

基于 HIF-1 α 介导的 VEGF mRNA 表达探讨膈下逐瘀汤抗肝纤维化血管新生的机制

陈兰羽, 马继征, 刘咏梅, 张 云*

中国中医科学院广安门医院, 北京 100053

摘要: **目的** 通过研究肝纤维化大鼠缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 介导的血管内皮细胞生长因子 (VEGF) mRNA 表达及膈下逐瘀汤对其的影响, 探讨膈下逐瘀汤改善肝纤维化血管新生的机制。 **方法** 108 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 组及膈下逐瘀汤高 (GD)、中 (GZ)、低 (GX) 剂量组, 每组 18 只。大鼠 ip 50% 四氯化碳-橄榄油溶液 1 mL/kg 制备肝纤维化模型, 每周 2 次, 共 9 周。各组于造模同时给药。对照组及模型组 ig 无菌水 10 mL/kg, NAC 组 ig 给予 NAC 0.1 g/kg; GD、GZ、GX 组分别 ig 给予膈下逐瘀汤生药饮片浓煎液 26.0、7.8、3.9 g/kg, 每日给药 1 次。在第 3、6、9 周时间点, 各组分别随机选取大鼠处死, Masson 染色制作病理标本; 免疫组织化学染色半定量分析 IV 型胶原 (collage type IV, Col-IV) 及层黏连蛋白 (laminin, LN) 表达水平; Real-time PCR 检测 HIF-1 α 、VEGF mRNA 的相对表达量; 蛋白免疫印迹法 (Western blotting) 检测 VEGF、VEGFR2 蛋白表达水平。 **结果** 与模型组比较, NAC、GD 在给药第 9 周时均能有效抑制大鼠肝细胞外基质 LN 表达 ($P < 0.05$); 在给药第 6、9 周, NAC、GD 均能有效抑制大鼠肝细胞外基质 Col-IV 表达 ($P < 0.05$), NAC、GD 及 GZ 均能有效抑制大鼠肝组织 HIF-1 α 表达 ($P < 0.05$); 在给药第 6、9 周, NAC 和 GD 能有效抑制大鼠肝组织 VEGF mRNA 表达 ($P < 0.05$); 膈下逐瘀汤各剂量和 NAC 均能抑制大鼠肝组织 VEGF、VEGFR2 的蛋白表达 ($P < 0.05$)。 **结论** 膈下逐瘀汤对 HIF-1 α 介导的 VEGF mRNA 表达有调控作用, 可能是其抗肝纤维化血管新生的作用机制之一。

关键词: 膈下逐瘀汤; 肝纤维化; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮细胞生长因子; IV 型胶原; 层黏连蛋白

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)02-0449-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.02.026

Mechanisms of Gexia Zhuyu Decoction on anti-angiogenesis of hepatic fibrosis based on regulation of VEGF mRNA expression mediated by HIF-1 α

CHEN Lan-yu, MA Ji-zheng, LIU Yong-mei, ZHANG Yun

Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of improving angiogenesis of hepatic fibrosis by Gexia Zhuyu Decoction (GZD) through the regulation of the mRNA expression of VEGF mediated by HIF-1 α . **Methods** A total of 108 Wistar rats were randomly divided into normal group ($n = 18$), model group ($n = 18$), N-acetylcysteine (NAC) group ($n = 18$), high-dose GZD group (GD, $n = 18$), middle-dose GZD group (GZ, $n = 18$), and low-dose GZD group (GX, $n = 18$). Hepatic fibrosis model was established by intraperitoneal injection of 50% CCl₄-olive oil solution (1 mL/kg) twice a week for nine weeks. Each group was administered while model established, until the rats were sacrificed. Normal group and model group were ig given sterile water 10 mL/(kg·d), NAC group was ig given NAC 0.1 g/(kg·d), GD, GZ, GX groups were given 26, 7.8, and 3.9 g/(kg·d) GZD by oral gavage. At 3, 6, and 9 weeks, rats in the corresponding groups were randomly sacrificed. Masson staining was used to make pathological specimens, immunohistochemical analysis of Col-IV and laminin was also performed, and real-time PCR was used to detect the mRNA expression of HIF-1 α and VEGF. Western blotting was used to detect the protein expression levels of VEGF and VEGFR2. **Results** Compared with model group, NAC group and GD group significantly inhibited the expression of LN in the extracellular matrix at 9 weeks ($P < 0.05$). Both NAC and GD groups significantly inhibited the expression of extracellular matrix Col-IV, especially at 6

收稿日期: 2018-10-05

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81202633)

作者简介: 陈兰羽 (1973—), 女, 主任医师, 研究方向为慢性肝病的中医药防治。Tel: (010)88001439 E-mail: chenlanyu@163.com

*通信作者 张 云 (1973—), 女, 副研究员, 研究方向为中医药药理药效学研究。Tel: (010)88001436 E-mail: bingqian0711@sina.com.cn

weeks and 9 weeks. NAC group, GD group, and GZ group can significantly inhibit the high expression of HIF-1 α in liver tissue of rats with liver fibrosis ($P<0.05$). At 6 weeks and 9 weeks of administration, NAC and GD groups significantly inhibited the high expression of VEGF mRNA in liver tissue ($P<0.05$). Both GZD and NAC could inhibit the protein expression of VEGF and VEGFR2 in liver tissue. **Conclusion** GZD can regulate the expression of VEGF mRNA mediated by HIF-1 α , which may be one of the key mechanisms of its anti-angiogenesis for hepatic fibrosis.

Key words: Gexia Zhuyu Decoction; hepatic fibrosis; hypoxia inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor (VEGF); collagen type IV; laminin

血管新生被认为是一些病理条件下肝纤维化的前奏^[1], 已有研究表明, 抑制血管新生能有效抑制纤维化的形成^[2]。但由于部分药物在抑制血管新生的同时可引起明显的并发症, 导致患者被迫停止药物治疗^[3-4], 因此寻找高效、低副作用的抗血管新生药物是目前抗肝纤维化药物研究的重要方向之一。

膈下逐瘀汤是清代医家王清任创制的活血祛瘀名方, 主治膈膜下、上腹部瘀血积块等病证, 与肝纤维化、肝硬化的发病机制和部位相符。实验研究证实膈下逐瘀汤可通过多种机制改善大鼠肝纤维化^[5-8], 但没有从血管新生的角度对膈下逐瘀汤抗肝纤维化进行过相关研究。

血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 是生理和病理情况下血管生成的主要调节者, VEGF 与其受体的相互作用是肝纤维化发生的前提条件^[9]。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 作为一种转录因子, 是 VEGF 基因上游重要表达调控因子^[10], 可在基因水平上直接调控 VEGF 的表达^[11-12]。体内细胞在缺乏 HIF-1 α 时 VEGF 的表达被明显抑制; 而在体外的野生型细胞中, 在缺氧环境下 VEGF 合成增加, HIF-1 α 引起 VEGF 增加能刺激肝星状细胞 (HSC) 活化、增殖, 增加微血管生成, 促进细胞外基质 (ECM) 生成及肝脏重构, 还能促进肝窦毛细血管化的形成, 使肝细胞与血浆之间物质交换及肝脏血液循环出现障碍, 从而促进肝纤维化的形成^[13]。

因此本实验研究膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠 HIF-1 α 、VEGF 表达的调节作用, 阐明肝纤维化血管新生与中医“血瘀”证的关系, 对深入认识肝纤维化“血瘀”病机具有重要的理论价值和临床指导意义。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠, 108 只, 清洁 II 级, 体质量 130~150 g, 购自北京华阜康生物科技有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2009-0007。大鼠于中国中医科学院广安门医院 SPF 级动物房饲养, 饲以标准的合成饲料, 自由饮用专用无菌水, 环境温度 (20±

2) °C, 相对湿度 36%。

1.2 药物与试剂

膈下逐瘀汤按《医林改错》方组成: 五灵脂 6 g、当归 9 g、川芎 6 g、桃仁 9 g、丹皮 6 g、赤芍 6 g、乌药 6 g、延胡索 3 g、甘草 9 g、香附 5 g、红花 9 g、枳壳 5 g。所有中药饮片均由广安门医院药剂科统一采购, 均来自康美药业股份有限公司 (批号 13056297F); N-乙酰半胱氨酸 (NAC, 美国 Sigma 公司); CCl₄ (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 黑色核染试剂盒、Masson 染色试剂盒、哈瑞氏苏木素染液 (北京世济合力生物科技有限公司); 二抗 (Dako 公司); Trizol 试剂 (Invitrogen 公司); Fermentas K1622 RT 逆转录试剂盒 (MBI 公司); SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒 (美国应用生物公司); Bradford 蛋白浓度测定试剂 (北京天根生化科技有限公司); VEGF、 β -actin 抗体 (Santa Cruz 公司); VEGFR2 抗体 (Abcam 公司)。

1.3 仪器

7900HT 型荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物公司); Thermo NanoDrop 2000 分光光度计 (基因有限公司); 高速冷冻离心机 (Hitachi 公司); 5415R 型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); Lambda P40 紫外可见光分光光度计 (美国 PE 公司); Mini-ROTEAN3 电泳系统、Mini Trans-Blot 转移系统 (美国 Bio-Rad 公司); TS-1 型脱色摇床 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); -80 °C 冷冻柜 (松下三洋公司)。

2 方法

2.1 分组及给药

参考文献方法^[14]选择 NAC 为对照药物, 大鼠适应性喂养 1 周, 随机分为对照组、模型组、NAC 组及膈下逐瘀汤高 (GD)、中 (GZ)、低 (GX) 剂量组, 每组 18 只。大鼠 ip 给予 50% CCl₄-橄榄油溶液 1 mL/kg, 每周 2 次, 共 9 周, 制备肝纤维化模型^[15]。对照组大鼠 ip 给予等量盐水橄榄油溶液。

膈下逐瘀汤采用中国中医科学院广安门医院饮

片煎药室统一操作规程煎煮。各组分别于造模同时即给药。对照组及模型组大鼠 ig 给予等量无菌水 10 mL/kg; NAC 组 ig 给予 NAC 0.1 g/kg; 按药理实验方法学^[16]计算大鼠膈下逐瘀汤给药剂量, GD、GZ、GX 组大鼠分别 ig 给予膈下逐瘀汤生药饮片浓煎液 26.0、7.8、3.9 g/kg, 每日给药 1 次。给药按组别分别持续给药 3、6、9 周。在第 3、6、9 周时间点, 各组分别随机选取大鼠, 取部分肝组织, 以 4% 多聚甲醛溶液固定, 制作病理标本。剩余部分肝组织置于液氮中, -80 ℃ 保存。

2.2 Masson 染色

大鼠肝组织石蜡切片 3 μm, 脱蜡至水, 依次采用黑色核染试剂盒、Masson 染色试剂盒染色。95% 乙醇-无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。

2.3 肝组织 IV 型胶原(Col-IV)及层黏连蛋白(LN)免疫组织化学染色

大鼠肝组织石蜡切片 2 μm, 经常规脱蜡至水, 蒸馏水洗 2 次, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 1 次, 每次 5 min, 高压锅抗原修复, PBS 漂洗 2~3 次, 每次 5 min; 3% H₂O₂ 室温静置 10 min; PBS 漂洗 2~3 次, 每次 5 min。滴加一抗 (1:300) 37 ℃ 孵育 2 h, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 二氨基联苯胺显色 3~5 min, 在显微镜下掌握染色程度, 自来水冲洗, 苏木精复染 2 min, 盐酸酒精分化, 脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。图像分析采用病理组织实时摄像显微镜系统摄像, 每个切片随机取 4 个高倍 (×400) 视野, 并使用图像分析软件 (MIAS) 计算 LN 和 Col-IV 平均吸光度 (A) 值。

2.4 Real-time PCR 检测 HIF-1α、VEGF mRNA 的相对表达量

取大鼠肝组织, 液氮研磨后 Trizol 法提取总 RNA, 按照 SYBR Green PCR Master Mix 说明书进行逆转录反应。Real-time PCR 反应体系为 2×SyBr Green Mix 10 μL, 10 μmol/L primer L 1 μL, 10 μmol/L primer R 1 μL, DEPC H₂O 7 μL, cDNA 1 μL; 反应条件为 95 ℃, 5 min; 95 ℃, 30 s, 55 ℃, 30 s, 72 ℃, 35 s, 40 个循环; 72 ℃, 8 min。以 2^{-ΔΔCt} 计算相应 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

2.5 Western blotting 法检测 VEGF、VEGFR2 蛋白表达量

取 50 mg 肝组织, 加入冰冷的裂解缓冲液 500 μL, 冰浴超声 3×10 s, 4 ℃ 下 10 000×g 离心 5 min,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
GAPDH	上游 CCATGGAGAAGGCTGGG	195
	下游 CAAAGTTGTCATGGATGACC	
VEGF	上游 AGCGACAAGGCAGACTATTCA	217
	下游 TCTTTCCTCTGCTGATTTC	
HIF-1α	上游 TGGATTACCACAGCTGACCA	190
	下游 ACAGAAACGAAACCCACAG	

吸取上清, Bradford 法测定蛋白浓度后分装, -80 ℃ 保存。加入 50 μg 蛋白样品至 0.5 mL 离心管中, 加入 5×SDS 上样缓冲液至终浓度为 1×SDS。80 V 电压电泳 30 min, 待样品走出加样孔后, 将电压调至 100 V。蛋白湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 洗膜, 将 VEGF、VEGFR2 抗体以 1×TBST 稀释至适当浓度 (1:1 000), 4 ℃ 孵育过夜。HRP 偶联二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 显影并定影, 凝胶图像处理系统分析。

2.6 统计学分析

用 SPSS 19.0 软件进行统计处理, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间 HIF-1α、VEGF mRNA 表达量及 VEGF、VEGFR2 蛋白表达量比较采用重复测量设计的方差分析。各组间大鼠肝脏 Col-IV、LN MOD 值比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 肝脏胶原纤维 Masson 染色结果

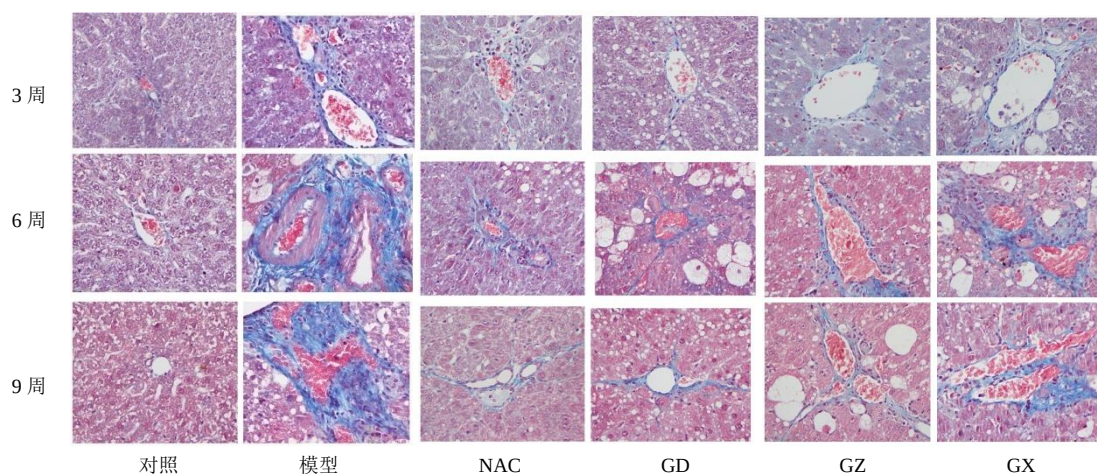
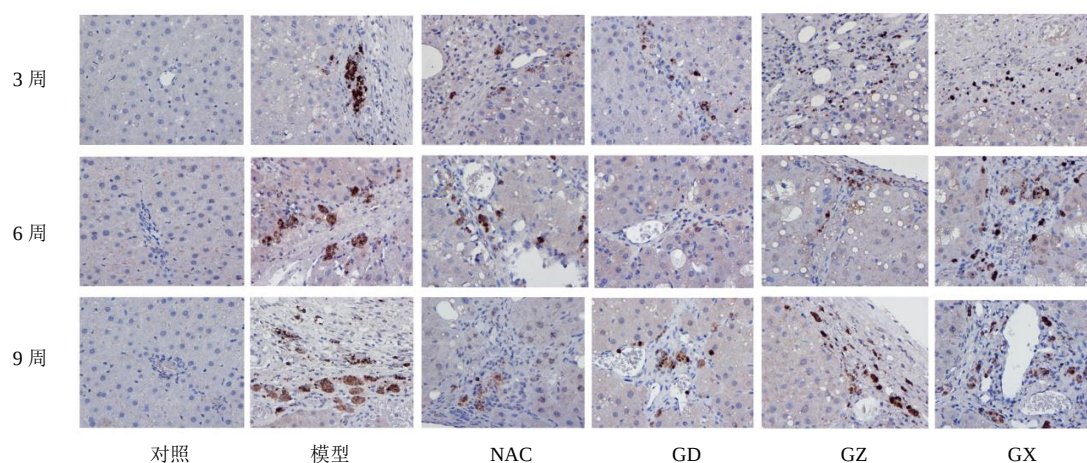
CCl₄ 慢性肝损伤能显著增加大鼠肝组织胶原纤维含量, 导致肝纤维化的形成, NAC 和膈下逐瘀汤不同剂量均能不同程度减少 CCl₄ 慢性肝损伤模型大鼠肝组织胶原纤维含量, 延缓肝纤维化病理进程。膈下逐瘀汤抗肝纤维化的作用存在剂量依赖性, 随着剂量的增加而增强 (图 1)。

3.2 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 LN 量的影响

与对照组比较, CCl₄ 慢性肝损伤能显著增加大鼠肝细胞外基质 LN 的表达。与模型组比较, 在造模第 9 周时, NAC、GD 均能有效抑制大鼠肝细胞外基质 LN 表达。GZ、GX 对 LN 表达未显示出显著的抑制作用。膈下逐瘀汤抑制大鼠肝组织 LN 的表达具有时间和剂量依赖性, 见图 2 及表 2。

3.3 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 Col-IV 的影响

与对照组比较, CCl₄ 慢性肝损伤能显著增加大鼠肝细胞外基质 Col-IV 表达。与模型组比较, NAC、GD 均能有效抑制大鼠肝细胞外基质 Col-IV 表达, 尤

图 1 各组大鼠肝脏 Masson 染色病理切片 ($\times 400$)Fig. 1 Masson staining pathological section of liver tissue of rats in each group ($\times 400$)图 2 各组大鼠肝脏 LN 免疫组化切片 ($\times 400$)Fig. 2 Immunohistochemical section of LN of rat liver in each group ($\times 400$)表 2 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 LN 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 2 Effect of GZD on expression of LN in rat liver ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	LN 表达量		
		3 周	6 周	9 周
对照		0.19±0.01	0.17±0.03	0.18±0.02
模型		0.64±0.33*	0.88±0.31*	1.33±0.40***
NAC	0.1	0.56±0.27*	0.77±0.21*	0.66±0.31*△
GD	26.0	0.56±0.25*	0.64±0.24*	0.71±0.13*△
GZ	7.8	0.66±0.23*	0.79±0.12*	1.10±0.16*▲●▼**
GX	3.9	0.68±0.27*	1.05±0.27*▲●▼**	1.12±0.17*▲●**

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: △ $P<0.05$; 与 NAC 组比较: ▲ $P<0.05$; 与 GD 组比较: ● $P<0.05$; 与 GZ 组比较: ▼ $P<0.05$; 与组内第 3 周比较: * $P<0.05$; 与组内第 6 周比较: * $P<0.05$, 下同
* $P<0.05$ vs control group; △ $P<0.05$ vs model group; ▲ $P<0.05$ vs NAC group; ● $P<0.05$ vs GD group; ▼ $P<0.05$ vs GZ group; * $P<0.05$ vs three week in group; * $P<0.05$ vs six week in group, same as below

其是在造模第 6、9 周时作用最明显。GZ、GX 对 Col-IV 表达的抑制作用不及 NAC 和 GD, 见图 3 及表 3。

3.4 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 HIF-1 α mRNA 表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肝组织 HIF-1 α mRNA 表达水平显著提高, NAC、GD 和 GZ 均能有效抑制 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠肝组织 HIF-1 α 高表达, 其中 GD 和 NAC 作用最强。与 NAC 组比较, GD 抑制 HIF-1 α mRNA 表达的作用更稳定, 提示膈下逐瘀汤抑制 CCl₄ 诱导的慢性肝损伤大鼠肝组织 HIF-1 α mRNA 表达, 且具有时间和剂量依赖性 (表 4)。

3.5 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 VEGF mRNA 表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肝组织 VEGF mRNA 表达水平显著提升, 在造模第 6、9 周, NAC 和 GD

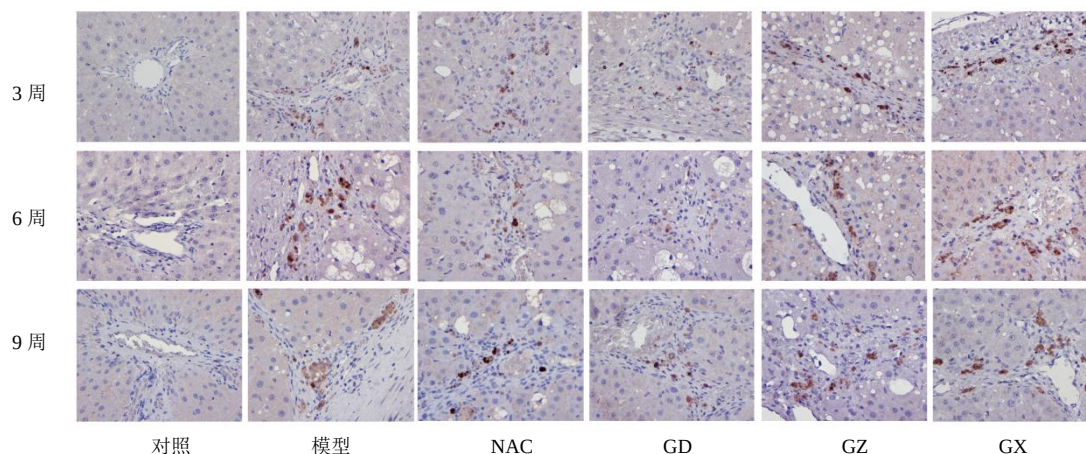


图 3 各组大鼠肝脏 Col-IV 免疫组化切片 ($\times 400$)

Fig. 3 Immunohistochemical section of Col-IV of rat liver in each group ($\times 400$)

表 3 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 Col-IV 量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of GZD on expression of Col-IV in rat liver ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Col-IV 表达量		
		3 周	6 周	9 周
对照	—	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.01
模型	—	$0.38 \pm 0.12^*$	$0.66 \pm 0.33^{*\Delta}$	$0.73 \pm 0.15^{*\Delta}$
NAC	0.1	$0.30 \pm 0.13^*$	$0.45 \pm 0.13^{\Delta}$	$0.47 \pm 0.22^{*\Delta}$
GD	26.0	$0.22 \pm 0.07^{\Delta}$	$0.41 \pm 0.10^{*\Delta}$	$0.42 \pm 0.08^{*\Delta}$
GZ	7.8	$0.32 \pm 0.05^*$	$0.54 \pm 0.17^{*\Delta}$	$0.57 \pm 0.12^{*\Delta}$
GX	3.9	$0.33 \pm 0.07^{*\Delta}$	$0.63 \pm 0.14^{*\Delta}$	$0.65 \pm 0.13^{*\Delta}$

表 4 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 HIF-1 α mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of GZD on expression of HIF-1 α mRNA in rat liver ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	HIF-1 α mRNA 相对表达量		
		3 周	6 周	9 周
对照	—	0.39 ± 0.10	0.32 ± 0.21	0.31 ± 0.19
模型	—	$1.23 \pm 0.72^*$	$2.59 \pm 0.61^{*\Delta}$	$2.57 \pm 0.95^{*\Delta}$
NAC	0.1	0.82 ± 0.43	$1.66 \pm 0.91^{*\Delta}$	$1.46 \pm 0.32^{*\Delta}$
GD	26.0	1.05 ± 0.58	$1.44 \pm 0.22^{*\Delta}$	$1.37 \pm 0.70^{*\Delta}$
GZ	7.8	1.06 ± 0.83	$1.95 \pm 0.74^*$	$1.86 \pm 0.74^*$
GX	3.9	$1.20 \pm 0.66^*$	$2.19 \pm 0.71^{*\Delta}$	$2.15 \pm 0.82^{*\Delta}$

能有效抑制 VEGF mRNA 高表达, GZ 和 GX 组作用不明显, 见表 5。

3.6 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 VEGF 蛋白表达的影响

给药第 3 周, 与对照组比较, 模型组大鼠肝脏 VEGF 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, NAC、GD 组大鼠肝脏 VEGF 蛋白表达显著降

表 5 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 VEGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of GZD on expression of VEGF mRNA in rat liver ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	VEGF mRNA 相对表达量		
		3 周	6 周	9 周
对照	—	0.42 ± 0.09	0.33 ± 0.10	0.35 ± 0.07
模型	—	$1.61 \pm 0.55^*$	$2.22 \pm 0.44^{*\Delta}$	$2.00 \pm 0.15^*$
NAC	0.1	$1.17 \pm 0.37^*$	$1.66 \pm 0.25^{*\Delta}$	$1.68 \pm 0.19^{*\Delta}$
GD	26.0	$1.24 \pm 0.39^*$	$1.60 \pm 0.31^{*\Delta}$	$1.51 \pm 0.24^{*\Delta}$
GZ	7.8	$1.29 \pm 0.39^*$	$2.00 \pm 0.24^{*\Delta}$	$1.85 \pm 0.24^{*\Delta}$
GX	3.9	$1.25 \pm 0.40^*$	$1.98 \pm 0.49^{*\Delta}$	$1.88 \pm 0.18^{*\Delta}$

低 ($P < 0.05$)。给药第 6、9 周, 与模型组比较, NAC、GD、GZ 组大鼠肝脏 VEGF 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。提示膈下逐瘀汤和 NAC 均能抑制 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠肝组织 VEGF 蛋白表达, 其中 GD 与 NAC 效果相当, 优于 GZ, 而 GX 作用不明显, 见表 6 及图 4。

3.7 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 VEGFR2 蛋白表达的影响

给药第 3、6、9 周, 与对照组比较, 模型组大鼠肝脏 VEGFR2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, NAC、GD、GZ 组大鼠肝脏 VEGFR2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性。说明 CCl₄ 致慢性肝损伤大鼠肝组织 VEGFR2 蛋白表达显著升高, NAC 和膈下逐瘀汤均能抑制 CCl₄ 致肝纤维化大鼠肝组织 VEGFR2 蛋白表达, NAC 与 GD 作用相当, 较 GZ 作用更强。GX 对 VEGFR2

表 6 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 VEGF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 6 Effect of GZD on protein expression of VEGF in rat liver ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	VEGF 蛋白相对表达量		
		3 周	6 周	9 周
对照		0.16±0.06	0.15±0.05	0.15±0.05
模型		0.49±0.11*	0.74±0.16**	0.54±0.13**
NAC	0.1	0.32±0.10* [△]	0.38±0.09* [△]	0.22±0.06* [△]
GD	26.0	0.35±0.08* [△]	0.44±0.10* [△]	0.31±0.10* [△]
GZ	7.8	0.41±0.09*	0.61±0.08* [△]	0.35±0.09* [△]
GX	3.9	0.44±0.07* [△]	0.72±0.14* [△]	0.45±0.07* [△]

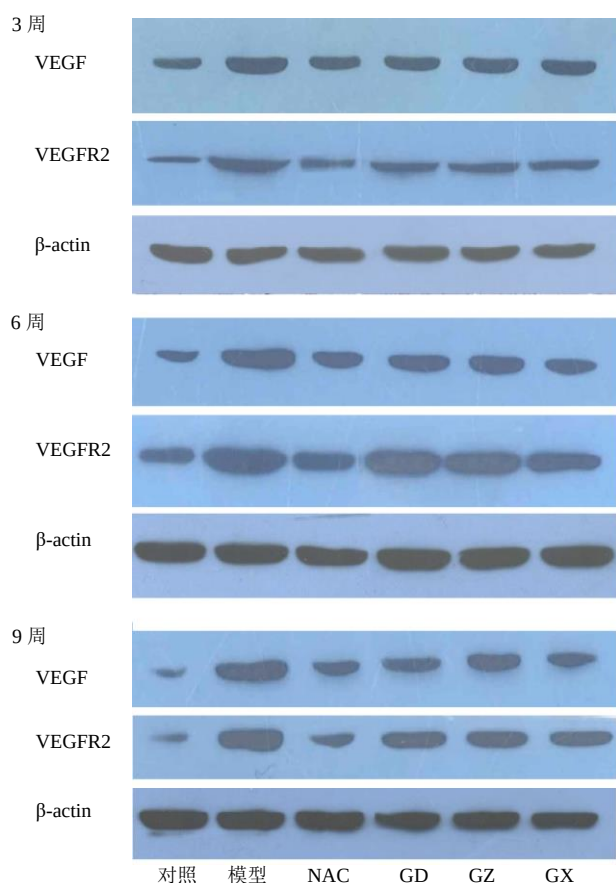


图 4 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 VEGF、VEGFR2 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of GZD on protein expression of VEGF and VEGFR2 in rats liver

蛋白表达无明显影响。见表 7 及图 4。

4 讨论

慢性肝损伤过程中, 肝纤维化继发于肝细胞缺氧与病理性血管生成。VEGF 是生理和病理情况下血管生成的主要调节者, 肝硬化发生过程中存在着

表 7 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏 VEGFR2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 7 Effect of Gexiazhu Yu Decoction on protein expression of VEGFR2 in rat liver ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	VEGFR2 蛋白相对表达量		
		3 周	6 周	9 周
对照		0.15±0.04	0.18±0.05	0.14±0.05
模型		0.52±0.11*	0.89±0.16**	0.59±0.13**
NAC	0.1	0.29±0.06* [△]	0.32±0.07* [△]	0.30±0.10* [△]
GD	26.0	0.41±0.08* [△]	0.51±0.11* [△]	0.38±0.11* [△]
GZ	7.8	0.40±0.06* [△]	0.63±0.13* [△]	0.42±0.07* [△]
GX	3.9	0.47±0.09* [△]	0.75±0.19* [△]	0.49±0.12* [△]

血管新生, 与 VEGF 的生成增多有关^[17]。在肝纤维化发展过程中 VEGF 及其受体表达水平均显著升高^[18], VEGF 与其受体的相互作用是肝纤维化发生的前提条件^[9]。可见 VEGF 在肝纤维化血管新生中具有重要的作用。

低氧是纤维化形成过程中主要的病理特点^[19], HIF-1 α 在这一病理过程中发挥重要的调节作用, 被称为缺氧应激的“总开关”^[20]。在缺氧的情况下, HIF-1 α 累积, 进而导致血管生成因子的表达增加^[21]。缺氧通过上调肝脏 VEGF、VEGFR1 表达, 促进肝脏微血管生成和 Col-I、Col-IV 沉积, 直接参与肝纤维化的病理进程^[22]。HIF-1 α 基因表达增加对肝纤维化的血管生成及胶原沉积至关重要, 是一个关键的促肝纤维化因子的调控因子^[23-24]。在缺氧环境下, 上皮细胞 (endothelial cell, EC) 通过 HIF-1 α /VEGF 通路上调 VEGF、VEGFR 的表达, 而在敲除 HIF-1 α 、VEGF 基因后, 缺氧刺激并不能诱导 VEGFR2 表达上调^[25]。可见在肝纤维化病理性血管新生的过程中, HIF-1 α 、VEGF 起着十分重要的作用。

本研究中, 在造模第 3 周, 与对照组比较, 模型组大鼠肝脏 HIF-1 α mRNA 表达水平显著升高, 由其调控的下游基因 VEGF mRNA 和 VEGF、VEGFR2 蛋白表达水平上调。在病理表现方面, 肝脏的炎症、变性、坏死、纤维化程度随着上述基因表达水平的上调而加重。各组指标演变规律与上述基因表达情况基本一致。提示 CCl₄ 造成大鼠慢性肝损伤, 启动了肝组织缺氧应激反应, HIF-1 α 表达上调, 进而调控其下游一系列基因过表达, 并引起肝脏 LN、Col-IV 等细胞外基质沉积的病理效应, 最终进展至肝纤维化、肝硬化。

CCl₄ 慢性肝损伤能够诱导大鼠肝脏 HIF-1 α 及其下游基因 VEGF、VEGFR 的表达上调,并且 HIF-1 α mRNA 水平与肝纤维化程度呈正相关,即大鼠肝纤维化程度随着肝组织缺氧程度的加重而加重,该结论与 Corpechot 等^[22]、Copples 等^[26]的研究一致。一定观察周期内,各造模组大鼠肝组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 水平和 VEGF、VEGFR2 蛋白表达水平随着损伤持续时间的延长而升高(3~6周),但继续延长观察周期,NAC 和膈下逐瘀汤组 HIF-1 α 、VEGF mRNA 和相关蛋白表达水平转而降低,即在实验的9周时间内,相关指标并未随着时间的延长而呈线性升高。鉴于本研究只观察了第3、6、9周3个时间点,各指标具体的变化拐点仍需要进一步研究。治疗组相关基因 mRNA 表达水平显著低于模型组,提示膈下逐瘀汤、NAC 能够改善肝脏的缺氧状态,有抑制肝脏病理性血管生成作用。

肝纤维化时肝脏血管新生对血液的运行造成了影响,破坏了肝脏正常的生理功能,符合中医“血瘀”病理表现。而相关的研究也表明“血瘀”是肝纤维化基本证候之一^[27],几乎伴随着肝纤维化整个病程。膈下逐瘀汤是治疗肝纤维化、肝硬化等“血瘀证”的经典方剂。本研究基于 HIF-1 α 介导的缺氧应激损伤及肝纤维化血管生成相关指标,探讨膈下逐瘀汤改善肝纤维化“血瘀证”的分子生物学机制,在一定程度上阐释了肝纤维化中医血瘀病机的分子生物学基础,从现代医学角度丰富了中医“血瘀”理论。

参考文献

- [1] Andrade Z A, Santana T S. Angiogenesis and schistosomiasis [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010, 105(4): 436-439.
- [2] Mejias M, Garci-Pras E, Tiani C, et al. Beneficial effects of sorafenib on splanchnic, intrahepatic, and portocollateral circulations in portal hypertensive and cirrhotic rats [J]. *Hepatology*, 2009, 49(4): 1245-1256.
- [3] Llovet J M, Bruix J. Testing molecular therapies in hepatocellular carcinoma: The need for randomized phase II trials [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(6): 833-835.
- [4] Siegel A B, Cohen E I, Ocean A, et al. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(18): 2992-2998.
- [5] 吴琦, 刘哲丞, 齐晓丹, 等. 膈下逐瘀汤对大鼠纤维化肝组织 CTGF mRNA 和 PDGF-A 蛋白表达的影响 [J]. 中外医疗, 2010(24): 29-32.
- [6] 张英博, 贾彦, 牛英才. 膈下逐瘀汤对大鼠纤维化肝组织 Smad4 mRNA 表达的影响 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2008, 29(14): 1669-1670.
- [7] 张英博, 贾彦, 周丽, 等. 膈下逐瘀汤对大鼠纤维化肝组织 TIMP1 和 MMP-2 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(9): 698-700.
- [8] 张英博, 贾彦, 牛英才. 膈下逐瘀汤对大鼠纤维化肝组织 α -SMA 和 MMP-2 表达的影响 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2008, 29(15): 1800-1801.
- [9] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, et al. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis [J]. *Gut*, 2003, 52(9): 1347-1354.
- [10] Bozova S, Elpek G O. Hypoxia-inducible factor-1 α expression in experimental cirrhosis: Correlation with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis [J]. *APMIS*, 2007, 115(7): 795-801.
- [11] Ry H E, Poloni M, McNulty W, et al. Hypoxia inducible factor-1 α is positive factor in solid tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(15): 4010-4015.
- [12] Jiang B H, Semenza G L, Bauer C, et al. Hypoxia inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension [J]. *Am J Physiol*, 1996, doi: 10.1152/ajpcell.1996.271.4.C1172.
- [13] Pfander D, Cramer T, Schipani E, et al. HIF-1 α controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(9): 1819-1826.
- [14] Pereira-Filho G, Ferreira C, Schwengber A, et al. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats [J]. *Arquivos Gastroenterol*, 2008, doi: 10.1590/S0004-28032008000200013.
- [15] Nakamura T, Akiyoshi H, Saito I, et al. Adenovirus-mediated gene expression in the septal cells of cirrhotic rat livers [J]. *J Hepatol*, 1999, 30(1): 101-106.
- [16] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [17] Vanheule E, Geerts A M, Van Huysse J, et al. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: Relationship between fibrosis and angiogenesis [J]. *Int J Exp Pathol*, 2008, 89(6): 419-432.
- [18] Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2002, doi: 10.1053/jhep.2002.32524.
- [19] Fine L G, Orphanides C, Norman J T. Progressive renal

- disease: The chronic hypoxia hypothesis [J]. *Kidney Int Suppl*, 1998, doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00853.x.
- [20] Prass K, Ruscher K, Karsch M, *et al.* Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia *in vivo* and *in vitro* HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(5): 520-525.
- [21] Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, *et al.* Angiogenesis in chronic liver disease and its complications [J]. *Liver Int*, 2011, 31(2): 146-162.
- [22] Corpechot C, Barbu V, Wendum D, *et al.* Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2002, 35(5): 1010-1021.
- [23] Moon J O, Welch T P, Gonzalez F J, *et al.* Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1 α -deficient mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(3): G582-G592.
- [24] Copple B L, Bai S, Burgoon L D, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α regulates the expression of genes in hypoxic hepatic stellate cells important for collagen deposition and angiogenesis [J]. *Liver Int*, 2011, 31(2): 230-244.
- [25] Tang N, Wang L, Esko J, *et al.* Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(5): 485-495.
- [26] Copple B L, Kaska S, Wentling C. Hypoxia-inducible factor activation in myeloid cells contributes to the development of liver fibrosis in cholestatic mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341(2): 307-316.
- [27] 张 琴, 刘 平, 章浩伟. 900 例肝炎后肝硬化中医证候判别模式的研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(8): 694-697.