

网络出版时间: 2023-03-31 16:32:21 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20230331.1334.001.html>

异甘草素对大鼠肝纤维化的治疗作用及其机制

张 畦¹, 安祯祥^{1,2}, 何远利³

摘要 目的 探讨异甘草素 (ISL) 对肝纤维化 (HF) 的治疗作用及其机制。方法 将 45 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、秋水仙碱组 (阳性对照 0.1 mg/kg)、ISL 高、低剂量组 (ISL 40、10 mg/kg)。除正常组外,其余各组采用 50% 四氯化碳 (CCl₄) 橄榄油溶液 (1.5 ml/kg) 腹腔注射建立 HF 模型,每周 2 次,持续 8 周。造模结束后各组大鼠按照每天 10 ml/kg 灌胃相应药物,共 4 周。末次给药后,测定大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 含量;计算肝脏指数;HE 及 Masson 染色观察肝组织病理变化;实时荧光定量 PCR 检测低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的 mRNA 表达水平;免疫组化、Western blot 检测肝组织中 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达情况。

结果 与正常组相比:模型组大鼠血清中 ALT、AST 含量上升 ($P < 0.01$),肝脏指数升高 ($P < 0.01$),大鼠纤维组织增生,胶原容积分数增加 ($P < 0.01$),肝组织内 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达水平上升 ($P < 0.01$);免疫组化及 Western blot 检测均表明模型组 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平上升 ($P < 0.01$)。与模型组相比:ISL 高、低剂量组血清中 ALT、AST 水平降低 ($P < 0.01$),肝脏指数下降 ($P < 0.01$),纤维化组织增生减轻,胶原容积分数下降 ($P < 0.05$),HIF-1 α 、VEGF 基因表达水平下调 ($P < 0.01$);免疫组化检测表明 ISL 高、低剂量组 HIF-1 α 蛋白水平降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),VEGF 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$);Western blot 检测表明 ISL 高剂量组 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。结论 ISL 对 CCl₄ 诱导 HF 模型大鼠有显著的治疗效果,其作用机制可能与调节 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平有关。

关键词 肝纤维化;低氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子;异甘草素

中图分类号 R 256.42

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0649-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.021

2023-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:82160893、81760865);国家中医药管理局第五批全国中医临床优秀人才研修项目 (编号:国中医药人教函(2022)1 号)

作者单位:¹ 贵州中医药大学第一临床医学院,贵阳 550002
贵州中医药大学第一附属医院² 消化内科、³ 老年病科,贵阳 550001

作者简介:张 畦,女,硕士研究生;
安祯祥,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: 407206115@qq.com

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是指肝脏受多种致病因素的影响,引起肝组织损伤伴纤维结缔组织

groups were measured. Furthermore, placental pathology, pregnancy outcomes, and cognitive abilities of offspring were observed. **Results** Blood pressure and urinary protein levels of model group were significantly higher than those of control group levels. Compared with the control group, the levels of platelet and antithrombin III (AT III) in the peripheral blood of pregnant rats in the model group were lower than those in the control group, while D-dimer was higher than that in the control group, the weight of the fetus and placenta in the model group decreased ($P < 0.001$), the expression levels of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor α (TNF- α) and interferon gamma (INF- γ) in peripheral blood increased, while the expression level of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) decreased ($P < 0.001$). The water maze test showed that the latency of the offspring of the model group to the platform was longer than that of the control group ($P < 0.05$), while the frequency of crossing the platform quadrant and the time of staying in the platform quadrant of the model group were lower than those of the control group ($P < 0.05$). HE and PAS staining showed that there were infiltration of inflammatory cells in the basal layer of placenta, obvious decrease of blood vessels in labyrinthine area, slight edema of renal interstitium and degeneration of local renal tubular epithelial cells in the model group, while there were no above pathological changes in placenta and kidney in the control group. **Conclusion** A single injection of LPS in early pregnancy can successfully induce PE-related symptoms and adverse pregnancy outcomes such as fetal growth restriction and lead to the decline of cognitive ability of offspring.

Key words preeclampsia; lipopolysaccharide; rat; inflammatory reaction; cognitive ability

增生的病理过程,是各种慢性肝病发展到肝硬化和肝癌的关键环节^[1]。血管新生、肝窦毛细血管化是促进 HF 发生发展的重要机制^[2]。抑制病理性血管新生是逆转肝纤维化的重要环节和靶点^[3]。低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 能够激活血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 并使其稳定表达,在血管新生方面发挥重要作用^[4]。甘草具有保肝、抗炎和抗纤维化等作用^[5]。甘草总黄酮是甘草中提取的一类主要活性成分,可通过下调 TGF- β 1 和 Caspase-3 的蛋白表达而拮抗大鼠肝纤维化^[6]。异甘草素 (isoliquiritigenin, ISL) 是一类具有查尔酮结构的黄酮类化合物,可通过干预 MAPK/Erk 信号通路改善肺纤维化^[7],是抗肺纤维化的有效活性成分^[8]。该研究通过四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 腹腔注射诱导建立大鼠 HF 模型,探讨 ISL 治疗 HF 的治疗作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只,6 周龄,体质量 (180 $\pm$ 20) g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号: SCXK(辽) 2020-0001。本实验经贵州中医药大学动物实验伦理委员会批准 (批号: 20210008)。

1.2 主要实验试剂及仪器 ISL (纯度 $\geq$ 98%,批号 YGCS20210812) 购自南京春秋生物工程公司;秋水仙碱片购自西双版纳版纳药业有限公司;CCl₄ 购自天津市大茂化学试剂厂;丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT,批号: 20211015)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST,批号: 20211016) 购自南京建成生物工程研究所;苏木精-伊红染液购自珠海贝索生物技术有限公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、一步法快速蛋白质免疫印迹法试剂盒、超纯 RNA 提取试剂盒购自北京康为世纪生物公司;VEGF 一抗 (批号: BJ11307117)、HIF-1 α 一抗 (批号: AF01217172) 购自北京博奥森生物公司;GAPDH 一抗 (批号: GR3316865-11) 购自英国 Abcam 公司。TL998-IV 型 Real-time PCR 仪购自西安天隆公司;EPS-300 电泳仪购自上海天能公司。

1.3 实验方法 SD 大鼠随机分成 5 组,即正常组、模型组、秋水仙碱组 (秋水仙碱 0.1 mg/kg)、ISL 高、低剂量组 (ISL 40、10 mg/kg)^[9],9 只/组。正常组采用等量的橄榄油腹腔注射,其余组大鼠每周腹腔注射 50% CCl₄ 橄榄油溶液 (1.5 ml/kg) 2 次,共造

模 8 周。末次造模后,从正常组和模型组各随机抽取 1 只大鼠检测,参照文献^[1]标准, S2 期以上为造模成功。从第 9 周起,连续 4 周灌胃相应药物。根据体质量调整药物剂量。正常、模型组灌胃等量蒸馏水。在模型复制期间,秋水仙碱组大鼠死亡 2 只, ISL 高、低剂量组各死亡 1 只。实验结束后,大鼠禁食不禁水 12 h,称重后麻醉处理,腹主动脉采血,离心分离血清,并在 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中保存。摘取肝组织称重,计算肝指数,将肝脏右叶的一部分用 4% 多聚甲醛固定,一部分在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.4 大鼠肝脏指数测定 根据大鼠肝脏质量和体质量,计算肝脏指数。肝脏指数 = 肝脏质量 / 大鼠体质量 $\times$ 100%

1.5 大鼠血清中 AST、ALT 水平测定 按说明书要求检测大鼠血清 ALT、AST 的水平。

1.6 大鼠肝组织病理形态学观察 肝组织经固定后,经脱水、透明、包埋及切片处理,分别进行 HE、Masson 染色。采用 IPP 6.0 软件测定胶原容积分数 (胶原纤维的容积分数 = 胶原阳性的蓝色面积 / 总面积)。

1.7 实时定量 PCR 法检测大鼠肝组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达 取大鼠肝组织提取总 RNA,测定含量和纯度。按逆转录试剂盒使用说明,将总 RNA 逆转录为 cDNA,通过实时荧光定量 PCR 法检测 HIF-1 α 、VEGF 的相对表达水平,以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')
HIF-1 α	F: ACTATGTCGCTTTCTTGG R: GTTCTGCTGCCTTGTAT
VEGF	F: CTGGCTTTACTGCTGTACCT R: CTGGTAGACGTCCATGAAC
GAPDH	F: CAAGTTCAACGGCAGAG R: CCAGTAGACTCCACGACAT

1.8 免疫组化法检测大鼠肝组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达 组织脱水、包埋、脱蜡、抗原修复,滴加一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 水洗,加二抗工作液, DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,中性树胶封片。棕黄色表达为阳性,不着色为阴性。以 PBS 液代替一抗为阴性对照。采用 IPP 6.0 图像分析系统测定所采集图像的吸光度和面积,并计算出 HIF-1 α 、VEGF 蛋白各自表达水平。

1.9 Western blot 检测大鼠肝组织 HIF-1 α 、VEGF

蛋白表达 肝组织提取总蛋白,测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳并转膜,加入 GAPDH 一抗(1:10 000),HIF-1 α 一抗(1:1 000),VEGF 一抗(1:500) 4℃ 过夜;加入二抗(1:200) 4℃ 过夜。ECL 显影定影。使用图像分析软件进行灰度分析,结果以 HIF-1 α 、VEGF 与内参 GAPDH 的蛋白灰度值的比值表示。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间差异比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝指数的变化 与正常组比较,模型组大鼠肝脏指数上升,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组、ISL 高剂量组、ISL 低剂量组肝脏指数下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

2.2 各组大鼠血清肝功能变化 与正常组比较,模型组大鼠血清中 ALT、AST 表达水平升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组、ISL 高剂量组、ISL 低剂量组大鼠血清中的 ALT、AST 表达水平下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠肝组织血清 AST、ALT 及肝指数变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST(U/L)	ALT(U/L)	肝指数(%)
正常	8	6.78 $\pm$ 2.25	4.88 $\pm$ 2.14	2.29 $\pm$ 0.26
模型	8	75.80 $\pm$ 12.12 ^{**}	56.65 $\pm$ 9.30 ^{**}	2.90 $\pm$ 0.23 ^{**}
秋水仙碱	7	21.10 $\pm$ 6.61 ^{##}	19.44 $\pm$ 6.05 ^{##}	2.45 $\pm$ 0.13 ^{##}
ISL 高剂量	8	13.07 $\pm$ 4.86 ^{##}	14.93 $\pm$ 7.12 ^{##}	2.50 $\pm$ 0.12 ^{##}
ISL 低剂量	8	22.39 $\pm$ 4.78 ^{##}	20.04 $\pm$ 7.18 ^{##}	2.38 $\pm$ 0.13 ^{##}
F 值		124.80	66.81	12.61
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

2.3 各组大鼠肝脏病理损伤变化 HE 染色显示:正常组大鼠肝脏肝小叶结构完整;模型组肝组织肝小叶结构紊乱,见肝细胞坏死及肝细胞脂肪变性,大量纤维组织增生,纤维间隔中存在大量炎性细胞浸润;药物干预组较模型组肝组织损伤情况得到改善。见图 1。Masson 染色显示:正常组大鼠肝脏汇管区有少许蓝染胶原纤维;模型组大鼠肝组织中汇管区、中央静脉区见大量增生纤维组织,纤维间隔变大、增宽;与模型组比较,各给药组蓝染胶原纤维变细、缩小。与正常组比较,模型组胶原容积分数增加,差异

有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组、ISL 高低剂量组胶原容积分数减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1 和表 3。

2.4 各组大鼠肝脏 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达水平 与正常组比较,模型组大鼠肝组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组、ISL 高剂量组、ISL 低剂量组大鼠肝组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达水平下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 各组大鼠肝组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 及胶原容积分数变化($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	HIF-1 α mRNA	VEGF mRNA	胶原容积分数(%)
正常	0.64 $\pm$ 0.32	0.62 $\pm$ 0.51	2.30 $\pm$ 0.01
模型	2.29 $\pm$ 0.12 ^{**}	1.60 $\pm$ 0.45 ^{**}	29.07 $\pm$ 8.16 ^{**}
秋水仙碱	0.99 $\pm$ 0.38 ^{##}	0.22 $\pm$ 0.04 ^{##}	20.40 $\pm$ 2.08 [#]
ISL 高剂量	0.75 $\pm$ 0.37 ^{##}	0.15 $\pm$ 0.07 ^{##}	17.07 $\pm$ 8.71 [#]
ISL 低剂量	0.38 $\pm$ 0.34 ^{##}	0.24 $\pm$ 0.13 ^{##}	19.93 $\pm$ 1.89 [#]
F 值	16.51	11.40	9.41
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.5 免疫组化检测 各组大鼠肝脏 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平 HIF-1 α 阳性产物主要分布在细胞质及细胞核。VEGF 阳性产物主要分布在细胞质及细胞间质。与正常组比较,模型组大鼠肝组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白吸光度值均升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组、ISL 高剂量组、ISL 低剂量组大鼠肝组织 VEGF 蛋白平均吸光度值下降($P < 0.01$),秋水仙碱组、ISL 高剂量组 HIF-1 α 蛋白平均吸光度值下降($P < 0.01$),ISL 低剂量组 HIF-1 α 蛋白平均吸光度值下降($P < 0.05$),差异有统计学意义。见图 2。

2.6 Western blot 检测 各组大鼠肝脏 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平 与正常组比较,模型组大鼠肝组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平上升,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组、ISL 高剂量组大鼠肝组织内 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平下降,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图 3。

3 讨论

HF 属于中医“胁痛”、“臌胀”、“积聚”等疾病范畴,其病机主要是正气虚损,气滞血瘀。东汉医圣张仲景在《金匮要略》中提出“见肝之病,知肝传脾”,

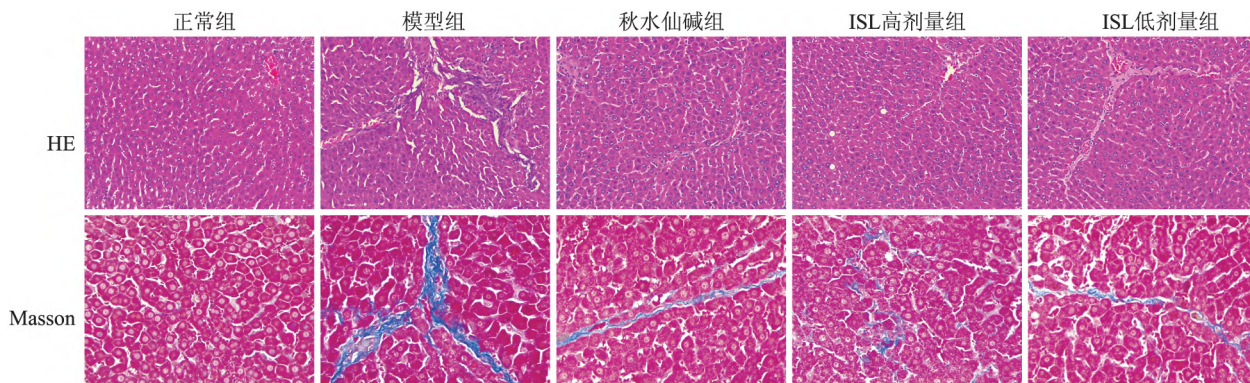


图1 各组大鼠肝脏病理变化情况 HE 染色 ×200; Masson 染色 ×400

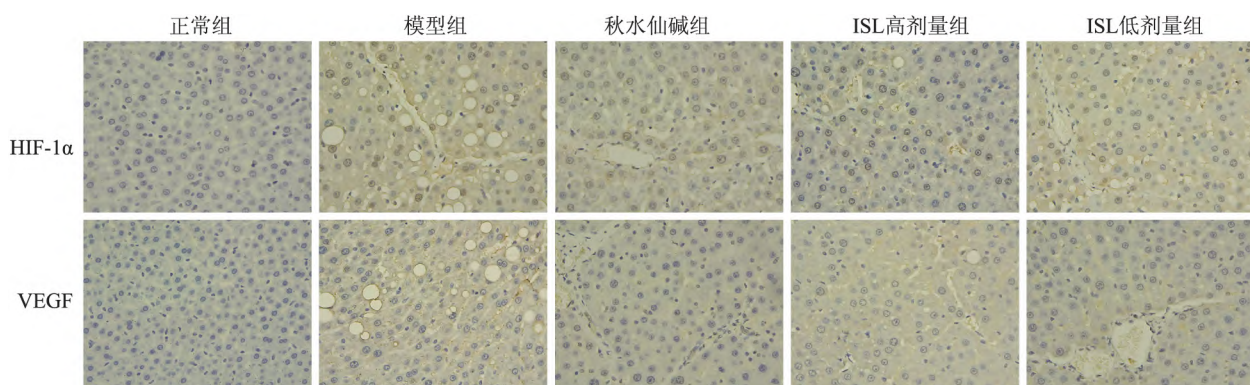
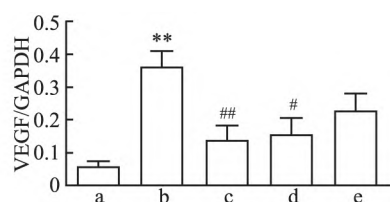
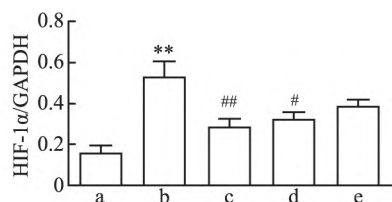
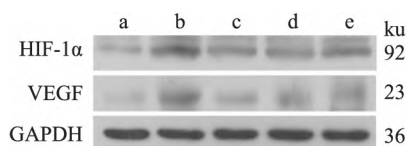
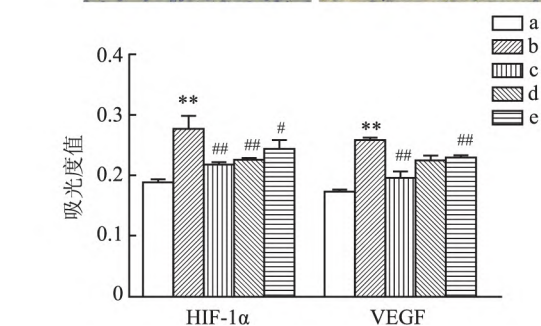


图2 免疫组化检测各组大鼠肝组织 HIF-1α、

VEGF 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s$ $n=3$) ×400a: 正常组; b: 模型组; c: 秋水仙碱组; d: ISL 高剂量组; e: ISL 低剂量组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 图3 Western blot 检测各组大鼠肝组织 HIF-1α、VEGF 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s$ $n=3$)a: 正常组; b: 模型组; c: 秋水仙碱组; d: ISL 高剂量组; e: ISL 低剂量组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

当先实脾”的健脾扶正治则。甘草具有补脾益气、调和诸药、清热解毒等功效,始载于《神农本草经》,位列上品 配伍使用频率高,被誉为“国老”,为“众药之主 经方少不用者”^[10]。ISL 主要存在于甘草的根中,具有抗炎、抗病毒、抗氧化、抗衰老等多种生物活性^[11]。秋水仙碱具有改善 HF 的功效^[12],于本

实验作为阳性对照药物。本实验采用了经典的 CCl_4 诱导的大鼠 HF 模型,HE 染色及 Masson 染色均显示模型大鼠肝组织结构破坏严重,纤维组织大量增生并伴有肝小叶结构紊乱、纤维间隔形成,且可见炎性细胞浸润及门管区变宽等现象,以及 ALT、AST 均升高,以上提示 HF 模型诱导成功。采用 ISL

干预大鼠,大鼠血清 AST、ALT 表达水平降低,ISL 高剂量组大鼠肝组织内胶原容积分数降低,病理染色结果显示 ISL 较模型组纤维间隔变细,增生减少,表明 ISL 可缓解 CCl_4 诱导的肝脏病理性损伤,对肝纤维化有一定改善作用。同时与秋水仙组比较,ISL 高剂量组血清 AST、ALT 表达水平均有降低,胶原容积分数降低,说明 ISL 高剂量对肝纤维化的改善优于秋水仙碱。

肝脏血管新生与 HF 等大多数慢性肝病直接相关,在 HF 的临床患者和动物模型中都表现出肝窦毛细血管化。目前肝纤维化的治疗方案中,针对血管新生、组织低氧、抑制 HSC 的活化治疗是新热点。临床数据表明肝纤维化临床患者的血清 VEGF 水平随着肝纤维化严重程度加重逐渐上升^[13]。VEGF 作为血管生成因子直接作用于血管内皮细胞,可促进内皮细胞血管生成,新生血管是纤维间隔形成的催化剂。新生血管改变肝脏微环境和微循环,激活肝星状细胞分泌细胞外基质,肝脏纤维化组织区域新生的血管存在着结构不成熟、通透性较差的特点,无法满足肝脏细胞再生需求和改善肝脏组织的低氧状态,推动了肝纤维化的发展^[14]。研究中模型组大鼠肝组织 VEGF 蛋白表达升高,经 ISL 干预后 VEGF 蛋白表达水平明显下降,表明 ISL 可抑制其表达改善肝脏损伤情况下的低氧状态,达到抗肝纤维化作用。HIF-1 α 是一种介导低氧适应性反应的转录因子,并受细胞内氧浓度的调节。肝脏损伤逐渐加重,伴随着肝组织低氧区域的扩大,HIF-1 α 的过表达会刺激 HSC 的激活,并通过诱导下游因子 VEGF 增加肝组织血供量,促进血管新生,短期改善肝脏低氧程度;但从长期来看,这种血管的异常增生加剧肝纤维化^[15]。病理血管和低氧之间的恶性循环,加速肝纤维化的发展进程。本研究中 ISL 治疗组 HIF-1 α 蛋白表达较模型组大鼠降低,提示 ISL 可以通过抑制 HIF-1 α 蛋白的过表达而发挥抗肝纤维化作用。

实验研究表明秋水仙碱具有一定的抗肝纤维化作用,但其副作用较大,限制其临床应用。本研究表明,秋水仙碱可改善肝功能,降低 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平,具有抗纤维化作用。秋水仙碱与 ISL 同时干预肝纤维化模型大鼠,两者差别不明显,说明 ISL 具有进一步研究的价值。本实验中肝纤维化模型大鼠与正常组比较,免疫组化及 Western blot 检测模型组大鼠肝组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白和 mRNA 表达升高,故推测在 CCl_4 的作用下大鼠出现了肝损伤,肝组织结构严重破坏,肝细胞大量坏死,肝

内炎性细胞浸润、聚集,肝脏出现低氧状态;HIF-1 α 表达升高刺激 HSC 活化并促进下游产物 VEGF 的表达和转录增强;VEGF 表达升高激发病理性新生血管,但对肝脏的低氧状态并没有改善作用,反而形成病理性血管新生、组织低氧二者之间恶性循环,推进了肝纤维化的发展进程。免疫组化及 Western blot 检测提示,与模型组对比,ISL 治疗组 HIF-1 α 、VEGF 蛋白和 mRNA 表达下降,提示 ISL 发挥改善肝纤维化的作用可能与调控 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达有关。ISL 在研究中有一定的剂量效应,但是少部分指标低剂量优于高剂量,考虑可能与样本数量过少、指标的特异性有关。

综上所述,ISL 能抑制肝纤维结缔组织增生,缓解肝脏损伤程度,其抗 HF 机制可能与下调 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达有关。是否与调控 HIF-1 α /VEGF 信号通路有关还需要进一步阐明。

参考文献

- [1] 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):1286-95.
- [2] Shenoda B, Boselli J. Vascular syndromes in liver cirrhosis [J]. Clin J Gastroenterol, 2019, 12(5): 387-97.
- [3] 钟培玲,陈英杰,柳臻,等.软肝颗粒抑制血管新生的抗肝纤维化作用机制研究[J].中西医结合肝病杂志,2021,31(1): 30-3.
- [4] 卫霞,宋育林,涂倩倩,等.白藜芦醇改善野百合碱所致大鼠肝损伤机制的初步研究[J].安徽医科大学学报,2022,57(7):1111-5.
- [5] 连小龙,令颖,张尚龙,等.甘草有效成分抗肿瘤作用机制及联合抗肿瘤研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(11):238-45.
- [6] 景晶,赵金英,华冰,等.甘草总黄酮抑制硫代乙酰胺诱导肝纤维化大鼠肝组织中 TGF- β 1 及 Caspase-3 的表达[J].中国中药杂志,2015,40(15):3034-40.
- [7] 蔡凤林,王梅芳,程雪琴,等.异甘草素对体外肺纤维化模型的作用及其机制[J].医药导报,2022,41(2):167-74.
- [8] Liao Y, Tan R Z, Li J C, et al. Isoliquiritigenin attenuates UUO-induced renal inflammation and fibrosis by inhibiting mTOR/Syk/NF- κ B signaling pathway [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 1455-68.
- [9] 孙博蕊,孙杰瑜,李志鹏,等.基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路异甘草素对大鼠颅脑外伤后炎症反应及 Th1/Th2 失衡的影响[J].西部医学,2022,34(6):785-90.
- [10] 李泽宇,郝二伟,李卉,等.甘草配伍应用的药理作用及机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(14):270-82.
- [11] 辛红,孙鹏然,宋鹏,等.异甘草素对人肾透明细胞癌 786-O 细胞抗癌作用及分子机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(12):83-9.

- [12] 章波, 麦琬婷, 檀燕君, 等. 秋水仙碱治疗肝纤维化的网络药理学研究[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(3): 372–9.
- [13] 陈兰羽, 马继征, 刘咏梅, 等. 基于 HIF-1 α 介导的 VEGF mRNA 表达探讨膈下逐瘀汤抗肝纤维化血管新生的机制[J]. 中草药, 2019, 50(2): 449–56.
- [14] Wang Z, Li J, Xiao W, et al. The STAT3 inhibitor S31-201 suppresses fibrogenesis and angiogenesis in liver fibrosis[J]. *Lab Invest* 2018, 98(12): 1600–13.
- [15] 夏雪皎, 林庚庭, 滕飞, 等. 疏肝健脾活血方对肝纤维化大鼠肝组织 HIF-1 α 蛋白及 VEGF mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1357–60.

Therapeutic effect of isoliquiritigenin on rat hepatic fibrosis and its mechanism

Zhang Qi¹, An Zhenxiang^{1,2}, He Yuanli³

(¹The First Clinical Medical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002;

²Dept of Gastroenterology, ³Dept of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001)

Abstract Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of isoliquiritigenin (ISL) on hepatic fibrosis (HF). **Methods** SD rats were randomly divided into normal group, model group, colchicine tablet group (positive control, 0.1 mg/kg), and high-dose and low-dose ISL groups (40, 10 mg/kg). Except for the normal group, the other groups were given intraperitoneal injection of 50% carbon tetrachloride (CCl₄) olive oil solution (1.5 ml/kg) to establish liver fibrosis models, twice a week for 8 weeks. After modeling, rats in each group were given the corresponding drugs by gavage at a volume of 10 ml/kg per day for 4 weeks. After the last administration, the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the serum of rats were determined; liver index was calculated; HE and Masson staining were used to observe the pathological changes of liver tissue; Real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA expression levels of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF); the expressions of HIF-1 α and VEGF protein in liver tissue were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with the normal group, the serum ALT and AST contents of the rats in the model group increased ($P < 0.01$), the liver index increased ($P < 0.01$), the rat fibrous tissue hyperplasia, the collagen volume fraction increased ($P < 0.01$), and the liver the expression levels of HIF-1 α and VEGF mRNA in the tissue increased ($P < 0.01$). Immunohistochemistry and Western blot showed that the expression levels of HIF-1 α and VEGF protein increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the ISL high and low dose groups could reduce the levels of ALT and AST in serum ($P < 0.01$), the liver index ($P < 0.01$), the proliferation of fibrotic tissue and the collagen volume fraction ($P < 0.05$), down-regulate the expression levels of HIF-1 α and VEGF genes ($P < 0.01$). Immunohistochemical detection showed that the high and low dose groups of ISL could reduce the protein expression levels of HIF-1 α ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the expression level of VEGF protein decreased ($P < 0.01$), Western blot detection showed that the high-dose group of ISL could reduce the protein expression levels of HIF-1 α and VEGF ($P < 0.05$). **Conclusion** ISL has a significant therapeutic effect on CCl₄-induced HF model rats, and its mechanism may be related to the regulation of HIF-1 α and VEGF protein expression levels.

Key words hepatic fibrosis; HIF-1 α ; VEGF; isoliquiritigenin