阿魏酸调控肝窦内皮细胞功能抑制血管新生减轻肝纤维化

时瑞敏[1,2], 黄 恺[1,2], 沈 丽[1,2], 薛静波[1,2], 陶艳艳[1,2], 刘成海[1,2*], 赵志敏[1,2*]

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 肝病研究所, 上海 201203; 2. 肝肾疾病病证教育部重点实验室, 上海 201203)

摘要: 既往研究发现阿魏酸有抗肝纤维化、抑制星状细胞活化的药理作用。肝窦内皮细胞损伤、增殖、毛细血管化是肝纤维化时血管新生的重要形式, 又是肝纤维化难以逆转的重要病理基础。本研究观察阿魏酸调控肝窦内皮细胞功能抑制血管新生的作用, 探究其抗肝纤维化机制。体外实验以氯化钴诱导SK-HEP-1细胞缺氧损伤, 内皮细胞生长因子 (endothelial cell growth supplement, ECGs) 诱导人肝窦内皮细胞 (human hepatic sinusoidal endothelial cells, HHSEC) 增殖, 阿魏酸干预细胞模型后, MTT法观察细胞活力, 荧光探针法检测内皮细胞一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 水平, 并通过HHSEC管腔形成实验和转基因斑马鱼 (VEGFR: GFP) 血管新生模型进行验证。动物实验遵循上海中医药大学动物伦理委员会规定 (批准号: PZSHUTCM2503280008)。以四氯化碳 (CCl_4) 腹腔注射6周诱导小鼠肝纤维化, 从第4周开始, 各药物干预组分别给予索拉非尼 (10 mg·kg^{-1})、阿魏酸50和100 mg·kg^{-1}灌胃, 持续3周。通过血清生化检测, 肝组织苏木精−伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, H&E)、天狼星红染色、羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 检测及免疫组化法检测α-平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin, α-SMA) 评价肝组织炎症及纤维化程度, 扫描电镜观察肝窦内皮细胞结构变化, 免疫组化法检测血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31) 和淋巴管内皮透明质酸受体1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1, LYVE1) 表达。结果显示, 阿魏酸对氯化钴缺氧模型SK-HEP-1细胞具有保护作用, 显著提高细胞NO和NOS水平; 对HHSEC增殖模型及其管腔形成具有显著抑制作用; 可抑制斑马鱼功能血管数量; 并显著降低纤维化小鼠血清谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 水平和肝组织HYP含量, 提高白蛋白 (albumin, ALB) 水平; 改善小鼠肝组织炎症浸润和肝纤维化程度, 减少α-SMA表达; 肝窦窗孔数量增加, CD31表达降低, LYVE1升高。上述结果表明, 阿魏酸可以调控肝窦内皮细胞功能, 抑制血管生成, 具有抗肝纤维化和抑制肝窦毛细血管化的作用。

关键词: 阿魏酸; 肝纤维化; 肝窦内皮细胞; 肝窦毛细血管化; 血管新生

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)10-3102-09

Ferulic acid regulates the function of liver sinusoidal endothelial cell to inhibit angiogenesis and alleviate hepatic fibrosis

SHI Rui-min[1,2], HUANG Kai[1,2], SHEN Li[1,2], XUE Jing-bo[1,2], TAO Yan-yan[1,2], LIU Cheng-hai[1,2*], ZHAO Zhi-min[1,2*]

(*1. Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases (Ministry of Education), Shanghai 201203, China*)

Abstract: Previous investigations have established that ferulic acid demonstrates anti-fibrosis effects and could inhibit the activation of hepatic stellate cell. Injury, proliferation and capillarization of hepatic sinusoidal

收稿日期: 2025-05-06; 修回日期: 2025-06-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82374122, 81473404); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目 (中医肝胆病学) (zyyzdxk-2023060); 上海市中医临床重点实验室 (20DZ2272200).

*通讯作者 E-mail: zhiminzhao@shutcm.edu.cn; chenghailiu@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0510

endothelial cell are important forms of angiogenesis during liver fibrosis, and is important for liver fibrosis regression. This study investigates the effects of ferulic acid on sinusoidal capillarization and explores its anti-fibrotic mechanism. *In vitro*, SK-HEP-1 cells were injured by cobalt chloride, while human hepatic sinusoidal endothelial cells (HHSECs) were induced by endothelial cell growth supplement (ECGs). Cell viability was detected using thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT); nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) were visualized through the fluorescence probe method; antiangiogenesis effects were assessed using the tube formation assay and transgenic zebrafish (VEGFR:GFP). Animal experiments complied with the regulations of the Animal Ethics Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (approval No. PZSHUTCM2503280008). Mice were received intraperitoneal injection of carbon tetrachloride (CCl_4) for 6 weeks to induce hepatic fibrosis and then treated with 10 mg·kg^{-1} of sorafenib, 50 and 100 mg·kg^{-1} of ferulic acid for 3 weeks from the fourth week. Liver inflammation and fibrosis were assessed through serum liver function [alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB)] tests, H&E and Sirius red staining, hydroxyproline (HYP) quantification, and the immumohistochemical staining of α-smooth muscle actin (α-SMA). Sinusoidal fenestrations were observed *via* scanning electron microscopy (SEM), and the phenotype of liver sinusoidal endothelial cells were labeled by platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE1). Results showed that ferulic acid protected SK-HEP-1 cells from $CoCl_2$-induced hypoxic injury, significantly increased NO and NOS levels. It suppressed the proliferation and tube formation of HHSEC, and inhibited angiogenesis of VEGFR:GFP zebrafish model. *In vivo* experiments, ferulic acid reduced serum AST/ALT and HYP levels and increased ALB. Histopathological analyses confirmed that it reduced inflammation and fibrosis, downregulated α-SMA expression, ameliorated sinusoid capillarization and downregulated the expression of CD31 and LYVE1. These findings indicate that ferulic acid can inhibit liver fibrosis through alleviating sinusoidal capillarization.

Key words: ferulic acid; hepatic fibrosis; liver sinusoidal endothelial cell; sinusoidal capillarization; angiogenesis

肝纤维化是指肝组织内细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度增生与异常沉积, 导致肝脏结构和(或) 功能异常的病理变化, 以肝窦毛细血管化与肝小叶内及汇管区纤维化为特征。主要由慢性肝损伤 (如肝炎病毒、酒精、药物、自身免疫性肝病等) 引起, 使肝星状细胞活化, 导致ECM合成与降解失衡[1], 最终可进展为肝硬化和肝功能衰竭。尽管肝纤维化机制已研究40余年, 但抗纤维化药物缺乏, 逆转纤维化的具体分子机制也尚未完全阐明[2]。因此, 寻找有效的抗肝纤维化疗法是当前研究的重点, 以期有效阻止这一病理进程的进一步发展。

肝窦内皮细胞 (liver sinusoidal endothelial cells, LSECs) 是肝脏特有的内皮细胞类型, 在维持肝脏稳态、血管生成和物质交换中起关键作用[3]。生理状态下, LSECs通过窗孔结构维持肝窦通透性, 抑制肝星状细胞活化[4,5]; 而慢性肝损伤诱发的LSECs毛细血管化(窗孔消失、基底膜沉积) 不仅解除对肝星状细胞的抑制, 还通过缺氧微环境触发异常血管新生[6-9], 新生血管加剧门静脉高压与炎症浸润, 形成“血管新生–肝星状细胞活化-ECM沉积”恶性循环, 推动纤维化进程, 最终导致肝功能严重受损[10,11]。因此, 保护LSECs的正常功能或逆转其去分化状态, 在抗肝纤维化治疗中具有重要意义。

阿魏酸是一种天然酚酸类化合物, 其结构如图1A所示, 是当归、川芎等中药的重要活性成分, 其抗氧化、抗炎及抗纤维化等多重药理活性已被证实[12]。既往研究发现阿魏酸可通过下调转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 表达、抑制肝星状细胞活化等途径减轻肝纤维化[13,14]。但肝纤维化进程中另一个关键病理环节——LSECs的毛细血管化及伴随的异常血管新生[15,16], 是否受阿魏酸调控仍未明确。基于此, 本研究将重点从肝星状细胞扩展至LSECs, 提出阿魏酸可能通过调控LSECs功能, 改善肝窦毛细血管化, 抑制肝内血管新生, 从而阻断“血管新生–肝星状细胞活化-ECM沉积”, 实现抗肝纤维化效应。通过体外培养的肝窦内皮细胞模型和CCl_4诱导的小鼠肝纤维化模型, 系统评估阿魏酸对肝纤维化的影响, 进一步探讨其对LSEC功能的调控作用及其在抑制血管新生、减轻肝纤维化中的潜在机制。

材料与方法

药物 阿魏酸 ($C_{10}H_{10}O_4$), 相对分子质量194.18; 索拉非尼 ($C_{48}H_{24}ClF_3N_4O_6S$), 相对分子质量637.03, 是一种多激酶抑制剂, 具有抑制血管新生的作用, 均购自MCE公司。

实验试剂 MEM干粉 (Cat#41500-067) 购自GIBCO™公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Cat#10099) 购自GIBCO™公司; ECM内皮细胞培养液购自美国ScienCell公司; HEPES (free acid, Cat#DH160-3) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; $NaHCO_3$、乙二胺四乙酸 (EDTA)、NaCl、KCl、$Na_2HPO_4·12H_2O$、KH_2PO_4、$NaHCO_3$、甲醇、丙酮 (均为分析纯)、*L*-谷氨酰胺 (Cat#62010834)、CCl_4 (Cat#10006480) 购自国药集团化学试剂有限公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, Cat#0231) 购自Amresco公司; 六水合氯化钴 ($CoCl_2·6H_2O$, Cat#080M0101V)、噻唑蓝 (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT, Cat#M2128) 购自Sigma公司; Matrigel购自德国Roche公司; DAF-FM DA (NO荧光探针, Cat#S0019)、一氧化氮合成酶检测试剂盒 (Cat#S0025) 购自碧云天生物技术研究所; 橄榄油 (Cat# A502795) 购自生工生物工程股份有限公司; 谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活力测试试剂盒 (Cat#C009-2-1)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活力测试试剂盒 (Cat# C010-2-1)、白蛋白 (albumin, ALB) 活力测试试剂盒 (Cat# A028-1-1)、羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 含量测试试剂盒 (Cat# A030-2-1)、苏木精−伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, H&E) 试剂盒 (Cat#10004160) 购自南京建成生物工程研究所; 天狼星红 (Cat#365548) 购自默克公司; *α*-平滑肌肌动蛋白 (*α*-smooth muscle actin, *α*-SMA) 抗体 (Cat#ab124964)、淋巴管内皮透明质酸受体1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1, LYVE1) 抗体 (Cat#ab218535) 购自Abcam公司; 血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31) 抗体 (Cat#77699T) 购自CST公司; 兔IgG二抗试剂盒 (Cat#SA1028) 购自博士德生物。

主要仪器设备 Gilson移液器购自法国吉尔森公司; BT223S电子分析天平、BT25S电子分析天平购自德国赛多利斯集团; Direct-Q3超纯水系统购自美国密理博公司; HVE-50高温高压灭菌消毒锅购自日本HIRAYAMA公司; TELSTAR Bio-II-A/M生物安全柜购自西班牙泰事达公司; Olympus IX70倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司; Thermo Scientific Steri-Cycle CO_2培养箱、Thermo Scientific Varioskan Flash全波长扫描多功能读数仪、ArrayScan® VTI高内涵筛选分析仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司。离心机 (5427R) 购自艾本德公司; Bio-Tek Power Wave XS酶标仪购自美国Bio-Tek公司; 病理脱水机 (SPP300)、包埋机 (EG1140)、切片机 (CM1850)、展片水浴锅 (HI1210) 购自德国LEICA公司; 病理扫片机 (SCN400) 购自莱卡公司。

细胞及模型制备

SK-HEP-1细胞缺氧损伤模型 SK-HEP-1细胞购自ATCC, 为人内皮来源的腹水瘤细胞, 具备肝窦内皮的某些特性[17], 常规培养于含10%胎牛血清的MEM培养液。以每孔8 000个细胞接种于96孔板, 待细胞密度为70%左右, 加入含$CoCl_2·6H_2O$的培养液 ($CoCl_2·6H_2O$终浓度800 μmol·L^{-1}), 每孔100 μL, 设空白对照组 (0.5% FBS), 孵育24 h诱导细胞缺氧损伤。药物在160 μmol·L^{-1}内设6个浓度梯度确定对未添加模型诱导因素的内皮细胞株的最大无毒范围 (与不加药组比存活率 > 90%), 根据最大无毒浓度再分设3个浓度梯度分别作用于细胞模型。各药物与细胞共孵育24 h, 同时添加800 μmol·L^{-1} $CoCl_2·6H_2O$。MTT法检测细胞活力; 荧光探针法观察内皮细胞NO、NOS水平。

HHSEC细胞增殖模型 HHSEC人肝窦内皮细胞购自美国ScienCell公司。常规培养于含内皮细胞生长因子的5%胎牛血清培养液, 2～3天传一代。细胞接种于96孔板, 24 h后换无血清培养液继续孵育, 24 h后换2% ECGs但不含FBS的条件培养液 (每孔100 μL), 培养48 h诱导HHSEC增殖, 药物在最大无毒浓度内分设3个浓度梯度。

管腔形成实验 HHSEC细胞分为HHSEC对照组、HHSEC + Matrigel组 (模型组)、HHSEC + Matrigel + 索拉非尼组 (阳性对照药组)、HHSEC + Matrigel + 药物干预各组。96孔板4 ℃预冷, 每孔加Matrigel 50 μL, 37 ℃细胞培养箱聚合1 h备用。细胞同步化后, 胰酶消化, 以无血清培养液调整细胞浓度至每毫升1×10^{5}个, 与药物培养液 (2×) 按1∶1混合后, 取100 μL铺在Matrigel上, 每组设3个复孔, 37 ℃细胞培养箱孵育24 h, Olympus倒置显微镜下观察拍摄。

斑马鱼血管新生模型 挑选发育24 h胚胎, 移入96孔板的样孔中, 每孔一枚。样孔中已预先加入新配好的受试样品溶液, 对照为胚胎培养用水加相应量的助溶剂。在受精卵发育到48 h时, 于倒置显微镜下观察96孔板样孔中的胚胎, 记录节间血管的血流数。荧光显微镜下对体节间血管 (intersegmental vessel, ISV) 进行计数并拍照, 观察结束后, 4%多聚甲醛固定, 碱性磷酸酶染色, 显微镜下拍照。

实验动物及肝纤维化模型制备 C57BL/6小鼠, 雄性, SPF级, 8周龄, 体质量 (21 ± 1) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 实验动物许可证号SCXK (沪) 2022-0004。饲养于上海中医药大学实验动物中心, 使用许可证号SYXK (沪) 2020-0009, 饲养条件为: 温度20～25 ℃, 相对湿度45%～55%, 12 h交替照明, 饲料、

饮水新鲜无污染, 小鼠自由摄食、饮水。动物实验方案遵循上海中医药大学动物伦理委员会规定且通过批准 (批准号: PZSHUTCM2503280008), 所有操作均按照委员会指导进行。

小鼠适应性喂养1周, 除正常组 (12只) 外, 其余均腹腔注射15% CCl_4-橄榄油溶液, 剂量为2 mL·kg^{-1}, 每周3次, 持续6周。第4周开始时, 将CCl_4小鼠随机分为4组: 模型组 (model)、索拉非尼阳性对照组 (sorafenib, 10 mg·kg^{-1})、阿魏酸 (ferulic acid) 低剂量组 (50 mg·kg^{-1}) 和高剂量组 (100 mg·kg^{-1}), 每组12只。各药物干预组给予相应药物灌胃, 体积为0.1 mL·10 g^{-1}, 每天一次, 持续至6周末。正常组及模型组给予相同溶剂。每组3只小鼠用于肝组织扫描电镜检测, 9只采用3%戊巴比妥钠溶液麻醉, 分离肝脏, 经固定、脱水、包埋后避光储存于4 ℃冰箱, 冰冻组织置−80 ℃冻存备用。

细胞实验方法

MTT法　细胞接种于96孔板, 药物干预后弃原培养液, 加入0.5 mg·mL^{-1} MTT工作液, 孵育4 h。可见蓝紫色结晶, 小心吸弃工作液, 加入DMSO 100 μL, 至充分溶解, 在微孔板扫描分光光度计上测定吸光度 (A_{490}) 值。

荧光探针法　细胞接种于96孔板, 药物干预后弃原培养液, 原位装载NO或NOS探针, 每孔100 μL。37 ℃细胞培养箱内孵育20～40 min。PBS洗3次。Thermo Scientific Varioskan Flash光谱扫描多功能读数仪上检测, 激发波长为495 nm, 发射波长为515 nm。

动物实验方法

肝组织病理染色　肝组织石蜡切片经二甲苯脱蜡、乙醇脱水后, 分别使用H&E染色试剂和天狼星红−苦味酸染色试剂进行病理染色, 中性树胶封片, 使用Leica扫描仪扫描。H&E染色观察肝组织炎症活动情况, 天狼星红染色观察肝组织胶原沉积情况, 对纤维化程度进行评分。

HYP含量检测　称取肝脏湿重约50 mg, 碱水解法进行肝组织HYP含量检测, 结果以"μg·g^{-1}肝组织"表示。

扫描电镜　小鼠以3%戊巴比妥钠麻醉, 打开腹腔暴露肝脏。从肝门静脉进针, 以恒流泵灌注生理盐水, 待肝脏内血液充分清洗后, 改用2.5%戊二醛固定液继续灌流15 min。取下肝脏切取薄片, 在固定液中4 ℃保存。经过3 h以上的固定、PBS清洗、1%锇酸后固定, 系列乙醇脱水、临界点干燥、喷金处理后, 用Quanta 250 FEG场发射扫描电镜观察肝窦内皮窗孔形态并拍照。

免疫组化　将肝组织石蜡切片分级脱蜡复水, 酸修复液或碱修复液高压热修复以增强抗原可检测性, 3%过氧化氢去除内源性过氧化物酶活性, 5% BSA室温下封闭30 min, 滴加30 μL一抗 α-SMA (1∶1 000)、CD31 (1∶100)、LYVE1 (1∶5 000), 4 ℃摇床孵育过夜, TBST洗3次, 每次5 min, 滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG二抗, 室温孵育1 h。TBST洗3次, 每次5 min, 滴加DAB显色液, 在显微镜下控制显色, 苏木素复染细胞核, 冲洗返蓝, 0.4%盐酸乙醇分化, 中性树胶封片。数字病理扫描仪采集图片, 用Image J 1.8.0软件进行肝组织免疫组化阳性表达面积半定量分析。

统计学处理　计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据均使用SPSS 27.0软件包进行统计学分析, 组间比较使用单因素方差分析。$P < 0.05$表示差异具有统计学意义。

结果

1　阿魏酸对氯化钴诱导SK-HEP-1细胞缺氧损伤模型的影响

不同浓度阿魏酸 (图1A) 对SK-HEP-1细胞的毒性检测结果显示 (图1B), 与空白对照组比较, 5 μmol·L^{-1}为细胞最大无毒浓度, 因此设置1.25、2.5和5 μmol·L^{-1} 3个浓度观察其对氯化钴诱导SK-HEP-1细胞缺氧损伤模型的影响。MTT结果显示 (图1C), 与对照组比较, 模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$), 阿魏酸对SK-HEP-1细胞损伤有明显保护作用 ($P < 0.05$)。NO检测结果显示 (图1D), 与正常组比较, 模型组NO表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿魏酸能够显著增加氯化钴损伤模型SK-HEP-1细胞NO的表达 ($P < 0.05$)。NOS检测结果显示 (图1E), 与对照组比较, 模型组NOS表达明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿魏酸能够显著增加氯化钴损伤模型SK-HEP-1细胞NOS的表达 ($P < 0.05$)。

2　阿魏酸对HHSEC细胞活力及管腔形成的影响

不同浓度阿魏酸对HHSEC细胞的毒性检测结果显示 (图2A), 与空白对照组比较, 25 μmol·L^{-1}为细胞最大无毒浓度, 因此设置6.25、12.5和25 μmol·L^{-1} 3个浓度观察其对HHSEC细胞增殖模型的影响。MTT结果显示 (图2B), 与对照组比较, 模型组细胞活力显著升高 ($P < 0.01$), 阿魏酸干预后细胞活力显著下降 ($P < 0.01$)。管腔形成实验显示 (图2C、D), 与空白对照组相比, Matrigel胶上的HHSEC细胞可以形成管腔结构; 与Matrigel + HHSEC组相比, 索拉非尼组及阿魏酸各浓度组均可不同程度地抑制细胞管腔形成。

3　阿魏酸对转基因斑马鱼功能血管数的影响

首先以100 μmol·L^{-1}阿魏酸干预转基因斑马鱼 (VEGFR:GFP), 进行初步评价, 结果发现斑马鱼荧光没有明显受到抑制, 但斑马鱼的节间血流有减少 (图3A), 所以用功能血管数量表示活性 (图3B)。与对照

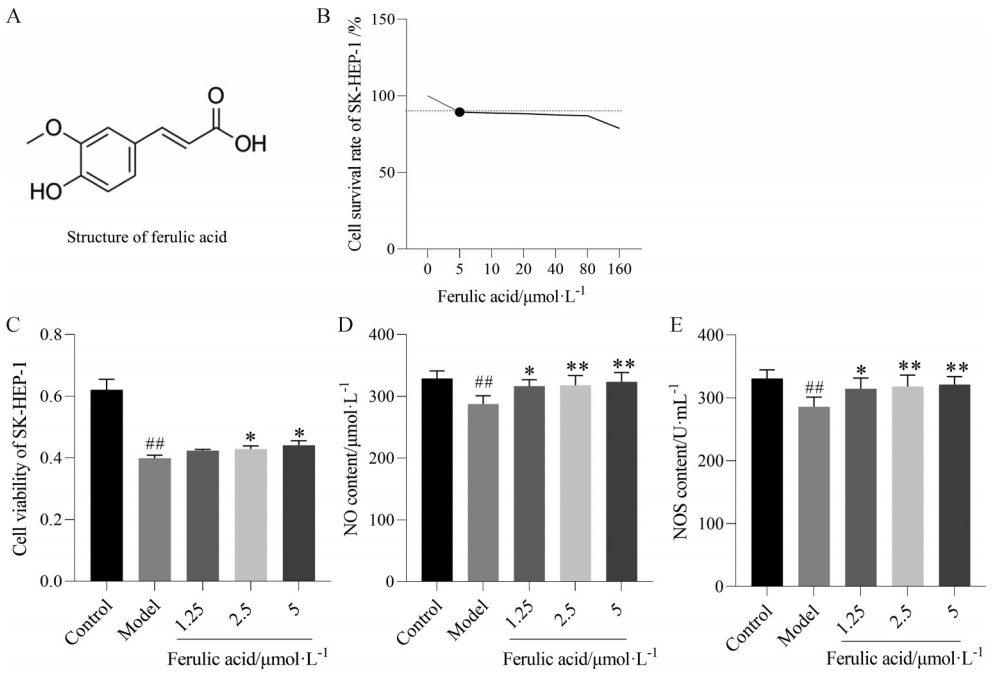


Figure 1 Effects of ferulic acid on SK-HEP-1 cell viability, NO, and NOS levels. A: Chemical structure of ferulic acid; B: Effects of ferulic acid at varying concentrations (0, 5, 10, 20, 40, 80, and 160 μmol·L^{-1}) on SK-HEP-1 cell viability; C: Effects of ferulic acid on cell viability of injured SK-HEP-1 cells induced by $CoCl_2·6H_2O$; D: NO level of SK-HEP-1 cells following ferulic acid treatment (1.25, 2.5, and 5 μmol·L^{-1}); E: NOS level of SK-HEP-1 cells after treatment with ferulic acid (1.25, 2.5, and 5 μmol·L^{-1}). NO: Nitric oxide; NOS: Nitric oxide synthase. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* model group

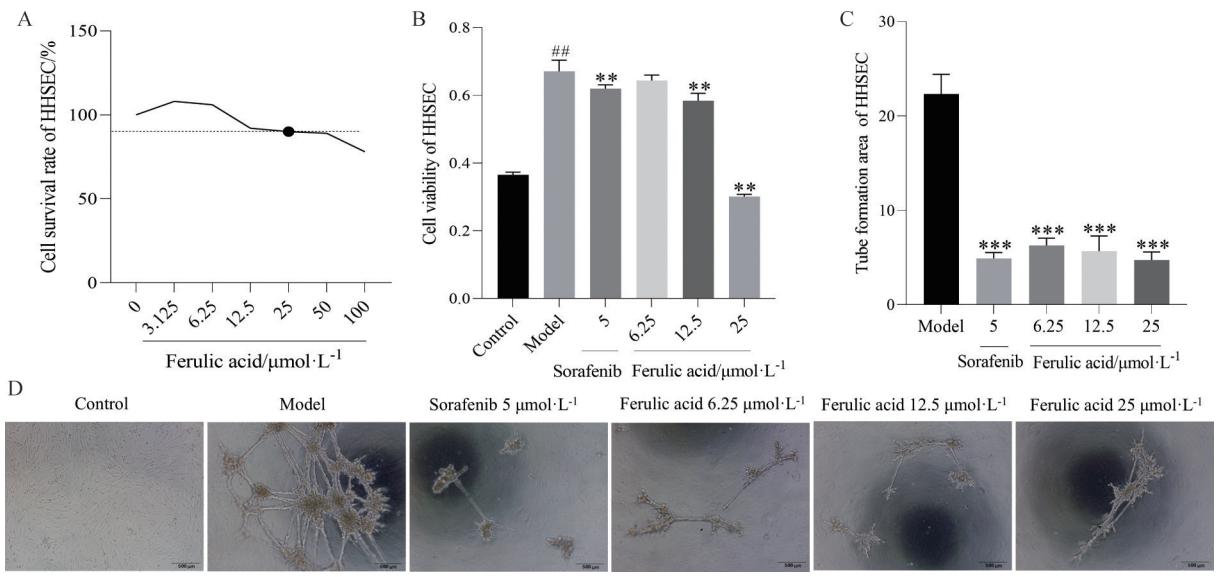


Figure 2 Effects of ferulic acid on HHSEC viability and tube formation. A: Cell survival rate of HHSEC (%); B: Effects of ferulic acid on the cell viability of HHSECs induced by ECGs; C: Semi-quantitative analysis of the tube formation test (area%); D: Morphological observation of the tube formation of HHSECs (microscopic images; scale bar: 500 μm). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* control group; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* model group. ECGs: Endothelial cell growth supplement

组比较, 40 和 80 μmol·L^{-1}阿魏酸对斑马鱼胚胎的节间血流数量均有明显影响 ($P < 0.01$, 图 3C)。

4 阿魏酸对 CCl_4 小鼠肝纤维化的影响

腹腔注射 CCl_4 构建肝纤维化模型, 并给予阿魏酸和索拉非尼干预 (图 4A)。首先观察小鼠的一般状态 (表 1), 与正常组相比, 模型组小鼠肝体比和脾体比显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 阿魏酸低剂量组和高剂量组小鼠肝体比明显降低 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.001$), 而索拉非尼组无明显改善。脾体比在各给药组中均有所下降, 但差异无统计学意义。

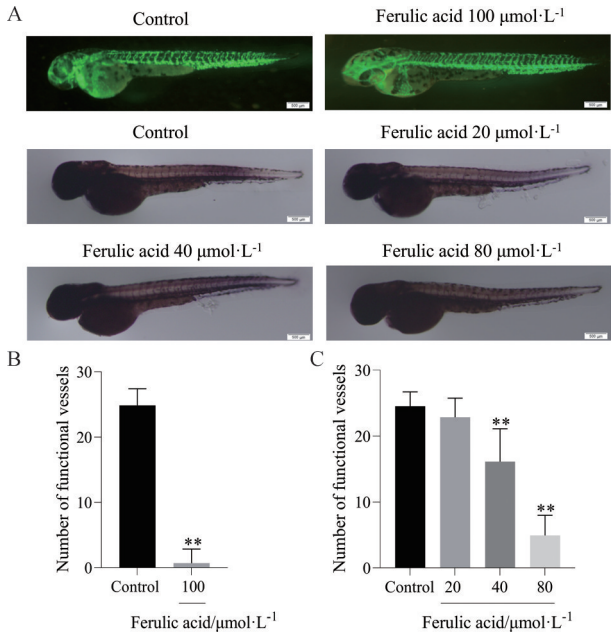


Figure 3 Effects of ferulic acid on angiogenesis in zebrafish. A: Observation of the intersegmental vessels of transgenic zebrafish under stereo microscope. Scale bar: 500 μm; B: Semi-quantification of the number of functional vessels during the initial screening (ferulic acid 100 μmol·L^{-1}); C: Semi-quantification of the number of functional vessels in different concentration of ferulic acid. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$ *vs* control group

Table 1 Effects of ferulic acid on the organ index in CCl_4-induced fibrotic mice. n = 9, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.001$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ *vs* model group

Group	Body weight/g	Liver/body weight ratio/%	Spleen/body weight ratio/%
Control	22.72 ± 2.67	4.12 ± 0.32	0.34 ± 0.06
Model	23.53 ± 2.26	5.12 ± 0.24$^{###}$	0.43 ± 0.07$^{###}$
Sorafenib 10 mg·kg^{-1}	22.28 ± 1.80	4.95 ± 0.26	0.42 ± 0.04
Ferulic acid 50 mg·kg^{-1}	22.49 ± 1.33	4.81 ± 0.15*	0.40 ± 0.05
Ferulic acid 100 mg·kg^{-1}	22.81 ± 2.08	4.58 ± 0.21***	0.40 ± 0.04

HE 染色显示 (图 4B), 正常组小鼠肝小叶结构完整, 肝细胞形态、大小正常, 以中央静脉为中心呈放射状有序排列, 胆管周围无明显炎性细胞浸润。模型组小鼠肝小叶结构显著受损, 汇管区肝细胞变性坏死, 纤维间隔形成, 局部可见大量炎性细胞浸润。与模型组小鼠相比, 索拉非尼组、阿魏酸低剂量组和高剂量组小鼠肝组织炎症均有不同程度减轻。

天狼星红染色显示 (图 4B), 正常组小鼠肝组织仅在中央静脉血管壁见微量胶原分布。与正常组小鼠相比, 模型组小鼠汇管区胶原纤维沉积, 胶原纤维包绕成团形呈多个纤维间隔, 纤维化分期以 S3 为主。与模型组小鼠相比, 索拉非尼组、阿魏酸低剂量组和高剂量组小鼠纤维增生均明显减轻, 纤维间隔不完全, 纤维化分期以 S1、S2 为主 (表 2)。

通过免疫组化进一步测定各组小鼠肝组织内 α-SMA 蛋白表达水平, 正常组小鼠 α-SMA 阳性信号 (棕褐色) 主要局限于中央静脉及小叶间血管壁的平滑肌细胞, 肝实质内仅见散在弱阳性表达。模型组小鼠肝组织汇管区及纤维隔周围呈现密集的 α-SMA 强阳性细胞, 阳性区域显著扩张 ($P < 0.001$)。与模型组相比, 索拉非尼组、阿魏酸低剂量组和高剂量组小鼠 α-SMA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$), 纤维隔内阳性细胞分布稀疏且不连续 (图 4B、C)。

通过检测小鼠血清 AST、ALT、ALB, 结果显示 (图 4D～F): 与正常组相比, 模型组小鼠血清 AST、ALT 水平显著升高 ($P < 0.001$), ALB 水平显著降低 ($P < 0.001$), 表明模型组小鼠肝功能受损。与模型组相比, 给药组均能不同程度改善肝功能, 索拉非尼组及阿魏酸低剂量组明显降低血清 AST、ALT 水平和升高 ALB 水平 ($P < 0.05$), 阿魏酸高剂量组效果更为显著 ($P < 0.01$)。肝组织 HYP 结果显示 (图 4G): 与正常组相比, 模型组小鼠肝组织 HYP 含量明显升高 ($P < 0.001$), 与模型组相比, 给药组小鼠肝组织 HYP 含量均不同程度降低, 其中阿魏酸高剂量组小鼠肝脏内 HYP 含量显著降低 ($P < 0.01$)。

5 阿魏酸对 CCl_4 小鼠肝窦毛细血管化的影响

扫描电镜结果显示, 正常组肝窦内皮结构完整, 窗孔分布均匀且形态规则, 表面平滑; 而模型组窗孔数量明显减少 ($P < 0.001$), 结构紊乱, 部分区域出现破坏或闭塞, 表面粗糙, 肝窦内皮受损严重。与模型组相比, 给药组窗孔数量、分布和内皮结构均有所改善和恢复, 表面更为平滑, 其中阿魏酸高剂量窗孔数量显著恢复

Table 2 Effects of ferulic acid on the fibrosis staging in CCl_4-induced fibrotic mice. n = 9, $\bar{x} \pm s$. $^{###}P < 0.001$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* model group

Group	Stage of liver fibrosis					Ridit analysis
	S0	S1	S2	S3	S4	*R* value
Control	9	0	0	0	0	0.10
Model	0	1	3	5	0	0.75$^{###}$
Sorafenib 10 mg·kg^{-1}	0	3	5	1	0	0.57*
Ferulic acid 50 mg·kg^{-1}	0	4	3	2	0	0.56*
Ferulic acid 100 mg·kg^{-1}	0	5	3	1	0	0.51**

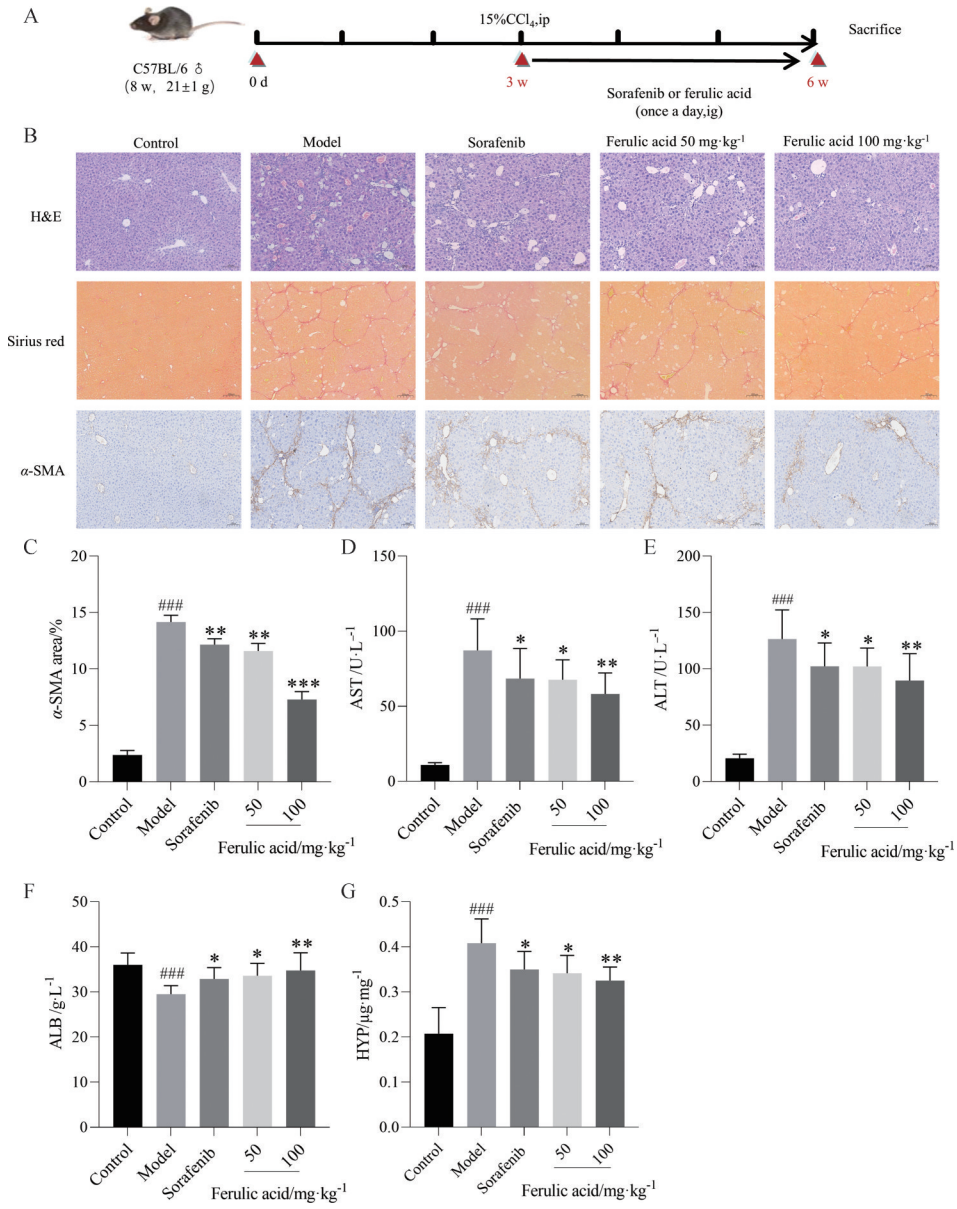


Figure 4 Effects of ferulic acid on hepatic fibrosis in CCl_4-induced fibrotic mice. A: Schematic diagram of the experimental process; B: H&E staining (×200), Sirius red staining (×100) and α-SMA staining (×200). Scale bar: H&E and α-SMA 100 μm; Sirius red 200 μm; C: Semi-quantification of α-SMA expression (area%); D−F: Serum liver function parameters (AST, ALT, ALB); G: HYP content in liver tissue. $n = 9$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* model group. H&E: Hematoxylin-eosin staining; α-SMA: α-Smooth muscle actin; AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase; ALB: Albumin; HYP: Hydroxyproline

($P < 0.001$), 分布均匀、内皮结构完整, 表面光滑度接近生理状态。综上, 阿魏酸对肝窦内皮窗孔具有剂量依赖性的保护作用 (图5A、B)。

免疫组化染色显示, 正常组小鼠肝内 CD31 少量表达, LYVE1 表达较多。与正常组小鼠相比, 模型组小鼠肝组织 CD31 表达明显增加, 而 LYVE1 表达减少 ($P < 0.001$)。与模型组小鼠相比, 阿魏酸低剂量组及高剂量组小鼠肝内 CD31 表达明显减少, LYVE1 表达明显增多 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$) (图5A、C、D)。

讨论

肝纤维化是慢性肝病恶性进展的核心环节, 肝窦毛细血管化与异常血管生成是其重要的病理学特征[11], 二者通过破坏肝窦微循环共同加速肝实质结构塌陷。肝窦中, LSEC 是最主要的细胞, LSEC 有两个异于普通血管内皮细胞的显著特征, 一是该细胞表面存在大量密集的呈筛状排列的结构, 称为窗孔; 二是该细胞膜外缺乏基膜结构的阻挡, 这些特征使得众多物质得以顺畅高速地通过 LSEC 到 Disse 腔, 并在血液与

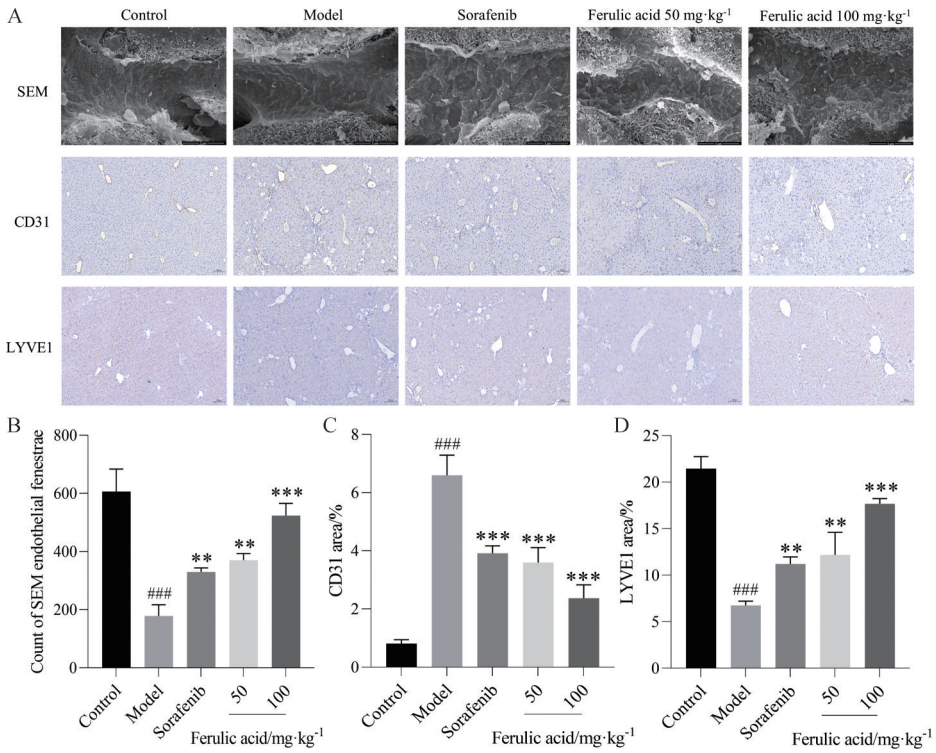


Figure 5 Effects of ferulic acid on sinusoidal fenestration in CCl_4-induced fibrotic mice. A: The SEM images (×20 000), CD31-stained images (×200) and LYVE1-stained images (×200). Scale bar: SEM 5 μm, CD31 and LYVE1 100 μm; B: SEM endothelial fenestrae count; C: Semi-quantification of CD31 (area%); D: Semi-quantification of LYVE1 (area%). SEM: Scanning electron microscopy. n = 3 (A: SEM, B) and 9 (A: CD31, LYVE1, C, and D), $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* control group; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* model group

肝细胞之间进行高效的物质交换, 保证肝脏的正常功能[18-20]。

当肝脏受到持续损伤时, LSEC 首先受到影响并失去其正常表型, 窦道毛细血管化破坏肝窦血流动力学, 影响窦道和肝细胞之间的双向物质交换, 导致肝细胞供氧障碍, 促进肝纤维化的发生[21-23]。在本研究中, 氯化钴诱导的 SK-HEP-1 缺氧模型显示, 阿魏酸显著提升细胞内 NO、NOS 水平, 从而改善血管舒张功能。这一效应可能与其抗氧化特性相关: 阿魏酸通过清除氧化自由基, 抑制活性氧的产生, 并参与多种信号通路来发挥抗氧化作用[24], 从而缓解缺氧诱导的 LSECs 窗孔结构塌陷。其次, 毛细血管化的 LSEC 促进病理性血管新生, 新生的血管由于不成熟、无窗孔结构且具有连续的基底膜结构, 无法为肝脏提供足够的氧气和营养物质, 造成肝脏微循环障碍和组织缺氧, 加重肝纤维化进程[8,25]。索拉非尼是一种激酶抑制剂, 具有抑制血管新生的作用[26]。在 HHSEC 增殖及管腔形成模型中, 阿魏酸显著抑制内皮细胞增殖与血管网络生成。转基因斑马鱼 (VEGFR:GFP) 模型中功能性血管数量的显著减少进一步验证了阿魏酸对血管生成的抑制效果。此外, 分化的 LSEC 分泌促纤维化介质 (如 TGF-β1、PDGF 和活性氧簇), 直接诱导肝星状细胞向肌成纤维细胞转分化并大量分泌细胞外基质, 导致细胞外基质在肝脏中过度沉积, 进而引发肝纤维化[3]。在 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维化模型中, 阿魏酸显著降低血清 ALT、AST 及肝组织 HYP 含量, 同时提高 ALB 水平, 表明其有效改善肝功能并抑制胶原沉积。组织学分析显示, 阿魏酸干预组肝组织炎症浸润减少、α-SMA 阳性表达下降, 其抗肝纤维化作用与文献报道一致[14]。同时, 本研究进一步对肝窦内皮形态和表型检测发现, 阿魏酸干预的小鼠肝组织表达少量 CD31—连续性血管内皮细胞标志物, 以及一定丰度的 LYVE1—肝窦内皮细胞标志物, 窗孔结构恢复, 证实了阿魏酸具有抑制肝窦毛细血管化和抗血管生成的作用。

与现有研究相比, 本研究进一步揭示了阿魏酸在调控 LSEC 功能抑制血管新生中的关键作用。但是仍存在一定的局限性, 阿魏酸对 LSEC 功能保护的具体分子机制尚未完全阐明, 其在抑制血管新生和调控肝星状细胞活化之间的相互作用也有待进一步研究。未来的研究可以进一步聚焦于阿魏酸的靶点分子及其与其他抗纤维化药物的联合应用效果, 以推动其在肝纤维化治疗中的临床转化。

综上所述，阿魏酸通过调控肝窦内皮细胞功能，抑制病理性血管新生，有效减轻肝纤维化进程。本文探究了阿魏酸对CCl_4小鼠肝纤维化中的保护作用，进一步丰富了阿魏酸的药理作用，为更好地预防和治疗肝纤维化，提供更科学合理的实验依据。

作者贡献：时瑞敏负责实验操作、数据处理、文章撰写和文献检索；黄恺、沈丽和薛静波为实验操作提供指导；陶艳艳为文章修改提供指导；刘成海和赵志敏为本研究提供了课题设计、基金支持与论文修改。

利益冲突：本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Xu LM, Liu P, Shen XZ, et al. Diagnosis and Treatment Guidelines of Integrated Chinese and Western Medicine for Treating Hepatic Fibrosis (2019 ed) [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2019, 39: 1286-1295.

[2] Friedman SL, Pinzani M. Hepatic fibrosis 2022: unmet needs and a blueprint for the future [J]. Hepatology, 2022, 75: 473-488.

[3] Poisson J, Lemoinne S, Boulanger C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases [J]. J Hepatol, 2017, 66: 212-227.

[4] Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, et al. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids [J]. J Clin Invest, 1997, 100: 2923-2930.

[5] Deleve LD, Wang X, Guo Y. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence [J]. Hepatology, 2008, 48: 920-930.

[6] McConnell MJ, Kostallari E, Ibrahim SH, et al. The evolving role of liver sinusoidal endothelial cells in liver health and disease [J]. Hepatology, 2023, 78: 649-669.

[7] Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis [J]. Nature, 1992, 359: 843-845.

[8] Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis [J]. Hepatology, 2002, 35: 1010-1021.

[9] Liu L, You Z, Yu H, et al. Mechanotransduction-modulated fibrotic microniches reveal the contribution of angiogenesis in liver fibrosis [J]. Nat Mater, 2017, 16: 1252-1261.

[10] Garbuzenko DV, Arefyev NO, Belov DV. Mechanisms of adaptation of the hepatic vasculature to the deteriorating conditions of blood circulation in liver cirrhosis [J]. World J Hepatol, 2016, 8: 665-672.

[11] Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, et al. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications [J]. Liver Int, 2011, 31: 146-162.

[12] Li D, Rui YX, Guo SD, et al. Ferulic acid: a review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives [J]. Life Sci, 2021, 284: 119921.

[13] Dong H, Guo H, Liang Y, et al. Astragaloside IV synergizes with ferulic acid to suppress hepatic stellate cells activation *in vitro* [J]. Free Radic Res, 2017, 51: 167-178.

[14] Mu M, Zuo S, Wu RM, et al. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation *via* inhibition of TGF-*β*/smad signaling pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 4107-4115.

[15] Sun WQ, Huang Y, Han T, et al. To explore mechanism of Qingdu Tiaogan decoction in treating hepatic fibrosis based on sinusoid capillarization [J]. J Xinjiang Med Univ (新疆医科大学学报), 2024, 47: 1293-1300.

[16] Wu XX, Zhang CZ, Wang X, et al. Targeting angiogenesis and vascular remodeling as a novel therapeutic approach to liver fibrosis [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2015, 50: 535-540.

[17] Cogger VC, Arias IM, Warren A, et al. The response of fenestrations, actin, and caveolin-1 to vascular endothelial growth factor in SK Hep1 cells [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008, 295: G137-G145.

[18] Cai X, Li Z, Zhang Q, et al. CXCL6-EGFR-induced kupffer cells secrete TGF-*β*1 promoting hepatic stellate cell activation *via* the SMAD2/BRD4/C-MYC/EZH2 pathway in liver fibrosis [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22: 5050-5061.

[19] Novo E, Cannito S, Morello E, et al. Hepatic myofibroblasts and fibrogenic progression of chronic liver diseases [J]. Histol Histopathol, 2015, 30: 1011-1032.

[20] Shetty S, Lalor PF, Adams DH. Liver sinusoidal endothelial cells-gatekeepers of hepatic immunity [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15: 555-567.

[21] Mak KM, Kee D, Shin DW. Alcohol-associated capillarization of sinusoids: a critique since the discovery by schaffner and popper in 1963 [J]. Anat Rec (Hoboken), 2022, 305: 1592-1610.

[22] Huang K, Zhao ZM, Liu HL, et al. Evaluation of cryptotanshinone inhibition of angiogenesis in human hepatic sinusoidal endothelial cells [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2016, 51: 1257-1262.

[23] DeLeve LD. Hepatic microvasculature in liver injury [J]. Semin Liver Dis, 2007, 27: 390-400.

[24] Tang XX, Wen WX, Li JL, et al. Research progress on biological activity of ferulic acid [J]. Guangzhou Chem Ind (广州化工), 2024, 52: 22-25.

[25] Lafoz E, Ruart M, Anton A, et al. The endothelium as a driver of liver fibrosis and regeneration [J]. Cells, 2020, 9: 929.

[26] Wang K, Li Y, Zhang LJ, et al. Synthesis and *in vitro* cytotoxic activities of sorafenib derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2014, 49: 639-643.