

引用:熊小花,柳玉佳,杨柳,王莘智. 加味大黄廑虫丸对原发性胆汁性胆管炎肝星状细胞损伤状态下 TGF- β 1、Smads 的影响[J]. 湖南中医杂志,2023,39(8):187-191.

加味大黄廑虫丸对原发性胆汁性胆管炎肝星状细胞损伤状态下 TGF- β 1、Smads 的影响

熊小花,柳玉佳,杨柳,王莘智

(湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙,410007)

[摘要] 目的:观察加味大黄廑虫丸对原发性胆汁性胆管炎(PBC)肝星状细胞损伤状态下转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、Smads 的影响。方法:将 20 只大鼠随机分为干预组与对照组,每组各 10 只。干预组灌胃加味大黄廑虫丸混悬液 1.5 ml/100 g,对照组灌胃等量 0.9%氯化钠注射液,每天 1 次,持续 1 周。将肝星状细胞 T6(HSC-T6)细胞分为 6 组,分别为空白组、对照组、5%空白血清组、10%空白血清组、5%含药血清组、10%含药血清组,培养 24 h。建立乳酸损伤模型,造模成功后分为 5 组:空白组、对照组、正常组、模型组、中药组。测定细胞活性,细胞中 TGF- β 1、Smad3、Smad7 mRNA 表达,TGF- β 1、磷酸化 Smad3、磷酸化 Smad7 mRNA 蛋白表达。结果:各组 HSC-T6 细胞活性对照组、5%空白血清组、10%空白血清组、5%含药血清组、10%含药血清组与空白组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。TGF- β 1、Smad3、Smad7 mRNA 表达及 TGF- β 1、p-Smad3、p-Smad7 mRNA 蛋白表达水平,模型组与空白组比较,中药组与模型组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:加味大黄廑虫丸治疗 PBC 的作用机制与降低 TGF- β 1、Smad3 水平,提高 Smad7 水平相关。

[关键词] 原发性胆汁性胆管炎;肝星状细胞;损伤状态;加味大黄廑虫丸;TGF- β 1、Smads

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2023.08.042

Effect of Jiawei Dahuang Zhechong pills on transforming growth factor- β 1 and Smads under the status of hepatic stellate cell injury in primary biliary cholangitis

XIONG Xiaohua, LIU Yujia, YANG Liu, WANG Shenzhi

(The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Jiawei Dahuang Zhechong pills on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and Smads under the status of hepatic stellate cell injury in primary biliary cholangitis (PBC). Methods: A total of 20 rats were randomly divided into intervention group and control group, with 10 rats in each group. The rats in the intervention group were given the suspension of Jiawei Dahuang Zhechong pills by gavage, and those in the control group were given an equal volume of 0.9% sodium chloride injection by gavage, once a day for one week. Hepatic stellate cell-T6 (HSC-T6) cells were divided into blank group, control group, 5% blank serum group, 10% blank serum group, 5% drug-containing serum group, and 10% drug-containing serum group, and the cells were cultured for 24 hours. A model of lactic acid-induced injury was established, and after successful modeling, the experiment was divided into blank group, control group, normal group, model group, and traditional Chinese medicine (TCM) group. Cell viability was measured, as well as the mRNA expression lev-

基金项目:湖南省自然科学基金项目(2020JJ4479)

第一作者:熊小花,女,2020 级硕士研究生,研究方向:中西医结合治疗风湿性疾病

通信作者:王莘智,男,医学博士,主任医师,研究方向:中医药防治风湿性疾病,E-mail:361979636@qq.com

els of TGF- β 1, Smad3, and Smad7 and the mRNA and protein expression levels of TGF- β 1, phosphorylated Smad3 (p-Smad3), and phosphorylated Smad7 (p-Smad7) in cells. Results: There was a significant difference in the viability of HSC-T6 cells between the blank group and the other five groups (control group, 5% blank serum group, 10% blank serum group, 5% drug-containing serum group, and 10% drug-containing serum group) ($P < 0.01$). There were significant differences in the mRNA expression levels of TGF- β 1, Smad3, and Smad7 and the mRNA and protein expression levels of TGF- β 1, p-Smad3, and p-Smad7 between the model group and the blank group and between the TCM group and the model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Conclusion: Jiawei Dahuang Zhechong pills exert a therapeutic effect on PBC by reducing the levels of TGF- β 1 and Smad3 and increasing the level of Smad7.

[**Keywords**] primary biliary cholangitis; hepatic stellate cell; status of injury; Jiawei Dahuang Zhechong pills; transforming growth factor- β 1; Smads

原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)是一种慢性进展的自身免疫性肝病^[1]。其基本病理改变是肝星状细胞(HSC)激活转变为具有增殖性、成纤维性的肌成纤维细胞,产生大量细胞外基质如I、III型胶原纤维,从而引起肝纤维化^[2]。PBC起病隐匿,诊治困难,预后不佳。本病的治疗药物选择少,能减轻症状、延缓病程,但价格昂贵、不良反应多^[3]。中医药立足于中医传统整体观念,通过辨证论治对PBC进行多环节、多途径、多靶点的治疗,疗效稳定持久,可有效延缓疾病进展,且不良反应少,联合熊去氧胆酸治疗PBC具有更好的临床疗效和安全性^[4-5]。

大黄廬虫丸来自张仲景《金匱要略》,是治疗虚劳干血的经典名方。本课题组前期临床研究表明,大黄廬虫丸加黄芪、白术组成的加味大黄廬虫丸不仅可以制约大黄、虫类药的峻猛之性,并且契合PBC患者慢性起病、日久不愈之特点及体内“虚瘀互结”之病机,临床疗效佳^[6]。

转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/Smads信号通路是肝纤维化进程中的重要通路,TGF- β 1是目前已知的最强促纤维化因子之一^[7]。Smads是TGF- β 1受体复合物下游一类非常重要的信号传导分子,在肝纤维化进程中,Smad3明显被激活是信号传导通路中负责纤维化的关键因素^[8],而Smad7则发挥着保护作用。因此,本实验通过建立肝星状细胞损伤模型,观察加味大黄廬虫丸含药血清对TNF- β 1、磷酸化Smad3(pSmad3)、磷酸化(pSmad7)表达量的影响,探讨加味大黄廬虫丸治疗PBC的相关机制,为临床研究提供实验支持。

1 实验材料

1.1 动物与细胞 健康SPF级SD雄性大鼠20只,鼠龄8~12周,平均体质量(200 ± 10)g,合格证编号:2020-0010。动物由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,饲养于湖南中医药大学动物实验中心SPF级实验室,温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 20)%。肝星状细胞T6(HSC-T6)细胞株购于湖南维世尔生物有限公司,取3~8代对数生长期细胞进行实验。

1.2 药物 加味大黄廬虫丸:购于北京同仁堂(集团)有限责任公司,规格:3g/丸,批号:Z11020002,药物成分主要有熟大黄、廬虫、虻虫、水蛭、蛭螯、干漆、桃仁、苦杏仁、黄芩、干地黄、白芍、甘草等。中药超微配方颗粒黄芪(批号:211053)、白术(批号:211061)均购自湖南春光九汇现代中药有限公司。药物剂量按照大黄廬虫丸成药:黄芪:白术为3.5:3:2进行配置,浓度为1.5ml/100g。

1.3 主要试剂与仪器 DNA凝胶加样缓冲液(中国Abiowell,批号:AWR0103);mRNA逆转录试剂盒(中国北京康为世纪,批号:CW2569);miRNA逆转录试剂盒(中国北京康为世纪,CW2141);Trizol(美国Thermo,批号:15596026);UltraSYBR Mixture(中国北京康为世纪,CW2601);DM2000 Plus DNA Marker(中国北京康为世纪,CW0632);核酸染料(中国北京普利莱,批号:PB11141);Tris-乙酸电泳缓冲液(中国Abiowell,批号:AWR0124);DEPC处理水(中国Abiowell,AWR0062);BCA蛋白定量试剂盒(中国Abiowell,批号:AWB0104);广谱彩虹预染蛋白Marker(中国Abiowell,批号:AWB0236);磷酸

缓冲液(PBST)(中国 Abiowell,AWI0130);Acr-Bis(30%,29:1,中国 Abiowell,AWB0020);Tris-甘氨酸电泳缓冲液(中国 Abiowell,AWB0083);Western 转膜缓冲液(中国 Abiowell,AWB0211);丽春红 S 染色液(中国 Abiowell,AWB0225);荧光定量 RCP 仪(美国 Thermo,PIKOREAL96);荧光 PCR 板(美国 Thermo,SPL0960);荧光定量 RCP 仪(美国 ABI QuantStudio1);电泳仪(中国北京六一,DYY-2C);化学发光成像系统(中国勤翔,ChemiScope6100)等。

2 实验方法

2.1 含药血清的制备 根据《医学实验动物学》^[9]计算得出大鼠的给药剂量为人的 6.3 倍,即 2.14 g/100 g。将 20 只大鼠随机分为干预组与对照组,每组各 10 只。干预组灌胃加味大黄廬虫丸混悬液 1.5 ml/100 g,对照组灌胃等量 0.9%氯化钠注射液,每天 1 次,持续 1 周。末次灌胃后大鼠禁食 24 h,之后腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉采血。血液静置 10~15 min 后立即离心 10 min,3500 r/min,取上清液水浴锅灭活(56℃,30 min),过滤分装,-20℃留存。

2.2 细胞的培养与分组 将细胞 T6 细胞株(HSC-T6)细胞置于含 10%脂牛血清(FBS)+1%双抗的细胞培养基(DMEM)中,37℃、5%CO₂的饱和湿度培养箱中培养。然后将其随机分为 6 组,分别为空白组(加不含细胞的培养基)、对照组(细胞不做处理)、5%空白血清组(培养基为 5%空白血清)、10%空白血清组(培养基为 10%空白血清)、5%含药血清组(培养基为 5%含药血清)、10%含药血清组(培养基为 10%含药血清),每组 3 个复孔,均连续培养 24 h。

2.3 乳酸损伤模型的建立 研究显示,低浓度乳酸(0.05 mmol/L)对于肝星状细胞具有促进其激活及大量繁殖的作用^[10]。低浓度乳酸溶液的配制:母液浓度为 1M,将母液浓度稀释 100 倍即可得到 10 mmol/L 工作浓度,再将 10 mmol/L 稀释 200 倍得到 0.05 mmol/L 的工作浓度。将工作浓度的乳酸加入以上各组,根据细胞活性判断造模是否成功。造模成功后分为 5 组:空白组、对照组(空白血清)、正常组(正常含药血清)、模型组(乳酸模型)、中药组(乳酸含药血清)。

2.4 指标检测

2.4.1 细胞活性的测定 采用 CCK8 法测定各组细胞活性。上述各组培养 24 h 后,每孔 10 μl 的 CCK8,用完全培养基配置 CCK8 溶液,去除含药培养基每孔加入 100 μl 含有 CCK8 的培养基。在温度 37℃,5%CO₂ 饱和湿度条件下继续孵育 4 h,用汇松酶标仪分析 450 nm 处吸光度(OD)值。

2.4.2 细胞中 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 表达的测定 采用聚合酶链式反应(PCR)法测定细胞中 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 的表达。提取总 RNA,并计算其浓度、纯度,以细胞总 mRNA 为模板,逆转录 cDNA,逆转录产物可直接用于 PCR 反应和荧光定量 PCR 反应,配置 50 μl 扩增体系,并进行熔解曲线分析。每个样本每个指标设置 3 个孔,检测相关基因及内参灰度,通过两者比值计算相关基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物	序列(5'→3')
Actin	F	ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC
	R	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC
TGF-β1	F	ACTACGCCAAAGAAGTCACC
	R	CACTGCTTCCCGAATGTCT
pSmad 3	F	TCCATCTTGCCATTCACCTCCG
	R	CAAGCTCATCTAATCGTCTCTGT
pSmad 7	F	ACGAAGAGACTCTCGGAGGAA
	R	CTGGGGCTGCTCGCATAA

2.4.3 细胞中 TGF-β1、pSmad3、pSmad7 mRNA 蛋白表达的测定 采用 Western Blot 法测定细胞中 TGF-β1、pSmad3、pSmad7 的表达。提取蛋白,按照 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明测定蛋白浓度。制胶(10%浓缩胶、4.8%分离胶),样本准备,电泳(恒定电压 75V,时间为 130 min),转膜,封闭。一抗孵育(用 1×PBST 将 TGF-β1 稀释至 1:3000,转膜 65 min,pSmad 3 稀释至 1:5000,转膜 78 min,pSmad 7 稀释至 1:1000,转膜 66 min,室温放置 90 min,随后 1×PBST 洗 3 次,每次 10 min);二抗孵育(用 1×PBST 稀释 HRP 标记的二抗均至 1:5000,室温 90 min,1×PBST 洗 3 次,每次 15 min),ECL 显色曝光,凝胶成像系统成像。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

2 组组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组 HSC-T6 细胞活性比较 HSC-T6 细胞活性对照组、5%空白血清组、10%空白血清组、5%含药血清组、10%含药血清组与空白组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。(见表 2)

表 2 各组 HSC-T6 细胞活性比较

组别	OD 值(24 h)
空白组	0.22±0.01
对照组	1.28±0.08 ^a
5%空白血清组	1.23±0.01 ^a
10%空白血清组	1.31±0.02 ^a
5%含药血清组	1.29±0.02 ^a
10%含药血清组	1.35±0.02 ^a

注:与空白组比较,^a $P<0.01$ 。

3.2 各组细胞中 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 表达比较 细胞中 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 表达水平模型组与空白组比较,中药组与模型组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。(见表 3)

表 3 各组细胞中 TGF-β1、Smad3、Smad7 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	TGF-β1	Smad3	Smad7
空白组	0.93±0.08	0.92±0.07	0.90±0.12
正常组	1.23±0.03	1.19±0.12	0.83±0.04
模型组	6.30±0.66 ^a	4.08±0.28 ^a	0.46±0.02 ^a
中药组	2.78±0.83 ^b	3.16±0.37 ^c	0.67±0.15 ^c

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

3.3 各组细胞中 TGF-β1、pSmad3、pSmad7 mRNA 蛋白表达比较 细胞中 TGF-β1、pSmad3、pSmad7 mRNA 蛋白表达水平模型组与空白组比较,中药组与模型组比较,差异均有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。(见表 4)

表 4 各组细胞中 TGF-β1、pSmad3、pSmad7 mRNA 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	TGF-β1	pSmad3	pSmad7
空白组	0.05±0.03	0.06±0.02	0.26±0.06
正常组	0.05±0.08	0.05±0.02	0.27±0.07
模型组	0.17±0.03 ^a	0.21±0.05 ^a	0.06±0.02 ^a
中药组	0.09±0.04 ^b	0.11±0.02 ^c	0.13±0.01 ^b

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

4 讨 论

原发性胆汁性胆管炎是一种隐匿起病的进展性免疫性疾病,如不积极治疗,预后较差^[11-13]。肝内胆汁淤积及慢性炎症是其主要病理特征,其中肝星状细胞的激活是其纤维化的基础。熊去氧胆酸是目前公认的唯一有效的治疗药物,但多种临床研究证明其仅能延缓疾病进展,并且效果因人而异^[14-15]。TGF-β1/Smads 通路是肝纤维化进程中最重要通路之一。TGF-β1 作为一种强效致纤维化因子,在肝星状细胞被激活后浓度急剧升高,促进下游 Smad3 激活,使其具有超强的磷酸化活性^[7,16]。随着肝纤维化的不断进展,HSC 中抑制肝纤维化的 Smad7 也被激活,产生磷酸化后对肝纤维化的保护作用。

PBC 患者来诊时多已处于中晚期。此时日久不愈,正气亏虚而邪气凝聚,阻滞气血经络,导致瘀毒内结,此为重要病理因素。因此,对于本病后期的治疗,重在培补正气、解毒活瘀。研究表明扶正化瘀类方药对于肝纤维化具有显著作用^[17-19],这与本课题组的加味大黄廑虫丸主治“虚劳干血”的理论不谋而合。大黄廑虫丸是东汉张仲景的名方,本方重在祛瘀,大量使用大黄等峻猛之品及虫类药破血逐瘀通络,但是缺乏补益之力。因此,本研究在大黄廑虫丸的基础上加入黄芪、白术,既减前方之毒,又增前方之效,合用大补脾肺之气,增强扶正之力。二药性味甘温,药性偏于温和,既能制大黄、黄芩等寒凉之性,又能降低虫类药之毒性,使本方久服而不伤正。诸药合用,共奏益气活血化瘀、健脾祛湿、清热解郁之效,使邪去正复,病势向愈。

本研究通过建立肝星状细胞损伤模型探讨了加味大黄廑虫丸调控 TGF-β1/Smads 等细胞因子的表达,结果发现其可以降低 TGF-β1 及 Smad3 的表达、提高 Smad7 的表达,从基因和蛋白质分子的角度佐证了加味大黄廑虫丸对于 PBC 的治疗作用。由此认为,加味大黄廑虫丸可能通过调控 TGF-β1/Smads 来减轻肝纤维化,从而治疗 PBC。

参考文献

[1] 陈成伟,成军,窦晓光,等.原发性胆汁性肝硬化(又名原发性胆汁性胆管炎)诊断和治疗共识(2015)[J].中华肝脏病杂志

- 志,2016,24(1):5-13.
- [2] ALESSANDRO GRANITO, LUIGI MURATORI, CLAUDINE LALANNE, et al. Hepatocellular carcinoma in viral and autoimmune liver diseases: Role of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in the immune microenvironment[J]. World Journal of Gastroenterology, 2021, 27(22):2994-3009.
- [3] 孙春燕, 马雄.《2017年欧洲肝病学会临床实践指南:原发性胆汁性胆管炎的诊断和管理》摘译[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(10):1888-1894.
- [4] 杨子轩, 卢秉久. 中西医结合治疗原发性胆汁性胆管炎研究进展[J/OL]. 实用中医内科杂志[2023-03-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1187.R.20230315.0954.002.html>.
- [5] 王宇新, 彭文婉, 黄锦桢, 等. 基于数据挖掘的中医药治疗原发性胆汁性胆管炎用药规律研究[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(8):1124-1130.
- [6] 何国平, 周培, 赵轩竹, 等. 基于“干血劳”理论探讨活血化瘀法在癌症恶病质中应用的研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2021, 27(5):799-804.
- [7] 曾震军, 李墨航, 王新亭. 血清中 TGF- β 1、MMP-1 表达水平联合 FibroScan 对乙型肝炎肝硬化诊断价值[J]. 热带医学杂志, 2020, 20(3):376-379.
- [8] GUO MM, WANG ZD, DAI JY, et al. Glycyrrhizic acid alleviates liver fibrosis in vitro and in vivo via activating CUGBP1-mediated IFN- γ /STAT1/Smad7 pathway [J]. Phytomedicine, 2023, 112, 154587.
- [9] 李垚, 陈学进. 医学实验动物学[M]. 上海:上海交通大学出版社, 2019:12.
- [10] 孙辉, 马凌波, 董飞, 等. 乳酸堆积对肝星状细胞增殖、分化、凋亡的影响[J]. 重庆医学, 2019, 48(16):2743-2746.
- [11] 焦云, 周毅骏. 190例原发性胆汁性胆管炎患者临床指标及影响不良预后的危险因素分析[J]. 中国现代医生, 2023, 61(2):21-24.
- [12] 段维佳, 吕婷婷, 陈莎, 等. 抗线粒体抗体阳性的自身免疫性肝炎患者的临床特点及预后[J]. 临床和实验医学杂志, 2022, 21(18):1931-1934.
- [13] 靳婵娟. 预后不良的原发性胆汁性胆管炎相关危险因素分析[D]. 大连:大连医科大学, 2022.
- [14] 孙春燕, 马雄.《2017年欧洲肝病学会临床实践指南:原发性胆汁性胆管炎的诊断和管理》摘译[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(10):1888-1894.
- [15] 王笑. 原发性胆汁性肝硬化中医辨证分型与病理特点的关系[J]. 中国现代医生, 2019, 57(34):14-17.
- [16] 曹涛, 朱海宏. 基于下调 TGF- β 1/Smad 通路抗肝纤维化研究进展[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2020, 8(30):93.
- [17] 牛宏垚, 黄涛, 郝月茗, 等. 扶正化瘀胶囊对乙型肝炎肝硬化患者肝功能及免疫功能的影响[J]. 吉林中医药, 2023, 43(2):190-193.
- [18] 范海纳, 黄恺, 代云凯, 等. 扶正化瘀方对肝纤维化小鼠肝癌发生的影响与机制[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2023, 31(2):110-117.
- [19] MOHAMMAD HASHEMIPOUR. To determine the effects of Fuzheng Huayu (FZHY) formula in improving myocardial fibrosis following sustained pressure-overload hypertrophy in Rats[D]. Beijing: Beijing University of Chinese medicine, 2010.

(收稿日期:2023-06-25)

[编辑:刘珍]