

# 柴竭抑肝纤对大鼠肝星状细胞增殖和 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路的影响

郭会君<sup>1</sup>, 张志毕<sup>2</sup>, 余晓玲<sup>3</sup>, 蔡悦青<sup>1</sup>, 魏炜<sup>1</sup>, 张荣平<sup>2\*</sup>, 姜莉云<sup>3\*</sup>

(1. 云南中医学院, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学 生物医学工程研究中心, 昆明 650500;  
3. 昆明市中医医院, 昆明 650000)

**[摘要]** **目的:**研究保肝护肝中药复方柴竭抑肝纤(CJYGX)通过肝星状细胞治疗肝纤维化的作用机制。**方法:**培养肝星状细胞 T6 (hepatic stellate cell T6, HSC-T6), 设空白组、秋水仙碱 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 组和 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 mg·L<sup>-1</sup> 质量 CJYGX 组, 作用 24 h 后通过细胞计数试剂 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测 HSC-T6 细胞的增殖情况, 筛选合适的 CJYGX 药物浓度; 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测 CJYGX (200, 100, 50 mg·L<sup>-1</sup>) 作用 HSC-T6 细胞 24 h 后转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), 信号转导蛋白 Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 mRNA 表达变化; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 CJYGX (200, 100, 50 mg·L<sup>-1</sup>) 作用 HSC-T6 细胞 24 h 后 TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 表达变化。**结果:**① 与空白组比较, 200, 100, 50 mg·L<sup>-1</sup> CJYGX 对 HSC-T6 细胞具有显著的抑制增殖作用 ( $P < 0.05$ )。② 200, 100, 50 mg·L<sup>-1</sup> CJYGX 显著下调 TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ); 200, 100 mg·L<sup>-1</sup> CJYGX 显著下调 Smad4 mRNA 表达, 并显著上调 Smad7 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ )。③ 200, 100 mg·L<sup>-1</sup> CJYGX 显著下调 HSC-T6 细胞 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。**结论:** CJYGX 能抑制 HSC-T6 细胞的增殖, 其作用机制与 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路有关。

**[关键词]** 柴竭抑肝纤; HSC-T6 细胞; 转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) /Smad 通路; 增殖; 活化

**[中图分类号]** R285.5; R22; R24; R287; R2-0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0100-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181049

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1320.053.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-09 14:41

## Effect of Chaijie Yiganxian on HSC-T6 Cell Proliferation and TGF- $\beta_1$ /Smad Signaling Pathway

GUO Hui-jun<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-bi<sup>2</sup>, YU Xiao-ling<sup>3</sup>, CAI Yue-qing<sup>1</sup>, WEI Wei<sup>1</sup>,  
ZHANG Rong-ping<sup>2\*</sup>, JIANG Li-yun<sup>3\*</sup>

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Kunming 650500, China;

2. Biomedical Engineering Research Center of Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

3. Kunming Hospital of TCM, Kunming 650000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective mechanism of Chaijie Yiganxian (CJYGX) on the liver fibrosis through hepatic stellate cells (HSC-T6) and transforming growth factor- $\beta_1$ /signal transduction protein (TGF- $\beta_1$ /Smad) signaling pathway. **Method:** Different concentrations of colchicine (1.0 mg·L<sup>-1</sup>) and CJYGX (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 mg·L<sup>-1</sup>) were added to the culture medium, and the proliferation of HSC-T6 was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) after 24 hours. The appropriate drug concentration that can inhibit the cell

**[收稿日期]** 20171024(005)

**[基金项目]** 云南省科技厅科技计划项目(2013FZ253)

**[第一作者]** 郭会君, 硕士, 从事中药药理学研究, E-mail: 1536572828@qq.com

**[通信作者]** \* 张荣平, 教授, 博士生导师, 从事天然药物化学研究, E-mail: zhrpkm@163.com;

\* 姜莉云, 主任医师, 硕士生导师, 从事中药学研究, E-mail: Jean6895@163.com

proliferation was screened out according to the CCK-8 results. The mRNA expressions of TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3, Smad4 and Smad7 in HSC-T6 cells treated with CJYGX (200, 100, 50 mg·L<sup>-1</sup>) were detected by Real-time PCR, and the protein expressions of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA also were detected by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, CJYGX (200, 100, 50 mg·L<sup>-1</sup>) had a significantly inhibitory effect on HSC-T6 cells ( $P < 0.05$ ). CJYGX (200, 100, 50 mg·L<sup>-1</sup>) can significantly down-regulate the mRNA expressions of TGF- $\beta_1$ , Smad2 and Smad3 ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, CJYGX (200, 100 mg·L<sup>-1</sup>) can significantly down-regulate Smad4 mRNA expression and up-regulated Smad7 mRNA expression ( $P < 0.05$ ). CJYGX (200, 100 mg·L<sup>-1</sup>) can significantly down-regulate the protein expressions of TGF- $\beta_1$  and  $\alpha$ -SMA in HSC-T6 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** CJYGX can inhibit HSC-T6 cell proliferation, and its mechanism is related to TGF- $\beta_1$ /Smad signaling pathway.

[**Key words**] Chaijie Yiganxian; HSC-T6 cell; transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) /Smad pathway; proliferation; activation

肝纤维化(HF)是各种病因导致的肝脏细胞外基质(ECM)分泌与降解失衡,使得 ECM 过度沉积的病理过程<sup>[1]</sup>,而肝星状细胞(HSC)的激活与增殖是 HF 启动与发展的中心环节<sup>[2]</sup>。转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )是导致肝星状细胞 HSC 激活和 ECM 分泌的关键细胞因子,而 TGF- $\beta_1$ /信号转导蛋白(TGF- $\beta_1$ /Smad)信号通路是介导 TGF- $\beta_1$  进入细胞核的主要途径。以 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路作为治疗靶点,已成为目前研究治疗 HF 药物热点之一<sup>[3-4]</sup>。

“柴竭抑肝纤”(CJYGX)是昆明市中医医院姜莉云主任医师依据中医基础理论及近 20 年的临床经验,组成的经验方,由柴胡、血竭、白芍、赤芍、当归、桃仁、红花、佛手、茵陈、黄芪、北沙参、川芎、甘草共 13 味中药组成,具有疏肝行气、益气健脾、活血化瘀的功效。笔者前期动物实验表明“柴竭抑肝纤”可以明显抑制并减轻大鼠肝纤维化水平(已申请发明专利),但其作用机制还不清楚。故本实验通过研究“柴竭抑肝纤”对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 细胞增殖, TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路和对  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)蛋白表达变化的影响,来探讨“柴竭抑肝纤”抗肝纤维化作用的分子机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** HSC-T6 细胞株购自于中国科学院上海细胞库。

**1.2 药物制备** CJYGX 药物组成为柴胡 10 g, 血竭 5 g, 白芍 15 g, 赤芍 10 g, 当归 15 g, 桃仁 10 g, 红花 5 g, 佛手 15 g, 茵陈 50 g, 黄芪 30 g, 川芎 10 g, 北沙参 15 g, 甘草 6 g。血竭打粉过 60 目筛备用,其余药味用水煎煮 2 次,每次 8 倍量水,煎煮 1 h,过滤,合并 2 次滤液,滤液浓缩至相对密度 1.30 ~ 1.35 (50 °C),加入血竭粉(60 目)拌匀,于烤箱中(80 ~

90 °C)干燥制得。“柴竭抑肝纤”由昆明市中医药制剂中心(GPP 认证滇 2010009HZ)制备,为院内制剂。使用时研磨为粉末,用生理盐水溶解稀释为实验浓度,0.2  $\mu$ m 滤膜过滤除菌后使用。

**1.3 试剂** H-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,细胞计数试剂(CCK-8)(Transgen Biotech 公司,批号分别为 F20341, K20902);AxyPrep 总 RNA 提取试剂盒(美国 Axygen 公司,批号 12113KD1);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kti (Thermo Scientific 公司,批号 00374359);荧光定量试剂盒[宝生生物工程(大连)有限公司,批号 AK8603];TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA 兔抗一抗、兔抗二抗, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)(武汉华美生物工程公司,批号分别为 189781AP, 551351AP, SA00001-2, CSB-MA000091);BCA 蛋白定量试剂盒(南京建成生物技术有限公司,批号 20170104);蛋白 ECL 试剂盒[杭州联科生物技术(股份)有限公司,批号 71055164];秋水仙碱片(西双版纳药业责任有限公司,批号 160805)。

**1.4 仪器** CHP80 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 Bio-Tek 公司); CHB-100 型恒温金属浴(杭州博日科技有限公司); ND-1000 型核酸蛋白检测仪(美国 BDT 公司); GCZX3 型垂直电泳仪、转模仪, ACCURI C6 型化学发光仪(美国 Becton 公司); QuantStudio™ 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); HMIAS-2000 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 HSC-T6 细胞培养与传代** HSC-T6 细胞用 H-

DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清,  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素和  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素), 于二氧化碳培养箱 ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$ , 饱和湿度) 培养。待细胞长至 80% 时用 0.25% 胰酶消化, 按 1:3 传代。

**2.2 CCK-8 检测 HSC-T6 的增殖情况** 取对数生长期细胞, 消化后用完全培养基制备成  $1 \times 10^5$  个/mL 细胞悬液, 接种到 96 孔板中, 每孔接种  $100 \text{ } \mu\text{L}$ , 96 孔板最外一圈孔加满生理盐水, 以减少液体蒸发。设置空白组, 秋水仙碱组 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[5]</sup>, 6 个不同浓度的 CJYGX 组(药物终质量浓度分别为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每组设 10 个重复孔。细胞接种培养 24 h 后, 去除培养液, 空白组加入新鲜培养液  $90 \text{ } \mu\text{L}$  和生理盐水  $10 \text{ } \mu\text{L}$ ; 药物组加入新鲜培养液  $90 \text{ } \mu\text{L}$  和含药生理盐水  $10 \text{ } \mu\text{L}$ , 继续培养 24 h。药物处理结束后每孔加入 CCK-8  $10 \text{ } \mu\text{L}$ , 培养箱中继续培养 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 处吸光度 A, 计算细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率} = (1 - A_{\text{药物组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

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	下游	
TGF- $\beta_1$	NM_021578.2	CTTGCCCTCTACAACCAACA	CTFGCGACCCACGTAAGTAGA	102
Smad2	XM_006254946.3	AGTGTTCGCGAGTGCCTAAGTG	GAGCAGCAAATTCCTGGTTGTTGA	146
Smad3	XM_008766216.2	TAGCACAGGCTCTTTGGATG	GAAGCAGAGACTGGGTCTCTC	93
Smad4	NM_019275.3	GTGGCTGGTCGAAAGGAT	CCTGGGTAAGGATGGCTGT	273
Smad7	NM_030858.1	TGCTGTGCAAAGTGTTCAGGTG	CCATCGGGTATCTGGAGTAAGGA	177
Beta-actin	NM_031144.3	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTTC	150

**2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HSC-T6 细胞 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达** 收集对数生长期的细胞, 接种到 6 孔板中培养, 每孔接种  $1 \times 10^5$  个细胞, 每组设 3 个重复孔。待细胞长至 70% ~ 80% 时, 去除培养液, 空白组加入新鲜培养液 1.9 mL 和生理盐水  $100 \text{ } \mu\text{L}$ ; 秋水仙碱组 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 CJYGX 药物组 ( $200, 100, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 加入新鲜培养液  $1 \text{ } 900 \text{ } \mu\text{L}$  和含药生理盐水  $100 \text{ } \mu\text{L}$ , 继续培养 24 h。收集细胞。根据试剂盒说明, 加入 RIPA 裂解细胞, 提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 (1:1 万),  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜, 洗膜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

**2.3 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测对 HSC-T6 细胞 TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 mRNA 的表达** 分为空白组, 秋水仙碱组 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), CJYGX ( $200, 100, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理组。收集对数生长期的细胞, 接种到 6 孔板中培养, 每孔接种  $1 \times 10^5$  个细胞, 每组设 5 个重复孔。待细胞长至 70% ~ 80% 时, 去除培养液, 空白组加入新鲜培养液  $1 \text{ } 900 \text{ } \mu\text{L}$  和生理盐水  $100 \text{ } \mu\text{L}$ ; 药物组加新鲜培养液  $1 \text{ } 900 \text{ } \mu\text{L}$  和含药生理盐水  $100 \text{ } \mu\text{L}$ , 继续培养 24 h。药物作用结束后收集细胞, 按照试剂盒说明提取细胞总 RNA, ND-1000 测定 RNA 浓度和纯度, 然后通过逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 用 TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 基因和内参基因  $\beta$ -actin 引物进行 Real-time PCR 扩增, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因相对表达量。引物信息见表 1。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。实时荧光定量 PCR 反应条件为  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 30 s;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 30 s, 40 个循环。反应体系为  $20 \text{ } \mu\text{L}$ 。

后 ECL 化学发光检测, 以  $\beta$ -actin 蛋白为内参对照, IMAGE J 软件分析 TGF- $\beta_1$  和  $\alpha$ -SMA 灰度值, 计算蛋白相对表达量。

**2.5 统计学处理** 采用 GraphPad Prism5.0 统计软件进行数据统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 HSC-T6 细胞增殖的影响** CJYGX 处理 HSC-T6 细胞 24 h 后, 可明显抑制细胞增殖, 且呈现剂量依赖关系。与空白组比较, 秋水仙碱组和 200, 100, 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度 CJYGX 对细胞增殖的抑制具有显著性 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 故选择该剂量作为后续实验剂量。见表 2。

表 2 CJYGX 对 HSC-T6 细胞增殖的影响

Table 2 Effect of CJYGX on proliferation of HSC-T6 cells

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	A( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )	抑制率/%
空白	-	1.41 ± 0.08	-
秋水仙碱	1.0	0.67 ± 0.16	52.48 <sup>2)</sup>
CJYGX	200	0.80 ± 0.12 <sup>2)</sup>	43.42 <sup>2)</sup>
	100	1.02 ± 0.12 <sup>2)</sup>	27.61 <sup>2)</sup>
	50	1.28 ± 0.16 <sup>1)</sup>	9.44 <sup>2)</sup>
	25	1.31 ± 0.19	7.51
	12.5	1.36 ± 0.15	3.91
	6.25	1.41 ± 0.20	0.06

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>2)</sup>P < 0.01(表 3,4 同)。

表 3 CJYGX 对 HSC-T6 细胞 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of CJYGX on mRNA levels of TGF-β<sub>1</sub>, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 in HSC-T6 cell( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	TGF-β <sub>1</sub>	Smad2	Smad3	Smad4	Smad7
空白	-	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.01 ± 0.08	1.01 ± 0.06	1.00 ± 0.08
秋水仙碱	1.0	0.78 ± 0.16 <sup>1)</sup>	0.83 ± 0.12 <sup>1)</sup>	0.81 ± 1.19 <sup>1)</sup>	0.93 ± 1.06	1.15 ± 0.16
CJYGX	200	0.69 ± 0.13 <sup>2)</sup>	0.74 ± 0.07 <sup>2)</sup>	0.77 ± 0.12 <sup>2)</sup>	0.72 ± 0.07 <sup>2)</sup>	1.49 ± 0.18 <sup>2)</sup>
	100	0.79 ± 0.12 <sup>1)</sup>	0.78 ± 0.15 <sup>1)</sup>	0.84 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.90 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.23 ± 0.12 <sup>2)</sup>
	50	0.86 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.84 ± 0.10 <sup>1)</sup>	0.87 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.92 ± 0.07	1.16 ± 0.13

3.3 对 HSC-T6 细胞 TGF-β<sub>1</sub> 和 α-SMA 蛋白表达的影响 与空白组比较,秋水仙碱组能显著下调 HSC-T6 细胞中 TGF-β<sub>1</sub> 和 α-SMA 蛋白的表达(P < 0.05)。200, 100 mg·L<sup>-1</sup> 质量浓度的 CJYGX 处理 HSC-T6 细胞 24 h 后,能显著下调 HSC-T6 细胞中 TGF-β<sub>1</sub> 和 α-SMA 的蛋白表达(P < 0.05),而质量浓度 50 mg·L<sup>-1</sup> 的 CJYGX 对 TGF-β<sub>1</sub> 和 α-SMA 的蛋白表达的影响无显著性差异。见图 1,表 4。

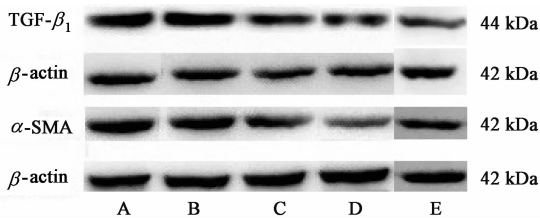
3.2 对 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2, Smad3, Smad4, Smad7 mRNA 表达的影响 与空白组比较,秋水仙碱组 TGF-β<sub>1</sub>, Smad2, Smad3 基因表达显著下调(P < 0.05),但是 Smad4, Smad7 基因表达无显著变化。200, 100, 50 mg·L<sup>-1</sup> CJYGX 处理 HSC-T6 细胞 24 h 后, TGF-β<sub>1</sub> mRNA 表达显著降低, Smad2, Smad3 mRNA 表达显著下降(P < 0.05, P < 0.01)。200, 100 mg·L<sup>-1</sup> CJYGX 处理 HSC-T6 细胞 24 h 后, Smad4 mRNA 表达显著降低(P < 0.05, P < 0.01); 而 Smad7 mRNA 表达显著增加(P < 0.01), 而 50 mg·L<sup>-1</sup> CJYGX 对 Smad4 和 Smad7 mRNA 表达的影响无显著性差异。见表 3。

表 4 CJYGX 对 HSC-T6 细胞 TGF-β<sub>1</sub> 和 α-SMA 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of CJYGX on protein levels of TGF-β<sub>1</sub> and α-SMA in HSC-T6 cell( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	TGF-β <sub>1</sub> /β-actin	α-SMA/β-actin
空白	-	122.00 ± 24.03	98.94 ± 8.79
秋水仙碱	1.0	80.01 ± 15.69 <sup>1)</sup>	79.36 ± 12.04 <sup>1)</sup>
CJYGX	200	74.35 ± 14.31 <sup>1)</sup>	65.21 ± 13.18 <sup>1)</sup>
	100	78.69 ± 9.89 <sup>1)</sup>	74.16 ± 11.02 <sup>1)</sup>
	50	109.31 ± 17.24	90.06 ± 10.03

TGF-β<sub>1</sub> 是最为重要的因子之一,可激活 HSC, 调节 ECM 的形成和降解平衡<sup>[5]</sup>。Smad 家族蛋白是 TGF-β<sub>1</sub> 的细胞受体,对 TGF-β<sub>1</sub> 的信号转导起着关键的作用。Smad 蛋白根据结构和功能不同可分为 3 类。受体活化型 Smad(R-Smad),如 Smad1, 2, 3, 5, 8 等,其中 Smad2 和 Smad3 是通过活化的 TGF-β 受体(TβRI)而激活的<sup>[6]</sup>。共同通路型 Smad,如 Smad4, Smad4 是 TGF-β 家族在各类信号转导过程中所需要的共同介质。抑制性 Smad,包括 Smad6 和 7,其主要作用是抑制或调解信号转导作用。其中 Smad7 是 TGF-β<sub>1</sub>/Smad 信号通路的主要抑制因子,Smad7 通过与 TβRI 结合或竞争性结合 Smad4,阻碍 Smad2 和 Smad3 信号转导,还可促进 Smad2 与活化的 TβRI



A. 空白组; B. CJYGX(50 mg·L<sup>-1</sup>)组; C. CJYGX(100 mg·L<sup>-1</sup>)组; D. CJYGX(200 mg·L<sup>-1</sup>)组; E. 秋水仙碱(1.0 mg·L<sup>-1</sup>)组

图 1 CJYGX 对 TGF-β<sub>1</sub> 和 α-SMA 蛋白表达电泳

Fig. 1 Effect of CJYGX on protein levels of TGF-β<sub>1</sub> and α-SMA

#### 4 讨论

肝纤维化是由各种病因导致的肝脏损害与炎症反应后,肝脏组织内细胞外基质过度增生与异常积累,导致肝脏结构和功能异常改变的病理过程。许多细胞因子都参与肝纤维化形成的过程,其中

结合,导致 T $\beta$ RI 降解<sup>[7]</sup>。

TGF- $\beta_1$  促进纤维发生的作用主要是通过 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路来实现的<sup>[8]</sup>。首先,TGF- $\beta_1$  与细胞膜上的 I, II 型受体 (T $\beta$ RI 和 T $\beta$ RII) 形成 TGF- $\beta$ -T $\beta$ RI-T $\beta$ RII 复合物,该复合物能磷酸化细胞质中的受体 R-Smad(如 Smad2 和 Smad3),活化后的 R-Smad 与 Smad4 形成复合物,由细胞质转入细胞核内,协同转录因子调控靶基因 mRNA 的表达,产生生物学效应。

肝星状细胞的活化是肝纤维化发生的重要环节<sup>[9]</sup>, $\alpha$ -SMA 可作为 HSC 细胞活化的标志<sup>[10]</sup>,抑制 HSC 的激活也是治疗肝纤维化的主要策略。目前研究发现,通过调控 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路,降低 TGF- $\beta_1$  的表达,从而抑制 HSC 的激活与增殖,是治疗肝纤维化的重要路径。肝纤维化发生的机制十分复杂,西医对于肝纤维化的治疗多为阻断其诱因的针对治疗,目前无理想的治疗药物<sup>[11]</sup>。比较之下,中医在治疗肝纤维化方面具有多成分、多环节、多靶点的优势,并且已经取得了较好的疗效<sup>[12]</sup>。

CJYGX 药方中柴胡疏肝解郁、升达清阳,血竭活血定痛、化瘀止血,二者共为君药;黄芪补气健脾,北沙参养阴清肺、益胃生津,红花活血化瘀止痛,当归养血益阴活血,以上四者共为臣药;佛手理气和中、燥湿化痰,茵陈清利湿热,桃仁破血行滞而润燥,白芍敛阴、柔肝止痛,赤芍、川芎活血祛瘀、理气行滞,使气行则血行而化瘀,六者共为佐药;甘草调和诸药,为使药。诸药共奏疏肝行气、益气健脾、活血化瘀的功效。全方配伍,特点分别为①活血与行气相伍,既行血分瘀滞,又解气分郁结;②祛瘀与养血同施,则活血而无耗血之虑,行气而无伤阴之弊;③燥润结合,柴胡、红花、川芎(血中气药)、佛手、茵陈等味辛而具发散、行气行血之效,发散太过易耗气损血,故伍与黄芪益气,当归养血,白芍阴柔补血之品(血中血药),北沙参养阴生津以防大队活血祛瘀药物的辛燥伤阴耗气,动静相宜,行血而不伤血,补血而不滞血,温而不燥。④攻补兼施,扶正与祛邪同用,针对“正虚血瘀”的病机,予黄芪大补脾肺之气,益气健脾,气旺血生,当归养血和营。

本实验旨在探讨 CJYGX 对 HSC-T6 细胞 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路的影响。结果显示,CJYGX 能下调 TGF- $\beta_1$ , Smad2, Smad3, Smad4 基因和上调 Smad7 基因表达,通过 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路抑制 HSC-T6 细胞的增殖。笔者进一步研究还发现,CJYGX 影响 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路后,还会抑制 HSC-T6 的活化,使

HSC-T6 细胞活化标志物  $\alpha$ -SMA 表达降低。

综上,CJYGX 能通过 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路抑制 HSC-T6 细胞的增殖和活化,进而发挥抗肝纤维化的作用。但是其作用机制是否还涉及到其他信号通路,还需要后续的实验进行验证。

#### [参考文献]

- [1] Asrani S K, Larson J J, Yawn B, et al. Underestimation of liver-related mortality in the United States[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145 (2):375-382.
- [2] Lakner A M, Steuerwald N M, Walling T L, et al. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis [J]. *Hepatology*, 2012, 56 (1): 300-310.
- [3] XIAO X, GANG Y, GU Y, et al. Osteopontin contributes to TGF-beta1 mediated hepatic stellate cell activation[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(11):2883-2891.
- [4] DING Z Y, JIN G N, LIANG H F, et al. Transforming growth factor beta induces expression of connective tissue growth factor in hepatic progenitor cells through Smad independent signaling [J]. *Cell Signal*, 2013, 25 (10): 1981-1992.
- [5] 邹静,王小琴,郑作文. 蛇葡萄素对大鼠肝星状细胞增殖及胶原蛋白、细胞因子生成的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(8):163-165.
- [6] ZHOU J, ZHONG D W, WANG Q W, 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.
- [7] Singha P K, Pandeswara S, Geng H, et al. TGF- $\beta$  induced TM6P/PM6P1 inhibits canonical Smad signaling through R-Smad sequestration and promotes non-canonical PI3K/Akt signaling by reducing PTEN in triple negative breast cancer[J]. *Genes Cancer*, 2014, 5(9):320-336.
- [8] Nakao A, Afrakhte M, Morén A, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. [J]. *Nature*, 1997, 389(6651):631-635.
- [9] FU R, WU J, DING J, et al. Targeting transforming growth factor  $\beta$  II expression inhibits the activation of hepatic stellate cells and reduces collagen synthesis. [J]. *Exp Biol Med*, 2011, 236(3):291-297.
- [10] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. [J]. *Best Pract Res Cl Ga*, 2011, 25(2):195-206.
- [11] HE Y H, LI Z, NI M M, et al. Cryptolepine derivative-6h inhibits liver fibrosis in TGF- $\beta_1$ -induced HSC-T6 cells by targeting the Shh pathway. [J]. *Can J Physiol Pharm*, 2016, 94(9):987-995.
- [12] 刘雪萍,韦啟球,李振明,等. 排钱草对食蟹猴肝纤维化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(24): 133-140.

[责任编辑 全燕]