DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.08.027

基于 Rho A/ROCK 通路探索鬼箭羽醇提物对肝纤维化小鼠的影响

马敏,曾华华,孙宇杰,胡嘉敏,黄德斌
(湖北民族大学医学部,湖北 恩施 445000)

摘要:目的 基于 Rho A/ROCK 信号通路探究鬼箭羽醇提物(Ethanolic extracts of euonymus alatus,EEEA)对四氯化碳(CCl_4)诱导的肝纤维化(Hepatic fibrosis,HF)模型小鼠的影响。方法 将 50 只 C57BL/6 小鼠随机分为空白组(Normal group,NG)、模型组(Model group,MG)、鬼箭羽低剂量组(EA-L)、鬼箭羽中剂量组(EA-M)、鬼箭羽高剂量组(EA-H),每组 10 只。除 NG 外,其余各组小鼠腹腔注射含有 25% CCl_4 的橄榄油混悬液造模。造模的同时,NG、MG 以双蒸水灌胃,其余 3 组按对应剂量灌胃:EA-L、EA-M、EA-H 3 个剂量分别为 2、4、8 g/kg(相当于含生药量)。6 周后取材,收集小鼠血清和肝组织,采用谷草转氨酶(Glutamic oxalacetic transaminase,AST)、谷丙转氨酶(Glutamate pyruvate transaminase,ALT)测试盒检测血清中肝功能指标。ELISA 法检测血清中肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)和白细胞介素 6(Interleukin-6,IL-6)含量,相同方式检测肝组织羟脯氨酸(Hydroxyproline,Hyp)、转换生长因子 β1(Transforming growth factor-β1,TGF-β1)的含量。HE 和 Masson 染色分析小鼠肝脏的损伤和胶原沉积情况。Western blot 法检测肝组织中 α 平滑肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)、Ⅰ型胶原蛋白(Type Ⅰ Collagen,Collagen Ⅰ)以及信号通路 Rho A/ROCK 相关蛋白的相对表达量。结果 与 MG 相比,EA-M 和 EA-H 血清 ALT、AST、TNF-α、IL-6 呈下降趋势;与 MG 相比,鬼箭羽药物组肝组织 Hyp、TGF-β1 的含量不同程度下降($P<0.05$,$P<0.01$)。鬼箭羽药物组的肝形态结构、细胞炎性浸润、纤维变化及胶原沉积呈剂量依赖性优于 MG;与 MG 相比,EA-L、EA-M 和 EA-H 的 α-SMA、Collagen Ⅰ及 Rho A/ROCK 信号通路相关蛋白表达水平下降($P<0.05$,$P<0.01$)。与 MG 相比,EA-L、EA-M 和 EA-H 的 α-SMA、Collagen Ⅰ及 Rho A/ROCK 信号通路相关蛋白 mRNA 表达下降($P<0.05$,$P<0.01$)。结论 鬼箭羽醇提物具有明显的降酶护肝、抗肝纤维化的作用,而抑制 Rho A/ROCK 信号通路是其抗肝纤维化的作用机制之一。

关键词:鬼箭羽醇提物;肝纤维化;Rho A/ROCK 信号通路
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)08-0131-07

Exploring Effects of Ethanolic Extracts of Guijianyu(Euonymus Alatus) on Hepatic Fibrosis in Mice Based on Rho A/ROCK Signaling Pathway

MA Min,ZENG Huahua,SUN Yujie,HU Jiamin,HUANG Debin
(Medical School,Hubei Minzu University,Enshi 445000,Hubei,China)

Abstract:*Objective* To investigate the effect of ethanol extract of Guijianyu(Euonymus Alatus) on CCl_4-induced liver fibrosis model mice based on Rho A/ROCK signaling pathway. *Methods* Fifty C57BL/6 mice were randomly divided into normal group (NG),model group(MG),low-dose group of Guijianyu(Euonymus Alatus)(EA-L),medium-dose group of Guijianyu(Euonymus Alatus)(EA-M),high-dose group of Guijianyu(Euonymus Alatus)(EA-H),10 mice in each group. The mice in all groups except NG were modeled by intraperitoneal injection of olive oil suspension containing 25% CCl_4. At the same time of modeling,NG and MG were treated with double-distilled water by gavage,and the remaining three groups were treated with Guijianyu(Euonymus Alatus)by gavage with the corresponding doses(2 g/kg,4 g/kg and 8 g/kg,equivalent to the amount of the raw drug contained),respectively. 6 weeks later,the serum and liver tissues were collected,and the liver function indexes[glutamic oxalacetic transaminase(AST),glutamate pyruvate transaminase(ALT)] were detected. ELISA method detected the levels of tumor necrosis factor-α(TNF-α),interleukin-6(L-6),hydroxyproline(HYP) and transforming growth factor-β1(TGF-β1). HE and Masson staining were used to analyze the damage and collagen deposition in the liver of mice. The expressions of α-SMA,Collagen I and the relative protein expressions of Rho A/ROCK signaling pathway related proteins in the liver tissues were detected by Western blot. *Results* Compared with those of MG,the serum levels of ALT,AST,TNF-α and IL-6 of EA-M and EA-H showed a decreasing trend. Compared with those of MG,the contents of Hyp and TGF-β1 in liver tissues of the Guijianyu(Euonymus Alatus)groups decreased to different degrees($P<0.05$,$P<0.01$). The hepatic morphology and structure,cellular inflammatory infiltration,fibrous changes and collagen deposition in the Guijianyu(Euonymus Alatus)groups were dose-dependently better than that of MG. The protein expression levels of α-SMA,Collagen Ⅰ and Rho A/ROCK signaling pathway related proteins in the EA-L,EA-M and EA-H were decreased compared with those of MG($P<0.05$,$P<0.01$). Compared

基金项目:国家自然科学基金项目(82060745)
作者简介:马敏(1994-),女(土家族),湖北恩施人,硕士在读,研究方向:中医药防治肝胆疾病。
通讯作者:黄德斌(1965-),男,湖北恩施人,教授,硕士研究生导师,硕士,研究方向:民族中医药。E-mail:hdb66910@163.com。

with those of MG, the mRNA expressions of α - SMA, Collagen Ⅰ and Rho A/ROCK signaling pathway related proteins were decreased in EA - L, EA - M and EA - H ($P < 0.05$, $P < 0.01$). *Conclusion* Ethanol extract of Guijianyu (Euonymus Alatus) has obvious enzyme - lowering, hepatoprotective and antihepatic fibrosis effects, and inhibition of the Rho A/ROCK signaling pathway is one of the mechanisms of its anti - hepatic fibrosis action.

Keywords: ethanol extract of Guijianyu (Euonymus Alatus); liver fibrosis; Rho A/ROCK signaling pathway

肝纤维化(Hepatic fibrosis, HF)指由多种原因引起的复杂性纤维化炎症反应,通常表现为以氧化应激反应失衡、肝星状细胞(Hepatic stellate cells, HSCs)异常激活、细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)过度沉积等为特征的肝脏组织结构及功能异常。其中,约 40% 肝纤维化疾病可向肝硬化甚至肝癌等终末期肝病演变[1]。目前,由于用于防治肝纤维化的西药作用靶点的单一性等限制,很难达到治疗的理想水平。中药具有多成分、多靶点且安全性强的优势[2],近年来,中药防治肝纤维化成为国内外热点。鬼箭羽是一种经现代医学研究证明具有抗肝纤维化、护肝、降血糖、抗肿瘤、抗炎抗氧化和抗病毒等作用的传统中药[3]。本课题组前期研究发现,鬼箭羽水提物、醇提取物及相关活性成分(Beta - 谷甾醇、二氢槲皮素、山柰酚、儿茶素、金丝桃苷等)均可显著减轻 CCl_4 小鼠急性肝损伤及改善其纤维化,其作用机制与影响肿瘤坏死因子 - α (Tumor necrosis factor - α, TNF - α) - NF - κB、TβR1 - Smad2/3、MMp2、ERK1/2、JAK2/STAT3、PARA - 1 - HMGB1 等多信号通路及相关通路蛋白表达有关[4-7],由此,我们不禁思考,是否可将鬼箭羽的两种或两种以上单体联合起来,在中医性味归经及中医辨证论治理论的指导下,达到中药复方配伍的目的? 中药鬼箭羽抗肝纤维化的优势为多成分、多靶点、多层次互补,此种互补为其干预肝纤维化复杂的病理机制提供可能。鬼箭羽醇提物(Ethanolic extracts of euonymus alatus, EEEA)为鬼箭羽去除杂质之后相对纯净的鬼箭羽,即相当于将鬼箭羽各自单体部分配伍应用。鉴于此,目前国内外尚未有鬼箭羽对 Rho A/ROCK 信号通路(在 HF 发生发展中具有重要作用)影响的报道,本研究在复制肝纤维小鼠模型的基础上,探究鬼箭羽醇提物对 Rho A/ROCK 信号通路的影响,以期进一步明确鬼箭羽醇提物在抗肝纤维化中多成分多靶位互补机制,为临床治疗肝纤维化提供可能。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

谷草转氨酶(Glutamic oxalacetic transaminase, AST)、谷丙转氨酶(Glutamate pyruvate transaminase, ALT)试剂盒(购于 BIOBASE 公司,货号分别为:70910、70911);羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)试剂盒(购于南京建成公司,货号A030 - 2 - 1);白细胞介素 6(Interleukin - 6, IL - 6)、TNF - αELISA 试剂盒(酶免生物,货号分别为MM - 0163M1、MM - 0132M1),苏木精 - 伊红(HE)(购于武汉百仟度生物科技有限公司,货号B1002),RIPA 裂解液、SDS - PAGE 蛋白上样缓冲液(购于 Biosharp 公司,货号分别为:BL504A、BL502B);α 平滑肌动蛋白(α - smooth muscle actin, α - SMA)抗体、Ⅰ型胶原蛋白(Type Ⅰ Collagen, Collagen Ⅰ)抗体(购于美国 Abcam 公司,货号分别为 ab7817、ab260043);MLC 抗体(购于 CST,货号:A12975),P - MLC 抗体(购于 CST,货号 95777);Rho A 抗体(购于 proteintech,货号:10749 - 1 - Ap);ROCK Ⅰ抗体(购于 Servicebio,货号:GB111691);HRp - Goat anti Rabbit、HRp - Goat anti Mouse(购于 Searcare,货号分别为:5220 - 0336、5220 - 0341)。

1.2 动物

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 50 只,购于辽宁长生生物技术股份有限公司,体质量(20.0 ± 2.0)g,许可证号为 SCXK(辽)2020 - 0001。经湖北民族大学伦理委员会正式批准[批准号:NO.(2023)039],并遵照 3R 原则(Reduction、Replacement、Refinement)和湖北民族大学实验室动物管理规定进行。

1.3 主要仪器

高速离心机,济南来宝医疗器械有限公司;多功能酶标仪,美国 THFrmo Scientific 公司;数字显微镜,日本 Nikon 公司;组织全自动包埋机,湖北泰维科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 鬼箭羽醇提物的制备 选取采于湖北恩施的野生鬼箭羽,经过清洗和晾干处理,并由湖北民族大学中药学专家进行鉴定。将洗净的鬼箭羽粉碎,称取 2 kg 粉碎物,并将其浸泡于 65% 乙醇中,热回流提取 2 h,该过程重复 2 次,提取完成后,过滤得到滤液,将滤液进行减压冷冻干燥,得到干提物。在密封保存之前,干提物需在 - 80 ℃的冰箱中急速冷冻。在需要使用时,将其溶解在双蒸水中。整个制备过程严谨细致,旨在确保鬼箭羽醇提物的质量和功效。

1.4.2 动物造模与给药 将小鼠随机分为空白组(NG)、模型组(MG)、鬼箭羽低剂量组(EA - L)、鬼箭羽中剂量组(EA - M)、鬼箭羽高剂量组(EA - H),每组 10 只,采用灌胃并腹腔注射四氯化碳的方法来复制小鼠肝纤维化模型。NG 小鼠与 MG 小鼠每日予生理盐水(0.02 mL/g)灌胃,EA - L、EA - M、EA - H 以同样的方法每日灌不同剂量的鬼箭羽醇提物。给予正常组小鼠腹腔内注射橄榄油溶液(1.6 mL/kg),其余各组小鼠腹腔注射含 25% 四氯化碳的橄榄油溶液(1.6 mL/kg),连续 6 周,2 次/周。查阅相关文献[4-6]最终确定 EA - L、EA - M、EA - H 3 组灌胃药物剂量分别为 2、4、8 g/kg(相当于含生药量)。观察小鼠生理状态,如模型复制后小鼠是否出现毛发粗糙、精神萎靡等情况,初步判断模型是否成功。

1.4.3 样本采集与处理 6 周后禁食不禁水 24 h,予戊巴比妥钠麻醉小鼠后取眼球血,冰上静置 2 h 后,以 3000 r/min、4 ℃离心 15 min,取血清于 Ep 管并保存于 4 ℃冰箱待测。取血完成后颈椎脱臼处死小鼠,取出肝脏拍照并称质量,分取肝右叶存放在 10% 的甲醛溶液 EP 管中,剩下肝组织置于 EP 管于 - 80 ℃冰箱保存。观察和检测相关指标。

1.4.4 血清学指标检测 按试剂盒方法测 ALT、AST,按 Elisa 试剂盒说明书操作,检测炎症因子 IL - 6、TNF - α 含量。

1.4.5 肝组织指标检测 按照 Elisa 试剂盒说明书操作,检测肝组织中 Hyp、转换生长因子 β1(Transforming growth factor - β1, TGF - β1)含量。

1.4.6 HE 和 Masson 染色 采用 10% 的多聚甲醛对肝组织进行固定,予不同浓度梯度的乙醇和二甲苯脱水处理,石蜡包埋并切片,最后用 Masson、HE 染色,于光学显微镜下观察并拍摄照片。

1.4.7 蛋白免疫印记法检测肝组织相关蛋白表达 予 RIPA 裂解液对肝组织裂解,再加 PMSF 混匀搅碎,根据 BCA 说明书步骤操作测其蛋白浓度,- 20 ℃冰箱保存。电泳,恒压转膜,快速封闭液封闭,孵育一抗,二抗等过程。检测肝组织 α - SMA、Collagen Ⅰ、Rho A、ROCK Ⅰ、p - MLC 的蛋白表达。

1.4.8 实时荧光定量 PCR 检测肝脏 mRNA 相对表达量 将

表 1 qpCR 引物序列

基因	正向	反向
α－SMA	5′－GGACGTACAACTGGTATTGTGC－3′	5′－TCGGCAGTAGTCACGAAGGA－3′
Collagen Ⅰ	5′－CGATGGATTCCCGTTCGAGT－3′	5′－GAGGCCTCGGTGGACATTAG－3′
Rho A	5′－ATACCGGGTGAAGACAGTGAG－3′	5′－AACTTCTCAGATGCAAGGACAATC－3′
ROCK Ⅰ	5′－CCTTCAGCAAATGCCAGTGAG－3′	5′－TTTCTGTAAACTTTCCTGCAAGC－3′
MLC	5′－CGACAGCAGAGCGCCAT－3′	5′－TCTTGTAGCTGAAGCACGGG－3′
GAPDH	5′－CCTCGTCCCGTAGACAAAATG－3′	5′－TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT－3′

标本匀浆，置入 EP 管，依次加入裂解液和 Trizol，匀浆 20 s，冰上静置 10 min，加入 200 μL 的三氯甲烷，4 ℃离心 15 min，上层水相吸出放于新的无酶 EP 管，吸入等体积的异丙醇，4 ℃离心 15 min，弃去上清液，将 Ep 管晾干水分，加入 DEPC 水。按试剂盒逆转录 RNA，再进行 40 循环的 PCR。引物见表 1，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行结果的计算。

1.4.9 统计学方法 用 Graphpad prime 9.0 软件绘图，数据均以平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）的形式表示，用 SPSS 22.0 软件对实验所得数据进行统计学分析，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用两样本 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义，$P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 鬼箭羽醇提物对 HE 模型小鼠生理学的影响

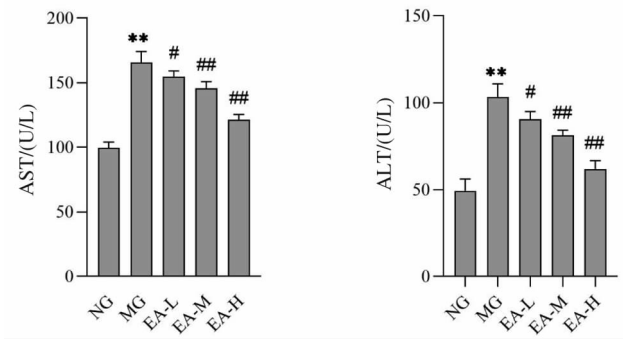
实验期间，小鼠死亡 3 只，分别为 EA－L 组 1 只、MG 组 2 只。造模前，各组小鼠毛发、精神状态、耳鼻口腔分泌物、饮食情况、活动状态、尿色等生理状况均正常。造模后，与 NG 比较，其余各组小鼠出现不同程度的精神欠佳、活动量减少、毛发粗糙、食欲不振等。与 MG 比较，鬼箭羽醇提物各给药组小鼠的生理状态均有一定程度的改善。

2.2 鬼箭羽醇提物对 HE 模型小鼠肝脏外形及肝组织病理形态学影响

NG 小鼠肝脏外形包膜光滑且完整，呈棕红色。MG 小鼠肝脏表层呈粗糙颗粒状，呈暗灰色。EA－L、EA－M、EA－H 小鼠肝脏表面均分布有大小不同的细小颗粒，但较 MG 小鼠明显减少，且呈现出随剂量越高小鼠肝脏表面颗粒越少的趋势。HE 和 Masson 结果显示，NG 小鼠肝组织结构基本正常，肝索排列规则紧密，肝实质内未见炎症细胞浸润及纤维化改变，未发现假小叶。与 NG 小鼠相比，模型组肝组织结构重度异常，大量肝细胞明显水肿并呈现大空泡，部分肝细胞坏死，坏死的肝细胞形成纤维间隔将肝实质分成大小不一的肝细胞团，并形成假小叶，提示造模成功。与模型组相比，EA－H 组小鼠视野内部分肝细胞坏死，肝实质内可见少量炎症细胞浸润，胶原纤维沉积少；有炎性细胞浸润，未见典型假小叶。EA－L 和 EA－M 小鼠肝组织病理染色结果优于 MG，但较 EA－H 组差。见插页XLⅦ图 1。

2.3 鬼箭羽醇提物对 HF 模型小鼠肝功能的影响

与 NG 小鼠相比，MG 小鼠 ALT、AST 水平明显升高（$P<0.01$），与 MG 相比，鬼箭羽醇提物各剂量组 ALT 均显著下降，差异具有统计学意义（$P<0.01$，$P<0.05$）。与 MG 相比，EA－L、EA－M 以及 EA－H 组 AST 显著下降，差异具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。见图 2。

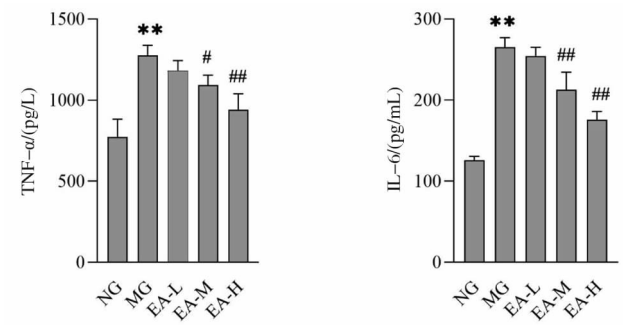


注：＊＊与 NG 相比，$P<0.01$；#与 MG 相比，$P<0.05$；##与 MG 相比，$P<0.01$。

图 2 各组小鼠肝功能 AST、ALT 变化

2.4 鬼箭羽醇提物对 HE 模型小鼠血清 TNF－α、IL－6 的影响

与 NG 小鼠相比，MG 小鼠 TNF－α、IL－6 水平明显升高（$P<0.01$），与 MG 相比，鬼箭羽醇提物各剂量组 TNF－α 均显著下降，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。与 MG 相比，EA－L 对 IL－6 的影响，差异无统计学意义（$P>0.05$），EA－M 以及 EA－L 组 IL－6 显著下降，差异具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。见图 3。



注：＊＊与 NG 相比，$P<0.01$；#与 MG 相比，$P<0.05$；##与 MG 相比，$P<0.01$。

图 3 各组小鼠 TNF－α、IL－6 变化

2.5 鬼箭羽醇提物对 HE 模型小鼠肝组织 Hyp、TGF－β1 的影响

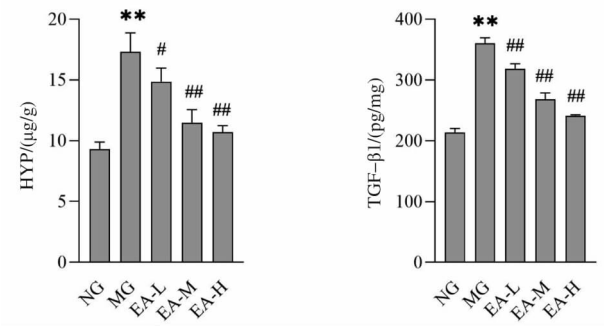
与 NG 小鼠相比，MG 小鼠 Hyp 水平明显升高（$P<0.01$），与 MG 相比，EA－L 组、EA－M 组和 EA－L 的 Hyp 显著下降，差异具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。见图 4。

2.6 鬼箭羽醇提物对 HE 模型小鼠肝组织蛋白表达的影响

鬼箭羽醇提物各剂量组的 Collagen Ⅰ蛋白表达水平均有不同程度降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$），EA－L、EA－M 和 EA－H 的 α－SMA 蛋白表达水平均有不同程度降低，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。与 NG 小鼠相比，MG 小鼠的 α－SMA、Collagen Ⅰ蛋白表达水平明显升高（$P<0.01$），且差异具有统计学意义，提示造模成功。见图 5。

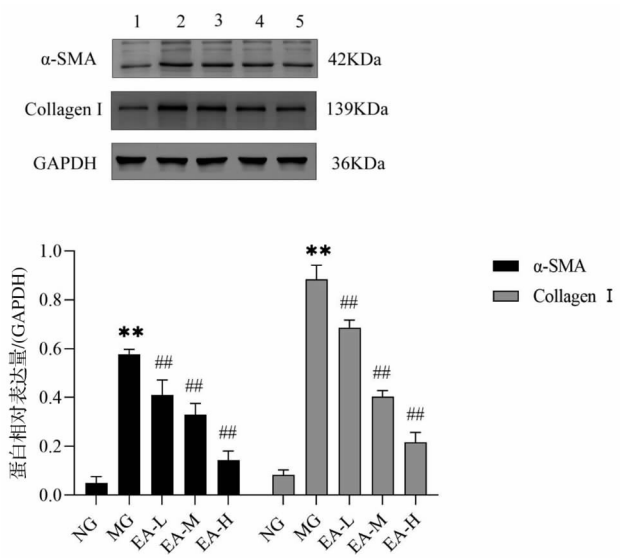
2.7 鬼箭羽醇提物对 HF 模型小鼠 Rho A/ROCK 信号通路相关蛋白的影响

与 NG 小鼠相比，MG 小鼠 Rho A、ROCK Ⅰ、MLC、p－MLC 蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$），差异具有统计学意义。鬼



注：＊＊与 NG 相比，$P<0.01$；#与 MG 相比，$P<0.05$；##与 MG 相比，$P<0.01$。

图 4 各组小鼠 HYP、TGF－β1 的变化



注：＊＊与 NG 相比，$P<0.01$；#与 MG 相比，$P<0.05$；##与 MG 相比，$P<0.01$。

图 5 各组小鼠肝组织蛋白表达变化

箭羽醇提物各剂量组的 Rho A、ROCK Ⅰ、MLC、p－MLC 的蛋白表达水平均有不同程度降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。见图 6。

2.8 鬼箭羽醇提物对 HF 模型小鼠肝组织 α－SMA、Collagen Ⅰ mRNA 影响

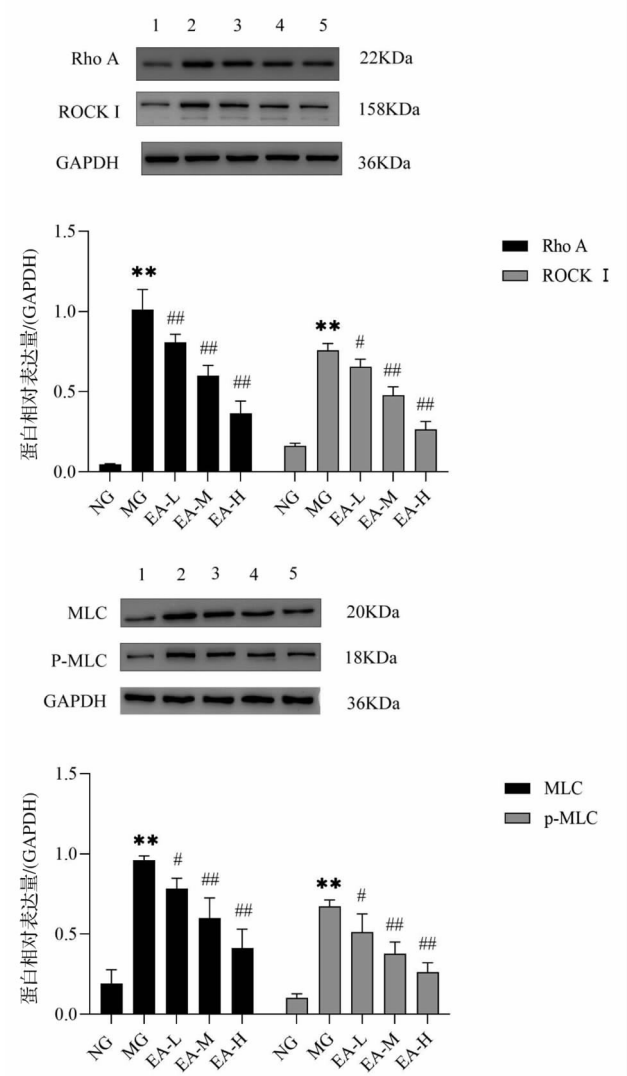
与 NG 小鼠相比，MG 小鼠 α－SMA、Collagen Ⅰ的 mRNA 表达显著升高（$P<0.01$），差异具有统计学意义。鬼箭羽醇提物各剂量组的 α－SMA、Collagen Ⅰ mRNA 表达水平均有不同程度降低，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。见图 7。

2.9 鬼箭羽醇提物对 HF 模型小鼠 Rho A、ROCK Ⅰ、MLC mRNA 的影响

与 NG 小鼠相比，MG 小鼠 Rho A、ROCK Ⅰ、MLC mRNA 表达显著升高（$P<0.01$），差异具有统计学意义。鬼箭羽醇提物各剂量组的 Rho A、ROCK Ⅰ、MLC mRNA 表达水平均有不同程度降低，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。见图 8。

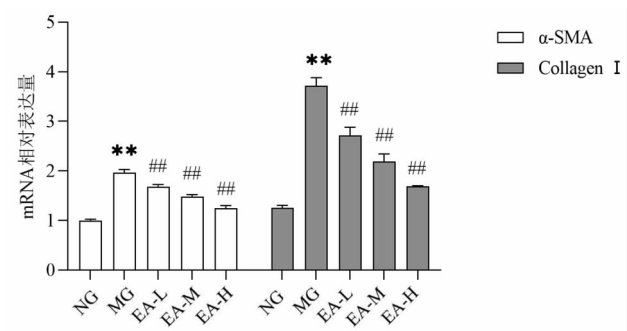
3 讨论

HF 若发展到肝硬化、肝癌阶段，会出现消化道出血、肝性脑病、肝肾综合征、肝肺综合征等一系列并发症，严重影响患者生活质量和生命健康。据报道，慢性肝病影响全世界约 8 亿多人的健康，每年死于慢性肝病的患者约 200 万人，同时，全球每年超过 100 万人死于 HF 导致的终末期肝病，截至 2030 年国际



注：＊＊与 NG 相比，$P<0.01$；#与 MG 相比，$P<0.05$；##与 MG 相比，$P<0.01$。

图 6 各组小鼠 Rho A/ROCK 信号通路相关蛋白表达情况

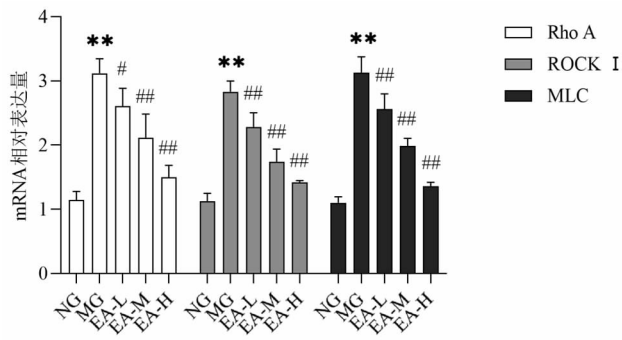


注：＊＊与 NG 相比，$P<0.01$；##与 MG 相比，$P<0.01$。

图 7 各组小鼠肝组织 α－SMA、Collagen Ⅰ mRNA 表达变化

肝病流行病学预测显示，全球逐年上升的肝硬化、肝癌等终末期肝病的死亡率将成为严重威胁人类生命健康的高危因素之一，每年死于肝硬化及并发症的患者将达到约 100 万人[8-11]。因此，如何延缓甚至逆转 HF 成为亟待解决的世界难题。

病毒感染为 HF 最常见的病因[2]。已有相关研究证明，核苷（酸）类似物或聚乙二醇 α 干扰素对乙型肝炎病毒（HFpatitis



注：＊＊与 NG 相比，$P<0.01$；#与 MG 相比，$P<0.05$；##与 MG 相比，$P<0.01$。

图 8 各组小鼠 Rho A、ROCK Ⅰ、MLC mRNA 表达情况

B virus，HBV）的有效抑制可使部分患者 HF 得到治愈，但仍有患者即便肝功能得到改善以及乙肝病毒得以清除，HF 却仍继续发展[12]。针对 HF 其他病因如酒精性肝病、脂肪性肝病、自身免疫性肝病等的治疗目前临床尚无特效药。在中医独特的辨证论治等理论体系中回顾与总结中医历来对 HF 的治疗，发现中药具有不良反应小、疗效显著以及靶点丰富等治疗优势[13]。

查阅古籍，中医并无 HF 之病名，常根据患者的临床表现和体征将其归为“胁痛”“积聚”“肝积”等范畴。《肝纤维化中西医结合诊疗指南（2019 年版）》将 HF 基本病机总结为为正虚邪盛，邪毒久稽，肝络受损，气滞血瘀，可归纳为“虚损生积”[13]。血瘀既为壅塞之因，又是本病传变的核心环节，因此认为 HF 病因病机中血瘀尤为重要[14-15]。血瘀日久可致瘀血，瘀血进一步阻滞脉络则血瘀加重，如此反复。由此可见，运用中医药治疗 HF 时，应十分重视活血化瘀类药物的运用。鬼箭羽作为我国传统中草药，药用历史源远流长，早在魏晋时期就开始被利用。鬼箭羽首次出现在《神农本草经》之中，被分类为中等药材，为卫矛科植物卫矛 *Euonymus alatus*（*Thunb.*）*Sieb.* 的具翅状物枝条或翅状附属物，性苦味寒，归肝经，具有破血通经、解毒消肿、杀虫的功效[16]。《证类本草》曰：“主女子崩中下血……去白虫，消皮肤风毒肿，令阴中解”。《本草品汇精要》曰：“去瘀血”。凡以通利血脉、消散瘀血为主要功效的用于治疗瘀血病症的药物，统称活血化瘀药，故鬼箭羽可纳入活血化瘀类药物范畴。综上，从中医理论方面分析，鬼箭羽可运用“祛瘀通络”的治法改善肝 HF 的血瘀，从而达到活血化瘀、通畅脉络的功效。

CCl_4 是一种能在人体肝脏内生成毒性三氯甲基（CCL_3）自由基、引起炎症反应的特异性致肝损伤的物质，并能激活 HSCs 导致 ECM 堆积，导致 HF[17-18]。从中医整体观念出发，内脏病变，必然表现于外，即所谓“有诸内，必形诸外”（《孟子·告子下》），在本项实验中我们发现 MG 小鼠活动量减少、精神萎靡、毛发粗糙无光泽、食欲减退等现象。同时 MG 小鼠肝脏表层呈粗糙颗粒状且呈暗灰色，MG 小鼠肝结构被破坏，出现假小叶，小鼠的外形表现和异常的肝组织染色共同提示成功建立了小鼠 HF 模型。目前临床上用于检测肝功能最广泛的生化指标是 AST 和 ALT，它们在受到外界环境因素影响时，肝细胞结构发生改变，肝细胞膜通透性增高甚至破裂，导致 ALT 和 AST 迅速从胞浆和线粒体内跨膜进入血液，ALT 和 AST 在血清中随之显著增加[18]。本实验证实经过鬼箭羽醇提物低中高剂量对相应 HF 模型小鼠灌胃后，明显改善了不同药物剂量组小鼠的血清 AST、ALT 水平。通过查阅文献[19]得知，HF 的发生及发展中炎症途径起着关键作用，而直接促进 HSCs 活化的炎症因子 TNF－α 和 IL－6 参与并推动了 HF 进程。本实验中，经过鬼箭羽醇提物干预后的不同药物剂量组小鼠 TNF－α、IL－6 呈现不同程度下降。由此可见鬼箭羽醇提物参与了抗 HF 肝损伤的过程。Hyp 是一种仅存在于蛋白质中的特殊氨基酸成分，它可以作为衡量体内胶原蛋白分解代谢基本情况的依据[20]。与 MG 相比，3 组不同药物浓度组（EA－L、EA－M、EA－H）的 Hyp 都有明显下降。当肝脏受到损伤时，活化的 HSCs 是产生 ECM 的主要细胞[21]，HSCs 被激活后，转换为肌成纤维化细胞，使 α－SMA 高表达并迁移到组织修复部位，分泌 Collagen Ⅰ和 Collagen Ⅲ[22-23]。TGFβ1 是关键的促纤维化因子，它能够通过激活 HSCs 进而促进成纤维细胞的增殖和 ECM 的分泌，引发 HF 的发生[24]。本实验研究结果显示，鬼箭羽醇提物能以显著且呈剂量相关的方式降低重要的促 HF 因子 TGFβ1 的含量、HSCs 激活标志物 α－SMA 的表达以及细胞外基质 Collagen Ⅰ的沉积，证实鬼箭羽醇提物能改善 CCl_4 诱导的 HF 模型小鼠 HF 水平。

RhoA/ROCK 通路调节细胞的多种生物功能，包括增殖、分化、基因表达等，同时具有调控 HSCs 活化、增殖和收缩的功能，被视为 HF 的重要机制之一[25-26]。当 RhoA 被各种细胞因子被激活时，与下游效应分子 ROCK 结合后，细胞内钙离子水平升高，分子中的多个氨基酸磷酸化而被激活，激活的 ROCK 使得肌球蛋白磷酸酶（Myosin phosphatase，MLCP）磷酸化而失活，失活的 MLCP 不能将 MLC 脱磷酸化从而使得胞浆磷酸化肌球蛋白轻链（Phospho－myosin light chain，p－MLC）含量增多，或直接使 MLC 磷酸化，p－MLC 增多，促使肌动－肌球蛋白相互作用增加，肌动蛋白骨架随之聚合，大量 HSCs 被激活，ECM 沉积，最终引发 HF[25,27-29]。ROCK 主要有两种异构体（ROCK Ⅰ和 ROCK Ⅱ）。ROCK Ⅰ在一些特定的部位例如肝、脑、肺、肾等含量最高[30]，ROCK Ⅱ在脑和心脏中表达更多[31]。TGF－β1 被证实是最有效的促 HF 因子[32]，同时已有相关研究证实 TGF－β1 也可激活 Rho A/ROCK 信号通路[33-34]，但 TGF－β1 与 Rho/ROCKI 信号通路的关系在 HF 进程中的作用尚未见报道。本实验研究发现，与 MG 相比，EA－L、EA－M、EA－H 的 TGF－β1 含量逐渐下降，Rho A、ROCK Ⅰ蛋白表达呈现剂量依赖性递减，P－MLC 的蛋白表达趋势与 Rho A、ROCK Ⅰ蛋白表达趋势相同，同时 Rho A、ROCK Ⅰ的 mRNA 表达趋势也与以上一致，推测 TGF－β1 可能激活 Rho A/ROCK 信号通路后，经过一系列生化反应，导致 MLC 磷酸化，影响肌动蛋白微丝骨架聚合，最终诱发大量 HSCs 活化而发生 HF。

综上所述，鬼箭羽醇提物对 CCl_4 诱导 HF 模型小鼠的肝脏损伤和 HF 具有治疗作用，其机制与抑制 Rho A/ROCK 信号通路有关，提示鬼箭羽抗 HF 与 Rho A/ROCK 信号通路的抑制密切相关，这指向鬼箭羽中另一活性成分的靶向作用，这为鬼箭羽研究指明了另一研究方向。本研究团队已经探明鬼箭羽抗 HF 机制系其多成分分别对应多通路途径，如万星等[4]研究发现鬼箭羽醇提物、二氢槲皮素、山柰酚、儿茶素可通过抑制 TβR1－Smad2/3、TNF－α－NF－κB、PARP1－Caspase3 信号通路改善 HF，王咏兰等[6]证实鬼箭羽醇提物抑制 JAK2、STAT3 蛋白表达从而抑制肝星状细胞激活，最终影响 HF 发展；ZENG H H 等[7]发现金丝桃苷可通过影响 PARA－1－HMGB1 信号通路延缓 HF 进程等，这些通路的影响证实了鬼箭羽抗 HF 的机制系其多成分多靶点互补共同实现的。本课题组针对鬼箭

羽的系列研究表明:一方面,大量研究表明,多味中药或中药多成分在治疗多种疾病中均具有理想的疗效,但将其关键活性成分提取后的单体成分效果却并不理想,此研究表明,多成分多靶点互补效应既印证了中药在宏观上必须遵循君臣佐使传统配伍与中药引经配伍等理论基础的正确性,又将其理论向现代微观医学分子对接和分子动力学理论深化并轨,还为中医理论现代化发展指明了新方向,这应该是中医理论对微观理论早期认识的精髓所在,将从宏观的多味中药君臣佐使配伍与早期引经理论认识跨越到微观多成分君臣佐与分子引经多靶点互补效应认识。另一方面在已经明确鬼箭羽现有二氢槲皮素、山柰酚、儿茶素、金丝桃苷等成分的基础上,鉴于王咏兰等[6]证实鬼箭羽醇提物抑制 JAK2/STAT3 逆转 HF 以及本研究再次证实鬼箭羽在抗 HF 中对 Rho - ROCK、MLC 的影响,其相关对应活性成分的明确,是本团队在今后研究中的又一新方向。

参考文献

[1] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues[J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 37 - 55.
[2] 陶永彪, 杨世睿, 汪龙德, 等. 中医药调控 TGF - β1/Smads 信号通路干预肝纤维化的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(6): 918 - 922.
[3] 杜雨璇, 谢治深, 徐江雁, 等. 鬼箭羽化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物预测[J]. 天然产物研究与开发, 2024, 36(6): 1064 - 1081, 1044.
[4] 万星, 郭琼, 刘向东, 等. 鬼箭羽醇提物对四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型的作用[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(4): 485 - 490.
[5] WAN X, HUANG H C, WANG X P, et al. *Euonymus alatus* and its monomers alleviate liver fibrosis both in mice and LX2 cells by blocking TβR1 - Smad2/3 and TNF - α - NF - κB pathways[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(1): 106 - 119.
[6] 王咏兰,陶柏楠,陈明环,等. 基于 JAK2/STAT3 信号通路探究鬼箭羽醇提物抗 CCl_4 诱导 C57BL/6J 小鼠肝纤维化作用机制[J]. 中国药理学通报,2023,39(5):875 - 881.
[7] ZENG H H, MA M, WANG Y L, et al. Hyperoside attenuates carbon tetrachloride - induced hepatic fibrosis *via* the poly(ADP - ribose)polymerase - 1 - high mobility group protein 1 pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 960: 176178.
[8] ASRANI S K, DEVARBHAVI H, EATON J, et al. Burden of liver diseases in the world[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 151 - 171.
[9] SHETTY A, SAAB E G, CHOI G. Social impact of hepatic encephalopathy[J]. Clin Liver Dis, 2024, 28(2): 273 - 285.
[10] XIAO J, WANG F, WONG N K, et al. Global liver disease burdens and research trends: Analysis from a Chinese perspective[J]. J Hepatol, 2019, 71(1): 212 - 221.
[11] 牛丽娜, 窦婧, 李栋栋, 等. 细胞凋亡在肝纤维化发生、发展中的作用研究进展[J]. 肝脏, 2023, 28(11): 1369 - 1372.
[12] MARCELLIN P, GANE E, BUTI M, et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5 - year open - label follow - up study[J]. Lancet, 2013, 381(9865): 468 - 475.
[13] 李依洁, 贾可欣, 刘闰平, 等. 五法经典方辨治肝纤维化的现代药理作用研究概况[J]. 中草药, 2022, 53(16): 5193 - 5204.
[14] 贾可欣, 李依洁, 曲姣蓉, 等. 从血论治肝纤维化经方的现代药理作用研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(10): 3322 - 3328.
[15] 徐列明, 刘平, 沈锡中, 等. 肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019 年版)[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(11): 1286 - 1295.
[16] 江苏新医学院. 中药大辞典 - 上下册[M]. 缩印本. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
[17] 杨武斌, 唐金凤, 米本中. 柴胡疏肝散对四氯化碳诱导的早期大鼠肝纤维化的治疗作用[J]. 山西医科大学学报, 2022, 53(9): 1096 - 1102.
[18] 陈秀梅, 王英杰, 赵成周, 等. 三味甘露对大鼠肝纤维化的改善作用及机制[J]. 中国药房, 2024, 35(6): 707 - 711.
[19] 徐杰, 钟明利, 王跃峰, 等. 狗肝菜多糖干预 MAPK 信号通路抑制炎症反应缓解大鼠肝纤维化进程[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(4): 531 - 537.
[20] SATO K, ASAI T T, JIMI S. Collagen - derived di - peptide, prolylhydroxyproline (pro - hyp): a new low molecular weight growth - initiating factor for specific fibroblasts associated with wound healing[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 548975.
[21] 王珊珊, 白俊杰, 于雪, 等. 基于 NLRP3 信号通路探讨清开灵对肝纤维化大鼠的影响及作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1561 - 1569.
[22] NULALI J, ZHAN M, ZHANG K W, et al. Osteoglycin: an ECM factor regulating fibrosis and tumorigenesis[J]. Biomolecules, 2022, 12(11): 1674.
[23] 张春艳, 赵晓璐, 高晓阳, 等. 基于 NF - κB 信号通路探讨蒙药七味清肝散抗肝纤维化作用的研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2024, 43(4): 296 - 303.
[24] 陈欣怡, 严得刚, 梁宏, 等. TGF - β1 和 Collagen - Ⅲ在牦牛感染细粒棘球蚴肝纤维化中的表达[J]. 动物医学进展, 2024, 45(4): 45 - 50.
[25] AYDIN M M, AKÇALI K C. Liver fibrosis[J]. Turk J Gastroenterol, 2018, 29(1): 14 - 21.
[26] 李贵芝, 刘莎, 张艳, 等. RhoA/ROCK 信号转导通路介导高糖诱导的大鼠肝星状细胞的增殖和胶原合成[J/OL]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2023, 15(2): 28 - 35.
[27] BI D, NISHIMURA J, NIIRO N, et al. Contractile properties of the cultured vascular smooth muscle cells: the crucial role played by RhoA in the regulation of contractility[J]. Circ Res, 2005, 96(8): 890 - 897.
[28] SWÄRD K, DREJA K, SUSNJAR M, et al. Inhibition of Rho - associated kinase blocks agonist - induced Ca^{2+} sensitization of myosin phosphorylation and force in Guinea - pig ileum[J]. J Physiol, 2000, 522(Pt 1): 33 - 49.
[29] 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/OL]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2021, 13(4): 38 - 45.
[30] AMIN E, DUBEY B N, ZHANG S C, et al. Rho - kinase: regulation, (dys)function, and inhibition[J]. Biol Chem, 2013, 394(11): 1399 - 1410.
[31] KNIPE R S, TAGER A M, LIAO J K. The Rho kinases: critical mediators of multiple profibrotic processes and rational targets for new therapies for pulmonary fibrosis[J]. Pharmacol Rev, 2015, 67(1): 103 - 117.
[32] 魏丹丹, 李闪闪, 张明昊, 等. 灯盏花素对肝纤维化大鼠的干预作用及机制[J]. 中国药房, 2024, 35(6): 671 - 677.
[33] SHAIFTA Y, MACKAY C E, IRECHUKWU N, et al. Transforming growth factor - β enhances Rho - kinase activity and contraction in airway smooth muscle *via* the nucleotide exchange factor ARHGEF1[J]. J Physiol, 2018, 596(1): 47 - 66.
[34] KOROL A, TAIYAB A, WEST - MAYS J A. RhoA/ROCK signaling regulates TGFβ - induced epithelial - mesenchymal transition of lens epithelial cells through MRTF - A[J]. Mol Med, 2016, 22: 713 - 723.

基于 Rho A/ROCK 通路探索鬼箭羽醇提物对肝纤维化小鼠的影响

(正文见 131 – 136 页)

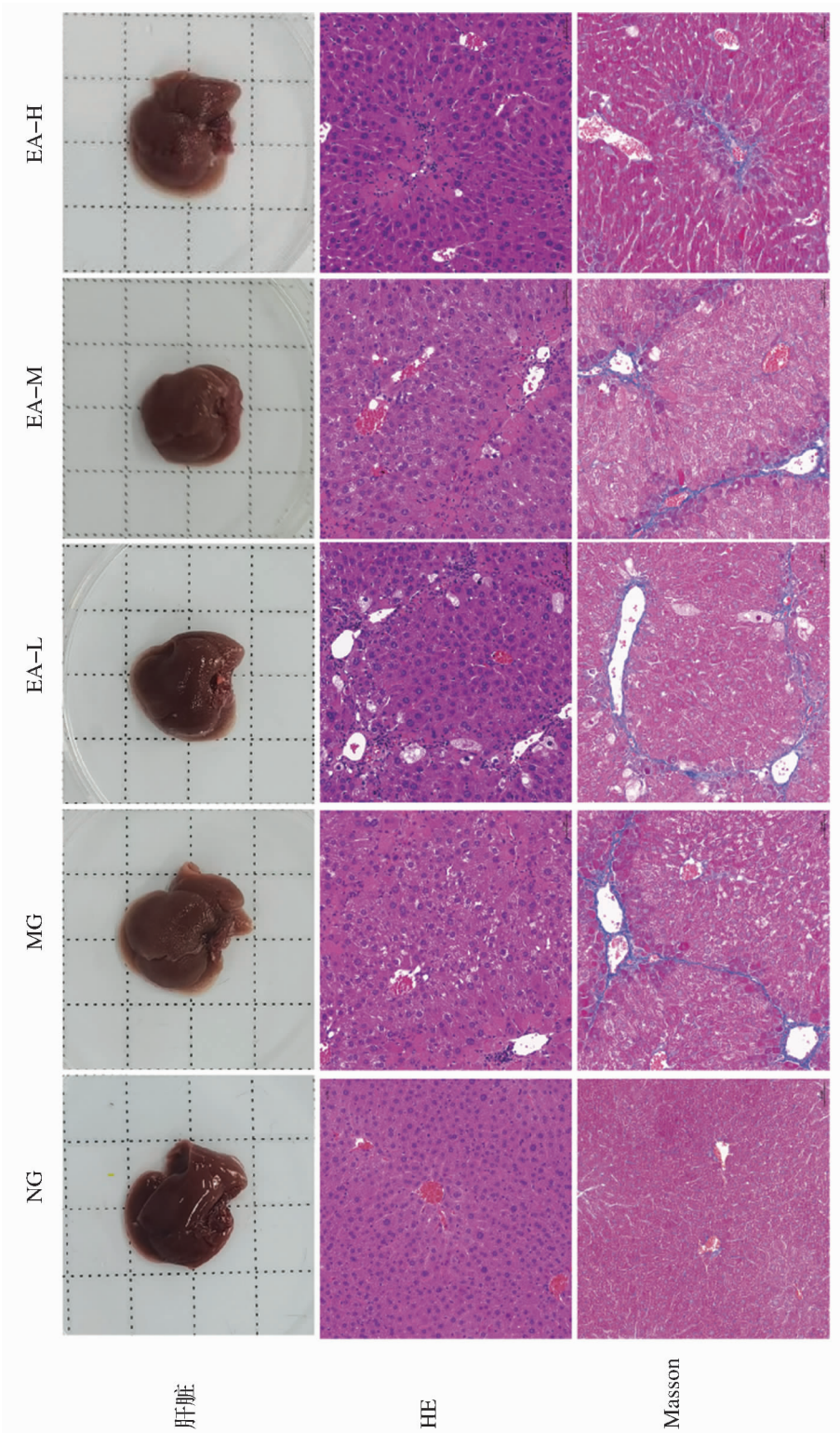


图 1　各组小鼠肝脏形态变化及肝组织 HE 和 Masson 染色(200 ×)