

膈下逐瘀汤对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠 Wnt/ β -catenin 通路的影响

孙旭¹, 熊芬¹, 黄育生², 闫雪¹, 蔡庆群¹, 丘振文^{1*}

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学岭南医学研究中心, 广东 广州 510405)

摘要: 目的 探讨膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠 Wnt/ β -catenin 通路的影响。方法 48 只成年大鼠随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组 (0.11 mg/kg)、膈下逐瘀汤组 (7.29 g/kg), 每组 12 只。采用四氯化碳改良法制备肝纤维化模型, 造模成功后连续灌胃给药 8 周, 每天 1 次, 8 周后处死大鼠, 取肝脏拍照并计算肝脏指数。HE 染色观察大鼠肝脏组织病理形态, 检测大鼠血清中 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、CⅣ水平, RT-qPCR 法检测 Wnt-1、 β -catenin、GSK-3 β mRNA 表达, Western blot 法检测 Wnt-1、 β -catenin、p-GSK-3 β 、GSK-3 β 蛋白表达。结果 与模型组比较, 秋水仙碱组和膈下逐瘀汤组大鼠血清 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、CⅣ水平降低 ($P<0.01$), 肝细胞坏死及脂肪变性减少, 纤维化程度减轻, 大鼠肝组织 Wnt-1、 β -catenin mRNA 和蛋白表达降低 ($P<0.01$), GSK-3 β mRNA 和蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。结论 膈下逐瘀汤可以降低大鼠肝纤维程度, 其机制可能与抑制 Wnt/ β -catenin 通路活化相关。

关键词: 膈下逐瘀汤; 肝纤维化; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1945-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.039

肝纤维化是肝脏受到病毒、酒精、药物等生物、化学或免疫因素损伤后进行组织修复的病理生理过程, 其本质是肝星状细胞激活后导致的细胞外基质大量聚集^[1-2]。若肝纤维化没有得到逆转或改善则会进一步发展为肝硬化, 据统计每年死于肝硬化的人数达到 100 万^[3]。肝纤维化存在逆转可能, 因此, 开展肝纤维化治疗具有重要意义。

Wnt 信号通路是调控细胞生长与分化的重要信号通路, 其异常表达与纤维化疾病紧密关联。当 Wnt 信号通路被激活后, 异常表达的 Wnt 蛋白参与肝内炎症、脂代谢、氧化应激等反应, 导致酒精性脂肪肝、肝纤维化等慢性肝病的发生^[4]。具有活血化瘀作用的丹参、红景天、龙血竭等能抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活, 起到抗肝纤维化的作用^[5-7]。

膈下逐瘀汤出自《医林改错》, 具有活血逐瘀、破症消结之功效, 主治积聚痞块、痛不移处、卧则腹坠、肾泻、久泻由瘀血所致者^[8]。中医认为肝纤维化多由湿热阻滞、肝气郁滞而致脉道不通、瘀血阻络所致, 属本虚标实之证, 本虚以脾气虚弱和肝肾阴虚为主, “因虚致积”可促使疾病进一步发展为肝硬化或肝癌, 标实以水停、血瘀为主^[9]。因此, 本研究通过膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠 Wnt/ β -catenin 通路的调控作用, 阐明膈下逐瘀汤对肝纤维化的治疗作用, 以期指导临床应用。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 48 只, 鼠龄 8~12 周, 体质量 (200±20) g, 由广东省医学实验动物中心提供, 实验动物使用许可证号 SYXK (粤) 2018-0092, 饲养于广东药科大学实验动物中心, 实验室温度 24~25 ℃, 相对湿度 50%~60%。标准饲料、饮用水由广东药科大学动物实验中心提供, 高脂低蛋白饲料配方为在 79.5% 标准饲料基础上添加 20% 猪油和 0.5% 胆固醇, 适应性饲养 1 周。

1.2 试剂与药物 膈下逐瘀汤由五灵脂 6 g、当归 9 g、川芎 6 g、桃仁 9 g、牡丹皮 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 组成, 饮片购自广州中医药大学第一附属医院, 经广州中医药大学第一附属医院副主任中药师黄光荣鉴定为正品, 将上述饮片按比例加入 10 倍量水煎煮, 过滤, 滤液浓缩至含生药量 1.58 g/mL, 4 ℃ 保存备用。秋水仙碱片 (西双版纳药业有限责任公司, 批号 H53021369), 溶于蒸馏水, 配制成质量浓度为 11 mg/L; CCl₄ (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂, 批号 5623-5); 花生油 (山东鲁花集团有限公司, 批号 Q/LLH0015S); HE 染色试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 G1005); 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂盒、透明质酸 (HA)

收稿日期: 2021-09-02

基金项目: 广东省中医药管理局项目 (20201094)

作者简介: 孙旭 (1988—), 女, 硕士, 主管药师, 从事消化内科临床药理研究。Tel: 18218498176, E-mail: SXApril@163.com

* 通信作者: 丘振文 (1975—), 男, 教授, 主任中药师, 从事中药制剂与分析研究。Tel: 020-36598871, E-mail: 738711598@qq.com

试剂盒、层黏蛋白 (LN) 试剂盒、Ⅲ型前胶原 (PCⅢ) 试剂盒、Ⅳ型胶原 (CⅣ) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20190518、20190409、20190814、20190730、20190916、20191011); TRIzol 试剂 (美国 Sigma 公司, 批号 187022024); RNA 提取试剂盒 (上海捷瑞生物工程有限公司, 批号 GK4175); 实时荧光定量 PCR 扩增试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, 批号 ST728A); 磷酸酶抑制剂 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 批号 B546021-0250]; 蛋白酶抑制剂 [安诺伦 (北京) 生物科技有限公司, 批号 HY-K0010]; SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、DAB 显色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 ST627、ST627); Wnt-1、 β -catenin、p-GSK3 β 、GSK3 β 抗体 (美国 Affinity 公司, 批号 AF2115、AF6266、AF2016、AF2017); GAPDH 抗体、山羊抗兔 HRP 标记二抗、ECL 试剂盒 (杭州弗德生物科技有限公司, 批号 FD0063、FDR007、P0023A); BCA 试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司, 批号 VK314219); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司, 批号 402190QR)。

1.3 仪器 -80 ℃超低温冰箱 (美国 Sigma 公司); 高速低温离心机 (美国 Thermo Scientific 公司); 组织研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); 脱水机 (意大利 Diapath 公司); 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); 病理切片机 (德国 Leica 公司); TBA-2000FR 全自动生化分析仪 (日本东芝公司); 病理切片扫描仪 (匈牙利 3D-histech 公司); 垂直电泳槽、转移电泳槽、MicroCL17R 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 电泳仪 (北京百晶生物技术有限公司); SK-L180-E 摇床 (美国 Scilogex 公司); 电子天平 [奥豪斯仪器 (上海) 有限公司]; 化学发光显影仪 (北京赛智创业科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 48 只大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、秋水仙碱组、膈下逐瘀汤组, 每组 12 只。参考文献 [10] 报道, 以 CCl₄ 诱导制备肝纤维化模型。造模组大鼠于第 1 天腹腔注射含 40% CCl₄ 花生油 3 mL/kg, 之后每 3 d 腹腔注射 2 mL/kg, 连续 8 周, 正常组大鼠腹腔注射等体积花生油。首次注射后第 2 天开始给药, 膈下逐瘀汤组大鼠灌胃给予药液 7.29 g/kg^[11], 秋水仙碱组大鼠灌胃给予秋水仙碱混悬液 0.11 mg/kg, 正常组和模型组大鼠灌胃给予生理盐水 10 mL/kg, 每天 1 次, 每 3 d 称定体质量 1 次以调整药量, 共 8 周, 末次给药后, 禁食不禁水 12 h 后腹腔注射 6% 水合氯醛 7 mL/kg 麻醉取材。

2.2 行为学评价 每天观察并记录大鼠的精神状况、饮食及活动、毛发光泽度等一般情况。

2.3 肝脏指数评价 大鼠麻醉后, 开腹摘取肝脏, 观察肝脏形态并称定质量, 计算脏器指数。

2.4 肝组织病理学观察 将约 1 cm×1 cm 大小的肝组织置于 4% 多聚甲醛浸泡 72 h, 依次进行梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片 (厚度 3 μ m), 脱蜡, 行苏木精-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下进行组织形态学观察。

2.5 生化法检测血清 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、CⅣ水平 腹主动脉取血, 4 ℃静置 4 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 严格按照相应试剂盒说明书操作, 检测大鼠血清中 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、CⅣ水平。

2.6 RT-qPCR 法检测肝组织中 Wnt-1、 β -catenin、GSK-3 β mRNA 表达 采用 TRIzol 试剂提取肝组织总 RNA。按照逆转录试剂盒的操作说明书将提取的总 RNA 逆转录成 cDNA, 采用 SYBR Green 进行两步法实时荧光定量 PCR 反应, 以 GAPDH 作为内参。每个样品重复 3 次, 以 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 分析计算各组 mRNA 表达情况。引物序列均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计并合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列
Wnt-1	正向 5'-CCCGAGGTACGCAATAGGAGT-3'
	反向 5'-CACGGTGGCATCAATACAGG-3'
GSK-3 β	正向 5'-ACACCTGCCCTCTTC-3'
	反向 5'-GTCTCCAGCATTAGTATCT-3'
β -catenin	正向 5'-ACTCCAGGAATGAAGGCGTG-3'
	反向 5'-GAACTGCTCAGCTCAACCGA-3'
GAPDH	正向 5'-GTGCTGAGTATGTCGTGGAG-3'
	反向 5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3'

2.7 Western blot 法检测肝组织 Wnt-1、 β -catenin、GSK3 β 、p-GSK3 β 蛋白表达 剪取肝组织约 30 mg 于玻璃匀浆器中, 加入 400 μ L RIPA 裂解液和 100 $\times$ 磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂, 冰上充分研磨, 将匀浆液于 4 ℃条件下 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对肝组织蛋白进行定量分析后, 按照 4:1 的比例加入上样缓冲液 (5 $\times$), 沸水浴 15 min 使蛋白变性, 制作 10% 分离胶与 5% 浓缩胶, 蛋白上样, SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 在低温条件下, 恒流 300 mA, 60 min 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 PVDF 膜 2 h, TBST 洗涤 3 次, 加入一抗孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 二抗稀释后室温孵育 30 min, TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min。以 GAPDH 为内参, ECL 试剂盒显影成像, 利用 GelAnalyze 对蛋白条带进行图像分析, 记录灰度值, 通过计算目的条带与内参的灰度值比值来分析 Wnt-1、 β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用 GraphPad Prism 9 软件进行方差分析和作图, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 *t* 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠一般形态、肝脏形态和肝脏指数的影响 正常组大鼠精神状态良好、活泼好动、皮毛洁白光泽; 模型组大鼠行动迟缓, 毛发枯乱、偏黄, 死亡 1 只; 秋水仙碱组和膈下逐瘀汤组大鼠精神状态良好, 行动较正常组迟缓, 毛发黯淡无光泽, 秋水仙碱组死亡 1 只, 见图 1。

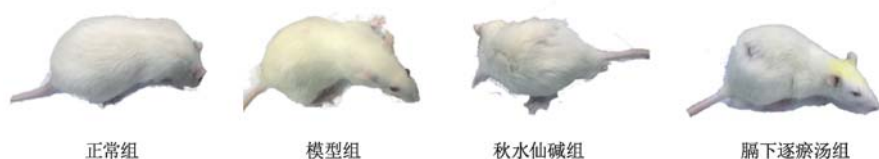


图 1 膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠行为、形态的影响

正常组大鼠肝脏组织呈鲜亮的红褐色,大小适中,无肿大,质地触及柔软光滑且富有弹性,组织边缘完整无钝感;模型组大鼠肝脏组织呈现出肿胀状态,颜色呈土黄色或灰黄色,黯淡无光泽,触之质地油腻、粗糙不平、无弹性且有颗粒感,组织边缘变钝且显韧硬;膈下逐瘀汤组和秋水仙碱组大鼠肝脏组织质地、色泽介于正常组和模型组之间,无正常组大鼠肝组织颜色鲜亮且光滑,但较模型组大鼠肝组织边缘整齐,肝脏组织的整体状态接近正常组,见图 2。

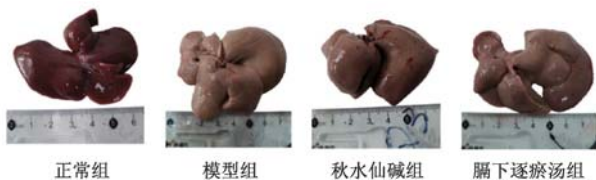
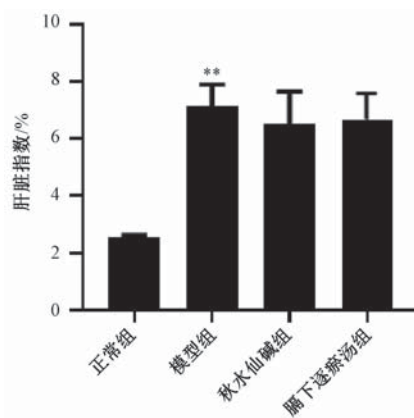


图 2 膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠肝脏形态的影响

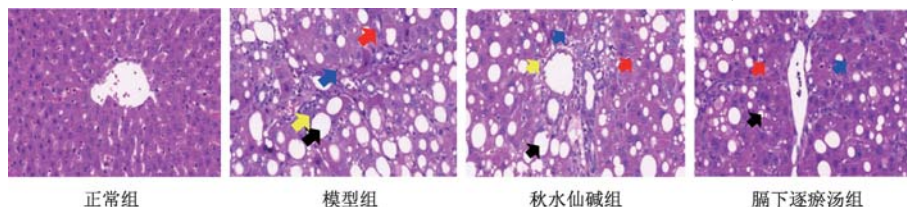
与正常组比较,模型组大鼠肝脏指数升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,膈下逐瘀汤组和秋水仙碱组大鼠肝脏指数无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3。



注:与正常组比较,** $P < 0.01$ 。

图 3 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

3.2 膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠肝脏组织病理变化的影响 正常组大鼠肝脏内小叶结构清晰、肝细胞排列整齐;模型组大鼠肝脏内小叶结构破坏、可见大量脂滴、炎症浸润和坏死细胞,汇管区纤维结缔组织增生;膈下逐瘀汤组和秋水仙碱组大鼠可见胶原纤维增生和炎性细胞减少,纤维间隔薄且仅分布于汇管区周围,阳性染色面积降低,见图 4。



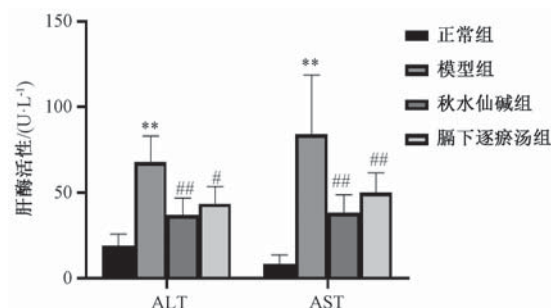
注:红色箭头表示炎性细胞,蓝色箭头表示核固缩,黄色箭头表示坏死细胞,黑色箭头表示脂滴。

图 4 膈下逐瘀汤对大鼠肝脏组织病理学的影响

3.3 膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST 活性的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中 ALT、AST 活性升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组和膈下逐瘀汤组大鼠血清中 ALT、AST 活性降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 5。

3.4 膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠血清中 HA、LN、PCⅢ、CIV 水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中 HA、LN、PCⅢ、CIV 水平升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组和膈下逐瘀汤组大鼠血清中 HA、LN、PCⅢ、CIV 水平降低 ($P < 0.01$),见图 6。

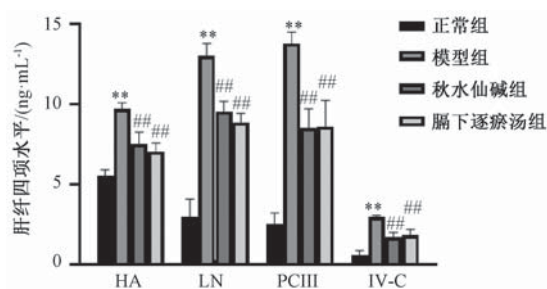
3.5 膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠肝组织中 Wnt-1、 β -catenin、GSK-3 β mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 Wnt-1、 β -catenin mRNA 表达升高 ($P < 0.01$),GSK-3 β mRNA 表达降低 ($P < 0.05$);与模型组比



注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

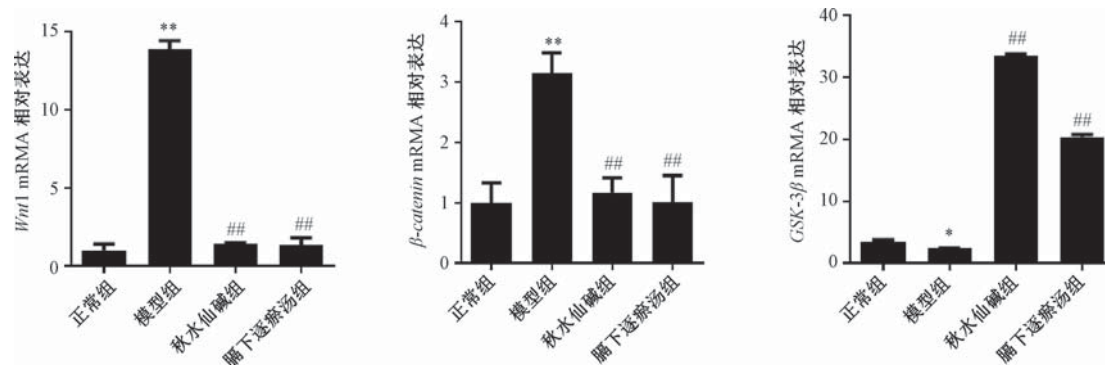
图 5 膈下逐瘀汤对大鼠血清 ALT 和 AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

较,秋水仙碱组和膈下逐瘀汤组大鼠肝组织中 Wnt-1、 β -



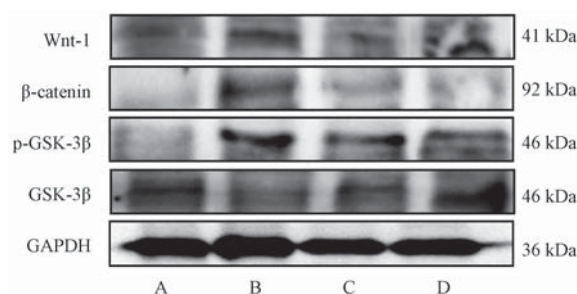
注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图6 膈下逐瘀汤对大鼠血清中HA、LN、PCIII、CIV水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)



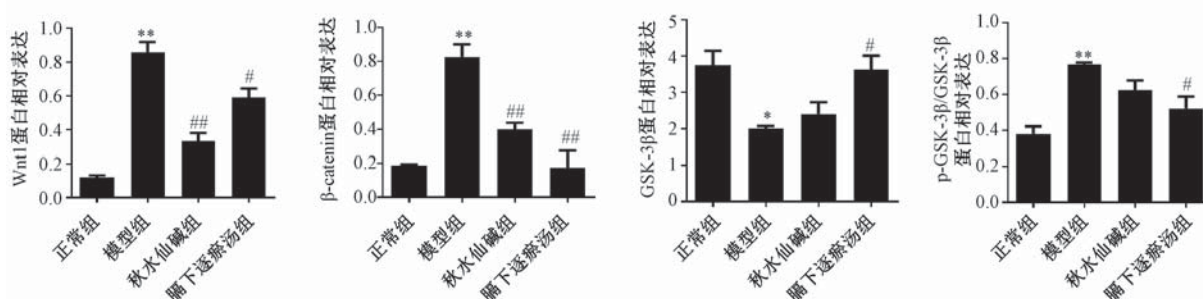
注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图7 膈下逐瘀汤对大鼠肝组织Wnt-1、β-catenin、GSK-3β mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)



注:A~D分别为正常组、模型组、秋水仙碱组、膈下逐瘀汤组。

图8 各组大鼠肝组织中Wnt-1、β-catenin、p-GSK-3β、GSK-3β蛋白表达



注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图9 膈下逐瘀汤对大鼠肝组织中Wnt-1、β-catenin、GSK-3β、p-GSK-3β/GSK-3β蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

4 讨论

肝纤维化是慢性肝病进展至肝硬化、肝癌的中心环节,中医将其归于“肝著”“臌胀”“积聚”“黄疸”等范

catenin mRNA表达降低($P<0.01$),GSK-3β mRNA表达升高($P<0.01$),见图7。

3.6 膈下逐瘀汤对肝纤维化大鼠肝组织中Wnt-1、β-catenin、GSK-3β、p-GSK-3β蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织中Wnt-1、β-catenin、p-GSK-3β/GSK-3β蛋白表达升高($P<0.01$),GSK-3β蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组比较,膈下逐瘀汤组大鼠肝组织中Wnt-1、β-catenin、p-GSK-3β/GSK-3β蛋白表达降低($P<0.01$, $P<0.05$),GSK-3β蛋白表达升高($P<0.05$),见图8~9。

畴^[9,12]。现今尚无抗肝纤维化的有效药物,部分西药如秋水仙碱等,因不良反应大在临床难以推广。中医认为,纤维化病机为湿热疫毒内蕴,气滞瘀血阻络,治法以活血化

瘀、疏肝解郁、养血柔肝为主^[13]。

膈下逐瘀汤由五灵脂、当归、川芎、桃仁、牡丹皮、赤芍、乌药、延胡索、甘草、香附、红花、枳壳组成，具有改善微循环、抑制炎症的作用，主治腹部瘀血积块等病证，与肝纤维化发病机制和部位相符^[14]。本研究发现，膈下逐瘀汤能降低肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、CIV 水平，减少坏死细胞和炎性浸润，对肝纤维化大鼠具有保护作用。

Wnt/ β -catenin 通路广泛参与细胞分化、组织修复等过程，在正常状态下处于低表达或沉默状态，当发生纤维化和肿瘤时，可被异常激活出现高表达^[15-17]。 β -catenin 为多功能蛋白，可介导信号转导和细胞黏附^[18]。当 Wnt 相关配体与细胞膜上 Frizzled 受体结合后，通路被异常激活，细胞质中 GSK-3 β 发生磷酸化，导致 β -catenin 在细胞质中积累并转移至细胞核并激活下游靶基因。抑制 β -catenin 高表达，阻断 Wnt/ β -catenin 通路，抑制肝星状细胞增殖和活化，进而延缓肝纤维化发生^[19-22]。

目前，膈下逐瘀汤对肝纤维化的探索除了集中在临床研究^[23-24]，对于临床前动物研究也在不断深入，如赵海军等^[25]发现，膈下逐瘀汤能降低 CCl₄ 所致肝纤维化大鼠血清中 ALT、AST、LN、HA 水平，升高血清蛋白和总蛋白表达，这与本研究部分结果一致。此外，膈下逐瘀汤可降低转化生长因子- β 1 和 α -平滑肌肌动蛋白等致纤维化因子水平，下调缺氧诱导因子-1 α 及血管内皮细胞生长因子，改善血管新生^[26-27]；在信号通路方面，杨婧等^[28-29]发现，膈下逐瘀汤可活化 Akt-Nrf2 通路增强大鼠肝脏谷胱甘肽和硫氧还蛋白系统，减轻组织氧化应激，延缓纤维化进展。本研究在已证实膈下逐瘀汤对肝纤维化有积极治疗作用的前提下，首次探索了膈下逐瘀汤通过 Wnt/ β -catenin 通路干预肝纤维化的可能性。结果显示，Wnt-1、 β -catenin 在肝纤维化大鼠肝组织中表达升高，膈下逐瘀汤可下调 Wnt-1、 β -catenin、p-GSK-3 β /GSK-3 β 蛋白表达，上调 GSK-3 β mRNA 及蛋白表达。

综上所述，Wnt/ β -catenin 通路在肝纤维化大鼠肝脏组织中存在异常激活现象，膈下逐瘀汤可通过抑制 GSK-3 β 磷酸化，促进 β -catenin 降解，减少 β -catenin 在细胞内积聚，进而阻断 Wnt/ β -catenin 通路激活。本研究证实了 Wnt/ β -catenin 通路与肝纤维化的相关性，进一步探究了膈下逐瘀汤改善肝纤维化的潜在机制，为抗肝纤维化研究提供了新的思路和方向。

参考文献：

- [1] 邓羊羊, 葛善飞, 余燕青, 等. 肝纤维化相关细胞信号转导通路及潜在治疗策略[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(5): 1141-1145.
- [2] 焦若男, 魏 新, 张梦佩, 等. 肝星状细胞活化在肝纤维化中的研究进展[J]. 中国临床研究, 2020, 33(2): 240-243.
- [3] GBD 2017 Risk Factor Collaborators. Global, regional, and

national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1923-1994.

- [4] 赵东康, 骆伟伟, 余水平. Wnt 信号通路及肝纤维化发生发展的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(11): 2415-2419.
- [5] Cao T T, Lu Y, Zhu M W, et al. Effects of *Salvia miltiorrhiza* and *Radix astragali* on the TGF- β /Smad/Wnt pathway and the pathological process of liver fibrosis in rats[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2020, 66(6): 46-51.
- [6] 岳学良. 红景天苷对肝纤维化的保护作用及其机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2017.
- [7] Hu J P, Zhang R, Tang M, et al. Loureirin B inhibits the proliferation of hepatic stellate cells and the Wnt/ β -catenin signaling pathway by regulating miR-148-3p[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018, 23: 35.
- [8] 刘晓焱, 张 菁. 《医林改错》五“逐瘀汤”治疗妇科疾病概况[J]. 河南中医, 2020, 40(8): 1292-1296.
- [9] 艾丁丁, 罗伟生. 肝纤维化的中医药研究概况[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(9): 188-189.
- [10] 邵佳亮, 万赞燕, 胡国信. 四氯化碳诱导大鼠肝纤维化模型改良的研究[J]. 南昌大学学报(医学版), 2011, 51(7): 40-42; 51; 107.
- [11] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1331.
- [12] 安振涛, 魏兰福, 黄钰萍, 等. 肝纤维化中医证候规范化与客观化研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(2): 280-282.
- [13] 田德禄. 中医内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 267-272.
- [14] 陈兰羽, 马继征, 张 云, 等. 膈下逐瘀汤治疗慢性肝病实验研究进展[J]. 中西医结合肝病杂志, 2014, 24(2): 123-126.
- [15] Nishikawa K, Osawa Y, Kimura K. Wnt/ β -catenin signaling as a potential target for the treatment of liver cirrhosis using antifibrotic drugs[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 3103.
- [16] Wang J N, Li L, Li L Y, et al. Emerging role and therapeutic implication of Wnt signaling pathways in liver fibrosis [J]. *Gene*, 2018, 674: 57-69.
- [17] Hu H H, Cao G, Wu X Q, et al. Wnt signaling pathway in aging-related tissue fibrosis and therapies[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 60: 101063.
- [18] Lee J M, Yang J, Newell P, et al. β -Catenin signaling in hepatocellular cancer: Implications in inflammation, fibrosis, and proliferation[J]. *Cancer Lett*, 2014, 343(1): 90-97.
- [19] Sun X, He Y, Ma T T, et al. Participation of miR-200a in TGF β 1-mediated hepatic stellate cell activation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 388(1-2): 11-23.
- [20] 文 彬, 孙海涛, 贺松其, 等. 鳖甲煎丸对肝星状细胞中 Wnt 信号通路信号分子 β -catenin、GSK-3 β 及下游蛋白表达

- 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(9): 3997-4000.
- [21] 孙海涛, 文彬, 陈冠新, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化模型大鼠肝组织中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白及其靶基因表达的影响[J]. 中医杂志, 2018, 59(10): 876-881.
- [22] 招文婷, 孙嘉玲, 文彬, 等. 鳖甲煎丸通过 Wnt/ β -catenin 信号通路逆转大鼠肝卵圆细胞 EMT 的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 38-45.
- [23] 何湘琴, 胡国信. 膈下逐瘀汤治疗乙型肝炎肝硬化临床疗效 Meta 分析[J]. 陕西中医, 2021, 42(3): 398-401; 408.
- [24] 高世钦. 膈下逐瘀汤对乙型肝炎肝硬化患者肝纤维化及免疫功能的作用[J]. 华夏医学, 2021, 34(1): 52-55.
- [25] 赵海军, 李燕, 赵鲁鸣, 等. 加味膈下逐瘀汤对肝纤维化模型大鼠肝功能及纤维化指标的影响[J]. 山东中医杂志, 2017, 36(5): 407-410.
- [26] 陈兰羽, 马继征, 刘咏梅, 等. 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[J]. 中草药, 2019, 50(2): 449-456.
- [27] 杨婧, 贾彦, 刘宏, 等. 膈下逐瘀汤对大鼠纤维化肝组织 α -SMA 和 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(2): 158-160.
- [28] 杨婧, 贾彦, 王蔚, 等. 膈下逐瘀汤对大鼠纤维化肝脏组织谷胱甘肽抗氧化系统的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 121-126.
- [29] 杨婧, 贾彦, 王蔚, 等. 膈下逐瘀汤对大鼠纤维化肝脏组织硫氧还蛋白系统的影响[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2017, 19(4): 701-705.

五香血藤醇提物对慢性非细菌性前列腺炎大鼠的改善作用

李章春¹, 孙海波¹, 党荣敏¹, 叶劲松¹, 李珀², 胡先运¹, 杨政敏^{1*}

(1. 黔南民族医学高等专科学校, 贵州 都匀 558000; 2. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 目的 观察五香血藤醇提物对慢性非细菌性前列腺炎大鼠的改善作用。方法 60 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组, 模型组, 阳性药物组 (前列舒通胶囊水溶液 354 mg/kg), 五香血藤醇提物低、中、高剂量组 (63、126、252 mg/kg), 每组 10 只, 注射消痔灵进行造模。RT-qPCR 法检测 *miR-155* 表达, Western blot 法检测 NF- κ B p65、TLR4 表达, ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平, 比较各组大鼠前列腺组织病理评分, 观察病理学改变。结果 与模型组比较, 五香血藤醇提物各剂量组大鼠前列腺组织内 TNF- α 、IL-6、IL-8、NF- κ B p65、TLR4、*miR-155* 表达降低 ($P < 0.05$); 五香血藤醇提物高剂量组与阳性药物组病理评分最低; 五香血藤醇提物高剂量组大鼠前列腺组织慢性炎症细胞浸润、腺体增生、血管扩张充血等症状有改善。*miR-155* 表达与 NF- κ B p65、TLR4、TNF- α 、IL-6、IL-8 表达呈正相关 ($P < 0.01$)。结论 五香血藤醇提物能够改善慢性非细菌性前列腺炎大鼠的炎症, 其作用机制可能通过抑制 *miR-155* 表达, 调控 TLR4/NF- κ B 信号通路。

关键词: 五香血藤; 慢性非细菌性前列腺炎; *miR-155*; TLR4/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1950-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.040

慢性非细菌性前列腺炎 (chronic abacterial prostatitis, CAP) 是临床男科较为常见的病症, 占慢性前列腺炎的 90% 以上^[1], 我国成年人发病率为 13.5% ~ 21.3%^[2], 全球发病率为 3% ~ 16%^[3]。患者主要表现为腰骶部、会阴部等酸胀不适, 并伴随尿不尽、尿频、尿急等症状, 常用的药物为抗生素、 α 1-受体阻滞剂、非甾体类抗炎药等, 然而, 此类药物易引发胃肠出血、头晕等不良反应, 服用时间不宜过长, 所以疗效并不理想^[4]。近年来, 随着 CAP 治

疗药物研究的不断深入, 中医药副作用小、疗效好的优势逐渐显现。五香血藤是贵州民间特色苗药, 具有消肿镇痛、去风络、抗肿瘤等功效。*miR-155* 是与炎症、自身免疫等疾病密切相关的一种小分子 RNA, 能够参与炎症、免疫等多种生物过程^[5-6], TLR4/NF- κ B 是经典的信号通路, 在细胞氧化应激、炎症反应过程中具有重要作用^[7], 通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路能抑制炎症反应^[8]。基于此, 本研究五香血藤醇提物对 CAP 大鼠前列腺组织 *miR-155* 表

收稿日期: 2021-07-26

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (81860317); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (gzwkj2021-384); 黔南民族医学高等专科学校科研基金资助项目 (qnyz202033)

作者简介: 李章春 (1981—), 女, 硕士, 副教授, 从事病理教学及慢性病病理生理学研究。Tel: 18085456863, E-mail: 17547482@qq.com

***通信作者:** 杨政敏 (1983—), 男, 博士, 副教授, 从事天然药物化学研究。Tel: 15085823747, E-mail: 251059207@qq.com