

# 丹芍化纤胶囊含药血清对大鼠肝星状细胞 Gremlin 和 BMP7 表达的影响

赵雪珂<sup>1</sup>, 吴荣敏<sup>2</sup>, 姚玉梅<sup>1\*</sup>, 国惠<sup>1</sup>, 何小慧<sup>1</sup>

(1. 贵阳医学院附属医院, 贵阳 550004; 2. 贵州省妇幼保健院, 贵阳 550003)

**[摘要]** **目的:**观察丹芍化纤胶囊(DSHX)含药血清对大鼠肝星状细胞(HSC)Gremlin和骨形态发生蛋白7(BMP7)表达的影响,探讨该药治疗肝纤维化的可能机制。**方法:**将20只雄性Wistar大鼠随机分为4组,每组5只,分别经DSHX低剂量(0.5 g·kg<sup>-1</sup>),DSHX高剂量(1.0 g·kg<sup>-1</sup>),扶正化瘀胶囊(0.8 g·kg<sup>-1</sup>)及生理盐水ig 5 d,2次/d,其后股动脉取血制备大鼠DSHX含药血清、扶正化瘀胶囊含药血清及生理盐水血清,4组血清分别干预体外培养的HSC-T6,用MTT比色法测定各组HSC的增殖效应,ELISA法测培养液上清I型胶原(Col I),Ⅲ型胶原(Col Ⅲ)及 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的含量,免疫细胞染色法检测各组HSC内转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )的表达,采用RT-PCR法检测各组HSC Gremlin,BMP7 mRNA的表达,Western blot检测各组HSC Gremlin,BMP7蛋白的表达。**结果:**与生理盐水血清组比较,DSHX低、高剂量组含药血清均可显著抑制大鼠HSC的增殖( $P < 0.05$ ),抑制率与扶正化瘀胶囊血清组相当;DSHX低、高剂量血清组培养液上清Col I,Col Ⅲ与 $\alpha$ -SMA的含量明显减少( $P < 0.01$ , $P < 0.05$ );HSC内TGF- $\beta_1$ 蛋白的表达强度显著降低( $P < 0.01$ ),与扶正化瘀胶囊血清组相当。与生理盐水血清组比较,DSHX低、高剂量血清组Gremlin mRNA及蛋白表达显著下降,而BMP7 mRNA及蛋白表达显著增多( $P < 0.01$ ),与扶正化瘀胶囊血清组相当。**结论:**丹芍化纤胶囊可抑制体外培养的大鼠HSC增殖与活化,减少细胞外基质的合成,对大鼠肝纤维化有潜在的治疗作用,其机制可能与下调HSC Gremlin,上调BMP7的表达有关。

**[关键词]** 丹芍化纤胶囊;肝星状细胞;Gremlin;骨形态发生蛋白7;肝纤维化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0182-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020182

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141204.0946.003.html>

**[网络出版时间]** 2014124 9:46

## Effects of Serum Containing Danshao Huaxian Capsule on Expressions of Gremlin and BMP7 in Rat HSC

ZHAO Xue-ke<sup>1</sup>, WU Rong-min<sup>2</sup>, YAO Yu-mei<sup>1\*</sup>, GUO Hui<sup>1</sup>, HE Xiao-hui<sup>1</sup> (1. *Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China*; 2. *Guizhou Maternal and Child Health Hospital, Guiyang 550003, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Danshao Huaxian capsule (DSHX) on the expressions of Gremlin and bone morphogenetic protein 7 (BMP7) in rat hepatic stellate cell (HSC) and to explore its possible mechanism in treating hepatic fibrosis. **Method:** A total of 20 male Wistar rats were randomly divided into control group, Fuzheng Huayu capsule group (0.8 g·kg<sup>-1</sup>), low-and high-dose DSHX treated group (0.5, 1.0 g·kg<sup>-1</sup>) ( $n = 5$ ). Rats in each group were intragastrically administered with the corresponding medicines, respectively, twice per day for 5 days. Then, the drug-containing serums were collected and added to the cultured HSC-T6. HSC proliferation was detected using MTT colorimetric assay. Collagen (Col) I, Col Ⅲ and  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) of culture supernatant were detected by ELISA. The expression of transforming growth factor (TGF) - $\beta_1$  in HSC was measured by immunocytochemistry staining, and the expressions of Gremlin and BMP7 were determined by RT-PCR and Western blot, respectively. **Result:** Compared with the control group, the HSC

**[收稿日期]** 20140501(013)

**[基金项目]** 贵州省科技计划课题(黔科合SZ字[2008]3049)

**[第一作者]** 赵雪珂,博士,副主任医师,从事肝纤维化防治研究,Tel:0851-6773914,E-mail:zhaoxueke1@163.com

**[通讯作者]** \*姚玉梅,副主任医师,从事肝纤维化防治研究,Tel:0851-6773914,E-mail:yaom@21cn.com

proliferation was significantly inhibited ( $P < 0.05$ ), the concentrations of Col I, Col III,  $\alpha$ -SMA and the expression levels of TGF- $\beta_1$  were decreased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), the mRNA and protein expressions of Gremlin were decreased ( $P < 0.01$ ), and the mRNA and protein expression of BMP7 were elevated ( $P < 0.01$ ) in the low- and high-dose DSHX serum groups. The above results in DSHX serum groups were the same as the positive control serum group. **Conclusion:** DSHX has potential effect in treating hepatic fibrosis in rats. It could inhibit the proliferation and activation of HSC and reduce the synthesis of extra cellular matrix, which are partly achieved by down-regulating gremlin and up-regulating BMP7.

**[Key words]** Danshao Huaxian capsule; hepatic stellate cell; Gremlin; bone morphogenetic protein 7; hepatic fibrosis

肝纤维化的发生机制错综复杂,肝星状细胞(HSC)活化是其中心环节,有多种细胞因子参与肝纤维化的发生发展,其中转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )是迄今已知的最强促HSC活化的细胞因子<sup>[1-2]</sup>,TGF- $\beta_1$ 通过其介导的细胞信号转导,诱导HSC向肌成纤维细胞转化,最终引起细胞外基质(ECM)在肝内过量沉积。Gremlin是近年发现的TGF- $\beta$ 通路下游因子,经TGF- $\beta_1$ 作用后,其基因和蛋白表达增加,与纤维化关系密切<sup>[3]</sup>。骨形态发生蛋白7(BMP7)是一种分泌型多功能蛋白,属于TGF细胞因子超家族,能逆转TGF- $\beta_1$ 的致纤维化作用<sup>[4]</sup>。因此,下调Gremlin并促进BMP7的表达,从而抑制HSC的活化,在肝纤维化的治疗中具有重要意义。目前,肝纤维化的药物治疗仍处于探索阶段,有学者发现,丹芍化纤胶囊(DSHX,原名汉丹肝乐)可上调肝纤维化大鼠肝脏过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)- $\gamma$ ,促进肝内Col I,Col III的降解,发挥治疗肝纤维化的作用,并对砷暴露肝损伤患者具有良好治疗作用<sup>[5-7]</sup>。本实验在前期研究的基础上,以大鼠HSC为研究对象,观察DSHX含药血清对HSC Gremlin和BMP7表达的影响,以探讨该药干预肝纤维化可能的作用机制,为抗肝纤维化药物的开发及临床应用提供可靠的实验依据。

## 1 材料

**1.1 肝星状细胞系** HSC-T6由北京友谊医院肝病中心贾继东教授惠赠。由SV40转染大鼠肝星状细胞而成,表型为活化HSC。

**1.2 动物** 雄性Wistar大鼠20只,清洁级,体质量(180 $\pm$ 20)g,购自中国人民解放军第三军医大学实验动物中心,合格证号SCXK(渝)2007-0003。普通饲料喂养,自由饮水,自然采光,室温15~25 $^{\circ}$ C,实验前适应环境1周。

**1.3 试剂** 丹芍化纤胶囊(由汉防己甲素、丹参、赤芍、黄芪、银杏叶等组成),贵阳制药厂生产(国药

准字Z20081011,批号201203162);扶正化瘀胶囊(上海黄海制药有限责任公司,国药准字Z20020073)。Col I,Col III, $\alpha$ -SMA检测试剂盒(南京建成,批号20120219,20120218,20120216),逆转录试剂盒(加拿大Fermentas MBI,批号00087036),电化学发光(ECL)试剂盒(美国Millipore,批号28216),全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物,批号KGP250),BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo SCIENTIFIC,批号23227),TGF- $\beta_1$ , Gremlin, BMP7一抗(英国Abcam,批号ab92486, ad90670, ab56023),Gremlin上、下游引物序列分别为5'-CGC-CATCCCCTCGCCTTACAA-3'和5'-AACCCCTC-CTCGCTCACCGTCT-3',176 bp;BMP7上、下游引物序列分别为5'-GTAGCGCGTAGAGCCG-3'和5'-CGAGTCCGTGCATGG-3',345 bp; $\beta$ -actin上、下游引物序列分别为5'-TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCT-3'和5'-GCTCAGTAACAGTCCGCCTAGAA-3',1536 bp。均由上海生工生物工程有限公司合成。

**1.4 仪器** 超净工作台(SW-CJ-1FD,苏州净化设备有限公司),二氧化碳培养箱(MCD-DAIC,日本三洋),752型紫外分光光度计(上海菁华科技),核酸定量仪(美国Amersham Biosciences),DA7600型核酸扩增实时荧光检测系统(中山大学达安基因),Gel Doc EQ凝胶成像仪(美国Bio-Rad),显微图像采集系统(日本Olympus)等。

## 2 方法

**2.1 大鼠含药血清的制备** 20只Wistar大鼠随机分成4组,即生理盐水组、扶正化瘀胶囊阳性组(0.8 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)<sup>[8]</sup>,DSHX低剂量组(0.5 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)及DSHX高剂量组(1.0 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)<sup>[9]</sup>,分别ig 5 d,2次/d,于末次灌胃后2 h再重复ig 1次,第2次ig 1 h后股动脉取血。1500 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心15 min,混匀同组大鼠血清,56 $^{\circ}$ C水浴30 min灭活补体,0.22  $\mu$ m滤膜过滤除菌,-80 $^{\circ}$ C保存备用。

**2.2 MTT 法检测含药血清对 HSC 增殖的影响** 将 HSC 按  $1.0 \times 10^5/\text{mL}$  接种 96 孔板,每孔  $100 \mu\text{L}$ ,预培养 72 h。然后分生理盐水血清组、阳性血清组、DSHX 低剂量及高剂量血清组,各孔加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基稀释的各种血清(均为 10%) $100 \mu\text{L}$ ,每组均设置 6 复孔。 $5\% \text{CO}_2$ , $37^\circ\text{C}$  培养 48 h 后,吸取上清液  $-20^\circ\text{C}$  冰冻保存,用 DMEM 洗 1~2 次,每孔加入  $100 \mu\text{L}$  DMEM 培养基和  $5 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT  $20 \mu\text{L}$ ,继续孵育 4 h,然后加入二甲亚砜(DMSO) $150 \mu\text{L}$ ,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪  $492 \text{nm}$  测量各孔的吸光度  $A$ 。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{实验孔}}) / A_{\text{对照孔}} \times 100\%^{[10]}$$

**2.3 ELISA 双抗夹心法检测培养液上清 Col I, Col III 及  $\alpha$ -SMA 水平** 培养液上清  $2000 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,取上清用 PBS 稀释 5 倍,每孔加稀释后样品  $50 \mu\text{L}$ , $37^\circ\text{C}$  温育 30 min,洗涤液洗 5 次。加酶标试剂  $50 \mu\text{L}$ , $37^\circ\text{C}$  温育 30 min,洗涤 5 次,加入显色剂  $37^\circ\text{C}$  避光显色 15 min。加终止液  $50 \mu\text{L}$ ,以空白管调零,15 min 内  $450 \text{nm}$  波长测量各孔  $A$ 。

**2.4 免疫细胞染色法观察各组血清对 HSC 内 TGF- $\beta_1$  蛋白表达的影响**

**2.4.1 制作细胞爬片** 6 孔培养板中放置预先用无菌  $0.01\%$  多聚赖氨酸处理过的盖玻片(面积约为  $1.0 \text{cm} \times 1.0 \text{cm}$ ),将经胰蛋白酶消化适宜的 HSC 悬液( $1 \times 10^5/\text{mL}$ )加入 6 孔培养板中,每孔  $1 \text{mL}$ ,于  $5\% \text{CO}_2$ , $37^\circ\text{C}$  培养 72 h,然后分为盐水血清组、阳性血清组、DSHX 低、高剂量血清组及阴性组。吸出原液,除阴性组外,其余各孔加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基稀释的各种血清(均为 10%) $1.5 \text{mL}$ ,每组均设置 6 复孔。继续培养 48 h,取出载玻片,PBS 清洗 3 次, $4\%$  多聚甲醛中固定后用去离子水清洗 1 次,室温自然晾干,中性树胶粘于载玻片上, $-20^\circ\text{C}$  保存。

**2.4.2 细胞爬片** 于室温下复温, $0.1\%$  Triton X-100 破膜,PBS 清洗, $3\% \text{H}_2\text{O}_2$  避光孵育,PBS 清洗,羊血清封闭,加入 TGF- $\beta_1$  一抗(工作浓度均为  $1:100$ ) $4^\circ\text{C}$  过夜,PBS 清洗。滴加 ChemMate™ EnVision/HRP 二抗,湿盒  $37^\circ\text{C}$  孵育,PBS 清洗,DAB 显色,室温下控制反应时间,蒸馏水终止反应。苏木素液轻度复染,中性树胶封片,PBS 代替一抗作为阴性对照。

**2.4.3 阳性判断** 胞浆及胞膜染成棕黄色者为阳性细胞,每张爬片取 5 个视野( $\times 400$  倍),每个视野

取 5 个视场,测定细胞中阳性表达的  $A$ 。

**2.5 RT-PCR 法检测各组 gremlin, BMP7 mRNA 的表达** HSC 按  $1.0 \times 10^5/\text{mL}$  接种于 6 孔板,每孔  $2 \text{mL}$ ,待细胞生长至 70% 融合时换含  $0.25\%$  的 FBS 血清培养液,作用 24 h,再按分组条件加入干预因素作用 48 h,每组设 6 个复孔。抽提细胞中总 RNA,用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度,保证  $A_{260}/A_{280}$  均为  $1.8 \sim 2.0$ 。取  $1 \mu\text{L}$  RNA,逆转录合成 cDNA 后行 RT-PCR。实验过程中以  $\beta$ -actin 作内对照,进行标准化转换得到各样本的拷贝数( $C_t$  值)。以  $C_t$  的均数来反映目的基因的表达。

**2.6 Western blot 检测各组 Gremlin, BMP7 蛋白的表达** 弃培养上清液,PBS 洗 2 遍, $0.25\%$  胰蛋白酶消化 HSC,离心,将收获的细胞用蛋白裂解液裂解,参考说明书条件提取蛋白并测定蛋白含量。取蛋白质样品  $40 \mu\text{g}$ , $10\%$  SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,分别用 Gremlin 抗体( $1:1000$ ),BMP7 抗体( $1:1000$ ) $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,二抗( $1:3000$ )室温 1 h,ECL 曝光显影,Gel Doc EQ 凝胶成像仪扫描,Quantity One 软件分析结果。以  $\beta$ -actin 表达水平作为内参照。目标蛋白的表达量以目标蛋白与内参照蛋白灰度值的相对比值表示。

**2.7 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较时,对于方差齐的情况采用 LSD 法,方差不齐的情况采用 Tamhane 法; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 HSC 增殖的影响** MTT 法测定结果显示,生理盐水血清组(A 组),阳性血清组(B 组),DSHX 低剂量血清组(C 组)和 DSHX 高剂量血清组(D 组)  $A$  分别为  $(0.61 \pm 0.03)$ ,  $(0.43 \pm 0.03)$ ,  $(0.49 \pm 0.03)$ ,  $(0.45 \pm 0.02)$ ,后 3 组 HSC 的抑制率分别为  $(27 \pm 7)\%$ ,  $(22 \pm 8)\%$ ,  $(25 \pm 10)\%$ ,与 A 组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 DSHX 低、高剂量组血清均可显著抑制大鼠 HSC 的增殖,其抑制率与阳性血清组相当。

**3.2 Col I, Col III 及  $\alpha$ -SMA 水平比较** B, C, D 组 3 个检测指标均显著低于 A 组( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),而 3 个检测指标在 B, C, D 组之间均无显著差异,见表 1。

**3.3 对 HSC 内 TGF- $\beta_1$  蛋白表达的影响**( $A$  与目标蛋白的表达强度呈反比) B, C, D 组 TGF- $\beta_1$  蛋白表达强度均显著低于 A 组(均  $P < 0.01$ ),而 B, C, D

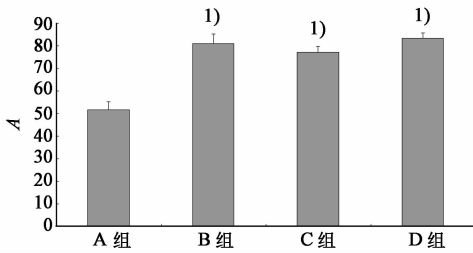
表 1 丹芍化纤胶囊含药血清对各组 Col I, Col III 及  $\alpha$ -SMA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Comparison of levels of Col I, Col III and  $\alpha$ -SMA in culture solution among groups ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	Col I /μg·L <sup>-1</sup>	Col III /μg·L <sup>-1</sup>	$\alpha$ -SMA /μg·L <sup>-1</sup>
A	-	55.50 ± 3.52	51.49 ± 3.78	49.48 ± 4.87
B	0.8	35.59 ± 3.59 <sup>1)</sup>	37.15 ± 3.28 <sup>1)</sup>	35.44 ± 3.12 <sup>1)</sup>
C	0.5	38.97 ± 2.05 <sup>1)</sup>	40.88 ± 3.22 <sup>1)</sup>	40.41 ± 2.61 <sup>2)</sup>
D	1.0	35.18 ± 2.49 <sup>1)</sup>	38.83 ± 3.92 <sup>1)</sup>	36.11 ± 2.80 <sup>1)</sup>

注:与 A 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

3 组之间无显著差异,见图 1。



与 A 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

图 1 丹芍化纤胶囊含药血清对各组 HSC 内 TGF- $\beta_1$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Immunocytochemical analysis of protein expression of TGF- $\beta_1$  in HSC among groups ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

表 2 丹芍化纤胶囊含药血清对各组 HSC Gremlin, BMP7 的 mRNA 及蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Comparison of mRNA and protein expression of Gremlin and BMP7 among groups ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	Gremlin		BMP7	
		mRNA	蛋白质	mRNA	蛋白质
A	-	146.80 ± 7.77	0.92 ± 0.03	76.34 ± 3.92	1.18 ± 0.06
B	0.8	85.69 ± 4.57 <sup>1)</sup>	0.64 ± 0.03 <sup>1)</sup>	106.21 ± 6.07 <sup>1)</sup>	1.89 ± 0.07 <sup>1)</sup>
C	0.5	97.51 ± 5.78 <sup>1)</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>1)</sup>	96.93 ± 6.68 <sup>1)</sup>	1.83 ± 0.05 <sup>1)</sup>
D	1.0	86.64 ± 3.77 <sup>1)</sup>	0.62 ± 0.02 <sup>1)</sup>	109.06 ± 6.89 <sup>1)</sup>	2.01 ± 0.07 <sup>1)</sup>

注:与 A 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

化及凋亡,并在组织器官的形成、胚胎发育和损伤组织的修复中起关键作用,BMP7 与 TGF- $\beta_1$  同属 TGF- $\beta$  超家族成员,二者的信号转导在纤维化形成过程中相互拮抗,BMP7 可直接拮抗 TGF- $\beta_1$  信号转导,或抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的上皮间质转化(EMT)<sup>[12]</sup>。近年研究发现,Gremlin 为 TGF- $\beta$  通路的下游因子,其基因最早从非洲爪蟾神经脊中克隆得到,编码 184 个氨基酸残基的蛋白质,是一种高度保守的分泌性蛋白,作为 BMP7 的天然拮抗因子,Gremlin 在肺、肾或肝纤维化进程中起着促进作用<sup>[13-15]</sup>。正常情况下肝脏中 Gremlin 的表达量很低或基本检测不到,

3.4 各组血清对 HSC gremlin, BMP7 mRNA 及蛋白表达的影响 B, C, D 组 gremlin mRNA 及蛋白表达均显著低于 A 组(均  $P < 0.01$ ), B, C, D 组 BMP7 mRNA 及蛋白表达均显著高于 A 组(均  $P < 0.01$ )。上述各检测指标在 B, C, D 3 组之间均无统计学差异,见表 2, 图 2。

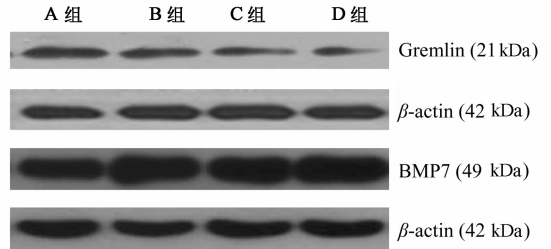


图 2 丹芍化纤胶囊含药血清对各组 HSC Gremlin, BMP7 蛋白的表达

Fig. 2 Western blot analysis of Gremlin and BMP7 expression in HSC among groups

#### 4 讨论

TGF- $\beta_1$  是重要的促肝纤维化细胞因子,可通过 TGF- $\beta$ /细胞质果蝇蛋白质(Smad)信号转导途径,刺激 HSC 活化,使细胞外基质(ECM)的合成和分泌增加,如 Col I, Col III,  $\alpha$ -SMA,从而促进肝纤维化发生发展<sup>[11]</sup>。BMP7 是一种分泌型的多功能蛋白,具有广泛的生物学活性,参与调节多种细胞的增殖、分

病理状态下的肝组织微环境优势表达 TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$  进一步特异性上调 Gremlin 表达<sup>[3]</sup>。而 Gremlin 通过与 BMP7 直接结合,阻断 BMP7 与其受体相结合,从而拮抗 BMP7 的生物学活性<sup>[16]</sup>。可见,上述三者之间可能存在着彼此调控与被调控的关系。

前期研究发现,丹芍化纤胶囊可上调 Smad7 的基因转录和蛋白质翻译,反馈性抑制 TGF- $\beta$ /Smad 促纤维化信号转导作用,且具有抑制 HSC 增殖的功能<sup>[9, 17]</sup>。血清药理学研究与将中药粗提物直接加入反应体系中的方法相比,具有较大的优势,能克服中药本身的杂质对实验结果的影响,且相对接近于药

物在体内生物转化的真实过程,能较客观阐明中药药效和作用机制,是目前研究中药药理学的一种较为理想的方法<sup>[18]</sup>。故本实验在前期工作基础上,制备丹芍化纤胶囊含药血清,用其作用于体外培养的大鼠 HSC,并以具有确切抗肝纤维化疗效的药物扶正化痰胶囊<sup>[19]</sup>作为阳性对照,观测丹芍化纤胶囊对大鼠 HSC Gremlin, BMP7 表达的影响,探讨其抑制 HSC 增殖、活化的可能机制。

结果显示,在丹芍化纤胶囊含药血清干预后,大鼠 HSC 的增殖被有效抑制,培养液上清 Col I, Col III 及  $\alpha$ -SMA 水平显著低于生理盐水对照组,提示 HSC 的活化受抑,合成分泌 ECM 的能力减弱。对 HSC 内 TGF- $\beta_1$  蛋白表达的检测表明,丹芍化纤胶囊血清组 TGF- $\beta_1$  显著低于生理盐水对照组。对 HSC Gremlin 与 BMP7 的检测发现,丹芍化纤胶囊血清组 Gremlin mRNA 及蛋白表达显著低于生理盐水对照组,而 BMP7 mRNA 及蛋白表达则显著高于生理盐水对照组,与扶正化痰胶囊阳性对照组相当。同时,上述两指标在丹芍化纤胶囊低、高剂量血清组之间无显著差异,提示低、高剂量丹芍化纤胶囊血清对大鼠 HSC Gremlin 与 BMP7 表达的影响无明显量效关系。

综上所述,本实验结果表明丹芍化纤胶囊对 HSC 的增殖及活化有明显抑制作用,具有良好的治疗肝纤维化的潜能。其改善肝纤维化的机制可能与下调 TGF- $\beta_1$  及其下游信号分子 Gremlin,上调 BMP7 表达有关。Gremlin 与 BMP7 很可能是本课题组新发现的丹芍化纤胶囊的药物作用靶点,有望成为抗肝纤维化药物作用的靶标及疗效评价指标。本研究结果对该药的开发及临床应用具有一定的指导意义,而丹芍化纤胶囊治疗肝纤维化的确切分子机制还有待于进一步深入研究。

#### [参考文献]

[1] Ikushima H, Miyazono K. Biology of transforming growth factor- $\beta$  signaling[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(12):2099-2107.  
[2] 赵珍东,段启,张雷红,等. 姜黄素对氧应激致大鼠肝星状细胞增殖及 TGF- $\beta_1$  表达的抑制作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(9):203-206.  
[3] 刘艳玲,柳长柏. Gremlin 和 BMP7 在纤维化疾病中的作用[J]. *广东医学杂志*, 2012, 33(3):422-424.  
[4] Wang S L, Yang C Q, Qi X L, et al. Inhibitory effect of bone morphogenetic protein-7 on hepatic fibrosis in rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(5):897-903.  
[5] Geng X X, Yang Q, Xie R J, et al. Effects of Dan-Shao-Hua-Xian on the expression of collagen type I and

III in rats with hepatic fibrosis [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 3(4):558-563.  
[6] 王河焱,周晓倩,程明亮. 丹芍化纤胶囊抗肝纤维化治疗对大鼠过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$  表达的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2007, 15(11):859-860.  
[7] 吴君,陆彤,程明亮. 汉丹肝乐胶囊对贵州地区 20 例石棉暴露肝损伤患者的治疗作用[J]. *中国地方病学杂志*, 2006, 25(1):86-89.  
[8] 刘成,姜春萌,刘平. 扶正化痰方对大鼠肝星状细胞旁分泌活化途径的抑制作用[J]. *中华消化杂志*, 2001, 21(6):367-369.  
[9] 耿晓霞,吴亚云,程明亮. 丹芍化纤胶囊对体外活化 HSC<sub>s</sub> 增殖、凋亡及 Fas/FasL 途径的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2005, 20(7):404-408.  
[10] 胡泰洪,黄利华,杨玲,等. NHE-1 与肝星状细胞增殖的关系及姜黄素对其的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(18):1860-1863.  
[11] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. *Nature*, 2003, 425(6958):577-584.  
[12] Khan I, Agarwal P, Thangjam G S, et al. Role of TGF- $\beta$  and BMP7 in the pathogenesis of oral submucous fibrosis[J]. *Growth Factors*, 2011, 29(4):119-127.  
[13] Yang T, Chen S L, Lu X J, et al. Bone morphogenetic protein 7 suppresses the progression of hepatic fibrosis and regulates the expression of gremlin and transforming growth factor  $\beta_1$  [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1):246-252.  
[14] Rodrigues-Diez R, Lavoiz C, Carvajal G, et al. Gremlin is a downstream profibrotic mediator of transforming growth factor-beta in cultured renal cells[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2012, 122(1/2):62-74.  
[15] Costello C M, Cahill E, Martin F, et al. Role of gremlin in the lung: development and disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42(5):517-523.  
[16] Sethi A, Jain A, Zode G S, et al. Role of TGFbeta/Smad signaling in gremlin induction of human trabecular meshwork extracellular matrix proteins [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(8):5251-5259.  
[17] 杨婷,谢汝佳,罗新华,等. 丹芍化纤胶囊对肝纤维化大鼠肝脏 Smads 分子表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(9):1807-1812.  
[18] 张绪富,吕志平,赵进军. 血清药理学在抗肝纤维化研究中的应用概况[J]. *南京中医药大学学报:自然科学版*, 2002, 18(2):127-128.  
[19] Liu P. Fuzheng Huayu capsule in the treatment of liver fibrosis: clinical evidence and mechanism of action[J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(5):398-400.

[责任编辑 邹晓翠]