

基于 JAK1/STAT3 信号通路研究高车前素对肝纤维化小鼠的影响

徐冲¹, 秦小东¹, 任丽², 罗先钦^{2*}

1. 重庆市中医院 药剂科, 重庆 400021

2. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016

摘要: 目的 基于 Janus 激酶 1 (Janus kinase 1, JAK1) 和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路研究高车前素对四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 小鼠的影响。方法 小鼠连续 6 周背部 sc CCl₄ 溶液制备 HF 模型, 将 HF 小鼠随机分为模型组、秋水仙碱 (2 mg/kg) 组和高车前素高、低剂量 (30、10 mg/kg) 组, 各给药组连续 4 周 ip 相应药物, 末次给药后 24 h 制备血清, 计算肝脏指数; 采用全自动生化分析仪测定血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性及总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 水平; 测定血清和肝组织中羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 水平; 测定肝组织中丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 检测血清中透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、层黏连蛋白 (laminin, LN)、III 型前胶原 (type III procollagen, PIIIINP)、IV 型胶原 (type IV collagen, Col-IV)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-6 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝组织病理改变; 采用 qRT-PCR 法检测肝组织中尿激酶型纤溶酶原激活物 (urokinase type plasminogen activator, uPA) 和纤溶酶原激活物抑制因子-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) mRNA 表达; 采用 Western blotting 检测肝组织中 JAK1/STAT3 信号通路中相关蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 高车前素组小鼠体质量显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肝脏指数显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 血清中 ALT、AST 活性和 TBIL 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 血清和肝组织中 Hyp 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 肝组织中 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$), SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 血清中 LN、HA、PIIINP、Col-IV、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 光镜下可见肝组织细胞水肿、空泡样改变、炎细胞浸润明显减轻; 肝组织中 uPA mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), PAI-1 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 肝组织中 p-JAK1 和 p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。**结论** 高车前素可减轻 HF 小鼠的肝损伤和炎症程度, 其抗 HF 的作用机制可能与激活 uPA 纤溶酶系统和干预 JAK1/STAT3 信号转导通路有关。

关键词: 高车前素; 肝纤维化; Janus 激酶 1/转录激活因子 3 信号通路; 尿激酶型纤溶酶原激活物; 纤溶酶原激活物抑制因子-1

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)19-6093-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.015

Effect of hispidulin on hepatic fibrosis mice based on JAK1/STAT3 signaling pathway

XU Chong¹, QIN Xiao-dong¹, REN Li², LUO Xian-qin²

1. Department of Pharmacy, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China

2. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To study the effect of hispidulin on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis (HF) mice based on Janus kinase 1 (JAK1) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway. **Methods** HF model was prepared by sc CCl₄ solution on the back of mice for six consecutive weeks, HF mice were randomly divided into model group, colchicine (2 mg/kg) group and hispidulin high-and low-dose (30, 10 mg/kg) groups, each administration group was ip corresponding

收稿日期: 2022-06-16

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2019jcyj-msxmX0044)

作者简介: 徐冲, 副主任中药师, 从事中药有效成分和药理活性研究。Tel: (023)67063730 E-mail: chongxu@cudtc.edu.cn

*通信作者: 罗先钦, 研究员, 从事中药药理与毒理评价研究。Tel: (023)65712062 E-mail: lxq_0203@163.com

drug for four consecutive weeks, serum was prepared at 24 h after the last administration, and liver index was calculated; Fully automated biochemical analyzer was used to measure alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) activities and total bilirubin (TBIL) level in serum; Levels of hydroxyproline (Hyp) in serum and liver tissues were detected; Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels and superoxide dismutase (SOD) activity in liver tissues were detected; Hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen (PIIINP), type IV collagen (Col-IV), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 levels in serum were detected; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological changes in liver tissues; qRT-PCR was used to detect urokinase type plasminogen activator (*uPA*) and plasminogen activator inhibitor-1 (*PAI-1*) mRNA expressions in liver tissues; Western blotting was used to detect the expressions of related proteins in JAK1/STAT3 signaling pathway in liver tissues. **Results** Compared with model group, body weight of mice in hispidulin group was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), liver index was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), ALT, AST activities and TBIL level in serum were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), Hyp levels in serum and liver tissue were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), MDA level in liver tissue was significantly decreased ($P < 0.01$), while SOD activity was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), levels of LN, HA, PIIINP, Col-IV, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$); Hepatic tissue edema, vacuolar-like changes, and inflammatory cell infiltration were observed under light microscope; *uPA* mRNA expression in liver tissue was significantly increased ($P < 0.01$), and *PAI-1* mRNA expression was significantly decreased ($P < 0.01$); p-JAK1 and p-STAT3 protein expression levels in liver tissue were significantly decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** Hispidulin can reduce liver injury and inflammation in HF mice, and its anti-HF mechanism may be related to the activation of uPA plasmin system and intervention of JAK1/STAT3 signal transduction pathway.

Key words: hispidulin; hepatic fibrosis; Janus kinase 1/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway; urokinase type plasminogen activator; plasminogen activator inhibitor-1

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是多种病因导致肝细胞发生变性、炎症及坏死等, 进而刺激肝细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 合成与降解失调, 造成肝脏内的纤维结缔组织异常增生、沉积而引起的一系列病理、生理过程^[1]。其本质是由于肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 活化及 ECM 合成与降解不平衡, 导致 ECM 过度沉积; 主要表现为广泛的肝细胞坏死、ECM 过度沉积引起的正常肝组织破坏、假小叶和再生结节形成, 最终导致门脉高压相关性疾病、低蛋白血症等多种严重并发症的产生^[2]。尽管现代医学对 HF 的发病机制研究颇深, 但目前大多数抗 HF 药物的临床效果不显著, 且具有药物毒性, 其实际应用受到限制。因此, 开发有效的药物逆转 HF 进程, 是治疗慢性肝病, 预防肝硬化、肝癌的关键。

龙血竭是百合科植物龙血树属植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的含脂木材经乙醇提取而得到的树脂, 被誉为“活血圣药”, 有散瘀生新、活血止痛、止血生肌等功效, 在治疗冠心病、脑梗死、心肌缺血以及抗炎、创伤愈合等方面具有显著的疗效^[3]。研究表明, 龙血竭具有抗血栓、抗血小板聚集、抗纤维化等作用^[4]。本课题组前期通过生物信息学方法, 筛选出龙血竭中抗纤溶酶原激活物抑制因子-1 (plasminogen activator

inhibitor-1, PAI-1) 的活性成分高车前素, 其生物活性强于龙血素 B^[5]。高车前素是一种黄酮类化合物, 现代药理学研究表明其具有抗炎、抗氧化、抗增殖、抗真菌、抗癫痫、抗诱变、抗肿瘤、保肝、抑制血管生成等多种药理活性^[6]。高车前素可能通过 Janus 激酶 1 (Janus kinase 1, JAK1) 和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 通路, 抑制磷酸化 STAT3 (phosphorylated STAT3, p-STAT3) 和 Twist1 蛋白表达, 从而抑制抗凋亡的 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达, 抑制肝癌细胞增殖^[7]。JAK1/STAT3 信号转导通路是细胞因子信号转导通路之一, 参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等多种重要的生物学过程。研究发现, JAK1/STAT3 信号通路与 HF 有着极其密切的联系, 但其具体的作用机制尚不明确^[8-10]。因此, 本研究采用四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导建立 HF 小鼠模型, 初步考察高车前素对小鼠肝功能指标、纤维化相关指标和肝脏病理学改变等的影响, 探讨高车前素对 HF 小鼠 JAK1/STAT3 信号通路的影响, 为其临床应用提供思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性昆明种小鼠 80 只, 6~8 周龄, 体

质量 18~22 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 生产许可证号 SCXK (渝) 2018-0003。动物饲养于重庆医科大学实验动物中心 IVC 第二动物房, 每笼饲养不多于 5 只, 自由进食饮水, 室温 22.0~23.1 °C, 相对湿度 52%~60%。动物实验经重庆医科大学医学研究伦理委员会批准 (批准号 2022072)。

1.2 药品与试剂

高车前素 (批号 DSTDG002601, 质量分数为 99.23%) 购自成都德斯特生物技术有限公司; 秋水仙碱片 (0.5 mg/片, 批号 20200802) 购自滇红药业集团玉溪生物制药有限公司; 血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 AUZ2122)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 AUZ2119)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 试剂盒 (批号 AUZ2130) 均购自贝克曼库尔特商贸有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 20210906)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20210927)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒 (批号 20211009)、羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 试剂盒 (批号 20211124)、透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 试剂盒 (批号 20210918)、层黏连蛋白 (laminin, LN) 试剂盒 (批号 2021091)、III 型前胶原 (type III procollagen, PIIIINP) 试剂盒 (批号 20210909)、IV 型胶原 (type IV collagen, Col-IV) 试剂盒 (批号 20211101) 均购自南京建成生物工程研究所; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 E20210301A)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒 (批号 E20210312A)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 E20210407A), 购自上海继锦化学科技有限公司; PAI-1、尿激酶型纤溶酶原激活物 (urokinase type plasminogen activator, uPA) 引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成; RNA simple Total RNA 试剂盒 (批号 W0103) 购自天根生化科技有限公司; RT Master Mix for qPCR (批号 99152)、SYBR Green qPCR Master Mix (批号 115209) 购自 MCE 公司; 全蛋白提取试剂盒 (批号 20211210) 购自北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒增强型 (批号 P0010)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (批号 P0012)、一抗稀释液 (批号 P0023) 均购自碧云天生物技术有限公司; β -actin 抗体 (批号

ab169795)、JAK1 抗体 (批号 ab126315)、p-JAK1 抗体 (批号 ab126413)、STAT3 抗体 (批号 ab163709)、p-STAT3 抗体 (批号 ab163518) 均购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体 (批号 BST17C18B17D54)、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (批号 BST17C08A17C50) 购自博士德生物工程有限公司; 发光液 (批号 2104602) 购自美国 Millipore 公司; Western blotting Marker (批号 01081673) 购自 PageRuler 公司; CCl₄ (分析纯)、无水乙醇 (分析纯)、二甲苯、中性树胶等均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器

CLW-1020 型纯水机 (重庆乾味仪器有限公司); Allegra X-12 型离心机 (美国贝克曼库尔特有限公司); Mias-2000 型病理图象处理系统 (四川大学图象处理国家研究所); AU480 型全自动生化分析仪 (美国贝克曼库尔特有限公司); 756PC 型紫外可见分光光度计 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); ST360 型酶标仪 (上海科华实验系统有限公司); Mastercycler[®] nexus 型实时荧光定量 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂公司); ChemiDoc XRS+ 型全自动化学发光凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

参照文献方法^[11-14], 取 65 只雄性昆明种小鼠, 背部 sc 现用现配的 40% CCl₄ 橄榄油溶液 (10 mL/kg), 2 次/周, 连续 6 周, 制备 HF 小鼠模型, 另取 15 只小鼠作为对照组。分别取 5 只模型小鼠和 5 只对照小鼠, 检测血清中肝损伤指标 (AST、ALT) 活性, 并进行肝脏病理学观察, 确定模型复制成功。造模过程中动物死亡 20 只, 将剩余 40 只 HF 小鼠随机分为模型组、秋水仙碱 (2 mg/kg) 组和高车前素高、低剂量 (30、10 mg/kg) 组, 每组 10 只。各给药组 ip 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ip 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 4 周。末次给药后, 小鼠禁食不禁水 24 h, 称定体质量, 摘眼球取血, 取肝脏组织, 用 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 称定肝湿质量, 计算肝脏指数^[15-16]。

肝脏指数 = 肝湿质量/体质量

2.2 各组小鼠血清中肝功能相关指标测定

各组小鼠摘眼球取血后, 离心分离血清, 采用全自动生化分析仪测定血清中 ALT、AST 活性及

TBIL水平。

2.3 各组小鼠血清中 HF 相关指标测定

取各组小鼠血清,按 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 HA、LN、PIIINP 和 Col-IV 水平。

2.4 各组小鼠肝组织中 SOD 活性及 MDA、GSH 水平测定

取各组小鼠肝脏,用预冷的生理盐水洗去浮血,用生理盐水研磨成 10%的肝组织匀浆,4 ℃、3500 r/min 离心 15 min,取上清,按试剂盒说明书测定 SOD 活性及 MDA、GSH 水平。

2.5 各组小鼠血清和肝组织中 Hyp 水平测定

按试剂盒说明书测定各组小鼠血清和肝组织中 Hyp 水平。

2.6 各组小鼠肝组织中炎症因子水平测定

按 ELISA 试剂盒说明书测定各组小鼠肝组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。

2.7 各组小鼠肝组织病理观察

取各组小鼠肝大叶相同部位的小块肝组织,于 10%甲醛溶液中固定 24 h,梯度乙醇脱水,石蜡常规包埋后切片(4~5 μ m 厚),进行苏木素-伊红(HE)染色,自然晾干后中性树胶封片,于光学显微镜下观察肝组织病理改变。

2.8 各组小鼠肝组织中 uPA 和 PAI-1 mRNA 表达

取各组小鼠肝组织,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析^[17-18]。引物序列为 uPA 上游引物 5'-AAAACAGTAATCCC-TACGAA-3',下游引物 5'-TTTAATGAGGAGTACT-GGAC-3'; PAI-1 上游引物 5'-TGTCCCTTCTACA-GGG-3',下游引物 5'-GGGTACAGCACTTGGA-CG-3'; β -actin 上游引物 5'-TTGTGAGACCCAATC-CG-3',下游引物 5'-AGATTTCTGAGCCGCAAG-3'。

2.9 各组小鼠肝组织中 JAK1/STAT3 信号通路相关蛋白表达

取各组小鼠肝组织,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液,于冰上充分裂解,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,采用 BCA 蛋白定量试

剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,TBST 洗涤 5 min,加入含 5%脱脂奶粉的封闭液,室温封闭 1 h;分别加入 p-JAK1、JAK1、p-STAT3、STAT3 和 β -actin 抗体(1:1000),4 ℃孵育过夜;TBST 洗涤 10 min,洗涤 3 次,加入二抗(1:10 000),室温封闭 2 h;TBST 洗涤 10 min,洗涤 3 次,加入 ECL 发光试剂显影,采用 Image J 软件分析条带灰度值^[8-10]。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 22.0 进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,选用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行显著性分析;计数资料采用非参数检验(Kruskal-Wallis 检验)进行显著性分析。

3 结果

3.1 高车前素对 HF 小鼠体质量和肝脏指数的影响

如表 1 所示,与对照组比较,模型组小鼠体质量明显下降($P < 0.01$),肝脏指数显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠体质量均显著升高($P < 0.05、0.01$),肝脏指数明显降低($P < 0.05、0.01$)。

3.2 高车前素对 HF 小鼠血清中肝功能指标的影响

如表 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清

表 1 高车前素对 HF 小鼠体质量和肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of hispidulin on body weight and liver index in HF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g	肝脏指数/%
对照	—	38.8 ± 5.9	4.81 ± 0.92
模型	—	27.5 ± 6.4 ^{##}	6.44 ± 0.94 ^{##}
秋水仙碱	2	34.7 ± 5.2 ^{**}	5.11 ± 0.88 ^{**}
高车前素	30	35.6 ± 4.8 ^{**}	5.25 ± 0.79 ^{**}
	10	34.3 ± 6.2 [*]	5.60 ± 0.84 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

表 2 高车前素对 HF 小鼠血清中肝功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of hispidulin on liver function indicators in serum of HF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TBIL/(μ mol·L ⁻¹)
对照	—	60.52 ± 15.18	123.65 ± 31.10	302.7 ± 82.8
模型	—	278.64 ± 50.36 ^{##}	347.43 ± 67.34 ^{##}	532.9 ± 91.1 ^{##}
秋水仙碱	2	207.30 ± 42.44 ^{**}	273.21 ± 56.29 ^{**}	387.0 ± 80.8 ^{**}
高车前素	30	209.67 ± 56.37 ^{**}	265.67 ± 45.79 ^{**}	396.9 ± 82.3 ^{**}
	10	225.54 ± 58.32 [*]	287.08 ± 52.23 ^{**}	430.8 ± 90.3 ^{**}

中 ALT、AST 活性和 TBIL 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠血清中 ALT、AST 活性和 TBIL 水平均显著降低 ($P < 0.05、0.01$), 提示高车前素对 HF 小鼠肝损伤有一定保护作用。

3.3 高车前素对 HF 小鼠血清中 HF 相关指标的影响

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 LN、HA、PIIINP 和 Col-IV 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠血清中 LN、HA、PIIINP 和 Col-IV 水平均显著降低 ($P < 0.05、0.01$)。

3.4 高车前素对 HF 小鼠肝组织中抗氧化相关指标的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组

织中 MDA 水平明显升高 ($P < 0.01$), SOD 活性和 GSH 水平明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织中 MDA 水平明显降低 ($P < 0.01$), SOD 活性明显升高 ($P < 0.05、0.01$), GSH 水平呈升高趋势。

3.5 高车前素对 HF 小鼠血清和肝组织中 Hyp 水平的影响

如表 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清和肝组织中 Hyp 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠血清和肝组织中 Hyp 水平均显著降低 ($P < 0.05、0.01$)。

3.6 高车前素对 HF 小鼠血清中炎症因子水平的影响

如表 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与

表 3 高车前素对 HF 小鼠血清中 HF 相关指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of hispidulin on HF related indicators in serum of HF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LN/(ng·mL ⁻¹)	HA/(ng·mL ⁻¹)	PIIINP/(ng·mL ⁻¹)	Col-IV/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	98.34 ± 24.08	47.32 ± 12.57	17.35 ± 7.56	26.09 ± 8.35
模型	—	319.67 ± 70.24 ^{##}	135.39 ± 36.86 ^{##}	53.83 ± 12.75 ^{##}	72.04 ± 20.64 ^{##}
秋水仙碱	2	221.98 ± 65.31 ^{**}	77.91 ± 29.17 ^{**}	38.32 ± 10.16 ^{**}	45.16 ± 19.36 ^{**}
高车前素	30	210.14 ± 69.55 ^{**}	83.41 ± 36.65 ^{**}	36.51 ± 13.60 ^{**}	49.58 ± 18.47 [*]
	10	237.36 ± 60.16 ^{**}	80.27 ± 30.10 ^{**}	40.63 ± 14.29 [*]	52.28 ± 16.86 [*]

表 4 高车前素对 HF 小鼠肝组织中抗氧化相关指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of hispidulin on antioxidant related indicators in liver tissue of HF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH/(U·mL ⁻¹)
对照	—	4.38 ± 0.36	103.31 ± 35.34	80.21 ± 10.37
模型	—	6.23 ± 0.57 ^{##}	68.76 ± 21.09 ^{##}	59.34 ± 21.69 ^{##}
秋水仙碱	2	5.10 ± 0.49 ^{**}	97.34 ± 24.57 ^{**}	72.39 ± 23.58
高车前素	30	5.24 ± 0.54 ^{**}	90.45 ± 27.31 [*]	74.61 ± 30.12
	10	5.40 ± 0.63 ^{**}	96.37 ± 26.60 ^{**}	69.43 ± 22.86

表 5 高车前素对 HF 小鼠血清和肝组织中 Hyp 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of hispidulin on Hyp levels in serum and liver tissue of HF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血清 Hyp/ (μg·mL ⁻¹)	肝组织 Hyp/ (μg·mg ⁻¹)
对照	—	61.37 ± 3.48	135.59 ± 44.17
模型	—	72.64 ± 5.41 ^{##}	237.32 ± 53.64 ^{##}
秋水仙碱	2	66.59 ± 3.26 ^{**}	171.65 ± 50.35 ^{**}
高车前素	30	65.23 ± 2.34 ^{**}	174.54 ± 46.31 ^{**}
	10	66.27 ± 4.03 [*]	182.63 ± 57.83 [*]

表 6 高车前素对 HF 小鼠血清中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of hispidulin on inflammatory factors levels in serum of HF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	181.32 ± 35.78	307.92 ± 81.06	137.53 ± 25.65
模型	—	318.87 ± 76.70 ^{##}	575.65 ± 90.32 ^{##}	271.32 ± 53.16 ^{##}
秋水仙碱	2	248.54 ± 63.09 ^{**}	402.56 ± 101.36 ^{**}	183.17 ± 40.58 ^{**}
高车前素	30	236.42 ± 59.50 ^{**}	431.87 ± 84.54 ^{**}	188.80 ± 51.65 ^{**}
	10	249.51 ± 70.72 [*]	470.34 ± 93.09 ^{**}	201.30 ± 46.24 ^{**}

模型组比较, 各给药组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05、0.01$), 提示高车前素可通过抑制促炎细胞因子的表达, 从而发挥抗 HF 的作用。

3.7 高车前素对 HF 小鼠肝组织中 uPA 和 PAI-1 mRNA 表达的影响

如表 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 uPA mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), PAI-1 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 高车前素高、低剂量组小鼠肝组织中 uPA

表7 高车前素对 HF 小鼠肝组织中 *uPA* 和 *PAI-1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effect of hispidulin on *uPA* and *PAI-1* mRNA expressions in liver tissue of HF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量	
		<i>uPA</i>	<i>PAI-1</i>
对照	—	1.000 ± 0.051	1.000 ± 0.093
模型	—	0.437 ± 0.042 ^{###}	1.528 ± 0.103 ^{###}
秋水仙碱	2	0.525 ± 0.063	1.427 ± 0.219
高车前素	30	0.863 ± 0.048 ^{**}	1.248 ± 0.157 ^{**}
	10	0.717 ± 0.053 ^{**}	1.280 ± 0.204 ^{**}

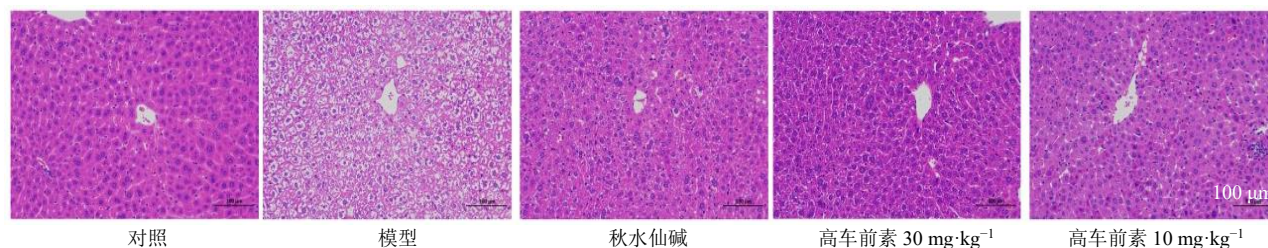


图1 高车前素对 HF 小鼠肝组织病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of hispidulin on histopathological changes in liver tissue of HF mice (HE, × 200)

各给药组肝细胞排列趋于正常, 细胞水肿、空泡样改变、炎细胞浸润明显减轻, 提示高车前素对 CCl₄ 致 HF 小鼠肝组织损伤具有明显的保护作用。

3.9 高车前素对 HF 小鼠肝组织中 JAK1/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 p-JAK1 和 p-STAT3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 高车前素低剂量组小

mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), *PAI-1* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 秋水仙碱组小鼠肝组织中 *uPA* 和 *PAI-1* mRNA 表达均无显著差异。

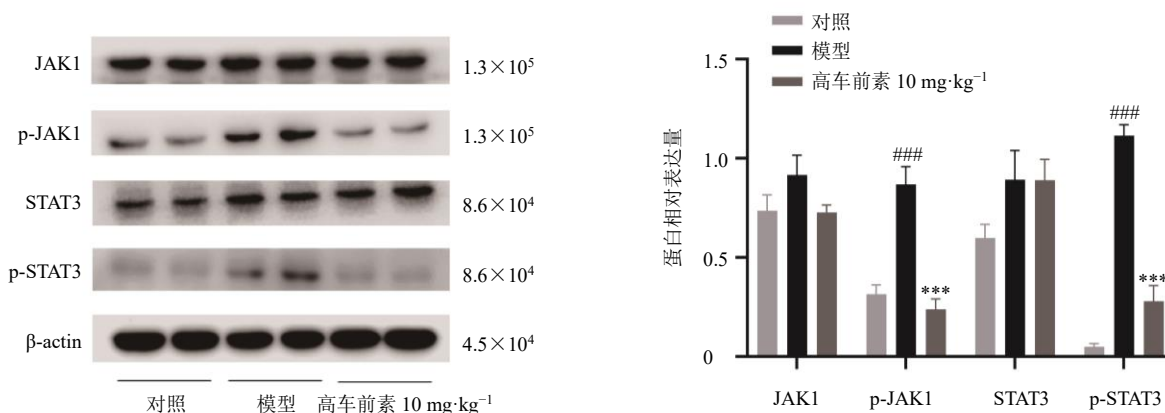
3.8 高车前素对 HF 小鼠肝组织病理变化的影响

如图 1 所示, 对照组小鼠肝细胞排列整齐, 肝索呈放射状, 肝小叶和汇管区形态结构完整、轮廓清晰, 无炎细胞浸润及纤维组织增生; 模型组小鼠肝小叶和肝细胞结构紊乱、不规则, 出现明显水肿, 肝细胞体积变大, 呈空泡样变性, 可见肝细胞坏死、炎细胞浸润和明显纤维间隔形成; 与模型组比较,

鼠肝组织中 p-JAK1 和 p-STAT3 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.001$), 提示高车前素抗 HF 的作用机制可能与下调 JAK1/STAT3 信号通路有关。

4 讨论

近年来, HF 的发病率越来越高, 已成为目前备受关注的社会健康问题, 亟待利用我国中医药资源的优势, 加强中药抗 HF 机制研究。CCl₄ 可通过直接破坏肝细胞膜, 造成肝细胞损伤坏死, 长期给



与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{***} $P < 0.001$
^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{***} $P < 0.001$ vs model group

图2 高车前素对 HF 小鼠肝组织中 JAK1/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of hispidulin on JAK1/STAT3 signaling pathway related proteins expressions in liver tissue of HF mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

药可导致 HF、肝硬化和肝癌,其病理组织学变化与人类 HF 相似,现已被广泛用于抗 HF 药物的研究。

本研究采用 sc CCl₄ 建立 HF 小鼠模型,结果显示,模型组小鼠肝脏指数、血清 ALT、AST 活性及 TBIL 水平以及血清和肝组织中 Hyp 水平均显著升高,肝组织 MDA 水平显著升高,肝组织 SOD 活性和 GSH 水平明显降低,同时血清中促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著升高,这些细胞因子的不断刺激又可进一步加重肝损伤,形成恶性循环,导致 HF 的发生发展。高车前素能够显著降低血清中 ALT、AST 活性和 TBIL 水平,下调血清和肝组织中 Hyp 水平,降低血清中 MDA 水平并升高 SOD 活性,且对 GSH 水平有上调趋势;此外,高车前素能够降低肝脏指数和血清中促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,使肝细胞排列趋于正常,细胞水肿、空泡样改变、炎细胞浸润明显减轻。提示高车前素可有效减轻 CCl₄ 诱导 HF 模型小鼠的肝损伤和炎症程度,具有明显的保肝作用。

PAI-1 作为一种单链糖蛋白,由 379 个氨基酸残基组成,属于丝氨酸蛋白酶家族,通过与纤溶酶原激活物丝氨酸活性中心结合,使其活化作用丧失。PAI-1 是专一抑制纤溶酶原激活的抑制剂,在生理条件下,PAI-1 通过形成复合物来抑制 uPA 和组织型纤溶酶原激活物 (tissue plasminogen activator, tPA),从而阻止纤溶酶的形成。PAI-1 在肝脏中主要由巨噬细胞、肝窦细胞和 HSC 表达。在正常肝脏中 PAI-1 含量很低,肝部分切除后再生细胞中的 PAI-1 含量升高。研究发现,PAI-1 与 HF 的发生关系密切,随着纤维化的加重,PAI-1 含量增加,抑制 PAI-1 表达可以有效抑制 HSC 活性。PAI-1 可阻止 uPA 激活纤溶酶原,降低基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 活性,导致 ECM 在肝细胞内过多沉积,PAI-1 还可以诱导细胞分化为活化的成纤维细胞^[19]。在 PAI-1 过表达小鼠中纤维蛋白沉积和器官纤维化增加^[20],而 PAI-1 缺陷小鼠中 HF 减弱^[21]。CCl₄ 诱导的 HF 小鼠模型中,PAI-1 在 HF 进程中持续上调,可能参与 Col-I、Col-III 的表达调控,在 HF 的发生中起重要作用,从而证实了 PAI-1 可促进 HF 时基质蛋白的合成^[22]。临床实践表明,HA、LN、PIIINP 和 Col-IV 4 项指标是临床判断 HF 的重要血清学指标,其水平与肝组织炎症活动及纤维化均呈正相关^[23]。本研究发现,模型组小鼠血清中 HA、LN、PIIINP 和 Col-IV 水平显著升高,同时

小鼠肝组织中 uPA mRNA 表达水平显著降低,而 PAI-1 mRNA 表达水平显著升高,说明 CCl₄ 引起了小鼠肝组织的损伤及纤维化;给予高车前素干预后,小鼠血清中 HA、LN、PIIINP 和 Col-IV 水平均显著下降,肝组织中 uPA mRNA 表达水平显著上调,PAI-1 mRNA 表达水平显著下调,表明高车前素具有抗 HF 作用,其作用机制可能与激活 uPA 纤溶酶系统有关。

JAK/STAT 信号通路是一条由细胞转导刺激的信号通路,参与细胞的生长、分化以及免疫调控等生物学过程,主要由酪氨酸激酶相关受体、酪氨酸激酶 JAK 和转录因子 STAT 组成。血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、IL-4、IL-6、瘦素、生长激素和 γ 干扰素等细胞因子均能激活这一通路,其中最主要刺激因子为 PDGF,当 PDGF 与受体结合后,会磷酸化 JAK1,继而磷酸化 STAT3,之后与受体分离进入核内,激活靶基因转录和表达,直接促进 HSCs 生长和分裂,提示 JAK1/STAT3 信号通路在 HF 的形成过程中发挥了重要的调控作用,抑制 JAK1/STAT3 信号通路的转导和激活可延缓 HF 的进展。本研究结果显示,高车前素低剂量组小鼠肝组织中 p-JAK1 和 p-STAT3 蛋白表达水平均显著降低,表明高车前素抗 HF 的作用机制可能调节 JAK1/STAT3 信号通路相关因子有关。

综上所述,高车前素可有效减轻 CCl₄ 诱导 HF 小鼠的肝损伤和炎症程度,其抗 HF 的作用机制可能与激活 uPA 纤溶酶系统和干预 JAK1/STAT3 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Krenkel O, Puengel T, Govaere O, *et al.* Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis [J]. *Hepatology*, 2018, 67(4): 1270-1283.
- [2] 周翔,顾达,童聪,等. 鳖甲煎丸对 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化的治疗作用机制研究 [J]. *陕西中医*, 2022, 43(2): 151-156.
- [3] 胡迎庆,宫飙,屠鹏飞. 龙血树属植物化学成分及生物活性研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2000, 15(1): 5-8.
- [4] Xin N, Li Y J, Li Y, *et al.* Dragon's blood extract has antithrombotic properties, affecting platelet aggregation functions and anticoagulation activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(2): 510-514.
- [5] Xu C, Liu X, Shen J, *et al.* Integrative identification of

- human serpin PAI-1 inhibitors from *Dracaena* dragon blood and molecular implications for inhibitor-induced PAI-1 allostereism [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(1): 221-229.
- [6] 陈春林, 王健, 戈悦欣, 等. 高车前素药理作用研究进展 [J]. 宜春学院学报, 2019, 41(12): 17-20.
- [7] 张涛. 高车前素对肝癌细胞增殖的抑制作用及作用机制研究 [J]. 中国药物与临床, 2014, 14(10): 1349-1351.
- [8] 李晨, 李晓媚, 刘亭, 等. 高盐饮食激活肠 JAK1/STAT3 通路诱导肠上皮屏障功能障碍 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37(1): 35-40.
- [9] Li H G, You P T, Xia Y, *et al.* Yu Gan Long ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting PI3K/AKT, Ras/ERK and JAK1/STAT3 signaling pathways in CCl₄-induced liver fibrosis rats [J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(3): 539-547.
- [10] 吴斌, 王蓉, 李胜男, 等. 秦皮素通过调节 JAK1/STAT3 信号通路抑制肝纤维化 [J]. 中南药学, 2019, 17(3): 420-425.
- [11] 王娟, 杨晶晶, 周仁鹏, 等. 肝纤维化小鼠模型研究现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 105-110.
- [12] 孙家昌, 孙妩弋, 厉歆然, 等. 不同浓度四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型比较 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(4): 255-260.
- [13] 王肖辉, 周霖, 杜秋争, 等. 五味子甲素对四氯化碳诱导小鼠肝纤维化的保护作用及其机制研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(22): 2725-2730.
- [14] 鲁智文, 潘晓莉, 宋宇虎. 3 种小鼠肝纤维化模型的建立及评价 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2018, 27(4): 390-392.
- [15] 李茜, 吴惠春, 谭家鑫, 等. 柔肝方通过抑制纤维化蛋白抗肝纤维化的机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(3): 263-269.
- [16] 张春雷, 吴新玉, 王栋, 等. 大王马先蒿对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的保护作用 [J]. 医药导报, 2022, 41(4): 423-429.
- [17] 焦黎. 纤溶酶原激活物抑制因子-1 对肝星状细胞活化及其细胞外基质的影响 [D]. 太原: 山西医科大学, 2011.
- [18] 王桐生, 李莉, 吴德玲, 等. 桃红四物汤对肝纤维化模型大鼠肝脏组织 *uPA/PAI-1* mRNA 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 5-9.
- [19] Adnot S, Breaux M, Houssaini A. PAI-1: A new target for controlling lung-cell senescence and fibrosis? [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62(3): 271-272.
- [20] Coudriet G M, Stoops J, Orr A V, *et al.* A noncanonical role for plasminogen activator inhibitor type 1 in obesity-induced diabetes [J]. *Am J Pathol*, 2019, 189(7): 1413-1422.
- [21] Pant A, Kopec A K, Baker K S, *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 reduces tissue-type plasminogen activator-dependent fibrinolysis and intrahepatic hemorrhage in experimental acetaminophen overdose [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(5): 1204-1212.
- [22] 朱颖炜, 曾欣, 谢渭芬, 等. 纤溶酶原激活物抑制剂-1 在大鼠肝纤维化组织中的表达及其与 I、III 型胶原的相关性分析 [J]. 肝脏, 2006, 11(1): 18-20.
- [23] 郭羽轩, 董惠娟, 刘涛, 等. 睡莲花总黄酮对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用 [J]. 中草药, 2020, 51(19): 4983-4990.

[责任编辑 李亚楠]