

本文引用: 杨茂辉, 冉恒泉, 王何斌, 刘德钦, 李 劲. 汉黄芩素调节 Hippo/YAP 信号通路对肝硬化大鼠肝纤维化的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(7): 1160-1166.

汉黄芩素调节 Hippo/YAP 信号通路对 肝硬化大鼠肝纤维化的影响

杨茂辉¹, 冉恒泉², 王何斌^{1*}, 刘德钦¹, 李 劲¹

1. 攀枝花学院附属医院肝胆外科, 四川 攀枝花 617000; 2. 攀枝花市中心医院肝胆外科, 四川 攀枝花 617000

[摘要] **目的** 初步探讨汉黄芩素(Wogonin, Wog)调节河马(Hippo)/Yes-相关蛋白(Yes associated protein, YAP)信号通路对肝硬化大鼠肝纤维化的影响。**方法** 将大鼠分为空白对照组(腹腔注射等量生理盐水+灌胃等量生理盐水)、模型组(腹腔注射等量生理盐水+灌胃等量生理盐水)、阳性对照组(0.8 g/kg 复方鳖甲软肝片溶液灌胃)和 Wog 低、中、高剂量组(7、14、28 mg/kg Wog 腹腔注射), 每组 12 只。除空白对照组外, 其余各组腹腔注射四氯化碳溶液构建肝硬化模型。所有大鼠造模后给药干预, 连续 4 周。检测大鼠血清肝功能指标谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, AST)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, ALT); ELISA 法检测血清纤维化指标 III 型前胶原(type III procollagen, PCIII)、透明质酸(hyaluronic acid hyaluronan, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN); HE、Masson 及免疫组织化学染色法观察肝硬化大鼠肝纤维化程度; Ishak 评分判断肝组织纤维化程度, 分析胶原体积分数(collagen volume fraction, CVF)及 I 型胶原(collagen-I, COL-I)和 III 型胶原(collagen-III, COL-III)阳性表达; Western blot 检测肝组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)及 Hippo/YAP 信号通路蛋白表达水平。**结果** 与空白对照组比较, 模型组 AST、ALT、PCIII、HA、LN、Ishak 评分、CVF、COL-I、COL-III、 α -SMA、TGF- β 1 表达升高 ($P < 0.05$), p-大肿瘤抑制因子 1 (large tumor suppressor gene 1, LATS1)/LATS1、p-YAP/YAP 表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, Wog 低、中、高剂量组及阳性对照组 AST、ALT、PCIII、HA、LN、Ishak 评分、CVF、COL-I、COL-III、 α -SMA、TGF- β 1 表达降低 ($P < 0.05$), p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP 表达升高 ($P < 0.05$)。Wog 各剂量组 AST、ALT、PCIII、HA、LN、Ishak 评分、CVF、COL-I、COL-III、 α -SMA、TGF- β 1 水平均随剂量升高而降低 ($P < 0.05$); p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP 水平随剂量升高而升高 ($P < 0.05$)。**结论** Wog 可能通过抑制 Hippo/YAP 信号通路的激活, 改善肝硬化大鼠肝纤维化。

[关键词] 肝硬化; 肝纤维化; 汉黄芩素; Hippo 信号通路; Yes-相关蛋白

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.07.003

Effects of Wogonin on liver fibrosis in cirrhotic rats by regulating the Hippo/YAP signaling pathway

YANG Maohui¹, RAN Hengquan², WANG Hebin^{1*}, LIU Deqin¹, LI Jin¹

1. Department of Hepatobiliary Surgery, The Hospital of Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China;

2. Department of Hepatobiliary Surgery, The Central Hospital of Panzhihua, Panzhihua, Sichuan 617000, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Wogonin (Wog) on liver fibrosis in cirrhotic rats by regulating the Hippo/Yes associated protein (YAP) signaling pathway. **Methods** The rats were divided into blank control (with intraperitoneal injection of equal volume of saline solution + intragastric administration of equal volume of saline solution), model (with intraperitoneal

[收稿日期] 2024-01-04

[基金项目] 四川省卫生和计划生育委员会科研课题项目 (18PJ507)。

[通信作者] * 王何斌, 男, 主任医师, E-mail: whb1972@163.com。

injection of equal volume of saline solution + intragastric administration of equal volume of saline solution), positive control (with intragastric administration of 0.8 g/kg Compound Biejia Ruangan Tablets solution), low-, medium-, and high-dose (with intraperitoneal injection of 7, 14, 28 mg/kg Wog) Wog groups, with 12 rats in each group. Except for blank control group, the other groups were injected intraperitoneally with carbon tetrachloride in aqueous solution to construct cirrhosis models. After modeling, all rats were treated with corresponding drugs, for consecutive 4 weeks. The serum liver function indicators of rats including alanine aminotransferase (AST) and aspartate aminotransferase (ALT) were measured; ELISA was used to test serum fibrosis indicators including type III procollagen (PC III), hyaluronic acid (HA), and laminin (LN); Hatmatoxylin-eosin (HE), Masson and immunohistochemical staining were performed to observe the degree of liver fibrosis in cirrhotic rats; Ishak score was used to determine the degree of liver tissue fibrosis, the collagen volume fraction (CVF), and the positive expressions of collagen-I (COL-I) and collagen-III (COL-III); Western blot was used to determine the expression levels of α -smooth muscle actin (α -SMA), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), and Hippo/YAP signaling pathway in liver tissue. **Results** Compared with blank control group, the expressions of AST, ALT, PC III, HA, LN, Ishak score, CVF, COL-I, COL-III, α -SMA, and TGF- β 1 in model group were higher ($P<0.05$), the expressions of phosphorylation (p)-large tumor suppressor gene 1 (LATS1)/LATS1 and p-YAP/YAP were lower ($P<0.05$); compared with model group, the expressions of AST, ALT, PC III, HA, LN, Ishak score, CVF, COL-I, COL-III, α -SMA, and TGF- β 1 in low-, medium-, and high-dose Wog groups and positive control group were lower ($P<0.05$), the expressions of p-LATS1/LATS1 and p-YAP/YAP were higher ($P<0.05$). The levels of AST, ALT, PC III, HA, LN, Ishak score, CVF, COL-I, COL-III, α -SMA and TGF- β 1 in all dose Wog groups decreased with the increase of dose ($P<0.05$). While the levels of p-LATS1/LATS1 and p-YAP/YAP increased with the dose increasing ($P<0.05$). **Conclusion** Wog may improve liver fibrosis in cirrhotic rats by inhibiting the activation of Hippo/YAP signaling pathway.

[**Keywords**] liver cirrhosis; liver fibrosis; Wogonin; Hippo signaling pathway; Yes-associated protein

肝硬化是由于肝脏疾病或特定疾病引起的长期反复损伤而导致肝脏经历缓慢瘢痕形成过程的疾病,其病理特征包括肝组织炎症和坏死、肝脏前部纤维化,其中,肝纤维化是导致肝硬化甚至肝癌等肝脏疾病发生的重要因素^[1]。治疗肝硬化的理想策略包括预防纤维化、病因治疗、肝硬化并发症治疗等^[2]。目前,暂无批准的抗纤维化或促再生药物治疗肝硬化,肝移植是终末期肝病最有效的治疗选择。然而,肝移植受到供体器官稀缺的限制,因此,急需寻找其他治疗肝硬化的方法。汉黄芩素(Wogonin, Wog)具有抗炎、抗癌、抗病毒、抗血管生成、抗氧化和神经保护等多种药理活性^[3]。Wog可通过抑制核因子 κ B/转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)/Smad3通路改善肾脏炎症和纤维化^[4]。研究表明,Wog可通过调节肝星状细胞的活化和凋亡减轻肝纤维化,可能是治疗和预防肝纤维化的有效药物^[5]。研究发现,河马(Hippo)途径及下游其效应物Yes-相关蛋白(Yes associated protein, YAP)是肝星状细胞活化的关键调节因子,抑制Hippo/YAP信号通路可减弱肝星状细胞活化和肝纤维化^[6]。WU等^[7]研究表明,Wog可通过调节Hippo/YAP信号传导诱导肝细胞癌的细胞周期停滞和凋亡。目前,Wog对肝硬化大鼠肝纤维化的影响尚不清楚。本研究通过体内构建

肝硬化大鼠模型,探究Wog对肝硬化大鼠肝纤维化及Hippo/YAP信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD雄性大鼠,SPF级,体质量240~270 g,购于华中科技大学动物实验中心[生产许可证号:SCXK(鄂)2021-0009]。分笼饲养1周,期间自由饮水饮食。12 h光暗循环、温度22~26 $^{\circ}$ C、相对湿度50%~70%。动物实验在成都纽瑞特医疗科技股份有限公司动物实验中心进行,经成都纽瑞特医疗科技股份有限公司动物实验伦理委员会批准(审批号:202206009)。

1.2 主要试剂与仪器

Wog(上海佰利莱生物科技有限公司,批号:BLL-bzp20505);四氯化碳(美国Sigma-Aldrich公司,批号:289116,纯度 \geq 99.5%);复方鳖甲软肝片(内蒙古福瑞医疗科技股份有限公司,国药准字Z19991011);III型前胶原(type III procollagen, PC III)ELISA试剂盒(上海信裕生物科技有限公司,批号:XY-PC III-H);透明质酸(hyaluronic acid;hyaluronan, HA)ELISA试剂盒(批号:EK-R38773)、层粘连蛋白(laminin, LN)ELISA试剂盒(批号:EK-R37021)均购自上海酶研生物科技有限公司;HE染色试剂盒(批号:J-SG1120-

10)、Masson 染色试剂盒(批号:J-SG1340-100)均购自上海研谨生物科技有限公司;谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, AST)(批号:YDLC-16409)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, ALT)(批号:YDLC-16414)均购自上海羽喙生物科技有限公司;兔源一抗 I 型胶原(collagen-I, COL-I)(批号:ab270993)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)(批号:ab5694)、大肿瘤抑制因子 1(large tumor suppressor gene 1, LATS1)(批号:ab243656)、p-LATS1(批号:ab111344)、p-YAP(批号:ab76252)、TGF- β 1(批号:ab215715)、III 型胶原(collagen-III, COL-III)(批号:ab7778)、YAP(批号:ab81183)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(批号:ab9485)、辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG(批号:ab6721)均购自美国 Abcam 公司。

酶标仪、凝胶成像系统(美国赛默飞公司,型号:Multiskan FC, iBright);离心机(上海奥陆生物科技有限公司,型号:5415D);光学显微镜(德国徕卡显微系统公司,型号:Leica DM750)。

1.3 方法

1.3.1 模型构建、分组及干预 参考文献[8]方法构建肝硬化大鼠模型。每周腹腔注射四氯化碳溶液 2 次(5 mL/kg),共注射 16 次。大鼠血清肝功能指标 AST、ALT 水平显著升高,且肝组织病理检查发现有假小叶生成,视为造模成功^[8]。将造模成功的大鼠分为 5 组:模型组、阳性对照组和 Wog 低、中、高剂量组,每组 12 只;另选 12 只大鼠每周腹腔注射 2 次等量生理盐水,作为空白对照组。阳性对照组大鼠灌胃 0.8 g/kg 复方鳖甲软肝片溶液^[8]+腹腔注射等量生理盐水;Wog 低、中、高剂量组大鼠根据参考文献[5]和前期预实验结果经腹腔注射 7、14、28 mg/kg Wog 溶液+灌胃等量生理盐水;空白对照组、模型组大鼠腹腔注射等量生理盐水+灌胃等量生理盐水。所有给药大鼠均为造模后给药,均每天干预 1 次,连续 4 周。

1.3.2 血清肝功能指标检测 给药结束后,采取每组 6 只大鼠的腹主动脉血,4 °C 以 3 000 r/min 离心 10 min(离心半径 10 cm),收集上清液。根据说明书检测 AST、ALT 水平。

1.3.3 血清纤维化指标检测 取“1.3.2”剩余血清,检测每组 6 只大鼠血清 PC III、HA、LN 纤维化指标,具体操作步骤严格根据 ELISA 说明书进行。

1.3.4 HE 及 Masson 染色 处死所有大鼠,分离肝组织。多聚甲醛固定大鼠肝组织(每组随机取 6 只),石蜡包埋并切成 4 μ m 的切片。脱蜡和脱水后进行 HE、Masson 染色,乙醇脱水、二甲苯透明,中性胶封层后镜下观察肝组织病理改变。根据肝纤维化 Ishak 评分标准判断肝组织纤维化程度^[9]。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析肝组织胶原体积分数(collagen volume fraction, CVF), $CVF(\%) = \text{蓝色胶原面积} / \text{肝组织总面积} \times 100\%$ 。

1.3.5 免疫组织化学染色法检测 COL-I、COL-III 表达 将肝组织切片置入柠檬酸钠溶液中进行抗原修复,3%过氧化溶液处理 20 min,去除内源性过氧化物酶,与 COL-I、COL-III 一抗(1:500)4 °C 孵育过夜,并与辣根过氧化物酶偶联的抗山羊 IgG 二抗(1:1 000)37 °C 孵育 60 min,经二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色,中性胶封层后镜检。使用 Image-pro Plus6.0 分析阳性细胞率。

1.3.6 Western blot 检测肝组织 α -SMA、TGF- β 1 及 Hippo-YAP 通路蛋白表达 用液氮将肝组织充分研磨后加入预冷的 RIPA 裂解缓冲液,以 12 000 r/min 离心 15 min(离心半径 10 cm)。收集上清液并用于蛋白质印迹分析。使用 BCA 蛋白质检测试剂盒定量蛋白质浓度。在 12% SDS-PAGE 中分离,并转移至聚偏氟乙烯膜上,脱脂牛奶封闭。在 4 °C 下与 α -SMA(1:1 000)、TGF- β 1(1:2 000)、LATS1(1:1 000)、p-LATS1(1:2 000)、p-YAP(1:1 000)、YAP(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)一抗孵育过夜。将膜洗涤并在室温下与加入辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG(1:2 000)孵育 1 h。使用化学发光试剂检测蛋白质条带,并使用 ImageJ 软件分析灰度值,内参为 GAPDH。

1.4 统计学分析

采用 Graphpad Prism 9.0 软件分析实验数据。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Wog 对肝硬化模型大鼠 AST、ALT 水平的影响

与空白对照组比较,模型组 AST、ALT 水平升高($P < 0.05$);与模型组比较,Wog 低、中、高剂量组及阳性对照组 AST、ALT 水平降低($P < 0.05$);且 Wog 各剂量组 AST、ALT 水平随剂量升高而降低($P < 0.05$)。详见表 1。

表1 各组大鼠血清AST、ALT水平比较($\bar{x}\pm s, n=6, U/L$)**Table 1** Comparison of serum AST and ALT levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6, U/L$)

分组	AST	ALT
空白对照组	58.32±3.64	39.47±2.16
模型组	106.48±7.85 [#]	90.21±7.10 [#]
Wog 低剂量组	95.54±7.29 ^{#*}	82.75±6.24 ^{#*}
Wog 中剂量组	81.07±6.44 ^{#*^{&}}	71.26±5.39 ^{#*^{&}}
Wog 高剂量组	64.53±5.31 ^{#*^{&}}	58.35±4.57 ^{#*^{&}}
阳性对照组	62.90±5.37 ^{#*^{&}}	56.81±4.63 ^{#*^{&}}

注:与空白对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与Wog低剂量组比较,[&] $P<0.05$;与Wog中剂量组比较,[Ⓢ] $P<0.05$ 。

2.2 Wog对肝硬化模型大鼠纤维化指标影响

与空白对照组比较,模型组PCⅢ、HA、LN升高($P<0.05$);与模型组比较,Wog低、中、高剂量组及阳性对照组PCⅢ、HA、LN降低($P<0.05$);且Wog各剂量组PCⅢ、HA、LN随剂量升高而降低($P<0.05$)。详见表2。

2.3 Wog对肝硬化模型大鼠肝组织病理损伤的影响

空白对照组肝脏组织完整,未见病理性损伤;与空白对照组比较,模型组大鼠肝细胞排列松散混乱、细胞肿胀,可见大量炎症浸润及纤维增生,有假小叶形成,肝硬化病理现象明显;与模型组比较,Wog低、中、高剂量组及阳性对照组大鼠肝组织病理损伤减轻,炎症浸润、纤维增生均有不同程度降低,假小

表2 各组大鼠血清PCⅢ、HA、LN水平比较($\bar{x}\pm s, n=6, ng/mL$)**Table 2** Comparison of serum PCⅢ, HA, and LN levels of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6, ng/mL$)

分组	PCⅢ	HA	LN
空白对照组	46.74±3.81	96.28±6.37	68.61±4.54
模型组	87.69±6.12 [#]	259.82±13.61 [#]	157.92±11.47 [#]
Wog 低剂量组	79.53±5.75 ^{#*}	220.79±12.56 ^{#*}	134.37±10.68 ^{#*}
Wog 中剂量组	70.26±5.48 ^{#*^{&}}	168.52±10.87 ^{#*^{&}}	108.29±9.56 ^{#*^{&}}
Wog 高剂量组	54.29±5.13 ^{#*^{&}}	123.54±11.46 ^{#*^{&}}	81.54±6.39 ^{#*^{&}}
阳性对照组	53.87±4.92 ^{#*^{&}}	120.87±10.73 ^{#*^{&}}	79.21±5.46 ^{#*^{&}}

注:与空白对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与Wog低剂量组比较,[&] $P<0.05$;与Wog中剂量组比较,[Ⓢ] $P<0.05$ 。

叶逐渐消失,其中Wog高剂量组及阳性对照组对肝硬化病理改变的改善程度最为明显。详见图1。

2.4 Wog对肝硬化模型大鼠肝组织纤维化的影响

空白对照组大鼠肝组织中几乎无纤维化组织;与空白对照组比较,模型组大鼠肝组织纤维化程度加重,可见大量纤维化组织,Ishak评分、CVF均升高($P<0.05$);与模型组比较,Wog低、中、高剂量组及阳性对照组大鼠肝组织纤维化程度明显改善,纤维化组织减少,Ishak评分、CVF均降低($P<0.05$);且Wog各剂量组Ishak评分、CVF随剂量升高而降低($P<0.05$)。详见图2、表3。

2.5 Wog对肝硬化模型大鼠肝组织中胶原蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组胶原蛋白COL-I、

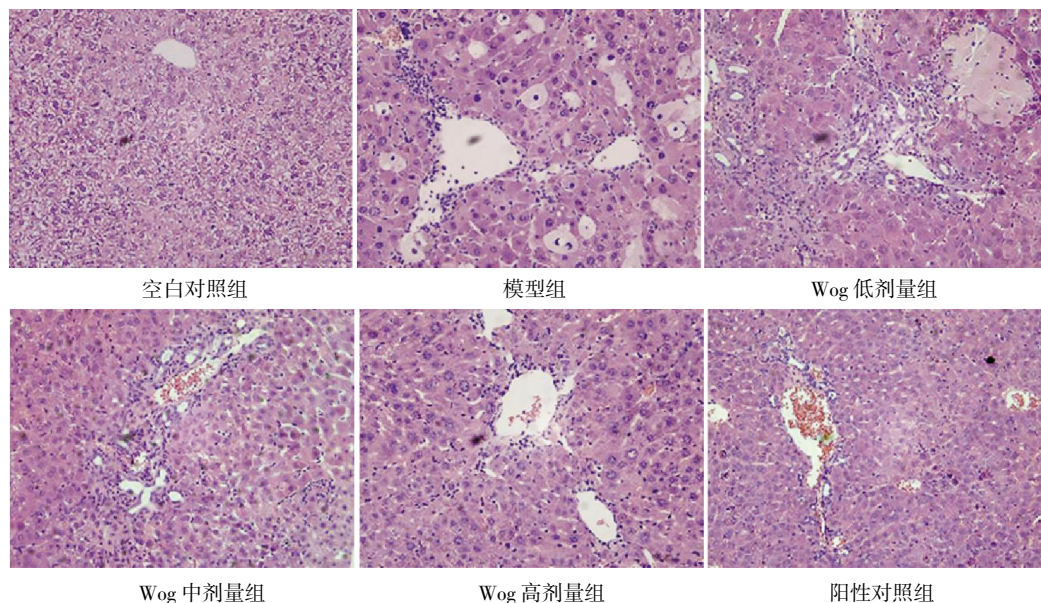


图1 各组大鼠肝组织病理损伤比较(HE,×200)

Fig.1 Comparison of pathological damage in liver tissue of rats in each group (HE, ×200)

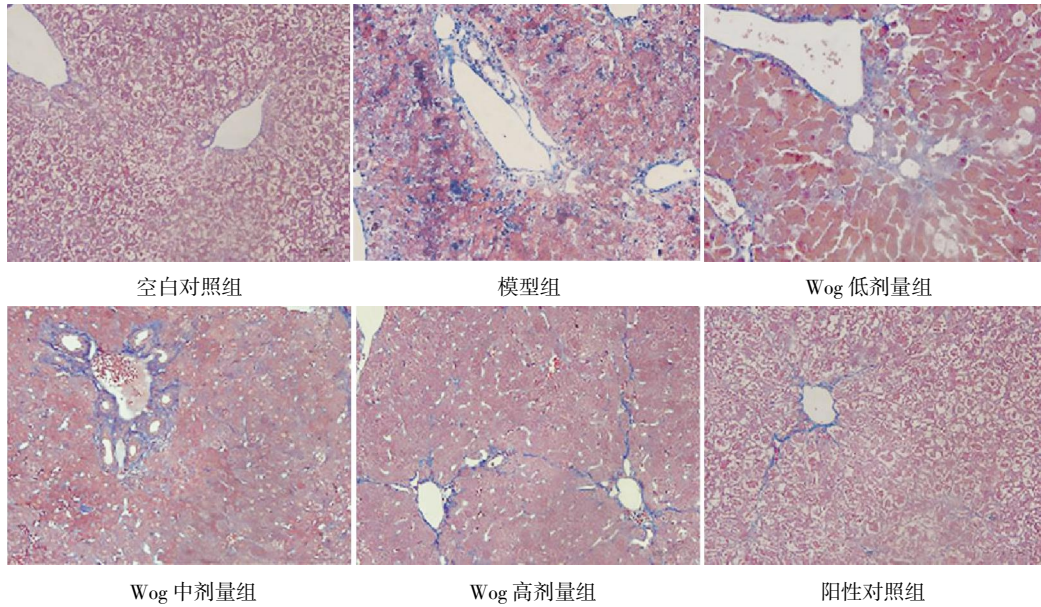


图 2 各组大鼠肝组织纤维化程度比较(Masson,×200)

Fig.2 Comparison of the degree of liver fibrosis of rats in each group (Masson, ×200)

表 3 各组大鼠肝组织 Ishak 评分、CVF 比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of Ishak score and CVF in liver tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	Ishak 评分/分	CVF/%
空白对照组	0.21±0.04	1.02±0.24
模型组	5.48±0.56 [#]	19.52±1.23 [#]
Wog 低剂量组	4.36±0.47 ^{#*}	14.76±1.17 ^{#*}
Wog 中剂量组	3.05±0.42 ^{#*[△]}	9.52±1.09 ^{#*[△]}
Wog 高剂量组	1.48±0.23 ^{#*[△][⊗]}	3.28±0.62 ^{#*[△][⊗]}
阳性对照组	1.32±0.19 ^{#*[△][⊗]}	3.14±0.57 ^{#*[△][⊗]}

注:与空白对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与 Wog 低剂量组比较,[△] $P<0.05$;与 Wog 中剂量组比较,[⊗] $P<0.05$ 。

表 4 各组大鼠肝组织 COL-I、COL-III 阳性表达比较($\bar{x}\pm s, n=6, \%$)

Table 4 Comparison of COL-I and COL-III positive expression in liver tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6, \%$)

分组	COL-I 阳性率	COL-III 阳性率
空白对照组	7.56±1.13	5.98±1.07
模型组	34.78±2.41 [#]	38.61±2.85 [#]
Wog 低剂量组	26.81±2.19 ^{#*}	33.25±2.67 ^{#*}
Wog 中剂量组	20.06±1.63 ^{#*[△]}	24.78±2.31 ^{#*[△]}
Wog 高剂量组	12.53±1.28 ^{#*[△][⊗]}	15.14±1.38 ^{#*[△][⊗]}
阳性对照组	11.47±1.30 ^{#*[△][⊗]}	13.97±1.27 ^{#*[△][⊗]}

注:与空白对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与 Wog 低剂量组比较,[△] $P<0.05$;与 Wog 中剂量组比较,[⊗] $P<0.05$ 。

COL-III 表达升高($P<0.05$);与模型组比较,Wog 低、中、高剂量组及阳性对照组胶原蛋白 COL-I、COL-III 表达降低($P<0.05$);且 Wog 各剂量组 COL-I、COL-III 表达随剂量升高而降低($P<0.05$)。详见表 4、图 3。

2.6 Wog 对肝硬化模型大鼠 α -SMA、TGF- β 1、p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组 α -SMA、TGF- β 1 表达升高($P<0.05$),p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP 表

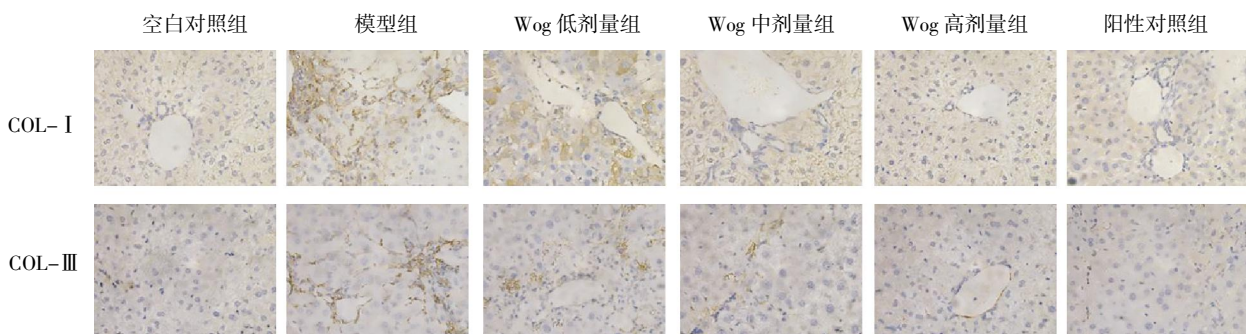


图 3 各组大鼠肝组织 COL-I、COL-III 阳性表达比较(免疫组织化学染色,×400)

Fig.3 Comparison of COL-I and COL-III positive expression in liver tissues of rats in each group (immunohistochemistry, ×400)

达降低($P<0.05$);与模型组比较,Wog低、中、高剂量组及阳性对照组 α -SMA、TGF- β 1表达降低($P<0.05$),p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP表达升高($P<0.05$);且Wog各剂量组 α -SMA、TGF- β 1表达随剂量升高而降低($P<0.05$),p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP表达随剂量升高而升高($P<0.05$)。详见图4、表5。

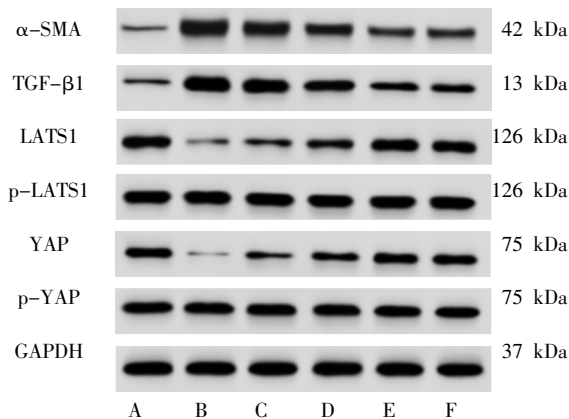


图4 各组大鼠肝组织 α -SMA、TGF- β 1、p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP蛋白表达条带图

Fig.4 Expression bands of α -SMA, TGF- β 1, p-LATS1/LATS1, and p-YAP/YAP proteins in liver tissues of rats in each group

注:A.空白对照组;B.模型组;C.Wog低剂量组;D.Wog中剂量组;E.Wog高剂量组;F.阳性对照组。

3 讨论

肝纤维化是肝损伤后维持肝脏完整性的适应性反应,病毒感染、酒精性与非酒精性脂肪性肝病、自身免疫性疾病等多种原因均可导致肝纤维化^[10]。肝硬化具有死亡率高的特点,肝纤维化是硬化的主要病因,其特征是肝星状细胞活化和细胞外基质过度沉积(主要是COL-I、COL-III),在肝纤维化过程中,静止肝星状细胞被激活并分化为肌成纤维细胞,其特征为 α -SMA和Coll-I表达上调^[11]。肝纤维化

持续发展,会增加肝细胞癌发生的风险。因此,研究延缓肝纤维化进程的作用机制有利于开发改善肝硬化等慢性肝病的药物。

近年来,中药因其广泛的药理作用和更多的临床应用而受到越来越多的关注。Wog是一种黄酮类化合物,是中药黄芩的主要活性成分之一。研究表明,Wog通过降低COL-I、COL-III表达可以减轻糖尿病肾病大鼠肾组织的纤维化^[12]。另有研究表明,Wog可以抑制TGF- β 1诱导的 α -SMA和COL-I水平,从而抑制肾小管上皮细胞的纤维化^[13]。然而,Wog对肝硬化的作用机制尚不清楚。复方鳖甲软肝片是临床上用于治疗肝硬化的常用药物,对肝纤维化有明显的治疗作用,且常被用作肝硬化药物开发的阳性对照药物,故本研究以复方鳖甲软肝片作为阳性对照来观察Wog的疗效^[18,14]。本研究发现,不同剂量Wog均可显著降低COL-I、COL-III、TGF- β 1、 α -SMA表达,且高剂量的效果最好,与阳性药的作用趋于一致。COL-I与COL-III是主要的间质胶原蛋白,与纤维化进展密切相关。TGF- β 1在纤维化疾病中被诱导和激活,可参与多种生物学过程,如成纤维细胞增殖、胶原蛋白合成等; α -SMA是肝星状细胞活化的标志物^[15]。PCIII、HA、LN是肝纤维化的生物学诊断指标,其表达水平与肝纤维化程度密切相关^[16]。故推测Wog可能通过抑制肝星状细胞的活化,起到减轻肝硬化大鼠肝纤维化的作用。通过Masson染色观察大鼠肝纤维化程度发现,Wog干预后大鼠肝组织Ishak评分、CVF均显著降低,提示Wog可作为改善肝硬化大鼠肝纤维化的潜在药物。

Hippo途径及其下游效应蛋白YAP首次在果蝇中发现,已被证明参与肺脏、肝脏、肾脏等多种器官纤维化疾病的进展^[17]。Hippo途径调节哺乳动物

表5 各组大鼠肝组织 α -SMA、TGF- β 1、p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Comparison of α -SMA, TGF- β 1, p-LATS1/LATS1, and p-YAP/YAP protein expression levels in liver tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	α -SMA/GAPDH	TGF- β 1/GAPDH	p-LATS1/LATS1	p-YAP/YAP
空白对照组	0.15 \pm 0.02	0.18 \pm 0.05	0.97 \pm 0.10	0.95 \pm 0.08
模型组	1.76 \pm 0.14 [#]	1.59 \pm 0.12 [#]	0.06 \pm 0.01 [#]	0.07 \pm 0.02 [#]
Wog低剂量组	1.34 \pm 0.11 ^{*#}	1.25 \pm 0.11 ^{*#}	0.28 \pm 0.05 ^{*#}	0.33 \pm 0.05 ^{*#}
Wog中剂量组	0.85 \pm 0.09 ^{*#&}	0.78 \pm 0.09 ^{*#&}	0.60 \pm 0.08 ^{*#&}	0.61 \pm 0.07 ^{*#&}
Wog高剂量组	0.46 \pm 0.06 ^{*#&@}	0.42 \pm 0.07 ^{*#&@}	0.94 \pm 0.09 ^{*#&@}	0.92 \pm 0.09 ^{*#&@}
阳性对照组	0.38 \pm 0.05 ^{*#&@}	0.36 \pm 0.06 ^{*#&@}	0.96 \pm 0.07 ^{*#&@}	0.93 \pm 0.10 ^{*#&@}

注:与空白对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与Wog低剂量组比较,[&] $P<0.05$;与Wog中剂量组比较,[@] $P<0.05$ 。

ste20样激酶(mammalian sterile 20-like kinase, MST)1/2和LATS1/2激酶级联反应,其中,磷酸化后激活的LATS1/2可在Ser-127或Ser-381位点磷酸化YAP,使YAP易位到细胞质,导致蛋白质降解^[18]。最近研究表明,YAP激活是体内和体外纤维化肝星状细胞激活的关键驱动因素,并且阻断Hippo途径和YAP激活可防止静止肝星状细胞转化为肌成纤维细胞^[19-20]。人脐带来源间充质基质细胞可通过调节Hippo/YAP信号通路,改善四氯化碳诱导的肝硬化小鼠的肝功能,缓解小鼠肝硬化^[21]。本研究中,肝硬化大鼠肝组织中p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP表达显著降低,而不同剂量Wog均可显著升高p-LATS1/LATS1、p-YAP/YAP表达,提示Wog可通过抑制Hippo/YAP信号通路改善肝硬化大鼠肝纤维化。

综上所述,Wog可改善肝硬化大鼠肝纤维化,其作用机制可能与抑制Hippo/YAP信号通路有关。本研究可为改善肝硬化肝纤维化进程提供新的药物参考。Wog具有广泛的生物活性,改善肝硬化肝纤维化的作用是否涉及到其他途径仍有待进一步的研究。

参考文献

- BAUMGARTNER K, COOPER J, SMITH A, et al. Liver disease: Cirrhosis[J]. *FP Essentials*, 2021, 511: 36-43.
- ROEHLEN N, CROUCHET E, BAUMERT T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.
- TULI H S, RATH P, CHAUHAN A, et al. Wogonin, as a potent anticancer compound: From chemistry to cellular interactions[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2023, 248(9): 820-828.
- ZHENG Z C, ZHU W, LEI L, et al. Wogonin ameliorates renal inflammation and fibrosis by inhibiting NF- κ B and TGF- β 1/Smad3 signaling pathways in diabetic nephropathy[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2020, 14: 4135-4148.
- DU X S, LI H D, YANG X J, et al. Wogonin attenuates liver fibrosis via regulating hepatic stellate cell activation and apoptosis[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 75: 105671.
- LI Y L, KANG X M, ZHOU Z W, et al. The m6A methyltransferase Mettl3 deficiency attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30 (12): 3714-3728.
- WU K Y, TENG M, ZHOU W, et al. Wogonin induces cell cycle arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by activating hippo signaling[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2022, 22(8): 1551-1560.
- 刘露, 刘占奎, 吴雪, 等. 狼毒大戟调节AGE-RAGE信号通路对肝硬化大鼠炎症反应和纤维化的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(15): 3800-3804.
- 翟浩宇, 曹欢, 杨柳, 等. 血红素加氧酶1(HO-1)修饰的大鼠骨髓间充质干细胞对肝硬化大鼠T淋巴细胞亚群的影响[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2020, 40(6): 444-452.
- HAMMERICH L, TACKE F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2023, 20(10): 633-646.
- HUANG D Q, TERRAULT N A, TACKE F, et al. Global epidemiology of cirrhosis-aetiology, trends and predictions[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2023, 20(6): 388-398.
- 张旭东, 任桂灵, 陈慧慧, 等. 汉黄芩素调控TLR4/MAPK/NF- κ B信号通路对糖尿病肾病大鼠肾纤维化的影响[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(10): 1840-1846.
- MENG X M, REN G L, GAO L, et al. Anti-fibrotic effect of wogonin in renal tubular epithelial cells via Smad3-dependent mechanisms[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2016, 789: 134-143.
- 冯志刚, 李涛, 赵冰清, 等. 复方鳖甲软肝片联合恩替卡韦对乙型肝炎肝硬化失代偿期患者疗效、肝功能、免疫功能影响研究[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(1): 184-187.
- XIAO Z, JI Q, FU Y D, et al. Amygdalin ameliorates liver fibrosis through inhibiting activation of TGF- β /smad signaling[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2023, 29(4): 316-324.
- LI H, LIANG C, KUANG D L, et al. The impact of drug-eluting bead (vs. conventional) transarterial chemoembolization on hepatic fibrosis in treating intermediate or advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2023, 24(1): 2166335.
- MIA M M, SINGH M K. New insights into hippo/YAP signaling in fibrotic diseases[J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2065.
- SHEN H Y, HUANG X, ZHAO Y H, et al. The Hippo pathway links adipocyte plasticity to adipose tissue fibrosis[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6030.
- KITSUGI K, NORITAKE H, MATSUMOTO M, et al. Arg-Gly-Asp-binding integrins activate hepatic stellate cells via the hippo signaling pathway[J]. *Cellular Signalling*, 2022, 99: 110437.
- XIANG D J, ZOU J, ZHU X Y, et al. Physalin D attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by blocking TGF- β /Smad and YAP signaling[J]. *Phytomedicine*, 2020, 78: 153294.
- YAO L C, HU X, YUAN M Q, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells alleviate liver cirrhosis through the Hippo/YAP/Id1 pathway and macrophage-dependent mechanism[J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 123: 110456.