

夏枯草硫酸多糖对 CCl_4 致大鼠肝纤维化及 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导的大鼠肝星状细胞活化的影响

付月月¹, 朱兰平², 张国梁³, 张双霞^{3*}

(1. 天津医科大学第一中心临床学院, 天津 300070; 2. 天津医科大学总医院, 天津 300052;
3. 天津市第一中心医院, 天津 300192)

[摘要] **目的:**观察夏枯草硫酸多糖(PSSP)对四氯化碳(CCl_4)所致的大鼠肝纤维化及转化生长因子- β_1 ($\text{TGF-}\beta_1$)诱导活化大鼠肝星状细胞-T6(HSC-T6)的影响,从而初步探讨 PSSP 抗纤维化的机制。**方法:**采用 CCl_4 -橄榄油溶液腹腔注射诱导大鼠肝纤维化造模,随机分为 5 组,分别为正常组,模型组,秋水仙碱组($0.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),PSSP 高剂量组($300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和 PSSP 低剂量组($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。分别测定各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),层粘连蛋白(LN),透明质酸(HA),Ⅲ型前胶原(PCⅢ)和Ⅳ胶原(C-Ⅳ)的含量;采用苏木素-伊红(HE)及天狼猩红染色观察大鼠肝组织病理学改变;体外培养 HSC-T6 细胞;采用细胞增殖与活性法(CCK-8)测定 PSSP 对 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导的 HSC-T6 细胞增殖的影响;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HSC-T6 细胞中 I 型胶原(Col-I), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)mRNA 和蛋白的表达。**结果:**与模型组比较,PSSP 可明显降低大鼠 ALT,AST,HA, LN,PC-Ⅲ和 C-Ⅳ的含量,并减轻大鼠肝纤维化程度($P < 0.01$);PSSP 可抑制 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导的 HSC-T6 细胞的增殖,减少 HSC-T6 细胞 Col-I, α -SMA mRNA 和蛋白的相对表达量($P < 0.01$)。**结论:**PSSP 具有很好的抗纤维化作用,其机制可能与抑制肝星状细胞活化及抑制胶原合成与沉积,减少细胞外基质(ECM)的生成并促进其降解有关。

[关键词] 夏枯草硫酸多糖;肝纤维化;肝星状细胞;I 型胶原; α -平滑肌肌动蛋白

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R2-0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0147-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181056

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.0904.001.html>

[网络出版时间] 2018-3-15 10:04

Effect of *Prunellae Spica Sulfated Polysaccharide* on Carbon Tetrachloride (CCl_4)-induced Hepatic Fibrosis and Activation of Hepatic Stellate Cell Induced by $\text{TGF-}\beta_1$

FU Yue-yue¹, ZHU Lan-ping², ZHANG Guo-liang³, ZHANG Shuang-xia^{3*}

(1. *First Central Hospital Clinic Institute, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;*
2. *Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China;*
3. *Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Prunellae Spica sulfated polysaccharide* (PSSP) on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced hepatic fibrosis and activation of HSC-T6 induced by transforming growth factor (TGF) β_1 . **Method:** The liver fibrosis model was established through intraperitoneal injection with 40% CCl_4 . The rats were randomly divided into five groups: normal control group, model group, positive control group (colchicines, $0.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high and low-dose PSSP groups. Serum levels of alanine aminotransferase

[收稿日期] 20171207(026)

[基金项目] 天津市卫计委科技基金项目(2015KR14)

[第一作者] 付月月, 硕士, 从事肝纤维化的基础与临床的实验研究, Tel:022-23626816, E-mail: Fuyue6521@foxmail.com

[通信作者] *张双霞, 博士, 副主任医师, 从事肝纤维化的预防与治疗, Tel:022-23626913, E-mail: Fuyue6521@126.com

(ALT), aspartate aminotransferase (AST), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen-III-peptide (PC-III) and type IV collagen (C-IV) were examined in different groups. Moreover, htoxylin eosin (HE) staining and sinus red staining were used to examine the degree of hepatic fibrosis. HSC-T6 was cultured, and the proliferation of HSC-T6 was determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The expressions of collagen type I (Col-I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) mRNA were detected by Real-time PCR. The mRNA and protein expressions of Col-I and α -SMA were measured by Western blot. **Result:** Compared with the model group, the levels of ALT, AST, HA, LN, PC-III and C-IV were significantly decreased in the PSSP groups. HE staining and sinus red staining showed that PSSP could significantly reduce the degree of hepatic fibrosis. PSSP had an inhibitory effect on the proliferation of TGF- β_1 -induced HSC-T6 cells ($P < 0.01$). Compared with TGF- β_1 group, mRNA and protein expressions of α -SMA and Col-I were significantly decreased by PSSP in TGF- β_1 -induced HSC-T6 cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** PSSP has a protective effect against CCl₄-induced liver fibrosis possibly by reducing secretion of collagen and promoting extracellular matrix degradation.

[Key words] Prunellae Spica sulfated polysaccharide; hepatic fibrosis; hepatic stellate cell; collagen type I; α -smooth muscle actin

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是在损伤、炎症等各种致病因素的作用下,肝内结缔组织异常增生,导致肝内细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积的病理过程,也是各种急慢性肝病共同的病理基础,进一步恶化会发展成为肝硬化甚至肝癌^[1]。肝纤维化发生的中心环节是肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 的活化,活化的 HSC 可进一步转化为具有增殖能力的肌成纤维细胞,后者可导致 ECM 大量沉积,引起 HF 的发生发展^[2]。目前,常用的抗纤维化药物有秋水仙碱、干扰素- γ (IFN- γ) 等,但部分西药抗纤维化的疗效仍不确切,有时甚至产生较严重的副作用,因此从中药中寻找具有抗纤维化的活性成分具有深远的意义。

夏枯草为唇形科草本植物,其性辛、苦、寒,归肝、胆经,具有清肝、消肿、散结之功效^[3]。夏枯草主要包括多糖类、总三萜类、黄酮类等生物活性成分,其具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒等多种作用^[4-6]。近年来,有研究发现其在治疗急性肝损伤及 HF 上也有较好的疗效^[7]。夏枯草硫酸多糖 (Prunellae Spica sulfated polysaccharide, PSSP) 是夏枯草主要的生物活性成分之一,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用^[8-9],但其在 HF 方面却很少有人研究。本研究采用 PSSP 作用于四氯化碳 (CCl₄) 诱导的大鼠 HF 模型,从而观察 PSSP 对 HF 的干预作用,并观察其对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 诱导的 HSC 的调控作用,从而初步探讨 PSSP 抗纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 动物 5~6 周龄雄性 SD 大鼠,SPF 级,体重 (180~200) g,合格证号 SCXK (军) 2012-0004。

所有动物均由军事医学科学院实验动物中心提供,标准鼠食喂养。本研究所有实验动物操作均遵循实验动物伦理条律,并经天津市第一中心医院伦理委员会批准。

1.2 细胞 HSC-T6 细胞株购自中国科学院昆明细胞库。

1.3 试剂 PSSP 由天津医科大学药学院提供 (纯度 83.7%);秋水仙碱 (西双版纳药业有限公司,批号 090205);CCl₄ (广东汕头达濠精细化学品公司,批号 20090513);层粘连蛋白 (LN),透明质酸 (HA),III 型前胶原 (PC III) 试剂盒 (武汉华美生物工程公司,货号分别为 Y19294102, H16203162, V17230149);IV 胶原 (C-IV) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所,货号 C010-1);天狼猩红染色试剂盒 (北京索莱宝生物有限公司,货号 G1470);苏木素-伊红 (HE) 试剂盒 (武汉博士德生物科技公司,货号 AR1180);胎牛血清 (FBS),DMEM 高糖培养基及胰酶 (美国 Gibco 公司,货号分别为 1908121, C11965500BT, 25200-056);TGF- β_1 (美国 Pepro Tech 公司,货号 0614209);细胞增殖与活性检测 (CCK-8) 试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司,批号 20150221);trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司,货号 12183-55);I 型胶原 (Col-I), α -肌动蛋白 (α -SMA) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 引物由北京金唯智生物公司合成;Col-I 及 GAPDH 抗体 (美国 Abcam 公司,货号分别为 ab34710, ab22555); α -SMA 抗体 (美国 CST 公司,货号 14968);逆转录试剂盒 (天根生物有限公司,货号 KR121221)。

1.4 仪器 L420 型台式低速离心机 (湖南湘仪实

实验室仪器公司), Synergy NEO 型酶标仪(美国 Bio Tek Synergy 公司), DU800 型凝像成像分析系统(美国 Alpha Innotech FluorChem FC2 公司), LW C320 型荧光定量 PCR 仪(瑞士 LightCycle96 公司), TC2323 型细胞培养箱(美国 SHEL LAB 公司), WD9405B 型水平摇床(北京沃德生物医学仪器公司), PowerPac™ Universal 型垂直电泳仪、转模仪(美国 Bio-Rad 公司), 7180 型自动生化分析仪(日本 Hitachi 公司), HV-85 型蒸气压力灭菌器(日本 Hirayama Hiclave 公司)。

2 方法

2.1 HF 模型的制备^[10]及分组给药 将 SD 大鼠随机分为正常组($n = 10$)和造模组。正常组腹腔注射 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 橄榄油, 每周 2 次, 共 4 周。造模组大鼠均腹腔注射 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 40% 的 CCl_4 -橄榄油溶液, 每周 2 次, 共 4 周, 4 周后随机抽取大鼠进行肝组织病理学检查, 证实 HF 模型已经建立成功。将 HF 造模成功大鼠随机分为模型组($n = 10$), 秋水仙碱组($0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 10$), PSSP 高剂量组($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 10$)和 PSSP 低剂量组($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 10$)。除正常组外, 其余各组均继续腹腔注射 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 40% 的 CCl_4 橄榄油溶液, 每周 2 次, 秋水仙碱组, PSSP 高、低剂组每天 2 次灌胃给药, 正常组给予等量生理盐水, 共 5 周。末次灌胃后禁食 24 h, 5% 的水合氯醛腹腔麻醉大鼠, 收集腹主动脉血和肝脏组织。

2.2 血清学指标的测定 大鼠麻醉后, 腹主动脉取血, $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集血清, 放于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。采用全自动化分析仪测丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的含量; 酶联免疫吸附法(ELISA)测定 HA, LN, PC-III 和 C-IV 的含量, 严格按试剂盒说明操作。

2.3 肝组织病理学检查 取距离肝右叶同一部位肝组织, 4% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋、切片。苏木素-伊红(HE)及天狼猩红染色, 光学显微镜下观察肝细胞变性、胶原纤维增生程度及组织形态学变化。

2.4 细胞培养 HSC-T6 细胞使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 孵箱中培养, 48 h 更换 1 次培养基, 待细胞生长至 90% 融合时进行传代。

2.5 CCK-8 检测细胞的增殖活性 取对数生长期的 HSC-T6 细胞按 $5 \times 10^3/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中, 放于细胞培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后, 换用无血清培养基饥饿处理 12 h, 然后分组干预细胞为空白

组, 给药组, $\text{TGF-}\beta_1$ 组, 除空白组外, 各组用 $\text{TGF-}\beta_1$ ($10 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 2 h; 然后给药组加入不同浓度的 PSSP, 终质量浓度分别为 10, 50, 100, 200, 400, 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每组设 5 个副孔。分别培养 24, 48, 72 h, 每孔加入 CCK-8 $10 \text{ }\mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温箱孵 2 h, 酶标仪 450 nm 下测吸光度 A , 计算细胞生长抑制率 = $(A_{\text{TGF-}\beta_1 \text{ 组}} - A_{\text{给药组}}) / A_{\text{TGF-}\beta_1 \text{ 组}} \times 100\%$ 。

2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 Col-I 和 α -SMA mRNA 表达 取对数生长期的 HSC-T6 细胞接种于 6 孔板中, 放于细胞培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后, 将培养基换成无血清培养基饥饿 12 h, 设空白组, PSSP 50 组($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), PSSP 100 组($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), PSSP 200 组($200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和 $\text{TGF-}\beta_1$ 组。除空白组外, 各组用 $\text{TGF-}\beta_1$ ($10 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 预处理 2 h, 然后再按上述分组给药干预。培养 48 h 后, 用 trizol 试剂盒提取 RNA, 按逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。扩增条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 预变性; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 40 个循环以后进行熔解曲线分析, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。PCR 引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Primers used for Real-time PCR

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
Col-I	上游 ACAGACCAACAACCCAAACTC	253
	下游 ACTTATACCCACATAGGCTCTCAAG	
α -SMA	上游 AAGTATCCGATAGAACACG	296
	下游 TAGATAGGCACGTTGTGAG	
GAPDH	上游 CCATCAACGACCCCTTCATT	110
	下游 GACCAGCTTCCCATTCTCAG	

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Col-I 和 α -SMA 蛋白表达水平 按照 2.6 项处理细胞, 48 h 后加入 RIPA 蛋白裂解液, 冰上裂解 20 min, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液 BCA 蛋白定量后加入上样缓冲液, $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 10 min 使蛋白充分变性, 然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后按照蛋白相对分子质量大小进行切胶、转膜, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 清洗后分别加入 Col-I (1:2 000) 和 α -SMA(1:1 000) 一抗孵育 2 h, 过夜, 二抗孵育 1 h, ECL 发光试剂盒显影, 以 GAPDH 为内参, Image J 软件分析条带灰度值并计算蛋白质表达相对含量。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 23.0 统计学软件进

行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血清 ALT 和 AST 变化的影响 模型组血清中 AST 和 ALT 明显高于正常组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, PSSP 高、低剂量组血清 ALT 及 AST 均降低 ($P < 0.01$), 其中 PSSP 高剂量组比 PSSP 低剂量组降低更明显 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.2 对大鼠血清 HF 指标变化的影响 模型组血清中 HA, LN, PC-III 和 C-IV 明显高于正常组 ($P < 0.01$); 与模型组比较, PSSP 高、低剂量组血清 HA, LN, PC-III 和 C-IV 均降低 ($P < 0.01$), 其中 PSSP

高剂量组比 PSSP 低剂量组降低的明显 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 PSSP 对大鼠血清 ALT 和 AST 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of PSSP on serum ALT and AST in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT	AST
正常	-	36.62 ± 4.56	132.39 ± 21.07
模型	-	$133.31 \pm 13.06^{1)}$	$341.49 \pm 48.22^{1)}$
秋水仙碱	0.25	$59.70 \pm 15.80^{2)}$	$178.43 \pm 16.01^{2)}$
PSSP	300	$78.35 \pm 17.46^{2)}$	$155.46 \pm 27.44^{2)}$
	100	$104.46 \pm 16.27^{2, 4)}$	$218.57 \pm 12.88^{2, 3)}$

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; 与 PSSP 高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

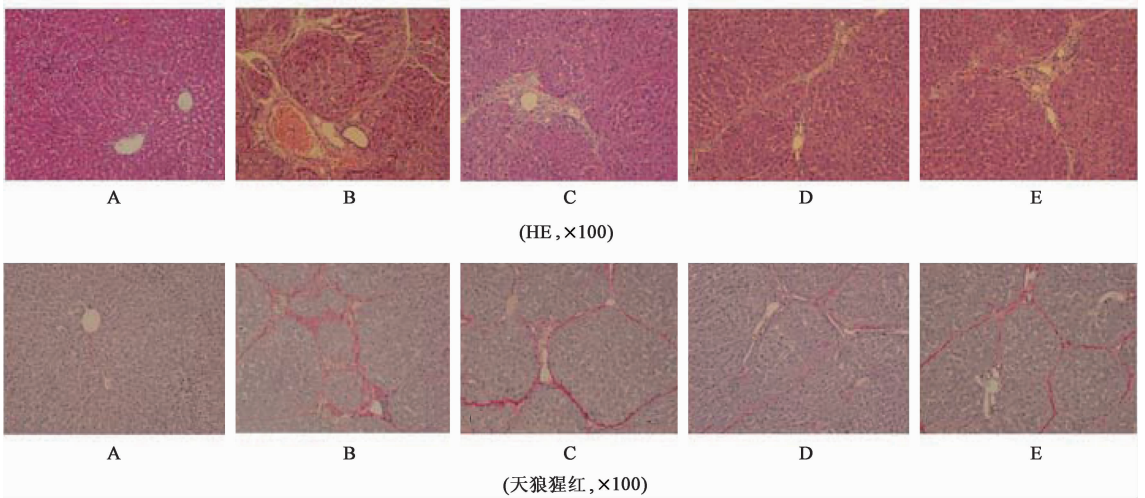
表 3 PSSP 对大鼠血清 HA, LN, PC-III 和 C-IV 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of PSSP on serum HA, LN, PC-III and C-IV in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	HA	LN	PC-III	C-IV
正常	-	52.55 ± 12.08	17.52 ± 3.07	7.89 ± 2.64	10.93 ± 2.66
模型	-	$277.59 \pm 21.23^{1)}$	$82.99 \pm 9.22^{1)}$	$36.49 \pm 8.31^{1)}$	$56.25 \pm 7.59^{1)}$
秋水仙碱	0.25	$130.14 \pm 32.94^{2)}$	$44.71 \pm 10.45^{2)}$	$16.58 \pm 2.89^{2)}$	$27.69 \pm 3.94^{2)}$
PSSP	300	$124.91 \pm 18.27^{2)}$	$43.71 \pm 17.20^{2)}$	$21.02 \pm 1.89^{2)}$	$26.83 \pm 7.72^{2)}$
	100	$186.04 \pm 28.91^{2, 3)}$	$64.25 \pm 10.47^{1, 3)}$	$9.61 \pm 3.05^{2, 4)}$	$35.97 \pm 6.82^{2, 4)}$

3.3 对大鼠肝脏组织病理学变化的影响 HE 及天狼猩红染色结果显示, 正常组肝组织肝小叶与汇管区结构正常, 肝细胞呈条索状排列, 无明显肝细胞坏死, 无间质扩增, 纤维主要分布于汇管区和中央静脉周围。模型组大部分肝小叶结构破坏或消失, 肝索排列紊乱, 可见肝细胞点状坏死, 有少量炎性细胞排

列, 肝细胞空泡变性散在分布, 间质增生明显, 肝汇管区及肝小叶坏死区可见大量纤维组织增生, 纤维间隔形成明显, 其界板破坏严重, 分割、包绕肝小叶。与模型组比较, 秋水仙碱组及 PSSP 组肝小叶结构稍紊乱, 较少肝细胞脂肪变性、炎性细胞浸润, 纤维组织轻度增生, 汇管区的纤维增生不明显。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 秋水仙碱组; D. PSSP 高剂量组; E. PSSP 低剂量组

图 1 PSSP 对大鼠肝脏组织病理学变化的影响

Fig. 1 Effect of PSSP on histopathological change in liver tissues

3.4 对 HSC-T6 细胞增殖的影响 分组干预 HSC-T6 细胞 24, 48, 72 h 后, TGF- β_1 组细胞增殖率分别为 (115.34 \pm 9.09)%, (158.78 \pm 11.45)%, (134.52 \pm 13.67)%, 其中 48 h 细胞增殖效果显著。在同一时间点随着 PSSP 浓度的增高, 细胞抑制率逐渐上升。在相同的 PSSP 浓度作用下, HSC-T6 细胞在 48 h 受到的抑制比较明显。因此, 本实验的确定药物的作用时间为 48 h。见表 4。

表 4 PSSP 对 HSC-T6 细胞抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of PSSP on inhibitory rate of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	24 h	48 h	72 h
空白	-	-	-	-
PSSP	10	9.85 \pm 2.09	12.33 \pm 1.88	13.01 \pm 0.97
	50	12.38 \pm 1.22	24.37 \pm 2.97	18.01 \pm 1.23
	100	19.13 \pm 4.01	47.48 \pm 6.04	31.07 \pm 1.67
	200	26.31 \pm 6.07	68.38 \pm 5.89	46.38 \pm 7.23
	400	37.01 \pm 5.57	72.57 \pm 3.54	61.08 \pm 4.02
	800	57.00 \pm 2.09	75.00 \pm 2.44	69.09 \pm 5.76
TGF- β_1	0.01	-	-	-

3.5 对 HSC-T6 细胞 Col-I 和 α -SMA mRNA 相对表达的影响 与空白组比较, TGF- β_1 组 HSC-T6 细胞中 Col-I 和 α -SMA mRNA 表达量显著增加 ($P < 0.01$)。与 TGF- β_1 组比较, PSSP 100, 200 mg·L⁻¹ 组 HSC-T6 细胞中 Col-I 和 α -SMA mRNA 表达量均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且 PSSP 200 mg·L⁻¹ 组降低更明显 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5。

表 5 PSSP 对 HSC-T6 细胞中 Col-I 和 α -SMA mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Comparison expressions of Col-I and α -SMA mRNA in different groups of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	Col-I	α -SMA
空白	-	0.30 \pm 0.01	0.31 \pm 0.02
PSSP	50	0.41 \pm 0.04	0.37 \pm 0.08
	100	0.55 \pm 0.12 ²⁾	0.58 \pm 0.18 ²⁾
	200	0.73 \pm 0.14 ^{2, 3)}	0.79 \pm 0.23 ^{2, 3)}
TGF- β_1	0.01	0.77 \pm 0.07 ¹⁾	0.93 \pm 0.26 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 TGF- β_1 组比较²⁾ $P < 0.01$; 与 PSSP 100 mg·L⁻¹ 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.6 对 HSC-T6 细胞 Col-I 和 α -SMA 蛋白表达的影响 与空白组比较, TGF- β_1 组 HSC-T6 细胞中 Col-I 和 α -SMA 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.01$)。与

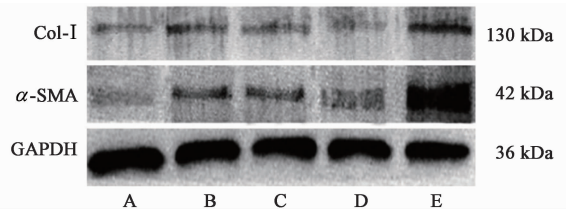
TGF- β_1 组比较, PSSP 100, 200 mg·L⁻¹ 组 HSC-T6 细胞中 Col-I 和 α -SMA 蛋白表达量均减少 ($P < 0.01$), 且 PSSP 200 mg·L⁻¹ 组减少更明显 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6, 图 2。

表 6 PSSP 对 HSC-T6 细胞中 Col-I, α -SMA 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Comparison expressions of Col-I and α -SMA in different groups of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	Col-I/GAPDH	α -SMA/GAPDH
空白	-	0.21 \pm 0.02	0.24 \pm 0.10
PSSP	50	0.57 \pm 0.20	0.57 \pm 0.11
	100	0.44 \pm 0.10 ²⁾	0.51 \pm 0.17 ²⁾
	200	0.25 \pm 0.03 ^{3, 4)}	0.27 \pm 0.09 ^{3, 4)}
TGF- β_1	0.01	0.65 \pm 0.08 ¹⁾	0.77 \pm 0.12 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 TGF- β_1 组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与 PSSP 100 mg·L⁻¹ 组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。



A. 空白组; B ~ D. PSSP 50, 100, 200 mg·L⁻¹ 组; E. TGF- β_1 组

图 2 HSC-T6 细胞 Col-I 和 α -SMA 蛋白的表达电泳

Fig. 2 Expressions of Col-I and α -SMA in different groups of HSC-T6 cells detected

4 讨论

HF 是肝脏对各种原因所导致的肝损伤的创伤愈合反应, 能够引起肝脏损伤的因素经长期、反复的作用, 都可能会导致肝细胞变性、坏死, 进而引起肝细胞再生和肝内结缔组织增生, 最终导致 HF 形成^[11]。CCl₄ 诱导的 HF 模型具有易操作、模型稳定、容易重复等优点^[12-13], 其模型在形态学、生物化学及细胞分子等方面与人 HF 相似^[14], 因此, 本实验采用 CCl₄ 制备了大鼠的 HF 模型。

HF 的实质是由于胶原等 ECM 的合成与降解失衡, 导致 ECM 在肝内过量沉积^[15]。ECM 主要由胶原、蛋白聚糖、粘连糖蛋白等构成, HA, LN, PC-III 和 C-IV 是 ECM 的重要组成成分, 其血清含量能较好地反映 HF 程度^[16-17]。本实验血清结果显示, PSSP 能显著降低 CCl₄ 诱导的大鼠 HF 血清中 HA, LN, PC-III 和 C-IV 含量, 而且天狼猩红染色结果显示, PSSP 能减少 CCl₄ 诱导的大鼠 HF 肝组织中胶原的合成,

提示 PSSP 可能通过抑制胶原的合成,减少 ECM 的沉积,从而发挥抗纤维化的作用。血清 ALT 和 AST 是反映肝损伤的主要指标,肝细胞一旦受损,ALT 和 AST 会大量释放入血^[18]。实验结果显示,PSSP 能明显降低降低 CCl₄ 诱导的大鼠 HF 血清中 ALT 和 AST 的含量,表明 PSSP 具有保护肝细胞的作用。

HSC 的活化在 HF 的过程中起着关键作用,Col-I 与 α -SMA 可作为 HSC 细胞活化的标志^[19-20]。TGF- β_1 是主要的纤维化细胞因子之一,能促进 HSC 细胞活化与增殖,形成过多的 ECM,主要包括 Col-I 和 α -SMA 等^[21-23]。因此,本实验采用 TGF- β_1 诱导 HSC-T6 细胞活化。Real-time PCR 和 Western blot 实验结果显示,TGF- β_1 能显著增加 HSC-T6 细胞 Col-I, α -SMA mRNA 和蛋白的表达量,从而促进 HSC 细胞的活化;而 PSSP 能明显降低 TGF- β_1 诱导的 HSC-T6 细胞中 Col-I, α -SMA mRNA 和蛋白的表达量,提示 PSSP 可抑制 TGF- β_1 诱导的 HSC 细胞的活化。

根据体内外研究结果,本实验可初步得出 PSSP 的具有很好的抗纤维化作用,其主要机制可能是通过抑制 HSC 的活化及减少胶原的合成,并减少 ECM 的产生以及促进其降解,从而达到抗 HF 的效果。本研究已初步得出 PSSP 抑制 HSC 活化的分子基础,为下一步的实验提供了指导性的意见,本课题组将继续进行深入的研究 PSSP 抑制 HSC 活化的相关分子机制,为将来 PSSP 应用于临床治疗 HF 提供参考。

[参考文献]

[1] ZHOU W C,ZHANG Q B,QIAO L. Pathogenesis of liver cirrhosis [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20 (23): 7312-7324.

[2] Blaner W S,O'Byrne S M,Wongsiriroj N, et al. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1791 (6): 467-473.

[3] 中国医学科学院药物研究所. 中药志 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1960: 357-360.

[4] ZHANG S X,ZHU C, BA Y, et al. Gekko-sulfated glycopeptide inhibits tumor angiogenesis by targeting basic fibroblast growth factor [J]. J Biol Chem, 2013, 287(16): 13206-13215.

[5] Ryu S Y, Oak M, Yoon S, et al. Anti-allergic and anti-inflammatory triterp-enes from the herb of *Prunella vulgaris* [J]. Planta Med, 2000, 66(4): 358-360.

[6] ZHANG X, Ao Z, Bello A, et al. Characterization of the inhibitory effect of an extract of *Prunella vulgaris* on Ebola virus glycoprotein (GP)-mediated virus entry and infection [J]. Antivir Res, 2016, 127(3): 20-31.

[7] HU Y, YU C, WU F, et al. Antihepatofibrotic effects of aqueous extract of *Prunella vulgaris* on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats [J]. Planta Med, 2016, 82(1/2): 97-105.

[8] 王莹莹,熊双丽,史敏娟,等. 夏枯草酸性多糖及其衍生物的生物活性研究 [J]. 林产化学与工业, 2013, 33 (5): 35-40.

[9] 王雅楠,曹蕊,朱聪,等. 夏枯草硫酸多糖对肝癌血管生成的作用及机制研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41 (12): 758-761.

[10] 段雪琳,韦燕飞,廖丹,等. 白花丹水煎液对四氯化碳诱导肝纤维大鼠的干预作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(7): 1059-1067.

[11] Friedman L. Hepatic fibrosis-overview [J]. Toxicology, 2008, 254(3): 120-129.

[12] 陈玮,陈维雄,陆允敏,等. 川芎嗪干预大鼠实验性肝纤维化的研究 [J]. 世界临床药物, 2007, 28(9): 522-525.

[13] 黄小丽,郭晓云,姜海行,等. Th17 及 Th1 细胞在四氯化碳致肝纤维化小鼠模型中的表达及关系 [J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(13): 1826-1833.

[14] Constantinou C, Henderson N, Iredale J P. Modeling liver fibrosis in rodents [J]. Methods Mol Med, 2005, 117(9): 237-250.

[15] HUANG Y, HUANG C, LI J. Effect of cytokines secreted from Kupffer cell on HSC proliferation, apoptosis in hepatic fibrosis process [J]. Chin Pharmacol Bull, 2010, 26(1): 9-13.

[16] 王颖,陈立宇,冯萍. 肝纤维化的无创诊断技术研究进展 [J]. 华西医学, 2014, 29(9): 1783-1786.

[17] Sebastiani G, Castera L, Halfon P, et al. The impact of liver disease aetiology and the stages of hepatic fibrosis on the performance of non-invasive fibrosis biomarkers: an international study of 2411 cases [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2011, 34(10): 1202-1206.

[18] Pinzani M, Barragan J. Update on the pathophysiology of liver fibrosis [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 4(4): 459-472.

[19] HE Y H, LI Z, MA M, et al. Cryptolepine derivative-6h inhibits liver fibrosis in TGF-beta1-induced HSC-T6 cells by targeting the Shh pathway [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(9): 987-995.

[20] Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis [J]. Gut, 2007, 56(2): 284-292.

[21] YANG Y, Kim B, Park Y K, et al. Astaxanthin prevents TGFbeta1-induced profibrogenic gene expression by inhibiting Smad3 activation in hepatic stellate cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(1): 178-185.

[22] 杨琳,卢斌,庞晓丽,等. 基于 TGF- β_1 /Smad4 信号探讨缺氧条件下补阳还五汤促进新生血管成熟的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3): 114-119.

[23] 程旭锋,张新峰,刘琦,等. 附子-白术药对对乳腺癌骨转移裸鼠 TGF- β /Smads/Gli2/PTHrP 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 128-132.

[责任编辑 全燕]