

# 丁香苷调节Hedgehog-YAP1信号通路对肝硬化大鼠纤维化的影响

吴德建<sup>1</sup> 杨秋<sup>2</sup> 谢桂丹<sup>1</sup> 彭鑫<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>儋州市人民医院, 消化内科, 儋州 571799; <sup>2</sup>海南西部中心医院, 检验科, 儋州 571799)

**摘要** 为了探讨丁香苷调节Hedgehog-Yes相关蛋白(YAP)信号通路对肝硬化大鼠纤维化的影响, 取SD大鼠腹腔注射四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)构建肝硬化模型, 随机分为模型组、丁香苷低剂量组、丁香苷高剂量组、Purmorphamine(Hedgehog激活剂)组、丁香苷高剂量+Purmorphamine组, 另选大鼠设为对照组, 以丁香苷和Purmorphamine分组处理后, 检测肝指数及肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平; 采用Masson染色检测肝硬化大鼠肝组织纤维化情况; 采用试剂盒测量各组肝硬化大鼠肝组织羧脯氨酸(HYP)含量, 肝组织与血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA, 总抗氧化能力(TAC)水平; 采用免疫印迹检测各组肝硬化大鼠肝组织胶原蛋白collagen I、collagen I表达及Hedgehog-YAP1信号相关蛋白表达情况。结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠肝指数, ALT水平, AST水平, 血清TNF- $\alpha$ 水平、IL-6水平、MDA水平, 肝组织TNF- $\alpha$ 水平、IL-6水平、MDA水平、胶原纤维占比、HYP含量、collagen I蛋白表达水平、collagen III蛋白表达水平、Hedgehog蛋白表达水平及p-YAP1/YAP1升高( $P < 0.05$ ), 肝组织与血清TAC水平降低( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 丁香苷低和高剂量组大鼠肝指数, ALT水平, AST水平, 血清TNF- $\alpha$ 水平、IL-6水平、MDA水平, 肝组织TNF- $\alpha$ 水平、IL-6水平、MDA水平、胶原纤维占比、HYP含量、collagen I蛋白表达水平、collagen III蛋白表达水平、Hedgehog蛋白表达水平及p-YAP1/YAP1降低( $P < 0.05$ ), 肝组织与血清TAC水平均升高( $P < 0.05$ ), 且高剂量丁香苷作用更强。Purmorphamine组大鼠各指标变化趋势与丁香苷低、高剂量组相反, 且Purmorphamine可逆转丁香苷对模型组大鼠各指标的作用。这表明丁香苷可通过阻止Hedgehog-YAP1信号激活而抑制炎症及氧化应激, 从而减轻肝硬化大鼠肝纤维化, 改善其肝功能。

**关键词** 丁香苷; Hedgehog-YAP1; 肝硬化; 纤维化

## Impact of Syringin on the Fibrosis of Cirrhotic Rats by Regulating Hedgehog-YAP1 Signal Pathway

WU Jiande<sup>1</sup>, YANG Qiu<sup>2</sup>, XIE Guidan<sup>1</sup>, PENG Xin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Digestive System Department, Danzhou People's Hospital, Danzhou 571799, China;

<sup>2</sup>Laboratory Department, Western Central Hospital of Hainan, Danzhou 571799, China)

**Abstract** In order to investigate the impact of syringin on the fibrosis of cirrhotic rats by regulating Hedgehog-YAP1 (Yes-associated protein 1) signal pathway, SD rats were randomly divided into model group, low-dose syringin group, high-dose syringin group, Purmorphamine (Hedgehog activator) group, high-dose syringin+Purmorphamine group, another rats were selected as the control group, the liver index and liver function

收稿日期: 2024-06-02

接受日期: 2025-01-02

海南省卫生健康行业科研项目(批准号: 22A200156)资助的课题

\*通信作者。Tel: 13976783682, E-mail: gjocp60@163.com

Received: June 2, 2024

Accepted: January 2, 2025

This work was supported by the Hainan Province Health Industry Research Project (Grant No.22A200156)

\*Corresponding author. Tel: +86-13976783682, E-mail: gjocp60@163.com

indexes [ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase)] were measured after treatment with syringin and Purmorphamine; the hepatic fibrosis was detected by Masson staining in cirrhotic rats; the content of HYP (hydroxyproline) in liver tissue, and the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, MDA and TAC (total antioxidant capacity) in liver tissue and serum of cirrhotic rats in each group were measured with the kit; Western blot was used to detect the expression of collagen I, collagen III and Hedgehog-YAP1 signal related protein in liver tissues of cirrhotic rats in each group. The results show that, compared with the control group, the liver index, the levels of ALT and AST, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and MDA in serum, the content of HYP in liver tissue, the proportion of collagen fibers in liver tissue, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and MDA in liver tissue, the expression of collagen I, collagen III, Hedgehog proteins in liver tissue and p-YAP1/YAP1 in liver tissue in model group increased ( $P < 0.05$ ), while the level of TAC in serum and in liver tissue decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and MDA in serum, the content of HYP in liver tissue, the proportion of collagen fibers in liver tissue, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and MDA in liver tissue, the expression of collagen I, collagen III, Hedgehog proteins in liver tissue and p-YAP1/YAP1 in liver tissue in the low-dose and high-dose syringin groups decreased ( $P < 0.05$ ), the level of TAC increased ( $P < 0.05$ ), and the effect of high dose syringin is stronger. The change trend of each index of rats in the Purmorphamine group is contrary to that in the low and high dose groups of syringin, and Purmorphamine can reverse the effect of syringin on each index of rats in the model group. This indicates that syringin can inhibit inflammation and oxidative stress by blocking the activation of Hedgehog-YAP1 signal, thereby reducing liver fibrosis and improving liver function in cirrhotic rats.

**Keywords** syringin; Hedgehog-Yes-associated protein 1; cirrhosis; fibrosis

肝硬化是临床常见的一种慢性进行性肝病,多数是肝炎、非酒精性脂肪性肝病等肝病进展的结果,可引发肝细胞坏死、肝组织弥漫性纤维化、假小叶和再生结节形成等病理改变,导致肝功能减退,给患者生命安全造成极大威胁<sup>[1-2]</sup>。以细胞外基质过度积累和肝脏结构改变为特征的肝纤维化是肝硬化的主要病理基础,炎症和氧化应激在其中起到关键作用,做抗氧化和抗炎处理是抑制纤维化,延缓肝硬化进展的有效策略<sup>[3-4]</sup>。Hedgehog-Yes相关蛋白1(Yes-associated protein 1, YAP1)信号可调控能量消耗、炎症和纤维化过程,在肝纤维化、肝硬化中发挥重要作用,该信号抑制剂可阻止成纤维细胞的积累和纤维化进展,改善肝硬化症状<sup>[5-7]</sup>,因此Hedgehog-YAP1可作为潜在的肝硬化治疗靶点。丁香苷又叫紫丁香苷,是欧丁香、刺五加等植物中含有的一种苯丙醇苷类化合物,具有抑制脂质过氧化、抗炎和抗肝毒功能,可抑制脂多糖诱发的肌管细胞炎症<sup>[8-9]</sup>,还可通过抑制脂质过氧化和炎症减轻大鼠肝缺血再灌注损伤,改善其肝功能<sup>[10]</sup>,但紫丁香苷是否可通过抗炎和抗氧化功能而抑制肝硬化,目前尚未有明确阐释,本文通过建立肝硬化大鼠模型,研究丁香苷调节Hedgehog-YAP1信号通路对肝硬化大鼠

纤维化的影响。

## 1 材料

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~7周龄、体质量215~250 g、SRF级SD健康雄性大鼠,购自海南药物研究所有限责任公司,生产许可证号SCXK(琼)2020-0007。大鼠在温度(23±2) °C、湿度(55±5)%的动物房中饲养,食水取用自由,室内保持明暗各12 h的循环照明。

1.1.2 主要试剂及仪器 四氯化碳(CCl<sub>4</sub>, 纯度: 98%, 货号C27710)购于上海吉至生化科技有限公司;丁香苷标准品(纯度: HPLC≥98%, 货号SS8790)、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)含量检测试剂盒(货号BC0255)购于北京索莱宝科技有限公司;兔抗大鼠Anti-YAP1一抗(货号AF5339)、MDA检测试剂盒(货号S0131S)、兔抗大鼠Anti- $\beta$ -actin一抗(货号AF5003)、Purmorphamine(纯度: 98%, 货号SF6822-25 mg)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, TAC)检测试剂盒(货号S0121)均购于上海碧云天生物技术有限公司;兔抗大鼠Anti-Hedgehog一抗(货号ab19897)、兔抗大鼠Anti-p-YAP1一抗(货号ab76252)、大鼠TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒(货号

ab236712)、Masson染色试剂盒(货号ab150669)、兔抗大鼠Anti-collagen I抗体(货号ab270993)、兔抗大鼠Anti-collagen III抗体(货号ab184993)、HRP标记驴抗兔二抗(货号ab205722)、大鼠IL-6 ELISA试剂盒(货号ab234570)均购于美国Abcam公司。

全自动生化分析仪购于北京普朗新技术有限公司,型号PUZS-600A/B;多功能酶标仪购于瑞士Tecan公司,型号BK-EL10C;切片仪购于德国Leica公司,型号SM2010R;生物光学显微镜购于南京新睿之鸿光学仪器有限公司,型号cm2000s;双稳电泳仪电源、电泳仪、湿式转膜仪购于北京好亿科技发展有限公司,型号分别为ELITE HC 2.0、V-GE、E-BlotterS等。

## 1.2 方法

**1.2.1 建立肝硬化大鼠模型并分组处理** 本研究方案经儋州市人民医院医学伦理委员会批准(批件号:2021-0876)。参考文献[11]中方法建立肝硬化大鼠模型:将四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )与大豆油混匀制成体积分数为20%的 $\text{CCl}_4$ 大豆油溶液,以5 mL/kg的剂量向SD大鼠腹腔内注射,每周注射2次,持续7周,然后随机选3只造模大鼠观察其肝组织病理形态,若肝细胞大量坏死、肝组织有大量胶原沉积及炎症浸润,即可视为肝硬化大鼠造模成功。随机将大鼠分为模型组、丁香苷低剂量组(50 mg/kg)、丁香苷高剂量组(100 mg/kg)、Purmorphamine组(Hedgehog激活剂,1 mg/kg)、丁香苷高剂量(100 mg/kg)+Purmorphamine(1 mg/kg)组,每组12只,另选12只SD大鼠腹腔注射等剂量大豆油设为对照组。

取SD大鼠腹腔注射 $\text{CCl}_4$ 诱导构建肝硬化模型,以丁香苷和Purmorphamine分组处理,采用生理盐水溶解丁香苷高剂量和Purmorphamine并混匀制为5、10 g/L的丁香苷药液和0.1 g/L的Purmorphamine药液,丁香苷低剂量组、丁香苷高剂量组大鼠分别以50、100 mg/kg的丁香苷静脉注射(1次/天)<sup>[10]</sup>,同时腹腔注射10 mL/kg生理盐水(1次/天);Purmorphamine组大鼠静脉注射10 mL/kg生理盐水(1次/天),同时腹腔注射1 mg/kg的Purmorphamine药液(1次/天)<sup>[12]</sup>;丁香苷高剂量+Purmorphamine组大鼠静脉注射100 mg/kg的丁香苷药液(1次/天),同时腹腔注射1 mg/kg的Purmorphamine药液(1次/天);对照组、模型组均以10 mL/kg生理盐水进行静脉于腹腔注射(1次/天),给药处理21天。

**1.2.2 肝指数、肝功能指标ALT、AST水平检测及标本采集** 于药物分组给药完成后24 h腹腔注射40 mg/kg戊巴比妥钠麻醉各组大鼠,自颈动脉取血后采用全自动生化分析仪检测其中肝功能指标谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平,再次取血后4 °C、3 000 r/min离心20 min,取血清存在-80 °C备用;颈椎脱臼处死大鼠,称量各组大鼠体质量后开腹取肝脏并称重,计算肝指数,公式为:肝指数(mg/g)=肝脏质量(mg)/体质量(g);每组自肝脏上剪下约0.7 g肝组织,置于RAPI中研磨匀浆,4 °C、3 000 r/min离心20 min后取上清,BCA法定量其中总蛋白浓度后存在-80 °C备用;剩余的肝组织清洗后4 °C下以10%甲醛固定,随后均于37 °C下进行二甲苯透明、梯度(80%、85%、90%、100%)酒精脱水处理,然后60 °C下以石蜡包埋制备为5  $\mu\text{m}$ 厚的薄片备用。

**1.2.3 Masson染色** 取出1.2.2中的肝脏组织石蜡切片于37 °C下经二甲苯脱蜡后使用梯度(100%、90%、80%、75%)酒精水化,水洗后以苏木素染细胞核5 min,自来水冲洗后用1%盐酸酒精分化数秒,用流水冲洗返蓝,以丽春红酸性品红染液染色5 min,用蒸馏水快速漂洗后用1%磷钼酸水溶液处理2 min,用苯胺蓝染液复染2 min,用1%冰醋酸溶液分化1 min即完成Masson染色,再次脱水透明,封片后于生物光学显微镜下观察染色后的切片并摄取其图片。采用ImageJ软件定量图片中切片面积及胶原纤维所占面积,计算肝组织胶原纤维占比,公式为:肝组织胶原纤维占比=胶原纤维所占面积/切片面积 $\times 100\%$ 。

**1.2.4 肝组织HYP含量,肝组织与血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA、TAC水平测量** 取出1.2.2中的肝组织样品液和血清,放入4 °C冰箱中解冻后,取250  $\mu\text{L}$ 肝组织样品液测出其中HYP含量与TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA、TAC水平,取200  $\mu\text{L}$ 血清测出其中TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA、TAC水平,进行加样、加工作液、显色。终止反应后采用酶标仪测定各组吸光度值后,参照HYP、MDA与TAC检测试剂盒说明书中方法测定HYP含量、MDA与TAC水平,参照ELISA试剂盒说明书中方法测定TNF- $\alpha$ 、IL-6水平。

**1.2.5 免疫印迹检测** 将1.2.4中剩余的各组肝组织样品液以100 °C沸水浴变性其中蛋白,每组以25  $\mu\text{g}$ 蛋白量通过电泳进行蛋白分离,随后通过湿

转进行蛋白转印, 移到硝酸纤维膜上的各组蛋白以5%脱脂奶粉进行封闭后根据分子量将collagen I、collagen III、 $\beta$ -actin、Hedgehog、YAP1、p-YAP1蛋白剪下, 以兔抗collagen I(1:1 000)、collagen III(1:2 000)、 $\beta$ -actin(1:2 000)、Hedgehog(1:2 000)、YAP1(1:2 000)、p-YAP1(1:1 000)一抗于4 °C孵育过夜后洗膜, 以HRP标记驴抗兔二抗(1:1 000)分别于37 °C孵育2 h各蛋白后洗膜, 以化学发光法对HRP显色后摄取各组蛋白条带图片, 运用ImageJ软件定量图片中各组蛋白灰度值后分析得到其相对表达水平。

### 1.3 统计分析

采用SPSS 26.0软件对本文实验数据做统计分析, 同时使用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 每组样本数为12, 实验重复3次, 采用单因素方差分析比较多组间差异, 两两之间差异进一步比较行SNK-*q*检验,  $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 丁香苷对各组大鼠肝指数及肝功能的影响

模型组大鼠肝指数及肝功能指标ALT、AST水平高于对照组( $P<0.05$ ); 丁香苷低、高剂量组大鼠肝指数及肝功能指标ALT、AST水平均低于模型组( $P<0.05$ ), 丁香苷高剂量组低于其低剂量组( $P<0.05$ ), Purmorphamine组高于模型组( $P<0.05$ ); 丁香苷高剂量+Purmorphamine组大鼠肝指数及肝功能指标ALT、AST水平高于丁香苷高剂量组( $P<0.05$ ), 但低于Purmorphamine组( $P<0.05$ )。见表1。

### 2.2 丁香苷对肝硬化大鼠肝组织纤维化的影响

模型组大鼠肝组织胶原纤维占比高于对照组( $P<0.05$ ); 丁香苷低、高剂量组大鼠肝组织胶原纤维占比均低于模型组( $P<0.05$ ), 丁香苷高剂量组低于其低剂量组( $P<0.05$ ), Purmorphamine组高于模型组( $P<0.05$ ); 丁香苷高剂量+Purmorphamine组大鼠肝组织胶原纤维占比高于丁香苷高剂量组( $P<0.05$ ), 但低于Purmorphamine组。见图1和表2。

### 2.3 丁香苷对肝硬化大鼠肝组织HYP含量的影响

模型组大鼠肝组织HYP含量高于对照组( $P<0.05$ ); 丁香苷低、高剂量组大鼠肝组织HYP含量均低于模型组( $P<0.05$ ), 丁香苷高剂量组低于其低剂量组( $P<0.05$ ), Purmorphamine组高于模型组( $P<0.05$ ); 丁香苷高剂量+Purmorphamine组大鼠肝组织HYP含量高于丁香苷高剂量组( $P<0.05$ ), 但低于Purmorphamine组。见表3。

### 2.4 丁香苷对肝硬化大鼠肝组织炎症及氧化应激因子水平的影响

模型组大鼠肝组织TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平高于对照组( $P<0.05$ ), TAC水平低于对照组( $P<0.05$ )。丁香苷低、高剂量组大鼠肝组织TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平均低于模型组( $P<0.05$ ), TAC水平均高于模型组( $P<0.05$ ); 丁香苷高剂量组TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平低于其低剂量组( $P<0.05$ ), TAC水平高于其低剂量组( $P<0.05$ ); Purmorphamine组TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平高于模型组( $P<0.05$ ), TAC水平低于模型组( $P<0.05$ )。丁香苷高剂量+Purmorphamine组大鼠肝组织TNF- $\alpha$ 、

表1 各组大鼠肝指数及肝功能指标ALT、AST水平

Table 1 Liver index and liver function indicators ALT and AST levels in each group of rats

组别 Groups	肝指数/mg·g <sup>-1</sup> liver index /mg·g <sup>-1</sup>	ALT /U·L <sup>-1</sup>	AST /U·L <sup>-1</sup>
Control group	2.10 $\pm$ 0.23	46.13 $\pm$ 2.04	38.89 $\pm$ 2.63
Model group	5.30 $\pm$ 0.51*	376.84 $\pm$ 15.61*	259.94 $\pm$ 17.52*
Low-dose syringin group	3.72 $\pm$ 0.31 <sup>#</sup>	215.23 $\pm$ 12.06 <sup>#</sup>	151.22 $\pm$ 13.02 <sup>#</sup>
High-dose syringin group	2.29 $\pm$ 0.18 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	52.71 $\pm$ 7.36 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	43.74 $\pm$ 7.31 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
Purmorphamine group	6.87 $\pm$ 0.49 <sup>#</sup>	489.57 $\pm$ 20.72 <sup>#</sup>	372.51 $\pm$ 21.74 <sup>#</sup>
syringin+Purmorphamine group	5.08 $\pm$ 0.55 <sup>#<math>\Delta</math><math>\&amp;</math></sup>	369.32 $\pm$ 14.35 <sup>#<math>\Delta</math><math>\&amp;</math></sup>	248.37 $\pm$ 19.36 <sup>#<math>\Delta</math><math>\&amp;</math></sup>

\* $P<0.05$ , 与对照组比较; <sup>#</sup> $P<0.05$ , 与模型组比较;  <sup>$\Delta$</sup>  $P<0.05$ , 与丁香苷低剂量组比较; <sup>\*</sup> $P<0.05$ , 与丁香苷高剂量组比较; <sup>&</sup> $P<0.05$ , 与Purmorphamine组比较。  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ 。

\* $P<0.05$  compared with the control group; <sup>#</sup> $P<0.05$  compared with the model group;  <sup>$\Delta$</sup>  $P<0.05$  compared with the low-dose syringin group; <sup>\*</sup> $P<0.05$  compared with the high-dose syringin group; <sup>&</sup> $P<0.05$  compared with the Purmorphamine group.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ .

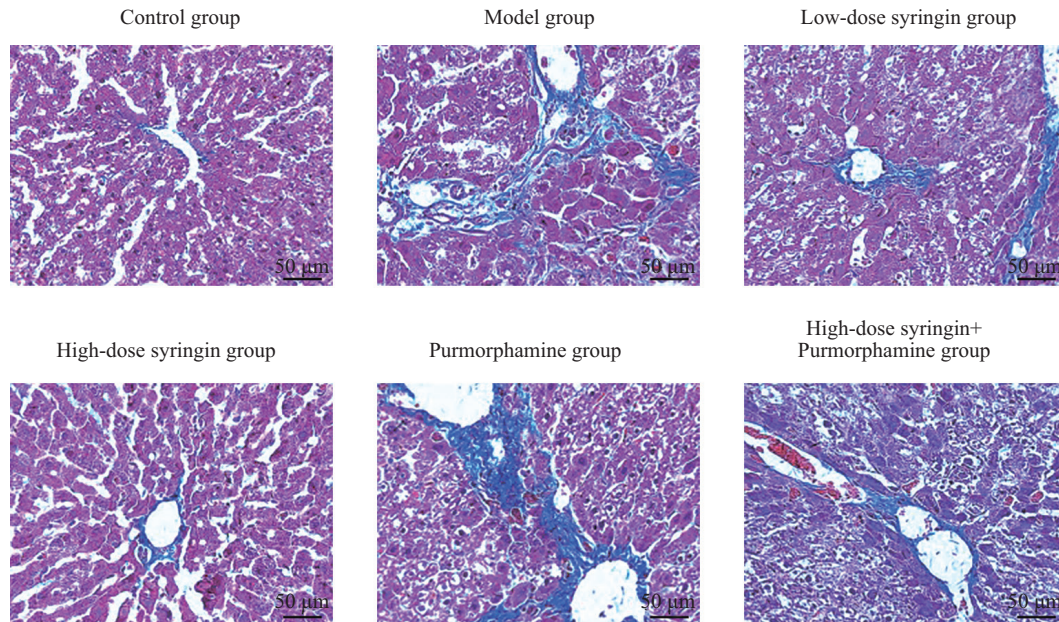


图1 Masson染色检测肝硬化大鼠肝组织纤维化

Fig.1 The liver fibrosis in cirrhotic rats in each group was detected by Masson staining

表2 各组大鼠肝组织胶原纤维占比

Table 2 Proportion of collagen fibers in liver tissue of rats in each group

组别 Groups	肝组织胶原纤维占比/% Proportion of collagen fibers in liver tissue / %
Control group	0.24±0.04
Model group	25.37±3.65*
Low-dose syringin group	13.76±1.68 <sup>#</sup>
High-dose syringin group	2.96±0.32 <sup>#△</sup>
Purmorphamine group	36.82±4.14 <sup>#</sup>
High-dose syringin+Purmorphamine group	23.80±2.57 <sup>☆&amp;</sup>

\* $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , 与模型组比较; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , 与丁香苷低剂量组比较; <sup>☆</sup> $P < 0.05$ , 与丁香苷高剂量组比较; <sup>&</sup> $P < 0.05$ , 与Purmorphamine组比较。  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ 。

\* $P < 0.05$  compared with the control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  compared with the model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the low-dose syringin group; <sup>☆</sup> $P < 0.05$  compared with the high-dose syringin group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  compared with the Purmorphamine group.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ .

表3 各组大鼠肝组织HYP含量

Table 3 HYP content in liver tissue of rats in each group

组别 Groups	HYP含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ HYP content / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
Control group	343.84±42.13
Model group	1 174.36±94.54*
Low-dose syringin group	768.47±71.42 <sup>#</sup>
High-dose syringin group	359.11±45.72 <sup>#△</sup>
Purmorphamine group	1 591.36±120.12 <sup>#</sup>
High-dose syringin+Purmorphamine group	1 138.18±106.54 <sup>☆&amp;</sup>

\* $P < 0.05$ , 与对照组比较; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , 与模型组比较; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , 与丁香苷低剂量组比较; <sup>☆</sup> $P < 0.05$ , 与丁香苷高剂量组比较; <sup>&</sup> $P < 0.05$ , 与Purmorphamine组比较。  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ 。

\* $P < 0.05$  compared with the control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  compared with the model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  compared with the low-dose syringin group; <sup>☆</sup> $P < 0.05$  compared with the high-dose syringin group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  compared with the Purmorphamine group.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ .

表4 各组大鼠肝组织TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA、TAC水平Table 4 Levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, MDA, and TAC in liver tissue of rats in each group

组别 Groups	TNF- $\alpha$ /pg·mg <sup>-1</sup> prot	IL-6 /pg·mg <sup>-1</sup> prot	MDA /nmol·mg <sup>-1</sup> prot	TAC /nmol·mg <sup>-1</sup> prot
Control group	65.23±10.45	70.48±11.16	4.12±0.83	15.69±1.22
Model group	192.76±22.71*	237.52±26.68*	27.03±3.75*	4.14±0.50*
Low-dose syringin group	130.43±13.93 <sup>#</sup>	154.76±21.24 <sup>#</sup>	16.92±2.91 <sup>#</sup>	9.27±0.80 <sup>#</sup>
High-dose syringin group	74.94±12.16 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	78.93±9.36 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	5.01±0.79 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	14.72±0.93 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
Purmorphamine group	259.87±25.21 <sup>#</sup>	323.27±28.12 <sup>#</sup>	38.24±4.48 <sup>#</sup>	0.83±0.15 <sup>#</sup>
High-dose syringin+Purmorphamine group	181.87±20.54 <sup>☆<math>\&amp;</math></sup>	228.45±25.30 <sup>☆<math>\&amp;</math></sup>	25.73±3.14 <sup>☆<math>\&amp;</math></sup>	4.96±0.61 <sup>☆<math>\&amp;</math></sup>

\* $P$ <0.05, 与对照组比较; <sup>#</sup> $P$ <0.05, 与模型组比较;  <sup>$\Delta$</sup>  $P$ <0.05, 与丁香苷低剂量组比较; <sup>☆</sup> $P$ <0.05, 与丁香苷高剂量组比较;  <sup>$\&$</sup>  $P$ <0.05, 与Purmorphamine组比较。  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ 。

\* $P$ <0.05 compared with the control group; <sup>#</sup> $P$ <0.05 compared with the model group;  <sup>$\Delta$</sup>  $P$ <0.05 compared with the low-dose syringin group; <sup>☆</sup> $P$ <0.05 compared with the high-dose syringin group;  <sup>$\&$</sup>  $P$ <0.05 compared with the Purmorphamine group.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ 。

表5 各组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA、TAC水平Table 5 Serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, MDA, and TAC in rats of each group

组别 Groups	TNF- $\alpha$ /ng·L <sup>-1</sup>	IL-6 /ng·L <sup>-1</sup>	MDA /nmol·L <sup>-1</sup>	TAC / $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>
Control group	121.43±16.47	99.53±12.20	8.11±0.85	29.61±5.81
Model group	456.87±54.21*	342.93±34.14*	39.24±5.69*	7.34±0.93*
Low-dose syringin group	293.46±32.94 <sup>#</sup>	223.76±27.45 <sup>#</sup>	24.13±3.67 <sup>#</sup>	17.50±3.26 <sup>#</sup>
High-dose syringin group	132.01±15.83 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	112.01±23.84 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	9.05±1.32 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	28.12±5.69 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
Purmorphamine group	623.82±62.05 <sup>#</sup>	467.58±42.37 <sup>#</sup>	45.21±7.76 <sup>#</sup>	0.91±0.21 <sup>#</sup>
High-dose syringin+Purmorphamine group	443.97±48.16 <sup>☆<math>\&amp;</math></sup>	331.73±32.36 <sup>☆<math>\&amp;</math></sup>	35.95±5.14 <sup>☆<math>\&amp;</math></sup>	8.25±0.87 <sup>☆<math>\&amp;</math></sup>

\* $P$ <0.05, 与对照组比较; <sup>#</sup> $P$ <0.05, 与模型组比较;  <sup>$\Delta$</sup>  $P$ <0.05, 与丁香苷低剂量组比较; <sup>☆</sup> $P$ <0.05, 与丁香苷高剂量组比较;  <sup>$\&$</sup>  $P$ <0.05, 与Purmorphamine组比较。  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ 。

\* $P$ <0.05 compared with the control group; <sup>#</sup> $P$ <0.05 compared with the model group;  <sup>$\Delta$</sup>  $P$ <0.05 compared with the low-dose syringin group; <sup>☆</sup> $P$ <0.05 compared with the high-dose syringin group;  <sup>$\&$</sup>  $P$ <0.05 compared with the Purmorphamine group.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ 。

IL-6、MDA水平高于丁香苷高剂量组( $P$ <0.05), 但低于Purmorphamine组; TAC水平低于丁香苷高剂量组( $P$ <0.05), 但高于Purmorphamine组( $P$ <0.05)。见表4。

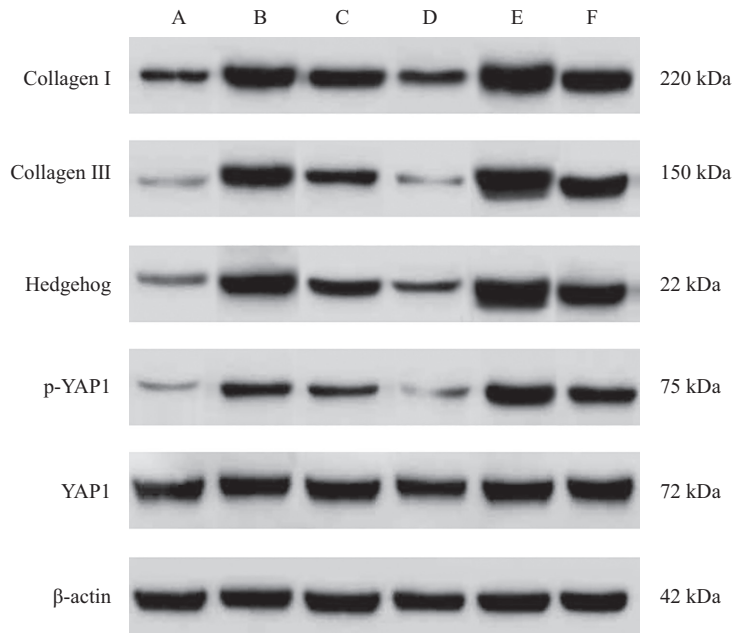
## 2.5 丁香苷对肝硬化大鼠血清炎症及氧化应激因子水平的影响

模型组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平高于对照组( $P$ <0.05), TAC水平低于对照组( $P$ <0.05)。丁香苷低、高剂量组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平均低于模型组( $P$ <0.05), TAC水平均高于模型组( $P$ <0.05); 丁香苷高剂量组TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平低于其低剂量组( $P$ <0.05), TAC水平高于其低剂量组( $P$ <0.05); Purmorphamine组TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平高于模型组( $P$ <0.05), TAC水平低于模型组( $P$ <0.05)。丁香苷高剂量+Purmorphamine组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平高于丁香苷高剂量组

( $P$ <0.05), 但低于Purmorphamine组; TAC水平低于丁香苷高剂量组( $P$ <0.05), 但高于Purmorphamine组( $P$ <0.05)。见表5。

## 2.6 丁香苷对肝硬化大鼠肝组织胶原蛋白及Hedgehog-YAP1信号相关蛋白表达的影响

模型组大鼠肝组织collagen I、collagen III、Hedgehog蛋白表达及p-YAP1/YAP1高于对照组( $P$ <0.05); 丁香苷低、高剂量组大鼠肝组织collagen I、collagen III、Hedgehog蛋白表达及p-YAP1/YAP1均低于模型组( $P$ <0.05), 丁香苷高剂量组低于其低剂量组( $P$ <0.05), Purmorphamine组高于模型组( $P$ <0.05); 丁香苷高剂量+Purmorphamine组大鼠肝组织collagen I、collagen III、Hedgehog蛋白表达及p-YAP1/YAP1高于丁香苷高剂量组( $P$ <0.05), 但低于Purmorphamine组( $P$ <0.05)。见图2和图3。

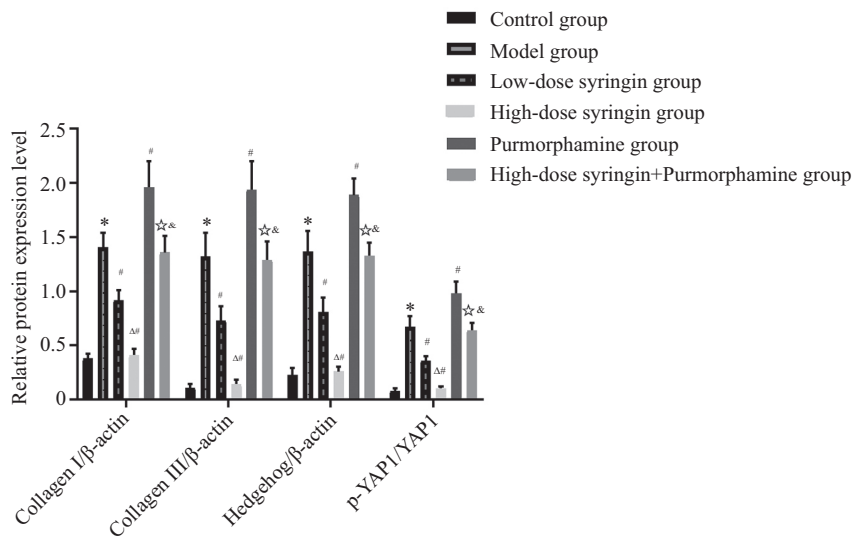


A: 对照组; B: 模型组; C: 丁香苷低剂量组; D: 丁香苷高剂量组; E: Purmorphamine组; F: 丁香苷高剂量+Purmorphamine组。

A: control group; B: model group; C: low-dose syringin group; D: high-dose syringin group; E: Purmorphamine group; F: high-dose syringin+Purmorphamine group.

图2 免疫印迹检测各组大鼠肝组织胶原蛋白及Hedgehog-YAP1信号相关蛋白表达

Fig.2 The expression of collagen and Hedgehog-YAP1 signaling related proteins in liver tissue of rats in each group were detected by immunoblotting



\* $P < 0.05$ , 与对照组比较; # $P < 0.05$ , 与模型组比较;  $\Delta P < 0.05$ , 与丁香苷低剂量组比较; ☆ $P < 0.05$ , 与丁香苷高剂量组比较; & $P < 0.05$ , 与Purmorphamine组比较。  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ 。

\* $P < 0.05$  compared with the control group; # $P < 0.05$  compared with the model group;  $\Delta P < 0.05$  compared with the low-dose syringin group; ☆ $P < 0.05$  compared with the high-dose syringin group; & $P < 0.05$  compared with the Purmorphamine group.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ 。

图3 各组大鼠肝组织胶原蛋白及Hedgehog-YAP1信号相关蛋白相对表达

Fig.3 Relative expression of collagen and Hedgehog-YAP1 signaling related proteins in liver tissue of rats in each group

### 3 讨论

肝硬化目前不可能完全根治,且临床上也没有特效治疗药物,只能进行保肝治疗,尽量延缓病情进

展,到了肝硬化失代偿期只能进行肝脏移植,但花费高昂且肝源难寻,因此探寻有效的防治肝硬化药物是临床的迫切需求<sup>[13-14]</sup>。本文通过腹腔注射 CCL<sub>4</sub>

诱导构建肝硬化模型,结果显示造模大鼠炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6大量合成分泌,抗氧化活力明显降低,引发强烈炎症和氧化应激,诱导大鼠肝组织发生纤维化变性,使肝脏质量增大,损害肝功能,提示肝硬化模型构建成功。

炎症和氧化应激可引发严重的肝组织纤维化,是肝硬化发生及病情进展的主要病理机制,降低炎症水平并增强抗氧化功能可显著抑制肝纤维化,改善肝硬化症状<sup>[3-4,15]</sup>。丁香苷是一种具有抑制炎症、降低氧化应激和肝保护作用的天然化合物,可明显降低炎症因子表达水平,减少中性粒细胞浸润,通过抗炎作用而减轻大鼠脑缺血再灌注损伤<sup>[8,16]</sup>,能减轻哮喘小鼠炎症和氧化应激<sup>[17]</sup>,缓解缺血再灌注引发的肝损伤并修复其肝功能<sup>[10]</sup>,因而推测丁香苷可能通过抗炎和抗氧化功能而防治肝硬化。本文以不同剂量丁香苷处理肝硬化大鼠,可升高其肝组织TAC水平,降低大鼠肝指数,ALT水平,AST水平,肝组织胶原纤维占比,肝组织HYP含量,肝组织与血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平,肝组织collagen I、collagen III蛋白表达水平,表明丁香苷可抑制炎症因子合成分泌,增强大鼠抗氧化活力,阻滞炎症和氧化应激发生进展,抑制大鼠肝组织纤维化,减缓其肝指数增高且改善肝功能损伤症状,最终发挥显著的肝保护作用,且剂量越高,作用越强。

Hedgehog-YAP是调控成纤维细胞活化增殖、纤维化、炎症及脂质过氧化的主要信号,在肝炎、肝纤维化、肝硬化等许多肝脏疾病中起到重要调节作用,可抑制Hedgehog-YAP信号激活,减轻CCl<sub>4</sub>诱导的肝损伤,促使肝再生<sup>[18]</sup>,能减轻疟疾感染及硫代乙酰胺诱导的肝脏炎症和纤维化<sup>[19-20]</sup>。本文以Hedgehog激活剂Purmorphamine处理肝硬化大鼠,该实验可升高炎症因子水平,增强大鼠炎症反应、氧化应激和肝纤维化反应,加重肝功能损伤,而丁香苷可降低Hedgehog蛋白表达水平及YAP1磷酸化水平,表明Hedgehog-YAP信号参与介导肝硬化发生过程,并与丁香苷对肝硬化大鼠肝纤维化的抑制作用有关;以Purmorphamine和丁香苷联合处理肝硬化大鼠,相比丁香苷单独处理,可升高肝指数,ALT水平,AST水平,肝组织胶原纤维占比,肝组织HYP含量,肝组织与血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、MDA水平,肝组织collagen I、collagen III、Hedgehog蛋白表达水平、p-YAP1/YAP1,降低肝组织TAC水平,表明Purmor-

phine可减弱丁香苷的抗炎和抗氧化功能,消除其对肝硬化大鼠肝纤维化的抑制作用,最终逆转丁香苷对肝功能的保护作用,揭示丁香苷是通过抑制Hedgehog信号激活减弱肝硬化大鼠肝纤维化的。

总之,本研究证实了丁香苷可通过下调Hedgehog蛋白表达而降低YAP1磷酸化水平,从而抑制炎症及氧化应激反应,减轻肝脏纤维化,改善肝功能,阻断Hedgehog-YAP1信号转导可能是其药理机制之一。本文提示了丁香苷可作为肝硬化的潜在治疗药物,并为其临床应用提供了理论依据,有利于肝硬化治疗技术的开发改进。

### 作者贡献

吴德建负责科研设计、组织实施及实验指导;杨秋负责具体实验操作;谢桂丹负责数据收集及分析整理;彭鑫负责文章撰写、修改及审阅。

### 参考文献 (References)

- [1] HUANG D Q, TERRAULT N A, TACKE F, et al. Global epidemiology of cirrhosis-aetiology, trends and predictions [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(6): 388-98.
- [2] 段文彪, 吴伟斌, 张贵锋, 等. 鳖甲煎丸对肝硬化模型大鼠糖脂代谢紊乱和肝纤维化的影响[J]. *解剖学研究(DUAN W B, WU W P, ZHANG G F, et al. Effect of Biejiajian Pill on glycolipid metabolism disorder and liver fibrosis in cirrhotic rats [J]. Anatomy Research)*, 2020, 42(4): 298-302,308.
- [3] PEISELER M, SCHWABE R, HAMPE J, et al. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease: novel insights into cellular communication circuits [J]. *J Hepatol*, 2022, 77(4): 1136-60.
- [4] LEE K C, WU P S, LIN H C. Pathogenesis and treatment of non-alcoholic steatohepatitis and its fibrosis [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2023, 29(1): 77-98.
- [5] ZHU C, TABAS I, SCHWABE R F, et al. Maladaptive regeneration: the reawakening of developmental pathways in NASH and fibrosis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(2): 131-42.
- [6] BRUSCHI F V, TARDELLI M, EINWALLNER E, et al. PNPLA3 I148M up-regulates Hedgehog and Yap signaling in human hepatic stellate cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8711-26.
- [7] DU K, HYUN J, PREMONT R T, et al. Hedgehog-YAP signaling pathway regulates glutaminolysis to control activation of hepatic stellate cells [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(5): 1465-79,e13.
- [8] 耿春叶, 曹裕旻, 王培, 等. 基于分子对接法预测红藤Sargentol及类似物紫丁香苷抗炎靶点的研究[J]. *中国野生植物资源(GENG C Y, CAO Y M, WANG P, et al. Target prediction of sargentol and its analogue syringin against inflammation by molecular docking [J]. Chinese Wild Plant Resources)*, 2022, 41(6): 18-22.
- [9] 陈莉萍, 张艳蕾, 马梦玲, 等. 紫丁香苷通过调控NF- $\kappa$ B/PPAR $\gamma$ 1



- 通路保护 C2C12 肌管细胞活力研究 [J]. 国际中医中药杂志 (CHEN L P, ZHANG Y L, MA M L, et al. Research on Syringin protecting C2C12 myotube viability through regulating NF- $\kappa$ B/PPAR $\gamma$ 1 pathway [J]. International Journal of Traditional Chinese Medicine), 2022, 44(5): 530-4.
- [10] 姜月红, 王燕颖. 紫丁香苷对大鼠肝缺血再灌注损伤保护作用的初步研究 [J]. 中国实验诊断学 (JIANG Y H, WANG Y Y. Preliminary research on the protective effects of syringin against hepatic ischemia reperfusion injury in rats [J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis), 2016, 20(3): 359-61.
- [11] 陈艳, 王桂洁, 余青. 当归注射液对肝硬化大鼠门静脉压力及 TGF $\beta$ 1/PI3K 通路的调节作用 [J]. 中西医结合肝病杂志 (CHEN Y, WANG G J, YU Q. Regulatory effect of Angelica injection on portal vein pressure and TGF- $\beta$ 1/PI3K pathway in cirrhotic rats [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases), 2022, 32(7): 617-21.
- [12] ZHANG B, DAI X H, YU X P, et al. Baihui (DU20)-penetrating-Qubin (GB7) acupuncture inhibits apoptosis in the perihemorrhagic penumbra [J]. Neural Regen Res, 2018, 13(9): 1602-18.
- [13] LIU Y, JI F, NGUYEN M H. Sarcopenia in cirrhosis: epidemiology, diagnosis, management and prognosis [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2023, 39(3): 131-9.
- [14] YANG X, LI Q, LIU W, et al. Mesenchymal stromal cells in hepatic fibrosis/cirrhosis: from pathogenesis to treatment [J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(6): 583-99.
- [15] XU J, LIU K, MA Z, et al. Exploration of inflammation, oxidative stress, adiponectin and intestinal flora in patients with hepatitis B, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. Minerva Gastroenterol, 2022, 68(3): 365-7.
- [16] 谭俊毅. 丁香苷通过 FOXO3a/NF- $\kappa$ B 途径对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用 [D]. 重庆: 重庆医科大学 (TAN J Y. syringin exerts neuroprotective effects in a rat model of cerebral ischemia through the foxo3a/Nf- $\kappa$ b pathway [D]. Chongqing: Chongqing Medical University), 2021.
- [17] DAI R, NIU M, WANG N, et al. Syringin alleviates ovalbumin-induced lung inflammation in BALB/c mice asthma model via NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Environ Toxicol, 2021, 36(3): 433-44.
- [18] JIN L, HUANG H, NI J, et al. Shh-Yap signaling controls hepatic ductular reactions in CCl4-induced liver injury [J]. Environ Toxicol, 2021, 36(2): 194-203.
- [19] KIM J, WANG S, LEE C, et al. Blood-stage plasmodium berghei ANKA infection promotes hepatic fibrosis by enhancing hedgehog signaling in mice [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(4): 1414-28.
- [20] ASLAM A, SHEIKH N, SHAHZAD M, et al. Quercetin ameliorates thioacetamide-induced hepatic fibrosis and oxidative stress by antagonizing the Hedgehog signaling pathway [J]. J Cell Biochem, 2022, 123(8): 1356-65.