

基于Rho-ROCK信号转导通路研究竹沥对肝纤维化小鼠的作用

王玖恒¹, 徐成军¹, 王晓宏¹, 张小冰¹, 刘青松¹, 王云中¹, 郑洋², 赵铁建^{2,3}, 段雪琳⁴ (1.河北省承德市宽城满族自治县医院 消化内科, 河北 承德, 067600; 2.广西中医药大学 赛恩斯新医药学院, 南宁 530222; 3.广西中医药大学 基础医学院生理教研室, 南宁 530021; 4.广西中医药大学 壮医药学院, 南宁 530021)

摘要: **目的** 探究竹沥对肝纤维化小鼠Ras同源基因-Rho相关螺旋卷曲蛋白激酶(Ras homologous gene-Rho-associated coiled-coil containing kinases, Rho-ROCK)信号转导通路的作用, 分析竹沥抗肝纤维化的分子机制。**方法** 将40只KM小鼠随机分为空白组、模型组、竹沥组和丹参酚酸B组, 每组10只, 模型组、竹沥组和丹参酚酸B组小鼠给予40% CCl₄花生油混合液(剂量2 μl/g), 空白组给予等量生理盐水, 腹腔注射, 2次/周, 连续8周。模型构建成功后, 竹沥组以竹沥灌胃, 每日1次, 每次30 ml/100 g; 丹参酚酸B组以丹参酚酸B溶液灌胃, 每日1次, 每次用量0.25 mg/100 g; 其余2组给予等量生理盐水灌胃, 持续4周。末次给药后对小鼠眼球取血并处死, 采用HE染色观察肝组织病理并进行Ishak评分, 采用γ放射免疫全自动双探头计数器检测肝纤维化指标, 包括透明质酸、层粘连蛋白、III型前胶原和IV型胶原, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测RhoA和ROCK2 mRNA的相对表达量, 采用Western blot检测RhoA和ROCK2蛋白的相对表达量。**结果** 空白组、模型组、竹沥组和丹参酚酸B组小鼠Ishak评分分别为(0.40 ± 0.05)分、(4.80 ± 0.84)分、(3.20 ± 0.45)分 and (2.80 ± 0.83)分, 差异有统计学意义($F = 34.807, P < 0.001$), 其中空白组显著低于模型组、竹沥组和丹参酚酸B组($t = 8.690, P < 0.001$; $t = 5.674, P < 0.001$; $t = 4.768, P = 0.001$), 模型组显著高于竹沥组和丹参酚酸B组($t = 3.016, P = 0.017$; $t = 3.922, P = 0.004$), 竹沥组和丹参酚酸B组差异无统计学意义($t = 0.809, P = 0.464$)。空白组小鼠肝纤维化指标均显著低于模型组、竹沥组和丹参酚酸B组[透明质酸: (26.14 ± 2.69) μg/L vs (53.69 ± 5.87) μg/L vs (37.21 ± 3.04) μg/L vs (32.88 ± 3.60) μg/L, 层粘连蛋白: (120.37 ± 15.57) μg/L vs (214.48 ± 21.39) μg/L vs (162.54 ± 19.22) μg/L vs (161.66 ± 14.23) μg/L, III型前胶原: (4.04 ± 1.01) μg/L vs (11.70 ± 3.09) μg/L vs (8.12 ± 1.87) μg/L vs (7.80 ± 1.72) μg/L, IV型胶原: (12.96 ± 2.82) μg/L vs (31.34 ± 4.44) μg/L vs (23.72 ± 3.69) μg/L vs (22.85 ± 3.00) μg/L; P 均 < 0.05], 模型组小鼠肝纤维化指标均显著高于竹沥组和丹参酚酸B组(P 均 < 0.05), 竹沥组和丹参酚酸B组差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。空白组RhoA和ROCK2 mRNA相对表达量均显著低于模型组、竹沥组和丹参酚酸B组(RhoA mRNA: 1.05 ± 0.18 vs 2.61 ± 0.37 vs 1.62 ± 0.21 vs 1.50 ± 0.14, ROCK2 mRNA: 1.04 ± 0.17 vs 2.32 ± 0.29 vs 1.46 ± 0.08 vs 1.45 ± 0.09; P 均 < 0.05), 模型组RhoA和ROCK2 mRNA相对表达量均显著高于竹沥组和丹参酚酸B组(P 均 < 0.05), 竹沥组和丹参酚酸B组差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。空白组RhoA和ROCK2蛋白相对表达量均显

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2021.04.007

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960751); 广西中青年骨干教师科研基础能力提升项目(2020KY59009); 广西壮瑶药重点实验室项目(GXZYZZ2020-07); 广西中医药大学一流学科项目(2019XK141)

通讯作者: 段雪琳 Email: 403605650@qq.com

著低于模型组、竹沥组和丹参酚酸B组 (RhoA蛋白: 0.14 ± 0.03 vs 0.43 ± 0.05 vs 0.26 ± 0.02 vs 0.30 ± 0.15 ; ROCK2蛋白: 0.28 ± 0.03 vs 0.76 ± 0.09 vs 0.38 ± 0.04 vs 0.49 ± 0.03 ; P 均 < 0.05), 模型组RhoA和ROCK2蛋白相对表达量均显著高于竹沥组和丹参酚酸B组 (P 均 < 0.05), 竹沥组和丹参酚酸B组差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。结论 竹沥可抑制Rho-ROCK信号转导通路的活动, 可能是其抗肝纤维化的作用机制。

关键词: 肝纤维化; 竹沥; RhoA; ROCK2

Effects of Zhuli on mice with liver fibrosis based on the Rho-ROCK signal transduction pathway

Wang Jiuheng¹, Xu Chengjun¹, Wang Xiaohong¹, Zhang Xiaobing¹, Liu Qingsong¹, Wang Yunzhong¹, ZHENG Yang², Zhao Tiejian^{2,3}, Duan Xuelin⁴ (1.Department of Gastroenterology, Kuancheng Manchu Autonomous County Hospital, Chengde 067600, Hebei Province, China; 2.Faculty of Chinese Medicine Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China; 3.Department of Physiology, College of Basic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China; 4.Zhuang Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Zhuli on the Ras homologous gene-Rho-associated coiled-coil containing kinases (Rho-ROCK) signaling transduction pathway in mice with liver fibrosis and to analyze the molecular mechanism of Zhuli against liver fibrosis. **Methods** A total of forty KM mice were divided into blank group, model group, Zhuli group and salvianolic acid B group, 10 mice in each group. Mice in model group, Zhuli group and salvianolic acid B group were given 40% CCl₄ peanut oil mixture (2 μ l/g) and mice in blank group were given equal amounts of saline by intraperitoneal injection for 8 weeks. After the successful model construction, mice in Zhuli group were gavaged with Zhuli once a day (30 ml/100 g), mice in salvianolic acid B group were gavaged with salvianolic acid B once a day (0.25 mg/100 g) and mice in the other two groups were gavaged with equal amounts of saline for 4 weeks. After the last administration, blood was taken from the eyeballs and the mice were sacrificed. Liver histopathology was visualized by HE staining and Ishak score was calculated. Liver fibrosis indexes were detected by a fully automated double probe counter, including hyaluronic acid, laminin, procollagen III and IV collagen. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the mRNA relative expression of RhoA and ROCK2. Western blot was used to detect the protein relative expression of RhoA and ROCK2. **Results** The Ishak score of mice in blank group, model group, Zhuli group and salvianolic acid B group were (0.40 ± 0.05) points, (4.80 ± 0.84) points, (3.20 ± 0.45) points and (2.80 ± 0.83) points, respectively, the difference was statistically significant ($F = 34.807$, $P < 0.001$), the Ishak score of mice in blank group was significantly lower than that in model group, Zhuli group and salvianolic acid B group ($t = 8.690$, $P < 0.001$; $t = 5.674$, $P < 0.001$; $t = 4.768$, $P = 0.001$), the Ishak score of mice in model group was significantly higher than that in Zhuli group and salvianolic acid B group ($t = 3.016$, $P = 0.017$; $t = 3.922$, $P = 0.004$), and there was no significant difference of Ishak score between mice in Zhuli group and salvianolic acid B group ($t = 0.809$, $P = 0.464$). Liver fibrosis indexes of mice in blank group were significantly lower than those in model group, Zhuli group and salvianolic acid B group [hyaluronic acid: (26.14 ± 2.69) μ g/L vs (53.69 ± 5.87) μ g/L vs (37.21 ± 3.04) μ g/L vs (32.88 ± 3.60) μ g/L, laminin: (120.37 ± 15.57) μ g/L vs

(214.48 ± 21.39) μg/L vs (162.54 ± 19.22) μg/L vs (161.66 ± 14.23) μg/L, procollagen III: (4.04 ± 1.01) μg/L vs (11.70 ± 3.09) μg/L vs (8.12 ± 1.87) μg/L vs (7.80 ± 1.72) μg/L, IV collagen: (12.96 ± 2.82) μg/L vs (31.34 ± 4.44) μg/L vs (23.72 ± 3.69) μg/L vs (22.85 ± 3.00) μg/L; all $P < 0.05$), liver fibrosis indexes of mice in model group were significantly higher than those in Zhuli group and salvianolic acid B group (all $P < 0.05$), and there were no significant differences of liver fibrosis indexes between mice in Zhuli group and salvianolic acid B group (all $P > 0.05$). The RhoA and ROCK2 mRNA relative expression levels of mice in blank group were significantly lower than those in model group, Zhuli group and salvianolic acid B group (RhoA mRNA: 1.05 ± 0.18 vs 2.61 ± 0.37 vs 1.62 ± 0.21 vs 1.50 ± 0.14, ROCK2 mRNA: 1.04 ± 0.17 vs 2.32 ± 0.29 vs 1.46 ± 0.08 vs 1.45 ± 0.09; all $P < 0.05$), the RhoA and ROCK2 mRNA relative expression levels of mice in model group were significantly higher than those in Zhuli group and salvianolic acid B group (all $P < 0.05$), and there were no significant differences of RhoA and ROCK2 mRNA relative expression levels between mice in Zhuli group and salvianolic acid B group (all $P > 0.05$). The RhoA and ROCK2 protein relative expression levels of mice in blank group were significantly lower than those in model group, Zhuli group and salvianolic acid B group (RhoA protein: 0.14 ± 0.03 vs 0.43 ± 0.05 vs 0.26 ± 0.02 vs 0.30 ± 0.15; ROCK2 protein: 0.28 ± 0.03 vs 0.76 ± 0.09 vs 0.38 ± 0.04 vs 0.49 ± 0.03; all $P < 0.05$), the RhoA and ROCK2 protein relative expression levels of mice in model group were significantly higher than those in Zhuli group and salvianolic acid B group (all $P < 0.05$), and there were no significant differences of RhoA and ROCK2 protein relative expression levels between mice in Zhuli group and salvianolic acid B group (all $P > 0.05$). **Conclusions** Zhuli can inhibit the activity of Rho-ROCK signaling pathway, which may be its anti-liver fibrosis mechanism.

Key words: Liver fibrosis; Zhuli; RhoA; ROCK2

肝纤维化可由饮酒、非酒精性脂肪性肝炎、病毒性肝炎和自身免疫性肝炎等引起,其可使肝脏产生慢性炎症,从而导致肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度积累形成纤维性瘢痕,进而使肝细胞受损,肝脏正常功能失调,最终导致肝衰竭^[1-3]。ECM主要来源于活化的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC),因此HSC是肝纤维化疾病防治的关键^[4,5]。肝纤维化是可逆的,只要未进展至晚期肝硬化阶段,去除诱因有助于肝纤维化的改善^[6]。Ras同源基因-Rho相关螺旋卷曲蛋白激酶(Ras homologous gene-Rho-associated coiled-coil containing kinases, Rho-ROCK)信号转导通路可调控HSC收缩,促进其增殖过程,参与肝纤维化的形成^[7,8]。

竹沥为禾本科植物淡竹的茎经火烤后流出的淡黄色液汁^[9],具有清热化痰功效,用于治疗肺热咳嗽痰多、气喘胸闷等症^[10]。目前对竹沥的研究主要集中在呼吸系统和内分泌系统,网络药理学研究表明,竹沥中的活性成分与Rho-ROCK信号转导

通路有相互作用,其中黄酮类化合物具有清除活性氧自由基的作用^[11],说明竹沥具有抗肝纤维化的物质基础。丹参酚酸B是丹参中含量丰富、生物活性最强水溶性物质,具有抗氧化应激损伤、抗炎和抗肿瘤等多种药理作用^[12]。目前研究表明,丹参酚酸B具有确切的抗肝纤维化作用^[13]。本研究首次通过Rho-ROCK信号转导通路探讨竹沥对CCl₄诱导的肝纤维化小鼠的作用,评估肝脏病理改变,利用分子生物学技术检测RhoA和ROCK2的表达,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 实验动物 本研究采用的实验动物为2周龄清洁级昆明小鼠(Kunming mice, KM小鼠),共40只,体质量12~16 g,购自湖南斯莱克景达公司,合格证号[SCXK(湘)2016-0002],使用许可证号[SYXK(桂)2016-0001]。本实验通过了伦理委员会审核(编号:2016-12-02-1)。

1.2 药物与试剂 竹沥(广西金门记生物科技有限公司,GF45080114207)、HE试剂盒(北京索莱宝

科技有限公司, G1120)、丹参酚酸B(阿拉丁, S101148)、四氯化碳(天津市富宇精细化工有限公司, 1301100034)、肝纤维化四项免疫放射分析试剂盒(上海西唐生物科技有限公司, F5762)、兔多抗RhoA(22 kD)(武汉三鹰生物有限公司, 10749-1-AP)、兔多抗ROCK2(164 kD)(武汉三鹰生物有限公司, 20248-1-AP)。

1.3 主要仪器 低速离心机(Eppendorf, 5702R)、RT-PCR仪(ABI, QuantStudio 6)、生物显微镜(日本奥林巴斯公司, CKX53)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及药物干预 将40只KM小鼠随机分为4组:空白组、模型组、竹沥组和丹参酚酸B组, 每组10只。模型组、竹沥组和丹参酚酸B组小鼠给予40% CCl₄花生油混合液(剂量2 μl/g), 空白组给予等量生理盐水, 腹腔注射, 2次/周, 连续8周。模型构建成功后, 竹沥组以竹沥灌胃, 每日1次, 每次30 ml/100 g; 丹参酚酸B组以丹参酚酸B溶液灌胃, 每日1次, 每次用量0.25 mg/100 g; 其余2组给予等量生理盐水灌胃, 持续4周。

1.4.2 肝组织病理检查 末次给药后采取颈椎脱位法处死小鼠, 取小鼠肝脏, 用生理盐水冲洗后取肉眼可见的病变严重的肝组织, 用4%多聚甲醛固定, 使用不同浓度乙醇进行梯度脱水, 然后进行石蜡包埋, 切成3 μm左右的组织切片, 进行HE染色并观察。依据Ishak评分标准^[14]对肝纤维化进行评分。

1.4.3 肝纤维化指标的检测 当末次给药后对小鼠眼球取血, 将血液放置于室温下3 h左右, 凝固后进行离心, 保留上层血清, 放置于-20 °C冰箱保存。用γ放射免疫全自动双探头计数器检测肝纤维化指标, 包括透明质酸、层粘连蛋白、III型前胶原和IV型胶原。

1.4.4 RhoA和ROCK2 mRNA相对表达量的检测 采用Trizol试剂一步法提取肝组织中的RNA, 逆转录后进行实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-

PCR), PCR扩增反应体系为20 μl, 条件设置为: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 60 s, 40个循环。采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对表达量。RhoA、ROCK2及GAPDH引物见表1。

1.4.5 RhoA和ROCK2蛋白的检测 采用Western blot检测RhoA和ROCK2蛋白。提取肝组织总蛋白后进行电泳、转膜、封闭, 在4 °C孵育一抗过夜后, 用封闭液稀释相应二抗, 使PVDF膜浸泡于二抗孵育液中, 37 °C孵育2 h。洗去多余的二抗, 通过显色系统显色, 用BandScan分析胶片灰度值。

1.5 统计学处理 采用SPSS 22.0对数据进行统计分析, Ishak评分、肝纤维化指标、RhoA和ROCK2 mRNA相对表达量、RhoA和ROCK2蛋白相对表达量为计量资料, 符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组内两两比较用LSD-*t*检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠基本情况 随着实验进行, 模型组、竹沥组及丹参酚酸B组小鼠逐渐出现食欲下降、精神不佳、消瘦、体质量减轻、毛发干枯等改变。

2.2 肝组织病理 各组小鼠肝组织HE染色结果显示, 空白组未见明显异常病理学改变(图1A); 模型组小鼠肝小叶间分界不清, 有假小叶结构, 存在空泡样改变(图1B); 竹沥组(图1C)和丹参酚酸B组(图1D)小鼠病变情况较模型组有所改善。空白组、模型组、竹沥组和丹参酚酸B组小鼠Ishak评分分别为(0.40 ± 0.05)分、(4.80 ± 0.84)分、(3.20 ± 0.45)分和(2.80 ± 0.83)分, 差异有统计学意义($F = 34.807, P < 0.001$), 其中空白组显著低于模型组、竹沥组和丹参酚酸B组($t = 8.690, P < 0.001; t = 5.674, P < 0.001; t = 4.768, P = 0.001$), 模型组显著高于竹沥组和丹参酚酸B组($t = 3.016, P = 0.017; t = 3.922, P = 0.004$), 竹沥组和丹参酚酸B组差异无统计学意义($t = 0.809, P = 0.464$)。

2.3 肝纤维化指标 空白组小鼠肝纤维化指标(透明

表1 RhoA、ROCK2及GAPDH qRT-PCR引物序列

名称	序列	目的基因(bp)
RhoA	上游引物: 5'-GTTGGTGATGGAGCTTGTGG-3' 下游引物: 5'-CTGTCCAGCTGTGTCCATA-3'	159
ROCK2	上游引物: 5'-GGATGGTTGTCAATGCCTGT-3' 下游引物: 5'-TGTCTGGGTAACAGGTCGGA-3'	180
GAPDH	上游引物: 5'-ATGGGTGTGAACCACGAGA-3' 下游引物: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGCA-3'	229

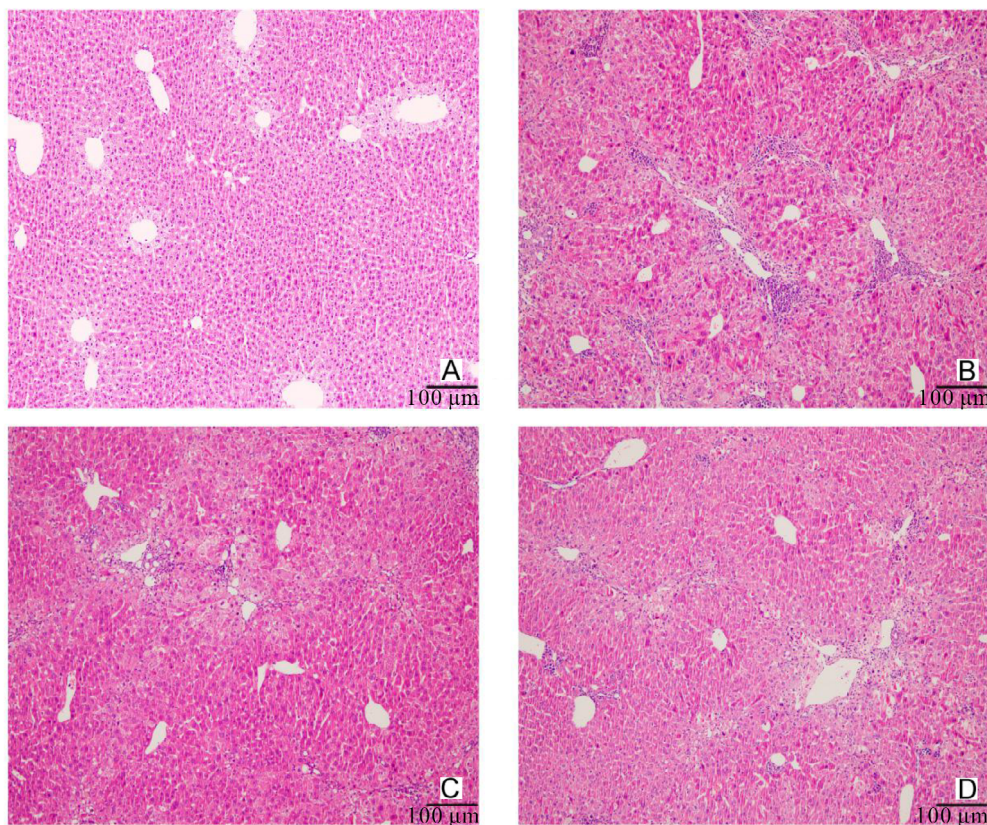


图1 各组小鼠肝组织 HE 染色

注: A 为空白组, 未见明显异常病理学改变; B 为模型组, 肝小叶间分界不清, 有假小叶结构, 存在空泡样改变; C 为竹沥组, D 为丹参酚酸 B 组, 两组病变情况较模型组均有所改善

表2 空白组、模型组、竹沥组和丹参酚酸 B 组小鼠肝纤维化指标 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

组别	透明质酸	层粘连蛋白	III型前胶原	IV型胶原
空白组	26.14 ± 2.69	120.37 ± 15.57	4.04 ± 1.01	12.96 ± 2.82
模型组	53.69 ± 5.87 ^a	214.48 ± 21.39 ^a	11.70 ± 3.09 ^a	31.34 ± 4.44 ^a
竹沥组	37.21 ± 3.04 ^{ab}	162.54 ± 19.22 ^{ab}	8.12 ± 1.87 ^{ab}	23.72 ± 3.69 ^{ab}
丹参酚酸B组	32.88 ± 3.60 ^{ab}	161.66 ± 14.23 ^{ab}	7.80 ± 1.72 ^{ab}	22.85 ± 3.00 ^{ab}
F值	54.102	23.365	48.345	22.576
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t ₁ 值	8.223	6.388	5.753	6.410
P ₁ 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
t ₂ 值	3.333	2.840	2.531	3.847
P ₂ 值	0.010	0.022	0.035	0.005
t ₃ 值	7.340	2.740	2.558	3.481
P ₃ 值	< 0.001	0.025	0.034	0.008
t ₄ 值	4.892	3.550	3.221	2.929
P ₄ 值	0.001	0.008	0.012	0.019
t ₅ 值	6.209	3.648	3.195	2.928
P ₅ 值	< 0.001	0.007	0.013	0.019
t ₆ 值	1.148	0.013	0.818	0.246
P ₆ 值	0.315	0.990	0.459	0.818

注: ^a 与空白对照组相比 $P < 0.05$; ^b 与模型组相比 $P < 0.05$; t₁、P₁ 为空白组与模型组相比; t₂、P₂ 为空白组与竹沥组相比; t₃、P₃ 为空白组与丹参酚酸 B 组相比; t₄、P₄ 为模型组与竹沥组相比; t₅、P₅ 为模型组与丹参酚酸 B 组相比; t₆、P₆ 为竹沥组与丹参酚酸 B 组相比。

质酸、层粘连蛋白、III型前胶原和IV型胶原)均显著低于模型组、竹沥组和丹参酚酸B组(P 均 < 0.05),模型组小鼠肝纤维化指标均显著高于竹沥组和丹参酚酸B组(P 均 < 0.05),竹沥组和丹参酚酸B组差异无统计学意义(P 均 > 0.05),提示竹沥干预后,肝纤维化程度有所减轻,见表2。

2.4 RhoA和ROCK2 mRNA相对表达量 空白组RhoA和ROCK2 mRNA相对表达量均显著低于模型组、竹沥组和丹参酚酸B组(P 均 < 0.05),模型组RhoA和ROCK2 mRNA相对表达量均显著高于竹沥组和丹参酚酸B组(P 均 < 0.05),竹沥组和丹参酚酸B组差异无统计学意义(P 均 > 0.05),见表3。

2.5 Western Blot检测RhoA和ROCK2表达 空白组RhoA和ROCK2蛋白相对表达量均显著低于模型组、竹沥组和丹参酚酸B组(P 均 < 0.05),模型

组RhoA和ROCK2蛋白相对表达量均显著高于竹沥组和丹参酚酸B组(P 均 < 0.05),竹沥组和丹参酚酸B组差异无统计学意义(P 均 > 0.05),见图2、表4。

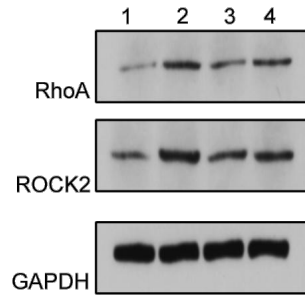


图2 空白组、模型组、竹沥组和丹参酚酸B组小鼠RhoA和ROCK2 Western blot图

注:1为空白对照组;2为模型组;3为竹沥组;4为丹参酚酸B组

表3 空白组、模型组、竹沥组和丹参酚酸B组小鼠RhoA和ROCK2 mRNA相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	RhoA	ROCK2
空白组	1.05 ± 0.18	1.04 ± 0.17
模型组	2.61 ± 0.37 ^a	2.32 ± 0.29 ^a
竹沥组	1.62 ± 0.21 ^{ab}	1.46 ± 0.08 ^{ab}
丹参酚酸B组	1.50 ± 0.14 ^{ab}	1.45 ± 0.09 ^{ab}
F 值	22.705	26.726
P 值	< 0.001	< 0.001
t_1 值	7.910	8.063
P_1 值	< 0.001	< 0.001
t_2 值	2.860	2.545
P_2 值	0.021	0.034
t_3 值	2.391	2.609
P_3 值	0.045	0.031
t_4 值	5.051	5.454
P_4 值	0.001	0.001
t_5 值	5.669	5.450
P_5 值	< 0.001	0.001
t_6 值	0.479	0.047
P_6 值	0.645	0.964

注:^a与空白对照组相比 $P < 0.05$;^b与模型组相比 $P < 0.05$; t_1 、 P_1 为空白组与模型组相比; t_2 、 P_2 为空白组与竹沥组相比; t_3 、 P_3 为空白组与丹参酚酸B组相比; t_4 、 P_4 为模型组与竹沥组相比; t_5 、 P_5 为模型组与丹参酚酸B组相比; t_6 、 P_6 为竹沥组与丹参酚酸B组相比;以GAPDH为参考。

表4 空白组、模型组、竹沥组和丹参酚酸B组小鼠RhoA和ROCK2蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	RhoA	ROCK2
空白组	0.14 ± 0.03	0.28 ± 0.03
模型组	0.43 ± 0.05 ^a	0.76 ± 0.09 ^a
竹沥组	0.26 ± 0.02 ^{ab}	0.38 ± 0.04 ^{ab}
丹参酚酸B组	0.30 ± 0.15 ^{ab}	0.49 ± 0.03 ^{ab}
F 值	42.857	46.273
P 值	< 0.001	< 0.001
t_1 值	5.599	9.054
P_1 值	0.001	< 0.001
t_2 值	2.539	3.634
P_2 值	0.048	0.006
t_3 值	3.563	3.698
P_3 值	0.007	0.006
t_4 值	3.308	7.269
P_4 值	0.011	< 0.001
t_5 值	2.531	5.356
P_5 值	0.048	0.001
t_6 值	2.508	1.913
P_6 值	0.338	0.092

注:^a与空白对照组相比 $P < 0.05$;^b与模型组相比 $P < 0.05$; t_1 、 P_1 为空白组与模型组相比; t_2 、 P_2 为空白组与竹沥组相比; t_3 、 P_3 为空白组与丹参酚酸B组相比; t_4 、 P_4 为模型组与竹沥组相比; t_5 、 P_5 为模型组与丹参酚酸B组相比; t_6 、 P_6 为竹沥组与丹参酚酸B组相比;以GAPDH为参考。

3 讨论

肝纤维化是肝脏受到慢性损伤后所发生的损伤-愈合反应,其本质特点是ECM的产生与分解间的平衡被打破,过多的ECM在肝组织沉积,形成“纤维瘢痕”,从而对肝功能产生影响^[15]。竹沥有抗肝纤维化的物质基础,但其具体作用的分子机制尚未明确。RhoA是鸟苷三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)结合蛋白的Ras超家族的成员, GTP和GDP是RhoA活化和失活的开关器, Rho相关的ROCK是Rho下游效应分子,属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族^[16]。因此RhoA和ROCK2可反映该信号转导通路的活动状态。已有研究证实RhoA/ROCK信号转导通路在细胞多种生理活动中发挥调节作用,包括收缩、黏附、生长、分裂及成纤维细胞增生^[17]。RhoA是Rho信号转导通路的起始分子,可参与细胞迁移和收缩等多种细胞生理行为以及应力纤维的形成和肌动蛋白的收缩^[18,19], ROCK2则在细胞收缩和迁移过程具有重要作用^[20]。肝窦毛细血管瘤是肝窦内皮细胞失窗孔以及形成连续的基底膜,是肝纤维化早期重要的病理改变^[21]。有研究表明,在肝窦毛细血管瘤形成过程中,肝窦内皮细胞会有生物学表型改变,导致转分化的发生^[22]。目前已证实,细胞转分化在炎症、器官组织纤维化性疾病和肿瘤等疾病发生中有重要作用^[23,24]。Rho GTPase是调控众多细胞事件信号转导通路的分子开关,在细胞极化、细胞骨架及转录调节和转型等过程中发挥关键调节作用^[25,26]。RhoA/ROCK信号转导通路在肾纤维化形成时肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化中是必不可少的^[27]。综上, RhoA/ROCK信号转导通路不仅可通过调控HSC的活化增殖参与肝纤维化的发生发展,也可通过调控肝窦内皮细胞的转分化介导肝窦毛细血管瘤的病理过程,促进肝纤维化的发生发展。

丹参酚酸B可逆转CCl₄诱导的大鼠肝纤维化,还可抑制HSC活化标志物I型胶原和 α 平滑肌肌动蛋白的表达^[28-31]。还有研究表明,丹参酚酸B可通过调控PKD1-HIF-1 α -VEGF信号转导通路的活动从而介导心肌梗死大鼠血管新生^[32],进一步体现了丹参活血化瘀的药理作用。丹参酚酸B可调控Rho/ROCK信号转导通路的活动过程,本研究通过检测竹沥对RhoA和ROCK2表达的影响来阐明竹沥对RhoA/ROCK信号转导通路的影响。本研究中模型组RhoA和ROCK2的表达显著高于空白对照组,说明其在肝纤维化发生过程中高表达,竹沥组和丹参酚酸B组RhoA和ROCK2的表达均显著低于模型

组,提示竹沥可能是通过抑制Rho通路上RhoA和ROCK2的表达来发挥抗肝纤维化的作用。本次研究开拓了竹沥的药理作用,为科学假设即竹沥抗肝纤维化提供了科学依据,有利于其开发推广。

参考文献

- [1] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*,2021,18(3):151-166.
- [2] SMITH A, BAUMGARTNER K, BOSITIS C. Cirrhosis: diagnosis and management[J]. *Am Fam Physician*,2019,100(12):759-770.
- [3] ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. *Cells*,2020,9(4):875.
- [4] 莫晓晖, 梁韬. 葛根素对四氯化碳所诱导肝纤维化大鼠的干预作用及对TLR-4、NF- κ B、AP-1的影响[J]. *中国医院药学杂志*,2017,37(14):1348-1351.
- [5] 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/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2020,12(4):23-28.
- [6] SEKI E, BRENNER D A. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*,2015,22(7):512-518.
- [7] 张芳, 李盼盼, 徐丽, 等. 中药调控Rho/ROCK信号通路治疗平滑肌细胞功能异常疾病机制及研究进展[J]. *中华中医药学刊*,2018,36(11):2658-2661.
- [8] XIE Y, SONG T, HUO M, et al. Fasudil alleviates hepatic fibrosis in type 1 diabetic rats: involvement of the inflammation and RhoA/ROCK pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2018,22(17):5665-5677.
- [9] 徐诗军, 万娜, 伍振峰, 等. 鲜竹沥的本草考证与现代研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*,2021,27(4):196-204.
- [10] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药材:第1册[S]. 北京:中华人民共和国卫生部药典委员会,1992:99.
- [11] 乔蕊, 毛绒, 张金玲, 等. 竹叶黄酮药理作用研究进展[J]. *医药导报*,2020,39(11):1516-1519.
- [12] 张彤, 刘文杰, 李芮琳, 等. 丹参酚酸B对缺血性脑中风保护作用的研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*,2019,35(13):1410-1412,1416.
- [13] 吴航. 丹参酚酸B通过Sirt-1对大鼠肝纤维化模型的影响[J]. *华北理工大学学报(医学版)*,2016,18(5):349-352.
- [14] ISHAK K, BAPTISTA A, BIANCHI L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis[J]. *J Hepatol*,1995,22(6):696-699.
- [15] 徐诗雨, 郭惠婕, 刘揭, 等. 肝纤维化治疗靶标研究进展[J]. *医学综述*,2020,26(10):1930-1934.
- [16] 刘建兵, 刘敏丽. RhoA/ROCK信号通路相关疾病的研究进展[J]. *海南医学院学报*,2019,25(6):472-476.
- [17] SECCIA T M, RIGATO M, RAVAROTTO V, et al. ROCK (RhoA/Rho kinase) in cardiovascular-renal pathophysiology: a review of new advancements[J]. *J Clin Med*,2020,9(5):1328.
- [18] 国伟, 孟建中, 陈宇. Rho/Rho激酶信号通路与血管内皮通透性的研究[J]. *生物医学工程研究*,2009,28(2):154-158.
- [19] 辛鹏飞, 高雪, 康富贵, 等. Rho/ROCK信号通路调控肝星状细胞活化的研究进展[J]. *肝胆胰外科杂志*,2021,33(1):61-65.
- [20] TAKEDA Y, MATOBA K, KAWANAMI D, et al. ROCK2 regulates monocyte migration and cell to cell adhesion in vascular endothelial cells[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(6):1331.
- [21] WU Y, LI Z, XIU A Y, et al. Carvedilol attenuates carbon tetrachloride-

induced liver fibrosis and hepatic sinusoidal capillarization in mice[J]. Drug Des Devel Ther,2019,13:2667-2676.

[22] LIU H L, LV J, ZHAO Z M, et al. Fuzhenghuayu Decoction ameliorates hepatic fibrosis by attenuating experimental sinusoidal capillarization and liver angiogenesis[J]. Sci Rep,2019,9(1):18719.

[23] KRENKEL O, HUNDERTMARK J, RITZ T P, et al. Single Cell RNA Sequencing Identifies Subsets of Hepatic Stellate Cells and Myofibroblasts in Liver Fibrosis[J]. Cells,2019,8(5):503.

[24] SHERMAN M H. Stellate cells in tissue repair, inflammation, and cancer[J]. Ann Rev Cell Dev Biol,2018,34:333-355.

[25] ZHANG Y, LI G R. A tumor suppressor DLC1: the functions and signal pathways[J]. J Cell Physiol,2020,235(6):4999-5007.

[26] KIM J G, LSLAM R, CHO J Y, et al. Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway[J]. J Cell Physiol,2018,233(9):6381-6392.

[27] YE Q, ZHAO S, ZHANG Y, et al. Activation of the RhoA/ROCK pathway contributes to renal fibrosis in offspring rats induced by maternal exposure to di-n-butyl phthalate[J]. Toxicology,2020,443:152573.

[28] 任正肖, 张颖颖. 丹酚酸B的化学成分及药理作用的研究进展[J]. 山东化工,2019,48(13):74-75,82.

[29] YU F, LU Z, CHEN B, et al. Salvianolic acid B-induced microRNA-152 inhibits liver fibrosis by attenuating DNMT1-mediated Patched1 methylation[J]. J Cell Mol Med,2015,19(11):2617-2632.

[30] LI S, WANG L, YAN X C, et al. Salvianolic acid B attenuates rat hepatic fibrosis via downregulating angiotensin II signaling[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2012,2012:160726.

[31] 王育红, 宋明, 李时, 等. 丹酚酸B对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用[J]. 中国现代医学杂志,2014,24(2):24-28.

[32] 刘暖, 杨雷, 毛秉豫. 丹参酚酸B调控PKD1-HIF-1 α -VEGF通路促心肌梗死大鼠血管新生的作用[J]. 中国药理学通报,2020,36(7):984-990.

收稿日期: 2021-03-03

王玖恒, 徐成军, 王晓宏, 等. 基于Rho-ROCK信号转导通路研究竹沥对肝纤维化小鼠的作用[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2021,13(4):38-45.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿医学名词和文字的要求

来稿中医学名词要求: 应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词, 可选用最新版《医学主题词表(MeSH)》《医学主题词注释字顺表》《中医药主题词表》中的主题词。对没有通用译名的名词术语于文内第一次出现时应注明原词。中医名词术语按 GB/T 16751.1/2/3-1997 《中医临床诊疗术语疾病部分 / 证候部分 / 治法部分》和 GB/T 20348-2006 《中医基础理论术语》执行, 腧穴名称与部位名词术语按 GB/T 12346-2006 《腧穴名称与定位》和 GB/T 13734-2008 《耳穴名称与定位》执行。中西药名以最新版本《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。确需使用商品名时应先注明其通用名称。中药应采用正名, 药典未收录者应附注拉丁文名称。

来稿中文字要求: 严格执行《中华人民共和国国家通用语言文字法(2000-10-31)》和新闻出版总署 2010 年 12 月 24 日发布的《关于进一步规范出版物文字使用的通知》, 以及 1992 年新闻出版总署、国家语言文字工作委员会发布的《出版物汉字使用管理规定》, 以 1986 年 10 月国家语言文字工作委员会重新发布的《简化字总表》和 1988 年 3 月国家语言文字工作委员会和新闻出版总署发布的《现代汉语通用字表》为准。

本刊编辑部