

阿魏酸钠对乙醛诱导的肝星状细胞增殖、活化和胶原合成的影响

张志毕¹, 蔡婷², 缪紫娥³, 徐哲³, 冯国华^{1*}

(1. 昆明医科大学 生物医学工程研究中心, 昆明 650500;

2. 昆明医科大学 第一附属医院, 昆明 650032; 3. 昆明医科大学 药学院, 昆明 650500)

[摘要] 目的:研究阿魏酸钠(SF)对体外乙醛诱导的大鼠肝星状细胞(HSC-T6)增殖、活化、胶原合成的影响及其作用机制。方法:体外培养 HSC-T6 细胞,建立乙醛诱导的 HSC-T6 增殖模型,设空白组、乙醛组、秋水仙碱组($2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及 SF 组($1, 10, 25, 50, 100, 200, 400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),通过细胞增殖和毒性检测(MTS)比色法检测细胞增殖,筛选合适的 SF 浓度。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 SF($400, 200, 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对乙醛诱导的 HSC-T6 细胞 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 I 型, III 型胶原浓度,酸水解法检测羟脯氨酸(Hyp)含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),信号转导蛋白 Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, 基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)基因 mRNA 表达变化。结果:与空白组比较, $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙醛能显著诱导 HSC-T6 体外增殖($P < 0.01$);与空白组比较,模型组 HSC-T6 增殖显著增加($P < 0.01$), α -SMA 和 I 型, III 型胶原和 Hyp 含量显著增加($P < 0.01$), TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 mRNA 的表达显著上调($P < 0.01$), MMP-1 和 TIMP-1 mRNA 表达显著上调($P < 0.01$)。与模型组比较, $400, 200, 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 SF 能明显抑制乙醛诱导的 HSC-T6 增殖($P < 0.05, P < 0.01$),显著降低 α -SMA 和 I 型, III 型胶原和 Hyp 含量($P < 0.01$),下调 TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4 基因 mRNA 的表达($P < 0.05, P < 0.01$),上调 Smad7 基因 mRNA 表达($P < 0.01$),并明显上调 MMP-1 mRNA 表达($P < 0.05, P < 0.01$)和下调 TIMP-1 mRNA 表达($P < 0.01$)。结论:SF 能通过调控 TGF- β_1 /Smad 和 MMP-1/TIMP-1 信号通路,抑制乙醛诱导的体外 HSC-T6 细胞的增殖,活化和胶原分泌。

[关键词] 阿魏酸钠; 肝星状细胞(HSC-T6); 乙醛; 细胞增殖; 活化; 胶原

[中图分类号] R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0123-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181132

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180314.1632.004.html>

[网络出版时间] 2018-03-14 17:30:58

Effect of Sodium Ferulate on Proliferation, Activation and Collagen Synthesis of Hepatic Stellate Cells Induced by Acetaldehyde

ZHANG Zhi-bi¹, CAI Ting², MIAO Zi-e³, XU Zhe³, FENG Guo-hua^{1*}

(1. Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

2. The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China;

3. School of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of sodium ferulate (SF) on the proliferation, activation and collagen synthesis of rat hepatic stellate cells (HSC-T6) induced by acetaldehyde *in vitro* and explore its mechanism. **Method:** HSC-T6 cells were cultured *in vitro* to establish acetaldehyde-induced HSC-T6 proliferation

[收稿日期] 20180117(013)

[基金项目] 云南省教育厅基金重点项目(2013Z112);昆明医科大学本科生创新项目

[第一作者] 张志毕, 硕士, 实验师, 从事药理学研究, Tel:0871-5922653, E-mail:350248256@qq.com

[通信作者] *冯国华, 实验师, 从事药理学研究, Tel:0871-65922953, E-mail:144169717@qq.com

models. The rats were divided into blank group, acetaldehyde group, colchicine group ($2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and SF groups (1, 10, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). HSC-T6 proliferation was measured by MTS method and the appropriate SF concentration was screened. The effect of SF (400, 200, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in HSC-T6 cells induced by acetaldehyde was detected by Western blot; type I and type III collagen concentrations were detected by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the Hydroxyproline (Hyp) content was detected by hydrolysis method; mRNA expression levels of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), signal transducers Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, Matrix metallo proteinase 1 (MMP-1) and tissue inhibitors of metallo proteinase-1 (TIMP-1) were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** As compared with the blank group, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ acetaldehyde significantly induced HSC-T6 proliferation *in vitro* ($P < 0.01$). As compared with the blank group, the proliferation of HSC-T6 in model group was significantly increased ($P < 0.01$), and the contents of α -SMA, type I, type III collagen and Hyp were significantly increased ($P < 0.01$), the mRNA expression levels of TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4 and Smad7 as well as mRNA expression levels of MMP-1 and TIMP-1 were significantly up-regulated ($P < 0.01$). As compared with the model group, SF at concentrations of 400, 200, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly inhibited acetaldehyde-induced HSC-T6 proliferation ($P < 0.05$, $P < 0.01$), significantly decreased α -SMA, type I and type III collagen and Hyp contents ($P < 0.05$, $P < 0.01$), down-regulated the mRNA expression of TGF- β_1 , Smad2, Smad3 and Smad4 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), up-regulated the mRNA expression of Smad7 mRNA ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and down-regulated the mRNA expression of TIMP-1 ($P < 0.01$). **Conclusion:** SF can inhibit proliferation, activation and collagen secretion of HSC-T6 induced by acetaldehyde *in vitro* by regulating TGF- β_1 /Smads and MMP-1/TIMP-1 signaling pathways.

[**Key words**] sodium ferulate; hepatic stellate cells (HSC-T6); acetaldehyde; proliferation; activation; collagen

酒精性肝病是由酒精及其代谢产物的细胞毒性导致的肝细胞损伤,其病程发展顺序为酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化、酒精性肝硬化、肝癌^[1]。其中酒精性肝纤维化(alcohol hepatic fibrosis, AHF)主要是由于酒精代谢产物乙醛的毒性作用下,导致肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)异常沉积的病理变化^[2]。肝纤维化是一个可逆的过程,若纤维化发展到肝硬化,则不可逆转,所以如果能有效的控制 AHF 的发生和发展,就能大大降低肝硬化发生的概率。HSC 的活化和增殖是在各种刺激因素的作用下, HSC 由静止状态转化为激活状态,是 AHF 发生的中心环节^[3]。所以控制 HSC 的激活和增殖是治疗肝纤维化的关键。

阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)是提取自当归、川芎等药材的水溶性有效单体,具有抗氧化、抗氧化、活血化瘀、抑制肾小管纤维化等活性^[4-5],目前已开发为临床用药^[6]。研究发现 SF 对四氯化碳(CCl_4)和胆管结扎所诱导的大鼠肝纤维化具有保护作用^[7-8],但这些研究模型的造模方法与生活中导致肝纤维化发生病因具有一定差距。AHF 属于

常见的肝纤维化种类之一,目前关于 SF 对 AHF 是否具有保护作用目前还未见报道。为了解 SF 对 AHF 是否具有疗效,所以本研究通过建立体外乙醛诱导 HSC-T6 激活和增殖模型,研究 SF 对乙醛诱导的 HSC 活化和增殖和胶原分泌是否具有抑制作用,并探讨其作用机制,为 SF 在治疗 AHF 方面的应用提供研究细胞水平的研究基础。

1 材料

1.1 实验细胞 HSC-T6 细胞株由中国科学院上海细胞库提供。

1.2 药物及试剂 SF(大连美仑生物技术有限公司,纯度 >99%,批号 2016032205);40% 甲醛(成都科龙化工试剂厂,批号 2016082501);秋水仙碱(西双版纳药业责任有限公司,批号 160805);高糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司,批号 AB10155403);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 1625403);胰酶(北京全式金生物技术有限公司,批号 F20341);细胞增殖和毒性检测(MTS)试剂盒(上海贝博生物公司,批号 BB18011X);大鼠 I 型, III 型胶原酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)兔抗一抗及抗兔二抗(武汉华美

生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 仪器 HP80 型细胞培养箱, Centrifuge 5804R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Synergy2 型多功能酶标仪(美国 Biotek 公司); ND-1000 型核酸蛋白检测仪(美国 BDT 公司); GCZX3 型垂直电泳仪及转膜仪, ACCURI C6 型化学发光仪(美国 BD 公司); QuantStudioTM 6 Flx 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HSC-T6 细胞培养于 H-DMEM 培养基中(含 10% 胎牛血清, 1×10^5 U·L⁻¹ 青霉素和 100 mg·L⁻¹ 链霉素), 培养条件 37 °C 5% CO₂ 培养箱。

2.2 乙醛诱导 HSC-T6 细胞增殖模型^[9] 设空白组和乙醛组(乙醛浓度分别为 1, 10, 50, 100, 200, 400 μmol·L⁻¹)。取对数生长期 HSC-T6 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 5×10^3 个细胞, 每组设 10 个重复孔。细胞培养 24 h, 更换为无血清培养基培养, 同步化处理 24 h, 加入对应浓度的乙醛, 空白组加入等量生理盐水, 继续培养 24 h 后通过 MTS 检测细胞增殖情况。

2.3 SF 对 HSC-T6 增殖检测 设空白组, 模型组, 秋水仙碱组(1.0 mg·L⁻¹), SF 组(1, 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800 μmol·L⁻¹)。取对数生长期 HSC-T6 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 5×10^3 个细胞, 每组设 10 个重复孔。细胞培养 24 h, 更换为无血清培养基培养, 同步化处理 24 h 后, 模型组加入 200 μmol·L⁻¹ 乙醛, 秋水仙碱组和 SF 组加入 200 μmol·L⁻¹ 乙醛和相应浓度的药物, 空白组加入等量生理盐水。继续培养 24 h 后通过 MTS 检测细胞增殖情况。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HSC-T6 α-SMA 蛋白的表达 设空白组、模型组、秋水仙碱组及 SF 组(100, 200, 400 μmol·L⁻¹)。取对数生长期 HSC-T6 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 1×10^5 个细

胞, 每组设 3 个重复孔。细胞培养 24 h, 更换为无血清培养基培养, 同步化处理 24 h 后, 模型组加入 200 μmol·L⁻¹ 乙醛、秋水仙碱组和 SF 组加入 200 μmol·L⁻¹ 乙醛和相应浓度的药物, 空白组加入等量生理盐水。继续培养 24 h 后显微镜观察细胞形态并拍照。收集细胞, 加入 RIPA 裂解细胞, 提取细胞总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。每组取蛋白 50 μg, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(90 V, 100 min), 电泳结束后切出目的条带, 湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 α-SMA 一抗(1:1 万), 4 °C 孵育过夜, 洗膜 5 次后加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:1 万), 室温孵育 1 h, 洗膜 3 次后 ECL 化学发光检测, 以 β-肌动蛋白(β-actin)蛋白为内参, Image J 软件分析 α-SMA 蛋白相对表达量。

2.5 ELISA 检测 HSC-T6 胶原含量 细胞处理同 2.4 项, 处理结束后取细胞培养液, 根据 ELISA 试剂盒说明检测细胞培养液中 I 型, III 型胶原含量, 酸水解法检测 Hyp 含量。

2.6 Real-time PCR 检测 HSC-T6 细胞转化生长因子-β₁(TGF-β₁), 信号转导蛋白(Smad) 2, Smad3, Smad4, Smad7, 基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1) mRNA 表达 细胞处理同 2.4 项, 处理结束后收集细胞, 根据 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 检测 RNA 浓度和质量, 逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 用 2^{-ΔΔC_t} 法计算基因的相对表达量。Real-time PCR 反应条件为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。反应总体积为 20 μL。引物信息见表 1。

2.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行数据统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 one way ANOVA 处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 乙醛诱导 HSC-T6 增殖模型评价 不同浓度的乙醛处理 HSC-T6 细胞, 能不同程度的促进细胞增殖, 且呈现剂量关系, 其中 200 μmol·L⁻¹ 的乙醛对 HSC-T6 增殖的促进作用最为显著($P < 0.01$), 故后续实验选择该浓度来诱导建立 HSC-T6 细胞增殖模型。见表 2。

3.2 对乙醛诱导的 HSC-T6 细胞形态和增殖的影响 药物剂量筛选结果发现, 与模型组比较, 秋水仙碱和 SF(400, 200, 100, 50 μmol·L⁻¹) 能明显抑制乙醛诱导的 HSC-T6 增殖($P < 0.05$, $P < 0.01$), 后面

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称	基因序列号	引物序列(5'-3')		产物长度/bp
		上游引物	下游引物	
TGF-β ₁	NM_021578.2	CTTGCCCTCTAGAACCAACA	CTTGCGACCCACGTAGTAGA	102
Smad2	XM_006254946.3	AGTGTTTGCCGAGTGCCTAAGTG	GAGCAGCAAATTCTTGTTGTTGA	146
Smad3	XM_008766216.2	TAGCACAGGCTCTTTGGATG	GAAGCAGAGACTGGGTCTCTC	93
Smad4	NM_019275.3	GTGGCTGGTCGGAAAGGAT	CCTGGGTAAGGATGGCTGT	273
Smad7	NM_030858.1	TGCTGTGCAAAGTTCAGGTG	CCATCGGTATCTGGAGTAAGGA	177
MMP-1	NM_001134530.1	TCAGCATGCTTAGCCTTCCT	TAGCTTGACGTCTTCACCC	150
TIMP-1	NM_053819.1	CCACAGGTTCCGGTTCGCCTACA	GCACACCCACAGCCAGCACTAT	218
β-actin	NM_031144.3	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTAATGTACGACGAGATTTC	150

表 2 乙醛对 HSC-T6 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of acetaldehyde on proliferation of HSC-T6 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	乙醛浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A
空白	-	0.82 ± 0.11
模型	400	1.38 ± 0.15 ²⁾
	200	1.42 ± 0.11 ²⁾
	100	1.36 ± 0.14 ²⁾
	50	1.01 ± 0.19 ¹⁾
	20	0.92 ± 0.21 ¹⁾
	10	0.91 ± 0.12 ¹⁾
	5	0.85 ± 0.08

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

以 400, 200, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为 SF 的有效剂量。见表 3。从细胞形态上来看,空白组细胞体积较大,细胞多呈梭型;模型组细胞生长密集,细胞间连接紧密;与模型组比较,秋水仙碱和 SF 组,细胞增殖程度降低,部分细胞变圆、漂浮,贴壁细胞形态与空白组相似。见图 1。

表 3 SF 对乙醛诱导的 HSC-T6 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of SF on HSC-T6 proliferation induced by acetaldehyde ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A
空白	-	0.85 ± 0.15
模型	-	1.44 ± 0.21 ²⁾
秋水仙碱	2.5	1.18 ± 0.13 ⁴⁾
SF	400	1.20 ± 0.13 ⁴⁾
	200	1.26 ± 0.16 ⁴⁾
	100	1.29 ± 0.11 ³⁾
	50	1.33 ± 0.09 ³⁾
	25	1.41 ± 0.15
	10	1.40 ± 0.22
	1	1.45 ± 0.23

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4~6 同)。

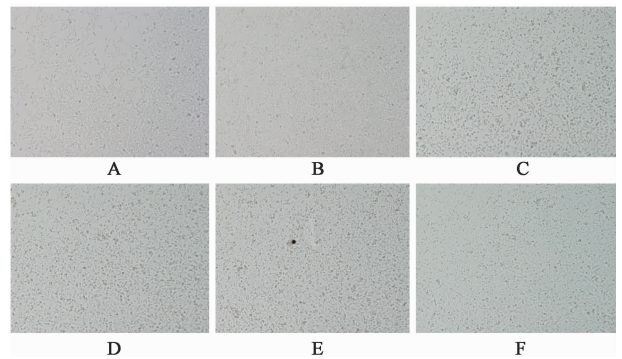


图 1 SF 对 HSC-T6 细胞形态的影响(电子显微镜, $\times 200$)

Fig.1 Effect of SF on HSC-T6 morphology(EMS, $\times 200$)

3.3 对乙醛诱导的 HSC-T6 α -SMA 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 HSC-T6 内 α -SMA 表达显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱和 SF 都能显著降低 HSC-T6 内 α -SMA 蛋白的表达($P < 0.01$)。见图 2 和表 4。

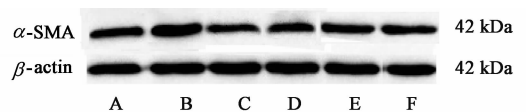


图 2 SF 对 HSC-T6 细胞 α -SMA 蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of SF on expression of α -SMA protein in HSC-T6

3.4 对乙醛诱导的 HSC-T6 I 型, III 型胶原和 Hyp 含量的影响 与空白组比较,模型组细胞 I 型, III 型胶原和 Hyp 含量都显著增加($P < 0.01$),表明乙醛能诱导 HSC-T6 胶原合成的增加。与模型组比较,秋水仙碱和 SF 各浓度组都能明显降低 HSC-T6 胶原和 Hyp 含量($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5。

3.5 对乙醛诱导的 HSC-T6 细胞 TGF-β₁, Smad 2, Smad 3, Smad 4, Smad 7, MMP-1, TIMP-1

表 4 SF 对 HSC-T6 细胞 α -SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of SF on expression of α -SMA protein in HSC-T6 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	α -SMA/ β -actin
空白	-	0.74 \pm 0.14
模型	-	1.23 \pm 0.11 ²⁾
秋水仙碱	2.5	0.42 \pm 0.15 ⁴⁾
SF	400	0.49 \pm 0.16 ⁴⁾
	200	0.72 \pm 0.13 ⁴⁾
	100	0.77 \pm 0.17 ⁴⁾

表 5 SF 对 HSC-T6 细胞 I 型, III 型胶原, Hyp 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of SF on type I and III collagens, Hyp content in HSC-T6 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	I 型胶原/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	III 型胶原/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Hyp/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	19.23 \pm 1.46	16.32 \pm 1.26	1.26 \pm 0.06
模型	-	34.26 \pm 1.56 ²⁾	26.37 \pm 1.32 ²⁾	2.39 \pm 0.13 ²⁾
秋水仙碱	2.5	22.37 \pm 1.43 ⁴⁾	18.69 \pm 1.29 ⁴⁾	1.51 \pm 0.16 ⁴⁾
SF	400	25.28 \pm 1.23 ⁴⁾	18.67 \pm 1.33 ⁴⁾	1.49 \pm 0.18 ⁴⁾
	200	29.34 \pm 1.69 ⁴⁾	19.26 \pm 1.15 ⁴⁾	1.62 \pm 0.14 ⁴⁾
	100	30.06 \pm 1.21 ³⁾	22.31 \pm 1.09 ⁴⁾	1.88 \pm 0.18 ⁴⁾

表 6 SF 对 HSC-T6 细胞 TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, MMP-1, TIMP-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of SF on mRNA levels of TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, MMP-1, TIMP-1 in HSC-T6 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TGF- β_1	Smad2	Smad3	Smad4	Smad7	MMP-1	TIMP-1
空白	-	1.01 \pm 0.09	1.01 \pm 0.05	1.01 \pm 0.07	1.01 \pm 0.10	0.99 \pm 0.04	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.10
模型	-	2.13 \pm 0.23 ²⁾	2.11 \pm 0.22 ²⁾	1.99 \pm 0.16 ²⁾	2.66 \pm 0.21 ²⁾	1.46 \pm 0.11 ²⁾	1.28 \pm 0.16 ¹⁾	2.85 \pm 0.23 ²⁾
秋水仙碱	2.5	1.26 \pm 0.18 ⁴⁾	1.43 \pm 0.17 ⁴⁾	1.30 \pm 0.18 ⁴⁾	1.51 \pm 0.26 ⁴⁾	2.10 \pm 0.17 ⁴⁾	1.96 \pm 0.20 ⁴⁾	1.62 \pm 0.16 ⁴⁾
SF	400	1.55 \pm 0.14 ⁴⁾	1.24 \pm 0.16 ⁴⁾	1.47 \pm 0.16 ⁴⁾	1.79 \pm 0.14 ⁴⁾	2.33 \pm 0.21 ⁴⁾	1.99 \pm 0.16 ⁴⁾	1.74 \pm 0.21 ⁴⁾
	200	1.67 \pm 0.13 ⁴⁾	1.38 \pm 0.09 ⁴⁾	1.59 \pm 0.16 ³⁾	1.88 \pm 0.15 ⁴⁾	2.03 \pm 0.22 ⁴⁾	1.74 \pm 0.17 ⁴⁾	1.78 \pm 0.12 ⁴⁾
	100	1.76 \pm 0.13 ⁴⁾	1.64 \pm 0.15 ⁴⁾	1.57 \pm 0.19 ³⁾	1.98 \pm 0.13 ⁴⁾	1.86 \pm 0.14 ⁴⁾	1.46 \pm 0.17 ³⁾	1.84 \pm 0.10 ⁴⁾

培养基中加入乙醛,能显著地提高细胞增殖,使星状细胞活化的标志蛋白 α -SMA 表达显著增加,胶原的合成也显著增加,表明乙醛能直接刺激 HSC,从而促进肝纤维化的发生。

TGF- β_1 是细胞因子 TGF- β 超家族成员之一,能诱导 HSC 的激活和增殖,促进 ECM 合成,调节胶原的生成,与肝纤维化的发生密切相关。Smad 蛋白是已知的唯一的 I 型受体胞内底物,是 TGF- β 家族信号从受体到细胞核的胞内转导分子,可分为 3 类。第 1 类是受体型 Smads,包括 Smad1,2,3,5,8,其中

mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组 HSC-T6 内 TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7, MMP-1, TIMP-1 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$),表明乙醛对诱导这些基因的表达上调。与模型组比较,秋水仙碱和 SF 都能明显下调 HSC-T6 内 TGF- β_1 , Smad2, Smad3, Smad4, TIMP-1 mRNA 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$),明显上调 Smad7, MMP-1 mRNA 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6。

4 讨论

AHF 是酒精性肝病的一种,是酒精性脂肪肝、酒精性肝炎进一步恶化导致的以胶原为代表的细胞外基质成分过度增生、沉积的纤维增生性疾病。随着饮酒人群的增加,酒精性肝纤维化的发病率也不断上升,但是目前临床上仍然没有理想的治疗药物。研究肝纤维化的形成机制是当前研究的热点之一。

在 AHF 发病过程中,乙醛扮演着重要的角色。乙醛作为乙醇的主要毒性代谢产物,可直接参与肝纤维化的生成。研究发现,在离体肝星状细胞培养中,乙醛可刺激 I, III 型胶原的产生,而加用乙醇则无此反应,说明乙醛可直接参与肝纤维化的形成^[10-11]。研究也发现,体外培养的 HSC-T6

Smad2 和 Smad3 介导 TGF- β 的信号。第 2 类是通用型 Smads,包括 Smad4,是 TGF- β 必要的信号中转分子。第 3 类是抑制型 Smads,主要有 Smad6 和 Smad7,其中 Smad7 能抑制 TGF- β 信号转导,因此可抑制纤维化的形成^[12-13]。本研究发现,SF 能降低 HSC-T6 增殖速率和活化 (α -SMA 蛋白表达降低),并且在 TGF- β_1 /Smad 信号通路中,SF 能降低受体型 Smad2,3 和通用型 Smad4 的表达,增加抑制型 Smad7 的表达,从而抑制了 TGF- β_1 /Smad 信号通路,进而抑制了乙醛对 HSC-T6 的激活、增殖和胶原

合成。

在肝纤维化发生的过程中,ECM的沉积是由于胶原的合成和降解失衡导致的,主要以I型和III型胶原为主^[14]。MMP-1是肝脏中分解I型和III型胶原的主要胶原酶,而TIMP-1是一种能特异的抑制MMPs的糖蛋白^[15]。肝纤维化发生过程中,TIMP-1的表达增加,抑制了MMPs的活性,从而使ECM的降解不足^[16]。本研究发现,乙醛可导致MMP-1和TIMP-1的表达增加,这可能是由于HSC-T6内胶原含量增加,分解胶原的酶MMP-1的表达也增加,而其抑制因子TIMP-1的表达也随着表达增加。SF能显著抑制TIMP-1的表达,部分解除TIMP-1对MMP-1的抑制,从而使MMP-1的表达也增加,促进了胶原的降解,降低细胞内胶原含量。

本研究模拟酒精性肝纤维化发生的过程,在体外建立了乙醛诱导的HSC-T6增殖模型,发现SF对HSC的活化、增殖和胶原合成的具有一定的抑制作用,其调控作用机制可能与TGF- β_1 /Smads和MMP-1/TIMP-1信号通路有关,为SF在AHF疾病中的应用奠定了一定的研究基础。但是,本研究是体外实验,在体内生理条件下SF是否还具有相应的药理作用,还需要进一步的体内实验进行研究。

[参考文献]

[1] Louvet A, Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment [J]. Nat Rev Gastro Hepat, 2015, 12(4): 231-242.

[2] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Best Pract Res Cl Ga, 2011, 25(2): 195-206.

[3] Sankar U, Means A R. Gfer is a critical regulator of HSC proliferation [J]. Cell Cycle, 2011, 10(14): 2263-2268.

[4] YIN H, YAN X, YANG K H. Systematic review on sodium ferulate for treatment of diabetic nephropathy [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2009, 29(11): 970-974.

[5] Marimuthu S, Sudheer A R, Menon V P. Ferulic acid;

therapeutic potential through its antioxidant property [J]. J Clin Biochem Nutr, 2007, 40(2): 92-100.

[6] 刘文林, 杨晓风, 胡晓红. 阿魏酸钠的临床应用 [J]. 中国医药指南, 2009, 7(12): 80-81.

[7] 贺德, 曾志良. 阿魏酸钠抗大鼠肝纤维化 [J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(2): 240-241.

[8] 杨娟, 徐胜南, 王敏, 等. 阿魏酸钠对大鼠肝纤维化的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(12): 1676-1681.

[9] 朱艳虹, 陈真, 钱之玉, 等. 西红花酸对乙醛诱导的肝星状细胞增殖和胶原合成的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(8): 841-847.

[10] Moshage H, Casini A, Lieber C S. Acetaldehyde selectively stimulates collagen production in cultured rat liver fat-storing cells but not in hepatocytes [J]. Hepatology, 1990, 12(1): 511-518.

[11] Brenner D A, Chojkier M. Acetaldehyde increases collagen gene transcription in cultured human fibroblasts [J]. J Biol Chem, 1987, 262(36): 17690-17695.

[12] Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, et al. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver [J]. Z Gastroenterol, 2006, 44(1): 57.

[13] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis [J]. J Histochem Cytochem, 2016, 64(3): 157-167.

[14] Birukawa N K, Murase K, Sato Y, et al. Activated hepatic stellate cells are dependent on self-collagen, cleaved by membrane type 1 matrix metalloproteinase for their growth [J]. J Biol Chem, 2014, 289(29): 20209-20221.

[15] Muller M, Trocme C, Lardy B, et al. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing [J]. Diabetic Med, 2008, 25(4): 419-426.

[16] CAO Z, LI C, ZHU G. Inhibitory effects of baicalin on IL-1 β -induced MMP-1/TIMP-1 and its stimulated effect on Collagen-I production in human periodontal ligament cells [J]. EUR J Pharmacol, 2010, 641(1): 1-6.

[责任编辑 周冰冰]