



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.08.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2018.08.010
Chinese Journal of General Surgery, 2018, 27(8):1014-1021.

· 基础研究 ·

紫杉醇对牛血清白蛋白诱导大鼠肝纤维化的抑制作用及机制

边虹铮, 刘丽芳

(河北化工医药职业技术学院 制药工程系, 河北 石家庄 050031)

摘要

目的: 探讨紫杉醇对牛血清白蛋白 (BSA) 诱导大鼠肝纤维化的抑制作用及机制。

方法: 用 BSA 诱导 Wistar 大鼠产生免疫性肝纤维化后, 分别通过尾静脉注射生理盐水 (模型组) 与 10 $\mu\text{g/g}$ 紫杉醇 (紫杉醇处理组), 另取 10 只正常大鼠以相同的方式注射生理盐水作为对照组。每天注射 1 次, 28 d 后处死大鼠获取血与肝组织标本, 行肝组织病理学观察, 检测血清肝功能生化指标与血清及肝组织胶原相关指标、肝组织 α -SMA、TGF- β 1 表达, 分离肝星状细胞 (HSC), 检测 HSC 中 TGF- β /Smad 信号通路相关分子的蛋白及 mRNA 的表达。

结果: 与对照组比较, 模型组出现明显的肝纤维化改变、血清转氨酶水平明显升高, 而白蛋白水平明显降低、血清与肝组织胶原相关指标明显升高、肝组织 α -SMA 与 TGF- β 1 表达率明显升高、HSC 中 TGF- β /Smad 信号通路相关分子的蛋白及 mRNA 明显上调 (均 $P < 0.05$)。紫杉醇处理组以上指标的变化程度均明显小于模型组 (均 $P < 0.05$), 且部分指标与对照组无明显差异 (部分 $P > 0.05$)。

结论: 紫杉醇对 BSA 诱导大鼠免疫性肝纤维化有抑制作用, 机制可能与其抑制 TGF- β /Smad 信号传导通路活化有关。

关键词

肝硬化; 紫杉醇; 转化生长因子 β ; 疾病模型, 动物; 大鼠
中图分类号: R657.3

Inhibitory effect of paclitaxel on hepatic fibrosis induced by bovine serum albumin in rats and its mechanism

BIAN Hongzheng, LIU Lifang

(Department of Pharmaceutical Engineering, Hebei Chemical & Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract

Objective: To investigate the inhibitory effect of paclitaxel on hepatic fibrosis induced by bovine serum albumin (BSA) in rats and its mechanism.

Methods: Wistar rats after the formation of immunological liver fibrosis induced by BSA, were injected with normal saline (model group) or 10 $\mu\text{g/g}$ paclitaxel (paclitaxel treatment group) via tail vein respectively, and another 10 normal rats administered with normal saline with the same fashion were served as control group. Injection was performed once daily, and the rats were sacrificed and their blood samples and liver specimens were obtained 28 d later, and then histopathological observations were performed, the serum biochemical parameters for liver function and the collagen-related variables in the serum and liver tissue, and the expressions of α -SMA and TGF- β 1 in the liver tissue were measured; the hepatic stellate cells (HSCs) were isolated, and then the protein

收稿日期: 2018-03-08; 修订日期: 2018-07-20。

作者简介: 边虹铮, 河北化工医药职业技术学院讲师, 主要从事药理学方面的研究。

通信作者: 边虹铮, Email: 3166001899@qq.com

and mRNA expressions of molecules related to TGF- β /Smad signaling pathway in them were determined.

Results: In model group compared with control group, significant liver fibrosis was present, the levels of serum transaminases were significantly increased with significantly decreased albumin level, the collagen-related variables in the serum and liver tissue were significantly augmented, the expression rates of α -SMA and TGF- β 1 in the liver tissue were significantly elevated, and the protein and mRNA expressions of molecules related to TGF- β /Smad signaling pathway in the HSCs were significantly up-regulated (all $P < 0.05$). The changing amplitudes of all above variables in paclitaxel treatment group were significantly lower than those in model group (all $P < 0.05$), and some of them showed no significant differences with control group (partial $P < 0.05$).

Conclusion: Paclitaxel has inhibitory effect on immunological liver fibrosis induced by BSA in rats, and the mechanism may probably associated with its suppressing the activity of the TGF- β /Smad signaling pathway.

Key words

Liver Cirrhosis; Paclitaxel; Transforming Growth Factor β ; Disease Models, Animal, Rats

CLC number: R657.3

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理基础,是一种以胶原纤维为主的细胞外基质弥漫性过度增生、沉积并逐渐发展致肝硬化的结缔组织主动增生过程^[1]。肝纤维化的过程已被公认为是可逆的,因此早期控制或逆转肝纤维化,减少肝硬化从而可以抑制门静脉高压、肝癌的发生,具有重要意义。紫杉醇是在红豆杉的树皮分离提纯的天然次生代谢产物,具有良好的抗肿瘤作用,临床上广泛用于乳腺癌、卵巢癌和部分头颈癌和肺癌的治疗^[2-3]。近年来国内外相关研究发现低剂量紫杉醇对肝纤维化具有明显的抑制作用,但主要集中在体外实验。本研究采用牛血清白蛋白(BSA)诱导的免疫性肝纤维化大鼠模型,探讨紫杉醇在体内的治疗作用及机制,为临床使用紫杉醇防治肝纤维化提供实验及理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级Wistar大鼠100只,均为雄性,4~6周龄,体质量为150~170 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[批号:SCXK(京)2016-0032,合格证号:11600700047345],于我院实验动物中心适应性饲养7 d进行实验。温度20~26 $^{\circ}\text{C}$,湿度40%~70%,12 h明暗交替。

1.2 药品与试剂

注射用紫杉醇脂质体购自南京绿叶制药有限公司,给药时予葡萄糖生理盐水稀释至相应浓度。BSA及弗氏不完全佐剂购自美国Sigma公司;

戊巴比妥钠北京大田丰拓化学技术有限公司;羟脯氨酸(Hyp)试剂盒及总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;兔抗鼠透明质酸(HA)、层黏蛋白(LN)、III型前胶原(PCIII)、IV型胶原(IV-C)及同型二抗ELISA试剂盒与抗 α -SMA单抗、抗TGF- β 1单抗及相关试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。Western blot全套试剂购自美国BD公司。TRIzol、M-MLV逆转录酶、Platinum Taq DNA聚合酶均自美国Invitrogen公司。

1.3 方法

1.3.1 肝纤维化大鼠模型制备 模型制备方法参照文献^[4-5]方法并略加修改。实验大鼠于第2、4、5、6、7周皮下多点注射9 mg/mL BSA 弗氏不完全佐剂乳剂冲击免疫接种,每次0.5 mL,共注射5次。第8周内眦采血通过琼脂平板双向扩散法验证大鼠是否产生BSA抗体。取BSA抗体阳性大鼠,尾静脉攻击注射BSA生理盐水溶液0.4 mL/次/只,每周2次,剂量为每次2.0 mg逐渐递增至3.6 mg,共攻击注射15次。对照组同期注射等体积生理盐水。

1.3.2 实验分组及处理 将成模大鼠随机分为模型组(尾静脉注射葡萄糖生理盐水)与紫杉醇组处理(尾静脉注射10 $\mu\text{g/g}$ 紫杉醇)。每天注射1次,连续给药28 d。另取10只正常大鼠作为对照组,处理同模型组。由于时间较长,部分大鼠实验过程中死亡,最终获得鼠数为模型组15只、紫杉醇组处理13只,对照组10只大鼠均存活。

1.3.3 标本采集 末次给药后10~12 h采用45 $\mu\text{g/g}$

戊巴比妥钠麻醉, 称重后腹主动脉取血并离心收集血清。放血处死大鼠后, 迅速摘取肝脏并称重。肝脏分为3部分: (1) 取大鼠肝脏右叶纵断面标本1块, 厚度约为2 mm, 4%多聚甲醛固定24~36 h后, 移去固定液, 双蒸水冲洗2次, 梯度酒精脱水: 75% 15 min、85% 15 min、95% 15 min、95% 90 min、100% 20 min、100% 20 min; 二甲苯I、II各20 min透明, 浸蜡20 min, 蜡温65 °C包埋组织标本, 采用McIlwain组织切片机制片, 切片厚度4 μm, 55 °C摊片, HE及Masson染色, 中性树胶封片。(2) 剪取0.5 g肝组织检测Hyp含量。(3) 剩余肝组织5 mL 0.1%胶原酶IV和5 mL 0.1%链霉菌蛋白酶消化后, 200目尼龙滤网研磨制备成肝细胞悬液, 参照文献^[6]方法以40% Percoll分离液非灌注分离肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC), 免疫组化鉴定α-SMA阳性率>95%。

1.3.4 指标检测 全自动生化分析仪检测血清中TP、ALB、AST、ALT浓度。按照ELISA试剂盒说明书检测血清HA、LN、PCIII、IV-C水平。采用样本水解法检测Hyp含量, 按试剂盒说明书进

行操作。肝脏石蜡包埋组织连续切片, 切片厚度4 μm, HE染色进行细胞形态观察, 并对纤维化程度进行分期及计分^[7](0期: 无纤维化; 1期: 汇管区纤维化扩大, 局限窦周及小叶内纤维化; 2期: 汇管区周围纤维化, 纤维间隔形成, 小叶结构保留; 3期: 纤维间隔伴小叶结构紊乱, 无肝硬化; 4期: 早期肝硬化); 采用半定量计分系统^[8]进行纤维化计分。EnVision二两步法α-SMA、TGF-β1免疫组化染色并进行分级及计分^[9]。离心收集 1×10^6 个HSC, 冰上裂解(RIPA裂解液和苯甲基磺酰氟按100:1混匀)30 min, Western blot法检测转化生长因子β亚单位受体1(TβRI)、磷酸化(p)-smad2、p-Smad3、纤溶酶原活物抑制因子1(PAL-1)的蛋白相对表达水平, 以β-actin为内参。TRIzol试剂盒提取HSC总RNA, M-MLV反转录成cDNA, real-time PCR反应检测TβRI、PAL-1 mRNA水平。引物序列见表1, 由上海生工生物有限公司合成。反应条件: 94 °C预变性2 min; 94 °C变性30 s、60 °C退火30 s、72 °C延伸1 min, 35个循环; 72 °C延伸10 min。

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因	引物序列 (5' → 3')	产物长度 (bp)
TβRI	上游引物: CAT TAC TCT GAG AGG TTT GCC 下游引物: GGT GGA CAC GGT AGC AGT AGA AG	296
I型胶原	上游引物: GAG CGG AGA GTA CTG GAT CG 下游引物: TAC TCG AAC GGG AAT CCA TC	147
III型胶原	上游引物: GTG CGG TTT GTG AAG CAC CG 下游引物: GTT CTT CTC ATG CAC ACT T	154
PAL-1	上游引物: TTC GGA GTA AAA GTG TCA GCA 下游引物: TGA GCT GTG CCC TTC TCA TG	155
GAPDH	上游引物: CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG 下游引物: GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G	496

1.4 统计学处理

采用SPSS 25.0软件处理, 符合正态分布的数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 方差齐的资料组间比较采用单因素方差分析, 并采用LSD-*t*检验进一步行两两比较; 方差不齐的资料组间比较采用Welch检验, 并采用Tamhane's T_2 法进一步行两两比较。不符合正态分布的数据用中位数(范围)[*M*(范围)]表示, 采用Kruskal-Wallis检验进行组间比较, 组间比较有统计学意义的变量进一步进行两两比较, 将*P*值进行Bonferroni校正。单项有序的分类资料采用Ridit检验进行分析。*P*<0.05

为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织病理学观察

对照组肝组织结构基本正常, 汇管区无扩大, 小叶结构完整, 未见纤维间隔。模型组肝小叶中央静脉增厚, 呈环状并延伸至临近的肝细胞, 窦周间隙增宽, 弥散性纤维化, 汇管区结节状改变, 伴结缔组织沉淀及炎性细胞浸润。紫杉醇处理组大鼠汇管区及小叶纤维组织增生程度减

轻, 界板相对完整, 小叶结构基本完整, 窦周无 大鼠肝纤维化程度见表 2。
明显纤维化, 较少炎性细胞浸润 (图 1-2)。各组

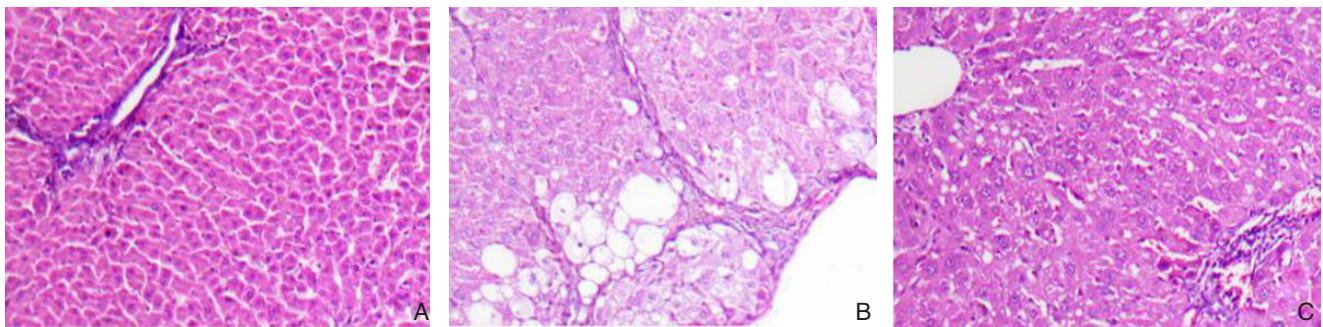


图 1 大鼠肝组织 HE 染色 (×100) A: 对照组; B: 模型组; C: 紫杉醇处理组
Figure 1 HE staining of the rat liver tissues (×100) A: Control group; B: Model group; C: Paclitaxel treatment group

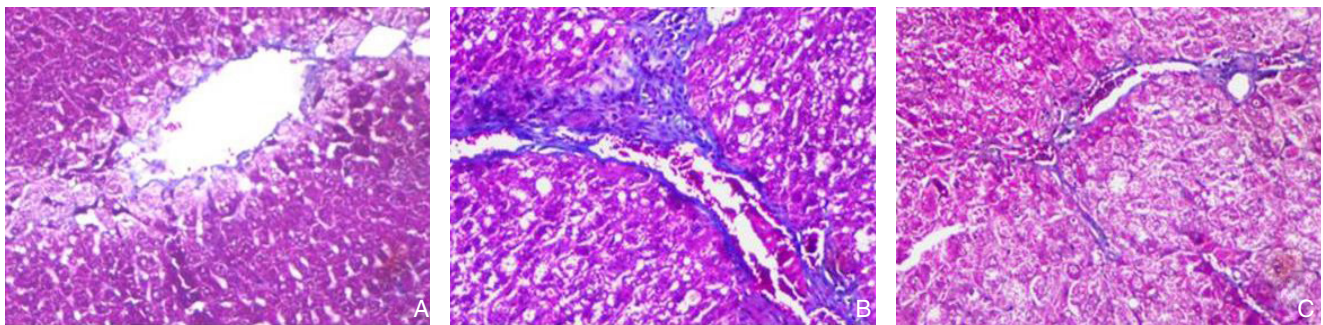


图 2 大鼠肝组织 Masson 染色 (×100) A: 对照组; B: 模型组; C: 紫杉醇处理组
Figure 2 Masson staining of the rat liver tissues (×100) A: Control group; B: Model group; C: Paclitaxel treatment group

表 2 各组大鼠肝纤维化程度比较

Table 2 Comparison of the degrees of liver fibrosis among groups of rats

组别	n	肝纤维化程度分期 (n) ¹⁾					肝纤维化计分
		0 期	1 期	2 期	3 期	4 期	
对照组	10	10	0	0	0	0	0 (0~1)
模型组	15	0	0	1	13	1	7 (1~10) ²⁾
紫杉醇处理组	13	5	6	1	1	0	1 (0~7) ^{2), 3)}

注: 1) Ridit 分析总体 $\chi^2=39.478, P<0.001$; 2) 与对照组比较, $P<0.05$; 3) 与模型组比较, $P<0.05$
Note: 1) $\chi^2=39.478, P<0.001$ in overall Ridit analysis; 2) $P<0.05$ vs. control group; 3) $P<0.05$ vs. model group

2.2 血清肝功能生化指标比较

各组间 TB 差异无统计学意义 ($F=1.352, P=0.256$), 但 ALB、AST、ALT 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与对照组相比, 模型组 ALB 明显减低, AST、ALT 水平明显增高 (均 $P<0.05$)。

紫杉醇脂质体治疗后, ALB 水平明显升高, 与模型组比较有统计学差异 ($P<0.05$), ALB 与 AST 水平可基本恢复至正常水平, 与对照组比较差异无统计学意义 (均 $P>0.05$) (表 3)。

表 3 各组大鼠血清生化指标比较

Table 3 Comparison of the biochemical indexes among groups of rats

组别	n	TB (g/L, $\bar{x} \pm s$)	ALB (g/L, $\bar{x} \pm s$)	AST (U/L, $\bar{x} \pm s$)	ALT [U/L, M (范围)]
对照组	10	57.91 ± 8.41	30.98 ± 6.75	113.1 (88.5~139.2)	47.6 (27.1~73.8)
模型组	15	51.82 ± 11.50	22.43 ± 9.26 ¹⁾	186.7 (110.3~470.5) ¹⁾	79.4 (54.4~116.6) ¹⁾
紫杉醇处理组	13	55.02 ± 7.44	29.77 ± 5.49 ^{1), 2)}	121.3 (79.7~222.4) ²⁾	54.3 (30.4~101.0) ²⁾

注: 1) 与对照组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$
Note: 1) $P<0.05$ vs. control group; 2) $P<0.05$ vs. model group

2.3 血清胶原相关指标及肝组织 Hyp 比较

模型组血清HA、LN、PCIII及IV-C水平与肝组织Hyp水平均明显高于对照组（均 $P<0.05$ ）。

紫杉醇治疗组血清HA、LN、PCIII及IV-C水平以及肝组织Hyp水平均较模型组降低（均 $P<0.05$ ）（表4）。

表 4 各组大鼠血清胶原相关指标及肝组织 Hyp 水平

Table 4 Comparison of the collagen-related variables in the serum and Hyp levels in the liver tissues among groups of rats

组别	n	血清胶原水平 ($\bar{x} \pm s$)				肝组织 Hyp [$\mu\text{g/g}$, M (范围)]
		HA ($\mu\text{g/L}$)	LN ($\mu\text{g/L}$)	PCIII ($\mu\text{g/L}$)	IV-C ($\mu\text{g/L}$)	
对照组	10	165.85 \pm 30.46	45.28 \pm 17.47	106.14 \pm 26.18	101.25 \pm 38.15	157.80 (113.57~268.04)
模型组	15	363.32 \pm 80.13 ¹⁾	305.06 \pm 68.53 ¹⁾	239.01 \pm 37.48 ¹⁾	197.06 \pm 25.37 ¹⁾	593.45 (274.64~1 320.85) ¹⁾
紫杉醇处理组	13	200.61 \pm 72.68 ^{1),2)}	78.73 \pm 24.27 ^{1),2)}	119.94 \pm 43.10 ^{1),2)}	107.92 \pm 22.70 ^{1),2)}	272.31 (143.75~752.67) ^{1),2)}

注: 1) 与对照组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. control group; 2) $P<0.05$ vs. model group

2.4 肝组织 α -SMA、TGF- β 1 表达比较

模型组 α -SMA、TGF- β 1 阳性率均为 100.0%，与对照组比较明显升高（均 $P<0.05$ ）。

紫杉醇处理组 α -SMA、TGF- β 1 表达均较模型组减低（均 $P<0.05$ ），且TGF- β 1表达与对照组比较无统计学差异（ $P>0.05$ ）（图3-4）（表5）。

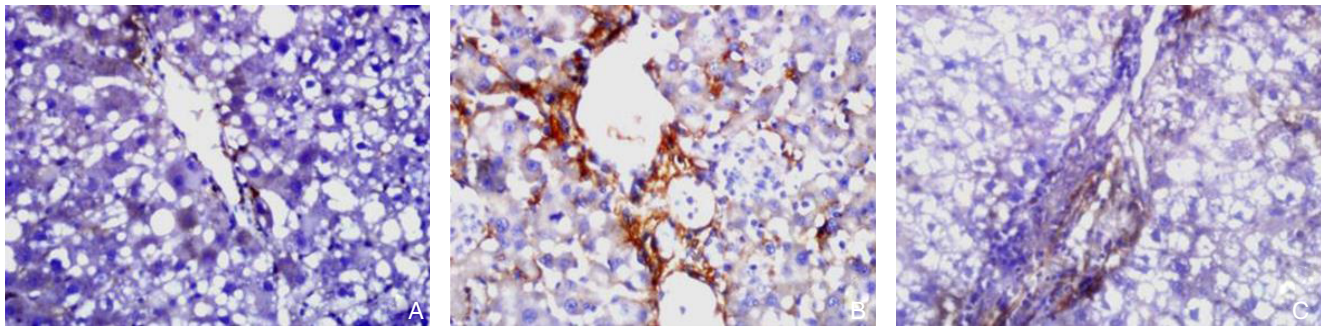


图 3 α -SMA 免疫组化染色 ($\times 400$)

A: 对照组; B: 模型组; C: 紫杉醇处理组

Figure 3 Immunohistochemical staining for α -SMA ($\times 400$)

A: Control group; B: Model group; C: Paclitaxel treatment group

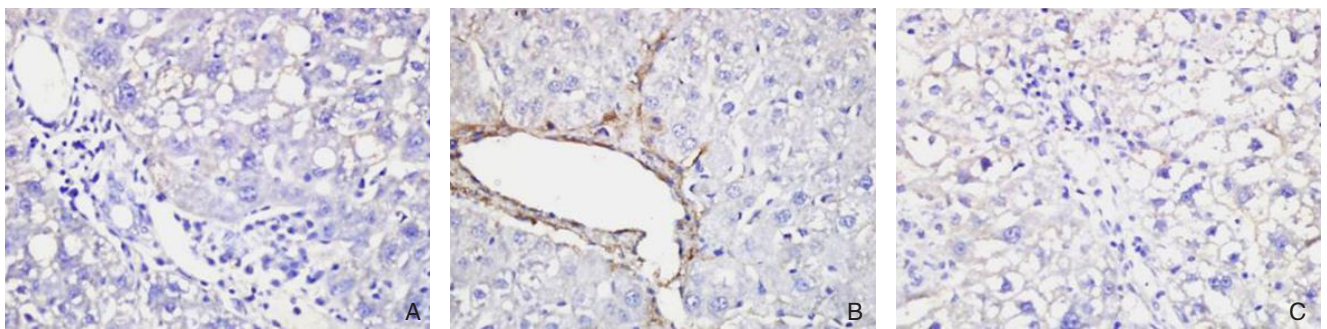


图 4 TGF- β 1 免疫组化染色 ($\times 400$)

A: 对照组; B: 模型组; C: 紫杉醇处理组

Figure 4 Immunohistochemical staining for TGF- β 1 ($\times 400$)

A: Control group; B: Model group; C: Paclitaxel treatment group

表 5 各组肝组织 α -SMA、TGF- β 1 表达

Table 5 Expressions of α -SMA and TGF- β 1 in the liver tissues among groups of rats

组别	n	α -SMA 阳性染色					TGF- β 1 阳性染色				
		程度 ¹⁾				计分	程度 ²⁾				计分
		(-)	(+)	(++)	(+++)		(-)	(+)	(++)	(+++)	
对照组	10	10	0	0	0	0.00 \pm 0.00	8	2	0	0	0.39 \pm 0.18
模型组	15	0	2	4	9	2.15 \pm 0.86 ³⁾	0	0	5	10	3.21 \pm 1.08 ³⁾
紫杉醇处理组	13	2	7	5	0	0.66 \pm 0.41 ^{3),4)}	8	5	0	0	0.42 \pm 0.47 ⁴⁾

注: 1) Ridit 分析总体 $\chi^2=27.251$, $P<0.001$; 2) Ridit 分析总体 $\chi^2=62.044$, $P<0.001$; 3) 与对照组比较, $P<0.05$; 4) 与模型组比较, $P<0.05$

Note: 1) $\chi^2=39.478$, $P<0.001$ in overall Ridit analysis; 2) $P<0.05$ vs. control group; 3) $P<0.05$ vs. model group

2.5 HSC 中 TGF- β /Smad 信号传导通路相关蛋白及 mRNA 表达情况

HSC中, 各组p-Smad2蛋白表达无统计学差异 ($P>0.05$); 模型组T β RI、p-Smad3、PAL-1蛋白及mRNA均高于对照组 (均 $P>0.05$), 而紫杉醇

处理组T β RI、p-Smad3、PAL-1蛋白及mRNA均低于模型组 (均 $P>0.05$), 且除PAL-1 mRNA水平高于对照组外, 其他与对照组比较均无统计学差异 (均 $P>0.05$) (表6-7)。

表6 各组HSC中T β RI、p-Smad2、p-Smad3、PAL-1蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 The protein expressions of T β RI, p-Smad2, p-Smad3 and PAL-1 in HSCs among groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T β RI	p-Smad2	p-Smad3	PAL-1
对照组	10	0.176 \pm 0.032	0.312 \pm 0.057	0.224 \pm 0.071	0.172 \pm 0.023
模型组	15	0.502 \pm 0.036 ¹⁾	0.337 \pm 0.052	0.455 \pm 0.068 ¹⁾	0.350 \pm 0.047 ¹⁾
紫杉醇处理组	13	0.197 \pm 0.020 ²⁾	0.307 \pm 0.029	0.274 \pm 0.058 ²⁾	0.193 \pm 0.062 ²⁾

注: 1) 与对照组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. control group; 2) $P<0.05$ vs. model group

表7 各组HSC中T β RI、PAL-1 mRNA表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 The mRNA expressions of T β RI and PAL-1 in HSCs among groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	T β RI	p-Smad	PAL-1
对照组	10	2.43 \pm 0.21	1.78 \pm 0.32	1.05 \pm 0.08
模型组	15	4.72 \pm 0.33 ¹⁾	3.89 \pm 0.47 ¹⁾	2.36 \pm 0.13 ¹⁾
紫杉醇处理组	13	2.66 \pm 0.26 ²⁾	1.95 \pm 0.37 ²⁾	1.81 \pm 0.25 ^{1), 2)}

注: 1) 与对照组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. control group; 2) $P<0.05$ vs. model group

3 讨论

肝纤维化是肝脏中胶原蛋白等细胞外基质合成和降解失去平衡, 在窦周间隙过度沉积, 继之肝窦毛细血管纤维化, 造成纤维在肝脏内沉积过多的病理过程^[11]。目前肝纤维化大鼠有多种造模方式^[10], 本研究采用BSA诱导的免疫性肝纤维模型大鼠进行实验, 此模型在致病因素上属于免疫损伤, 更接近于病毒、炎症诱发的人类肝纤维化形成, 且自愈性低, 便于观察药物的治疗作用^[4, 10-11]。本研究模型组大鼠肝脏纤维结缔组织增生并存在弥漫性假小叶, 窦间纤维间隔形成, 而肝实质细胞可见轻微炎性浸润, 血清HA、LN、PCIII、IV-C“肝纤四项”及肝组织 α -SMA、TGF- β 1、Hyp表达明显增高, 提示纤维化模型构建成功。但本研究中模型组AST、ALT明显升高, ALB水平降低, 考虑与本组肝脏细胞受损有关。

刘洋等^[12]研究显示, 低浓度紫杉醇 (200 nmol/L) 可以通过阻断TGF- β /Smad信号传导通路, 下调胶原蛋白表达水平, 从而逆转免疫性大鼠的肝纤维化状态。之后国内相关研究对博来霉素诱导的大鼠

肝纤维模型^[13]、CCl₄诱导的SD大鼠肝纤维模型^[14]、二甲基亚硝胺诱导的Wistar大鼠肝纤维化模型^[15]进行研究, 均证实低剂量紫杉醇对不同类型的大鼠肝纤维化模型有较好治疗作用。本研究参考上述文献及预实验数据, 采用10 μ g/g紫杉醇为动物实验所用剂量。

LN是细胞基底膜的主要成分, 肝纤维化时明显增多, HA随着肝纤维化的加重而增高, 血窦内皮细胞功能低下时HA升高更为明显。PCIII为反映肝脏纤维增生的指标, 其含量与肝纤维化程度呈正相关。Hyp为胶原蛋白所特有, 肝纤维化时肝内主要增多的成分即为胶原纤维。本研究发现, 紫杉醇脂质体能明显降低肝纤维化时升高的血清LN、HA, PCIII、IV-C及肝组织Hyp含量, 而且, 紫杉醇亦能降低BSA诱导的纤维化大鼠血清AST、ALT水平, 肝纤维化程度分期和积分均明显减低。

免疫组化结果显示, 肝组织中HSC活化标志 α -SMA与TGF- β 1表达明显增高。TGF- β 1是促肝纤维化重要的细胞因子, 在肝纤维化的过程中发挥了重要作用。研究表明TGF- β /Smad信号传导通路是TGF- β 1发挥生物作用的主要通路, TGF- β /

Smad信号通路主要由配体(TGF- β 超家族)、受体(TGF- β R超家族)、信号传递分子(Smad家族)构成。其主要过程为配体激活受体后,由多种Smad分子将膜信号传导到细胞核内引起基因的表达转录,使细胞外基质大量异常合成并抑制其分解,导致肝纤维化^[20]。PAL-1是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,可阻止纤溶酶激活纤溶酶原导致ECM过多沉积。PAL-1的启动子上均存在有Smad结合位点(SBE),因而TGF- β 1可能通过TGF β 信号通路传导促进PAL-1的分泌来促进肝纤维化^[21]。相关研究^[22]证实,在通过TGF- β 1激活的大鼠HSC中,加入200 nmol/L浓度的紫杉醇能通过抑制磷酸化的Smad3来改善纤维化程度。本研究结果显示,紫杉醇组HSC中T β RI、p-Smad3、PAL-1蛋白及mRNA均较模型组明显下调,提示紫杉醇通过降低TR β I表达,减少TR β I的磷酸化作用,从而降低了Smad3的磷酸化水平,导致co-Smad转移至细胞核的信号相对减少。又通过抑制PAL-1基因的表达,使PAL-1蛋白质和mRNA的表达减少,从而促进了细胞外基质的降解,减轻了肝纤维化。

综上所述,本研究证实低剂量紫杉醇可下调TGF- β /Smad信号通路蛋白及mRNA的表达,同时下调HA、LN、PCIII、IV-C水平及血清AST、ALT水平,故推测其机制是通过抑制TGF- β /Smad信号通路,来下调HA、LN、PCIII、IV-C水平的,今后待进一步通过敲除TGF- β /Smad信号通路相关基因来进一步证实。

参考文献

- [1] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6):1655-1669. doi: 10.1053/j.gastro.2008.03.003.
- [2] 陈强, 张其忠, 刘健, 等. 紫杉醇脂质体与传统紫杉醇治疗乳腺癌和非小细胞肺癌的随机对照研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2003, 25(2):190-192. doi:10.3760/j.issn:0253-3766.2003.02.027.
Chen Q, Zhang QZ, Liu J, et al. Multi-center prospective randomized trial on paclitaxel liposome and traditional taxol in the treatment of breast cancer and non-small-cell lung cancer[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2003, 25(2):190-192. doi:10.3760/j.issn:0253-3766.2003.02.027.
- [3] 王彦, 黄荣丽, 黄惠芳, 等. 紫杉醇在卵巢癌治疗中的应用[J]. *中华妇产科杂志*, 1999, 34(7):439. doi:10.3760/j.issn:0529-567X.1999.07.020.
- [4] 李生财, 李彤. 肝纤维化动物模型的造模原理及应用[J]. *中医药学刊*, 2006, 24(12):2267-2269. doi:10.3969/j.issn.1673-7717.2006.12.053.
Li SC, Li T. Principle and Application of Making Different Animal Models of Liver Fibrosis[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2006, 24(12):2267-2269. doi:10.3969/j.issn.1673-7717.2006.12.053.
- [5] 邢伟, 孔维涵, 方步武. 蒿鳖养阴软坚方对免疫性肝纤维化大鼠的治疗作用[J]. *中草药*, 2010, 41(10):1667-1672.
Xing W, Kong WH, Fang BW. Therapeutic effects of Haobie Yangyin Ruanjian Prescription on immunity hepatic fibrosis rats[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2010, 41(10):1667-1672.
- [6] 刘朋飞, 周余来, 冯业童, 等. 非灌注法分离大鼠肝星形细胞及其鉴定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(9):1220-1222.
Liu PF, Zhou YL, Feng YT, et al. Isolation of rat hepatic stellate cells by nonperfusion method and identification of isolated cells[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2012, 25(9):1220-1222.
- [7] 中华肝脏病学学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10(5):327-328. doi:10.3760/j.issn:1007-3418.2002.05.002.
Hepatic Fibrosis Group of Chinese Liver Diseases Association. Consensus on evaluation of the diagnosis and efficacy of hepatic fibrosis[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2002, 10(5):327-328. doi:10.3760/j.issn:1007-3418.2002.05.002.
- [8] 王泰龄, 刘霞, 周元平. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案[J]. *中华肝脏病杂志*, 1998, 6(4):195. doi:10.3760/j.issn:1007-3418.1998.04.002.
Wang TL, Liu X, Zhou YP. Scoring methods for inflammatory activity and degree of fibrosis in chronic hepatitis[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 1998, 6(4):195. doi:10.3760/j.issn:1007-3418.1998.04.002.
- [9] Bayer EM, Herr W, Kanzler S, et al. Transforming growth factor-beta1 in autoimmune hepatitis: correlation of liver tissue expression and serum levels with disease activity[J]. *J Hepatol*, 1998, 28(5):803-811.
- [10] 陈旭军. 肝纤维化动物模型的选择及评介[J]. *湖南中医药导报*, 2002, 8(12):785-785. doi:10.3969/j.issn.1672-951X.2002.12.043.
Chen XJ. Selection and evaluation for animal model of hepatic fibrosis[J]. *Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology*, 2002, 8(12):785-785. doi:10.3969/j.issn.1672-

- 951X.2002.12.043.
- [11] Wu SJ, Yang YH, Tsuneyama K, et al. Innate immunity and primary biliary cirrhosis: activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis[J]. *Hepatology*, 2011, 53(3):915-925. doi: 10.1002/hep.24113.
- [12] 刘洋. 低剂量紫杉醇对肝纤维化的作用机制的初步探讨[D]. 长沙: 中南大学, 2012:1-86.
Liu Y. Preliminary mechanisms of low-dose paclitaxel on liver fibrosis[D]. Changsha: Central South University, 2012:1-86.
- [13] 王红岗, 鲁明霞. 红豆杉提取物紫杉醇对博来霉素致大鼠肺纤维化的影响[J]. *浙江中医杂志*, 2014, 49(4):275-276. doi:10.3969/j.issn.0411-8421.2014.04.033.
Wang HG, Lu MX. Effect of taxaceae extract paclitaxel on lung fibrosis induced by bleomycin in rats[J]. *Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2014, 49(4):275-276. doi:10.3969/j.issn.0411-8421.2014.04.033.
- [14] 于金慧. 南方红豆杉聚戊烯醇的分离纯化与抗肝纤维化作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012:74-109.
Yu JH. Separation and purification of southern taxus polypentenol and its effect against hepatic fibrosis[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012:74-109.
- [15] 叶轲, 白宁, 周乐杜, 等. 紫杉醇对大鼠肝纤维化的抑制作用及机制研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(9):1155-1161. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.09.012.
Ye K, Bai N, Zhou LD, et al. Inhibitory effect of paclitaxel on hepatic fibrosis in rats and its mechanism[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2017, 26(9):1155-1161. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.09.012.
- [16] 信涛, 赵妍, 张磊, 等. 磁流体对肝癌细胞的凋亡诱导研究及联合紫杉醇对大鼠肝癌的抑制作用[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(22):1363-1366. doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.22.002.
Xin T, Zhao Y, Zhang L, et al. Inhibition of Rat Liver Cancer by Combined Paclitaxel and Magnetic Fluid-Induced Apoptosis of Hepatoma Cells[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2011, 38(22):1363-1366. doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.22.002.
- [17] 李明军, 李英夫, 吴雁, 等. 氨基丙烯酸正丁酯纳米载体促进紫杉醇粒抗脑胶质瘤作用的实验研究[J]. *黑龙江医药科学*, 2015, 38(2):29-30. doi:10.3969/j.issn.1008-0104.2015.02.014.
Li MJ, Li YF, Wu Y, et al. butylcyanoacrylate nanoparticle-carrier promoting paclitaxel particles to inhibit brain glioma[J]. *Heilongjiang Medicine and Pharmacy*, 2015, 38(2):29-30. doi:10.3969/j.issn.1008-0104.2015.02.014.
- [18] 冯勤梅, 刘萍, 吴霞, 等. 紫杉醇联合卡铂对荷瘤鼠细胞免疫功能影响的研究[J]. *现代妇产科进展*, 2011, 20(9):680-684.
Feng QM, Liu P, Wu X, et al. The study on the immunologic aspects in established tumor rats treated with paclitaxel and carboplatin[J]. *Progress in Obstetrics and Gynecology*, 2011, 20(9):680-684.
- [19] 罗全勇, 陈泽泉, 陈立波, 等. 99Tcm-Annexin B1探测荷瘤鼠化疗后肿瘤细胞凋亡的实验观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(20):1524-1527. doi:10.3969/j.issn.1673-5269.2008.20.002.
Luo QY, Chen ZQ, Chen LB, et al. Detection of tumor cell apoptosis induced by chemotherapy with 99Tcm-Annexin B1[J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2008, 15(20):1524-1527. doi:10.3969/j.issn.1673-5269.2008.20.002.
- [20] Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(1):55-71. doi: 10.1016/j.bbamer.2010.01.003.
- [21] Hu B, Wu Z, Phan SH. Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29(3 Pt 1):397-404. doi: 10.1165/rcmb.2003-0063OC.
- [22] Zhou J, Zhong DW, Wang QW, et al. Paclitaxel ameliorates fibrosis in hepatic stellate cells via inhibition of TGF-beta/Smad activity[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(26):3330-3334.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 边虹铮, 刘丽芳. 紫杉醇对牛血清白蛋白诱导大鼠肝纤维化的抑制作用及机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(8):1014-1021. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.08.010

Cite this article as: Bian HZ, Liu LF. Inhibitory effect of paclitaxel on bovine serum albumin induction of hepatic fibrosis in rats and the mechanism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2018, 27(8):1014-1021. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2018.08.010