Modern Practical Medicine, June 2024, Vol. 36, No. 6

·论　著·

清化瘀毒方对CCl_4肝纤维化模型大鼠PPARγ配体诱导信号介导途径的影响及与相关细胞因子的关系研究

张斌，魏冬梅，王培劼，卞尧尧，王邦才，何国浓，孙常波，毛飞寅

【摘要】目的　探讨清化瘀毒方对四氯化碳（CCl_4）肝纤维化模型大鼠PPARγ配体（PPARγ）诱导信号介导途径的影响及与相关细胞因子的关系。方法　将50只SD大鼠按照随机数字法分为空白组、模型组，清化瘀毒方高剂量干预组（高剂量组）、中剂量干预组（中剂量组）及低剂量干预组（低剂量组），每组各10只。模型组采用腹腔注射50%的CCl_4橄榄油溶液建模，空白组大鼠采用腹腔注射等量0.9%氯化钠注射液。造模成功后空白组、模型组分别以等量0.9%氯化钠注射液灌胃，清化瘀毒方（每1 ml含生药0.1 g）低剂量组、中剂量组及高剂量组分别以50、100及200 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌服，共计8周。比较5组肝组织病理学；免疫荧光法检测PPARγ、抗体Tolls样受体2（TLR2），免疫组化的方法检测血管内皮生长因子A（VEGF-A）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）和低氧诱导因子-1α（HIF-1α）治疗干预后的表达；ELISA法检测细胞间黏附分子-1（ICAM-1）、血管内皮细胞黏附分子-1（VCAM-1）的相关表达。结果　与空白组比较，各组TLR2、VEGF-A、bFGF、HIF-1α、ICAM-1和VCAM-1表达增强，清化瘀毒方低、中、高剂量干预组与模型组相比，明显减少。与空白组相比较，模型组PPARγ表达降低，清化瘀毒方治疗干预后，各组PPARγ表达增强。结论　清化瘀毒方可以调控PPARγ、VEGF-A及HIF-1α，通过调节血管生成细胞因子的产生、迁移、黏附和收缩激活PPARγ及配体诱导信号，从而改善模型大鼠的肝损伤，血管生成和血管重构，达到抗肝纤维化作用。

【关键词】肝纤维化；过氧化物酶体增殖物活化受体；Toll样受体；细胞间黏附分子；血管细胞间黏附分子
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.06.004
【中图分类号】R392.5　　【文献标志码】A　　【文章编号】1671-0800(2024)06-0714-05

The correlation between PPARγ ligand-induced signal mediated pathway and VEGF-A, bFGF and HIF-1α in CCl_4 hepatic fibrosis model rats by Qinghua Yudu formula

ZHANG Bin, WEI Dongmei, WANG Peijie, BIAN Yaoyao, WANG Bangcai, HE Guonong, SUN Changbo, MAO Feiyin (Ningbo Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningbo 315010, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective　Exploring the effect of Qinghua Yudu (QHYD) formula on the PPARγ ligand (PPARγ) induced signaling pathway in carbon tetrachloride induced liver fibrosis model rats and the relationship between related cytokines. **Methods**　Fifty Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into the blank (normal) control group, model group, QHYD formula low-dose group, QHYD formula middle-dose group, QHYD formula high-dose group model (10 rats in each group). After successful modeling, the normal group was gavaged with an equal amount of saline. The low, medium, and high dose groups of QHYD formula were treated with 50, 100, and 200 mg·kg^{-1}·d^{-1} by gavage for eight weeks, respectively. The liver histopathology was observed. Fluorescence expression of PPARγ and TLR2 was detected by immunofluorescence assay. The expressions of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), basic fibroblast growth factor (bFGF), and hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) were analyzed by immunohistochemical methods. Meanwhile, the expressions of cytokines intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1),

基金项目：宁波市科技计划项目（2019A610361）；浙江省中医药科技计划（2022ZQ070）；浙江中医药大学科研专项（2021FSYYZY06）；宁波市医学科技计划（2021Y22）

作者单位：315010 宁波，宁波市中医院（张斌、魏冬梅、王培劼、王邦才、何国浓、孙常波、毛飞寅）；南京中医药大学（卞尧尧）
通信作者：何国浓，Email：nbszyykjk@163.com

vascular endothelial cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) were detected by ELISA. **Results** Compared with the blank group, the expressions of toll-like receptor 2 (TLR2), VEGF-A, bFGF, HIF-1α, ICAM-1, and VCAM-1 in each group was significantly increased. The PPARγ expression was reduced in the model group when compared to the blank group. After intervention with the QHYD formula, the PPARγ expression was enhanced. **Conclusions** QHYD formula can regulate PPARγ, VEGF-A and HIF-1α, and activate PPARγ and ligand-induced signal by regulating the production, migration, adhesion and contraction of angiogenic cytokines, so as to improve the liver injury of model rats, angiogenesis and vascular remodeling to achieve the role of anti-liver fibrosis.

【Key words】 Hepatic fibrosis; PPARγ; toll-like receptor; intercellular adhesion molecule-1; vascular endothelial cell adhesion molecule-1

[Modern Practical Medicine,2024,36(6):714-718]

肝纤维化是肝脏结缔组织各种致病因子所致的异常增生病理过程，各种原因导致的肝脏细胞损伤最终都与人体免疫因素有关，而肝脏本身又是人体最重要的免疫器官[1]。Tolls样受体（toll-like receptor，TLRs）是连接人体固有免疫和适应性免疫的重要信号通路途径，对其下游的相关炎症因子起着重要的作用[2]。肝脏损伤的慢性感染被认为会刺激长时间的全身炎症反应，导致血管内皮损伤，并最终导致血管内血流动力学的改变[3]。过氧化物酶体增殖物激活受体（peroxisome proliferators-activated receptors，PPARs）包括PPARα、PPARβ/δ和PPARγ 3种亚型[4]。PPARγ参与机体脂肪生成、葡萄糖代谢、血管生成[如血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）、碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）、细胞间黏附分子-1（intercellular adhesion molecule-1，ICAM-1）及血管内皮细胞黏附分子-1（vascular endothelial cell adhesion molecule-1，VCAM-1）]和炎症[如TLRs、核因子κB（NF-κB）及其下游炎症因子]发生等多种细胞及组织的病理生理转录调控过程。低氧诱导因子-1α（hypoxia inducible factor-1α，HIF-1α）是参与纤维化细胞缺氧适应的最重要的核转录因子[5]，能增加血管内皮生长因子A（VEGF-A）及bFGF等的转录稳定性，进而参与肝纤维化细胞的增殖、浸润及病变过程。

中医药治疗肝纤维化具有独特的优势，能够有效的改善和逆转疾病的进程。清化瘀毒方是浙江省名中医王邦才等[6]治疗肝纤维化的经验方，笔者前期研究证实了清化瘀毒方治疗肝纤维化的有效性，其可以调节肝纤维化相关因子，并影响肝功能相关蛋白[7-8]。本研究拟探讨清化瘀毒方对四氯化碳（CCl_4）肝纤维化模型大鼠PPARγ配体诱导信号介导途径的影响及与细胞因子的关系研究，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 动物及药物 SD大鼠50只，年龄7周，体质量（170±20）g，购自南京中医药大学实验动物中心，许可证号：SCXK（浙）2012-0033。桃仁10 g、大黄10 g、地鳖虫10 g、炙鳖甲20 g、赤小豆30 g、莪术15 g、生地20 g，均购于江苏省中医院。以上各味中药加6倍的水浸泡1.5 h，后煎煮过滤浓缩后灭菌放置冰箱。

1.2 主要试剂与仪器 苏木素（贝索试剂，BA-4097），伊红（贝索试剂，BA-4099），OCT（包埋剂SAKURA4583），EDTA（pH8.0）抗原修复液（ServicebioG1206），EDTA（pH9.0）抗原修复液（ServicebioG1203），柠檬酸（pH6.0）抗原修复液（ServicebioG1202），PPARγ（Santa Cruz，sc-7273），VEGF-A（博奥森，bs-1957R），bFGF（博奥森，bs-2235R），HIF-1α（Santa Cruz，sc-71247），大鼠ICAM-1（金益柏生物，JEB-13738），大鼠VCAM-1（金益柏生物，JEB-13665），抗体Tolls样受体2（TLR2，Abcam，ab108998），抗β-Actin（康为世纪，CW0097），包埋机（Leica EG1150H，德国），酶标仪（BioTek，美国），全自动真空组织脱水机（Leica ASP200S，德国），显微镜（Nikon Ti，日本）。

1.3 动物模型建立 参照文献方法[9]将各组大鼠适应喂养7 d后给药。根据成人剂量体表面积公式[10]换算，模型组采用腹腔注射50%的CCl_4橄榄油溶液建模，0.15 ml/100 g，2次/周，共8周。空白组大鼠采用腹腔注射等量0.9%氯化钠注射液0.15 ml/100 g，2次/周，共8周。

1.4 分组及给药 将50只大鼠按照随机数字法分为空白组、模型组，清化瘀毒方高剂量干预组（高剂量

组)、中剂量干预组(中剂量组)及低剂量干预组(低剂量组),每组各 10 只。造模成功后空白组、模型组分别以等量 0.9%氯化钠注射液灌胃,清化瘀毒方(每 1 ml 含生药 0.1 g) 低剂量组、中剂量组及高剂量组分别以 50、100 及 200 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌服,共计 8 周。

1.5 检测指标及方法 实验结束后抽取大鼠腹主动脉血,采用酶联免疫法(ELISA)检测细胞因子;取血后处死并取肝脏进行制备,并用液氮储存。

1.6 免疫荧光法检测 按顺序将组织切片,脱蜡后用乙醇进行复水;用柠檬酸盐缓冲液微波抗原修复;山羊血清 [山羊抗兔 IgG (H+L) FITC (1∶50)] 封闭;Ⅰ抗:TLR2 抗体(1∶500)孵育及避光条件下经行Ⅱ抗:山羊抗兔 IgG(H+L)Cy3(1∶200)孵育后荧光染色;最后用荧光显微镜下观察。

1.7 免疫组化 按照常规切片烤片后(组织厚度为 4 μm),根据试剂说明书进行组织免疫组化,显色后用光学显微镜下观察并拍片。

1.8 统计方法 数据采用 SPSS 19.0 软件分析,计量资料采用均数±标准差表示,采用 F 检验或 Sidak 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 正常组大鼠皮毛光泽,颜色均匀,精神可,行动自如,食量稳定,排便成型,尾巴有光泽度,色淡红。造模组大鼠皮毛疏松,光泽度明显较差,活动量减少,精神不振,大便时有松散,随着造模时间的延长,开始出现嗜睡状况,且时间逐渐延长,从开始增加 1 h 到最后的 7 ～ 8 h。CCl_4 橄榄油溶液诱导造模后,各组大鼠体质量随时间逐渐增加,呈现时间依赖。

2.2 肝脏组织结构 HE 染色显示,空白组肝脏组织结构清晰,细胞排列整齐,未见异常。模型组肝小叶结构受损明显,细胞间排列紊乱,伴有炎性细胞浸润,细胞发生变性,纤维间隔增粗,部分假小叶的形成,见图 1。

Masson 染色显示(蓝色为胶原纤维),空白组大鼠肝组织中可见少量的胶原纤维。模型组肝组织明显可见大量蓝色增生胶原导致的纤维沉积。与模型组相比,各干预给药组肝组织中胶原纤维形成增生主要见于中央静脉,但纤维化程度较轻,见图 2。

2.3 肝纤维化组织中 PPARγ 表达 空白组的 PPARγ荧光强度未见明显变化。模型组 PPARγ红色目标荧光强度最弱(PPARγ-b),PPARγ造模后表达减弱。DAPI 标注的蓝色细胞核标记细胞位置,PPARγ模型组较其他组红色荧光暗淡 (Merge-b) 表达明显较低。予清化瘀毒方治疗干预后,各组 PPARγ荧光表达增强(PPARγ-c/d/e),见图 3。

2.4 肝纤维化组织中 TLR2 表达的影响 TLR2 模型组荧光强度增强,TLR2 造模后表达增强。予清化瘀毒方后,各组 TLR2 荧光表达减弱,见图 4。

2.5 肝纤维化组织中 VEGF-A、bFGF 及 HIF-1α蛋白表达 空白组 VEGF-A、bFGF 及 HIF-1α未见阳性细胞出现,模型组 VEGF-A、bFGF 及 HIF-1α弥漫表达,细胞明显可见染色阳性。中剂量组 bFGF,低剂量组 VEGF-A、bFGF 及 HIF-1α染色细胞均呈弱阳性表达,见图 5。

2.6 血清中 ICAM-1 及 VCAM-1 的表达 模型组 ICAM-1 表达均高于空白组、低剂量组、中剂量组及高剂量组($t \geq 3.00$,均 $P < 0.05$),中剂量组 ICAM-1 表达高于高剂量组 ($t=2.76$, $P < 0.05$)。模型组 VCAM-1 表达均高于空白组、低剂量组、中剂量组及高剂量组($t \geq 12.80$,均 $P < 0.05$),见表 1。

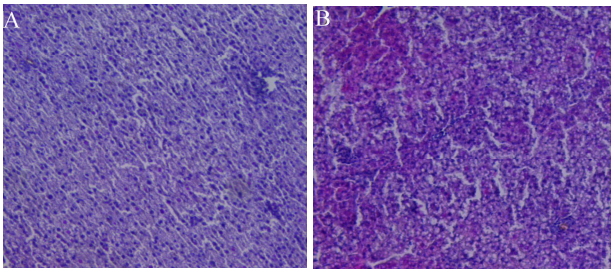
3 讨论

本课题前期研究结果显示,清化瘀毒方可抑制肝纤维化模型大鼠固有免疫通路的下游炎症细胞因子[7,8]。TLR4-MyD88-NF-κB 信号通路,参与固有免疫的受体诱导下游炎性反应产生 IL-1、IL-6 及 TNF-α,是肝纤维

表 1 5 组血清 ICAM-1 和 VCAM-1 表达情况比较 pg/ml

组别	ICAM-1 表达	VCAM-1 表达
空白组	29.94±5.22	51.35±7.65
模型组	111.23±19.57	136.56±12.16
高剂量组	45.69±13.09	60.70±8.89
中剂量组	65.53±5.64	104.08±25.67
低剂量组	94.46±14.42	124.41±37.07
F 值	37.41	36.48
P 值	< 0.05	< 0.05

注:ICAM-1 为细胞间黏附分子-1,VCAM-1 为血管内皮细胞黏附分子-1

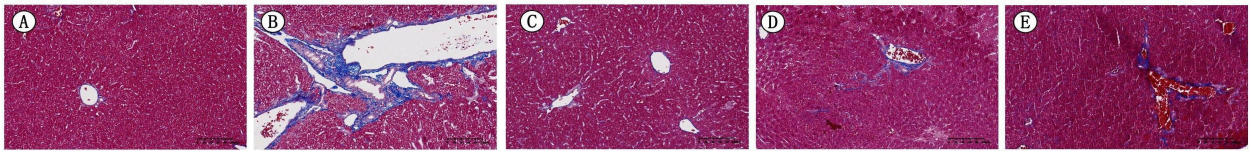


注:A 为空白组,B 为模型组

图 1 肝纤维化模型大鼠肝脏(HE 染色,×200)

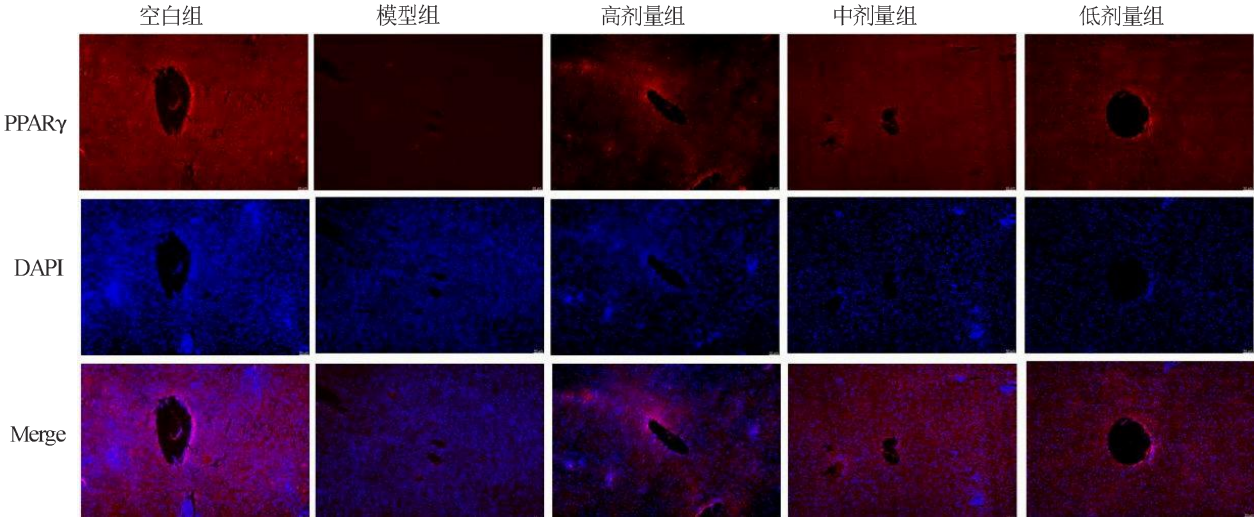
化的重要通路之一[11-12]。与 TLR4 相似，TLR2 经过对病原体相关分子的识别开启信号转导，导致下游炎症因子的释放可识别细胞应激过程中释放的内源性配体[13]。TLR2 活化与机体的超敏反应和感染免疫密切相关，引导细胞分化并抗病原体作用[14-15]。

本研究结果显示，清化瘀毒方可抑制肝纤维化模型大鼠的促血管生成细胞因子。肝纤维化模型大鼠对血管血流动力学的不利影响，中药复方清化瘀



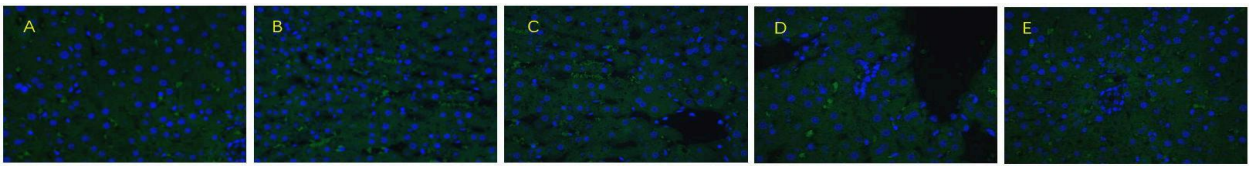
注：A 为空白组，B 为模型组，C 为高剂量组，D 为中剂量组，E 为低剂量组

图 2　肝纤维化模型大鼠肝脏（Masson 染色，×200）



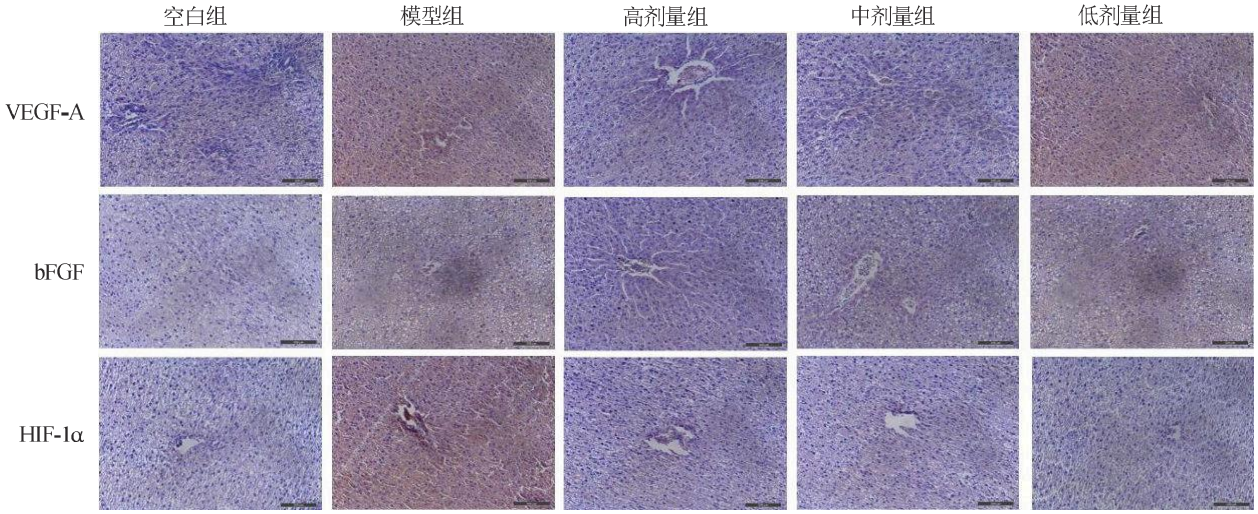
注：PPARγ为过氧化物酶体增殖物激活受体γ

图 3　清化瘀毒方对模型动物 PPARγ表达的影响（免疫荧光，×100）



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为高剂量组，D 为中剂量组，E 为低剂量组

图 4　清化瘀毒方对模型动物 TLR2 表达的影响（免疫荧光，×400）



注：以细胞核/胞浆内出现棕黄或褐色颗粒为染色阳性，染色深浅表示阳性程度。VEGF 为血管内皮生长因子，bFGF 为碱性成纤维细胞生长因子，HIF-1α为低氧诱导因子-1α

图 5　各组大鼠 VEGF-A、bFGF 和 HIF-1α表达（HE 染色，×200）

毒方干预治疗后降低了肝脏细胞中 VEGF-A 和 bFGF 的表达。VEGF-A 是 HIF1a 的直接下游靶基因，在血管生成中起着关键作用[16]，促进血管内皮细胞的增殖并有效抑制血管内皮细胞的凋亡，从而刺激血管的形成[17]。干预治疗显著减弱了这些对 bFGF 的诱导。

PPARγ在肝脏中可以有效调节脂质沉积和细胞代谢[18]，影响 NF-κB 的失活参与下游炎症反应过程[19]。在激活的巨噬细胞中，PPARγ表达上调减少单核细胞分泌 IL-6、MCP-1 及 TNF-α等细胞因子。本研究发现在纤维化大鼠肝脏中 PPARγ表达明显下降，而干预治疗后 PPARγ表达明显升高，提示清化瘀毒方可能是通过影响 PPARγ的表达进而改善肝纤维化。HIF-1α和 PPARγ表达变化受到多种相关因子（如 bFGF）影响。此外，有报道显示，PPARγ激动剂可以有效改善血管反应性异常，并修复舒张血管受损[20]。本研究结果显示，清化瘀毒方上调大鼠纤维化肝脏中 PPARγ的表达，降低 VEGF-A、bFGF 和 HIF-1α的表达。与模型组相比，纤维化模型大鼠的促血管生成细胞因子的产生显著增加，迁移、黏附和收缩能力增强，促进了体内肝纤维化和血管重塑。本研究结果显示，清化瘀毒方抑制星状细胞的迁移和黏附下调了 ICAM-1 和 VCAM-1 在肝脏中的表达，这是调节细胞黏附的两个重要分子。

综上所述，清化瘀毒方可能通过降低 TLR2 的表达，进而降低引起肝纤维化的炎症反应，从而参与了早期免疫应答的效应，达到了改善肝脏组织的损伤，调节血管生成细胞因子的产生、迁移、黏附和收缩激活 PPARγ，修复肝损伤，促进血管生成和血管重构，从而达到抗肝纤维化目的。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 张斌、卞尧尧：实验操作、论文撰写；孙常波、王培劼、毛飞寅：数据整理、统计学分析；王邦才、何国浓、魏冬梅：研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

[1] 严伟明,宁琴.肝脏免疫学研究进展:第 59 届美国肝脏疾病研究学会年会报道[J].中华肝脏病杂志,2009,17(3):235-237.

[2] ISSEMANN I, GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. Nature, 1990, 347(6294): 645-650.

[3] KHAN R S, LALOR P F, THURSZ M, et al. The role of neutrophils in alcohol-related hepatitis[J]. J Hepatol, 2023, 79(4): 1037-1048.

[4] CHO H Y, GLADWELL W, WANG X T, et al. Nrf2-regulated PPAR{gamma}expression is critical to protection against acute lung injury in mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(2): 170-182.

[5] 王晨,王紫娟,张晓梅,等.肺纤方提取物对肺间质纤维化大鼠肺微血管 VEGF、VEGFR2、PAI-1、VCAM-1 mRNA 表达的影响[J].北京中医药大学学报,2017,40(2):143-147.

[6] 王邦才,朱奇雄,王杰,等.清化瘀毒方治疗湿热瘀毒型酒精性肝硬化临床研究[J].中华中医药杂志,2012,27(10):2746-2748.

[7] 王邦才,张宇,何国浓.清化瘀毒方对酒精性大鼠肝纤维化转化生长因子-β1 表达的影响[J].中华中医药学刊,2011,29(9):2009-2011.

[8] 王邦才,张宇,何国浓,等.清化瘀毒方对酒精性大鼠肝纤维化血清 HA、LN、PCⅢ含量及 TIMP-1 的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(6):1404-1406.

[9] 张海燕,温韬,卢静,等.四氯化碳诱导大鼠慢性肝损伤模型方法的探讨[J].实用肝脏病杂志,2009,12(3):161-163,224.

[10] 徐叔云.药理实验方法学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2002:203-206.

[11] 张斌,孙松娴,陈轶尘,等.中药芷辛方对骨癌痛大鼠胶质细胞蛋白表达以及 TLRs 和 NF-κB 的影响[J].中国中西医结合杂志,2015,35(6):704-711.

[12] LI X, JIN Q W, YAO Q Y, et al. Quercetin attenuates the activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in mice through modulation of HMGB1-TLR2/4-NF-κB signaling pathways[J]. Toxicol Lett, 2016, 261: 1-12.

[13] LU J C, YUE Y, XIONG S D. Extracellular HMGB1 augments macrophage inflammation by facilitating the endosomal accumulation of ALD-DNA via TLR2/4-mediated endocytosis[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2021, 1867(10): 166184.

[14] 陈曦, 刘佳佳. Toll 样受体调节中性粒细胞免疫作用的研究进展[J].国际免疫学杂志,2009,32(1):24-27.

[15] 孙响波,李永伟,孙红,等.黑地黄丸对肾纤维化模型大鼠肾组织炎症因子及 TLR2/NF-κB/Myd88 通路的影响[J].中医杂志,2019,60(18):1593-1597.

[16] SEMENZA G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 721-732.

[17] XU L F, NI J Y, SUN H L, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1α silencing on the proliferation of CBRH-7919 hepatoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(11): 1749-1759.

[18] GAVRILOVA O, HALUZIK M, MATSUSUE K, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass[J]. J Biol Chem, 2003, 278(36): 34268-34276.

[19] KORBECKI J, BOBI SKI R, DUTKA M. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors[J]. Inflamm Res, 2019, 68(6): 443-458.

[20] MATSUMOTO T, KOBAYASHI T, KAMATA K. Relationships among ET-1, PPAR GAMMA, oxidative stress and endothelial dysfunction in diabetic animals[J]. J Smooth Muscle Res, 2008, 44(2): 41-55.

收稿日期：2024-03-28

（本文编辑：钟美春）