

## 蛇毒血凝酶调控 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路干预肝纤维化

满玉清,董宁霞,董新军,李淑兰

(滨州医学院附属医院药学部,山东 滨州 256603)

**【摘要】** 目的 探讨蛇毒血凝酶如何调控 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路从而干预肝纤维化的发生发展。方法 选取健康清洁级 SD 雄性大鼠 60 只,随机分为正常组、模型组和蛇毒血凝酶实验组各 20 只。模型组和实验组用皮下注射 CCL<sub>4</sub> 诱导肝纤维化大鼠模型为评价载体,正常组皮下注射花生油作为对照,检测血清中 ALT、AST、ALB 含量和 Col-IV、LN 参数,苏木素-伊红(HE)染色测定肝纤维化程度表达,用 RT-PCR 法检测肝组织中 TGF- $\beta$ 1 及 Smad3 水平,Western blot 法测定肝组织 TGF- $\beta$ 1 及 Smad3 蛋白表达。结果 实验组的 HE 染色显示肝纤维化程度好转。正常组和实验组的血清 ALT、AST 和 ALB 含量明显低于模型组大鼠( $P < 0.05$ )。实验组与正常组比较,血清 ALT、AST 和 ALB 含量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。模型组大鼠血清 TCol-IV、LN 参数明显高于正常组和实验组( $P < 0.05$ );实验组与正常组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。实验组与正常组比较,大鼠肝脏组织 TGF- $\beta$ 1 和 Smad3 的表达无明显差异( $P > 0.05$ );实验组 TGF- $\beta$ 1 和 Smad3 的表达高于正常组和模型组( $P < 0.05$ )。与模型组相比,正常组和实验组 TGF- $\beta$ 1 及 Smad3 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ );实验组与正常组比较,TGF- $\beta$ 1 及 Smad3 蛋白表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 蛇毒血凝酶干预能显著改善肝功能,降低肝纤维化程度,提示其作用机制可能与调控肝组织 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路有关。

**【关键词】** 蛇毒血凝酶;肝纤维化;TGF- $\beta$ 1;Smad3

DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2017.05.017

蛇毒血凝酶是一种不含有神经毒素及其他毒素的酶类止血剂,主要是从巴西矛头蝮蛇的毒液中分离、精炼得到<sup>[1]</sup>。蛇毒血凝酶具有类凝血酶样作用,能促进血管破损部位的血小板聚集,并释放一系列凝血因子及血小板因子 3,使凝血因子 I 降解生成纤维蛋白 I 单体,进而交联聚合成难溶性纤维蛋白,促使出血部位的血栓形成和止血<sup>[2]</sup>。蛇毒血凝酶在完整无损的血管内无促进血小板聚集的作用,也不激活血管内凝血因子 X III,因此,它促进的由纤维蛋白 I 单体形成的复合物,易在体内被降解而不致引起弥散性血管内凝血(DIC)<sup>[3]</sup>。肝纤维化是各种肝病期初的共同病理特征。各种原因(如病毒、酒精和寄生虫等)引起的慢性肝损伤,造成以胶原为主的细胞外基质各成分合成增多,然而基质的降解相对不足,导致基质过多沉积在肝内引发肝纤维化<sup>[4]</sup>。若任由其继续发展,肝小叶形成结节,肝细胞坏死,同时肝小叶结构破坏,假小叶形成,进一步病变形成肝硬化<sup>[5]</sup>。本研究显示,蛇毒血凝酶通过调控肝组织 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路,显著改善肝纤维化的程度。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),蛇毒血凝酶(兆科药业有限公

司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京百泰克化学试剂公司,液体石蜡购自天津市福晨化学试剂厂,RIPA 裂解液购自西安百泰克公司,PVDF 膜和 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司,二甲苯购自国药集团化学试剂有限公司,TGF- $\beta$ 1 和 Smad3 单克隆抗体购自美国 SANTA CRUZ 生物技术有限公司,生物素标记的通用型二抗(PV6000)试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司,DAB 显色剂购自北京中杉生物技术有限公司。

**1.2 主要仪器** 智能型全自动生化分析仪,意大利 Crony 公司;STSOIO 全自动染色机,德国徕卡公司;TEC-2800 病理包埋机,意大利 Histo-line 公司;X-ZOZB 轮转式病理切片机,上海华岩仪器设备有限公司;TG16-微量高速台式离心机,湘仪离心机仪器有限公司;Eppendorf 台式大容量高速冷冻离心机 5415D 型,德国 Eppendorf;DYY-6C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;801 凝胶成像分析系统,江苏省捷达科技发展有限公司;ABI9700 扩增仪,美国应用生物系统公司;ABI7000 全自动荧光定量 PCR 仪,美国应用生物系统公司。

**1.3 动物分组** 60 只 SD 大鼠购于北京生命科学研究所以,实验动物许可证号:SYXK(京)2015-0001;温度 23~25℃、相对湿度 40%~60%、光照黑暗各 12 h,自由进食进水。60 只大鼠随机分成对照组、肝纤维化模型组和蛇毒血凝酶治疗组,每组 20 只。肝纤维化模型

作者简介:满玉清,副主任药师,研究方向:临床药理毒理学。

组和蛇毒血凝酶治疗组首次皮下注射纯 CCl<sub>4</sub> 5 ml/kg , 以后改为皮下注射 CCl<sub>4</sub> 4% 花生油溶液 3 ml/kg 体重 , 3 次/d 共 6 周 蛇毒血凝酶治疗组每天静脉注射蛇毒血凝酶 0.2 kU/kg。对照组注射花生油。

**1.4 检测血清指标** 取血清 , 自动生化分析仪检测肝功能指标 ALT、AST 和 ALB 含量 , 放射免疫分析法检测血清 IV 型胶原 CO-IV , 层粘蛋白 LN 参数。

**1.5 HE 染色测定肝纤维化程度** 各组大鼠处死后 , 摘取肝脏后常规甲醛固定、石蜡包埋、连续切片 , 片厚 3~5 μm , HE 染色切片 , 操作步骤按照试剂盒说明书进行 , 上显微镜 ×400 观察心肌组织病变。

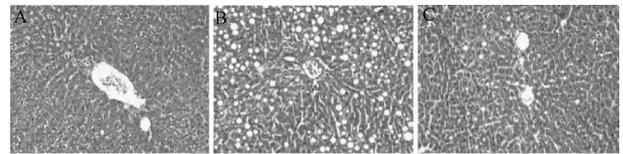
**1.6 RT-PCR 法检测肝组织中 TGF-β1 及 Smad3 mRNA 表达** 各组大鼠处死后 , 提取肝组织 , 制备组织匀浆 , Trizol 试剂提取大鼠肝组织总 RNA , 用紫外分光分析和凝胶电泳检测所提取总 RNA 的质量和浓度。在逆转录酶(MLV)催化下合成 cDNA , 并进行 PCR 扩增。根据人 TGF-β1、Smad3 和 β-actin 基因的 c-DNA 序列。按照引物设计原则 , 用 Primer 5.0 引物设计软件设计引物。β-actin 的上游引物序列: 5'-GCC ATG TAC GTA GCC ATC GA-3' , 下游引物序列: 5'-GAA CCG CTC ATT GCC GAT AG-3' , 产物长度为 375 bp; TGF-β1 的上游引物序列: 5'-GCT CCA CGG AGA ACA GGC TG-3' , 下游引物序列: 5'-CTG CTC CAC CTT GGG CTT GC-3' , 产物长度为 275 bp; Smad3 的上游引物序列: 5'-GCC CAG TTA CCT ACT CGG AGC-3' , 下游引物序列: 5'-TGT TGA CAT TGG AGA GCA GC-3' , 产物长度为 214 bp。PCR 反应体系 cDNA 5 μl 缓冲液 10 μl 探针 probe 1 μl dNTP 0.5 μl H<sub>2</sub>O 32 μl Taq 1.5 μl 正义链引物 10 pmol/μl , 反义链引物 10 pmol/μl , 总反应体系 50 μl , 然后 95 °C 5 min , 95 °C 10 s , 72 °C 15 s , 55 °C 10 s ; 40 个循环。

**1.7 Western blot 法测定肝组织 TGF-β1 及 Smad3 蛋白表达** 取肝组织称重 , 配制含有蛋白酶抑制剂的组织裂解液 RIPA , 将组织放入玻璃套管中 , 按 50 mg 组织加 100 μl 裂解液的比例混匀 , 直至充分裂解。转移至 Ep 放于冰上超声全程 40 s , 超 3 s 停 4 s。充分裂解后 , 12 000 g 离心 10 min 取上清 , 即为蛋白质溶液。BCA 法蛋白定量后 , 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳 , 最后孵育抗体显色观察条带。

**1.8 统计学方法** 运用 SPSS 19.0 统计学软件单因素方差分析 , 数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示 , 多重比较采用 SNK 检验 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

**2 结果**

**2.1 各组大鼠肝组织病理变化** HE 染色结果显示 , 正常组肝细胞以索状排列平整 , 环绕在静脉四周 , 肝小叶结构清晰完整 , 未见病变或坏死 (如图 1A); 模型组肝细胞呈点状排列杂乱 , 肝小叶结构被破坏 , 坏死灶内可见炎症细胞或成纤维细胞 (如图 1B); 实验组肝纤维化程度显著好转 (如图 1C)。



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为实验组。

图 1 各组大鼠 HE 染色的表达

**2.2 各组大鼠 ALT、AST 和 ALB 参数比较** 正常组和实验组的血清 ALT、AST 和 ALB 含量明显低于模型组大鼠 , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) ; 实验组与正常组比较。血清 ALT、AST 和 ALB 含量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) , 见表 1。

表 1 各组大鼠 ALT、AST 和 ALB 参数比较

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALB (g/L)
正常组	35.236 ± 3.821	54.236 ± 9.342	49.562 ± 4.201
模型组	154.967 ± 3.796 * $\Delta$	192.639 ± 12.311 * $\Delta$	26.637 ± 4.204 * $\Delta$
实验组	45.427 ± 3.516	43.132 ± 8.298	47.184 ± 4.318

注: 与正常组比较 , \*  $P < 0.05$ ; 与实验组比较 ,  $\Delta P < 0.05$ ;  $n = 20$ 。

**2.3 各组大鼠血清 TCol-IV、LN 参数的比较** 模型组大鼠血清 TCol-IV、LN 参数明显高于正常组和实验组 , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) ; 实验组与正常组比较 , 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) , 见表 2。

表 2 各组大鼠血清 TCol-IV、LN 参数比较

组别	Col-IV (μg/L)	LN (μg/L)
正常组	10.427 ± 3.462	30.152 ± 8.901
模型组	32.648 ± 3.859 * $\Delta$	64.810 ± 7.106 * $\Delta$
实验组	15.573 ± 4.104	23.692 ± 5.713

注: 与正常组相比 , \*  $P < 0.05$ ; 与实验组相比 ,  $\Delta P < 0.05$ ;  $n = 20$ 。

**2.4 各组大鼠肝组织 TGF-β1 和 Smad3 mRNA 的表达** 实验组与正常组比较 , 大鼠肝脏组织 TGF-β1 和 Smad3 的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) ; 模型组 TGF-β1 和 Smad3 的表达高于正常组和实验组 ( $P < 0.05$ ) , 见表 3。

表 3 各组大鼠肝组织 TGF-β1 和 Smad3 mRNA 的表达

组别	TGF-β1	Smad3
正常组	0.154 ± 0.0021	0.161 ± 0.0048
模型组	0.246 ± 0.0030 * $\Delta$	0.362 ± 0.0057 * $\Delta$
实验组	0.162 ± 0.0019	0.159 ± 0.0020

注: 与正常组相比 , \*  $P < 0.05$ ; 与实验组相比 ,  $\Delta P < 0.05$ 。

2.5 各组大鼠肝组织 TGF- $\beta$ 1 及 Smad3 蛋白表达与模型组相比,正常组和实验组 TGF- $\beta$ 1 及 Smad3 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 实验组与正常组比较; TGF- $\beta$ 1 及 Smad3 蛋白表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 2。

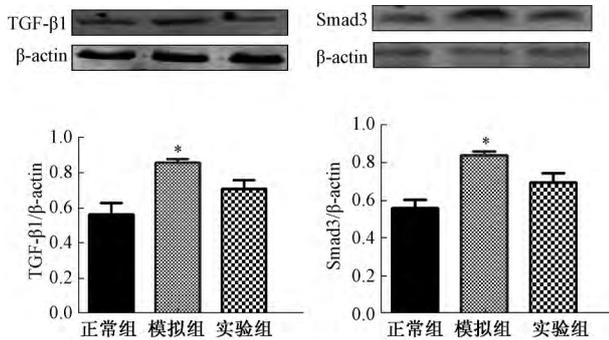


图 2 各组大鼠肝组织 TGF- $\beta$ 1 及 Smad3 蛋白表达

### 3 讨论

肝纤维化 (hepatic fibrosis) 是由于各种慢性的肝损伤引发的肝组织及细胞间的代谢紊乱, 导致肝实质细胞的各种慢性炎症和慢性坏死, 以及细胞间基质的过多产生而致沉积的慢性的病理过程。肝纤维化也被认为是机体对慢性肝损伤的一种自然修复反应, 是发展成肝硬化和肝癌的必经的过程<sup>[6-7]</sup>。肝星状细胞 (HSC) 是肝的重要组成部分, 是参与肝纤维化过程的重要成员, 是细胞外基质的重要来源。当各种慢性损伤因素作用在肝星状细胞时, 其会分化成肌纤维母细胞, 平滑肌肌动蛋白及细胞珠蛋白表达增加, 同时分泌大量的细胞外基质, 形成大量的 I 型和 III 型胶原纤维, 同进一步刺激肌纤维母细胞的增殖, 从而加重肝的纤维化。肝纤维化的主要病变特征是汇管区纤维结缔组织明显的增多, 肝细胞呈点状排列杂乱, 肝小叶结构被破坏, 肝的病理组织学检查目前仍是客观判断有无纤维化和评价肝纤维化病变程度的主要依据<sup>[8-9]</sup>。研究表明, 蛇毒血凝酶实验组在肉眼观察下, 肝表面比较光滑, 质地较均匀。HE 染色切片光学显微镜下发现, 肝细胞排列较整齐, 肝小叶结构比较完整, 有明显的好转。说明蛇毒血凝酶抑制了 CCl<sub>4</sub> 诱导的实验性肝纤维化的形成和发展。血清检测指标 ALT、AST 和 ALB 是显示肝细胞损伤的常用指标, 当用 CCl<sub>4</sub> 诱导大鼠肝纤维化时, ALT、AST 水平升高, ALB 水平降低, Col-IV、LN 水平升高, 说明血清指标模型组造模成功, 当用蛇毒血凝酶进行治疗时, 发现能翻转 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化血清指标, 进一步证实, 蛇毒血凝酶治疗肝纤维化有

显著疗效。

肝纤维化的形成涉及多种细胞及细胞因子之间的相互作用、相互制约, 是一个多因素、多细胞参与的过程。TGF- $\beta$ 1/Smad3 是最重要的众所周知的调控肝纤维化的信号通路<sup>[10-11]</sup>。Wang 和 Lin 等<sup>[12-13]</sup> 研究显示 Smad3 表达增加可以激活 TGF- $\beta$ 1, 进一步导致细胞外基质的大量堆积, 继而造成肝的纤维化。当在星状细胞敲低 Smad3 后发现, TGF- $\beta$ 1 表达增加, 说明被激活, 但是 I 型胶原分泌减少, 提示当敲低或缺失 Smad3 基因时, 小鼠可以抵抗 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化。当在造血干细胞上缺失 Smad3 基因发现 TGF- $\beta$ 1 诱导活化失败, Smads 复合物无法形成, 同时造成转录失败, 进而无法合成分泌胶原和其他细胞外基质, 同样提示 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路在肝纤维化发生发展过程的重要性。Sun 等<sup>[14]</sup> 发现肝纤维化时肝组织 TGF- $\beta$ 1 表达增加, 当用中药和硒治疗时可以被翻转至正常水平, 说明其对肝纤维化有显著的治疗效果。有研究用大鼠反义 I 型受体和 II 型受体重组质粒抑制 TGF- $\beta$ 1 作用受体可以抑制大鼠肝纤维化, 同时羟脯氨酸、I 和 III 型胶原合成均下降。进一步证实 TGF- $\beta$ 1 在肝纤维化的发生发展中具有重要作用。本文研究显示, CCl<sub>4</sub> 诱导模型组中 TGF- $\beta$ 1、Smad3 mRNA 和蛋白水平显著升高, 而蛇毒血凝酶实验组中 TGF- $\beta$ 1、Smad3 mRNA 和蛋白水平恢复至正常组。进一步证实, 蛇毒血凝酶通过调控 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路从而抑制四氯化碳诱导的肝纤维化的发生发展。

综上所述, 蛇毒血凝酶通过调控肝细胞中 TGF- $\beta$ 1/Smad3 信号通路, 抑制肝纤维化的发生发展, 为防治肝纤维化的药物筛选提供新的依据。

### 参考文献

- [1] 黄进, 张晨, 詹菲, 等. 黄芪多糖对肝纤维化大鼠 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(6): 2184-2186.
- [2] 张建伟, 李培潮, 苏东毅, 等. 基于转化生长因子- $\beta$ /Smads 信号传导通路研究鳖甲煎丸防治肝纤维化的作用机制 [J]. 甘肃中医学院学报, 2015, 32(1): 6-9.
- [3] 赵卫华, 王燕红, 丛敏. TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路在肝脏纤维化中的作用研究进展 [J]. 肝脏, 2016, 21(10): 877-879.
- [4] 那坤, 武亮, 李滢, 等. 软肝颗粒对肝纤维化大鼠转化生长因子- $\beta$ 1/Smads 信号通路的影响 [J]. 国际中医中药杂志, 2015, 4(1): 47-51.

(下转第 396 页)

中图分类号: R994.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-3127(2017)05-0396-05

• 综述 •

## 吴茱萸毒理学研究进展

曹思硕, 杜军

(安利(中国)研发中心有限公司, 上海 201203)

关键词: 吴茱萸; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 毒性; 机制; 药物相互作用

DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2017.05.018

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodiarutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Euodiarutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Euodiarutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 干燥近成熟果实。主产于贵州、广西、云南、四川、浙江、湖南和陕西等地。吴茱萸味辛、苦、热, 有小毒, 归肝、脾、胃和肾经。具有散寒止痛, 降逆止呕, 助阳止泻的功效。用于厥阴头痛, 寒疝腹痛, 寒湿脚气, 行经腹痛, 脘腹胀痛, 呕吐吞酸, 五更泄泻的治疗<sup>[1]</sup>。本文针对吴茱萸及其成分的系统毒性、靶器官毒性、毒性机制及药物相互作用等方面总结了近年来国内外学者的研究进展。

作者简介: 曹思硕, 博士, 研究方向: 食品毒理学。

通讯作者: 杜军, 博士, 研究方向: 营养食品研究与开发。

### 1 化学成分

吴茱萸属植物中主要化学成分包括生物碱、香豆素、黄酮类、萜类(主要是苦味素)、色原烷和酰胺等 6 大类<sup>[2]</sup>, 其中吴茱萸碱、吴茱萸次碱为主要药理活性成分。吴茱萸富含挥发油成分, 其中以吴茱萸烯和吴茱萸内酯为主<sup>[3]</sup>。

### 2 现代毒性研究/毒性机制

**2.1 急性毒性** 将 1.00、2.15、4.64 和 10.00 g/kg 吴茱萸水提物或 70% 乙醇提取物灌胃昆明小鼠, 在随后的 7 d 内未观察到中毒及死亡情况<sup>[4]</sup>。仅观察动物死亡情况的试验中, 12.5、25、50 和 150 g/kg 吴茱萸水提

(上接第 395 页)

- [5] 吴薇, 黄燕如, 万毅刚, 等. 尿毒清颗粒调控 TGF- $\beta$ 1/SnoN/Smads 信号通路改善肾衰竭模型鼠肾间质纤维化的作用和机制 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(12): 2291-2297.
- [6] 邱建利. 加味茵陈四逆汤对胆道闭锁肝纤维化的临床疗效及 TGF- $\beta$ 1/Smads 通路研究 [D]. 广州中医药大学, 2015.
- [7] 邵笑, 祝骥, 赵峻峰, 等. 丹参酮 II A 对大鼠肺纤维化细胞 TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2016, 26(5): 414-417.
- [8] 刘勇, 王锐, 施欣辛, 等. TGF- $\beta$ 1/Smads 调控与肾脏纤维化治疗研究进展 [J]. 实用中医药杂志, 2016, 32(10): 1041-1042.
- [9] Qu Y, Zong L, Xu M, et al. Effects of 18alpha-Glycyrrhizin on Tgf-Beta1/Smad signaling pathway in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2): 1292-1301.
- [10] 吴芙蓉, 姜玲, 何晓丽, 等. 橙皮苷对肝星状细胞 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的影响 [J]. 2015, 40(13): 2639-2643.
- [11] Li XM, Peng JH, Sun ZL, et al. Chinese medicine cga formula ameliorates dmn-induced liver fibrosis in rats via inhibiting mmp2/9, timp1/2 and the Tgf-Beta/Smad signaling pathways [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(6): 783-793.
- [12] Wang Y, Lin C, Ren Q, et al. Astragaloside effect on Tgf-Beta1, Smad2/3, and alpha-sma expression in the kidney tissues of diabetic kKay mice [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6): 6828-6834.
- [13] Lin X, Chen Y, Lv S, et al. Gypsophila elegans isoorientin attenuates CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in rats via modulation of nf-kappab and Tgf-Beta1/Smad signaling pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(1): 305-312.
- [14] Sun XE, Zhang XQ, Liu MM. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the Tgf-Beta1/Smad signaling pathway of hepatic stellate [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(3): 8744-8754.

(收稿日期: 2017-02-17)