

鳖甲提取物对抑制 TGF- β 诱导的大鼠肝星状细胞活化的影响

熊莎¹, 高建蓉², 胡祖良², 刘焱文¹, 尤朋涛^{1*}

(1. 湖北中医药大学 中药资源与化学重点实验室, 武汉 430065; 2. 浙江衢化医院, 浙江 衢化 324004)

[摘要] **目的:**研究鳖甲提取物相对分子质量 < 6 kDa 肽段(P6)对转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)诱导的大鼠肝星状细胞 HSC-T6 的活化增殖与肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)相关基因表达的影响,初步探究其抗肝纤维化的作用机制。**方法:**应用透析法得到 P6;细胞增殖与活性检测(CCK8)法检测 P6 对 HSC-T6 细胞增殖的影响;实时荧光定量聚合酶反应(Real-time PCR)检测 HSC-T6 细胞内 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA), I 型胶原(collagen type I, Col I), 基质金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)以及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的 mRNA 表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)分析 HSC-T6 细胞内 α -SMA 与 Col I 蛋白的表达。**结果:**与空白组比较, P6 对 HSC-T6 细胞存活率无明显影响,但却能显著抑制 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞的增殖($P < 0.05$)。与 TGF- β 组比较, P6 各浓度均能显著降低 HSC-T6 细胞中 α -SMA, Col I, TIMP-1 mRNA 的表达,增加 MMP-2 mRNA 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),明显降低 α -SMA 与 Col I 蛋白的表达。**结论:**P6 能抑制 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞的活化增殖,减少细胞外基质(extracellular matrix, ECM)生成,促进其降解,发挥抗肝纤维化作用。

[关键词] 鳖甲; HSC-T6; 肝纤维化; 活化; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0155-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190155

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1351.028.html>

[网络出版时间] 2017-07-11 13:51

Effect of Carapax Trionycis in Inhibiting Activation of Rat Hepatic Stellate Cell Induced by TGF- β

XIONG Sha¹, GAO Jian-rong², HU Zu-liang², LIU Yan-wen¹, YOU Peng-tao^{1*}

(1. Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Resources And Chemistry, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Zhejiang Quhua Hospital, Quhua 324004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of P6 (< 6 kDa) on activation, proliferation and hepatofibrosis-related genes in rat hepatic stellate cell line HSC-T6 induced by transforming growth factor- β (TGF- β), in order to explore the mechanism of anti-hepatofibrosis effect. **Method:** Dialysis was applied to get P6. Cell counting Kit 8 (CCK8) was performed to evaluate cell viability and P6 effect on HSC-T6 proliferation. The mRNA expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type I (Col I), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were determined by Real-time PCR. Protein expressions of α -SMA and Col I were assessed by Western blot. **Result:** Compared with control group, P6 did not significantly affect cell viability, but suppressed TGF- β -induced HSC-T6 proliferation ($P < 0.05$). Compared with TGF- β group, mRNA expressions of α -SMA, Col I and TIMP-1 were significantly decreased by P6 in TGF- β -induced HSC-T6, while MMP-2 mRNA expression was markedly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), α -SMA and Col I protein

[收稿日期] 20170418(021)

[基金项目] 浙江省自然科学基金项目(LY14H280001);浙江省公共项目(2016C37037)

[第一作者] 熊莎,在读硕士,从事中药及其制剂的物质基础研究, Tel:18771941242, E-mail:1101338068@qq.com

[通讯作者] *尤朋涛,博士,助理研究员,从事肿瘤免疫研究, Tel:13329738372, E-mail:tptyou@hbtem.edu.cn

expressions were also decreased obviously. **Conclusion:** These results demonstrated that P6 had an anti-hepatofibrosis effect by inhibiting HSC-T6 activation and proliferation induced by TGF- β , reducing production and accelerating degradation of ECM.

[**Key words**] Carapax Trionycis; HSC-T6; hepatofibrosis; activation; mechanism

肝纤维化是在持续存在的肝损伤作用下,组织发生修复时细胞外基质(ECM)合成与降解失衡,导致 ECM 在体内大量沉积而引起的一种病理改变,可继发于各种慢性肝损伤之后,是慢性肝病发展成为肝硬化的必经阶段^[1-2],通过积极有效地对原发病和肝纤维化进行治疗,可预防肝纤维化发展成为肝硬化或肝癌^[3]。大量研究表明,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)及其活化形式,即类成纤维细胞是 ECM 的主要来源^[2]。活化的 HSC 释放转化生长因子- β (TGF- β)等多种细胞因子,从而促进 ECM 的异常合成,抑制其降解^[3]。目前,常用的抗肝纤维化药物有干扰素- γ (IFN- γ),秋水仙碱等,但常规西药对抗肝纤维化的疗效仍不确切,部分药物还可产生较大的不良反应,治疗效果不理想。因此,从中草药中寻找具有抗肝纤维化活性成分,具有十分重要的意义。

鳖甲,来源于鳖科动物鳖的背甲,具有滋阴潜阳、软坚散结、退热除蒸的功效,广泛应用于临床抗肝纤维化治疗^[4]。目前已经上市的以鳖甲为君药的中药抗肝纤维化复方有复方鳖甲软肝片、鳖甲抗纤方、鳖甲煎丸等,且均报道有较好的抗肝纤维化作用^[4-5],但其抗肝纤维化的物质基础和作用机制尚不明确。本课题组前期研究表明,鳖甲提取物能抑制大鼠肝纤维化,作用相当或优于公认的抗肝纤维化药物 IFN- γ ,扶正化瘀胶囊^[6],并且进一步发现相对分子质量 < 6 kDa 肽段(P6)是鳖甲发挥抗肝纤维化作用的活性肽段^[7]。本实验在前期工作基础上,通过研究 P6 对 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞活化增殖以及对相关基因与蛋白的影响,初步探讨其抗肝纤维化作用及可能机制,为抗肝纤维化中药新药开发提供科学依据。

1 材料

1.1 药物 鳖甲中药饮片(衢州南孔中药有限公司饮片厂,批号 1612128),经湖北中医药大学中药资源教研室吴和珍教授鉴定为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* 的背甲。将饮片打粉并过 80 目筛,收集鳖甲细粉。

1.2 细胞株 大鼠肝星状细胞株 HSC-T6,由浙江大学附属第一医院肝病研究所提供。

1.3 试剂 DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司,批号为 8416246),FBS 胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 1715752),TGF- β (美国 Peprotech 公司,批号 0713AF354),0.25% 胰酶(上海源培生物科技有限公司,批号 G40308),细胞增殖与活性检测(CCK8)试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号 20150221),透析袋(美国光谱医学,批号 131492),鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)单抗、兔抗 α -SMA 单抗、兔抗 Col I 单抗(美国 CST 公司,货号分别为 8H10D10,14968S,ab34710),trizol 和逆转录试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,批号分别为 DP419, K1622),实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒(美国 Kapa 公司,批号 KK4601),Real-time PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 仪器 HH·CP-01 型恒温细胞培养箱(上海福玛实验设备有限公司);HCB-1300V 型垂直层流洁净工作台(青岛海尔特种电器有限公司);Revco Ultima II 型超低温冰箱(美国 Thermo Scientific 公司);CR21GIII 型高速冷冻离心机(美国 HITACHI 公司);xMARK 型酶标仪,PowerPac 型电泳仪,CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)VE186 型转移电泳槽,Scope 系列凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 透析法获得 P6 称取鳖甲细粉 200 g,用 400 mL 双蒸水超声提取 20 min,抽滤得滤液,将滤渣再用 200 mL 双蒸水超声提取 10 min,混合滤液,将滤液冷冻干燥。将鳖甲提取液冻干粉用少量双蒸水溶解,置于相对分子质量为 6 kDa 的透析袋中,4 $^{\circ}$ C 透析 5 h,同法再透析 1 次,合并透析液,并将其冷冻干燥,得到 P6 冻干粉 1.132 g。

2.2 细胞培养 HSC-T6 细胞复苏后采用含有 10% FBS 的 DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 恒温培养箱中培养,每 2 d 换 1 次液,3~4 d 即可传代。

2.3 CCK8 法检测 P6 对 HSC-T6 细胞增殖的影响 取对数生长期的 HSC-T6 细胞,以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板内,分别设空白组,5 μ g \cdot L⁻¹ TGF- β 诱导模型组^[2]、不同质量浓度的 P6 处理组、加入 5 μ g \cdot L⁻¹ TGF- β 的 P6 处理组,每组设 3 个复孔。待

细胞贴壁后,按上述分组处理细胞,使 P6 终质量浓度为 25,50,100,200 mg·L⁻¹。在细胞培养箱中培养 48 h 后,每孔加入 CCK8 20 μL,继续在培养箱中培养 4 h 后,采用酶标仪在 450 nm 下检测各组的吸光度 A,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.4 Real-time PCR 法检测 HSC-T6 细胞内 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA), I 型胶原(Col I), 基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1) 和基质金属蛋白酶(MMP-2) mRNA 的表达 将处于生长对数期的 HSC-T6 细胞,经消化后制成单细胞悬液,按 1 × 10⁶ 个/孔的细胞数接种于 6 孔板中。分别设空白组, TGF-β 组(使其终质量浓度为 2.5, 5, 10 μg·L⁻¹), 加入 5 μg·L⁻¹ TGF-β 的不同 P6 处理组(P6 终质量浓度为 25, 50, 100 mg·L⁻¹)。置于细胞培养箱中培养 24 h 后,采用 trizol 提取细胞中总 RNA,逆转录成 cDNA,通过特异性引物对细胞中的 α-SMA, Col I, MMP-2, TIMP-1 及其内参基因 β-actin 进行扩增,基因引物序列为 β-actin: 上游 5'-GGAGATTACTGCCC TGGCTCCTA-3', 下游 5'-GACTCATCGTACTCTCTG CTTGCTG-3', 产物长度 240 bp; α-SMA: 上游 5'-CGGGCATCCACGAAACCACC-3', 下游 5'-GAGCCG CCGATCCAGACAGA-3'^[8], 产物长度 217 bp; Col I: 上游 5'-CAATGGCACGGCTGTGTGCG-3', 下游 5'-CACTCGCCCTCCCGTCTTTGG-3'^[3], 产物长度 462 bp; TIMP-1: 上游 5'-GCCTACACCCAGCCAT-3', 下游 5'-ATGCCAGGGAACCAGGAAGC-3', 产物长度 287 bp; MMP-2: 上游 5'-CCAAAGCAGTGAGCGA GAA-3', 下游 5'-TCCCAGGGCACAATAAAGTC-3'^[9], 产物长度 262 bp。采用 CFX96 Real-time PCR 仪扩增,反应条件:95 ℃ 预变性 3 min, 95 ℃ 变性 3 s, 60 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 40 个循环分析溶解曲线,确认扩增产物的特异性,相对表达量计算采取 2^{-ΔΔC_t} 法计算。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HSC-T6 细胞内 α-SMA 和 Col I 蛋白的表达 取对数生长期的 HSC-T6 细胞,按 1 × 10⁶ 个/孔的细胞数接种 6 孔板,处理与分组同 2.4 项,置于细胞培养箱中培养 24 h 后,收集细胞,PBS 洗 2 遍,提取细胞总蛋白并定量。制备 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,上样电泳,110 mA 转膜 1 h,5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗 3 遍,每遍 5 min, α-SMA 和 Col I 一抗(1:1 000) 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 遍,然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:8 000),室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3

遍,用 ECL 试剂盒在暗室中显影。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 P6 对 HSC-T6 细胞增殖的影响 在 TGF-β 不存在情况下,与空白组比较,各浓度的 P6 对 HSC-T6 细胞存活率无明显抑制作用,而 5 μg·L⁻¹ TGF-β 能显著促进 HSC-T6 细胞增殖(*P* < 0.05)。在 TGF-β 存在情况下,与 5 μg·L⁻¹ TGF-β 组比较,各浓度 P6 能显著抑制 HSC-T6 细胞增殖(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 P6 对 HSC-T6 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	存活率/%
空白	-	100.00 ± 2.94
TGF-β(5 μg·L ⁻¹)	-	111.75 ± 10.24 ¹⁾
P6	25	97.13 ± 2.77
	50	91.04 ± 1.30
	100	84.96 ± 0.99
	200	82.39 ± 2.63
TGF-β(5 μg·L ⁻¹) + P6	25	95.95 ± 1.08 ²⁾
	50	95.48 ± 0.43 ²⁾
	100	93.97 ± 1.91 ²⁾
	200	93.00 ± 1.29 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ *P* < 0.05;与 TGF-β 组比较²⁾ *P* < 0.05。

3.2 TGF-β 对诱导 HSC-T6 细胞的影响 TGF-β 处理能诱导 HSC-T6 细胞中 α-SMA 和 Col I 基因和蛋白的表达。不同浓度的 TGF-β 作用于 HSC-T6 细胞后,随着 TGF-β 浓度的增加,细胞内 α-SMA 和 Col I mRNA 的表达与空白组相比逐步升高,且具有极显著差异(*P* < 0.01)。如图 1 所示,细胞内 α-SMA 和 Col I 蛋白表达与空白组相比也明显增加。但在质量浓度分别为 5, 10 μg·L⁻¹ TGF-β 作用下,两组 α-SMA 与 Col I mRNA 表达水平相互比较无显著性差异。因此,后续实验选用质量浓度为 5 μg·L⁻¹ TGF-β 活化 HSC-T6 细胞。见表 2, 3。

表 2 TGF-β 诱导 HSC-T6 细胞中 α-SMA 和 Col I 蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n = 3$)

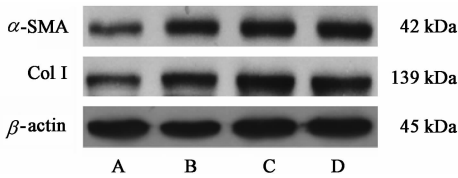
组别	质量浓度/μg·L ⁻¹	α-SMA	Col I
空白	-	0.458 ± 0.008	0.471 ± 0.002
TGF-β	2.5	0.830 ± 0.005 ¹⁾	0.803 ± 0.009 ¹⁾
	5	0.868 ± 0.004 ¹⁾	0.871 ± 0.002 ¹⁾
	10	0.877 ± 0.005 ¹⁾	0.906 ± 0.005 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ *P* < 0.01(表 3 同)。

表 3 TGF- β 诱导 HSC-T6 细胞中 α -SMA 和 Col I 基因的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of TGF- β on expression of α -SMA and Col I mRNA in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	α -SMA	Col I
空白	-	1.00	1.00
TGF- β	2.5	2.18 \pm 0.41 ¹⁾	1.63 \pm 0.15 ¹⁾
	5	3.30 \pm 0.16 ¹⁾	2.35 \pm 0.20 ¹⁾
	10	3.77 \pm 0.11 ¹⁾	2.65 \pm 0.18 ¹⁾



A. 空白组; B-D. TGF- β 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 1 TGF- β 诱导 HSC-T6 细胞中 α -SMA 和 Col I 蛋白的表达电泳

Fig. 1 TGF- β induced expression of α -SMA and Col I protein in HSC-T6 cells

表 4 P6 对 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞中 α -SMA, Col I, TIMP-1 和 MMP-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of P6 on expression of α -SMA, Col I, TIMP-1 and MMP-2 mRNA in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	α -SMA	Col I	TIMP-1	MMP-2
空白	-	1.00	1.00	1.00	1.00
TGF- β (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	-	3.36 \pm 0.47 ¹⁾	2.85 \pm 0.08 ¹⁾	3.03 \pm 0.30 ¹⁾	0.28 \pm 0.05 ¹⁾
TGF- β (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) + P6	25	3.05 \pm 0.19	2.40 \pm 0.03	2.44 \pm 0.11	0.44 \pm 0.11
	50	2.25 \pm 0.32 ²⁾	1.63 \pm 0.13 ²⁾	1.95 \pm 0.18 ²⁾	0.70 \pm 0.17 ²⁾
	100	1.60 \pm 0.20 ³⁾	1.33 \pm 0.09 ³⁾	1.24 \pm 0.25 ³⁾	0.94 \pm 0.18 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 TGF- β 模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

表 5 P6 对 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞中 α -SMA 和 Col I 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of P6 on expression of α -SMA and Col I protein in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	α -SMA	Col I
空白	-	0.311 \pm 0.006	0.224 \pm 0.007
TGF- β (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	-	0.958 \pm 0.005 ¹⁾	0.981 \pm 0.008 ¹⁾
TGF- β (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) + P6	25	0.873 \pm 0.003 ²⁾	0.948 \pm 0.009 ²⁾
	50	0.860 \pm 0.001 ²⁾	0.905 \pm 0.006 ²⁾
	100	0.666 \pm 0.005 ²⁾	0.872 \pm 0.009 ²⁾

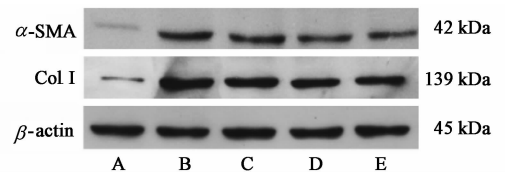
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 TGF- β 模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

成肝癌,导致死亡^[10]。目前尚无有效药物能将肝硬化治愈,但肝硬化作为各种慢性肝病进展为肝硬化的一个必经阶段,已经被证实是可逆的^[11]。鳖甲作为传统中药,广泛应用于临床抗肝纤维化治疗。在本研究中,本课题组发现了 P6 体外抗肝纤维化活

3.3 P6 对 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞 α -SMA, Col I, TIMP-1, MMP-2 mRNA 以及 α -SMA 和 Col I 蛋白表达的影响 与空白组比较,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β 作用于 HSC-T6 细胞后,能显著增加 α -SMA, Col I, TIMP-1 mRNA 的表达 ($P < 0.01$),降低 MMP-2 mRNA 的表达 ($P < 0.01$),增加 α -SMA 和 Col I 蛋白的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 TGF- β 组比较,P6 各剂量浓度均能降低 HSC-T6 细胞中 α -SMA, Col I, TIMP-1 mRNA 的表达,促进 MMP-2 mRNA 的表达,降低 α -SMA 和 Col I 蛋白的表达。当 P6 质量浓度为 50, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, α -SMA, Col I, TIMP-1, MMP-2 mRNA 的表达水平与 TGF- β 组相比均存在显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4, 5, 图 2。

4 讨论

肝纤维化是肝组织损伤后的一种修复反应,以 ECM 的过度沉积为特点^[9]。如果 ECM 与慢性炎症持续存在,会破坏肝实质结构形成肝硬化,最终演变



A. 空白组; B. TGF- β 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C ~ E. TGF- β (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) + P6 25, 50, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 2 P6 对 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞中 α -SMA 和 Col I 蛋白表达电泳

Fig. 2 P6 on expression of α -SMA and Col I protein in HSC-T6 cells

性,充分印证了实验室前期研究,并对其抗肝纤维化作用机制进行初步研究。

HSC 细胞的活化与增殖是肝纤维化发生的中心环节, Col I 与 α -SMA 可作为 HSC 细胞活化的标志^[12-13]。TGF- β 是主要的纤维化细胞因子,能促进 HSC 细胞活化和增殖^[14-16],形成过多的 ECM,主要包括 α -SMA 与 Col I 等。所以,本实验采用 TGF- β

来诱导 HSC-T6 细胞活化,结果也证明了 TGF- β 通过上调 α -SMA 与 Col I 的表达促进 HSC-T6 细胞活化,P6 能抑制 TGF- β 诱导的 α -SMA 和 Col I 的表达。MMP-2 与 TIMP-1 是肝细胞中一对调节 ECM 的主要细胞因子,MMP-2 能降解 ECM,而 TIMP-1 是 MMP-2 的抑制剂,可选择性的结合 MMP-2,抑制其降解 ECM^[17-18]。正常情况下,TIMP-1 与 MMP-2 保持着动态平衡,当肝组织受到持续损伤时,HSC 细胞激活并分泌大量 TIMP-1,从而抑制 MMP-2 的活性,使 ECM 降解减少^[19]。本实验 Real-time PCR 结果显示,当 P6 为 50,100 mg·L⁻¹时,能显著抑制 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞中 α -SMA,Col I 以及 TIMP-1 mRNA 的表达,促进 MMP-2 mRNA 的表达,并呈浓度依耐性。Western blot 结果显示,各剂量浓度 P6 均能明显降低 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞中 α -SMA 和 Col I 蛋白的表达。由此本研究认为,P6 发挥抗肝纤维化作用是通过抑制 TGF- β 诱导的 HSC-T6 细胞活化而抑制其增殖,并通过减少 ECM 的产生以及促进其降解达到抗肝纤维化的效果。

本研究初步探讨了 P6 抑制 HSC-T6 细胞活化的分子基础,为阐明 P6 的抗肝纤维化机制提供了实验依据。本课题组将继续深入研究 P6 的抗肝纤维化作用及其分子机制,为开发高效的中药抗肝纤维化新药奠定基础。

[参考文献]

[1] 戴琦,罗永宾,李梦乔,等. 益气活血利水汤对肝纤维化模型大鼠 Ncadin-Wnt 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(7):134-140.

[2] TANG Y, HU C, LIU Y. Effect of bioactive peptide of Carapax Trionycis on TGF- β_1 -induced intracellular events in hepatic stellate cells[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(1): 69-73.

[3] Sacha R, Thomas G, Aude B, et al. Characterization of the MMP/TIMP imbalance and collagen production induced by IL-1 β or TNF- α release from human hepatic stellate cells[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153118.

[4] 邱邦东,臧月,王生,等. 鳖甲煎丸改善肠道菌群失调治疗大鼠非酒精性脂肪肝的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(4):145-151.

[5] 郑艳,贺松其,文彬,等. 鳖甲煎丸对 HUVEC 增殖及 HepG2 中 VEGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(20):132-136.

[6] 高建蓉,朱友法,张赤志,等. 鳖甲水煎液对两种肝纤维化大鼠模型的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2009,27(8):1727-1733.

[7] 高建蓉,陶君,张赤志,等. 鳖甲防治肝纤维化实验研

究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(11):2462-2471.

[8] LIU Y, YANG P, CHEN N, et al. Effects of recombinant human adenovirus-p53 on the regression of hepatic fibrosis [J]. Int J Mol Med, 2016, 38(4): 1093-1100.

[9] CHONG L W, HU Y C, Lee T F, et al. Fluvastatin attenuates hepatic steatosis-induced fibrogenesis in rats through inhibiting paracrine effect of hepatocyte on hepatic stellate cells[J]. BMC Gastroenterol, 2015, 15(1): 22-30.

[10] TANG L X, HE R H, YANG G, et al. Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling *in vivo* and *in vitro*[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31350.

[11] YU F, GUO Y, CHEN B, et al. MicroRNA-17-5p activates hepatic stellate cells through targeting of Smad7 [J]. Lab Invest, 2015, 95(7): 781-789.

[12] HE Y H, LI Z, MA M, et al. Cryptolepine derivative-6 h 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.

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

[14] Lim C S, Kim E Y, Lee H S, et al. Protective effects of *Cinnamomum cassia* Blume in the fibrogenesis of activated HSC-T6 cells and dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in SD rats [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(3): 477-483.

[15] QIN Y, ZHONG Y, YANG G, et al. Profiling of concanavalin A-binding glycoproteins in human hepatic stellate cells activated with transforming growth factor-beta1 [J]. Molecules, 2014, 19(12): 19845-19867.

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

[17] Robison A, Nestler E. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction[J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(11): 623-637.

[18] Seki E, Brenner D A. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis [J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015, 22(7): 512-518.

[19] 郑旭锐,惠毅,同曙光,等. 三甲散对 HSC-T6 细胞 α -SMA,TIMP-1 和 ROCK-1 蛋白表达的影响[J]. 天津中医药大学学报,2014,33(6): 359-361.

[责任编辑 邹晓翠]