

YAP调控Notch信号通路影响小鼠NASH肝纤维化的机制及 慈菇消脂方的干预作用

王莉¹, 王兴胜², 赵秀萍¹, 王爱娣¹, 屈红梅², 马燕花¹

(1. 甘肃中医药大学第一临床医学院消化内科, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学第三附属医院·白银市第一人民医院消化二部, 甘肃 白银 730900)

摘要 **目的** 探讨Yes相关蛋白(YAP)调控Notch信号通路影响非酒精性脂肪性肝炎(NASH)肝纤维化的机制及解毒化痰法中药慈菇消脂方的干预作用。**方法** 将小鼠随机分为正常组、NASH肝纤维化模型组、维替泊芬(VP)组、VP+中药低剂量组、VP+中药高剂量组和DMSO对照组。采用蛋氨酸-胆碱缺乏(MCD)饮食联合小剂量CCl₄建立小鼠NASH相关肝纤维化模型,采用HE、Masson染色观察肝脏纤维化程度,ELISA法检测肝纤维化四项,碱水法测定小鼠肝脏中羟脯氨酸含量,免疫组织化学法检测α-SMA、Col I、YAP、Notch1蛋白在肝脏中的定位,Western blotting及实时定量PCR检测Notch信号通路中Notch1/2、Jagged1和DLL4蛋白及mRNA表达。**结果** NASH肝纤维化组小鼠肝细胞肿胀、胞质透明,肝小叶、门管区以及窦周均存在明显纤维化,并伴有大量炎症细胞浸润及多量脂肪小滴,局部出现肝细胞坏死、溶解以及肝硬化;肝纤维化四项指标显著升高($P < 0.01$);肝细胞中α-SMA、Col I、YAP以及Notch1定位于细胞质中;肝脏中YAP、Notch1/2及Jagged1均呈高表达($P < 0.01$)。经VP及VP联合高、低剂量中药慈菇消脂方分别干预后,小鼠肝脏中YAP、Notch1/2及Jagged1均呈低表达($P < 0.05$),DLL4因子在VP联合中药高剂量组上调($P < 0.05$)。**结论** YAP可能通过下调Notch1/2、Jagged1及上调DLL4,抑制Notch通路活化,干预NASH肝纤维化发生。中药慈菇消脂方通过多成分、多靶点下调YAP、Notch1/2、Jagged1、上调DLL4,抑制Notch信号通路活化,改善NASH肝纤维化进展。

关键词 非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化; Yes相关蛋白; Notch信号通路; 慈菇消脂方

中图分类号 R259 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2024)05-0392-09

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240511.1131.018>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2024.05.002

Mechanism of Notch signaling pathway regulated by YAP in NASH liver fibrosis mice and the intervention effect of Cigu Xiaozhi prescription

WANG Li¹, WANG Xingsheng², ZHAO Xiuping¹, WANG Aidi¹, QU Hongmei², MA Yanhua¹

(1. Department of Gastroenterology, The First Clinical College of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. The Second Department of Gastroenterology, The Third Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine · The First People's Hospital of Baiyin, Baiyin 730900, China)

Abstract Objective To investigate the regulatory mechanism of Notch signaling pathway by YAP in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver fibrosis, and assess the intervention effect of Cigu Xiaozhi prescription in detoxification and phlegm treatment.

Methods C57BL/6J mice were randomly divided into different groups, including a normal group, NASH liver fibrosis model group, verteporfin (VP) intervention group, VP + Chinese medicine (Cigu Xiaozhi prescription) low-dose group, VP + Chinese medicine high-dose group, and dimethyl sulfoxide control group. The methionine/choline-deficient diet combined with low-dose CCl₄ was used to construct the NASH liver fibrosis model. The degree of liver fibrosis was evaluated using hematoxylin and eosin (HE) and Masson staining. Four protein factors associated with liver fibrosis were detected using enzyme-linked immunosorbent assay, and hydroxyproline levels in the mouse liver was determined using the alkaline water method. The localization of α-SMA, Col I, YAP, and Notch1 proteins in the liver was determined using immunohistochemistry. Additionally, the mRNA and protein expression levels of the Notch signaling pathway molecules, namely Notch1/2, Jagged1, and DLL4, were assessed using real-time quantitative PCR and Western blotting analyses, respectively. **Results** The HE and Masson staining results revealed that the liver cells of NASH liver fibrosis mice were swollen and the cytoplasm was transparent.

基金项目: 国家自然科学基金地区基金(81860821); 甘肃省科技计划(23JDKD0001); 甘肃中医药大学第一临床医学院2021年度研究生创新基金(LCCX2021001)

作者简介: 王莉(1992-), 女, 医师, 硕士。

通信作者: 马燕花, E-mail: 617747928@qq.com

收稿日期: 2023-06-13

网络出版时间: 2024-05-14 14:55:05

Additionally, evident fibrosis was observed in the hepatic lobule, portal area, and sinus; it was accompanied by heightened levels of inflammatory cell infiltration, a large number of fat droplets, and instances of local hepatocyte necrosis, dissolution, and cirrhosis. The four factors associated with liver fibrosis showed a substantial increase ($P < 0.01$). α -SMA, Col I, YAP, and Notch1 were localized in the cytoplasm of hepatocytes. YAP, Notch1/2, and Jagged1 were highly expressed in the liver ($P < 0.01$) but were downregulated after intervention with VP and VP + high and low doses of Cigu Xiaozhi prescription ($P < 0.05$). Meanwhile, DLL4 factor was upregulated in the VP + high-dose of Cigu Xiaozhi prescription group ($P < 0.05$). **Conclusion** YAP may inhibit activation of the Notch pathway by downregulating Notch1/2 and Jagged1 and upregulating DLL4, thereby interfering with the occurrence of liver fibrosis in NASH. Treatment with Cigu Xiaozhi prescription may inhibit Notch signaling pathway activation by downregulating YAP, Notch1/2, and Jagged1 and upregulating DLL4 through its multi-components and multi-targets properties, ultimately slow the progression of liver fibrosis in NASH.

Keywords non-alcoholic steatohepatitis liver fibrosis; Yes-associated protein; Notch signaling pathway; Cigu Xiaozhi prescription

非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 是一类除酒精因素引起的以肝细胞损伤、肝脂肪变性、炎症细胞浸润乃至纤维化为特征的疾病,可发展为肝纤维化、肝硬化、肝细胞癌和肝衰竭^[1-2]。肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 产生的富含 I 型胶原的细胞外基质沉积是造成 NASH 肝纤维化或肝硬化的主要原因^[3]。在肝脏发育过程中,Notch 信号通常处于休眠状态,但在肥胖和 NASH 时作为一种促进纤维化发展的适应不良修复信号被异常激活^[4]。研究^[5]发现, Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 在肝纤维化 HSC 及肌成纤维细胞中存在显著的核累积。在人肝细胞癌中,配体 Jagged1 被确定为 YAP 下游的直接靶点,有助于肿瘤中 Notch 信号的高活性^[6]。YAP/TEAD 可直接控制肝脏再生中 Notch2 受体的表达调节信号转导。因此, YAP 与 Notch 信号通路在 NASH 肝纤维化中的作用尤为重要。慈菇消脂方是以山慈菇为君药的中药复方,中药慈菇消脂丸具有治疗脂肪肝、抗炎、抗纤维化等功效^[7-8]。因此,本研究拟探讨 YAP 因子对 NASH 肝纤维化 Notch 信号通路的影响,以及中药慈菇消脂方在防治 NASH 肝纤维化中的作用,旨在为治疗 NASH 肝纤维化提供理论基础和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:健康雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,7 周龄,体重 (20 ± 2) g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,动物许可证号 SCXK (京) 2019-0010。小鼠饲养于甘肃中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障环境中。本研究获得甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准 [SYXK (甘) 2021-198]。

1.1.2 中药慈菇消脂方:药物购自甘肃中医药大学附属医院药房,经杨锡仓主任药师鉴定。中药慈菇消脂方由山慈菇 10 g,柴胡 12 g,丹参 20 g,土鳖虫 20 g,薏苡仁 30 g,黄芩 10 g,泽泻 15 g,枸杞 20 g,生山楂 20 g,法半夏 15 g 等 14 味中药组成。前期急性毒理学研究结果显示,慈菇消脂方对小鼠灌胃给药的最大可给药量为 18.4 g/kg,为临床成人用量的 122.7 倍,说明本品毒性较低。

1.1.3 试剂:anti-YAP 抗体 (ab205270)、anti-Notch1 抗体 (ab52627) 购自美国 Abcam 公司;anti-Notch2 抗体 (D76A6) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司;anti-Jagged1 抗体 (T55726) 购自中国 Abmart 公司;anti-DLL4 抗体 (21584-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司;纤维胶原蛋白 I (collagen I, Col I) 抗体 (bs-5078R) 购自北京博奥森生物技术有限公司;anti- β -actin 抗体 (YM3028)、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (YM3365) 购自美国 Immunoway 公司。维替泊芬 (verteporfin, VP) (A8327) 购自美国 APEX BIO 公司;酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自江苏酶免实业有限公司。MolPure[®] Cell/Tissue Total RNA Kit (19221ES50) 购自上海翊圣生物科技有限公司。PCR 引物由北京博迈德基因技术有限公司合成。

1.1.4 实验仪器:化学发光成像仪 (MiniChemi 610) 购自北京赛智科技有限公司。酶标仪 (iMark) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 NASH 肝纤维化小鼠模型构建:NASH 肝纤维化小鼠模型造模方法参照文献 [9],给予蛋氨酸-胆碱缺乏 (methionine and choline deficient, MCD) 饮食

12周+小剂量CCl₄腹腔注射6周,诱导NASH肝纤维化模型。根据肝腺泡3区纤维化、肝小叶内纤维化、门静脉周围纤维化、中央静脉周围纤维化、桥接纤维化的程度及肝硬化,可将NASH分为4期^[10],分别为S1期(局灶性或广泛性肝腺泡3区、窦周纤维化),S2期(S1期病变+局灶性或广泛性门静脉周围纤维化),S3期(S2期病变+局限性或广泛性桥接纤维化),S4期(弥漫性肝纤维化+肝假小叶,包括肝硬化合并NASH、隐匿性肝硬化及脂肪性肝硬化)。

1.2.2 慈菇消脂方给药剂量:参照药理实验方法学、中药药理学研究方法^[11]及课题组前期经验,按照人-小鼠体表面积换算系数(9.1)计算小鼠等效剂量,成人用药量的9.1倍作为中药高剂量组,成人用药量的4.55倍作为中药低剂量组,灌胃体积均为0.2 mL/10 g。

1.2.3 动物分组及给药:SPF级C57BL/6J小鼠60只,按随机数字表法分为正常组、NASH肝纤维化模型组、VP干预组、VP+中药高剂量组、VP+中药低剂量组及DMSO对照组6组,每组8只。(1)正常组:标准饲料+生理盐水10 mL/kg灌服,1次/d。(2)模型组:MCD饮食12周+CCl₄腹腔注射6周(10 μL/10 g),2次/周。(3)VP组:造模第7周初尾静脉注射VP(5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)6周,1次/3 d。(4)(5)VP+中药高、低剂量组:造模第7周初尾静脉注射VP同时给予中药慈菇消脂方高剂量(32.76 g·kg⁻¹·d⁻¹)、低剂量(16.38 g·kg⁻¹·d⁻¹)干预治疗6周,1次/3 d。(6)DMSO对照组:造模第7周初尾静脉注射2%DMSO溶液(体积同VP组)持续6周,1次/3 d。

于12周末,小鼠禁食24 h,次日10%水合氯醛腹腔注射麻醉,迅速取出肝脏。取部分肝脏置于4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋;其余肝脏经冷生理盐水清洗后铝箔包裹置于液氮内速冻,-80℃冰箱冻存。

1.2.4 小鼠肝脏指数计算:各组小鼠末次给药后禁食24 h,脱颈处死,取出肝脏组织并称重,计算肝脏指数(%)=肝脏平均重量/体重×100。

1.2.5 肝脏组织学分析:4%中性甲醛固定小鼠肝脏,石蜡包埋,制5 μm厚切片,HE、Masson染色,显微镜下观察肝组织病理形态,并用Olympus BX43+sc50型显微成像系统分析图片,观察肝组织纤维化程度,计算肝组织纤维化水平(%)=Masson蓝染色面积/总面积×100。

1.2.6 ELISA:称取小鼠肝脏组织1 g,加入PBS并充分匀浆,离心后收集上清。根据ELISA试剂盒说明书检测肝纤维化四项指标(PC III、Col IV、LN、HA)。所有检测均重复进行,读数与使用试剂盒提供的标准蛋白构建的标准曲线进行比较。

1.2.7 肝脏羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)含量检测:称量80 mg组织并水解,调节水解产物pH6.0~6.8。加入蒸馏水至最终体积为10 mL/管,并充分混合。取约3~4 mL溶液,加入20~30 mg活性炭并充分混合,3 500 r/min离心10 min。按照试剂盒说明书制备测试溶液、空白管和标准管。测定550 nm波长处的吸光度,并计算肝脏中Hyp的含量。

1.2.8 免疫组织化学法分析α-SMA、Col I、Notch1和YAP在NASH肝纤维化中的定位:石蜡载玻片二甲苯脱蜡,分级乙醇水化,75℃焙烧2 h后在去离子水中再水化。室温下用3% H₂O₂孵育10 min。37℃下用山羊血清孵育30 min。用柠檬酸钠溶液(pH 8.0)热法提取抗原。加入抗α-SMA、抗Col I、抗YAP及抗Notch1抗体(稀释1:200),4℃孵育过夜。加入酶标抗兔IgG作为二抗。DAB染色,苏木精染色。

1.2.9 Western blotting检测:取约100 mg肝组织,RIPA裂解并匀浆,离心后收集上清。BAC法测定蛋白浓度。蛋白上样后10% SDS-PAGE电泳分离、转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h。加入Notch2、Jagged1、DLL4以及β-actin一抗(稀释1:1 000),4℃孵育过夜。TBST清洗3次,加入相应二抗孵育2 h。ECL化学发光,凝胶成像系统成像,并使用Image J 1.53 e软件进行分析。

1.2.10 实时定量PCR检测:肝组织匀浆后,经TRIzol试剂提取、纯化总RNA及cDNA逆转录后,采用实时定量PCR检测α-SMA、Col I、YAP、Notch1/2、Jagged1及DLL4 mRNA的相对表达量。PCR反应体系:cDNA模板1 μL、Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox) 5 μL、正向/反向引物各0.2 μL、ddH₂O 3.6 μL。PCR反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性10 s,60℃退火/延伸30 s,共40个循环。记录各组样品Ct值,以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算目标基因的相对表达量,并以空白对照组作为参照,计算各组目标基因mRNA的相对表达量。引物序列及产物长度见表1。

1.3 统计学分析

采用Graphpad prism 6.0和SPSS 18.0软件进行统

表1 PCR引物序列
Tab.1 PCR primer sequences

Gene	Primer sequence (5'-3')	Length of product (bp)
<i>GAPDH</i>		183
F	GGTTGTCTCTGCGACTTCA	
R	TGGTCCAGGTTTCTTACTCC	
<i>YAP</i>		292
F	CCATAAGAACAAGACCACATCC	
R	TCCATCCTGCTCCAGTGTAG	
<i>Notch1</i>		299
F	GATGATGTCGCTGGATAC	
R	TCACTCTCACAGTTGCC	
<i>Notch2</i>		295
F	TGATGAGTGTATCTCCAAGCC	
R	GGTGTAAGTGTGACATAGTCGG	
<i>Jagged1</i>		200
F	TGTGGACTCATCAGCC	
R	CAGCCTCCAGAACACTCAC	
<i>DLL4</i>		225
F	ACCAACTCCTTCGTCGTCAG	
R	TTGCTCGTTGTTCCGCC	
<i>Col I</i>		
F	CTCGTGGATTGCCTGGAAC	
R	ACAGCACCATCGTTACCGC	
α -SMA		210
F	TGCTGTGCCACAATGCC	
R	TGCTGATGATGCCGTGTTT	

计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用GraphPad Prism 9.0软件进行绘图。

2 结果

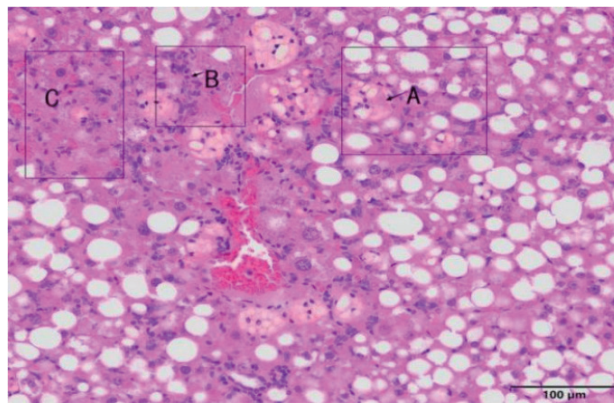
2.1 各组小鼠肝脏指数比较

与正常组小鼠肝脏指数(0.0421 ± 0.0027)比较,模型组(0.0562 ± 0.0087)明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,VP组(0.0493 ± 0.0017 , $P < 0.05$)、VP+中药高剂量组(0.0444 ± 0.0005 , $P < 0.01$)、VP+中药低剂量组(0.0484 ± 0.0028 , $P < 0.01$)肝脏指数显著降低。

2.2 各组小鼠肝脂肪变性、炎症及纤维化情况比较

造模第4、6、10、12周时,动态观察肝组织纤维化病变,HE、Masson染色结果(图1)显示,随造模时间延长,肝细胞脂肪变性逐渐加重、出现多量脂肪

小滴,并伴有炎症细胞(淋巴细胞和中性粒细胞)浸润及纤维组织增生;造模后期局部出现肝细胞坏死、溶解,甚至肝硬化等表现(S4期)。



A, steatosis and fat droplets; B, hepatocyte necrosis, lysis, and inflammatory cell infiltration; C, fibrosis, liver cirrhosis.

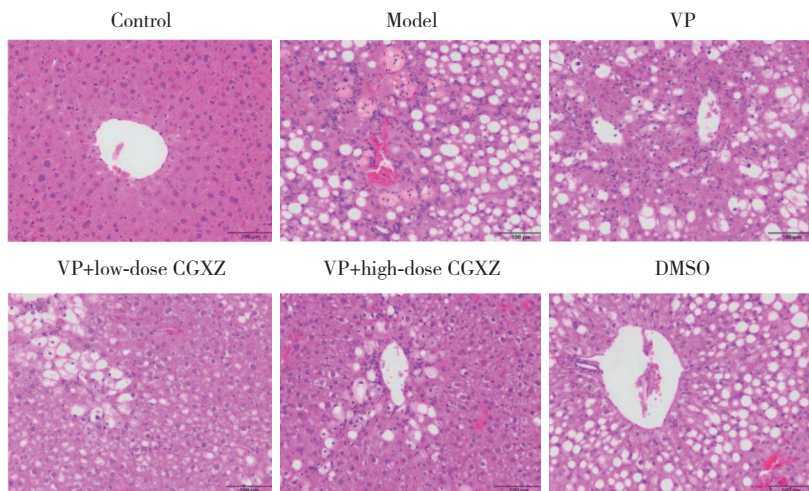
图1 NASH肝纤维化小鼠肝组织HE染色 $\times 100$

Fig.1 HE staining of liver tissue from mice with NASH liver fibrosis $\times 100$

2.2.1 肝组织HE染色(图2):正常组肝组织结构完整,肝索排列整齐,肝细胞及肝巨噬细胞形态正常。模型组小鼠肝细胞肿胀明显、胞质透明,肝小叶、门管区及窦周纤维结缔组织弥漫性增生,伴炎症细胞浸润、脂肪变性。与模型组比较,VP组、VP+中药低、高剂量组肝纤维化及脂肪变性均明显改善,基本无脂肪滴存在。其中,VP联合中药复方的治疗效果较为显著,脂肪变性明显减少。因采用2%DMSO溶解VP粉末,故DMSO组作为VP组的对照组,肝纤维化与脂肪变性仍存在,但无大片的肝细胞坏死、肝硬化等严重的病理发生,因此认为2%DMSO溶液对肝脏的毒性较小,不影响实验结果。

2.2.2 肝组织Masson染色(图3):造模第10、12周,模型组肝组织肝小叶、门静脉区以及窦周均存在明显的纤维化。计算第12周模型组小鼠的胶原纤维面积比约为40%,显著高于正常组($P < 0.05$),表明模型组小鼠肝脏发生了明显的纤维化病变。Masson染色显示,与正常组比较,模型组小鼠肝脂肪变性且存在弥漫性胶原纤维;与模型组相比,VP+中药高剂量组基本无纤维增生,VP组及VP+中药低剂量组肝细胞间质仍存在少量纤维结缔组织增生。DMSO对照组相较于VP组有广泛性胶原纤维。

综上所述,本研究于第12周末成功建立了小鼠



VP, verteporfin; CGXZ, Cigu Xiaozhi prescription.

图2 各组小鼠肝脏组织HE染色 × 200

Fig.2 HE staining of liver tissue in each group × 200

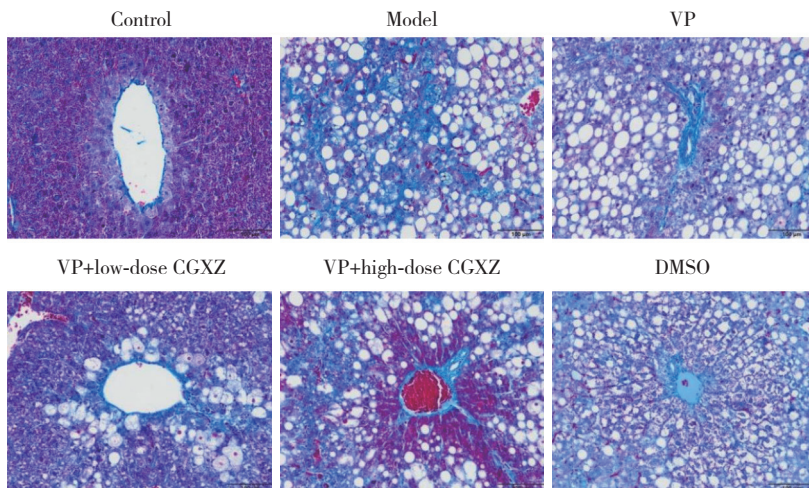


图3 各组小鼠肝脏组织Masson染色 × 200

Fig.3 Masson staining of liver tissue in each group × 200

NASH肝纤维化模型。其中,1~6周单纯MCD饮食导致小鼠肝细胞大量脂肪变性、胞质内充满了脂肪小滴;7~12周加用小剂量CCl₄后,肝细胞逐渐出现弥漫性胶原纤维增生。VP及VP+中药慈菇消脂方联合用药均明显改善NASH肝纤维化小鼠的肝组织病理损伤,且VP与慈菇消脂方的联合用药对NASH肝纤维化的治疗效果更为显著。

2.3 各组小鼠肝纤维化指标比较(表2)

与正常组比较,模型组小鼠肝纤维化四项指标PC III、Col IV、LN和HA水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,VP组及VP+中药慈菇消脂方组小鼠肝脏中PC III、Col IV、LN和HA水平均显著降低($P < 0.01$)。

2.4 各组小鼠肝脏Hyp含量比较

碱性水解法测定小鼠肝脏中Hyp含量,结果显示,与正常组(0.1058 ± 0.0030)相比,模型组肝脏Hyp含量(0.2865 ± 0.0016)明显升高($P < 0.01$)。与模型组相比,VP组(0.1507 ± 0.0201)及VP+中药低剂量、高剂量组($0.0782 \pm 0.0012, 0.1867 \pm 0.0021$)Hyp含量明显降低($P < 0.01$)。

2.5 各组小鼠肝组织中α-SMA、Col I、Notch1蛋白表达情况比较

2.5.1 α-SMA、Col I (图4~5):免疫组织化学染色结果显示,α-SMA、Col I蛋白表达主要定位于肝细胞质中。与正常组比较,模型组肝组织中α-SMA、Col I表达增加;与模型组比较,VP组及VP+中药高、低剂

表2 各组小鼠纤维化指标比较 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)
 Tab.2 Comparison of fibrosis indicators in each group ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

Group	PC III	Col IV	LN	HA
Control	4.399 1 \pm 0.257 1	53.530 4 \pm 2.302 8	401.322 8 \pm 9.179 6	61.008 7 \pm 2.472 7
Model	7.967 3 \pm 0.197 1 ¹⁾	88.073 8 \pm 1.726 7 ¹⁾	579.365 1 \pm 17.872 3 ¹⁾	94.792 5 \pm 1.967 2 ¹⁾
VP	5.314 8 \pm 0.590 0 ²⁾	64.683 8 \pm 3.612 7 ²⁾	412.169 3 \pm 20.083 8 ²⁾	68.634 2 \pm 5.466 4 ²⁾
VP+ low-dose CGXZ	5.671 7 \pm 0.106 6 ²⁾	72.324 4 \pm 3.953 1 ²⁾	520.899 5 \pm 30.329 6 ²⁾	88.180 5 \pm 4.281 0 ²⁾
VP+ high-dose CGXZ	5.463 2 \pm 0.202 8 ²⁾	70.538 6 \pm 3.676 9 ²⁾	472.486 8 \pm 21.126 ²⁾	68.827 2 \pm 4.178 2 ²⁾

1) $P < 0.01$ vs. control group; 2) $P < 0.01$ vs. model group.

量组表达明显减少,且VP+中药高剂量组尤为显著。
 2.5.2 YAP、Notch1 (图6~7):与正常组比较,模型组小鼠肝脏中YAP、Notch1蛋白明显沉积、着色加深,细胞核中YAP沉积尤为明显。与模型比较,VP组以及VP+中药高、低剂量组肝脏中YAP、Notch1的着色

显著减少,其中以VP+中药高剂量组减少更为显著。
 2.6 YAP及慈菇消脂方干预NASH肝纤维化后Notch信号通路蛋白的表达

Western blotting结果(表3、图8)显示,与正常组比较,模型组肝组织中Notch2、Jagged1蛋白呈高表

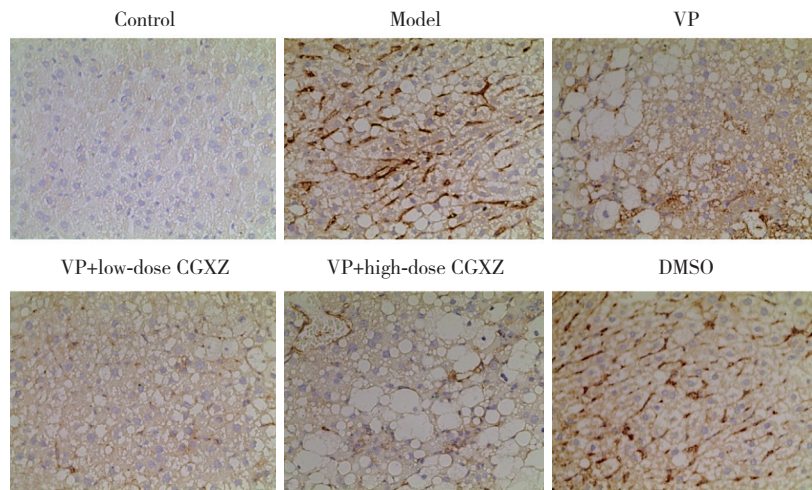


图4 各组小鼠肝脏组织中 α -SMA免疫组织化学染色 $\times 200$

Fig.4 α -SMA immunohistochemical staining in liver tissue of mice in each group $\times 200$

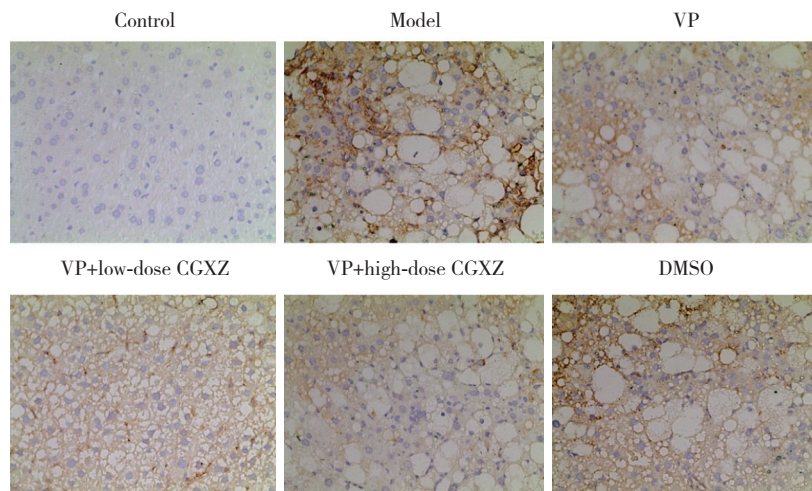


图5 各组小鼠肝脏组织中Col I免疫组织化学染色 $\times 200$

Fig.5 Immunohistochemical staining of Col I in liver tissue of mice in each group $\times 200$

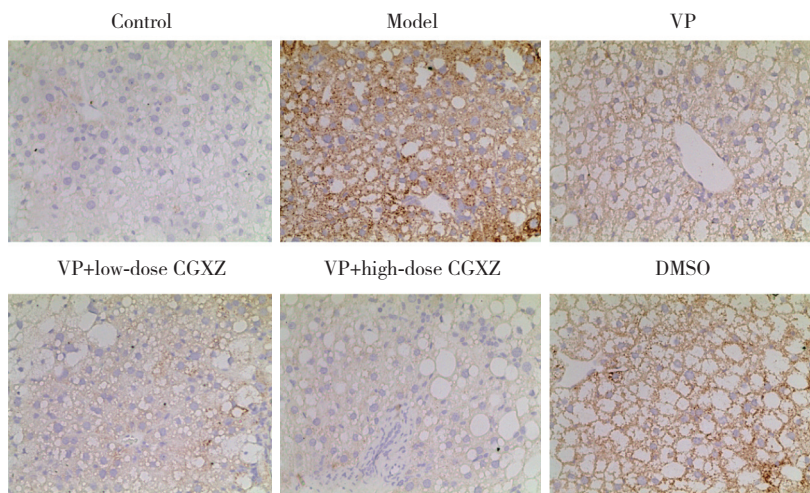


图6 各组小鼠肝脏组织中Notch1免疫组织化学染色 × 200

Fig.6 Notch1 immunohistochemical staining in liver tissue of mice in each group × 200

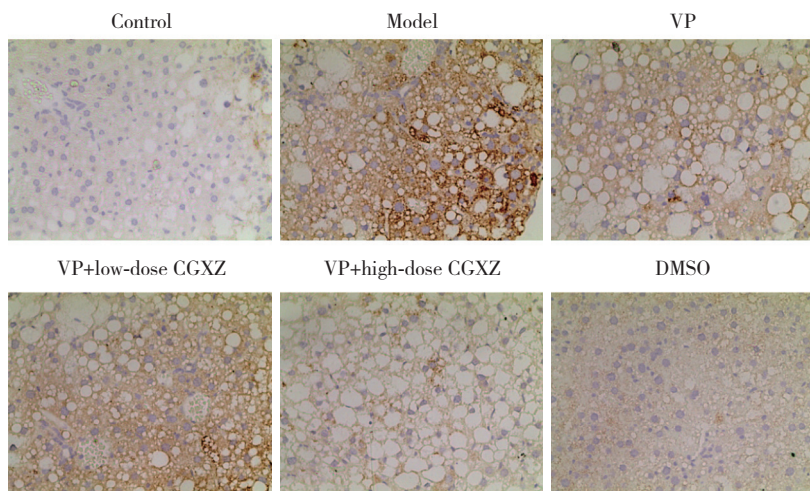


图7 各组小鼠肝脏组织中YAP免疫组织化学染色 × 200

Fig.7 YAP immunohistochemical staining in liver tissues of mice in each group × 200

达 ($P < 0.05$), DLL4蛋白表达无显著差异。与模型组比较, VP组 ($P < 0.05$) 及VP+中药高、低剂量组 ($P < 0.01$) Notch2蛋白均呈低表达; VP+中药高、低剂量组 ($P < 0.05$) Jagged1蛋白低表达, VP组无显著差异;

VP+中药高剂量组DLL4蛋白呈高表达 ($P < 0.05$)。

2.7 各组小鼠肝组织中Notch通路相关因子mRNA的表达情况 (表4)

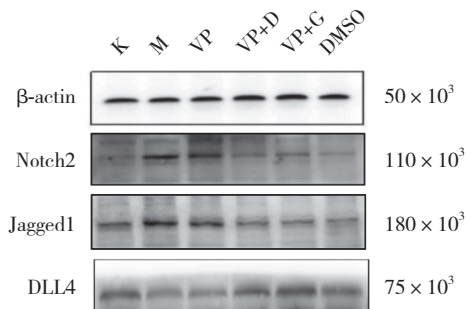
实时定量PCR检测结果显示, 与正常组比较,

表3 各组小鼠肝组织中Notch2、Jagged1及DLL4蛋白表达情况

Tab.3 Protein expressions of Notch2, Jagged1 and DLL4 in liver tissue of mice

Group	Notch2	Jagged1	DLL4
Control	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Model	1.37 ± 0.15 ¹⁾	2.37 ± 0.65 ¹⁾	0.62 ± 0.24
VP	0.93 ± 0.19 ²⁾	1.88 ± 0.69	0.92 ± 0.51
VP+ low-dose CGXZ	0.57 ± 0.29 ³⁾	1.32 ± 0.52 ²⁾	0.97 ± 0.29
VP+ high-dose CGXZ	0.47 ± 0.17 ³⁾	1.36 ± 0.65 ²⁾	1.19 ± 0.20 ²⁾
DMSO	0.65 ± 0.28	1.42 ± 0.57	0.70 ± 0.20

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.05$ vs. model group; 3) $P < 0.01$ vs. model group.



K, control; M, NASH liver fibrosis model group; VP, VP intervention; VP+D, VP+low-dose CGXZ; VP+G, VP+high-dose CGXZ; DMSO, DMSO control.

图8 Western blotting结果

Fig.8 Results of Western blotting

模型组中 α -SMA、Col I、YAP以及Notch1/2、Jagged1 mRNA均呈高表达 ($P < 0.01$), DLL4 mRNA无明显变化 ($P > 0.05$)。与模型组比较, VP组及VP+中药高、

低剂量组中 α -SMA、Col I、YAP、Notch1/2及Jagged1 mRNA均下调 (均 $P < 0.05$)。此外, 与模型组比较, DLL4 mRNA仅在VP+中药高剂量组呈高表达 ($P < 0.01$), 其他干预组中无明显差异 ($P > 0.05$)。上述结果均与Western blotting及免疫组织化学检测结果基本一致。

3 讨论

NASH肝纤维化的发生、发展是一个多信号通路调控的复杂过程, Hedgehog、TGF- β /Smad、Notch、Hippo-YAP/TAZ、Wnt/ β -catenin等通路以及一系列细胞因子之间形成复杂的交互网络, 共同影响肝纤维化的发生与发展^[12-13]。因此, 目前认为联合具有不同但互补作用机制的疗法是提高疗效、减缓疾病进展甚至逆转NASH的最佳途径。

表4 各组小鼠肝组织中Notch通路相关因子mRNA表达情况

Tab.4 mRNA expression of Notch pathway-related factors in liver tissue of mice in each group

Group	Col I	α -SMA	YAP	Notch1	Notch2	Jagged1	DLL4
Control	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
Model	2.600 ± 0.246 ¹⁾	1.285 ± 0.178 ¹⁾	2.282 ± 0.196 ¹⁾	1.485 ± 0.010 ¹⁾	3.958 ± 0.139 ¹⁾	3.051 ± 0.125 ¹⁾	0.936 ± 0.140
VP	1.682 ± 0.122 ²⁾	0.593 ± 0.098 ²⁾	1.853 ± 0.152 ³⁾	1.243 ± 0.032 ³⁾	2.839 ± 0.422 ²⁾	1.323 ± 0.217 ²⁾	0.990 ± 0.404
VP+low-dose CGXZ	0.799 ± 0.014 ²⁾	0.118 ± 0.009 ²⁾	0.803 ± 0.009 ²⁾	0.582 ± 0.060 ²⁾	0.539 ± 0.155 ²⁾	0.881 ± 0.194 ²⁾	2.399 ± 0.252
VP+high-dose CGXZ	0.725 ± 0.098 ²⁾	0.470 ± 0.029 ²⁾	1.178 ± 0.019 ²⁾	0.223 ± 0.039 ²⁾	0.451 ± 0.065 ²⁾	0.838 ± 0.043 ²⁾	6.753 ± 0.905 ²⁾
DMSO	2.700 ± 0.444	0.829 ± 0.104	1.978 ± 0.643	1.199 ± 0.066	3.856 ± 0.534	1.700 ± 0.278	1.268 ± 0.249

1) $P < 0.05$ vs. control group; 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.05$ vs. model group.

研究^[14]表明, HSC的转分化(或激活)是纤维化的主要驱动因素。 α -SMA作为HSC活化标志物, Col I的沉积及肝纤维化四项均可反映肝脏纤维化病变程度。本研究分别采用ELISA法检测肝纤维化四项, 碱水法检测肝组织中Hyp含量, 免疫组织化学染色观察 α -SMA、Col I在肝组织中的表达定位。结果显示, NASH肝纤维化模型小鼠肝脏中Hyp含量、肝纤维化四项指标均明显升高, 胞质中 α -SMA与Col I染色显著增加, 表明 α -SMA高表达及Col I显著沉积使HSC大量激活与增殖, 模型小鼠肝脏发生了显著的肝纤维化病变。为进一步研究YAP在NASH肝纤维化中的相关机制, 通过尾静脉注射药物VP特异性阻断YAP的表达, 结果发现, 抑制YAP表达后, 肝脏中 α -SMA、Col I表达明显下调, 肝纤维化四

项及Hyp含量显著减少, 肝纤维化程度减轻; 因此, 推测Hippo通路的下游调控因子YAP可能通过上调 α -SMA及Col I表达激活HSC, 促进NASH肝纤维化发生、发展。

本研究还发现, 模型组小鼠肝脏中YAP、Notch1明显沉积, YAP在细胞核中沉积尤为明显, 抑制YAP表达后, Notch1蛋白受体呈现同样的下调趋势。为进一步探索YAP对Notch信号通路的影响及慈菇消脂方对NASH肝纤维化的干预作用, 本研究采用Western blotting、实时定量PCR检测了Notch通路中相关蛋白及mRNA的表达, 同时设置了不同浓度的中药干预组, 结果显示, VP药物有效抑制YAP因子表达后, α -SMA、Col I蛋白表达下调, Notch信号通路蛋白Notch1/2、Jagged1表达下调, DLL4表达上调, 抑制

Notch信号通路活化干预NASH肝纤维化的发生、发展。

基于中医理论基础,认为痰湿、浊脂(毒)在NASH肝纤维化的发病机制中起关键作用,而慈菇消脂方的整体处方以解痰降浊脂为主。中药慈菇消脂方属于复方制剂,具有多成分、多靶点作用,NASH肝纤维化小鼠经中药慈菇消脂方干预6周后,肝组织中 α -SMA、Col I 沉积显著减少,肝纤维化四项指标及Hyp含量明显降低,HE与Masson染色显示肝纤维化程度减轻,证明了慈菇消脂方在治疗NASH肝纤维化方面的确切疗效。同时,Western blotting与实时定量PCR检测结果也同样证明了中药方慈菇消脂方的多靶点作用。因此,推测中药慈菇消脂方可能通过减少 α -SMA及Col I 的沉积抑制HSC活化,从而发挥抗纤维化作用;同时,下调YAP及Notch信号通路相关蛋白的表达,从而干预NASH肝纤维化。此外,本研究还发现VP联合中药慈菇消脂方后治疗效果更佳。

综上所述,抑制YAP可调控Notch信号通路相关蛋白,下调Notch1/2、Jagged1,上调DLL4,抑制Notch信号通路活化,干预NASH肝纤维化发生。以解毒、化痰法组方的中药慈菇消脂方通过多成分、多靶点下调YAP、Notch1/2、Jagged1,上调DLL4表达,抑制Notch信号通路活化,改善NASH肝纤维化进展。

参考文献:

- [1] ZHOU JH,ZHOU F,WANG WX,et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China [J]. *Hepatology*, 2020, 71 (5): 1851-1864. DOI: 10.1002/hep.31150.
- [2] 金虎,丁瑾,柳明江,等. 非酒精性脂肪性肝炎致病机制研究进展 [J]. *中华实验外科杂志*, 2020, 37 (9): 1761-1765. DOI: 10.3760/cma.j.cn421213-20200203-01047.
- [3] YOKOMIZO T, IDEUE T, MORINO-KOGA S, et al. Independent origins of fetal liver haematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Nature*, 2022, 609 (7928): 779-784. DOI: 10.1038/s41586-022-05203-0.
- [4] ZHU CY, HO YJ, SALOMAO MA, et al. Notch activity characterizes a common hepatocellular carcinoma subtype with unique molecular and clinicopathologic features [J]. *J Hepatol*, 2021, 74 (3): 613-626. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.09.032.
- [5] WU N, NGUYEN Q, WAN Y, et al. The Hippo signaling functions through the Notch signaling to regulate intrahepatic bile duct development in mammals [J]. *Lab Invest*, 2017, 97 (7): 843-853. DOI: 10.1038/labinvest.2017.29.
- [6] TSCHAHARGANEH DF, CHEN X, LATZKO P, et al. Yes-associated protein up-regulates jagged-1 and activates the NOTCH pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2013, 144 (7): 1530-1542.e12. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.02.009.
- [7] 马燕花, 师霞, 武燕, 等. 慈菇消脂丸含药血清对非酒精性脂肪肝细胞模型Caspase-8、FasL、p-c-Jun表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40 (1): 85-90. DOI: 10.7661/j.cjim.20191204.236.
- [8] 王莉, 马燕花, 赵秀萍, 等. 慈菇消脂丸含药血清对Hh信号通路相关miRNA的调控作用 [J]. *时珍国医国药*, 2022, 33 (10): 2305-2309. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2022.10.01.
- [9] ITAGAKI H, SHIMIZU K, MORIKAWA S, et al. Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6 (12): 2683-2696.
- [10] FRAILE JM, PALLIYIL S, BARELLE CJ, et al. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) -A review of a crowded clinical landscape, driven by a complex disease [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2021, 15: 3997-4009. DOI: 10.2147/DDDT.s315724.
- [11] 徐叔云. *药理实验方法学* [M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 238.
- [12] GRANNAS K, ARNGÅRDEN L, LÖNN P, et al. Crosstalk between hippo and TGF β : subcellular localization of YAP/TAZ/smad complexes [J]. *J Mol Biol*, 2015, 427 (21): 3407-3415. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.04.015.
- [13] XU XH, POULSEN KL, WU LJ, et al. Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis (NAFL/NASH) [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2022, 7: 287. DOI: 10.1038/s41392-022-01119-3.
- [14] WANG L, ZHANG ZL, LI MM, et al. P53-dependent induction of ferroptosis is required for artemether to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation [J]. *IUBMB Life*, 2019, 71 (1): 45-56. DOI: 10.1002/iub.1895.

(编辑 王又冬)