

铁皮石斛多糖基于Notch信号通路抗大鼠肝纤维化作用及其超声评价

许颖^{1,2}, 罗继娜¹, 杨柳青³, 田纤纤¹, 成家茂^{3*}, 陈海燕^{1,4*}

(1. 大理大学 临床医学院, 云南 大理 671003; 2. 大理白族自治州人民医院, 云南 大理 671000;
3. 大理大学 基础医学院, 云南 大理 671003; 4. 大理大学 第一附属医院, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的:探讨铁皮石斛多糖(DOP)基于Notch信号通路逆转四氯化碳(CCl₄)诱导大鼠肝纤维化(HF)的作用,并采用超声弹性成像技术评价药物疗效。方法:将56只雄性SD大鼠随机分成正常组、模型组、秋水仙碱组、扶正化瘀组、DOP低、中、高剂量组,每组8只。模型组及各给药组均皮下注射CCl₄-橄榄油(2:3)混合液,每3 d注射1次,共10周。造模6周后,各给药组分别给予秋水仙碱(1×10^{-4} g·kg⁻¹)、扶正化瘀胶囊粉(0.45 g·kg⁻¹)和低、中、高剂量DOP(0.05、0.1、0.2 g·kg⁻¹)连续灌胃4周,每日1次。采用苏木素-伊红(HE)和马松(Masson)染色观察大鼠肝组织的病理形态学改变。采用全自动生化分析仪分析血清肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆汁酸(TBA)和碱性磷酸酶(ALP)水平;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清肝纤四项指标透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)、Ⅳ型胶原(Col-Ⅳ)含量。分别采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肝组织中的 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、Notch1、Jagged1、Hes1的mRNA和蛋白表达。采用声辐射力脉冲(ARFI)弹性成像技术获取大鼠肝脏的杨氏模量(YM),观察DOP用药前后YM的变化,并分析YM与肝纤四项、肝组织中 α -SMA和Notch1信号通路相关因子蛋白的相关性。结果:与正常组比较,模型组大鼠的肝组织病理检查结果显示,肝组织肝细胞索排列紊乱,炎性细胞浸润明显,出现大量的脂肪空泡和纤维组织增生;大鼠的血清肝功能和肝纤四项表达均显著升高($P < 0.01$);大鼠肝组织中的 α -SMA、Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA和蛋白相对表达量均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠肝组织的假小叶及汇管区胶原纤维沉积均有不同程度改善;除DOP低剂量组大鼠的血清ALT水平变化不明显外,各给药组均能显著降低大鼠的血清肝功能和肝纤四项表达,并显著降低大鼠肝组织中的 α -SMA、Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA和蛋白的相对表达量,以DOP高剂量组最为明显($P < 0.05$, $P < 0.01$)。ARFI超声评价及相关性分析结果显示,给药后,与正常组比较,模型组肝组织的YM显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组的肝组织YM均显著下降($P < 0.01$);且YM与HA、LN、PC-Ⅲ及 α -SMA、Notch1、Jagged1和Hes1蛋白均呈强正相关(r 分别为0.754、0.734、0.801、0.885、0.896、0.757、0.800, $P < 0.01$),仅与Col-Ⅳ呈中等正相关($r = 0.688$, $P < 0.01$)。结论:DOP可通过下调Notch1/Jagged1/Hes1信号通路逆转HF。YM有利于DOP抗HF程度和疗效的评估。

[关键词] 铁皮石斛多糖; 肝纤维化; Notch信号通路; 超声评价; 杨氏模量

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)21-0070-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20241206

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240827.1635.001>

[网络出版日期] 2024-08-28 12:10:06

Effect of *Dendrobium officinale* Polysaccharides in Reversing Hepatic Fibrosis in Rats via Notch Signaling Pathway and Ultrasound Evaluation

XU Ying^{1,2}, LUO Jina¹, YANG Liuqing³, TIAN Qianqian¹, CHENG Jiamao^{3*}, CHEN Haiyan^{1,4*}

(1. School of Clinical Medicine, Dali University, Dali 671003, China; 2. Dali Bai Autonomous Prefecture People's Hospital, Dali 671000, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Dali University, Dali

[收稿日期] 2024-06-25

[基金项目] 云南省地方本科高校基础研究联合专项资金面上项目(202101BA070001~101);大理市科技项目(2022KBG007, 2022KBG019);云南省教育厅科学研究基金项目(2023Y0962)

[第一作者] 许颖, 硕士, 从事肝纤维化基础及超声应用研究, E-mail: 2636398556@qq.com

[通信作者] * 陈海燕, 副教授, 从事超声诊断及基础研究, E-mail: 316573230@qq.com;

* 成家茂, 教授, 从事中医药抗肝纤维化作用机制研究, E-mail: chjmao@163.com

671003, China; 4. The First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Dendrobium officinale* polysaccharides (DOP) in reversing carbon tetrachloride (CCl_4)-induced hepatic fibrosis (HF) in rats via the Notch signaling pathway and evaluate the therapeutic effect of DOP by ultrasound elastography. **Method:** Fifty-six male SD rats were randomized into normal, model, colchicine ($1 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), Fuzheng Huayu powder ($0.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and low-, medium-, and high-dose ($0.05, 0.1, 0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) DOP groups ($n=8$). The rats in the model group and each treatment group were injected subcutaneously with a mixture of CCl_4 -olive oil (2:3) once every 3 days for 10 weeks. After 6 weeks of modelling, the rats were administrated with corresponding drugs once a day for 4 weeks. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were employed to observe the pathomorphological changes of the liver tissue. An automatic biochemical analyzer was used to measure the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and total bile acids (TBA). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure the serum levels of hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen (PC-III), and type IV collagen (Col-IV). The mRNA and protein levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), Notch1, Jagged1, and Hes1 in the liver tissue were determined by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. The Young's modulus (YM) of the rat liver was measured by acoustic radiation force impulse (ARFI) elastography before and after treatment. Then, the correlations of YM with the serum levels of HA, LN, PC-III, and Col-IV and the protein levels of α -SMA and Notch1 signaling pathway-related factors in the liver tissue were analyzed. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed disordered arrangement of liver cell cords, obvious infiltration of inflammatory cells, appearance of a large number of fat vacuoles, and fibrous proliferation, elevated levels of ALT, AST, TBA, ALP, HA, LN, PC-III, and Col-IV in the serum, and up-regulated mRNA and protein levels of α -SMA, Notch1, Jagged1, and Hes1 in the liver tissue ($P<0.01$). Compared with the model group, drug interventions alleviated the pseudolobule formation and the collagen deposition in confluent areas. Except that the serum level of ALT in the low-dose DOP group had no significant changes, drug interventions, especially high-dose DOP, lowered the levels of ALT, AST, TBA, ALP, HA, LN, PC-III, and Col-IV in the serum and down-regulated the mRNA and protein levels of α -SMA, Notch1, Jagged1, and Hes1 in the liver tissue ($P<0.05, P<0.01$). The results of ARFI and correlation analysis showed that the YM of the liver tissue was increased in the model group ($P<0.01$) compared with that in the normal group. Compared with the model group, drug interventions decreased YM ($P<0.01$). YM was positively correlated with the expression levels of HA, LN, PC-III, α -SMA, Notch1, Jagged1, and Hes1 ($r=0.754, 0.734, 0.801, 0.885, 0.896, 0.757, \text{ and } 0.800$, respectively, $P<0.01$), and it had a moderate correlation with Col-IV ($r=0.688, P<0.01$). **Conclusion:** DOP can reverse HF by down-regulating the Notch1/Jagged1/Hes1 signaling pathway. YM can be used as an indicator in the assessment of the efficacy of DOP against HF.

[Keywords] *Dendrobium officinale* polysaccharides; hepatic fibrosis; Notch signaling pathway; ultrasound evaluation; Young's modulus

肝纤维化(HF)是一个分子、细胞和组织高度整合的动态过程,并由肌成纤维细胞维持细胞外基质(ECM)成分的过度积累^[1]。负责HF形成的主要细胞为肝星状细胞(HSCs),其在炎症刺激或肝细胞死亡反应中发生活化并向肌成纤维细胞转化,所表达的 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)可作为鉴定活化HSCs的最显著标志物^[2]。ECM成分的交联,尤其

是纤维胶原和弹性蛋白,与纤维化进展及对纤维化逆转的抵抗密切相关^[3]。Notch通路是控制细胞增殖、分化、凋亡、再生和其他细胞活动的基本且高度保守的通路^[4],在HF过程中对HSCs的活化起关键作用^[5]。早期发现并及时明确诊断和评估HF程度可通过有效治疗来延缓甚至逆转其病程进展。弹性成像已成为临床评估HF的首选非侵入性成像技

术。其中,声辐射力脉冲(ARFI)弹性成像是一种定量诊断HF并进行分期的超声弹性成像技术^[6]。目前尚无明确可用于抗HF的特效药物,但中医药因其具有多渠道、多层次、多靶点的综合药理作用,在治疗HF方面具有独特优势^[7]。铁皮石斛是一种天然的名贵中药,其主要活性物质铁皮石斛多糖(DOP)具有护肝、抗氧化、抗炎、提高免疫力等作用^[8]。本研究团队前期发现,DOP可通过调控大鼠肝组织中的转化生长因子- β (TGF- β)^[9]、Hedgehog^[10]、Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)^[9]信号通路和抑制上皮-间质转化达到抗HF作用^[11],但未见报道其抗HF机制是否与Notch信号通路有关。本研究主要探讨Notch信号通路在DOP抗HF作用中的机制,并运用ARFI评价HF程度及其干预效果。

1 材料

1.1 动物 SD雄性大鼠56只,7~8周龄,体质量150~200 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2019-0004。室温下自由进食饮水,适应性喂养1周后开始实验。所有实验符合大理大学实验动物伦理要求(编号2022-PZ-124),并严格遵循“减少(reduction)、替代(repIacement)、优化(refinement)”3R原则。

1.2 药物及试剂 四氯化碳(CCl_4 ,广东西陇科学股份有限公司,批号2203242);秋水仙碱片(云南植物药业有限公司,批号20221101,规格0.5 mg/片);扶正化瘀胶囊(上海黄海制药有限责任公司,批号211138,规格0.3 g/粒);DOP(宁夏香草生物技术有限公司,批号XC221015,纯度50%);苏木素-伊红(HE)、马松(Masson)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1120、G1340);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)血清检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为C009-2-1、C010-2-1、A059-2-2);总胆汁酸(TBA)血清测定试剂盒(深圳雷社生命科学股份有限公司,批号S03074);透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)、Ⅳ型胶原(Col-Ⅳ)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为ml003310、ml102831、ml028349、ml058918);总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号DP419);RIPA裂解液(强)、BCA蛋白定量检测试剂盒、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、HRP标记山羊抗小鼠IgG、Hes1一抗(武汉塞维尔生物科技有限公司,

批号分别为G2002-100ML、G2026-200T、GB23301、GB23303、GB11002、GB112254-100UL);Notch1、 α -SMA兔一抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为10062-2-AP、14395-1-AP);Jagged1鼠一抗(上海圣克鲁斯生物技术有限公司,批号sc-390177)。

1.3 仪器 KB0801003型光学显微镜(日本奥林巴斯公司);Chemray800型全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技);5804 R型冷冻型台式高速离心机(德国艾本德公司);YD-6L型生物石蜡包埋机、YD-6L型生物组织冷冻台(益迪医疗设备有限公司);RM-2126型石蜡切片机(德国徕卡公司);infinite 200型连续波长酶标仪(瑞士帝肯公司);CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Detection System、Mini-Protein型垂直电泳槽和电泳仪、XRS+型凝胶化学发光成像系统(美国伯乐公司);阿波罗500型彩色多普勒超声诊断仪(日本东芝公司)。

2 方法

2.1 造模及分组 56只雄性SD大鼠被随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组($1 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、扶正化瘀组($0.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)及DOP低、中、高剂量组(0.05 、 0.1 、 $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。本实验参考2020年版《中华人民共和国药典》记载的成人铁皮石斛用量(每天6~12 g),换算大鼠DOP(纯度50%)的等效用量:以成人铁皮石斛每天服用6 g、成人平均体质量70 kg、成人体表面积换算比为6.3进行换算,换算公式为($6 \text{ g}/70 \text{ kg}$) $\times 6.3 \times 50\% \approx 0.27 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。本研究团队预实验发现DOP在室温下的溶解率较低,结合前期研究干预效果^[11],故选取 $0.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为高剂量组浓度,然后设置依次递减的不同剂量进行干预,观察DOP对相关检测指标的影响。模型组及各给药组皮下注射 CCl_4 -橄榄油(2:3)混合液,首剂 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,之后每次 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每3 d注射1次,共10周;正常组大鼠给予等量橄榄油注射^[11]。

2.2 药物干预 所有药物用0.9%生理盐水(NS)配制, 4°C 保存备用。6周后给予相应药物连续灌胃,除秋水仙碱组每只 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 外,其余给药组均为每只 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天1次,共4周。正常组、模型组大鼠给予等量0.9% NS灌胃。

2.3 肝脏样本采集 第10周末禁食12 h后,2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。经腹主动脉抽血置于无菌离心管中,室温静置40 min后, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径10.7 cm)离心15 min,取上层血清置于 4°C 冰箱中保存备用。用0.9% NS自门静脉快速冲洗肝中

血液,剪取肝脏,洗净肝表面并去除肝包膜和周围残留组织后,滤纸吸干。称量肝脏质量,取肝中、外叶置于4%甲醛室温固定48 h以上,剩余组织迅速液氮冷冻后置于-80℃冰箱保存。

2.4 肝组织病理学检查 取肝叶切块,大小约1 cm×1 cm×1.5 cm,行常规脱水、石蜡包埋后以5 μm厚度连续切片,分别行HE、Masson染色,光镜下观察。

2.5 肝功能指标检测 按试剂盒说明书严格操作,采用全自动酶标仪测定血清中ALT、AST、AKP水平,使用深圳雷杜生命科技全自动生化分析仪检测血清总胆汁酸(TBA)水平。

2.6 HF指标检测 按照ELISA试剂盒说明书检测血清中的HA、LN、PC-Ⅲ、Col-Ⅳ含量,用样品稀释液将血清稀释5倍,分别设置标准品孔、空白孔、各组样品孔,每孔设置3个复孔。在λ=450 nm下,依序测量各孔的吸光度A,按照说明书计算HA、LN、PC-Ⅲ、Col-Ⅳ的血清相对含量。

2.7 Real-time PCR法检测α-SMA、Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA表达 称取肝组织50 mg,按照总RNA提取试剂盒提取肝组织总RNA。取总RNA 2 μg逆转录成cDNA,以β-actin为内参,β-actin和α-SMA引物序列均由武汉塞维尔生物科技有限公司设计并合成,Notch信号通路相关因子Notch1、Jagged1、Hes1的引物序列源自文献[12-13],并由北京擎科生物科技股份有限公司合成。引物序列见表1。扩增条件为95℃预变性30 s,95℃变性15 s,60℃退火30 s,共40个循环。扩增产物运用2^{-ΔΔC_t}法计算各目的mRNA的相对表达量。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
α-SMA	上游 ACCATCGGGAATGAACGCTT	191
	下游 CTGTCAGCAATGCCTGGGTA	
Notch1	上游 TGGATGAGGAAGACAAGCATT	136
	下游 GAAAAGCCACCGAGATAGTCAG	
Jagged1	上游 GAGACCTCCTCGGGCTTTGA	144
	下游 GCACACGCACTTGAATCCAT	
Hes1	上游 CAAGCTGGAGAAGGCAGACAT	143
	下游 CCTCGTTTCATGCACTCGCTG	
β-actin	上游 TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG	240
	下游 GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG	

表达 称量肝组织100 mg,将各组样本充分裂解,12 000 r·min⁻¹(离心半径9.5 cm)离心15 min,取上清液待用。使用BCA试剂盒进行大鼠肝组织蛋白含量的测定,按样本最低浓度将各样本总蛋白浓度配平。各取加入上样缓冲液5 μL,以10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳(200 V,40 min)。电泳结束后,置于TBST液中洗膜3次,5%脱脂奶粉封闭1 h,再洗膜3次去除残留液,分别加入一抗GAPDH(1:1 000)、α-SMA(1:5 000)、Notch1(1:500)、Jagged1(1:500)和Hes1(1:500),4℃孵育过夜。次日洗膜3次,分别加入二抗HRP标记山羊抗兔或小鼠IgG(1:3 000),室温孵育1 h,再洗膜3次后,滴加ECL显色液200 μL曝光成像。以GAPDH为内参,应用Image J软件对目的条带进行灰度分析,计算各目的蛋白的相对表达量。

2.9 超声检测 造模6周及灌胃4周后分别对大鼠称重,用2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,仰卧位固定,电动剃发刀备皮消毒。应用东芝Aplio 500彩色多普勒超声诊断仪,选用L5-14线阵探头(PLT-1204BT型号),频率12 MHz。在ARFI模式下,避开肝脏的包膜及大血管,将感兴趣区域置于肝中叶或右叶,直径约3 mm,得出剪切波速度(SWV)值,运用公式 $E=3\rho v^2$ 转换为杨氏模量(YM) $E^{[14]}$,以kPa为单位。

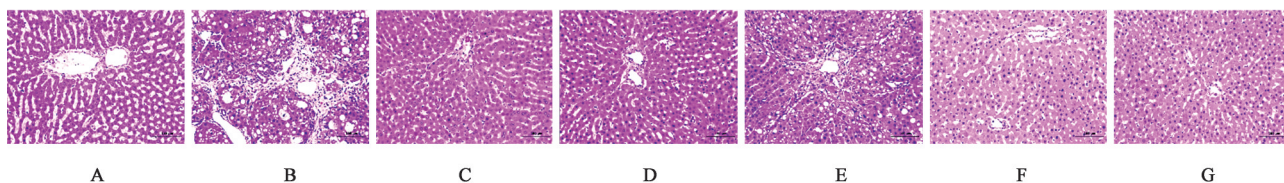
2.10 统计学方法 采用SPSS 27.0统计软件进行数据分析。计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者采用最小显著性差异法(LSD)检验,不齐者采用Tambane's T2检验法。相关性分析采用Spearman法,几乎无、弱、中等、强、高度强相关的系数绝对值(r)分别为0.00~0.10、0.10~0.39、0.40~0.69、0.70~0.89、0.90~1.00^[15], $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 DOP对肝组织病理学的影响

3.1.1 HE染色 正常组大鼠的肝小叶完整,肝细胞大小形态正常且排列有序,肝细胞索呈放射状排列。模型组大鼠的肝小叶结构被大量破坏,肝细胞索排列紊乱,炎性细胞浸润明显,可见大小不等的脂肪空泡和假小叶形成,汇管区出现大量纤维组织增生并形成纤维间隔。与模型组比较,各给药组大鼠的肝脏结构得到不同程度修复,脂肪空泡和假小叶明显减少,炎性细胞浸润和纤维组织增生明显减轻。见图1。

3.1.2 Masson染色 Masson染色结果显示,正常组大鼠的肝小叶结构清晰,细胞排列有序,仅在中



注:A.正常组;B.模型组;C.秋水仙碱组;D.扶正化瘀组;E~G.DOP低、中、高剂量组(图2-图3同)

图1 DOP对HF大鼠肝组织病理学的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of DOP on hepatic histopathology in HF rats (HE, ×200)

央静脉和汇管区有少量蓝染的胶原纤维。模型组大鼠的汇管区有大量蓝染的胶原纤维,纤维间隔明显增宽、不规则,伸入肝小叶将其分隔成大小不等

的假小叶;与模型组比较,各给药组的蓝染胶原纤维明显变细、变薄,纤维间隔缩小、变窄,假小叶形成得到改善。见图2。

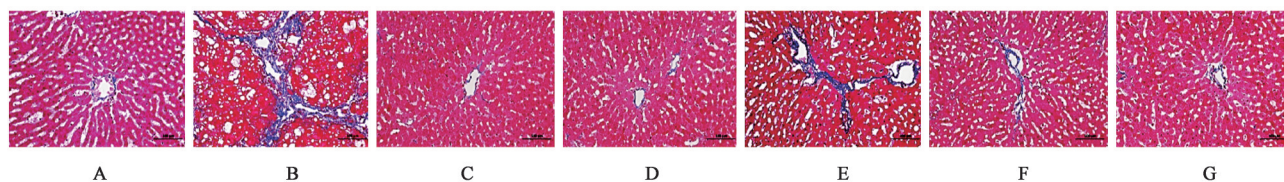


图2 DOP对HF大鼠肝组织病理学的影响(Masson,×200)

Fig. 2 Effect of DOP on hepatic histopathology in HF rats (Masson, ×200)

3.2 DOP对肝功能血清学指标的影响 与正常组比较,模型组大鼠的血清ALT、AST、TBA和ALP水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,除DOP低

剂量组大鼠的血清ALT水平变化差异无统计学意义外,其余各给药组大鼠的血清ALT、AST、TBA、ALP水平均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。见表2。

表2 DOP对HF大鼠血清肝功能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 2 Effect of DOP on serum hepatic function in HF rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

U·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ALT	AST	TBA	ALP
正常组		4.60±0.65	16.80±6.15	4.55±1.60	21.93±6.94
模型组		20.52±5.98 ¹⁾	77.84±8.83 ¹⁾	26.31±4.66 ¹⁾	78.86±20.53 ¹⁾
秋水仙碱组	0.000 1	8.02±2.18 ³⁾	33.99±7.63 ³⁾	7.33±1.61 ³⁾	25.65±7.90 ³⁾
扶正化瘀组	0.45	6.98±1.70 ³⁾	31.86±6.49 ³⁾	8.58±3.14 ³⁾	23.78±9.44 ³⁾
DOP低剂量组	0.05	13.27±2.02	63.41±6.71 ³⁾	16.02±2.68 ³⁾	44.14±3.67 ²⁾
DOP中剂量组	0.1	9.53±1.62 ²⁾	45.63±7.58 ³⁾	9.94±2.53 ³⁾	30.49±3.61 ³⁾
DOP高剂量组	0.2	7.28±1.35 ³⁾	23.16±2.32 ³⁾	9.84±1.61 ³⁾	25.50±8.01 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表3-表6同)

3.3 DOP对血清肝纤四项的影响 与正常组比较,模型组大鼠的血清HA、LN、PC-Ⅲ、Col-Ⅳ水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠的血清HA、LN、PC-Ⅲ、Col-Ⅳ水平均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。见表3。

3.4 DOP对大鼠肝组织中 α -SMA、Notch1、Jagged1、Hes1 mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织中的 α -SMA、Notch1、Jagged1和Hes1 mRNAs表达水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,除DOP低剂量组的Notch1 mRNA表达水平明显下降($P<0.05$),其余给药组的mRNA表达水平均显著下降($P<0.01$)。见表4。

3.5 DOP对大鼠肝组织中 α -SMA、Notch1、Jagged1、Hes1蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织中的 α -SMA、Notch1、Jagged1和Hes1蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,除秋水仙碱组的Notch1蛋白表达水平明显下降($P<0.05$),其余给药组的蛋白表达水平均显著下降($P<0.01$)。见表5、图3。

3.6 DOP对HF大鼠超声检测指标的影响

3.6.1 杨氏模量的变化 用药前,与正常组比较,模型组及各给药组的YM均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组的YM比较差异无统计学意义。用药后,与正常组比较,模型组的YM仍显著升

表3 DOP对HF大鼠血清肝纤四项指标的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of DOP on four results of hepatic fibrosis in serum of HF rats ($\bar{x}\pm s, n=8$) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$					
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	HA	LN	PC-Ⅲ	Col-Ⅳ
正常组		488.44±27.49	325.38±22.65	57.28±3.52	123.40±8.76
模型组		649.73±20.74 ¹⁾	549.86±10.61 ¹⁾	104.10±3.33 ¹⁾	178.80±12.81 ¹⁾
秋水仙碱组	0.000 1	529.07±14.64 ³⁾	377.03±23.84 ³⁾	81.96±8.68 ³⁾	138.52±5.14 ³⁾
扶正化瘀组	0.45	515.49±37.07 ³⁾	383.45±26.59 ³⁾	69.30±14.99 ³⁾	136.32±3.77 ³⁾
DOP低剂量组	0.05	578.53±32.81 ³⁾	433.64±22.34 ³⁾	96.13±2.05 ³⁾	153.84±8.29 ²⁾
DOP中剂量组	0.1	544.01±21.23 ³⁾	364.21±8.92 ³⁾	89.58±1.85 ³⁾	140.64±3.86 ³⁾
DOP高剂量组	0.2	516.43±28.67 ³⁾	357.13±25.20 ³⁾	74.82±12.14 ³⁾	138.41±4.50 ³⁾

表4 DOP对HF大鼠肝组织中 α -SMA和Notch1信号通路相关因子mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of DOP on mRNAs expressions of α -SMA and Notch1 signaling pathway factors in hepatic tissues of HF rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)					
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	α -SMA	Notch1	Jagged1	Hes1
正常组		1.01±0.04	1.01±0.17	0.90±0.16	1.02±0.13
模型组		6.73±0.80 ¹⁾	8.35±2.17 ¹⁾	2.78±0.41 ¹⁾	11.18±1.92 ¹⁾
秋水仙碱组	0.000 1	2.51±0.44 ³⁾	1.48±0.53 ³⁾	1.11±0.31 ³⁾	1.45±0.47 ³⁾
扶正化瘀组	0.45	2.10±0.38 ³⁾	1.23±0.67 ³⁾	1.21±0.23 ³⁾	2.45±0.66 ³⁾
DOP低剂量组	0.05	3.62±0.36 ³⁾	4.88±1.07 ²⁾	1.51±0.13 ³⁾	6.10±1.47 ³⁾
DOP中剂量组	0.1	2.64±0.49 ³⁾	2.85±0.99 ³⁾	1.08±0.22 ³⁾	1.14±0.74 ³⁾
DOP高剂量组	0.2	1.47±0.10 ³⁾	1.11±0.56 ³⁾	0.94±0.32 ³⁾	1.06±0.42 ³⁾

表5 DOP对HF大鼠肝组织中 α -SMA和Notch1信号通路相关因子蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 5 Effect of DOP on protein expressions of α -SMA and Notch1 signaling pathway factors in hepatic tissues of HF rats ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	α -SMA /GAPDH	Notch1 /GAPDH	Jagged1 /GAPDH	Hes1 /GAPDH
正常组		0.15±0.02	0.22±0.04	0.37±0.11	0.31±0.13
模型组		1.73±0.06 ¹⁾	1.69±0.02 ¹⁾	1.55±0.10 ¹⁾	1.36±0.04 ¹⁾
秋水仙碱组	0.000 1	0.47±0.08 ³⁾	0.71±0.20 ²⁾	1.00±0.08 ³⁾	0.55±0.10 ³⁾
扶正化瘀组	0.45	0.35±0.12 ³⁾	0.59±0.12 ³⁾	1.12±0.16 ³⁾	0.84±0.07 ³⁾
DOP低剂量组	0.05	0.98±0.10 ³⁾	1.34±0.04 ³⁾	1.24±0.04 ³⁾	1.06±0.06 ³⁾
DOP中剂量组	0.1	0.52±0.04 ³⁾	1.05±0.02 ³⁾	0.83±0.13 ³⁾	0.54±0.04 ³⁾
DOP高剂量组	0.2	0.18±0.02 ³⁾	0.45±0.03 ³⁾	0.81±0.07 ³⁾	0.46±0.03 ³⁾

高($P<0.01$),而各给药组的YM升高得到缓解;与模型组比较,各给药组的YM均显著下降($P<0.01$)。见表6。

3.6.2 杨氏模量与肝纤四项、 α -SMA和Notch1信号通路相关因子蛋白的相关性分析结果 YM与Col-Ⅳ呈中等正相关($r=0.688, P<0.01$),与HA、LN、PC-Ⅲ、 α -SMA、Notch1、Jagged1、Hes1的表达均呈

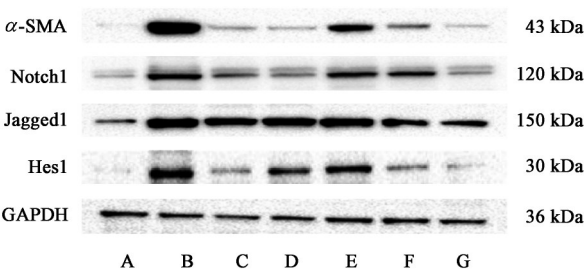


图3 各组大鼠肝组织中 α -SMA、Notch1、Jagged1、Hes1蛋白电泳
Fig. 3 Electrophoresis of α -SMA, Notch1, Jagged1 and Hes1 proteins from rat hepatic tissues in each group

表6 DOP对HF大鼠用药前后肝组织杨氏模量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 6 Effect of DOP on Young's modulus of rat hepatic tissues in each group before and after administration in HF rats ($\bar{x}\pm s, n=8$) kPa

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	给药前YM	给药后YM
正常组		4.01±0.54	4.11±0.55
模型组		11.15±0.88 ¹⁾	11.35±1.02 ¹⁾
秋水仙碱组	0.000 1	11.06±0.70 ¹⁾	5.68±1.02 ³⁾
扶正化瘀组	0.45	11.03±1.14 ¹⁾	5.73±0.82 ³⁾
DOP低剂量组	0.05	11.09±0.81 ¹⁾	7.89±1.08 ³⁾
DOP中剂量组	0.1	11.11±0.88 ¹⁾	6.49±0.55 ³⁾
DOP高剂量组	0.2	11.04±0.92 ¹⁾	5.54±0.57 ³⁾

强正相关(r 分别为0.754、0.734、0.801、0.885、0.896、0.757、0.800, $P<0.01$)。

4 讨论

HF是各种因素导致慢性肝损伤后,引起HSCs异常激活、肝组织内ECM过度沉积、肝脏正常结构破坏为主要特征的一种病理性疾病^[16]。当肝细胞受到刺激损伤时,ALT、AST、TBA将释放入血清中引起相关指标升高^[17]。而血清HA、LN、PC-Ⅲ和Col-Ⅳ是无创评估HF的4种主要血清标志物^[18]。本研究结果示模型组大鼠肝组织的肝小叶结构被破坏,汇管区有大量的胶原纤维增生,肝功能受损,肝纤四项水平显著升高,提示大鼠HF模型的成功建立,DOP干预后,大鼠的肝组织病理形态有不同程度的改善,大鼠血清肝功能及肝纤四项水平均有所下降,表明DOP可以改善CCl₄诱导的肝损伤,减轻大鼠HF的程度。

Notch信号通路是一个高度保守的通路,它与许多纤维化的过程都有关联,如HF、肺纤维化、肾纤维化等,在调节HF的形成过程中可涉及肝内多种不同类型的细胞,且与其他信号通路之间存在密切的相互作用^[19-20]。TGF- β_1 作为HF的关键调节因子,对HSCs的活化起到诱导作用^[21],并通过激活小鼠的HSCs,导致Notch信号通路相关因子Notch1、Jagged1和Hes1的高水平表达^[22]。且Notch1蛋白在矽肺肉芽肿中的蛋白表达明显增加^[23];Notch信号通路的配体Jagged1 mRNA和蛋白表达水平在肺纤维化组织标本中均异常上调^[24]。研究表明抑制Notch通路的激活可在体内外发挥强大的抗HF作用^[25]。DOP作为一种具有减轻肝损伤的铁皮石斛的活性成分,在CCl₄诱导的大鼠HF模型中,可抑制LPS/TLR4/NF- κ B信号通路的激活,减少TGF- β 和肿瘤坏死因子- α 的表达,以及显著降低 α -SMA和I型胶原蛋白的表达来预防HF^[26-27]。另外DOP还可能通过下调Notch1/Hes1信号通路来发挥抗矽肺小鼠肺纤维化的作用^[28]。本研究中CCl₄诱导的HF大鼠肝组织中 α -SMA、Notch1、Jagged1和Hes1 mRNAs及蛋白表达明显上调,而DOP干预后,DOP干预组 α -SMA及Notch1信号通路相关因子的mRNAs和蛋白表达均下降,且DOP高剂量组下降更加显著,提示DOP可能通过下调Notch1/Jagged1/Hes1信号通路来发挥抗HF作用。

ARFI是一种通过测量SWV对肝脏组织硬度进行评估的非侵入性方法,可用于区分非酒精性脂肪肝炎(NASH)和非NASH大鼠,并对NASH大鼠的HF程度进行分期^[29]。YM是单因素预测HF严重程度能力最大的指标^[30],在肝硬化患者中,ARFI检

测的肝实质硬度值(LS)与Child-Pugh(CP)评分呈正相关,且二者之间的相关性显著强于HA、LN、PC-Ⅲ、Col-Ⅳ与CP评分之间的相关性^[31]。另有研究发现,肝脏硬度值(LSM)与不同程度HF大鼠肝组织中的胶原比例面积具有良好的线性相关^[32]。本研究中,大鼠肝脏的YM在HF时显著升高,DOP干预后,YM显著下降,且与肝纤四项及Notch1、Jagged1、Hes1和 α -SMA蛋白表达成正相关,表明YM与HF程度密切相关,与多项指标联合应用可能成为HF诊断和动态监测的有效评估方法。

综上,DOP具有良好的抗HF的效果,对大鼠肝脏组织起到保护作用,其作用机制可能与下调Notch1/Jagged1/Hes1信号通路有关。YM可用于DOP抗HF程度和疗效的评估。本研究在体内实验中初步验证了DOP可能通过下调Notch1/Jagged1/Hes1信号通路来发挥抗HF的作用,未来将在体外实验中对DOP抗HF的作用机制进行深入探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[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] KHOMICH O, IVANOV A V, BARTOSCH B. Metabolic hallmarks of hepatic stellate cells in liver fibrosis[J]. Cells, 2019, 9(1): 24.
- [3] CHEN W, YANG A, JIA J, et al. Lysyl oxidase (LOX) family members: Rationale and their potential as therapeutic targets for liver fibrosis[J]. Hepatology, 2020, 72(2): 729-741.
- [4] ZHOU B, LIN W, LONG Y, et al. Notch signaling pathway: Architecture, disease, and therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 95.
- [5] BANSAL R, VAN BAARLEN J, STORM G, et al. The interplay of the Notch signaling in hepatic stellate cells and macrophages determines the fate of liver fibrogenesis[J]. Sci Rep, 2015, 5: 18272.
- [6] HITTALAMANI I M, LAKHKAR B B, PATTANASHETTI R C, et al. Acoustic radiation force impulse elastography of liver as a screening tool for liver fibrosis in alcoholic liver disease[J]. Indian J Radiol Imaging, 2019, 29(2): 190-194.
- [7] LI H. Advances in anti hepatic fibrotic therapy with traditional Chinese medicine herbal formula [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 251: 112442.
- [8] GUO L, QI J, DU D, et al. Current advances of

- Dendrobium officinale* polysaccharides in dermatology: A literature review [J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 664-673.
- [9] 范钦, 钱慧, 李红俊, 等. 铁皮石斛多糖抗肝纤维化作用及其机制研究[J]. 解剖学研究, 2022, 44(6): 511-518.
- [10] 卜文超. 滇产铁皮石斛对CCl₄损伤肝纤维化模型大鼠Hh信号通路的调节作用[D]. 大理: 大理大学, 2019.
- [11] 杨柳青, 范钦, 白雅洁, 等. 铁皮石斛多糖通过上皮-间质转化抗肝纤维化[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2024, 45(1): 76-84.
- [12] 衣晓娜, 姜英俊, 赵文君, 等. Notch信号通路对大鼠肝纤维化作用及药物干预价值[J]. 青岛大学医学院学报, 2015, 51(3): 335-337.
- [13] 张明昊, 郭申, 杜婧雯, 等. 灯盏花素通过调控LKB1/AMPK和Notch1/Jagged1通路改善高脂血症大鼠血脂水平及肝肾功能的作用机制研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(6): 2340-2352.
- [14] DIETRICH C F, BAMBER J, BERZIGOTTI A, et al. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of liver ultrasound elastography, update 2017 (long version) [J]. Ultraschall Med, 2017, 38(4): e16-e47.
- [15] SCHOBER P, BOER C, SCHWARTE L A. Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation [J]. Anesth Analg, 2018, 126(5): 1763-1768.
- [16] 郑兰兰, 郭才, 何燕芳, 等. 铁死亡在中药治疗肝纤维化中的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(23): 235-244.
- [17] 宋晨, 朱庆焰, 陈婷. 血清肝纤四项与肝功能联合检测评估慢性乙肝患者肝纤维化程度的价值[J]. 中国医学创新, 2023, 20(15): 132-137.
- [18] CHEN Q, MEI L, ZHONG R, et al. Serum liver fibrosis markers predict hepatic decompensation in compensated cirrhosis [J]. BMC Gastroenterol, 2023, 23(1): 317.
- [19] 李麟, 赖俐伶, 刘华宝. 基于网络药理学及药理实验验证探讨仙鹤草抗肝纤维化的作用机制[J]. 世界中医药, 2023, 18(1): 58-64.
- [20] 陈方园, 涂传涛. Notch信号转导通路在肝纤维化形成中的作用与分子机制[J]. 中国肝脏病杂志: 电子版, 2020, 12(4): 23-28.
- [21] 陈勇, 吴瑞胜, 王竞静, 等. 非编码RNA介导TGF- β_1 /Smads信号通路及肝纤维化及中药活性成分干预研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(7): 252-261.
- [22] AIMAITI Y, YUSUFUKADIER M, LI W, et al. TGF- β_1 signaling activates hepatic stellate cells through Notch pathway [J]. Cytotechnology, 2019, 71(5): 881-891.
- [23] MARTINS V, DA SILVA A L, TEODORO W R, et al. In situ evidence of collagen V and signaling pathway of found inflammatory zone 1 (FIZZ1) is associated with silicotic granuloma in lung mice [J]. Pathol Res Pract, 2020, 216(9): 153094.
- [24] ZHAO S, XIAO X, SUN S, et al. MicroRNA-30d/JAG1 axis modulates pulmonary fibrosis through Notch signaling pathway [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(9): 1315-1323.
- [25] GE M X, LIU H T, ZHANG N, et al. Costunolide represses hepatic fibrosis through WW domain-containing protein 2-mediated Notch3 degradation [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(2): 372-387.
- [26] JING Y, HU J, ZHANG Y, et al. Structural characterization and preventive effect on alcoholic gastric mucosa and liver injury of a novel polysaccharide from *Dendrobium officinale* [J]. Nat Prod Res, 2024, 38(7): 1140-1147.
- [27] WANG K, YANG X, WU Z, et al. *Dendrobium officinale* polysaccharide protected CCl₄-induced liver fibrosis through intestinal homeostasis and the LPS-TLR4-NF- κ B signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 240.
- [28] 窦玉玉, 郭建宏, 陆青兰, 等. 铁皮石斛多糖对矽肺纤维化小鼠的抗炎作用及对Notch1/Hes1通路、凋亡相关蛋白的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(10): 1307-1314.
- [29] GUO Y, LIN H, DONG C, et al. Role of acoustic radiation force impulse imaging elastography in the assessment of steatohepatitis and fibrosis in rat models [J]. Med Eng Phys, 2018, 59: 30-35.
- [30] 桑亮, 王学梅, 许东阳, 等. 超声量化指标预测大鼠肝纤维化严重程度[J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(5): 429-433.
- [31] 丰乃奇, 曲俊朴, 王雪瑞, 等. 声脉冲辐射力成像技术联合肝纤维化指标评估肝硬化程度的诊断价值[J]. 放射学实践, 2016, 31(11): 1093-1097.
- [32] MIAO X, SHA T, ZHANG W, et al. Liver fibrosis assessment by viewing sinusoidal capillarization: US molecular imaging versus two-dimensional shear-wave elastography in rats [J]. Radiology, 2022, 304(2): 473-482.

[责任编辑 周冰冰]