5.06±0.29
模型组	601.07±151.82 ^a	111.03±44.21 ^a	14.98±0.59 ^a	5.90±0.56 ^a
秋水仙碱组	85.13±21.40 ^{ab}	73.02±16.81 ^{ab}	13.51±0.52 ^{ab}	5.20±0.36 ^b
TF 高剂量组	220.91±67.90 ^{abc}	67.15±21.50 ^{ab}	14.20±0.60 ^{ab}	5.02±0.32 ^b
TF 中剂量组	355.06±105.71 ^{abc}	77.45±28.60 ^{ab}	14.11±0.91 ^{ab}	4.96±0.30 ^b
TF 低剂量组	370.85±107.80 ^{ac}	104.72±20.01 ^{ac}	14.18±0.74 ^{ab}	4.94±0.36 ^b

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较;^c: $P<0.05$,与秋水仙碱组比较

表 2 各组小鼠肝脏组织中 TGF- β 1,Smad2,Smad4,Smad7, α -SMA 蛋白平均光密度比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	TGF- β 1	Smad2	Smad4	Smad7	α -SMA
对照组	0.09±0.01	0.10±0.01	0.13±0.02	0.16±0.03	0.14±0.01
模型组	0.12±0.01 ^a	0.12±0.02 ^a	0.17±0.01 ^a	0.11±0.02 ^a	0.16±0.01 ^a
秋水仙碱组	0.10±0.01 ^b	0.11±0.01	0.15±0.02	0.13±0.02 ^a	0.14±0.01 ^b
TF 高剂量组	0.10±0.01 ^b	0.10±0.01 ^b	0.14±0.01 ^{ab}	0.16±0.01 ^{bc}	0.13±0.01 ^b
TF 中剂量组	0.09±0.01 ^b	0.10±0.01 ^b	0.12±0.01 ^{abc}	0.13±0.01 ^a	0.13±0.02 ^b
TF 低剂量组	0.11±0.02	0.11±0.01	0.15±0.01 ^{ab}	0.14±0.01	0.14±0.01 ^b

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较;^c: $P<0.05$,与秋水仙碱组比较



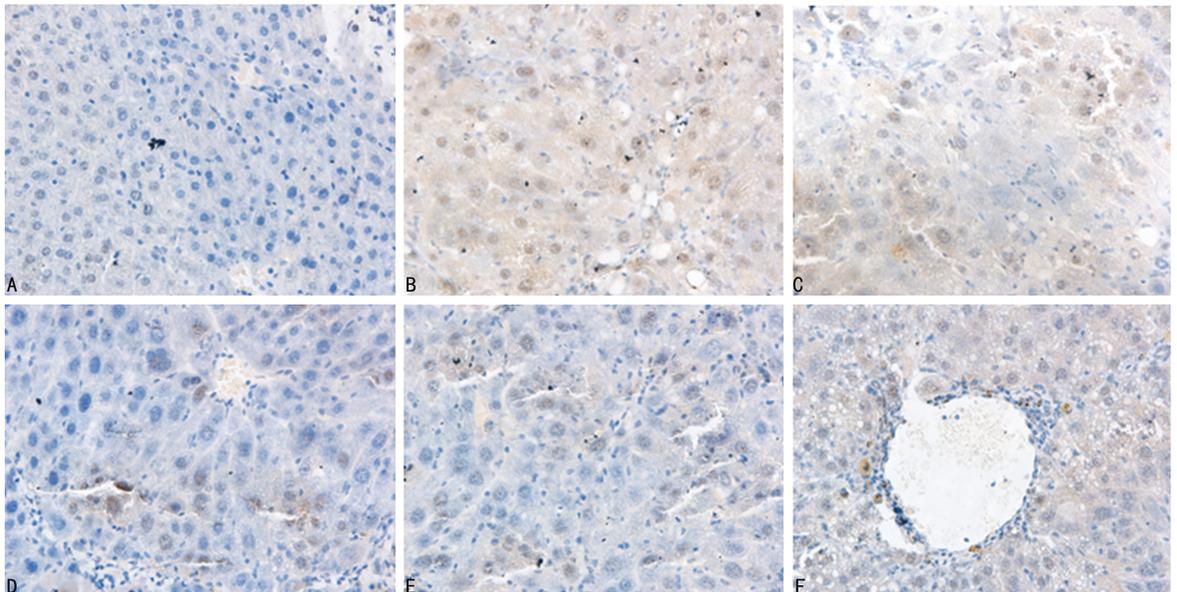
A:对照组;B:模型组;C:秋水仙碱组;D:TF 高剂量组;E:TF 中剂量组;F:TF 低剂量组

图 1 显微镜下各组小鼠 TGF- β 1 蛋白在肝细胞中的表达(IHC, $\times 400$)

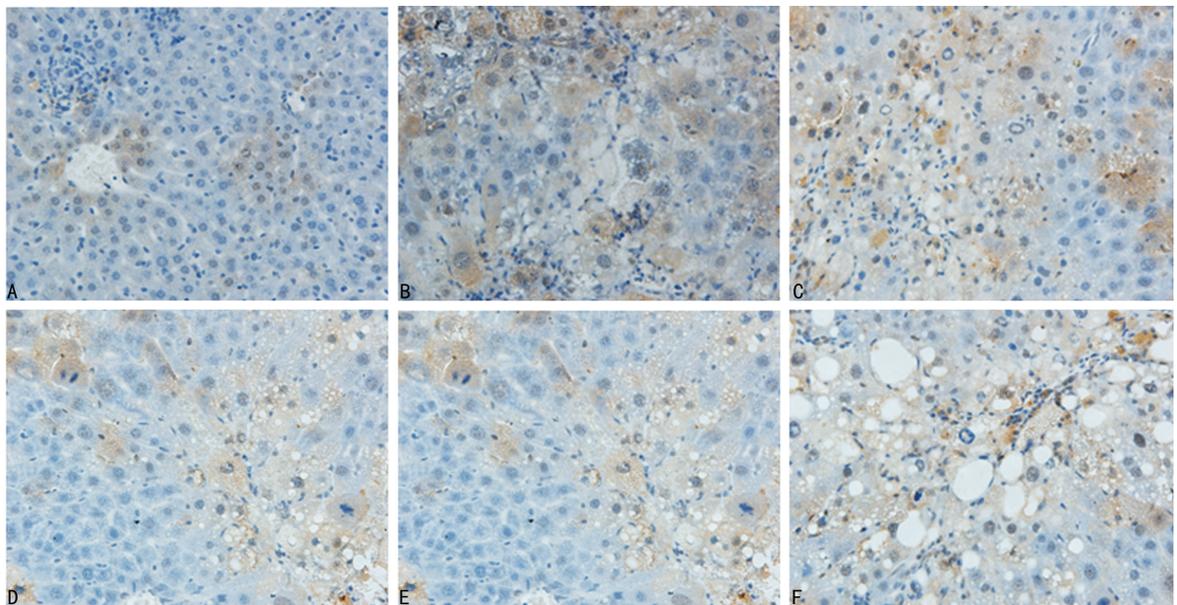
表 3 各组小鼠肝脏组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad4、Smad7、 α -SMA 平均阳性染色面积百分比比较($\bar{x}\pm s, \%, n=12$)

组别	TGF- β 1	Smad2	Smad4	Smad7	α -SMA
对照组	1.29 \pm 0.29	2.80 \pm 1.67	0.92 \pm 0.23	1.24 \pm 0.51	0.39 \pm 0.09
模型组	7.49 \pm 1.37 ^a	9.73 \pm 2.80 ^a	4.70 \pm 0.92 ^a	0.65 \pm 0.32	3.34 \pm 1.44 ^a
秋水仙碱组	1.14 \pm 0.61 ^b	4.92 \pm 1.16 ^b	0.98 \pm 0.16 ^b	5.87 \pm 2.23 ^{ab}	1.14 \pm 0.60 ^{ab}
TF 高剂量组	0.81 \pm 0.41 ^b	4.64 \pm 1.26 ^b	0.65 \pm 0.32 ^b	2.03 \pm 0.93 ^{bc}	0.36 \pm 0.09 ^{bc}
TF 中剂量组	2.07 \pm 0.93 ^b	4.82 \pm 1.86 ^b	2.42 \pm 0.95 ^{abc}	6.37 \pm 2.51 ^{ab}	1.25 \pm 0.82 ^{ab}
TF 低剂量组	8.47 \pm 0.42 ^{ac}	7.86 \pm 2.81 ^a	5.28 \pm 0.97 ^{ac}	2.37 \pm 0.55 ^{abc}	0.95 \pm 0.39 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与模型组比较; ^c: $P < 0.05$, 与秋水仙碱组比较



A: 对照组; B: 模型组; C: 秋水仙碱组; D: TF 高剂量组; E: TF 中剂量组; F: TF 低剂量组

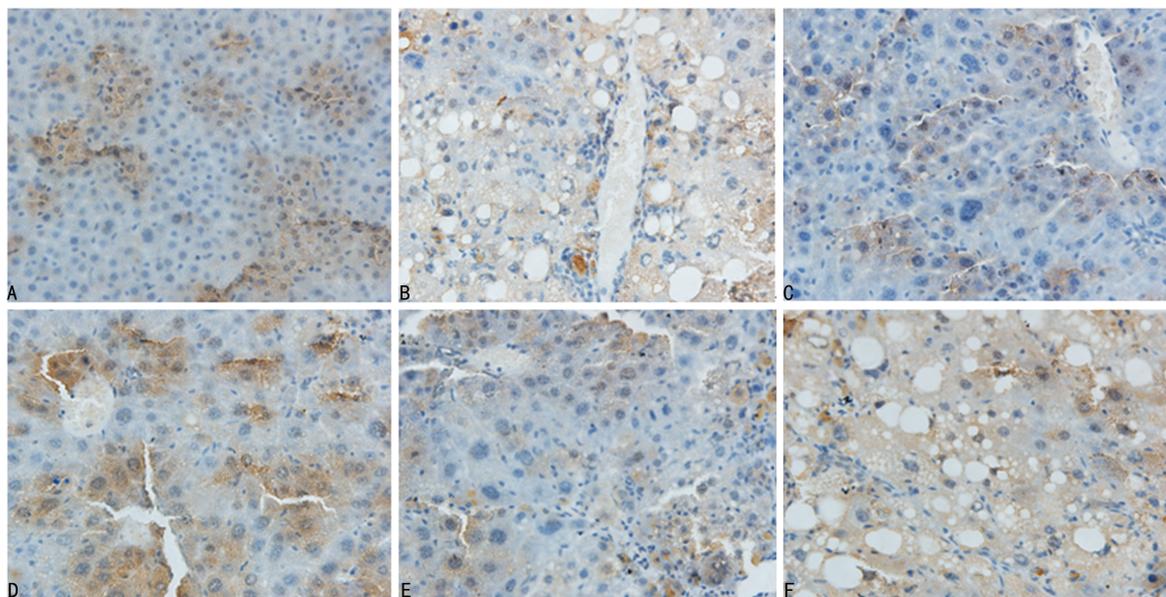
图 2 显微镜下各组小鼠 Smad2 蛋白在肝细胞中的表达(IHC, $\times 400$)

A: 对照组; B: 模型组; C: 秋水仙碱组; D: TF 高剂量组; E: TF 中剂量组; F: TF 低剂量组

图 3 显微镜下各组小鼠 Smad4 蛋白在肝细胞中的表达(IHC, $\times 400$)

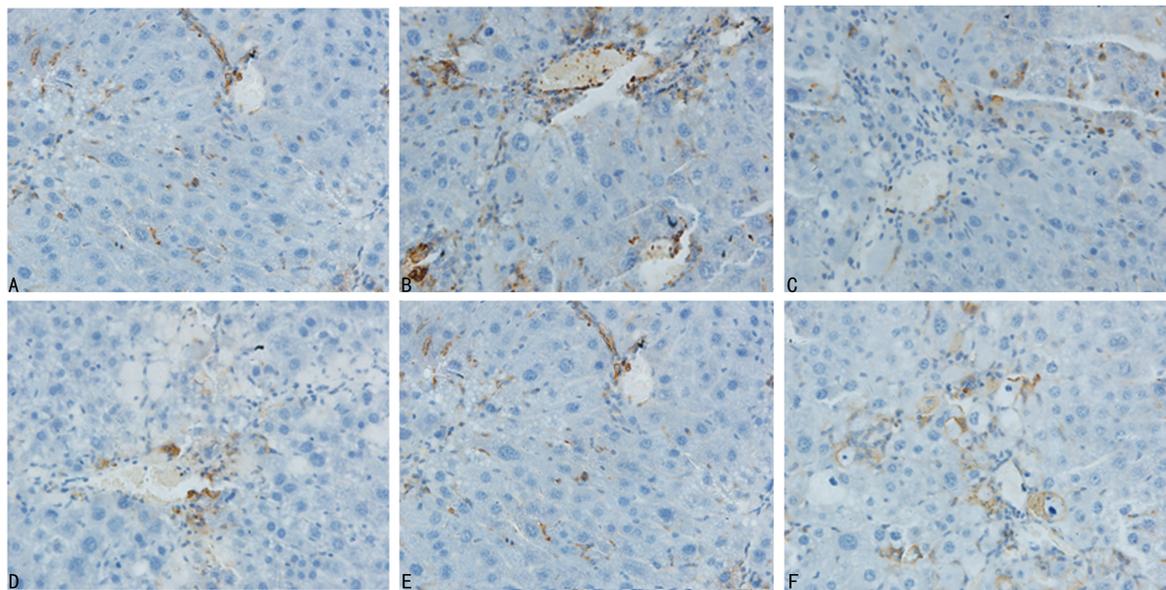
2.2 各组小鼠肝功能指标及肝组织中 Col I、Col III 水平比较 模型组、秋水仙碱组、TF 高、中、低剂量组小鼠血清 ALT、AST 均高于对照组 ($P < 0.05$), 秋水

仙碱组、TF 高、中剂量组低于模型组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 TF 改善肝功能效果并不优于秋水仙碱。与模型组比较, TF 高、中剂量组及低剂量



A: 对照组; B: 模型组; C: 秋水仙碱组; D: TF 高剂量组; E: TF 中剂量组; F: TF 低剂量组

图 4 显微镜下各组小鼠 Smad7 蛋白在肝细胞中的表达 (IHC, ×400)



A: 对照组; B: 模型组; C: 秋水仙碱组; D: TF 高剂量组; E: TF 中剂量组; F: TF 低剂量组

图 5 显微镜下各组小鼠 α -SMA 蛋白在肝细胞中的表达 (IHC, ×400)

组 Col I , Col III 水平明显降低 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 各组小鼠肝组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad4、Smad7、 α -SMA 蛋白表达水平比较 TGF- β 1 蛋白 IHC 结果显示, 对照组小鼠 TGF- β 1 在肝脏组织中表达较少, 模型组中可见广泛表达于肝细胞细胞质及汇管区增生的纤维细胞细胞质中; 秋水仙碱组在肝细胞细胞质中仍有较明显表达, 但与模型组相比有明显地减少; TF 高、中、低剂量组 TGF- β 1 在肝细胞细胞质中的表达与模型组相比均有所减少, 其中 TF 中剂量组的减少更为明显 ($P < 0.05$), 见图 1。Smad2 蛋白 IHC 结果显示, 对照组小鼠 Smad2 仅少量表达于细胞核中; 模型组可见广泛表达于细胞核中; 秋水仙碱

组 Smad2 在肝细胞核中表达与模型组相比有所减少; TF 高、中、低剂量组 Smad2 在细胞核膜中的表达与模型组相比均有所减少, 其中 TF 高、中剂量组中减少更为明显, 见图 2。Smad4 蛋白 IHC 结果显示, 对照组较少地表达于细胞核核膜; 模型组中可见 Smad4 广泛地表达于大部分细胞核核膜中; 秋水仙碱组在肝细胞核中的表达与模型组相比有所减少, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); TF 高、中剂量组在肝细胞细胞核及核膜中的表达与模型组相比均有所减少, 其中 TF 高剂量组减少更为明显 ($P < 0.05$), 见图 3。Smad7 蛋白 IHC 结果显示, 对照组小鼠较多地表达于细胞质和细胞核核膜; 模型组较少地表达于细胞核核膜中,

细胞质中表达的更少;TF 高剂量组与模型组平均光密度比较差异有统计学意义($P < 0.05$);秋水仙碱组及 TF 中、低剂量组在肝细胞细胞质和细胞核核膜中表达与模型组相比均有所增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$);蛋白阳性表达面积结果显示,TF 高、中、低剂量组与模型组相比表达量均明显增加,其中 TF 高剂量组增加的更为明显,见图 4。 α -SMA 蛋白 IHC 结果显示,对照组仅少量地表达于血管壁;模型组中 α -SMA 大量表达于肝门静脉及假小叶的纤维间隔区域;秋水仙碱组少量地表达于门静脉及汇管区;TF 高、中、低剂量组与模型组相比蛋白平均光密度均明显降低($P < 0.05$);蛋白阳性表达面积结果显示,TF 高、中、低剂量组与模型组相比均明显性降低,其中 TF 高剂量组减少更为明显($P < 0.05$),见图 5。各组小鼠肝组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad4、Smad7 及 α -SMA 蛋白表达水平比较,见表 2、3。

3 讨论

本课题组前期对 TF 的药理药效进行了广泛的研究,发现其具有抗炎、保肝降酶、抗病毒、抗肿瘤等作用^[2-3],TF 保肝降酶、抗肝纤维化的研究集中在药理药效,其作用机制仍不清楚^[4-7]。本研究采用 CCl₄ 复制小鼠肝纤维化模型,具有成模率高,病变典型等特点。其机制为 CCl₄ 经肝微粒体的细胞色素 P450 代谢生成的三氯甲基自由基攻击细胞膜上磷脂分子引起脂质过氧化,三氯甲基自由基继而与细胞膜脂质和蛋白大分子进行共价结合,引起膜结构和功能完整性的破坏^[8]。ALT、AST 存在于机体的脏器和组织中,ALT 水平从高到低分布的次序大致为肝、肾、心、肌肉;AST 水平从高到低分布的次序大致为心、肝、肌肉、肾。在肝脏 ALT 主要分布在细胞质内,AST 则分布于细胞质和线粒体中。肝组织中的细胞外基质(ECM)主要含有 Col I、Col III,两种胶原蛋白的占比变化反映着肝纤维化的病情发展情况。肝脏在损伤过程的同时,激活了一系列的应激反应,肝纤维化相关的细胞因子的合成和释放增加,其中 TGF- β 1 是与肝纤维化的形成最为密切的细胞因子之一^[9-10]。肝星状细胞(HSC)的激活是肝纤维化的核心环节,活化的 HSC 增大、增殖,维生素 A 水平降低,表型发生改变并大量表达 α -SMA 作为骨架蛋白。活化的 HSC 由过渡型最终转化为成纤维类的肌成纤维细胞,使得胶原蛋白的合成增加降解减少^[11]。TGF- β 1 能够激活 HSC,促进肝脏胶原蛋白的合成,抑制 ECM 的降解,导致肝脏纤维化形成。

TGF- β 1 是 TGF- β 超家族中的一员,哺乳动物 TGF- β 分为 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 3 种,其中 TGF- β 1 在肝脏中水平最高且具有生物活性,肝脏损

伤时 HSC 是 TGF- β 的主要来源。TGF- β 受体(TBR)同样存在 I、II、III 3 种类型,其中 I 型和 II 型为丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶,其和 TGF- β 1 的亲合力比 TGF- β 2 的亲合力强。T β R II 在细胞质内具有 Ser/Thr 激酶区,其细胞外端首先与配体结合,细胞内段的 Ser/Thr 激酶被活化,被配基耦合的 T β R II 使 I 型受体近膜区 GS 结构域磷酸化,进而将生物信号向细胞内转导^[12-13]。T β R III 无激酶活性,主要作用是调节 T β R II 的膜上表达及配体与受体的亲合力,不直接参与 TGF- β 1/Smad 细胞信号通路传递。TGF- β 1 是 TGF- β 1/Smad 信号转导通路中的启动因子,TGF- β 1 连续激活 T β R II、T β R I, T β R I 使质-核信号分子 Smad2/3 磷酸化,磷酸化的 Smad2/3 与 Smad4 结合,以 R-Smad-Smad4 三聚体的形式进入核内,最终与染色质形成核复合物,调控基因表达。Smad 最初在果蝇中发现,统称为 Smads 蛋白家族。脊椎动物中 Smad 成员,分为 3 类,(1)受体激活的 Smad(R-Smad),包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8 亚型。(2)通用型 Smad(Co-Smad),目前只有 Smad4。(3)抑制型 Smad(I-Smad),包括 Smad6、Smad7,其能与受体结合但 C 端功能区缺乏磷酸化位点,并且缺少 MH1 功能区无法与染色质有效结合,是信号转导中的抑制因子,竞争性抑制 R-Smad 与 T β R 结合^[14]。T β R I-SA RA-Smad 复合体形成后,T β R I 激酶将 Smad 蛋白 C 端 MH2 上 SSXS 基序中色氨酸磷酸化,从而使 Smad2/3 活化,Smad2/3 继而与 T β R 及 SARA 解离,同时与 Smad4 形成杂聚体,进入细胞核,调节转录。TGF- β 1/Smad 通路通过与 C-Jun/C-Fos 及 P300/CBP 等基因转录调节因子的协同作用激活胶原酶 I 等胶原相关基因的转录^[15-16]。STRAP 蛋白可与 T β R I、II 连接,又与 Smad7 特异性聚合并将其运送至活化的 T β R I,使 T β R I-Smad7 复合体形成及稳定,从而阻止 Smad2、3 与受体结合。

本研究结果显示,与模型组比较,TF 通过抑制肝纤维化小鼠肝组织中 TGF- β 1 的过表达,从而抑制 HSC 的激活,进而阻断肝纤维化的发展,使肝组织炎症、胶原纤维增生情况明显减轻。IHC 结果显示,其中 TF 高、中、低剂量均能不同程度下调肝组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad4 蛋白的表达,并能上调 Smad7 蛋白的表达。TF 下调肝组织中 α -SMA 蛋白的表达,抑制 Col I,Col III 的合成,促进 ECM 的降解。

综上所述,TF 可能是通过调控 TGF- β 1/Smad 信号通路中相关蛋白的表达,从而发挥抗肝纤维化的作用。

参考文献

[1] 冯涵,李娜,王华林,等.藤茶中黄酮类成分的功效研究进

- 展[J]. 公共卫生与预防医学, 2018, 29(1): 82-86.
- [2] 李刚, 郑作文, 唐云丽. 藤茶总黄酮体外抗人肝癌细胞作用研究[J]. 中国药房, 2008, 19(9): 652-654.
- [3] 欧贤红, 吕林艳, 郑作文. 藤茶提取物抗慢性肝纤维化作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 132-134.
- [4] 邝满元. 藤茶总黄酮对大鼠肝纤维化的防治作用[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(12): 2445-2447.
- [5] 邝满元, 罗明英, 贾蕾. 藤茶总黄酮对实验性肝纤维化大鼠 TGF- β_1 表达的影响[J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(6): 6-8.
- [6] BAGHERNIYA M, NOBILI V, BLESSO C N, et al. Medicinal plants and bioactive natural compounds in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a clinical review[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 130(6): 213-240.
- [7] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF/SMAD pathways and its regulation in hepatic fibrosis[J]. *J Histochem Cytochem*, 2016, 64(3): 157-167.
- [8] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1135.
- [9] 李洁, 邱建利, 许华. 加味茵陈四逆汤对肝纤维化小鼠 Smad7 及 I、III 型胶原蛋白表达的影响[J]. 中药材, 2016, 39(6): 1384-1388.
- [10] 杨小瑜. 肝纤维化的发病机制研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(11): 108-110.
- [11] GRESSNER A M, WEISKIRCHEN R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1): 76-99.
- [12] 李欣, 戴立里. 转化生长因子 β_1 /Smads 信号转导途径及其与肝纤维化的关系[J]. 重庆医学, 2007, 36(18): 1887-1889.
- [13] 张玉, 周曦, 易龙, 等. 二氢杨梅素通过 TGF- β_1 /Smad 信号通路抑制肝星状细胞活化的作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(4): 282-289.
- [14] LIN Y, LUO H, WANG X, et al. Flavanones from sedum sarmentosum bunge alleviate CCl₄-induced liver fibrosis in rats by targeting TGF- β_1 /T β R/Smad pathway in turn Inhibiting epithelial mesenchymal transition [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018(8): 1-10.
- [15] ARGENTOU N, GERMANIDIS G, HYTIROGLOU P, et al. TGF- β signaling is activated in patients with chronic HBV infection and repressed by SMAD7 overexpression after successful antiviral treatment [J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(5): 355-365.
- [16] 左魁阳, 陈梦茜, 孟娜娜, 等. TGF- β 与器官纤维化的研究进展[J]. 中国当代医药, 2017, 24(17): 12-16.

(收稿日期: 2018-09-18 修回日期: 2019-01-02)

(上接第 1492 页)

- Pristionchuspacificus 线虫神经损伤的治疗实验[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2758-2759.
- [6] 宋昕恬, 王琳, 张晶莹, 等. 人参三醇皂苷对大鼠坐骨神经急性损伤保护作用的研究[J]. 毒理学杂志, 2017, 31(2): 122-124.
- [7] RATEB E E, AMIN S N, ELTABLAWY N, et al. Effect of melatonin supplemented at the light or dark period on recovery of sciatic nerve injury in rats[J]. *EXCLI J*, 2017, 16(3): 138-150.
- [8] JIANG X, MA J, WEI Q, et al. Effect of frankincense extract on nerve recovery in the rat sciatic nerve damage model[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016(10): 1-8.
- [9] 高晓凤, 赵军, 伊红丽, 等. 大鼠坐骨神经损伤修复术后相应脊髓节段 Bcl-2、Bax 蛋白表达及神经细胞凋亡[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(3): 293-296.
- [10] YANG C C, WANG J, CHEN S C, et al. Synergistic effects of low-level laser and mesenchymal stem cells on functional recovery in rats with crushed sciatic nerves[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2016, 10(2): 120-131.
- [11] 叶伊琳, 唐洁, 李莉. 电针对坐骨神经损伤大鼠 BDNF、NGF 和 GAP-43 表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(4): 51-55.
- [12] ITOKAZU T, HAYANO Y, TAKAHASHI R, et al. Involvement of Wnt/ β -catenin signaling in the development of neuropathic pain[J]. *Neurosci Res*, 2014, 9(1): 34-40.
- [13] SACERDOTE P, FRANCHI S, MORETTI S, et al. Cytokine modulation is necessary for efficacious treatment of experimental neuropathic pain[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013, 8(1): 202-211.
- [14] ZHU K J, YANG J S. Anti-allodynia effect of safranal on neuropathic pain induced by spinal nerve transection in rat[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(12): 4990-4996.
- [15] GONG X, CHEN Y, BAO F, et al. Infant nerve injury induces delayed microglial polarization to the M1 phenotype, and exercise reduces delayed neuropathic pain by modulating microglial activity[J]. *Neuroscience*, 2017, 4(349): 76-86.

(收稿日期: 2018-07-22 修回日期: 2019-01-02)