

• 药理与临床 •

黄芪甲苷经 CXCL12/CXCR4 信号轴及 TXNIP/NLRP3 炎性体路径抗肝纤维化的机制研究

苏悦, 宋虹霏, 王鑫, 刘进, 肖萍, 许欣怡, 彭杨芷*

成都中医药大学, 四川 成都 610075

摘要:目的 研究黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)抗肝纤维化的疗效及分子机制。方法 采用 sc 40%四氯化碳花生油联合 10%乙醇饲喂的方式构建大鼠肝纤维化模型, 判断造模成功后, 随机分为空白组、模型组和 AS-IV 低、高剂量(20、40 mg/kg)组, 各给药组 ig 相应药物, 空白组和模型组 ig 等体积生理盐水, 给药 6 周后采用苏木素-伊红(HE)染色、Masson 染色观察肝组织病理学变化; 通过检测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)活性及肝纤维化标志物水平以评价 AS-IV 抗肝纤维化的疗效; 采用免疫组化、Western blotting、qRT-PCR 检测肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)及 I 型胶原(Collagen I)的表达; 采用 Western blotting 及 qRT-PCR 检测影响 HSCs 活化的 CXC 基序趋化因子配体 12(C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12)/CXC 基序趋化因子受体 4(C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4)信号轴及硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎性体路径上关键因子的表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠血清中 ALT、AST 活性及透明质酸(hyaluronic acid, HA)水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01), 肝组织炎症及胶原纤维沉积增加; 与模型组比较, AS-IV 显著降低血清中 ALT、AST 活性及 HA 水平($P < 0.05$ 、 0.01), 减轻肝组织炎症及纤维化。此外, 与空白组比较, 模型组肝组织 α -SMA 和 Collagen I 表达显著升高($P < 0.01$), CXCL12/CXCR4 信号轴显著上调($P < 0.05$ 、 0.01), TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 高表达($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, AS-IV 显著抑制肝组织 α -SMA、Collagen I 表达($P < 0.05$ 、 0.01), 抑制 CXCL12/CXCR4 信号轴($P < 0.01$), 下调 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 表达($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 AS-IV 可显著改善四氯化碳联合乙醇诱导的大鼠肝损伤, 减轻肝纤维化, 并可抑制 HSCs 活化, 其调控机制可能与抑制 CXCL12/CXCR4 信号轴和 TXNIP/NLRP3 炎性体路径有关。

关键词: 肝纤维化; 黄芪甲苷; CXCL12/CXCR4 信号轴; TXNIP/NLRP3 炎性体路径; 肝星状细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)08-2453-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.012

Astragaloside IV inhibits liver fibrosis by acting on CXCL12/CXCR4 signal axis and TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway

SU Yue, SONG Hong-fei, WANG Xin, LIU Jin, XIAO Ping, XU Xin-yi, PENG Yang-zhi

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China

Abstract: Objective To study the therapeutic effect and molecular mechanism of astragaloside IV (AS-IV) on liver fibrosis. **Methods** A rat model of liver fibrosis was established by sc 40% carbon tetrachloride peanut oil and feeding 10% ethanol. After judging the success of the model, rats were randomly divided into blank group, model group, AS-IV low- and high-dose (20 and 40 mg/kg) groups. The corresponding drugs were given to each group, blank group and model group were given equal volumes of normal saline. After six weeks of administration, hematoxylin eosin (HE) staining and Masson staining were used to observe the pathological changes of

收稿日期: 2022-12-23

基金项目: 四川省科技重点研发项目(2022YFS0409); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(BSH2020014)

作者简介: 苏悦(1990—), 女, 博士, 讲师, 主要从事中医肝病的防治研究。Tel: 13980711649 E-mail: suyue@cdutcm.edu.cn

*通信作者: 彭杨芷, 男, 博士, 讲师, 主要从事中医经典理论的现代研究。E-mail: pengyangzhi@cdutcm.edu.cn

liver tissue; To evaluate the therapeutic effect of AS-IV on liver fibrosis, the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum and levels of liver fibrosis markers were measured; Immunohistochemistry, Western blotting, and qRT-PCR were used to detect expressions of activation markers of hepatic stellate cells (HSCs) such as α -smooth muscle actin (α -SMA and Collagen I; Western blotting and qRT-PCR were used to detect key factors expressions in CXC motif chemokine ligand 12 (CXCL12)/CXC motif chemokine receptor 4 (CXCR4) signal axis and thioredoxin interacting protein (TXNIP)/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) inflammatory pathway that affect the activation of HSCs. **Results** Compared with blank group, the activities of ALT, AST and level of hyaluronic acid (HA) in serum of rats in model group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), liver histopathological inflammation and collagen fiber deposition were increased; Compared with model group, AS-IV significantly decreased activities of ALT, AST and level of HA level in serum ($P < 0.05, 0.01$), reduced liver inflammation and fibrosis. In addition, compared with blank group, expressions of α -SMA and Collagen I in liver tissue of model group was significantly increased ($P < 0.01$), CXCL12/CXCR4 signal axis were significantly upregulated ($P < 0.05, 0.01$), TXNIP, NLRP3, ASC, IL-1 β were high expression ($P < 0.05, 0.01$); Compared with model group, AS-IV significantly inhibited expressions of α -SMA and Collagen I ($P < 0.05, 0.01$), inhibited CXCL12/CXCR4 signal axis ($P < 0.01$), downregulated TXNIP, NLRP3, ASC and IL-1 β expressions ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** AS-IV could significantly improve carbon tetrachloride combined with ethanol induced liver injury in rats, alleviate liver fibrosis, and inhibit the activation of HSCs. The regulatory mechanism may be related to the inhibition of CXCL12/CXCR4 signal axis and TXNIP/NLRP3 inflammatory pathway.

Key words: liver fibrosis; astragaloside IV; CXCL12/CXCR4 signal axis; TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway; hepatic stellate cells

肝纤维化是慢性肝病肝实质损伤后过度修复的过程,以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度沉积为主要特征,进一步发展为肝硬化甚至肝癌^[1],是威胁人类健康的重要公共卫生问题。目前西医尚无针对肝纤维化的特效药物,近年来研究发现中医药可控制甚至逆转肝纤维化^[2],值得深入发掘。中医认为,肝纤维化属络病范畴,其病以邪毒瘀血痰浊等为标,正气亏虚为本,正虚络阻是其基本病机,因此治疗应以扶正通络法,其中尤以“扶正”为治疗的关键。在肝纤维化的治疗中,黄芪是益气健脾扶正的常用药物^[3]。黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。《中国药典》载其“味甘,微温,归肺、脾经,生黄芪补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓和敛疮生肌的功效,蜜炙黄芪益气补中”。黄芪常用于肝纤维化的治疗,本课题组前期依据首届全国名中医张之文教授的临床经验,由温病专家冯全生教授创芪甲柔肝方,该方以黄芪为君药,临床治疗肝纤维化疗效显著^[4]。研究发现黄芪抗肝纤维化的作用可能与调节免疫有关^[5]。

黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)是黄芪的主要成分之一,其分子式为 $C_{41}H_{68}O_{14}$,是黄芪质量鉴定中重要的评价指标^[6-7]。现代研究发现,AS-IV在肾间质纤维化^[8]、肺纤维化^[9]、心肌纤维化^[10]等多种纤维化疾病中发挥重要作用。近年来发现 AS-IV

具有抗肝纤维化的作用^[11-12],可抑制肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化及胶原产生^[13-14],但机制仍有待进一步揭示。因此,本研究拟开展动物实验,从 CXC 基序趋化因子配体 12(C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12)/CXC 基序趋化因子受体 4(C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4)信号轴、硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎性体路径的角度揭示 AS-IV 抗肝纤维化的分子机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 48 只,6 周龄,体质量(190 ± 10)g,购自成都达硕实验动物有限公司,合格证号 SCXK(川)2015-030。动物于室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50%的环境下,适应性喂养 1 周。动物实验经成都中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(批准号 2022-32)。

1.2 药品与试剂

AS-IV(批号 AIV-98-200203,质量分数为 99.54%)购自成都锦泰和医药化学技术有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)测定试剂盒购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,货号为 105-000442-00 和 105-000443-00;血清 III 型前胶原氨基端原肽(III procollagen amino-

terminal peptide, PIIINP)、IV 型前胶原 (procollagen type IV, PCIV)、透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 和层黏蛋白 (laminin, LN) 试剂盒购自北京北方生物技术研究所有限公司, 货号分别为 S20093002、S20090004、S20083010 和 S20080004; β -actin 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 一抗购自美国 CST 公司 (货号为 3700S 和 19245); I 型胶原 (Collagen I)、CXCR4、CXCL12、NLRP3、TXNIP、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteine-aspartate protease-1, Caspase-1)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 一抗购自英国 Abcam 公司, 批号为 GR3297275-2、GR3231217-1、GR3323838-1、GR3197814-8、GR3232708-8、GR309542-28; 凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) 一抗 (批号 sc-514414) 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京中杉, 货号为 ZB-2301 和 ZB-2305; RNeasy Pure Tissue Kit (DP431) 试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、TB Green[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司, 货号为 RR047B 和 RR820A; BCA 蛋白检测试剂盒 (批号 23325) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 仪器

RM2016 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司); DS-U3 型成像系统 (日本 Nikon 公司); JJ-12J 型冷冻离心机、JB-P5 型 PCR 仪、Quant studio 7flex qRT-PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); VersaDoc 3000 型凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); BS-240VET 型全自动生化仪 (Mindray 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机将其中 10 只大鼠设为空白组, 采用 sc 40%四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 花生油联合 10%乙醇饲喂的方式对剩余的 38 只大鼠构建肝纤维化模型, 持续 8 周, 分别于第 4、6、8 周末处死 2 只小鼠进行肝组织苏木素-伊红 (HE)、Masson 染色以判断造模效果。造模成功后将所有肝纤维化大鼠随机分为模型组 ($n=8$)、AS-IV 高剂量组 (40 mg/kg, $n=10$) 和 AS-IV 低剂量组 (20 mg/kg, $n=10$)^[15-16]。AS-IV 溶

于 0.5%羧甲基纤维素钠溶液, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 空白组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续 6 周。

2.2 取材

治疗 6 周后, 所有大鼠禁食禁水 1 d 后取材。大鼠 ip 3%戊巴比妥钠 (1.5 mL/kg) 麻醉后, 心脏采血 7 mL, 分离血清, 用于检测肝功能、血清纤维化标志物等指标。取肝脏, 称定质量并记录, 观察肝脏颜色及质地并拍照, 取数块肝组织液氮速冻, 用于 Western blotting、qRT-PCR 检测; 另取一块肝组织置于 4%多聚甲醛中固定, 用于 HE 及 Masson 染色及免疫组化。

2.3 血清学指标检测

按照试剂盒说明, 用放射性免疫法检测大鼠血清中 PIIINP、PCIV、HA 和 LN 水平, 采用全自动生化仪检测大鼠血清中 ALT、AST 活性。

2.4 肝组织病理学观察

2.4.1 HE 染色 大鼠肝组织经多聚甲醛固定、乙醇梯度脱水、包埋、切片后, 依次用二甲苯I、二甲苯II、无水乙醇I、无水乙醇II、95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、蒸馏水洗, 然后用苏木素染细胞核、伊红染细胞质, 再依次用 95%乙醇I、95%乙醇II、无水乙醇I、无水乙醇II、二甲苯I、二甲苯II脱水、封片, 于显微镜下观察并拍照。肝脏炎症分级参照 Scheuer 评分系统。

2.4.2 Masson 染色 大鼠肝组织经多聚甲醛固定、乙醇梯度脱水、包埋、切片后, 依次将切片放入二甲苯I、二甲苯II、无水乙醇I、无水乙醇II、75%乙醇、自来水洗, 然后依次用重铬酸钾、铁苏木素、丽春红酸性品红、磷钼酸、苯胺蓝染色, 再用 1%冰醋酸分化, 两缸无水乙醇脱水、封片, 于显微镜下观察并拍照。纤维化评分参照 Metavir 评分系统。

2.5 免疫组化检测肝组织 α -SMA 及 Collagen I 蛋白表达

大鼠肝组织经多聚甲醛中固定、乙醇梯度脱水、包埋、切片后, 依次将切片放入二甲苯I、二甲苯II、二甲苯III、无水乙醇I、无水乙醇II、85%乙醇、75%乙醇、蒸馏水洗, 置于柠檬酸抗原修复缓冲液 (pH 6.0) 进行抗原修复。将玻片置于 PBS 中洗涤 3 次, 放入 3%过氧化氢溶液, 室温避光孵育 25 min, PBS 洗涤 3 次。在组化圈内滴加 3%牛血清白蛋白均匀覆盖组织, 室温封闭 30 min。轻甩掉封闭液, 滴加 Collagen I、 α -SMA 一抗 (稀释比例为 1:400、1:

2000), 4 ℃ 孵育过夜。玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 稍甩干后在圈内滴加 HRP 标记的山羊抗兔二抗覆盖组织, 室温孵育 50 min。PBS 中洗涤 3 次。稍甩干后加 DAB 显色液显色, 阳性为棕黄色, 自来水冲洗切片终止显色。然后以苏木素复染 3 min, 自来水洗, 苏木素分化液分化数秒, 自来水冲洗, 苏木素返蓝液返蓝, 流水冲洗。将切片依次放入 75%乙醇、85%乙醇、无水乙醇I、无水乙醇II、二甲苯I中脱水透明, 稍晾干, 中性树胶封片。于显微镜下观察并拍照, 应用 Image-pro plus 6.0 软件进行图像分析。

2.6 qRT-PCR 检测 CXCL12/CXCR4 信号轴及 TXNIP/NLRP3 炎症小体通路相关基因表达

按照试剂盒说明书提取各组大鼠肝组织中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>CXCL12</i>	F: GCATCAGTGACGGTAAGC R: CACATCTTGAGCCTCTTGT
<i>CXCR4</i>	F: GAGGTCATCAAGCAAGGAT R: GAGGAAGGCGTAGAGGAT
<i>β-actin</i>	F: CAACCTTCTTGCAGCTCCTC R: ATACCCACCATCACACCCTG
<i>TXNIP</i>	F: CTACAGGTGAGAACGAGATG R: GGTGCCATTAAGTCAGGAG
<i>NLRP3</i>	F: TTGAAGAGGAGTGGATAGGT R: GGTGTAGCGTCTGTTGAG
<i>ASC</i>	F: AACTTGACAGCGGATGAG R: CTCCAGACTCTTCCATAATCT
<i>GAPDH</i>	F: GGTGAAGGTCGGTGTGAACG R: GGTGAAGGTCGGTGTGAACG
<i>Caspase-1</i>	F: TGGATTGCTGGATGAAGT R: CTGATGGACCTGACTGAAG
<i>α-SMA</i>	F: AGAACACGGCATCATCAC R: GTCCAGCACAATACCAGTT
<i>Collagen I</i>	F: CCGTGACCTCAAGATGTG R: AACCTTCGCTTCCATACTC

2.7 Western blotting 检测 CXCL12/CXCR4 信号轴及 TXNIP/NLRP3 炎症小体通路相关蛋白表达

取各组大鼠肝组织, 加入裂解液匀浆后提取蛋白, 采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度, 100 ℃ 加热使蛋白变性。蛋白样品经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于甲醛中浸泡 2 min 后, 用膜转移液清洗 1 次, 加入 5% 牛血清白蛋白溶液, 37 ℃ 封闭 0.5 h, 分别加入 β-

actin、α-SMA, Collagen I、CXCR4、CXCL12、NLRP3、TXNIP、ASC、Caspase-1、IL-1β 抗体 (1 : 1000), 4 ℃ 孵育过夜, 用 PBST 洗涤 3 次, 加入二抗 (1 : 5000), 孵育 2 h, PBST 清洗 3 次, 加入 ECL 溶液完全覆盖 PVDF 膜, 室温孵育 3 min, 使用凝胶成像仪成像, 以 Quantity One 软件定量分析。

2.8 统计学分析

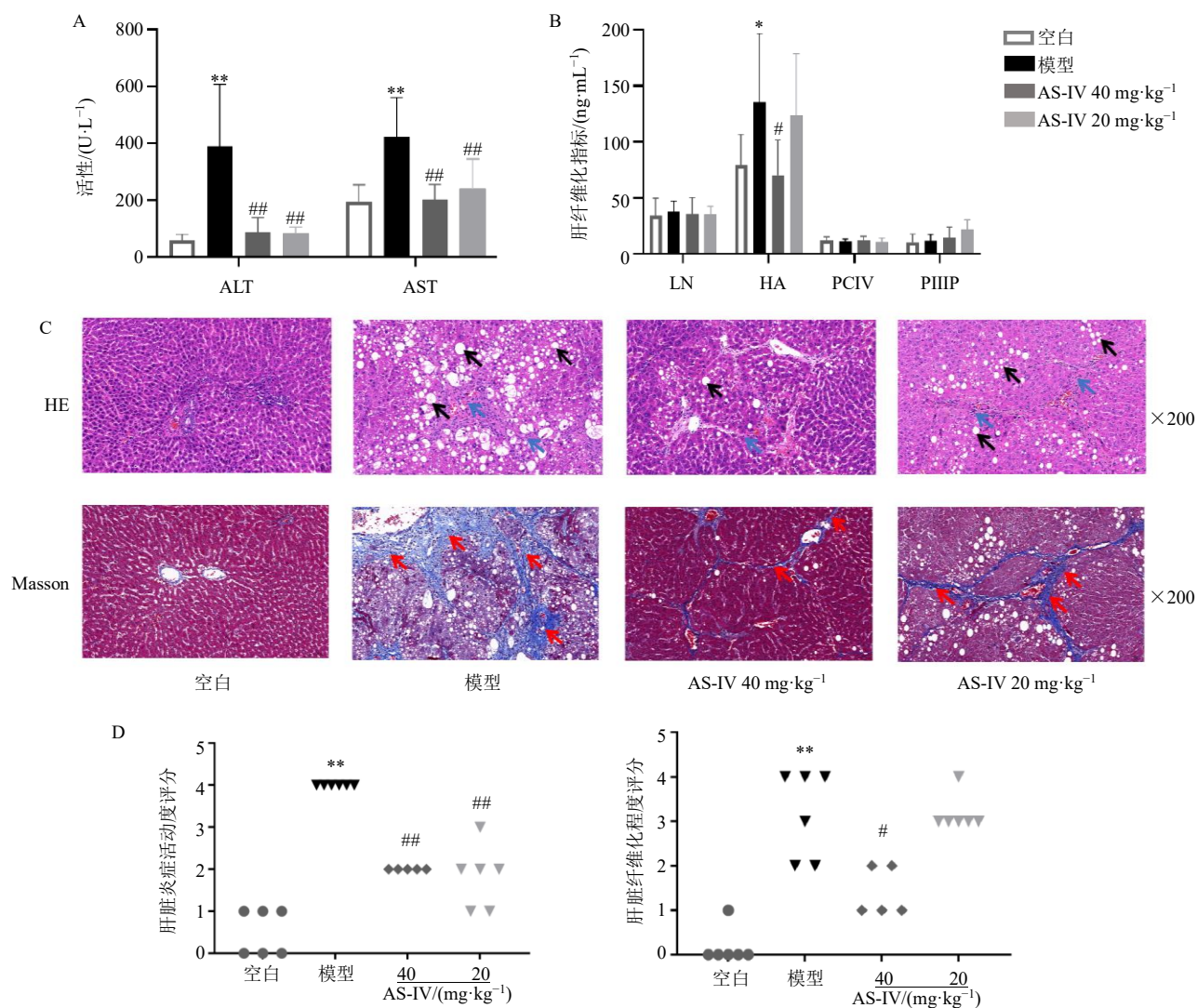
采用 SPSS 20.0 软件进行数据的统计分析, 对于符合正态分布、具有方差齐性的数据采用单因素方差分析; 对于符合正态分布的数据, 不具有方差齐性的数据, 采用独立样本 *T* 检验; 对于不服从正态分布的数据, 则选择非参数检验中 Mann-Whitney *U* 方法进行检验。

3 结果

3.1 AS-IV 减轻肝纤维化大鼠肝脏损伤及纤维化

如图 1-A 所示, 与空白组比较, 模型组大鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 ALT 和 AST 活性均显著降低 ($P < 0.01$)。血清肝纤维化标志物结果见图 1-B, 与空白组比较, 模型组大鼠血清中 HA 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 40 mg/kg AS-IV 可显著降低 HA 水平 ($P < 0.05$), LN、PCIV、PIIIP 在各组间无统计学差异。

如图 1-C 所示, 模型组肝组织 HE 染色可见大量肝细胞坏死, 细胞肿胀, 伴有较多淋巴细胞与中性粒细胞浸润 (蓝色箭头), 多见肝细胞脂肪变性 (黑色箭头), 汇管区胆管增生; Masson 染色显示组织中汇管区门静脉与中央静脉周围均可见大量胶原纤维增生 (红色箭头), 并形成大量纤维横隔, 可见大量假小叶。40 mg/kg AS-IV 组局部见肝细胞脂肪变性 (黑色箭头) 及淋巴细胞浸润 (蓝色箭头); 局部可见胶原纤维增生 (红色箭头) 及纤维横隔。20 mg/kg AS-IV 组 HE 染色多见肝细胞脂肪变性 (黑色箭头)、局部肝小叶中与汇管区周围可见肝细胞坏死溶解; Masson 染色显示组织中汇管区门静脉与中央静脉周围可见较多胶原纤维增生 (红色箭头), 并形成纤维横隔。各组炎症活动度及纤维化程度评分见图 1-D, Mann-Whitney *U* 检验显示, 与空白组比较, 模型组炎症活动度评分、纤维化程度评分均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组炎症活动度评分均显著降低 ($P < 0.01$), 40 mg/kg AS-IV 组纤维化程度评分显著降低 ($P < 0.05$), 20 mg/kg AS-IV 组纤维化程度无统计学差异。



A-各组血清中 ALT 和 AST 活性 B-各组血清肝纤维化标志物水平 C-各组肝组织 HE 和 Masson 染色（黑色箭头表示肝细胞脂肪变性，蓝色箭头表示淋巴细胞浸润，红色箭头表示胶原纤维增生） D-肝脏炎症活动度和纤维化程度评分 与空白组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ，下图同

A-ALT and AST activities in serum of each group B-levels of liver fibrosis markers in serum of each group C-HE and Masson staining of liver tissue in each group (black arrow indicates steatosis of liver cells, blue arrow indicates lymphocyte infiltration, red arrow indicates collagen fiber proliferation) D-score of liver inflammation activity and fibrosis degree * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

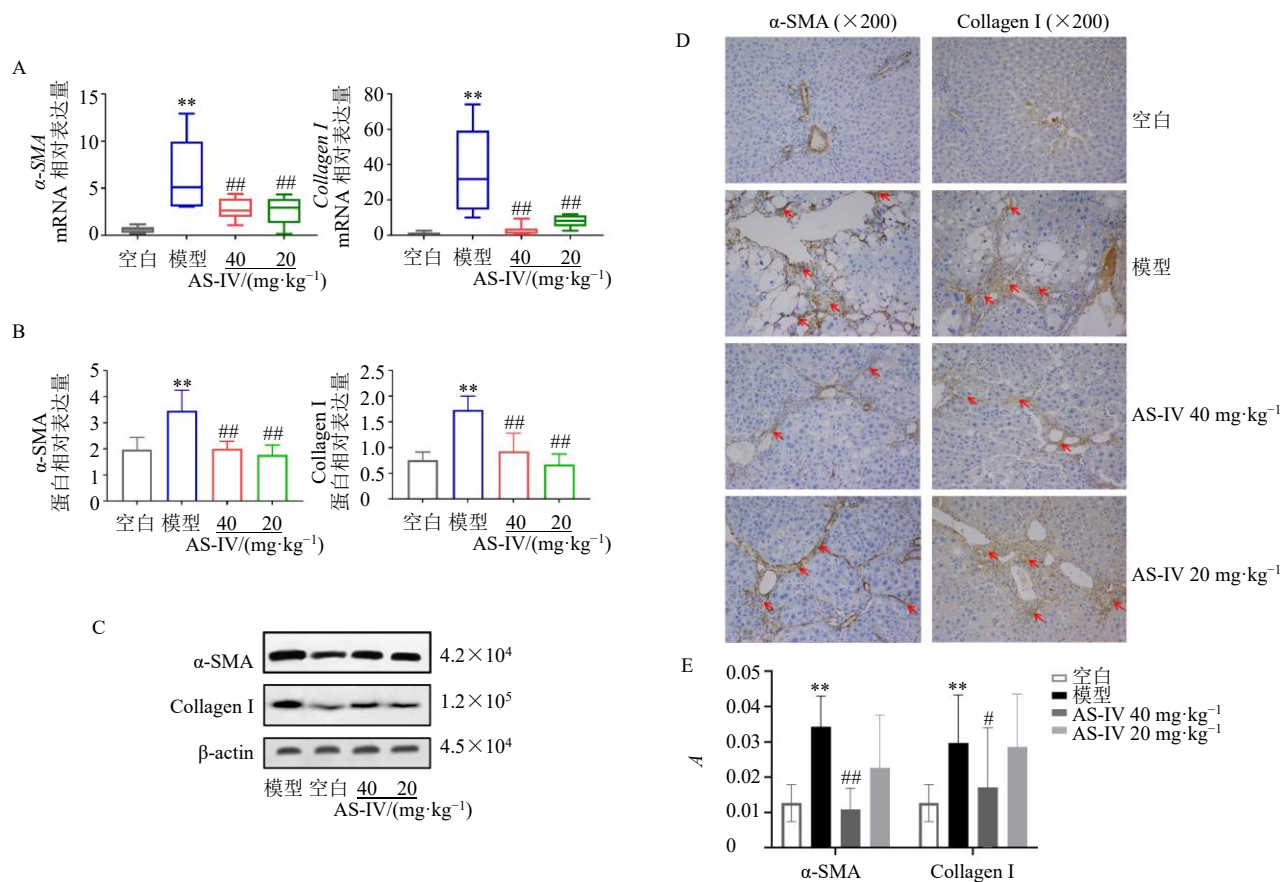
图 1 AS-IV减轻肝纤维化大鼠肝损伤及纤维化

Fig. 1 AS-IV alleviates liver inflammation and fibrosis of rats with liver fibrosis

3.2 AS-IV抑制肝纤维化大鼠 HSCs 活化

为探明 AS-IV对肝纤维化大鼠 HSCs 活化的抑制作用，通过免疫组化、qRT-PCR、Western blotting 法检测 HSCs 活化的重要指标 α -SMA 和 Collagen I 的表达。qRT-PCR（图 2-A）显示，与空白组比较，模型组大鼠肝组织 α -SMA 和 Collagen I mRNA 表达水平均显著升高（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，各给药组 α -SMA 和 Collagen I mRNA 表达水平均显著降低（ $P < 0.01$ ）。Western blotting（图 2-B、C）显示，与

空白组比较，模型组大鼠肝组织 α -SMA 和 Collagen I 蛋白表达水平均显著升高（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，各给药组 α -SMA 和 Collagen I 蛋白表达水平均显著降低（ $P < 0.01$ ）。免疫组化结果见图 2-D、E，棕色的部分为蛋白的阳性表达，与空白组比较，模型组大鼠肝组织 α -SMA 和 Collagen I 蛋白阳性表达均显著增强（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，40 mg/kg AS-IV可显著降低 α -SMA 和 Collagen I 的表达（ $P < 0.05$ 、0.01），其结果与 Western blotting 基本一致。



A-各组肝组织 α -SMA 和 Collagen I mRNA 表达 B、C-Western blotting 检测各组肝组织 α -SMA 和 Collagen I 蛋白表达 D、E-免疫组化检测各组肝组织 α -SMA 和 Collagen I 蛋白表达

A- α -SMA 和 Collagen I mRNA expressions in liver tissue of each group B, C- α -SMA and Collagen I protein expressions in liver tissue of each group detected by Western blotting D, E- α -SMA and Collagen I protein expressions in liver tissue of each group detected by immunohistochemistry

图 2 AS-IV 对肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA 和 Collagen I 的调控作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of AS-IV on regulation of α -SMA and Collagen I in liver of rats with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 AS-IV 下调肝纤维化大鼠肝组织 CXCL12/CXCR4 信号轴蛋白表达

如图 3-A 所示,与空白组比较,模型组大鼠肝组织 CXCL12 和 CXCR4 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,40 mg/kg AS-IV 能在一定程度上抑制 CXCL12 mRNA 表达,显著抑制 CXCR4 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。Western blotting 结果见图 3-B、C,与空白组比较,模型组 CXCL12 和 CXCR4 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组 CXCL12 和 CXCR4 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

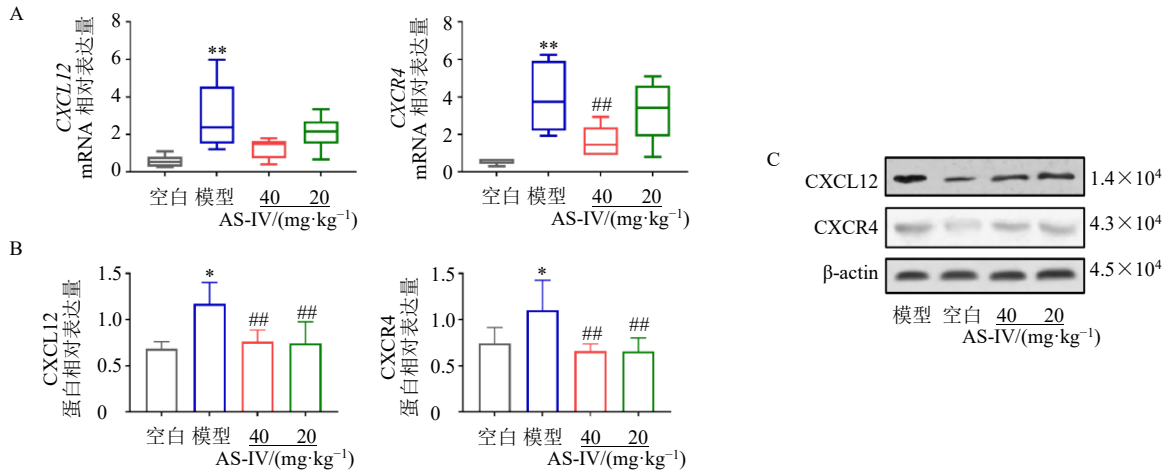
3.4 AS-IV 下调肝纤维化大鼠肝组织 TXNIP/NLRP3 炎性体路径中关键因子的表达

如图 4-A 所示,与空白组比较,模型组大鼠肝组织中 TXNIP、NLRP3、ASC mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$);与模型组比较,40 mg/kg

AS-IV 能显著抑制 TXNIP、NLRP3、ASC mRNA 表达 ($P < 0.05, 0.01$)。如图 4-B 所示,与空白组比较,模型组 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$);与模型组比较,40 mg/kg AS-IV 组 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),20 mg/kg AS-IV 组 ASC、IL-1 β 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

HSCs 活化是肝纤维化进程中的主要驱动力,抑制 HSCs 活化是抗肝纤维化药物研究的重要靶标^[17]。病毒、酒精、寄生虫等多种病因导致急性慢性肝损伤,可直接或间接诱导 HSCs 活化,活化的 HSCs 向肌成纤维细胞转化,明显高表达 α -SMA^[18]。 α -SMA 的表达情况不仅能反映 HSCs 的活化程度,还能在一定程度上判断病情及预后^[19]。此外,活化的 HSCs 可分泌 Collagen I,研究发现阻断 Collagen I 前胶原

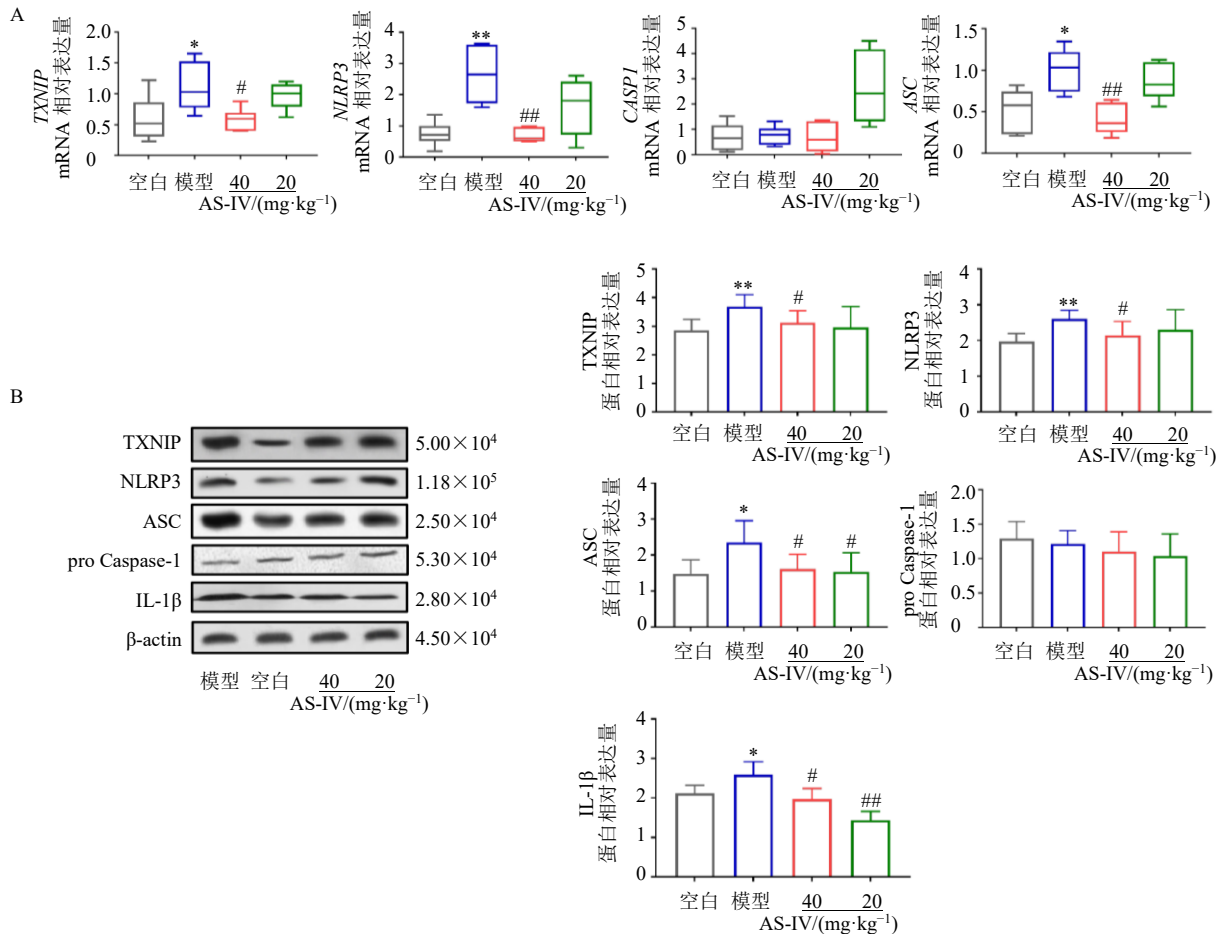


A-各组肝组织 CXCL12 和 CXCR4 mRNA 表达 B、C-各组肝组织 CXCL12 和 CXCR4 蛋白表达

A-CXCL12 和 CXCR4 mRNA expressions in liver tissue of each group B, C-CXCL12 and CXCR4 protein expressions in liver tissue of each group

图 3 AS-IV 下调肝纤维化大鼠肝组织 CXCL12/CXCR4 信号轴因子表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 AS-IV downregulates CXCL12/CXCR4 signal axis factors expressions in liver of rats with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A-各组肝组织 TXNIP、NLRP3、CASP1 和 ASC mRNA 表达 B-各组肝组织 TXNIP、NLRP3、ASC、pro Caspase-1 和 IL-1β 蛋白表达

A-TXNIP, NLRP3, CASP1 and ASC mRNA expressions in liver tissue of each group B-TXNIP, NLRP3, ASC, pro Caspase-1 and IL-1β protein expressions in liver tissue of each group

图 4 AS-IV 下调肝纤维化大鼠肝组织 TXNIP/NLRP3 炎性体途径关键因子表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 AS-IV downregulates TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway key factors expressions in liver of rats with liver fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

的输出可促进 HSC 的凋亡^[20]。本研究发现,经 CCl₄ 及乙醇刺激后,模型组大鼠肝组织 α -SMA、Collagen I 蛋白及 mRNA 表达水平均显著升高,提示模型组存在活跃的 HSCs 活化,AS-IV 治疗后显著下调了 α -SMA 及 Collagen I 的表达,说明 AS-IV 可抑制肝纤维化大鼠 HSCs 活化,这与既往的研究结果一致^[21]。

CXCL12 又被称为基质细胞衍生因子-1,在肝脏中主要在 HSCs、肝窦内皮细胞等表达,可随着急、慢性的肝损伤而增高^[22]。CXCR4 是 CXCL12 的特异性受体,研究发现,CXCL12/CXCR4 轴可通过募集免疫细胞促进肝脏炎症及纤维化^[23],其高表达会诱导 HSCs 活化增殖^[24],而抑制 CXCL12/CXCR4 轴可促进肝纤维化过程中肝血管重塑、抑制 HSCs 增殖和迁移^[25-26]。本研究发现 AS-IV 可显著降低肝组织 CXCL12、CXCR4 的 mRNA 及蛋白表达,说明 AS-IV 抗肝纤维化、抑制 HSCs 活化的作用可能与抑制 CXCL12/CXCR4 轴有关。

TXNIP 是一种炎症的内源性调节因子,可在危险信号刺激下与 NLRP3 形成 TXNIP/NLRP3 复合物,激活 NLRP3 炎性体^[27]。研究发现敲除小鼠 TXNIP 基因,可显著减少 NLRP3 炎性体激活^[28]。NLRP3 炎性体是一种由 NOD 样受体(NOD-like receptors, NLRs)家族构成的多蛋白复合物,NLRP3 通过招募 ASC 和 pro Caspase-1 完成炎性体的装配,介导 Caspase-1 激活,释放 IL-1 β ^[29]。NLRP3 炎性体活化是肝脏疾病过程中的肝细胞损伤、炎症放大的重要原因^[30]。研究发现,HSCs 中 NLRP3 炎性体激活,分泌 IL-1 β 可直接活化 HSCs,并可通过旁分泌的方式促进周围 HSCs 活化,从而促进肝纤维化^[31]。而抑制 NLRP3 炎性体活化可改善肝纤维化^[32]。本研究发现,40 mg/kg AS-IV 可显著降低 TXNIP、NLRP3、ASC、IL-1 β 的表达,提示 AS-IV 可能参与调节 TXNIP/NLRP3 炎性体路径。

本研究发现 AS-IV 可显著减轻 CCl₄ 联合乙醇诱导的大鼠肝细胞损伤及纤维化,并能显著抑制 HSCs 活化,其机制可能与抑制 CXCL12/CXCR4 轴和 TXNIP/NLRP3 炎性体路径有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 37-55.
- [2] Li H. Advances in anti hepatic fibrotic therapy with

Traditional Chinese Medicine herbal formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251: 112442.

- [3] Zhao Q Q, Bai J W, Chen Y W, *et al.* An optimized herbal combination for the treatment of liver fibrosis: Hub genes, bioactive ingredients, and molecular mechanisms [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 297: 115567.
- [4] 苏悦, 彭杨芷, 刘雨樵, 等. 基于 miR-23a-3p 的扶正通络法抗肝纤维化的机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(7): 3962-3966.
- [5] Liu Y T, Lv W L. Research progress in *Astragalus membranaceus* and its active components on immune responses in liver fibrosis [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(10): 794-800.
- [6] 孟丹丹, 李宗新, 贾瑞雪, 等. 黄芪甲苷抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(3): 1002-1009.
- [7] 曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(5): 954-960.
- [8] Zhou X J, Sun X B, Gong X X, *et al.* Astragaloside IV from *Astragalus membranaceus* ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting inflammation via TLR4/NF- κ B *in vivo* and *in vitro* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 42: 18-24.
- [9] Li N N, Feng F F, Wu K, *et al.* Inhibitory effects of astragaloside IV on silica-induced pulmonary fibrosis via inactivating TGF- β 1/Smad3 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 119: 109387.
- [10] Lu J, Wang Q Y, Zhou Y, *et al.* Astragaloside IV against cardiac fibrosis by inhibiting TRPM7 channel [J]. *Phytomedicine*, 2017, 30: 10-17.
- [11] Guo T, Liu Z L, Zhao Q, *et al.* A combination of astragaloside I, levistilide A and calycosin exerts anti-liver fibrosis effects *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(9): 1483-1492.
- [12] Wan Y, Xu L, Wang Y X, *et al.* Preventive effects of astragaloside IV and its active sapogenin cycloastragenol on cardiac fibrosis of mice by inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 833: 545-554.
- [13] Li X M, Wang X L, Han C Y, *et al.* Astragaloside IV suppresses collagen production of activated hepatic stellate cells via oxidative stress-mediated p38 MAPK pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60: 168-176.
- [14] Liu H, Wei W, Sun W Y, *et al.* Protective effects of astragaloside IV on porcine-serum-induced hepatic fibrosis in rats and *in vitro* effects on hepatic stellate cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 122(3): 502-508.
- [15] 蒋园, 白云, 刘萍, 等. 黄芪甲苷对 CCl₄ 所致小鼠肝损伤的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(6): 24-27.
- [16] Liu Y L, Zhang Q Z, Wang Y R, *et al.* Astragaloside IV improves high-fat diet-induced hepatic steatosis in

- nonalcoholic fatty liver disease rats by regulating inflammatory factors level via TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 605064.
- [17] Higashi T, Friedman S L, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 27-42.
- [18] Zhang C Y, Yuan W G, He P, *et al.* Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(48): 10512-10522.
- [19] Parikh J G, Kulkarni A, Johns C. α -smooth muscle actin-positive fibroblasts correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(2): 573-575.
- [20] Maiers J L, Kostallari E, Mushref M, *et al.* The unfolded protein response mediates fibrogenesis and collagen I secretion through regulating TANGO1 in mice [J]. *Hepatology*, 2017, 65(3): 983-998.
- [21] Mu Y P, Zhang X, Li X W, *et al.* Astragaloside prevents BDL-induced liver fibrosis through inhibition of Notch signaling activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169: 200-209.
- [22] Liepelt A, Tacke F. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) as a target in liver diseases [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016, 311(2): G203-G209.
- [23] Wald O, Pappo O, Safadi R, *et al.* Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(4): 1164-1174.
- [24] Hong F, Tuyama A, Lee T F, *et al.* Hepatic stellate cells express functional CXCR4: Role in stromal cell-derived factor-1 α -mediated stellate cell activation [J]. *Hepatology*, 2009, 49(6): 2055-2067.
- [25] Deng Z M, Zhang S H, Ge S H, *et al.* Gexia-Zhuyu Decoction attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice partly via liver angiogenesis mediated by myeloid cells [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 2835-2844.
- [26] Qin L F, Qin J M, Zhen X M, *et al.* Curcumin protects against hepatic stellate cells activation and migration by inhibiting the CXCL12/CXCR4 biological axis in liver fibrosis: A study *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 599-607.
- [27] Xu L L, Lin X P, Guan M P, *et al.* Verapamil attenuated prediabetic neuropathy in high-fat diet-fed mice through inhibiting TXNIP-mediated apoptosis and inflammation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1896041.
- [28] Mohamed I N, Sarhan N R, Eladl M A, *et al.* Deletion of Thioredoxin-interacting protein ameliorates high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis through modulation of Toll-like receptor 2-NLRP3-inflammasome axis: Histological and immunohistochemical study [J]. *Acta Histochem*, 2018, 120(3): 242-254.
- [29] Inzaugarat M E, Johnson C D, Holtmann T M, *et al.* NLR family pyrin domain-containing 3 inflammasome activation in hepatic stellate cells induces liver fibrosis in mice [J]. *Hepatology*, 2019, 69(2): 845-859.
- [30] Szabo G, Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 12(7): 387-400.
- [31] Inzaugarat M E, Johnson C D, Holtmann T M, *et al.* NLR family pyrin domain-containing 3 inflammasome activation in hepatic stellate cells induces liver fibrosis in mice [J]. *Hepatology*, 2019, 69(2): 845-859.
- [32] Han X, Song J, Lian L H, *et al.* Ginsenoside 25-OCH₃-PPD promotes activity of LXRs to ameliorate P2X7R-mediated NLRP3 inflammasome in the development of hepatic fibrosis [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(27): 7023-7035.

[责任编辑 李亚楠]