黄连素对小鼠肝纤维化的影响

欧意桃，杨桂智，兰 天，李卫东

（广东药科大学，广东 广州 510006）

[摘要]**目的** 探讨黄连素防治肝纤维化的机制。**方法** 将C57BL/6小鼠分为正常组、模型组、黄连素组，腹腔注射四氯化碳诱导纤维化动物模型，同时给予黄连素治疗。6周后测定丙氨酸转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate transaminase，AST）活性，并观察肝脏病理形态学改变，测定羟脯氨酸含量，同时用Western blot和实时PCR检测肝脏中α平滑肌肌动蛋白（alpha smooth muscle actin，α-SMA）、Ⅰ型胶原α1（collagen，type Ⅰ，alpha 1，Col1α1）和基质金属蛋白酶组织抑制剂-1（tissue inhibitors of matrix metalloproteinase 1，TIMP-1）的含量。**结果** 与肝纤维化组相比，黄连素干预后，肝脏损伤和纤维化程度明显减轻，胶原合成和沉积减少，炎性反应减轻，ALT和AST活性下降，α-SMA、Col1α1和TIMP-1合成减少。**结论** 黄连素通过抑制炎性反应和胶原沉积，改善小鼠肝纤维化。

[关键词]黄连素；肝纤维化；肝功能；平滑肌肌动蛋白；Ⅰ型胶原；基质金属蛋白酶抑制剂

[中图分类号]R285.5；R575.2 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2017.02.015

肝纤维化是一种在损害因子持续作用下渐进的病理进程，反复的伤口愈合反应导致持续的肝损伤[1]，以细胞外基质（extracellular matrix，ECM）过度沉积和瘢痕形成[2]为特征。如发生后未对其进行及时有效的干预及治疗，可发展为肝硬化甚至肝癌。然而，至今临床上还没有理想的药物对肝纤维化进行有效的治疗。因此，研发对肝纤维化干预治疗的药物具有重要意义。

黄连素俗称小檗碱，是从黄连、黄柏等植物中提取的异喹啉类生物碱。临床上黄连素广泛应用于痢疾和细菌性胃肠炎。但近年来研究发现该药尚能治疗肥胖[3]、动脉粥样硬化[4]及降低胆固醇[5]。最近有研究显示，黄连素能抑制人肝癌细胞HepG2细胞的增殖及生长[6-7]，有作为抗肝癌药物的潜在可能。而肝纤维化是发展为肝癌的中心环节，黄连素是否具有治疗肝纤维化的药理作用值得研究。因此，本研究采用CCl_4诱导的小鼠肝纤维化模型，探讨黄连素对肝纤维化的保护作用和机制。

基金项目：广东省自然科学基金重点项目（2016A030311014）

作者简介：欧意桃（1991-），女，硕士研究生

通信作者：李卫东，gylwd26@163.com

1 材料

1.1 实验动物 C57BL/6（C57）小鼠18只，雌雄各半，8周龄，体质量22～25 g，购于广东省实验动物中心，生产许可证号为SCXK（粤）2013-0002。将小鼠饲养于广东药科大学实验动物中心，期间遵循12 h光照/12 h黑暗周期，并保持充足的饲料和饮水。

1.2 药物与试剂 黄连素（货号PHR1502-500MG）：Sigma公司；CCl_4（货号C112043）、玉米油（货号C116023）：上海阿拉丁公司；丙氨酸转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）试剂盒（货号c009-2）、天冬氨酸转氨酶（aspartate transaminase，AST）试剂盒（货号c010-2）、羟脯氨酸测试盒（货号A030-2）：南京建成生物工程研究所；GAPDH抗体（货号Ab103-02）：南京诺唯赞生物科技有限公司；

and Toll-like receptor 5 (TLR5) in Caco-2 cells. **Results** Compared with the control group, the Caco-2 cells co-cultured with *Candida albicans* alone had significant increases in the expression of IL-6, IL-8, IL-1β, HBD-2, and HBD-3 ($P<0.05$) and significantly upregulated mRNA expression of TLR1, TLR2, TLR4, and TLR5 ($P<0.05$). Compared with the Caco-2 cells co-cultured with *Candida albicans* alone, the Caco-2 cells pretreated with BAEB had significant reductions in the expression of IL-6, IL-8, IL-1β, HBD-2, and HBD-3 ($P<0.05$) and significantly downregulated mRNA expression of TLR1, TLR2, TLR4, and TLR5 ($P<0.05$), and high-dose BAEB had the most significant effect. **Conclusion** The anti-*Candida albicans* mechanism of BAEB may be related to the downregulated expression of cytokines, HBD, and TLRs.

[**Key words**]Baitouweng Decoction; Butyl alcohol extract; *Candida albicans*; Caco-2 cell; Cytokine; Defensin; Toll-like receptor

α-平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin,α-SMA)抗体(货号 BM0002)、CD68 抗体(货号 BA3638):武汉博士德生物工程有限公司。

2 方法

2.1 肝纤维化模型复制及分组给药 将 C57BL/6 小鼠经 1 周适应性喂养后,随机分为正常组(n=6)、模型组(n=8)和黄连素组(n=8)。取玉米油 8 mL,加入 CCl_4 2 mL,配成 20% CCl_4。黄连素用三蒸水稀释,定容至 1 mg/mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装保存于-20 ℃冰箱。模型组和黄连素组每周两次腹腔注射 20% CCl_4,5 μL/g,连续 6 周,正常组腹腔注射等容积玉米油。同时黄连素组腹腔注射黄连素,给药剂量为 5 mg/kg,每周 5 次,与注射 20% CCl_4 的时间错开,连续 6 周。

2.2 血清生化指标检测 最后一次给予黄连素结束 24 h 后,眼眶取血,离心后取血清于-80 ℃保存。按试剂盒说明书测定血清 ALT、AST 活力值。

2.3 肝脏病理学检查 剖腹取肝,部分用来固定、脱水、包埋、切片。苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色和天狼星红染色观察胶原沉积程度。光镜下进行组织病理学检查,观察肝小叶结构、细胞形态及排列、炎性细胞浸润及纤维组织增生程度。采用 Image J 软件对天狼星红染色结果进行分析,先分解 RGB 图像为灰度图,调整待测对象为红色,测定红色区域面积占照片总面积的面积比。将剩余肝组织于-80 ℃保存。按试剂盒说明书测定肝脏中羟脯氨酸含量。

2.4 免疫组织化学检测 α-SMA 及 CD68 取石蜡切片,脱蜡,PBS 洗涤,柠檬酸盐修复 15 min,1% BSA 室温封闭 1 h。甩掉 1% BSA,加一抗,4 ℃过夜。PBS 洗涤,加二抗,放置 1 h。切片脱水后中性树胶封片。

2.5 实时 PCR 检测 α-SMA、Ⅰ型胶原 α1(collagen,type Ⅰ,alpha 1,Col1α1)及基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(tissue inhibitors of matrix metalloproteinase 1,TIMP-1)mRNA 表达水平 TRIzol 法提取肝脏总 RNA,逆转录合成 cDNA,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。反应条件为 95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 10 s,60 ℃退火 10 s,72 ℃延伸 10 s,共 40 个循环。实验结果以目的基因与 β-actin 相对表达量表示。

表 1 实时 PCR 扩增小鼠基因的引物

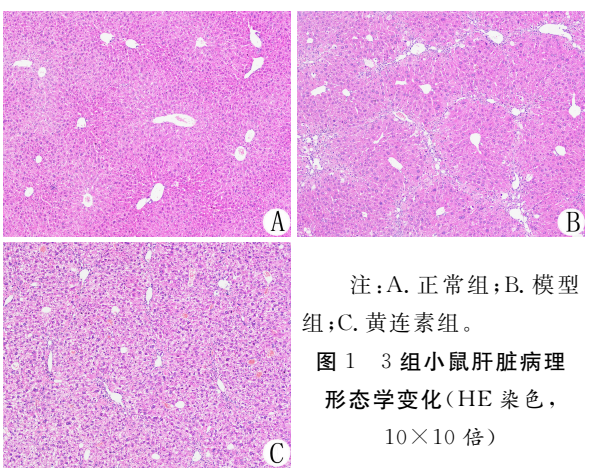
基因	上游引物	下游引物
β-actin	ATGGAGGGGAATACAGCCC	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT
Col1α1	TAGGCCATTGTGTATGCAGC	ACATGTTCAGCTTTGTGGACC
α-SMA	GTTCAGTGGTGCCTCTGTCA	ACTGGGACGACATGGAAAAG
TIMP-1	AGGTGGTCTCGTTGATTTCT	GTAAGGCCTGTAGCTGTGCC

2.6 Western blot 检测 α-SMA 取保存在-80 ℃的肝组织 30 mg,加适量蛋白裂解液匀浆,离心后取上清进行 BCA 蛋白定量。取 30 μg 蛋白上样,经电泳、电转及封闭后加一抗孵育,4 ℃过夜。TBST 洗涤后加二抗室温孵育 1 h,显影。用 Image J 软件进行灰度分析。

2.7 统计学方法 所有数据均采用"均数±标准差($\bar{x}\pm s$)"进行统计学描述,采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行单因素方差分析及两个独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

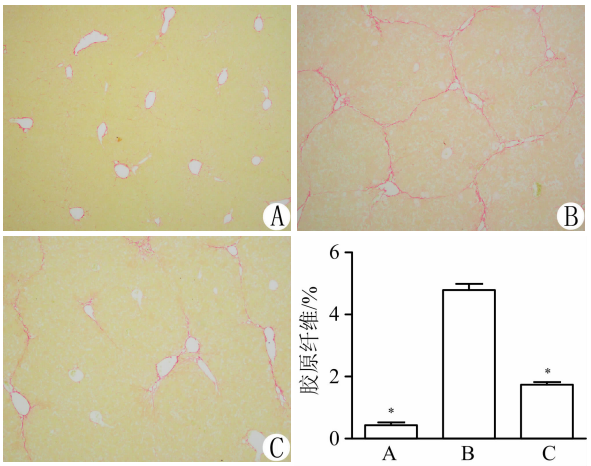
3.1 3 组小鼠肝脏病理形态学变化 正常组小鼠肝小叶结构正常,肝索以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞大小正常,未见肝细胞坏死、纤维结缔组织增生、炎性细胞浸润,汇管区结构清晰。模型组小鼠肝小叶结构紊乱,汇管区有炎性细胞浸润,纤维组织增生明显。黄连素组小鼠肝脏病理变化明显改善,纤维结缔组织增生明显减少。见图 1。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 黄连素组。

图 1 3 组小鼠肝脏病理形态学变化(HE 染色,10×10 倍)

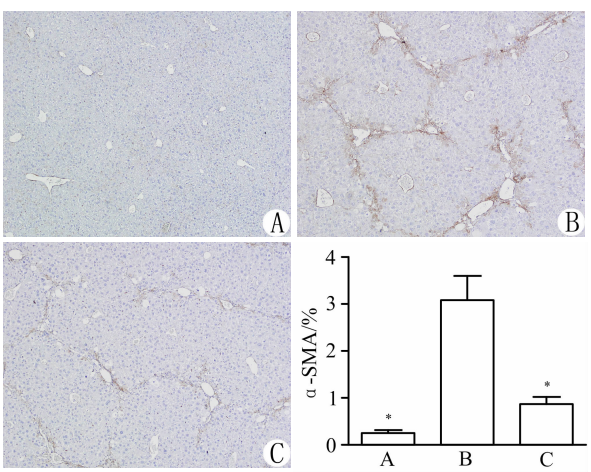
3.2 3 组小鼠肝脏汇管区和肝小叶间隔胶原纤维沉积量比较 与正常组比较,模型组小鼠肝脏汇管区及肝小叶间隔有大量胶原纤维沉积。与模型组比较,黄连素组小鼠肝脏胶原纤维沉积量明显减少($P<0.05$)。见图 2。



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 黄连素组；与模型组比较，* $P<0.05$。

图2 3组小鼠肝脏汇管区和肝小叶间隔胶原纤维沉积量比较（天狼星红染色，10×10倍）

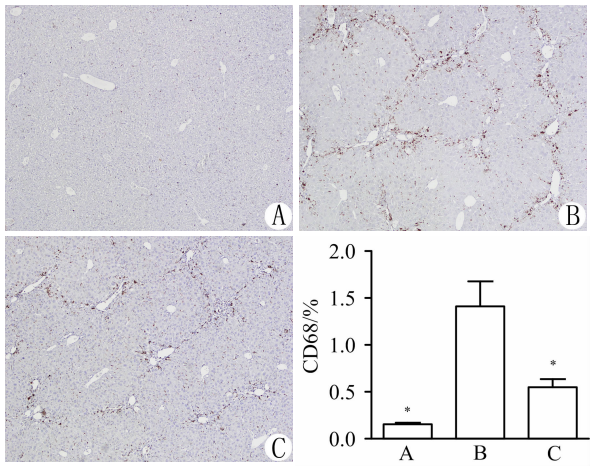
3.3 3组小鼠肝组织中α-SMA表达水平比较 免疫组织化学染色检测结果显示，正常组小鼠肝组织中α-SMA蛋白表达水平低；模型组小鼠肝组织汇管区纤维间隔及靠近纤维间隔的肝窦成纤维细胞胞浆中有较多α-SMA表达；与模型组比较，黄连素组小鼠肝组织α-SMA表达水平明显降低（$P<0.05$）。见图3。



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 黄连素组；与模型组比较，* $P<0.05$。

图3 3组小鼠肝组织α-SMA表达水平比较（免疫组织化学染色，10×10倍）

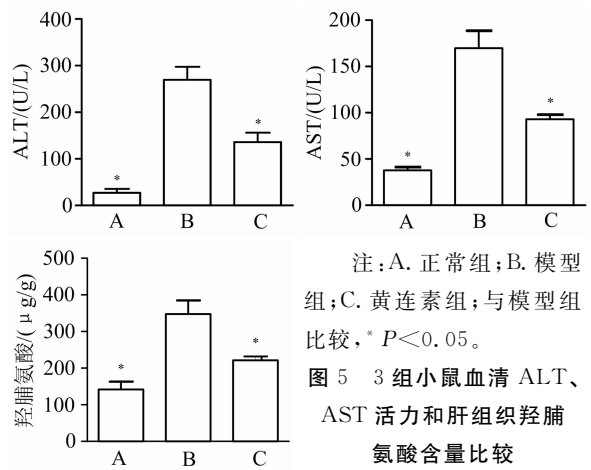
3.4 3组小鼠肝组织中CD68表达水平比较 免疫组织化学染色结果显示，正常组小鼠肝组织中CD68表达水平较低，主要分布在肝血窦；模型组CD68表达水平升高，除在肝血窦中表达，还在汇管区和纤维间隔中表达；与模型组比较，黄连素组CD68表达水平明显降低（$P<0.05$）。见图4。



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 黄连素组；与模型组比较，* $P<0.05$。

图4 3组小鼠肝组织CD68表达水平比较（免疫组织化学染色，10×10倍）

3.5 3组小鼠血清ALT、AST活力和肝组织中羟脯氨酸含量比较 与正常组比较，模型组血清ALT、AST活力均明显升高；与模型组比较，黄连素组血清ALT、AST活力和肝组织中羟脯氨酸含量明显降低（$P<0.05$）。见图5。

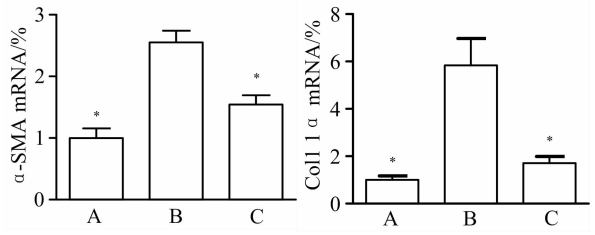


注：A. 正常组；B. 模型组；C. 黄连素组；与模型组比较，* $P<0.05$。

图5 3组小鼠血清ALT、AST活力和肝组织羟脯氨酸含量比较

3.6 3组小鼠肝组织中α-SMA、Col1α1、TIMP-1 mRNA表达水平比较 与正常组比较，模型组小鼠肝组织中α-SMA，Col1α1，TIMP-1 mRNA表达水平明显上调（$P<0.05$）；与模型组比较，黄连素组小鼠肝组织α-SMA，Col1α1，TIMP-1 mRNA表达水平明显下调（$P<0.05$）。见图6。

3.7 3组小鼠肝组织中α-SMA蛋白表达水平比较 正常组有少量α-SMA蛋白表达；与正常组比较，模型组α-SMA蛋白表达水平显著增多（$P<0.05$）；与模型组比较，黄连素组α-SMA蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。见图7、图8。



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 黄连素组；与模型组比较，* $P<0.05$。

图6 3组小鼠肝组织中α-SMA、Col1α1、TIMP-1 mRNA表达水平比较

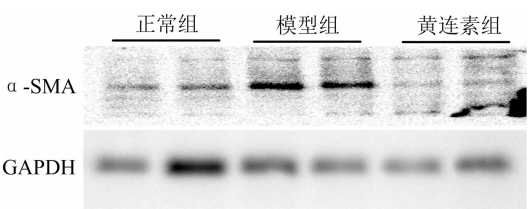
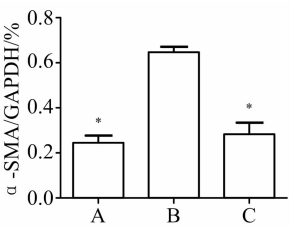


图7 Western blot检测小鼠肝组织中α-SMA蛋白表达水平



注：A. 正常组；B. 模型组；C. 黄连素组；与模型组比较，* $P<0.05$。

图8 3组小鼠肝组织中α-SMA蛋白表达水平比较

4 讨论

肝脏是人体重要的代谢器官，因此保肝护肝十分重要。肝损伤是各种肝脏疾病的病变结果，肝脏在损害因子的作用下会发生肝损伤，会出现慢性炎症、肝纤维化、肝硬化，甚至转化为肝细胞癌[8]。

腹腔注射 CCl_4 法是经典的毒物诱导肝纤维化模型的方法[9]。肝纤维化时，肝脏发生免疫应答，有炎性细胞浸润；大量脂质过氧化物外溢，肝星状细胞被活化后转变为肌成纤维细胞，表达大量肌性骨架蛋白，如α-SMA，分泌大量的ECM以致过度沉积[10]；纤维结缔组织增生，形成桥接，严重时有假小叶形成。ECM以Col1α1为主，天狼星红染色可以特异地显示胶原组织。而羟脯氨酸是胶原所特有的氨基酸，测定肝组织中羟脯氨酸含量可知胶原总体水平，是反映肝纤维化程度的直接指标。

ALT与AST是检测肝功能的指标，能反映肝细胞是否损伤及损伤程度。CD68是肝巨噬细胞的特异性标志物，同时也是反映肝脏炎症程度的指标。基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinases，MMPs）能降解ECM[11]，分解纤维化结构。而肝纤维化进程中，MMPs下调，而TIMP-1表达会上调，TIMP-1也是反映肝纤维化的一个指标。

近年有研究显示，黄连素具有抗炎、抗氧化应激作用[12]，下调促炎性细胞因子白细胞介素-6和肿瘤坏死因子-α的释放；能通过抑制p65的磷酸化及抑制核转录因子κB激酶抑制剂（inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase，IKK）介导的IκBα降解，进而抑制由炎性因子或致癌物质诱导的核因子κB信号通路活化[13]。这为研究黄连素减轻肝纤维化的作用机制提供了线索。器官纤维化是ECM过度沉积的病理进程，可引起器官结构紊乱和功能减退，甚至器官硬化以致衰竭[14]。近年来，有关用黄连素治疗纤维化的研究不断加深，有学者尝试用黄连素治疗心肌纤维化[15]、肺纤维化[16]、肾间质纤维化[17]，这为研究黄连素治疗肝纤维化提供了理论基础。

本研究中，通过肝组织病理学观察，黄连素能减轻肝纤维化程度，降低纤维结缔组织增殖及炎性反应，减少胶原沉积。黄连素组肝脏中羟脯氨酸含量减少，说明胶原合成减少。在肝功能检测中，黄连素均能降低ALT和AST活力，减轻肝损伤。免疫组织化学检测结果显示，黄连素能下调肝纤维化进程中α-SMA和CD68的表达。同时通过Western blot和实时PCR，在蛋白水平和mRNA水平上证明，黄连素能下调α-SMA的表达。而且在mRNA水平上，黄连素同时下调肝纤维化模型的Col1α1和TIMP-1的表达。

综上所述，黄连素可以在一定程度上抑制肝纤维化进程，其机制可能与其抑制肝内慢性炎症有关，详细机制还有待进一步研究。

参考文献：

[1] URTASUN R, LOPATEGI A, GEORGE J, et al. Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-Ⅰ via integrin α(V)β(3) engagement and PI3K/pAkt/NFκB signaling[J]. Hepatology, 2012, 55(2):594-608.

[2] MENG F, WANG K, AOYAMA T, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice[J]. Gastroenterology, 2012, 143(3):765-776.

[3] ZHANG Z, ZHANG H, LI B, et al. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue [J]. Nat Commun, 2014, 5:5493.

[4] LI K, YAO W, ZENG X, et al. Berberine promotes the development of atherosclerosis and foam cell formation by inducing scavenger receptor A expression in

macrophage[J]. Cell Res, 2009, 19(8):1006-1017.
[5] KONG W, WEI J, ABIDI P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins[J]. Nat Med, 2004, 10(12):1344-1351.
[6] CHEN J, WU F X, LUO H L, et al. Berberine upregulates miR-22-3p to suppress hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting Sp1[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(11):4932.
[7] WANG N, WANG X, TAN H Y, et al. Berberine Suppresses Cyclin D1 Expression through Proteasomal Degradation in Human Hepatoma Cells[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11):1899.
[8] STAUFFER J K, SCARZELLO A J, JIANG Q, et al. Chronic inflammation, immune escape, and oncogenesis in the liver: A unique neighborhood for novel intersections[J]. Hepatology, 2012, 56(4):1567-1574.
[9] LIEDTKE C, LUEDDE T, SAUERBRUCH T, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects[J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2013, 6(1):19.
[10] LIU Y, LIU Q, YE G, et al. Protective effects of Selenium-enriched probiotics on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats[J]. J Agric Food Chem, 2014, 63(1):242-249.
[11] PELLICORO A, AUCOTT R L, RAMACHANDRAN P, et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis[J]. Hepatology, 2012, 55(6):1965-1975.
[12] ALLIJN I E, CZARNY B M, WANG X, et al. Liposome encapsulated berberine treatment attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction[J]. J Control Release, 2017, 247:127.
[13] PANDEY M K, SUNG B, KUNNUMAKKARA A B, et al. Berberine modifies cysteine 179 of IkappaB kinase, suppresses nuclear factor-kappa B-regulated antiapoptotic gene products, and potentiates apoptosis [J]. Cancer research, 2008, 68(13):5370-5379.
[14] 张绪富，贺松其，吕志平. “从络论治”器官纤维化异病同治研究思路探讨[J]. 中国中医基础医学杂志，2009(1):80.
[15] DASKALOPOULOS E P, DUFEYS C, BERTRAND L, et al. AMPK in cardiac fibrosis and repair: actions beyond metabolic regulation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 91:188-200.
[16] CHITRA P, SAIPRASAD G, MANIKANDAN R, et al. Berberine inhibits Smad and non-Smad signaling cascades and enhances autophagy against pulmonary fibrosis[J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93(9):1015. DOI: 10.1007/s00109-015-1283-1.
[17] WANG F M, YANG Y J, MA L L, et al. Berberine ameliorates renal interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction in rats[J]. Nephrology (Carlton), 2014, 19(9):542-551.

(收稿日期:2017-01-09;编辑:姚实林)

Effect of Berberine on Liver Fibrosis in Mice

OU Yi-tao, YANG Gui-zhi, LAN Tian, LI Wei-dong
(*Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Guangzhou* 510006, *China*)

[**Abstract**]**Objective** To investigate the mechanism of action of berberine in the prevention and treatment of liver fibrosis. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into normal group, liver fibrosis group, and berberine group, and intraperitoneal injection of carbon tetrachloride was performed to establish an animal model of liver fibrosis. Berberine was used for treatment. After 6 weeks, the activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were measured, liver pathological changes were observed, and the level of hydroxyproline was measured. Western blot and real-time PCR were used to measure the levels of alpha-smooth muscle actin (α-SMA), collagen type Ⅰ α1 (Col1α1), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1). **Results** Compared with the liver fibrosis group, the berberine intervention group had significantly alleviated liver injury and fibrosis, reduced collagen synthesis and deposition, alleviated inflammatory response, reduced activities of ALT and AST, and reduced synthesis of α-SMA, Col1α1, and TIMP-1. **Conclusion** Berberine can inhibit inflammatory response and collagen deposition and thus reduce liver fibrosis in mice.

[**Key words**]Berberine; Liver fibrosis; Liver function; Smooth muscle actin; Collagen type Ⅰ; Tissue inhibitor of metalloproteinase