

委陵菜酸对大鼠肝星状细胞的抑制作用及其机制分析

劳玲玲¹, 卢春远¹, 黄权芳², 林兴¹, 韦锦斌^{1*}

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

[摘要] **目的:**研究委陵菜酸(tormentic acid, TA)对大鼠肝星状细胞(HSC-T6)活化增殖及转化生长因子- β (TGF- β)/Smads 信号通路的影响,探讨其抗纤维化的作用机制。**方法:**采用细胞活性毒性检测法(CCK-8)观察 TA(0, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于 HSC-T6 细胞 24 h 时的增殖情况,计算半数抑制率(IC_{50})并筛选出最适浓度。取对数生长期的 HSC-T6 细胞,分为正常组,刺激组,TA 高、中、低剂量(40, 20, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。利用姬姆萨染色液检测 TA 对细胞集落形成;流式细胞仪检测细胞凋亡及周期的变化;免疫组化法检测 III 型胶原蛋白(Col-III)的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Smad4, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达。**结果:**TA 能够抑制 HSC-T6 细胞的增殖,呈剂量依赖性, IC_{50} 为 81.71 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;与正常组比较,TA 呈剂量依赖性地抑制 HSC-T6 细胞集落的生成,同时,TA 能明显地促进细胞凋亡和将细胞阻滞在 G_2 期($P < 0.05$, $P < 0.01$);此外,还能降低 Col-III, α -SMA, Smad4 蛋白表达($P < 0.05$)。**结论:**委陵菜酸对肝星状细胞有明显的抑制作用,其机制可能与促进细胞凋亡、阻滞细胞周期,以及与阻断 TGF- β /Smads 通路有关。

[关键词] 委陵菜酸; 肝星状细胞; 细胞凋亡; 转化生长因子- β (TGF- β) /Smads 信号通路

[中图分类号] R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)08-0097-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180737

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180110.1638.013.html>

[网络出版时间] 2018-01-12 9:02

Inhibitory Effect and Underlying Mechanism of Tormentic Acid on Rat Hepatic Stellate Cells

LAO Ling-ling¹, LU Chun-yuan¹, HUANG Quan-fang², LIN Xing¹, WEI Jin-bin^{1*}

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of tormentic acid (TA) on the proliferation of rat hepatic stellate cell (HSC-T6) and transformation growth factor- β (TGF- β) /Smad signal pathway, so as to explore its anti-hepatic fibrosis mechanism. **Method:** Cell counting kit (CCK)-8 assay was used to observe the proliferation of HSC-T6 cell after treated with TA (0, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. The half inhibitory concentration (IC_{50}) of TA was calculated, and the optimal concentration was selected. HSC-T6 cells in the logarithmic phase were collected and divided into normal control group, stimulation group, and high, middle and low-dose TA (40, 20, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) treatment groups. Cell colony formation was observed using Giemsa staining; and cell apoptosis and cell cycle were examined by flow cytometry. The protein expression of Col-III was detected by immunocytochemistry. Additionally, the protein expressions of Smad4 and α -SMA were detected by Western blot. **Result:** TA could inhibit the proliferation of HSC-T6 cells in a concentration-dependent manner, and its IC_{50} value was 81.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with the normal group, TA significantly inhibited the colony formation

[收稿日期] 20171031(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660686, 81660706)

[第一作者] 劳玲玲, 硕士, 从事生化药理学研究工作, Tel: 0771-5645433, E-mail: 934206975@qq.com

[通信作者] * 韦锦斌, 博士, 教授, 从事生化药理学研究工作, Tel: 0771-5645433, E-mail: jbwei@sina.cn

in a dose-dependent manner. Meanwhile, TA could also significantly promote HSC-T6 cell apoptosis and arrest cell cycle in G₂ phase ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In addition, TA obviously decreased the protein expressions of Col-III, α -SMA and Smad4 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tormentic acid can significantly suppress HSC-T6 cell activation. Its mechanism may be correlated with the promotion of cell apoptosis, the retardation of cell cycle and the inhibition of TGF- β /Smad pathway.

[**Key words**] tormentic acid; hepatic stellate cell; cell apoptosis; transformation growth factor- β (TGF- β) /Smad signaling pathway

肝纤维化是肝脏对于慢性肝损伤的自我修复反应,在病毒、酒精、药物滥用、代谢综合征、自身免疫性疾病和代谢的遗传紊乱等刺激因素下,肝星状细胞(HSCs)被激活、增殖活化并大量分泌细胞外基质(ECM),使ECM的合成和降解失去平衡,导致其在肝内过度沉积。其中HSCs是肝纤维化发生发展过程中最关键的效应细胞^[1],因此,对HSCs细胞介导的ECM合成的抑制是抗纤维化治疗方法的主要目标。转化生长因子- β (TGF- β)/Smads信号通路是肝星状细胞活化增殖、促进ECM生成的最重要途径^[2],其中TGF- β 是促进HSC细胞增殖和致肝纤维化最强的细胞因子之一,也是目前研究最多与肝纤维化发生发展密切相关的细胞因子,而Smad蛋白是TGF- β 信号从受体到核内的转导分子,TGF- β 主要通过HSCs内的Smads信号转导途径来发挥促纤维化的作用,干预该信号通路可能是治疗肝纤维化的机制之一^[3-4]。

委陵菜为蔷薇科植物委陵菜 *Potentilla chinensis* 的干燥全草,委陵菜酸(tormentic acid,TA)是从委陵菜分离出来的主要活性之一,近年研究发现,委陵菜酸具有抗氧化^[5]、降脂保肝^[6-7]、抗肿瘤^[8]、降血糖^[9]等药理作用。前期研究证实,TA对脂多糖(LPS)/D-氨基半乳糖(D-GalN)诱导的小鼠急性肝损伤具有明显的保护作用,其机制可能与抗炎、抑制脂质过氧化和肝细胞的凋亡等有关^[6]。但是,TA改善肝纤维化的体外作用机制尚未见相关研究报道。血小板衍生生长因子(PDGF-BB)是主要的促肝纤维化的细胞因子,因此本实验以PDGF-BB为刺激因素,探讨TA对PDGF-BB诱导的HSC-T6细胞的抑制作用,以及对TGF- β /Smads信号通路的影响,进一步阐明TA抗肝纤维化的作用机制,从而为抗肝纤维化提供实验数据和理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 大鼠肝星状细胞HSC-T6细胞购于上海美轩生物科技有限公司。

1.2 药物及试剂 委陵菜酸(上海将来实业股份

有限公司,批号PRF7042741);大鼠PDGF-BB(美国Pepro Tech公司,批号0507CY420);DMEM高糖培养基、青链霉素(美国Hyclone公司,批号分别为ABF217624,20160929);Gemini胎牛血清(美国Gemini公司,批号A55E00F);姬姆萨工作液(北京索莱宝科技有限公司,批号20160310);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡、细胞周期试剂盒(南京凯基生物科技有限公司,批号分别为20160607,20160316);细胞活性毒性检测(CCK-8)试剂盒(日本同仁化学研究所,批号KN868);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号520C036);Ⅲ型胶原蛋白(Col-III)免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号GR261168-5);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Proteintech Group公司,批号GR217575-25);Smad4, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(英国Abcam公司,批号分别为GR200349-9,GR32377-26)。

1.3 仪器 Scientific3111型CO₂细胞培养箱(美国Thermo Forma公司);1450型洁净净化工作台(苏州净化设备总厂);CKX-41型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);TDL-5A型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);SpectraMaxPlus384型连续光谱扫描式酶标仪(香港分子仪器公司);FACS Cliblur型BD流式细胞仪(美国BD公司);Sa型Odyssey双色红外荧光扫描成像系统(美国Licor公司);MP-300V型电泳仪、转模仪(Major Science公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将HSC-T6细胞培养于含有10%胎牛血清(FBS),1%青、链霉素混合液的DMEM完全培养基中,于37℃5%CO₂培养箱中孵育,待细胞密度为90%以上,用0.25%胰酶消化细胞,加入DMEM完全培养液终止消化,800 r·min⁻¹离心5 min,收集细胞沉淀,传代备用。

2.2 CCK-8法检测细胞的增殖作用 取对数生长期的HSC-T6细胞制成5000个/孔的细胞悬液接种于96孔板中,每孔100 μ L,待细胞贴壁24 h后,TA药物组各加入质量浓度为50,60,70,80,90,

100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 空白组用正常培养基培养, 0.1% DMSO 为溶剂组, 调零孔为不含细胞的培养液, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h 后, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL , 放入 CO_2 培养箱内避光培养 1 h 后, 在酶标仪 450 nm 处测量吸光度 A , 计算细胞抑制率和半数抑制率(IC_{50})。

2.3 药物处理及分组 委陵菜酸以 DMSO 溶解, PDGF-BB 以高压灭菌水及 0.1% BSA 配置, 分装放于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存, 药物处理时以含有 10% FBS 的细胞培养液稀释成所需浓度。根据 CCK-8 法实验结果选择合适的给药浓度, 细胞分为 5 个实验组, 分别为正常组, 刺激组, TA 高、中、低剂量组; 正常组给予 10% FBS 的 DMEM 培养液, 刺激组用含 10% FBS 的 DMEM 培养液和 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PDGF-BB, TA 高、中、低剂量组用含 10% FBS 的 DMEM 培养液和 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PDGF-BB, 并分别给予 40, 20, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TA, PDGF-BB 在给 TA 1 h 后加入, 药物处理时间为 24 h。

2.4 姬姆萨染色液检测细胞集落形成 取对数生长期的细胞以 1 000 个/孔的细胞接种于 6 孔板内, 细胞贴壁 24 h 后, 各组样品继续培养 7 d, 弃培养液, PBS 洗 2 次, 每孔加入姬姆萨浓缩液与姬姆萨稀释液的比例为 1:9 的混合液 1 mL, 染色 20 min, 吸出染色液, PBS 清洗 2 次, 观察拍照。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 收集对数生长期的细胞以每孔 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔板内, 24 h 细胞贴壁后, 各组样品培养 24 h 后收集细胞, 按照细胞凋亡检测试剂盒说明书加入 Binding Buffer 悬浮细胞 500 μL , 再加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI 5 μL , 混匀, 在室温避光对细胞进行染色, 之后在 1 h 内进行上机检测细胞凋亡。

2.6 流式细胞仪检测细胞周期 收集对数生长期的细胞以每孔 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔板内, 24 h 细胞贴壁后, 各组样品分别培养 24 h 后收集细胞, 加入 70% 预冷乙醇, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱进行固定过夜, 弃固定液, 加入 PBS 重悬, $800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 按照细胞周期测试盒加入 RNase A 100 μL 后水浴 30 min, 再加入 PI 400 μL 进行染色, 于冰上避光 30 min, 置于流式细胞仪检测细胞周期的分布情况。

2.7 免疫组化法检测细胞 Col-III 胶原蛋白的表达 取处于对数生长期的细胞以 3×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中制作爬片。细胞贴壁 24 h 后按上述分组及处理因素给药, 培养 24 h 后取出玻片晾干, 用 4% 多聚甲醛将玻片固定于载玻片上, 免疫细胞化学

法检测 HSC-T6 细胞 Col-III 胶原蛋白的表达。用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件每个视野的累积吸光度 IA 及阳性表达区域的面积 Area , 计算, 结果以积分吸光度 ($\text{mean density} = IA/\text{Area}$) 表示。

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞 Smad4, α -SMA 蛋白的表达 将细胞加入 RIPA 裂解液充分裂解细胞, 收集上清即为总蛋白浓度, 测定浓度后按 4:1 的比例加上样缓冲液, 煮沸变性 5 min, 后经 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭 1 h, 分别加入一抗稀释的比例为 GAPDH (1:8 000), Smad4 (1:1 000), α -SMA (1:1 000), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次。最后采用 odessey 双色红外成像系统扫描条带, 用 ImageJ 2 \times 软件对条带进行检测, 并计算相应灰度值。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间采用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

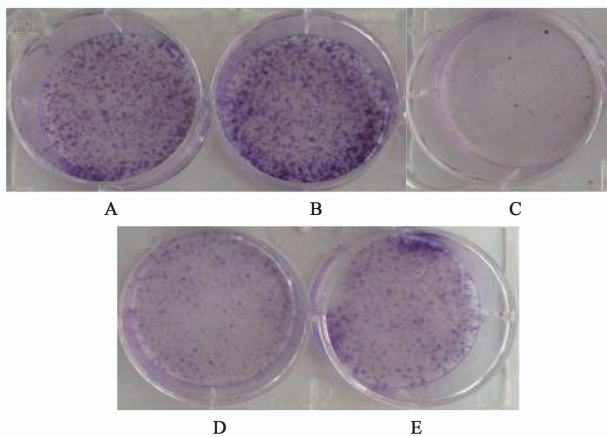
3.1 TA 对 HSC-T6 细胞增殖的影响 不同浓度的 TA 作用 HSC-T6 细胞 24 h 后, CCK8 检测细胞的增殖情况。结果显示, TA 对 HSC-T6 细胞的增殖具有抑制作用, 且随着药物浓度的增加抑制作用越明显, 呈浓度依赖性。HSC-T6 细胞经 TA 处理后的 IC_{50} 为 $81.71\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 因此选择 40, 20, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TA 作为实验的最佳浓度。见表 1。

表 1 TA 对 HSC-T6 细胞增殖的抑制作用 ($n=6$)

Table 1 Inhibitory effect of TA on HSC-T6 cells ($n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%
空白	-	0
TA	50	3.236
	60	4.807
	70	7.764
	80	38.755
	90	94.434
	100	95.660

3.2 TA 对 HSC-T6 细胞集落形成的影响 用姬姆萨染色液检测 TA 对 PDGF-BB 刺激下 HSC-T6 细胞的抑制作用, 结果显示, 与正常组比较, 刺激组中生成的细胞集落多, 细胞染色比较深。给予 TA 干预后, TA 高、中、低剂量组均能抑制细胞集落的生成, 并且随着 TA 药物浓度的增加, 抑制效果越明显, 高剂量抑制效果最明显。见图 1。



A. 正常组; B. 刺激组; C. TA 高剂量组; D. TA 中剂量组; E. TA 低剂量组 (图 2,3 同)

图 1 TA 对 HSC-T6 细胞集落形成的影响

Fig. 1 Effect of TA on clonogenicity in HSC-T6 cells

3.3 TA 对 HSC-T6 细胞凋亡的影响 在 PDGF-BB 的刺激下,用不同浓度的 TA 干预 24 h。与正常组比较,刺激组中的 PDGF-BB 能略降低细胞的凋亡

表 3 TA 对 HSC-T6 细胞周期细胞比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of TA on cell cycle in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	G_0/G_1	S	G_2/M	%
正常	-	57.292 ± 3.055	27.460 ± 2.403	15.250 ± 0.849	
刺激	-	57.51 ± 2.307	27.798 ± 2.119	14.695 ± 0.984	
TA	40	56.725 ± 5.283	22.600 ± 6.179	20.675 ± 1.896 ²⁾	
	20	59.643 ± 4.947	25.540 ± 3.335	14.817 ± 1.850	
	10	58.440 ± 4.874	26.632 ± 2.115	14.925 ± 2.851	

3.5 TA 对 HSC-T6 细胞 Col-III 胶原蛋白表达的影响 HSC-T6 细胞经不同浓度的 TA 处理后,与正常组比较,经 PDGF-BB 刺激后细胞表达 Col-III 蛋白无明显变化。TA 高剂量组能抑制 HSC-T6 中 Col-III 蛋白的表达 ($P < 0.05$);在 TA 高剂量组中可见阳性表达颗粒明显减少及染色程度变浅,而 TA 中、低剂量组中 Col-III 蛋白的表达减少,但无统计学意义。见表 4,图 2。

表 4 TA 对 HSC-T6 细胞 Col-III 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of TA on expression of Col-III in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Col-III
正常	-	0.197 ± 0.036
刺激	-	0.173 ± 0.032
TA	40	0.127 ± 0.012 ¹⁾
	20	0.162 ± 0.041
	10	0.169 ± 0.022

率,但 TA 高剂量组能明显促进 HSC-T6 细胞的凋亡 ($P < 0.05$),表明 TA 可促进 HSC-T6 细胞的凋亡。见表 2。

表 2 TA 对 HSC-T6 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effect of TA on apoptotic rate in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	总凋亡率/%
正常	-	7.940 ± 3.533
刺激	-	7.004 ± 1.945
TA	40	44.890 ± 10.073 ²⁾
	20	8.232 ± 3.183
	10	6.504 ± 1.613

注:与刺激组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3~5 同)。

3.4 TA 对 HSC-T6 细胞周期的影响 与正常组比较,各组间 G_1 期和 S 期细胞比例无明显变化,差异无统计学意义;PDGF-BB 中 HSC-T6 的 G_2 期细胞数无明显变化,经 TA 作用后,TA 高剂量组中 HSC-T6 在 G_2 期细胞比例较刺激组明显上升 ($P < 0.01$)。见表 3。

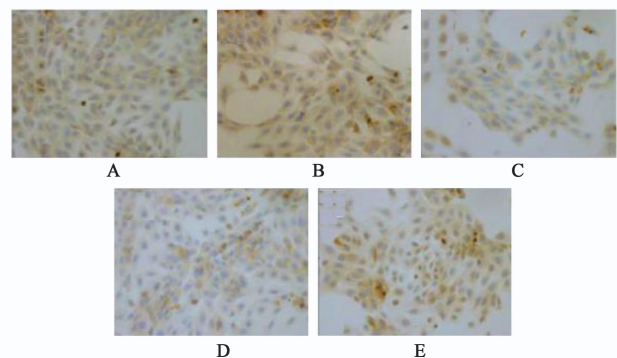


图 2 TA 对 HSC-T6 细胞 Col-III 蛋白表达的影响 (IHC, ×400)

Fig. 2 Effect of TA on expression of Col-III in HSC-T6 cells (IHC, ×400)

3.6 TA 对 HSC-T6 细胞 Smad4, α -SMA 蛋白表达的影响 TA 在 PDGF-BB 刺激的 HSC-T6 细胞作用 24 h 后,TA 高剂量组中 Smad4 蛋白的表达水平较刺激组明显降低 ($P < 0.05$),而 TA 中、低剂量组各蛋白的表达量减少,但无统计学意义;与刺激组比

较, TA 高、中、低剂量组均能降低 HSC-T6 细胞 α -SMA 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。见图 3, 表 5。

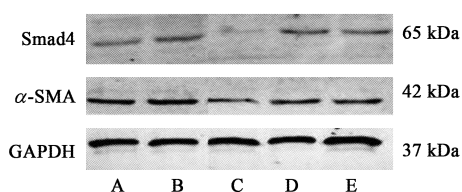


图 3 TA 对 HSC-T6 细胞 Smad4, α -SMA 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of TA on expression of Smad4 and α -SMA in HSC-T6 cells

表 5 TA 对 HSC-T6 细胞 Smad4, α -SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 5 Effect of TA on expression of Smad4 and α -SMA in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Smad4/GAPDH	α -SMA/GAPDH
正常	-	0.307 \pm 0.148 0	0.197 \pm 0.107
刺激	-	0.303 \pm 0.109 0	0.292 \pm 0.077
TA	40	0.060 \pm 0.041 2 ¹⁾	0.068 \pm 0.008 ¹⁾
	20	0.124 \pm 0.068 5	0.127 \pm 0.007 ¹⁾
	10	0.117 \pm 0.096 2	0.129 \pm 0.020 ¹⁾

4 讨论

肝纤维化的形成是一个极为复杂的生理病理过程,肝星状细胞的激活和增殖是肝纤维化发生发展的中心环节,因此有效地抑制肝星状细胞(HSC)活化增殖是抗纤维化的有效途径^[10-11]。HSC 在各种活化因素刺激下由静止储存维生素 A 的贮脂细胞分化成为表达细胞 α -SMA 的肌成纤维母细胞, α -SMA 是一种在激活 HSC 过程中表达的中间蛋白,被广泛认为是激活的标志,也被用来识别和量化活化的 HSCs。活化的 HSC 通过多种细胞因子的旁分泌及自分泌方式分泌 TGF- β , PDGF, HSC 被激活增殖活化,合成大量以 I, III 型为主的胶原纤维等 ECM,打破 ECM 的平衡状态,使 ECM 在肝内过度沉积,逐渐形成肝纤维化^[12]。巴图德力根等^[13]研究显示,通过抑制 Col-I, Col-III 的表达可以延缓肝纤维化发展。抑制 PDGF 是 HSC 最强的有丝分裂原,可促进 HSC 增殖和活化静息状态的 HSC 激活成为成纤维母细胞从而合成大量 ECM,以 PDGF-BB 作用最强,在肝纤维化形成和发展过程中起着重要的作用。黄洁玲等^[14]研究显示,抑制肝星状细胞 PDGF 的分泌可有效的治疗肝纤维化。通过本实验利用 PDGF-BB 作为刺激因素,在体外模拟肝纤维化 HSC 细胞

模型,观察 TA 对 HSC 活化的抑制作用。姬姆萨染色、流式细胞术结果发现,与正常组比较,PDGF-BB 组可促进 HSC-T6 细胞集落的形成和凋亡,但对细胞周期无明显的影响。经 TA 干预后,TA 对 PDGF-BB 刺激的 HSC-T6 增殖活化具有抑制作用,并且能明显地促进细胞凋亡,促使细胞周期进入 G₂ 期,干扰细胞周期的正常运行。免疫细胞化学和 Western blot 结果显示,与刺激组比较,TA 能显著地下调 Col-III, α -SMA 蛋白表达,结果提示,TA 对 HSC-T6 有明显的抑制作用,可能与促进细胞凋亡、阻滞细胞周期、抑制 HSC 的激活和胶原的表达从而减少 ECM 的沉积有关。

TGF- β 是肝内最强的诱导肝纤维化发生的细胞因子之一,在肝纤维化的形成过程中,激活 HSC,促进胶原的生成,增加 ECM 的合成和沉积,抑制活化的 HSC 凋亡。TGF- β 开启了 HSC 的活化,TGF- β 主要依赖其下游的 Smads 蛋白家族介导其胞内信号传导,TGF- β 先与 T β R II 受体结合形成复合物,从而激活 T β RI 形成异四聚体,使下游信号因子 Smad2, Smad3 被活化而激活,再与 Smad4 结合形成异源三聚体并转运进入细胞核内与相关转录因子相结合,从而调节靶基因的转录^[15]。Smad4 是 TGF- β 必要的信号中转分子^[16]。HSCs 被激活的过程中 TGF- β /Smads 信号通路被证实是介导肝纤维化发生和进展的最主要信号通路之一。Maurice 等^[17]研究显示,敲除 Smad4 基因可以阻止 HSC 的活化,从而延缓肝纤维化进展。HE 等^[18]研究显示,miR-146a 通过抑制 Smad4 的表达来阻断 TGF- β /Smads 信号从而抑制 HSC 的增殖。郭宝良等^[19]研究显示,阻断 Smad4 信号传导蛋白的表达可以抑制 TGF- β 诱导的 I 型胶原蛋白。为了了解 TA 抗肝纤维化的作用机制,本实验进一步探讨 TA 对 TGF- β /Smads 信号通路的影响。Western blot 检测结果发现,与刺激组比较,TA 能显著地降低 Smad4 的蛋白表达,提示 TA 可能通过抑制 Smad4 的蛋白表达,从而达到抑制 TGF- β /Smads 信号通路的作用。TA 对 PDGF-BB 诱导的 HSC 的抑制作用可能与介导 TGF- β /Smads 信号通路的调控有关。

综上所述,委陵菜酸对大鼠肝星状细胞有明显的抑制作用,其机制可能与促进细胞凋亡、阻滞细胞周期,以及与阻断 TGF- β /Smads 通路有关。阐明了委陵菜酸抗纤维化的作用机制,为开发委陵菜酸用于抗纤维化提供理论依据。

[参考文献]

- [1] Friedman S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (4) : 2247-2250.
- [2] Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches [J]. Chem Biol Interact, 2011, 193 (3) : 225-231.
- [3] 喻勤, 傅向阳, 罗伟生, 等. 荔枝核总黄酮对大鼠肝纤维化 TGF- β /Smad 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (18) : 223-227.
- [4] 尚立芝, 王付, 王琦, 等. 柴胡疏肝散对肝纤维化大鼠 TGF- β_1 /Smad 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (12) : 125-128.
- [5] Cho E J, Yokozawa T, Rhyu D Y, et al. The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their component compounds on lipid peroxidation [J]. Am J Chinese Med, 2003, 31 (6) : 907-917.
- [6] LIN X, ZHANG S, HUANG R, et al. Protective effect of tormentic acid from *Potentilla chinensis* against lipopolysaccharide/D-galactosamine induced fulminant hepatic failure in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 19 (2) : 365-372.
- [7] ZHANG Q, CHANG Z, WANG Q. Ursane triterpenoids inhibit atherosclerosis and xanthoma in LDL receptor knockout mice [J]. Cardiovasc Drug Ther, 2006, 20 (5) : 349-357.
- [8] GAO H, WU L, Kuroyanagi M, et al. Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* KOEHNE and their activities in JB6 mouse epidermal cells [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51 (11) : 1318-1321.
- [9] WU J B, KUO Y H, LIN C H, et al. Tormentic acid, a major component of suspension cells of *Eriobotrya japonica*, suppresses high-fat diet-induced diabetes and hyperlipidemia by glucose transporter 4 and AMP-activated protein kinase phosphorylation [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62 (44) : 10717-10726.
- [10] Issa R, Williams E, Trim N, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors [J]. Gut, 2001, 48 (4) : 548-557.
- [11] Wright M C, Issa R, Smart D E, et al. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats [J]. Gastroenterology, 2001, 121 (3) : 685-698.
- [12] Krizhanovsky V, Yon M, Dickins R A, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis [J]. Cell, 2008, 134 (4) : 657-667.
- [13] 巴图德力根, 徐艳华, 韩志强, 等. 德都红花-7 味散原药方与优化方对肝纤维化大鼠 I, III 型胶原 mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22 (7) : 134-138.
- [14] 黄洁玲, 钟鸣, 余胜民. 排钱草总生物碱对人肝星状细胞增殖及肝纤维化相关胶原蛋白、细胞因子的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (13) : 283-286.
- [15] LIU X, HU H, YIN J Q. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis [J]. Liver Int, 2006, 26 (1) : 8-22.
- [16] Derynck R, ZHANG Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling [J]. Nature, 2003, 425 (6958) : 577-584.
- [17] Maurice D, Pierreux C E, Howell M, et al. Loss of Smad4 function in pancreatic tumors: C-terminal truncation leads to decreased stability [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (46) : 43175-43181.
- [18] HE Y, HUANG C, SUN X, et al. MicroRNA-146a modulates TGF-beta1-induced hepatic stellate cell proliferation by targeting SMAD4 [J]. Cell Signal, 2012, 24 (10) : 1923-1930.
- [19] 郭宝良, 闫朝岐, 仲雷, 等. Smad4 siRNA 对转化生长因子 β 诱导 I 型胶原表达的作用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13 (11) : 2062-2065.

[责任编辑 邹晓翠]