

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.09.002

鸡矢藤颗粒剂干预大鼠肝纤维化模型 TGF- β_1 /Smad 通路试验

Paederia scandens granules of intervention in rat liver fibrosis model
experimental study on TGF- β_1 / Smad pathway

袁 勇^{1,2} 吕传柱³

YUAN Yong^{1,2} LV Chuan-zhu³

(1. 海南医学院, 海南 海口 570102; 2. 海南医学院急救与创伤研究教育部重点实验室, 海南 海口 570102; 3. 海南医学院第二附属医院海南省急危重症临床医学研究中心, 海南 海口 570102)

(1. Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570102, China; 2. Key Laboratory of Emergency and Trauma of Ministry of Education, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570102, China;

3. Department of Emergency, Clinical Research Center for Acute and Critical Diseases of Hainan Province, The Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan 570102, China)

摘要:将 30 只大鼠随机分为正常对照组(A 组)、非鸡矢藤治疗模型组(B 组)和鸡矢藤模型组(C 组)。8 周后荧光实时定量法检测 TGF- β_1 、Smad3 和 Smad7 的 mRNA 的表达。结果表明:从白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫数据看, C 组与 A 组差异极显著($P < 0.01$), 与 B 组差异显著($P < 0.05$); B 组与 A 组差异极显著($P < 0.01$)。采用鸡矢藤治疗后, 可以明显抑制 TGF- β_1 mRNA 的表达, C 组与 A 组差异显著($t = 2.245, P < 0.05$), 与 B 组差异极显著($t = 1.142, P < 0.01$); 采用鸡矢藤治疗后, 可以明显抑制 Smad3 mRNA 的表达, C 组与 A 组差异显著($t = 2.149, P < 0.05$), 与 B 组差异极显著($t = 1.206, P < 0.01$); 采用鸡矢藤治疗后, 可以提升 Smad7 mRNA 的表达, C 组与 A 组差异显著($t = 2.201, P < 0.05$), 与 B 组差异极显著($t = 1.007, P < 0.01$)。鸡矢藤可以抑制 TGF- β_1 mRNA 和 Smad3 mRNA 的表达, 促进 Smad7 mRNA 的表达。研究表明, 在肝纤维化的作用机制中, 存在 Smad3 mRNA-(TGF- β_1 mRNA)-Smad7 mRNA 的轴性作用通道。

关键词:鸡矢藤; 肝纤维化; 转化生长因子

Abstract: Thirty rats were randomly divided into normal control

group (group A), non-paederia scandens treatment model group (group B) and paederia scandens treatment model group (group C). The expression of mRNA of TGF- β_1 , Smad3 and Smad7 was detected by real-time quantitative fluorescence method after 8 weeks. The results showed that, according to the ELISA data of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), the difference between group C and group A was extremely significant ($P < 0.01$), which is the same as between group B and group A, and that the difference between group C and group B was significant ($P < 0.05$). The difference between group B and group A was extremely significant ($P < 0.01$). After treatment with paederia scandens, the expression of TGF- β_1 mRNA was significantly inhibited, the difference between group C and group A was significant ($t = 2.245, P < 0.05$), and the difference between group C and group B was extremely significant ($t = 1.142, P < 0.01$). After treatment with *Paederia scandens*, the expression of Smad3 mRNA was significantly inhibited, the difference between group C and group A was significant ($t = 2.149, P < 0.05$), and the difference between group C and group B was extremely significant ($t = 1.206, P < 0.01$). Afterwards, the expression of Smad7 mRNA was increased, the difference between group C and group A was significant ($t = 2.201, P < 0.05$), and the difference was significant between group C and group B ($t = 1.007, P < 0.01$). *Paederia scandens* can inhibit the expression of TGF- β_1 mRNA, decrease the expression of Smad3 mRNA, and increase the expression of Smad7 mRNA. It is shown in our study that in the mechanism of liver fibrosis, there exists a linear channel effect of Smad3

基金项目:2014 年海南省自然科学基金(编号: 0104777039); 2012 年海南省卫生厅科研项目(编号: 琼卫 2012PT-32)

作者简介:袁勇,男,海南医学院教授,硕士。

通信作者:吕传柱(1962—),男,海南医学院教授,博士生导师,硕士生。E-mail: lyuchuanzhu@hainmc.edu.cn

收稿日期:2019-03-02

mRNA-(TGF- β_1 mRNA)-Smad7 mRNA.

Keywords: paederia scandens; hepatic fibrosis; transforming growth factor

肝纤维化是一种慢性渐进性病理过程,多发于肝硬化、肝癌等多种肝病中。导致肝纤维化的原因有很多,如酒精性肝损伤、活动性病毒性肝炎、脂肪肝、药物性肝损伤等,最终导致弥漫性胶原或非胶原物质在肝内大量沉积,其核心病理改变是肝内发现肝星状细胞(Hepaticstellate cells, HSCs)激活并大量增殖,成肌纤维细胞样细胞是病理改变的最后呈现形式^[1-2]。在 HSCs 激活并增殖的过程中,各种致纤维化介质如转化生长因子 β_1 (transfo-rminggrowth fatorbata, TGF- β_1) 会大量分泌,大量研究^[3-6]表明,转化生长因子 β_1 是造成肝纤维化进展的最主要细胞因子,能使肝星状细胞激活和大量分泌胶原或非胶原物质,与肝纤维化的进展有强关联性。而 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 是肝脏炎症反应的关键炎症因子,常用于评价肝纤维化中因炎症造成肝损伤程度^[7]。

中医认为肝纤维化程度和肝脏产生大量瘀血密切相关,抗肝纤维化治疗过程中可以选用活血化瘀类中药^[8]。鸡矢藤是著名南药之一,广泛生长于琼海,具有活血止痛的功效^[9-11]。已有研究^[12]发现,鸡矢藤可以抑制 TGF- β_1 mRNA 的表达,减缓肝纤维化的进程,但其表达的具体传导通路还有待进一步探究。试验拟对鸡矢藤干预大鼠肝纤维化模型的 TGF- β_1 /Smad 通路进行探究,以期筛选有效抗肝纤维化中药研究提供借鉴案例。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与药物

鸡矢藤颗粒剂:广州一方药业公司;

Trizol 试剂:纯度 99%,美国英杰生命技术有限公司;

白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒:武汉华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 引物序列 引物 TGF- β_1 序列和内参照引物序列参照参考文献^[12]。引物 Smad3 序列:Forward 5' CCAGCCTCTTGATGGTCGT3'; Reverse 5' GGCG-GAAGTTCTGTTAGAAT3'。引物 Smad7 序列:Forward 5' CTTTCGCTTGGGTCAACTCTC3'; Reverse 5' TGGGATCACGCATATATTTCC3'。

1.2.2 动物分组、造模及给药 参考文献^[12]。

1.2.3 Smad3 和 Smad7 mRNA 表达检测 荧光实时定量法^[12]。

1.2.4 TGF- β_1 检测 参考文献^[12]。

1.2.5 血清指标(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)检测 ELISA 法^[13]。

1.3 数据处理

应用 SPSS 17.0 统计软件计量资料采用 ($\bar{X} \pm s$) 表示,组间差异采用单因素方差分析,两两比较可以采用 t 检验。

2 结果及分析

2.1 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平

如表 1 所示,C 组与 A 组差异极显著($P < 0.01$),与 B 组差异显著($P < 0.05$)。说明鸡矢藤对肝纤维化有理想疗效。

表 1 各组大鼠 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平[†]

Table 1 Comparison of IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels in rats in each group ($n = 10$) ng/mL

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
A	16.48 \pm 3.45*	21.02 \pm 6.74*	57.42 \pm 8.12*
B	30.36 \pm 4.36	45.64 \pm 9.64	75.36 \pm 4.21
C	29.38 \pm 3.38 Δ	33.28 \pm 7.85 Δ	64.75 \pm 3.54 Δ

[†] *表示 A 组的各项指标与 B 组和 C 组有极显著差异($P < 0.01$); Δ 表示 B 组的各项指标与 C 组有显著差异($P < 0.05$)。

2.2 各组 TGF- β_1 、Smad3 和 Smad7 的 mRNA 的表达水平

如表 2 所示,对于 TGF- β_1 mRNA 的表达,C 组与 A 组差异显著($t = 2.245, P < 0.05$),与 B 组差异极显著($t = 1.142, P < 0.01$);对于 Smad3 mRNA 的表达,C 组与 A 组

表 2 各组 TGF- β_1 、Smad3 和 Smad7 的 mRNA 的表达水平[†]

Table 2 Comparison of mRNA expression values of TGF- β_1 , Smad3 and Smad7 in each group ($n = 10$)

组别	TGF- β_1 /GAPDH	Smad3/GAPDH	Smad7/GAPDH
A	0.896 2 \pm 0.112 4*	0.905 4 \pm 0.105 6**	2.927 6 \pm 0.190 7***
B	2.875 6 \pm 0.204 4	2.875 6 \pm 0.204 4	3.458 4 \pm 0.114 5
C	1.156 8 \pm 0.105 4 Δ	1.025 0 \pm 0.004 6 $\Delta\Delta$	4.689 1 \pm 0.203 7 $\Delta\Delta\Delta$

[†] *表示 B 组的 TGF- β_1 指标与 C 组比有显著差异($t = 1.142, P < 0.01$), **表示 B 组的 Smad3 指标与 C 组比有显著差异($t = 1.206, P < 0.01$), ***表示 B 组的 TGF- β_1 指标与 C 组比有显著差异($t = 1.007, P < 0.01$); Δ 表示 C 组的 TGF- β_1 指标与 A 组比有差异($t = 2.245, P < 0.05$), $\Delta\Delta$ 表示 C 组的 Smad3 指标与 A 组比有差异($t = 2.149, P < 0.05$), $\Delta\Delta\Delta$ 表示 B 组的 Smad3 指标与 A 组比有差异($t = 2.201, P < 0.05$)。

差异显著($t = 2.149, P < 0.05$), 与 B 组差异极显著($t = 1.206, P < 0.01$); 对于 Smad7 mRNA 的表达, C 组与 A 组差异显著($t = 2.201, P < 0.05$), 与 B 组差异极显著($t = 1.007, P < 0.01$)。说明鸡矢藤可以明显抑制 TGF- β_1 mRNA 和 Smad3 mRNA 的表达, 促进 Smad7 mRNA 的表达。

3 结论

鸡矢藤可以疏肝和胃, 具有一定的活血止痛功效, 在临床中可以起到降酶保肝护肝之效。Smad3 mRNA-(TGF- β_1 mRNA)-Smad7 mRNA 的轴性作用通道在抗肝纤维化的作用机制中发挥着作用。当肝内弥漫性细胞外基质(胶原或非胶原)过度沉积, HSCs 激活并增殖的过程中, 各种致纤维化介质如转化生长因子 β_1 会大量分泌, 由此会促进肝纤维化进一步进展, 具体表现在 Smad3 mRNA 的表达会随之增加。采用鸡矢藤抗肝纤维化的干预治疗后, 各种致纤维化介质如转化生长因子 β_1 会分泌减少, 由此会阻断肝纤维化进一步进展, 具体表现在 Smad7 mRNA 的表达会随之增加。至于是否存在反馈机制, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 吴孟超, 李梦东. 实用肝病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 485-488.
- [2] 袁勇, 林丹. ETV 或 LAM 加 ADV 治疗 HBeAg 阳性慢性乙肝的回顾性分析[J]. 中国热带医学, 2017, 17(1): 101-103.
- [3] TANIGUCHI H, KATO N, OTSUKA M, et al. Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor- β_1 transcription[J]. J Med Virol, 2004, 72: 52.
- [4] SIMÃO A, MADALENO J, SILVA N. Plasma osteopontin is a biomarker for the severity of alcoholic liver cirrhosis, not for hepatocellular carcinoma screening[J]. BMC Gastroenterology, 2015(15): 73.
- [5] SHAWKY ABDELHAMID F, MOHAMED G, ABDEL N, et al. Plasma osteopontin level in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma[J]. Hepatitis Monthly, 2015, 15(9): e30753.
- [6] WADA W, KUWANO H, HASEGAWA Y, et al. The dependence of transforming growth factor- β -induced collagen production on autocrine factor activin A in hepatic stellate cells[J]. Endocrinology, 2004, 145(6): 2753-2759.
- [7] GORDILLO-BASTIDAS D, OCEGUERA-CONTRERAS E, SALAZAR-MONTES A, et al. Nrf2 and Snail-1 in the prevention of experimental liver fibrosis by caffeine[J]. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(47): 9020-9033.
- [8] 陶翠玲, 金春英, 赵艳波, 等. 肝纤康治疗慢性病毒性肝炎肝纤维化痰瘀互结证的临床研究[J]. 中医药学报, 2003, 31(4): 6.
- [9] 上海中医药大学中医文献研究所. 申江医萃续集: 内科名家姜春华学术经验集[M]. 上海: 上海中医药大学出版社, 2003: 147-148.
- [10] 廖建良, 单沛贤. 乌厥、鸡屎藤提取物的抑菌活性研究[J]. 惠州学院学报: 自然科学版, 2016, 36(3): 9-13.
- [11] 韩德承. 活血止痛鸡屎藤[J]. 中国中医药报: 农村与社区版, 2012, 8(30): 5.
- [12] 袁勇. 鸡矢藤颗粒剂干预大鼠肝纤维化模型 OPN 与 TGF- β_1 水平表达的试验研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(8): 16-18.
- [13] 徐礼通, 杨平. 鳖甲煎丸对慢性乙型肝炎早期肝硬化患者血清肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-6 的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2014, 22(1): 13-15.

信息窗

中国首个基于全基因组测序技术的食源性 疾病分子溯源网络建成并投入使用

食源性疾病是全球范围内重要的食品安全问题, 早期发现和查明病因是防控食源性疾病的重要保证。随着新一代基因组测序技术的发展, 基于全基因组测序(WGS)的分子分型技术在食源性疾病聚集性病例识别和暴发溯源调查中已显示出极大的应用价值和发展潜力, 逐渐成为国际研究热点, 欧美相关国家已相继开展研究和布局。

在国家重点研发计划“食品安全关键技术研发”重点专项的支持下, 国家食品安全风险评估中心与中国农业大学和北京中科助腾科技有限公司合作, 以国家

食源性疾病分子溯源网络(TraNet)为基础, 首次建成了基于 WGS 分型技术的新型食源性疾病分子溯源网络, 是中国首个实现国家、省、市三级实际应用的分子溯源网络。目前网络已经在泰国肠炎沙门氏菌暴发病例的跨省溯源、冷冻饮品中单核细胞增生李斯特氏菌的跨省追踪等事件调查中得到成功应用。网络的建成和运行, 为中国食源性疾病暴发的快速调查和精准溯源提供了技术支撑。

(来源: 科技部)