

磨奕玲,周晓玲,刘琳,等.加味济生肾气汤调控 HIF-1 α /Notch 通路改善缺氧抗肝硬化的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(2): 1-12.

Mo YL, Zhou XL, Liu L, et al. Study on the mechanism of Jisheng Shenqi Decoction regulating HIF-1 α /Notch pathway to improve hypoxia and antagonize liver cirrhosis [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(2): 1-12.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.02.001

加味济生肾气汤调控 HIF-1 α /Notch 通路改善 缺氧抗肝硬化的机制研究

磨奕玲¹,周晓玲^{2*},刘琳¹,孙东琪¹,吴腾³,罗艺¹,阮博文¹,
王月明³,贾瑶¹

(1.广西中医药大学,南宁 530001;2.广西中医药大学第一附属医院,南宁 530001;
3.柳州市中医医院,广西 柳州 545000)

【摘要】 目的 探究加味济生肾气汤改善缺氧微环境抗肝硬化的机制。方法 体内实验用 CCl₄ 诱导制备大鼠肝硬化模型,设置正常组、模型组、秋水仙碱组和加味济生肾气汤低、中、高剂量 (JWJSSQ low/medium/high-dose) 组。HE 染色和 Masson 染色观察各组大鼠肝组织病理改变;试剂盒检测各组大鼠血清肝功能变化;ELISA 检测各组大鼠透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白 (laminin, LN)、Ⅲ型前胶原 (procollagen Ⅲ, PCⅢ)、Ⅳ型胶原 (collagen type Ⅳ, COL4) 水平;Western blot 检测大鼠缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、Notch1、Jagged1、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 蛋白表达。体外实验以 HSC-T6 细胞为研究对象, CCK-8 法筛选出 CoCl₂ 培养细胞最适宜 (100 μ mol/L、200 μ mol/L、400 μ mol/L、600 μ mol/L 和 800 μ mol/L) 浓度及含药血清 (5%、10%、15% 和 20%) 最佳干预浓度;划痕试验检测各组细胞迁移能力;流式细胞术检测各组细胞凋亡率变化;Western blot 检测各组细胞内 HIF-1 α 、Notch1、Jagged1、 α -SMA、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) 蛋白表达情况。结果 体内实验:与正常组比较,模型组大鼠肝肿胀、炎性细胞浸润和胶原沉积明显增多,假小叶出现,血清 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、COL4 水平明显增高,ALB 显著降低,肝组织 HIF-1 α 、Notch1、Jagged1、 α -SMA 蛋白表达明显升高 ($P<0.01$),与模型组比较,各治疗组大鼠肝肿胀、炎性细胞浸润和胶原沉积明显减少,纤维化程度减轻,血清 ALT、AST、HA、LN、PCⅢ、COL4 水平明显降低,ALB 显著增高,肝组织 HIF-1 α 、Notch1、Jagged1、 α -SMA 蛋白表达均有不同程度降低 ($P<0.05$);体外实验:缺氧能够促进 HSC-T6 迁移,减少 HSC-T6 凋亡,并提高 HIF-1 α 、Notch1、Jagged1、 α -SMA、TIMP-1 蛋白表达,降低 MMP9 蛋白表达 ($P<0.01$),加味济生肾气汤含药血清能够抑制 HSC-T6 迁移,促进 HSC-T6 凋亡,并降低 HIF-1 α 、Notch1、Jagged1、 α -SMA、TIMP-1 蛋白表达,升高 MMP9 蛋白表达 ($P<0.01$),但其对 HSC-T6 细胞活化抑制的作用可被 HIF-1 α 激动剂 DMOG 逆转。结论 加味济生肾气汤能够通过 HIF-1 α /Notch 通路改善缺氧微环境,进而发挥抗肝硬化的作用。

【关键词】 肝硬化;肝星状细胞;加味济生肾气汤;缺氧微环境;缺氧诱导因子-1 α

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 02-0001-12

【基金项目】 国家自然科学基金 (81760855); 广西自然科学基金 (2025GXNSFAA069382); 广西中医药大学研究生教育创新计划项目 (YCSW2024404, YCBZ2024145); 柳州市科技计划项目 (2023YRZ0102)。

【作者简介】 磨奕玲 (1994—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 肝胆系病证防治。E-mail: 279411394@qq.com

【通信作者】 周晓玲 (1977—), 女, 博士, 硕士生导师, 教授, 主任医师, 研究方向: 消化系统疾病防治。E-mail: zxl_lz@163.com

Study on the mechanism of Jiawei Jisheng Shenqi Decoction regulating HIF-1 α /Notch pathway to improve hypoxia and antagonize liver cirrhosis

MO Yiling¹, ZHOU Xiaoling^{2*}, LIU Lin¹, SUN Dongqi¹, WU Teng³, LUO Yi¹, RUAN Bowen¹,
WANG Yueming³, JIA Yao¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China.

2. the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001.

3. Liuzhou Traditonal Chinese Medical Hospital, Liuzhou 545000)

[Abstract] Objective To explore the mechanism of Jiawei Jisheng Shenqi Decoction in improving the hypoxic microenvironment and antagonizing liver cirrhosis. **Methods** *In vivo* experiments were conducted using a rat model of carbon tetrachloride (CCL₄)-induced liver cirrhosis. Rats were divided into normal, model, colchicine, JWJSSQ low-dose, JWJSSQ medium-dose, and JWJSSQ high-dose group. Pathological changes in liver tissues in each group were examined by hematoxylin and eosin (HE) and Masson staining, changes in serum liver function were detected using test kits, levels of hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen III (PCIII), and collagen type IV (COL4) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and protein expression levels of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), Notch1, Jagged1, and α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected by Western blot. *In vitro* experiments were conducted in HSC-T6 cells, and the optimal concentration of CoCl₂ (100 μ mol/L, 200 μ mol/L, 400 μ mol/L, 600 μ mol/L and 800 μ mol/L) in the cultured cells and the optimal concentration of drug-containing serum (5%, 10%, 15%, 20%) were determined by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. The migration ability of cells in each group was detected by scratch testing, and changes in the apoptosis rates were determined by flow cytometry. Protein expression levels of HIF-1 α , Notch1, Jagged1, α -SMA, matrix metalloproteinase 9 (MMP9), and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) were detected by Western blot. **Results** In the *in vivo* experiments, liver swelling, inflammatory cell infiltration, collagen deposition, and the appearance of pseudolobules were significantly increased in the model group compared with those in the normal group. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), HA, LN, PCIII, and COL4 were significantly increased and albumin (ALB) was significantly decreased in the model group, while liver levels of HIF-1 α , Notch1, Jagged1, and α -SMA proteins were significantly increased ($P < 0.01$). Liver swelling, inflammatory cell infiltration, and collagen deposition were significantly reduced in each treatment group compared with those in the model group, and the degree of fibrosis was reduced. Serum ALT, AST, HA, LN, PCIII, and COL4 were significantly decreased and ALB was significantly increased, while liver levels of HIF-1 α , Notch1, Jagged1, and α -SMA proteins were also significantly decreased to varying degrees ($P < 0.05$). In the *in vitro* experiments, hypoxia promoted HSC-T6 migration and reduced apoptosis, increased the protein expression levels of HIF-1 α , Notch1, Jagged1, α -SMA, and TIMP-1, and reduced the expression levels of MMP9 ($P < 0.01$). Serum containing Jiawei Jisheng Shenqi Decoction inhibited HSC-T6 migration, promoted HSC-T6 apoptosis, lowered the expression of HIF-1 α , Notch1, Jagged1, α -SMA, and TIMP-1 proteins, and enhanced the expression of MMP9 protein ($P < 0.01$). The inhibitory effect of Jiawei Jisheng Shenqi on HSC-T6 cell activation was reversed by the HIF-1 α agonist dimethyloxallylglycine. **Conclusions** Jiawei Jisheng Shenqi Decoction can improve the hypoxic microenvironment via the HIF-1 α /Notch pathway, thereby exerting an anti-liver cirrhosis effect.

[Keywords] liver cirrhosis; hepatic stellate cells; Jiawei Jisheng Shenqi Decoction; hypoxia microenvironment; hypoxia-inducible factor-1 α

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝硬化是由于病毒、酒精、药物、脂质沉积、自身免疫等多种原因对肝的不断刺激,肝星状细

胞(hepatic stellate cells, HSCs)激活,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝内的合成过多,降

解不足,最终引起肝病理结构改变的疾病^[1]。全球每年因肝硬化死亡人数约有 116 万人^[2],约占全球每年疾病死亡原因的 2.4%,对全人类生命健康及社会经济造成了严重威胁。因此,抑制 HSCs 激活及进一步寻找干预其活化机制对于肝硬化的治疗有着重要意义。

研究发现,肝硬化的发生发展常常伴随缺氧的存在^[3]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是介导缺氧反应的核心调控因子^[4-5],缺氧会引起 HIF-1 α 过表达,释放大量炎症因子,致使 HSCs 激活,大量胶原沉积,这是肝硬化形成的核心病理基础^[6]。加味济生肾气汤是根据宋代医家严用和的济生肾气丸化裁而来,具有温补肾阳,化瘀软坚之功。课题组在前期体内研究中证实,本方可有效抑制肝炎症,降低氧化应激,改善肝硬化大鼠肝功能及病理状态^[7-8],但潜在机制仍不明确,故本研究拟从 HIF-1 α /Notch 信号通路着手,构建肝硬化体内外相关模型,通过加味济生肾气汤干预探讨其可能的作用机制,以期为肝硬化的中医治疗提供新方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,4 周龄,体重为 180~200 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [SCXK (湘) 2021 - 0002],合格证号: 430727241102103287;饲养于广西中医药大学动物实验中心 [SYXK (桂) 2024-0004],并在此进行实验。通过广西中医药大学伦理委员会审查 (DW20220710-224),符合 3R 原则。

1.1.2 细胞

大鼠肝星状细胞系 (HSC-T6) 购自中国科学院昆明细胞库,冻存于 -80 °C 条件,培养于 37 °C, 5% CO₂ 的恒温培养箱中。

1.2 主要试剂与仪器

加味济生肾气汤由熟地 40 g、山药 20 g、山茱萸 20 g、茯苓 15 g、泽泻 15 g、丹皮 15 g、制附子 5 g、肉桂 5 g、牛膝 10 g、车前子 10 g、三七 3 g、鳖甲 15 g 组成,以上药材均购自柳州市中医医院中药房。秋水仙碱片购自云南植物药业公司;伊红染色液、苏木素染色液 (中杉金桥生物公司, ZLI-

9613、ZLI-9610); Masson 三色染色试剂盒 (Solarbio 公司, G1340); ALT 试剂盒、AST 试剂盒和 ALB 试剂盒 (南京建成生物科技公司, C009-2-1、C010-2-1、A028-2-1); HA 试剂盒、LN 试剂盒、PC III 试剂盒、COL4 试剂盒 (武汉科鹿生物公司, ELK8487、ELK3050、ELK7301、ELK1712); DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (Gibco 公司, MA0212、10099-141); 二氧化钴 CoCl₂ (Sigma 公司, 232696), 胰蛋白酶、CCK-8 试剂盒 (大连博格林生物公司, KGL2101-100、MA0218-5); 细胞凋亡检测试剂盒 (凯基生物公司, KGA1102-50); HIF-1 α 兔抗、Notch1 兔抗、Jagged1 兔抗、 α -SMA 兔抗、MMP9 兔抗、TIMP-1 兔抗、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (BIOSS 公司, bs-0737R、bs-1335R、bs-23033R、bsm-52396R、bs-20619R、bs-0415R、bs-0295G-HRP); GAPDH 兔抗体 (英国 Abcam 公司, ab181602); HIF-1 α 激动剂 DMOG (MCE 公司, HY-15893)。细胞培养箱 (太仓艺斯高医疗器械科技有限公司); 凝胶电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 酶标仪 (ThermoFisher Scientific 公司); 低温高速离心机 (Beckman coulter 公司); 光学显微镜 (ThermoFisher Scientific 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 体内实验

(1) 大鼠的分组与造模

所有大鼠经适应性饲养 1 周后,随机选取 20 只,再从其中选取 3 只作为正常组,剩下的 17 只大鼠用 40% CCl₄ 橄榄油溶液进行腹腔注射,剂量为 2.0 mL/kg^[9],每周 2 次,共持续 8 周,用以制作肝硬化模型。造模 8 周后,随机选取 2 只大鼠取肝组织验证模型制备是否成功。在成功制作肝硬化模型后,将剩余的 15 只大鼠随机分为 5 组:模型组、秋水仙碱组和加味济生肾气汤低、中、高剂量 (JWJSSQ low/medium/high-dose) 组,每组 3 只。

(2) 干预方法

第 9 周起,模型组予等比生理盐水灌胃,中药组用加味济生肾气汤灌胃,治疗剂量从低到高为依次 0.5 $\times$ 15.57 g/kg、1 $\times$ 15.57 g/kg、2 $\times$ 15.57 g/kg,剂量比值按《人和动物按体表面积折算的等效剂量比值》计算,秋水仙碱组予秋水仙碱按灌胃 0.2 mg/kg^[10],每天 1 次,连续灌胃 6 周。

(3) 肝功能指标检测

按照试剂盒使用说明书步骤,依次进行加样,酶标仪读取 OD 值,最后计算出各组大鼠血清肝功能 ALT、AST、ALB 结果。

(4) 肝组织病理观察

HE 染色:将各组大鼠肝组织切取、固定、包埋、切片处理后,逐级脱蜡至水,用苏木素染色 8 min,反蓝,伊红染色 1 min,流水冲洗。常规脱水,透明,封固,显微镜下观察大鼠肝病理情况。

Masson 染色:将大鼠肝组织切取后进行固定、包埋、切片,用铁苏木素液染色 10 min,Masson 蓝化液复染 5 min,丽春红染色 1 min,苯胺蓝染液中 5 min、再复染 2 min,流水冲洗。逐级脱水,透明,封固,显微镜下观察大鼠肝病理情况。

(5) ELISA 检测各组大鼠 HA、LN、PC III、COL4 水平

严格按照 ELISA 试剂盒操作步骤,依次检测各组大鼠血清 HA、LN、COL4、PC III 水平,酶标仪读取 OD 值,根据标曲计算出各组结果。

(6) Western blot 检测各组大鼠肝组织内 HIF-1 α 、Notch1、Jagged1、 α -SMA 蛋白表达

取大鼠肝组织 30 mg,裂解肝组织后,离心,取上清,BCA 试剂测总蛋白浓度,将蛋白质煮沸变性。取各组蛋白上样,电泳,转膜,加入一抗 HIF-1 α (1:500)、Notch1(1:500)、Jagged1(1:1000)、 α -SMA(1:10 000)和 GAPDH(1:1000)4℃孵育过夜。次日加入二抗(1:10 000)孵育 1 h,ECL 发光液显影,将数据导入 Image J 1.51j8 软件分析结果。

1.3.2 体外实验

(1) 加味济生肾气汤含药血清的制备

按照《人和动物按体表面积折算的等效剂量比值》计算,即大鼠给药剂量为 15.57 g/kg,将 10 只大鼠随机分为空白血清组和含药血清组,每组各 5 只,含药血清组用加味济生肾气汤灌胃,空白血清组用等体积的生理盐水进行灌胃,每天 1 次,连续 1 周。取材前 1 晚禁食禁水,麻醉前 1 h 再次给药,随后进行麻醉,腹主动脉采血,收集血清,并进行灭活,过滤除菌,至-20℃保存备用。

(2) 细胞培养及分组

将 HSC-T6 用完全培养基培养(10%胎牛血清+1%青霉素-链霉素)培养于 37℃、5% CO₂ 的

细胞培养箱中,观察细胞贴壁情况,取对数生长期细胞用于实验。设置正常对照组(空白血清)、缺氧组(CoCl₂ 工作液^[11]+空白血清)、含药血清组(CoCl₂ 工作液+加味济生肾气汤含药血清)、DMOG 组(CoCl₂ 工作液+加味济生肾气汤含药血清+10 μ mol/L DMOG),共 4 组,每组设置 3 个复孔,各组干预 24 h 后进行相关检测。

(3) CCK-8 法筛选

取 HSC-T6 细胞接种于 96 孔板中,调整细胞密度为 5 $\times$ 10³/孔,培养至细胞完全贴壁后弃培养液,实验孔加入不同浓度 CoCl₂(设定浓度为 0 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L、400 μ mol/L、600 μ mol/L 和 800 μ mol/L)的完全培养基于 96 孔细胞培养板中,另设置不含细胞的对照孔,每组 5 个复孔,分别培养 24 h 和 48 h,每孔分别加入 10 μ L CCK8 试剂,孵育 1 h,置于酶标仪内,选择 450 nm 波长,读取 OD 值,计算各组细胞存活率,选择最适宜浓度用于培养缺氧肝星状细胞。

取 HSC-T6 细胞接种于 96 孔板中,调整细胞密度为 5 $\times$ 10³/孔,培养至细胞完全贴壁后更换为基础培养基饥饿 12 h,设置正常对照组、缺氧组和加味济生肾气汤含药血清组(5%、10%、15%、20%),每组 5 个复孔,其中正常对照组加入含 10%空白血清的培养基,含药血清组使用 CoCl₂ 建立 HSC-T6 缺氧模型后,分别加入不同体积分数的含药血清培养 24 h,每孔加入 10 μ L CCK8 试剂,孵育 1 h,置于酶标仪内,选择 450 nm 波长,读取 OD 值,计算各组细胞存活率,选择最适宜中药含药血清干预实验的最佳给药浓度。

(4) 划痕试验检测细胞迁移能力

取各组指数生长期细胞以 1 $\times$ 10⁶/mL 接种于 6 孔板,细胞融合率达 90%后,用 200 μ L 无菌移液枪吸头垂直紧靠直尺,在培养板上划出一条细痕,PBS 洗去漂浮细胞,加入含 2.5%胎牛血清的完全培养基,于 0 h 和 24 h 时记录各组划痕距离变化并拍照记录,计算划痕治愈率 R。R=(W0-W1)/W0 $\times$ 100%,W0:初始宽度,W1:愈合宽度。

(5) 流式细胞术检测细胞凋亡情况

取 HSC-T6 细胞接种于 6 孔板中,调整细胞密度为 5 $\times$ 10⁵/孔,培养至细胞完全贴壁后更换为基础培养基饥饿 12 h。各组细胞干预 24 h 后,调整各组细胞密度为 1 $\times$ 10⁶/mL,用不含 EDTA 的胰

酶消化收集,离心,PBS 清洗 2 次,加入 500 μ L Binding Buffer 重悬,随后分别加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 混匀,在室温下避光反应 10 min,用流式细胞仪进行检测。

(6) Western blot 检测 HSC-T6 细胞内 HIF-1 α 、Notch1、Jagged1、 α -SMA、MMP9、TIMP-1 蛋白表达情况

HSC-T6 细胞以密度为 5×10^5 /孔接种至 6 孔板。培养至细胞完全贴壁后更换为基础培养基饥饿 12 h。各组细胞干预 24 h 后,弃培养基,PBS 洗 2 次,于 4 $^{\circ}$ C 环境下用 PMSF 和 RIPA 裂解液(1 : 100)裂解各组细胞,离心,取上清,测各组样本总蛋白浓度,蛋白质变性后保存。取样品上样,电泳,转膜,加入一抗 HIF-1 α (1 : 500)、Notch1(1 : 500)、Jagged1(1 : 1000)、 α -SMA(1 : 10 000)和 GAPDH(1 : 1000)于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日加入二抗(1 : 10 000)孵育,显影,导入 Image J 1.51j8 软件分析。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 软件分析数据结果,数据服从正态分布时,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组间数据比较采用 LSD-*t* 检验,统计结果以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体内实验

2.1.1 加味济生肾气汤对 CCl₄ 诱导的肝硬化大鼠肝功能的影响

从表 1 可看出,与正常组相比,模型组大鼠血清肝功能 ALT、AST 水平显著升高,ALB 水平显著降低($P<0.01$);与模型组对比,加味济生肾气汤各剂量组大鼠血清肝功能 ALT、AST 水平均降低($P<0.05$),ALB 水平均增高($P<0.05$),其中以高剂量组和秋水仙碱组改善最明显($P<0.01$)。

2.1.2 加味济生肾气汤对 CCl₄ 诱导的肝硬化大鼠肝病理的影响

图 1 中 HE 染色及 Masson 染色结果显示,正常组大鼠的肝细胞结构清晰,未见肝细胞坏死,炎症,纤维化的迹象,肝小叶及肝索沿中央静脉呈放射状分布,表面基本无蓝色胶原纤维;模型组大鼠肝细胞排列紊乱,部分肝细胞炎性浸润、变性坏死,少量脂肪空泡,大片蓝染胶原纤维沉积,肝小叶被纤维间隔包绕形成假小叶;与模型组相比,加味济生肾气汤各剂量组和秋水仙碱组的大鼠肝细胞排列、形态规则性逐步好转,肝炎症、细胞变性明显减轻,蓝染胶原纤维减少、变细,肝纤维化程度明显减轻,其中以高剂量组和秋水仙碱组改善最为显著。以上结果提示加味

表 1 各组大鼠肝功能水平变化($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 1 Changes in liver function levels of rats in each group($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别 Groups	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	ALB/(U/L)
正常组 Normal group	40.62 $\pm$ 6.76	62.41 $\pm$ 4.33	30.38 $\pm$ 1.07
模型组 Model group	131.38 $\pm$ 11.68 ^{##}	167.23 $\pm$ 19.59 ^{##}	19.42 $\pm$ 1.45 ^{##}
加味济生肾气汤低剂量组 JWJSSQ low-dose group	110.48 $\pm$ 9.04 [*]	130.76 $\pm$ 14.71 [*]	22.00 $\pm$ 0.50 [*]
加味济生肾气汤中剂量组 JWJSSQ medium-dose group	99.21 $\pm$ 10.35 ^{**}	117.40 $\pm$ 17.53 ^{**}	24.67 $\pm$ 1.44 ^{**}
加味济生肾气汤高剂量组 JWJSSQ high-dose group	51.29 $\pm$ 5.70 ^{**}	83.64 $\pm$ 14.04 ^{**}	28.79 $\pm$ 0.31 ^{**}
秋水仙碱组 Colchicine group	53.71 $\pm$ 4.00 ^{**}	79.02 $\pm$ 7.65 ^{**}	28.29 $\pm$ 0.83 ^{**}
<i>F</i>	60.03	23.21	52.33
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组相比, ^{##} $P<0.01$;与模型组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

济生肾气汤可减轻 CCl₄ 诱导的大鼠肝硬化。

2.1.3 加味济生肾气汤对 CCl₄ 诱导的大鼠血清 HA、LN、PCⅢ、COL4 水平的影响

如表 2 所示,与正常组比较,模型组大鼠血清 HA、LN、PCⅢ、COL4 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,加味济生肾气汤各剂量组和秋水仙碱组大鼠血清 HA、LN、PCⅢ、COL4 水平显著下降($P<0.05$),其中以加味济生肾气汤高剂量组和秋水仙碱组下降程度最为显著($P<0.01$)。

2.1.4 加味济生肾气汤对 CCl₄ 诱导大鼠肝组织 Notch1、Jagged1、HIF-1 α 、 α -SMA 蛋白表达的影响

如图 2 所示,与正常组比较,模型组大鼠肝组织内 Notch1、Jagged1、HIF-1 α 、 α -SMA 蛋白表达显

著升高($P<0.01$);与模型组比较,加味济生肾气汤各剂量组和秋水仙碱组肝组织内 Notch1、Jagged1、HIF-1 α 、 α -SMA 蛋白表达均降低($P<0.05$),其中以加味济生肾气汤高剂量组和秋水仙碱组降低程度最为显著($P<0.01$)。

2.2 体外实验

2.2.1 CoCl₂ 对 HSC-T6 存活率的影响

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 、600 $\mu\text{mol/L}$ 、800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 作用 24 h、48 h 后细胞存活率均显著下降($P<0.01$),且具有浓度依赖性,其中 100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 干预 HSC-T6 后细胞存活率无明显差异($P>0.05$)(见图 3A)。随后取 0 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、

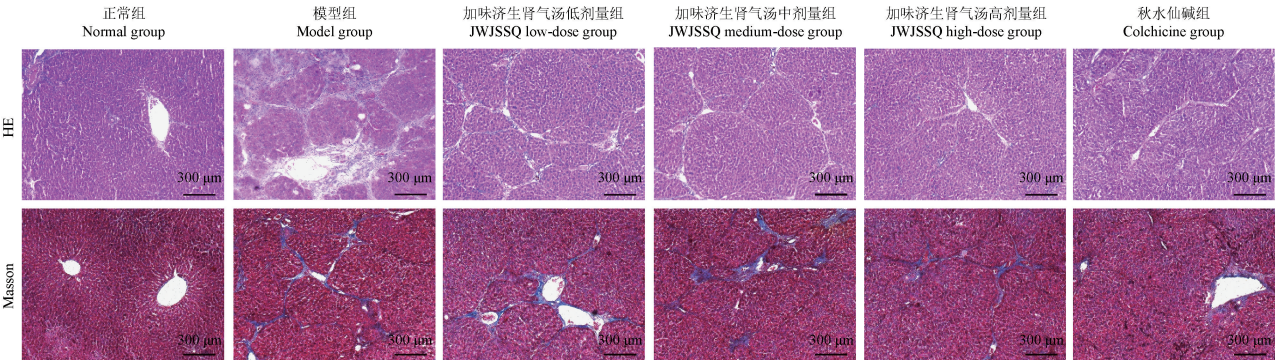


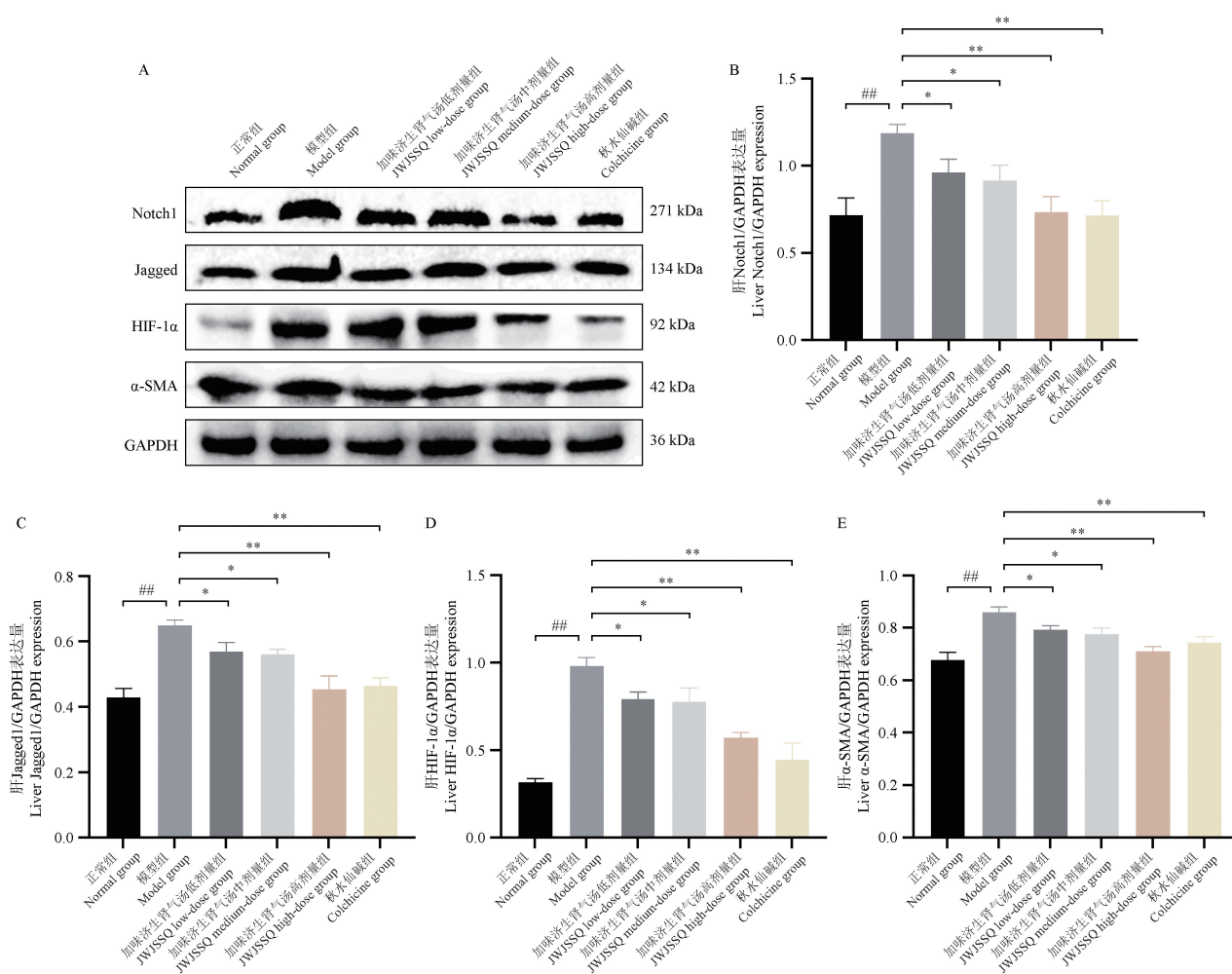
图 1 各组大鼠肝组织病理变化
Figure 1 Pathological changes in liver tissue of rats in each group

表 2 各组大鼠 HA、LN、PCⅢ、COL4 水平变化($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Changes in the levels of HA、LN、PCⅢ、COL4 in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别 Groups	HA/(ng/mL)	LN/(pg/mL)	PCⅢ/(ng/mL)	COL4/(ng/mL)
正常组 Normal group	6.27±0.50	125.94±5.37	1.29±0.25	0.25±0.02
模型组 Model group	57.45±9.89 ^{##}	833.34±64.68 ^{##}	8.59±0.75 ^{##}	1.46±0.06 ^{##}
加味济生肾气汤低剂量组 JWJSSQ low-dose group	41.65±5.15 [*]	454.15±23.54 ^{**}	5.98±0.69 ^{**}	0.94±0.14 ^{**}
加味济生肾气汤中剂量组 JWJSSQ medium-dose group	27.56±5.76 ^{**}	254.38±18.05 ^{**}	4.24±1.05 ^{**}	0.61±0.07 ^{**}
加味济生肾气汤高剂量组 JWJSSQ high-dose group	11.49±1.60 ^{**}	172.66±16.32 ^{**}	2.56±0.51 ^{**}	0.35±0.06 ^{**}
秋水仙碱组 Colchicine group	12.30±2.86 ^{**}	202.09±14.95 ^{**}	2.43±0.45 ^{**}	0.40±0.11 ^{**}
F	43.24	230.00	49.42	84.08
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组相比, ^{##} $P<0.01$;与模型组相比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.



注:A:肝 Notch1、Jagged1、HIF-1 α 、 α -SMA 蛋白相对表达量;B:肝 Notch1/GAPDH 表达量;C:肝 Jagged1/GAPDH 表达量;D:肝 HIF-1 α /GAPDH 表达量;E:肝 α -SMA/GAPDH 表达量。与正常组相比, $^{##}P<0.01$;与模型组相比, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图2 各组大鼠肝组织 Notch1、Jagged1、HIF-1 α 和 α -SMA 蛋白表达的变化($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. A, Relative expression of Notch1, Jagged1, HIF-1 α and α -SMA in liver. B, Expression of Notch1/GAPDH in liver. C, Expression of Jagged1/GAPDH in liver. D, Expression of HIF-1 α /GAPDH in liver. E, Expression of α -SMA/GAPDH in liver. Compared with the normal group, $^{##}P<0.01$. Compared with the model group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 2 Changes in Notch1, Jagged1, HIF-1 α and α -SMA protein expression in liver tissue of rats in each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 干预 24 h 后提取总蛋白,测 HIF-1 α 、 α -SMA 蛋白相对表达量,结果显示,100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 均能显著提高 HSC-T6 内 HIF-1 α 、 α -SMA 蛋白表达($P<0.01$) (见图 3B),且二者无明显差异($P>0.05$),提示二者均可诱导 HSC-T6 缺氧活化。根据以上实验结果,选择 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 24 h 建立 HSC-T6 细胞缺氧模型。

2.2.2 加味济生肾气汤含药血清对 CoCl_2 诱导的 HSC-T6 细胞存活率的影响

如表 3 所示,与正常对照组比较,缺氧组细胞

存活率明显增加($P<0.01$);与缺氧组比较,5%、10%、15%、20%的加味济生肾气汤含药血清对 CoCl_2 诱导的 HSC-T6 存活率均有抑制作用($P<0.01$),其中 15%和 20%的含药血清效果最佳,且两组数据相比无统计学差异($P>0.05$),选择 15%加味济生肾气汤含药血清进行后续实验。

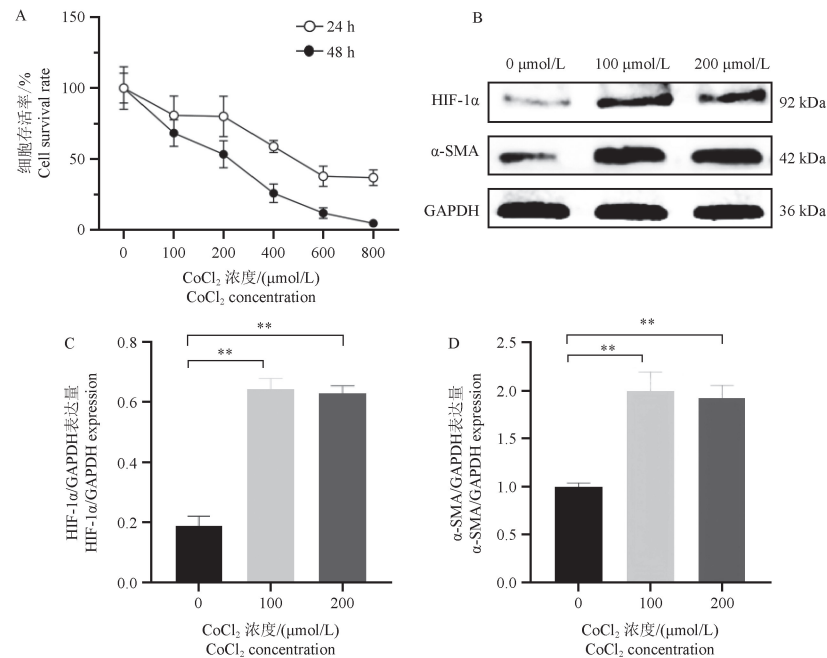
2.2.3 加味济生肾气汤含药血清对 HSC-T6 细胞迁移能力的影响

如图 4 细胞划痕实验显示,与正常对照组比较,干预 24 h 后,缺氧组细胞划痕治愈率明显增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与缺氧组比

较,含药血清组细胞划痕治愈率明显降低 ($P<0.01$)。与含药血清组比较,DMOG 组划痕治愈率明显增加 ($P<0.01$),表明缺氧能显著增加 HSC-T6 的划痕治愈率,而加味济生肾气汤能显著降低缺氧状态下 HSC-T6 的划痕治愈率,当缺氧信号通路被激活后,HSC-T6 细胞的划痕治愈率又

显著增加。
2.2.4 加味济生肾气汤含药血清对 HSC-T6 细胞凋亡的影响

如图 5 流式细胞术检测结果显示,与正常对照组比较,缺氧组细胞凋亡率显著减少 ($P<0.01$);与缺氧组比较,含药血清组细胞凋亡率



注:A:不同浓度 CoCl_2 干预 HSC-T6 24 h 和 48 h 的细胞存活率;B:100 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 干预 HSC-T6 24 h 后 HIF-1 α 和 α -SMA 蛋白相对表达量;C:细胞 HIF-1 α /GAPDH 表达量;D:细胞 α -SMA/GAPDH 表达量。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, ** $P<0.01$ 。

图 3 不同浓度 CoCl_2 对细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Note. A, Intervention of HSC-T6 survival rate with different concentrations of CoCl_2 at 24 h and 48 h. B, Relative expression levels of HIF-1 α and α -SMA proteins after 24 hours of intervention with 100 $\mu\text{mol/L}$ and 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 in HSC-T6. C, Expression of HIF-1 α /GAPDH in liver. D, Expression of α -SMA /GAPDH in liver. Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ group, ** $P<0.01$

Figure 3 Effect of different concentrations of CoCl_2 on cell survival rate ($\bar{x}\pm s, n=6$)

表 3 不同浓度含药血清的细胞存活率变化 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Changes in cell survival rate of serum containing drugs at different concentrations ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Groups	剂量/% Dose	细胞存活率/% Cell survival rate
正常对照组 Normal control group	/	100.00 $\pm$ 2.85
缺氧组 Hypoxia group	/	135.14 $\pm$ 3.15 ^{##}
含药血清组 Medicated serum group	5	120.41 $\pm$ 1.57 ^{**}
	10	108.26 $\pm$ 2.75 ^{**}
	15	82.72 $\pm$ 4.42 ^{**}
	20	79.27 $\pm$ 4.31 ^{**}

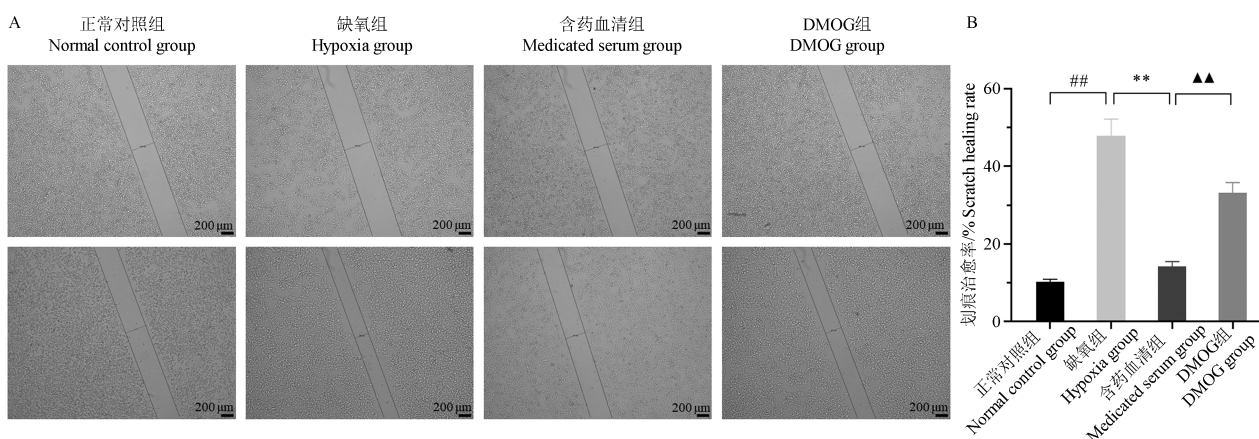
注:与正常对照组相比, ^{##} $P<0.01$;与缺氧组相比, ^{**} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal control group, ^{##} $P<0.01$. Compared with the hypoxia group, ^{**} $P<0.01$.

显著提高($P<0.01$),说明加味济生肾气汤含药血清能够促进缺氧诱导的 HSC-T6 凋亡;与含药血清组比较,DMOG 组细胞凋亡率明显降低($P<0.05$),表明 DMOG 能够阻止加味济生肾气汤导致的细胞凋亡。

2.2.5 加味济生肾气汤含药血清对 HSC-T6 细胞内 HIF-1 α 、Notch1、Jagged1、 α -SMA、MMP9、TIMP-1 蛋白表达情况的影响

如图 6 所示,与正常对照组比较,缺氧组

Notch1、Jagged1、HIF-1 α 、 α -SMA、TIMP-1 蛋白表达显著升高($P<0.01$),MMP9 蛋白表达显著降低($P<0.01$),与缺氧组比较,加味济生肾气汤含药血清组 Notch1、Jagged1、HIF-1 α 、 α -SMA、TIMP-1 蛋白表达均显著降低($P<0.01$),MMP9 蛋白表达显著升高($P<0.01$),与含药血清组比较,DMOG 组 Notch1、Jagged1、HIF-1 α 、 α -SMA、TIMP-1 蛋白表达显著升高($P<0.01$),MMP9 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。

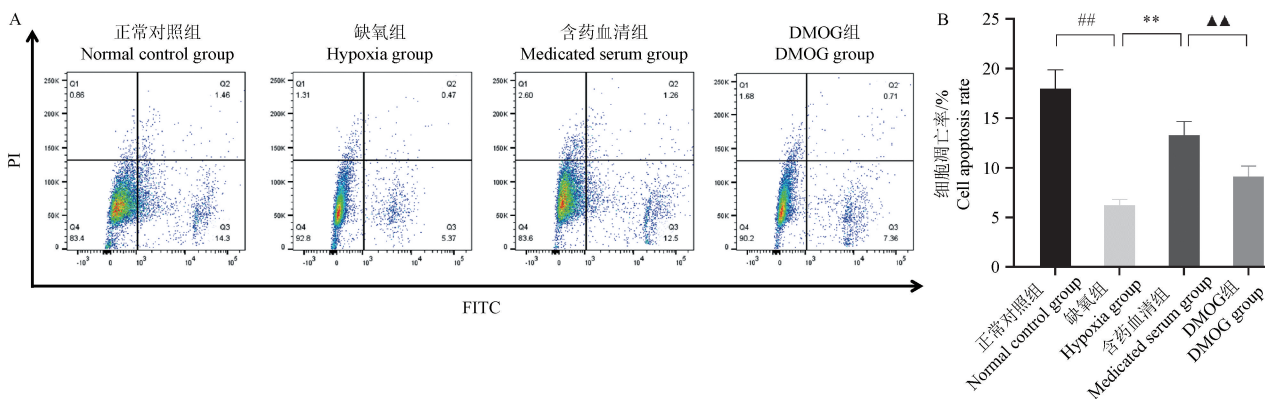


注:A:各组细胞干预 24 h 划痕距离变化;B:各组细胞划痕治愈率变化。与正常对照组相比,## $P<0.01$;与缺氧组相比,** $P<0.01$;与含药血清组相比,▲▲ $P<0.01$ 。

图 4 各组细胞划痕迁移变化($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. A, Changes in scratch distance after 24 h of cell intervention in each group. B, Changes in scratch healing rate of cells in each group. Compared with the normal control group, ## $P<0.01$. Compared with the hypoxia group, ** $P<0.01$. Compared with the medicated serum group, ▲▲ $P<0.01$.

Figure 4 Changes in scratch migration of cells in each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

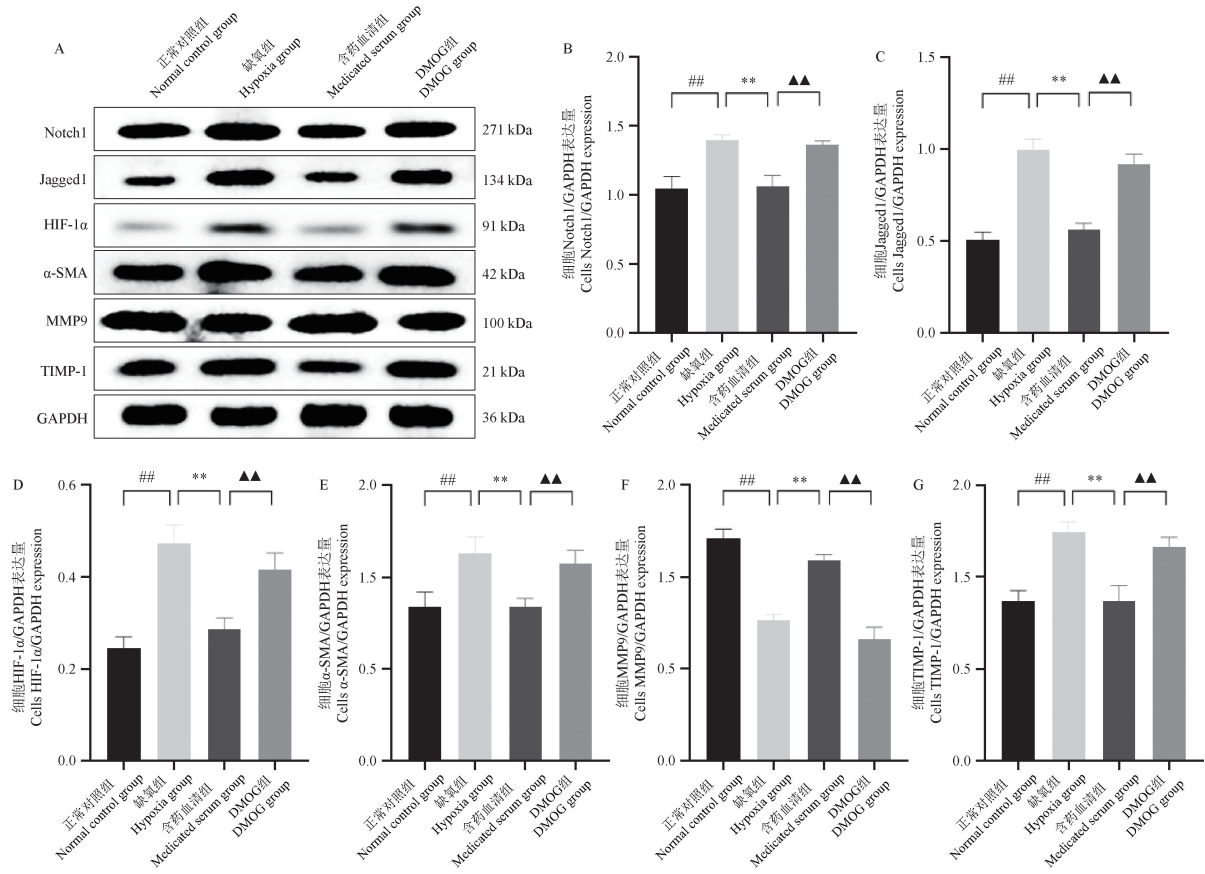


注:A:各组细胞凋亡情况;B:各组细胞凋亡率变化。与正常对照组相比,## $P<0.01$;与缺氧组相比,** $P<0.01$;与含药血清组相比,▲▲ $P<0.01$ 。

图 5 各组细胞凋亡率变化($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. A, Apoptosis status of cells in each group. B, Apoptosis rate of cells in each group. Compared with the normal control group, ## $P<0.01$. Compared with the hypoxia group, ** $P<0.01$. Compared with the medicated serum group, ▲▲ $P<0.01$.

Figure 5 Changes in apoptosis rate of cells in each group($\bar{x}\pm s, n=3$)



注:A:各组细胞 Notch1、Jagged1、HIF-1α、α-SMA、MMP9、TIMP-1 蛋白相对表达量;B:细胞 Notch1/GAPDH 表达量;C:细胞 Jagged1/GAPDH 表达量;D:细胞 HIF-1α/GAPDH 表达量;E:细胞 α-SMA/GAPDH 表达量;F:细胞 MMP9/GAPDH 表达量;G:细胞 TIMP-1/GAPDH 表达量。与正常对照组相比,## $P<0.01$;与缺氧组相比,** $P<0.01$;与含药血清组相比,▲▲ $P<0.01$ 。

图 6 各组细胞内各蛋白表达变化($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. A, Relative expression levels of Notch1, Jagged1, HIF-1α, α-SMA, MMP9, and TIMP-1 proteins in each group of cells. B, Expression level of Notch1/GAPDH in cells. C, Expression level of Jagged1/GAPDH in cells. D, Expression level of HIF-1α/GAPDH in cells. E, Expression level of α-SMA/GAPDH in cells. F, Expression level of MMP9/GAPDH in cells. G, Expression level of TIMP-1/GAPDH in cells. Compared with the normal control group, ## $P<0.01$. Compared with the hypoxia group, ** $P<0.01$. Compared with the medicated serum group, ▲▲ $P<0.01$.

Figure 6 Changes in protein expression of Notch1, Jagged1, HIF-1α, α-SMA, MMP9, and TIMP-1 in cells of each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

3 讨论

肝硬化在祖国医学中一般归属于“积聚”“臌胀”“黄疸”等范畴,在历代多部医著中均有对肝硬化病因病机的详细阐述,并有真武汤、茵陈术附汤、肾气丸、大黄蛰虫丸等经方沿用至今。随着对肝硬化病理机制及临床特征的深入探讨,近代学术界认为肝硬化的病机本质为“邪毒为患,正虚血瘀”,故多以“正虚血瘀”解释肝硬化的病因病机,普遍认为其主要病机特点为湿热瘀毒郁结,导致气机升降失衡,肝失疏泄,脾失运化,日

久累及于肾,肝脾肾三脏俱虚,气血失和,气滞血瘀而致本病。《素问·玉机真藏论》有言肝病“传之于脾,气舍于肾”。《医宗必读》曰:“积之成也,正气不足,而后邪气踞之。”由此可见,历代医家认为肝脾肾虚损进而引起的湿阻水停血瘀是肝硬化的核心病机,其中肝肾不足夹瘀是矛盾的主要方面。至于治疗,则重视补肾生肝,解毒化瘀,如《质疑录》曰:“水者,木之母也,母旺则子强,是以当滋化源。”《素问·阴阳应象大论》云:“北方生寒,寒生水,水生咸,咸生肾,肾生骨髓,髓生肝。”围绕病因病机,肝硬化在治疗上以“补虚”为

本,着重“补肾生髓生肝”,根据肝硬化“肝肾不足夹瘀”病机,团队在前期“补肾生髓”法基础上确立的“补肾化瘀,生髓生肝”治法更符合肝硬化中医治疗的核心法则。基于此研究团队在沿用济生肾气汤基础上,从院内制剂乙肝转阴散拆方中将三七-鳖甲药对加入,组成加味济生肾气汤,方中内含六味地黄丸补肾填精,又加制附子、肉桂可以补肾中元阳,化气利水同时助肝升发之力,加川牛膝、车前子可以泄肾浊、通利三焦水道,助肾精输布以助髓生肝^[12],三七、鳖甲活血化瘀、软坚散结,全方共奏补肾生髓、软肝散结、化瘀利湿之效,切合肝硬化中医治疗的“补肾化瘀,生髓生肝”原则。加味济生肾气汤长期应用于肝硬化治疗中,临床疗效显著。研究表明加味济生肾气汤能够降低肝硬化患者肝硬度值、门静脉内径、脾静脉内径、脾厚度及长度等指标,改善患者临床症状;在动物实验中,能下调肝硬化大鼠血清中 TGF- β 1、TNF- α 、IL-6 等炎症因子表达而抗肝硬化^[12]。

缺氧是急慢性肝病重要的微环境特征,肝的高能量消耗也使其极易受到低氧或缺氧的影响。在病毒感染、药物、脂肪变性或自身免疫攻击等因素作用下,肝组织损伤部位大量免疫细胞浸润,驻留的炎症细胞的生理活动增加了氧需求,并且分泌大量炎症因子影响肝细胞线粒体呼吸链功能,从而导致肝硬化的进一步加重^[13]。在部分细胞因子、受损肝细胞产物的作用下,HSCs 活化为肌成纤维细胞,增殖和产生胶原,这是导致肝纤维化发生、缺氧微环境最终形成的关键步骤^[14]。实验也证实了缺氧条件下培养的 HSCs 系细胞 LX-2 增殖活跃且合成胶原纤维增加^[15]。HIF-1 α 是细胞在微环境中对缺氧应答的关键调节因子,当细胞处在缺氧条件下,PHD 氧底物缺乏,HIF-1 α 羟基化受抑制,导致 HIF-1 α 大量积累并易位到细胞核,与 HIF-1 β 结合形成异二聚体,该二聚体与靶基因启动子区域内的缺氧反应元件(hypoxia response elements, HRE)结合,参与细胞增殖、转移、糖酵解、血管生成等数百个基因的转录^[16-19]。Notch 信号通路的激活与 HIF-1 α 的泛素化减少密切相关。JÖGI 等^[20]研究发现,在缺氧诱导的转录组分析中,Notch 靶基因的表达被上调,表明 Notch 信号与细胞的缺氧反应之间

存在关联。Notch 信号通路由 4 个受体(Notch1~4)和 5 个经典配体(Delta-like(DLL)1、DLL3、DLL4、Jagged(JAG)1 和 JAG2)组成^[21]。研究提示,缺氧环境中 HIF-1 α 的高表达刺激 Jagged1 基因水平增加是细胞内 HIF-1 α 调控 Notch 通路的主要机制之一^[22]。当阻断肝星状细胞 HIF-1 α /Notch 信号,可观察到肝星状细胞向成纤维细胞分化受到抑制,合成 I 型胶原、 α -SMA 等细胞外基质的能力下降,可见 HIF-1 α /Notch 通路在肝纤维化进程中至关重要。此外,HSCs 迁移运动除由细胞因子诱导外,其自身细胞形态的转变及细胞骨架的改变对运动迁移也起着决定性的作用。HSCs 活化标志是细胞由圆形伸展变形为星芒状的肌成纤维细胞,其细胞生物学行为类似肿瘤细胞功能,能够促进迁移,这一过程可能依赖于细胞骨架的重构完成^[23-24]。因此,HSC-T6 的迁移从另外角度也能进一步说明与其活化相关。此外,通过抑制金属蛋白酶组织抑制因子 TIMP-1 的蛋白表达和促进 MMP9 的蛋白表达,能够抑制其细胞外基质的过度积聚,促进其降解,改善纤维化程度,最终发挥其抗肝硬化的疗效。

本研究发现,在肝硬化大鼠模型组肝细胞变性明显,纤维间隔产生,炎性细胞浸润,HA、LN、PC III、COL4 水平显著升高,HIF-1 α 、Notch1、Jagged1、 α -SMA 蛋白高表达,提示 HIF-1 α /Notch 通路激活,肝硬化造模成功,而经加味济生肾气汤治疗后,各治疗组大鼠肝肿胀、炎性细胞浸润和胶原沉积显著减少,HA、LN、PC III、COL4 水平显著降低,HIF-1 α 、TIMP-1、Notch1、Jagged1、 α -SMA 蛋白表达显著下降。CoCl₂ 能够活化 HSC-T6,使用 DMOG 能激活 HIF-1 α /Notch 信号通路,而 15%的加味济生肾气汤含药血清干预后,能明显抑制 HSC-T6 迁移,促进 HSC-T6 凋亡,下调 HIF-1 α 、TIMP-1、Notch1、Jagged1、 α -SMA 蛋白表达,上调 MMP9 蛋白表达,表明加味济生肾气汤可通过抑制 HIF-1 α /Notch 信号通路,改善缺氧微环境,抑制肝星状细胞活化,并促进细胞外基质降解,而达到抗肝硬化的治疗目的。

参考文献:

- [1] GINÈS P, KRAG A, ABRALDES J G, et al. Liver cirrhosis [J]. Lancet, 2021, 398(10308): 1359-1376.

- [2] 王宪波, 高方媛, 刘尧, 等. 肝硬化中医诊疗指南 [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(3): 461-472.
WANG X B, GAO F Y, LIU Y, et al. Guidelines for traditional Chinese medicine diagnosis and treatment of liver cirrhosis [J]. J Clin Hepatol, 2024, 40(3): 461-472.
- [3] NING L, ZOU Y, LI S, et al. Anti-PCSK9 treatment attenuates liver fibrosis via inhibiting hypoxia-induced autophagy in hepatocytes [J]. Inflammation, 2023, 46(6): 2102-2119.
- [4] VATTE S, UGALE R. HIF-1, an important regulator in potential new therapeutic approaches to ischemic stroke [J]. Neurochem Int, 2023, 170: 105605.
- [5] 于海洋, 卢增鹏, 汪海燕, 等. 激素性股骨头坏死中 Hif-1 α /VEGF 信号轴和 H 型血管改变的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 759-766.
YU H Y, LU Z P, WANG H Y, et al. Changes in Hif-1 α /VEGF signal axis and type-H vessels in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 759-766.
- [6] ZHANG M, SERNA-SALAS S, DAMBA T, et al. Hepatic stellate cell senescence in liver fibrosis: Characteristics, mechanisms and perspectives [J]. Mech Ageing Dev, 2021, 199: 111572.
- [7] 钟镇康, 周晓玲, 王月明, 等. 济生肾气汤加三七、鳖甲对 CCL₄ 诱导肝纤维化大鼠模型的干预作用及机制 [J]. 海南医学院学报, 2022, 28(10): 742-749.
ZHONG Z K, ZHOU X L, WANG Y M, et al. Intervention effect and mechanism of Jisheng Shenqi Decoction plus *Panax notoginseng* and Bionjia on CCL₄-induced hepatic fibrosis rat model [J]. J Hainan Med Univ, 2022, 28(10): 742-749.
- [8] 王月明. 基于 PI3K/AKT/HIF-1 α 信号通路探讨温肾化瘀法治疗肝硬化的作用机制 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2022.
WANG Y M. Study on the mechanism of warming kidney and dispersing blood stasis in the treatment of liver cirrhosis based on PI3K/AKT/HIF-1 α signaling pathway [D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2022.
- [9] 潘富珍, 曹洪欣, 张永生, 等. 清肝健脾活血方通过调控 M1/M2 型巨噬细胞治疗肝纤维化大鼠的作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(21): 94-102.
PAN F Z, CAO H X, ZHANG Y S, et al. Analysis of mechanism of Qinggan Jianpi Huoxue prescription in treatment of hepatic fibrosis rats by regulating M1/M2 macrophages [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(21): 94-102.
- [10] LI D, MA D, LIU Y, et al. Extracts of *Periplaneta americana* alleviate hepatic fibrosis by affecting hepatic TGF- β and NF- κ B expression in rats with pig serum-induced liver fibrosis [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2022, 60(2): 125-135.
- [11] ZHANG L, GAO J, ZHOU D, et al. Profiles of messenger RNAs and microRNAs in hypoxia-induced hepatic stellate cells [J]. Ann Transl Med, 2021, 9(18): 1451.
- [12] 刘娟, 初杰. 解析六味地黄丸 [J]. 中医药信息, 2014, 31(5): 87-89.
LIU J, CHU J. Analysis of Liuwei Dihuang pills [J]. Inf Tradit Chin Med, 2014, 31(5): 87-89.
- [13] LI X, ZHANG Q, WANG Z, et al. Immune and metabolic alterations in liver fibrosis: a disruption of oxygen homeostasis? [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 802251.
- [14] WANG P, FANG Y, QIU J, et al. miR-345-5p curbs hepatic stellate cell activation and liver fibrosis progression by suppressing hypoxia-inducible factor-1 α expression [J]. Toxicol Lett, 2022, 370: 42-52.
- [15] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(3): 151-166.
- [16] LU J, ZHAO Y L, ZHANG X Q, et al. The vascular endothelial growth factor signaling pathway regulates liver sinusoidal endothelial cells during liver regeneration after partial hepatectomy [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 15(2): 139-147.
- [17] WU W, HU Z, ZHAO Q, et al. Down-regulation of hypoxia-inducible factor-1 α and downstream glucose transporter protein-1 gene by β -elemene enhancing the radiosensitivity of lung adenocarcinoma transplanted tumor [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 11627-11635.
- [18] SHIH H M, WU C J, LIN S L. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells [J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(11): 955-963.
- [19] 张静远, 姜晓龙, 崔淑芳. 基于 CRISPR/Cas9 系统构建裸鼯鼠 HIF-1 α 基因敲除质粒及其功能验证 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 202-209.
ZHANG J Y, JIANG X L, CUI S F. Construction of HIF-1 α gene knockout plasmid and functional verification in naked mole rats based on CRISPR/Cas9 system [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 202-209.
- [20] JÖGI A, ØRA I, NILSSON H, et al. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(10): 7021-7026.
- [21] SPRINZAK D, BLACKLOW S C. Biophysics of Notch signaling [J]. Annu Rev Biophys, 2021, 50: 157-189.
- [22] ZHANG Y, LIU Q, YANG S, et al. Knockdown of LRRN1 inhibits malignant phenotypes through the regulation of HIF-1 α /Notch pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 23: 51-64.
- [23] KRIZHANOVSKY V, YON M, DICKINS R A, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis [J]. Cell, 2008, 134(4): 657-667.
- [24] DORMANN D, WEIJER C J. Imaging of cell migration [J]. EMBO J, 2006, 25(15): 3480-3493.