

文章编号 1006-8147(2018)05-0381-04

论著

蒿鳖养阴软坚方对 TGF-β1 诱导的肝纤维化的作用

唐诗慧, 张丽, 方步武

(天津医科大学药理学系, 天津 300070)

摘要 目的: 研究蒿鳖养阴软坚方在体外对 LX-2 细胞的影响, 从而探讨蒿鳖养阴软坚方对 TGF-β1 诱导的肝纤维化的作用。方法: 体外培养人肝星状细胞 LX-2, 实验分为正常对照组、TGF-β1 刺激组和蒿鳖养阴软坚方低、中、高浓度给药组。MTT 法检测 LX-2 细胞增殖情况; 比色法检测细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)的活性; 酶消化法检测细胞上清羟脯氨酸(Hyp)的含量; Western blot 法检测 collagen I 以及 α-SMA 蛋白表达量。结果: TGF-β1 作用于 LX-2 能够明显促进细胞的增殖, collagen I、α-SMA 的表达量显著升高。蒿鳖养阴软坚方能抑制 LX-2 细胞增殖并且能够降低 collagen I 和 α-SMA 的表达。结论: 蒿鳖养阴软坚方能够显著抑制 LX-2 增殖, 下调 collagen I 和 α-SMA 的表达, 降低 Hyp 生成, 从而发挥抗肝纤维化的作用。

关键词 肝纤维化; 蒿鳖养阴软坚方; TGF-β1; collagen I; α-SMA

中图分类号 R96

文献标志码 A

Effect of HaoBieYangYinRuanJian on liver fibrosis induced by TGF-β1

TANG Shi-hui, Zhang Li, FANG Bu-wu

(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of HBYRJ on hepatic stellate cells (HSCs, LX-2) in vitro, and explore the effect of HBYRJ on liver fibrosis induced TGF-β1. **Methods:** LX-2 cells were cultured in vitro and divided into control group, TGF-β1 stimulation group and HBYRJ low dose group, middle dose group and high dose group. The proliferation of LX-2 cells was detected by MTT assay; the activity of LDH was detected by colorimetric assay; and the content of Hyp was detected by enzyme digestion. Western blot was used to detect the protein expression of collagen I and α-SMA. **Results:** TGF-β1 significantly promoted the proliferation of LX-2, TGF-β1 significantly increased the level of collagen I and α-SMA. HBYRJ significantly reduced the proliferation of LX-2, and significantly reduced the level of collagen I and α-SMA. **Conclusion:** HBYRJ can significantly reduce the proliferation of LX-2, down-regulate the expression of collagen I and α-SMA, and decrease the synthesis of Hyp to attenuate hepatic fibrosis.

Key words hepatic fibrosis; HaoBieYangYinRuanJian; TGF-β1; collagen I; α-SMA

肝纤维化是细胞外基质过度沉积的动态进行性过程, 是由多种慢性肝病共同作用的结果, 其发病率在全世界范围内呈现不断上升的趋势^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化并增殖, 导致细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与降解失衡并最终导致肝纤维化^[2]。转化生长因子(transforming growth factor-β, TGF-β1)是介导肝纤维化最重要的细胞因子, 与细胞外基质的代谢和肝纤维化的发生发展有着密切的关系^[3]。TGF-β1对HSCs的激活、增殖、转化具有极其重要的意义, 是最强的促纤维化细胞因子^[4]。本实验采用的蒿鳖养阴软坚方是由青蒿、鳖甲、知母、白花蛇舌草、虎杖、大黄等九味中药组成, 此中药复方配伍有良好的益气活血、清热利湿、软坚散结功效, 对治疗慢性肝病、肝纤维化有良好的疗效^[5]。本课题组前期工作已证明蒿鳖养阴软坚方先水后醇(60%)提取方案对 LX-2

细胞具有良好的抑制作用, 本实验进一步优化复方提取工艺。以 TGF-β1 刺激 LX-2 细胞, 给予蒿鳖养阴软坚方治疗, 初步探讨进一步优化提取工艺后的蒿鳖养阴软坚方对 LX-2 细胞的影响, 旨在揭示蒿鳖养阴软坚方抗纤维化的药物作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 LX-2 细胞株由北京地坛医院提供。

1.1.2 主要试剂 Recombinant Human TGF-β1-Mammalian 购于美国 PeproTech 公司, 产品编号 100-21-10。Anti-α-Smooth Muscle Actin antibody 购于美国 Cell Signaling Technology 公司, 产品编号 19245T。Rabbit Anti-Collagen I antibody 购于北京博奥森生物技术有限公司, 产品编号: bs-0578R。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购于江苏碧云天生物技术有限公司, 产品编号: P10010。Anti-β-actin、山羊抗兔抗体、LDH 试剂盒以及 ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。DMEM 以及胎牛

作者简介 唐诗慧(1993-), 女, 硕士在读, 研究方向: 中药药理学; 通信作者: 方步武, E-mail: fangdch@aliyun.com.cn。

血清均购于美国 Gibco 公司。

1.1.3 主要仪器 680 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司), CO₂ 恒温培养箱 (美国 NAPCO series5400), DL-CJ-2NDI 洁净工作台 (北京东联哈尔仪器制造公司), WD-9405A 型脱色摇床 (北京六一仪器厂), 湘仪 L420 低速自动平衡离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司), 垂直电泳槽 (美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组处理 从液氮中取出细胞并复苏, 将细胞置于含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中进行细胞培养。细胞密度长至培养瓶底 90% 时, 弃去培养液, PBS 冲洗 3 次, 加入 1 mL 0.25% 胰酶, 消化 1 min, 离心后按照 1:3 的比例进行传代, 取对数期细胞进行后续实验。本实验分成 5 组, 分别为 (1) control 组: 细胞对照组; (2) TGF-β1 刺激组 (2 ng/mL), 作用 24 h; (3) 不同浓度蒿鳖养阴软坚方处理组 (0.5、1、2 mg/mL), 作用 24 h。

1.2.2 复方提取 将鳖甲、青蒿、地黄等九味中药按照特定比例称取, 复方总重 141.6 g。先将鳖甲用 840 mL 三蒸水在微沸状态下回流提取 2 h, 加入其它剩余药材浸泡 2 h, 然后在微沸状态下再回流提取 1 h, 收集水提取液。840 mL 的 95% 乙醇继续回流提取 2 次, 每次 0.5 h, 收集醇提取液, 并与水提取液混合后旋蒸浓缩, 浓缩液冷冻干燥至恒重, 备用。

1.2.3 MTT 比色法检测 LX-2 细胞增殖情况 取处于对数期的 LX-2 细胞接种于 96 孔板中, 根据细胞实验设计分别对每组细胞进行处理, 每组设 5 个副孔。24 h 后, 每孔加入 20 μL MTT, 混匀后放回培养箱中继续孵育 4 h, 弃去培养液, 每孔加入 20 μL DMSO, 振荡 10 min, 在 490 nm 处测定各孔吸光度值 (A 值), 计算细胞抑制率 (inhibition rate, IR)。抑制率计算公式: 抑制率 (%) = [(对照组吸光度值 - 实验组吸光度值) / 对照组吸光度值] × 100%。

1.2.4 细胞培养液中 Hyp 含量测定 根据实验设计处理后, 收集 96 孔板中细胞培养液。空白管中加入 0.5 mL 双蒸水, 标准管中加入 0.5 mL 标准液, 每个测定管中加入 0.5 mL 的待测样本, 所有管中加入 0.05 mL 的消化液, 混匀, 37 °C 水浴 3 h。所有管加入试剂盒中试剂一 0.5 mL 室温静置 10 min, 试剂二 0.5 mL 室温静置 5 min, 试剂三 1 mL 60 °C 水浴 15 min, 流水冷却后 3 500 r/min, 离心 10 min, 取上清在 550 nm 处测定各管吸光度。羟脯氨酸含量 (μg/mL) = (测定 OD 值 - 空白 OD 值 / 标准 OD 值 - 空白 OD 值) × 标准品浓度 (5 μg/mL) × 样品测试前稀释倍数。

1.2.5 细胞培养液中 LDH 活性测定 根据实验设计处理后, 收集细胞培养液备用。按照碧云天生物研究所乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒说明书进行操作。LDH 活性 = (样品孔吸光度 - 背景空白对照孔吸光度) / (标准管吸光度 - 标准空白管吸光度) × 标准品浓度 (mU/mL)。

1.2.6 Western blot 法检测 collagen I、α-SMA 蛋白的表达 取对数期细胞以 5 × 10⁴ 个/mL 单个细胞悬液接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL。根据实验设计处理后, 弃去培养液, PBS 冲洗 3 遍, 每孔加入 80 μL RIPA 蛋白裂解液, 冰浴条件下使其充分裂解提取细胞总蛋白并用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性后取 20 μg 蛋白上样, 8% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 将蛋白转移至 PVDF 上, 室温条件下 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h。4 °C 下摇床孵育一抗 (collagen I 1:500、α-SMA 1:1 000) 过夜。次日, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 室温下孵育二抗 2 h。ECL 化学发光试剂盒显色, 采用 Image J 软件对蛋白条带的光密度值进行分析。

1.3 统计学方法 本实验所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 检验, 所用统计软件为 SPSS17.0。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 蒿鳖养阴软坚方对 LX-2 细胞增殖的影响 与对照组相比, 2 ng/mL 的 TGF-β1 作用于细胞 24 h, 细胞明显增殖 (P < 0.05)。与 TGF-β1 刺激组相比, 不同浓度的蒿鳖养阴软坚方 (药物终浓度为 0.5、1、2 mg/mL) 作用 24 h 后, 对 LX-2 细胞增殖有明显的抑制作用 (P < 0.05), 且随着浓度增大, 抑制作用越明显, 表现出一定剂量的剂量依赖性 (表 1)。

表 1 蒿鳖养阴软坚方对 LX-2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab 1 Effects of HBYJRJF on the proliferation of LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 (mg/mL) | 抑制率 / % |
|------------|------------------------------|
| 对照组 | - |
| TGF-β1 刺激组 | -15.59 ± 0.97* |
| HBYJRJ 0.5 | 21.11 ± 0.86 [#] |
| HBYJRJ1 | 33.15 ± 1.54 [#] |
| HBYJRJ 2 | 49.611 ± 1.86 ^{#△◇} |

与对照组比较, *P < 0.01; 与 TGF-β1 处理组比较, [#]P < 0.05; 与 HBYJRJ (0.5 mg/mL) 组比较, [△]P < 0.05; 与 HBYJRJ (1 mg/mL) 组比较, [◇]P < 0.05

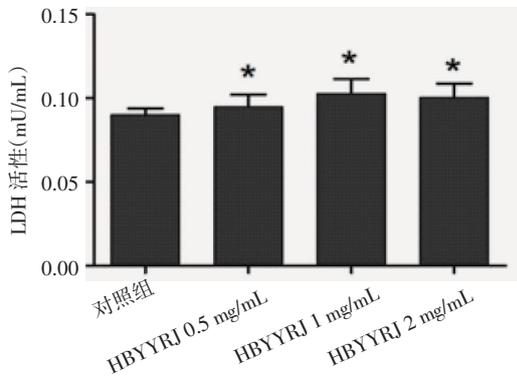
2.2 蒿鳖养阴软坚方对细胞培养液 LDH 活性的影响 不同浓度的蒿鳖养阴软坚方作用于 LX-2 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 上清中 LDH 活性无明显改变, 差异无统计学意义 (P > 0.05, 表 2、图 1)。

表 2 葛鳖养阴软坚方对细胞上清中 LDH 活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of HBYRJ on the activity of LDH($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别/(mg/mL) | LDH 活性/mU/mL |
|------------|--------------|
| 对照组 | 0.09±0.009 |
| HBYRJ 0.5 | 0.095±0.015* |
| HBYRJ 1 | 0.103±0.019* |
| HBYRJ 2 | 0.101±0.018* |

与对照组比较, *P>0.05



与对照组比较, *P>0.05

图 1 葛鳖养阴软坚方对细胞上清中 LDH 活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig 1 Effects of HBYRJ on the activity of LDH($\bar{x}\pm s, n=3$)

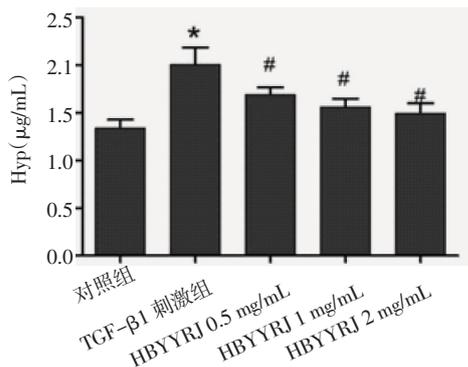
2.3 葛鳖养阴软坚方对细胞培养液 Hyp 含量的影响 不同浓度葛鳖养阴软坚方作用于 LX-2 细胞 24 h 后, 与模型组相比, 各剂量组细胞上清液中羟脯氨酸含量明显降低, 且剂量越大, 羟脯氨酸含量越低, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 表 3、图 2)。

表 3 葛鳖养阴软坚方对 Hyp 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 3 Effects of HBYRJ on the content of Hyp($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别/(mg/mL) | Hyp ($\mu\text{g/mL}$) |
|------------|--------------------------|
| 对照组 | 1.34±0.15 |
| TGF-β1 刺激组 | 2.10±0.31* |
| HBYRJ 0.5 | 1.69±0.13# |
| HBYRJ 1 | 1.56±0.14# |
| HBYRJ 2 | 1.50±0.18# |

与对照组比较, *P<0.01; 与 TGF-β1 刺激组比较, #P<0.05

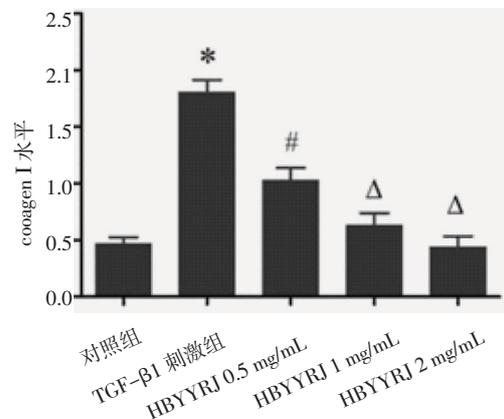
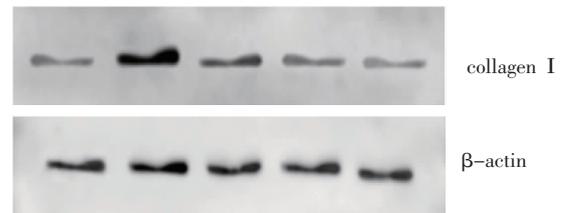


与对照组比较, *P<0.01; 与 TGF-β1 刺激组比较, #P<0.05

图 2 葛鳖养阴软坚方对 Hyp 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig 2 Effects of HBYRJ on the content of Hyp($\bar{x}\pm s, n=3$)

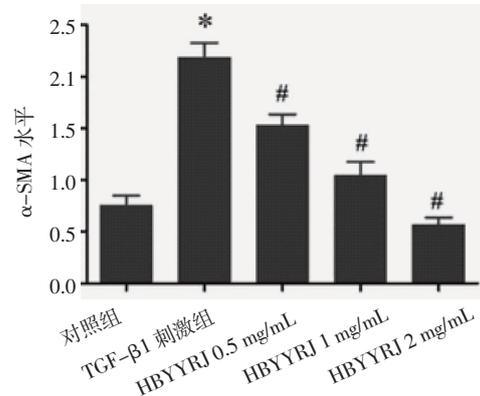
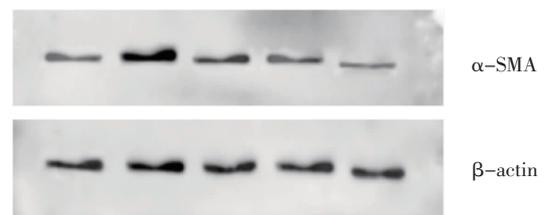
2.4 葛鳖养阴软坚方对 collagen I 和 α-SMA 蛋白水平的影响 见图 3、4。



与对照组相比, *P<0.01; 与 TGF-β1 刺激组相比, #P<0.05, ΔP<0.01

图 3 葛鳖养阴软坚方对 LX-2 细胞 collagen I 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig 3 Effects of HBYRJ on the expression level of collagen I ($\bar{x}\pm s, n=3$)



与对照组相比, *P<0.01; 与 TGF-β1 刺激组相比, #P<0.05

图 4 葛鳖养阴软坚方对 LX-2 细胞 α-SMA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig 4 Effects of HBYRJ on the expression level of α-SMA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3 讨论

肝纤维化大多发生在各种慢性肝损伤后, 是肝脏对于各种慢性刺激损伤进行自我修复的病理过程。肝纤维化的过程是可逆的, 如果不控制肝纤维化任其发展, 将会形成肝纤维结节及肝脏结构和

功能异常,最终导致肝硬化甚至肝癌^[6]。肝纤维化发生最为关键的一步是 HSC 的活化和增殖^[7]。TGF- β 1 是目前已知最强的促肝纤维化细胞因子^[8]。HSCs 在 TGF- β 1 的作用下活化增殖,并且促进细胞外基质 I 型胶原和 IV 型胶原的产生进而使得肝纤维化进一步发生发展^[9]。本实验应用蒿鳖养阴软坚方能显著抑制 LX-2 细胞的增殖,表明蒿鳖养阴软坚方可通过抑制 LX-2 细胞增殖发挥抗纤维化的作用。羟脯氨酸是胶原蛋白中特有的有效成分,肝纤维化时,活化的 HSCs 合成大量以胶原纤维为主的细胞外基质,测定培养液上清中羟脯氨酸含量可换算成 HSCs 产生胶原蛋白的含量,以反映肝纤维化的程度^[10]。蒿鳖养阴软坚方能显著降低羟脯氨酸含量。 α -SMA 是 HSCs 活化的标志,在肝纤维化研究中被广泛应用, α -SMA 的表达随着肝纤维化的加重而增加^[11]。本实验通过测定 LX-2 细胞中 α -SMA 的表达来反映肝纤维化的程度。实验结果显示,蒿鳖养阴软坚方降低 α -SMA 蛋白水平,表明蒿鳖养阴软坚方能抑制 LX-2 细胞活化,从而发挥抗肝纤维化的作用。

中药在治疗肝纤维化方面有其独特的优势,中药复方多成分、多靶点的特点正好应对肝纤维化复杂的发病机制。蒿鳖养阴软坚方主要是由鳖甲、青蒿、地黄等九味中药构成,具有多种药理作用。本实验探究蒿鳖养阴软坚方对 LX-2 细胞增殖,细胞产生羟脯氨酸含量以及相关蛋白表达的影响,发现蒿鳖养阴软坚方具有良好的抗肝纤维化作用。

本研究结果显示,蒿鳖养阴软坚方通过抑制 HSCs 的激活增殖和细胞外基质的沉积减轻 TGF- β 1 诱导的肝纤维化,为临床治疗肝纤维化提供了新的理论依据。

参考文献:

- [1] Popov Y, Schuppan D. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies[J]. *Hepatology*, 2009, 50(4):1294
- [2] Yin C, Evason K J, Asahina K, et al. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5):1902
- [3] Dooley S, Delvoux B, Streckert M, et al. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells[J]. *FEBS Lett*, 2001, 502(1-2):4
- [4] Liu X, Hu H, Yin J Q. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis[J]. *Liver Int*, 2006, 26(1):8
- [5] 率红莉, 方步武, 邢伟, 等. 蒿鳖养阴软坚方对四氯化碳复合因素所致肝纤维化的预防作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013(16):197
- [6] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6):1655
- [7] Anthony B, Allen J T, Li Y S, et al. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis[J]. *Parasit Vectors*, 2010, 3(1):60
- [8] Chen Y W, Li D G, Wu J X, et al. Tetrandrine inhibits activation of rat hepatic stellate cells stimulated by transforming growth factor-beta in vitro via up-regulation of Smad 7[J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 100(3):299
- [9] Oh C J, Kim J Y, Min A K, et al. Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 52(3):671
- [10] Sancho-Bru P, Juez E, Moreno M, et al. Hepatocarcinoma cells stimulate the growth, migration and expression of pro-angiogenic genes in human hepatic stellate cells[J]. *Liver Int*, 2010, 30(1):31
- [11] Cheng Y, Zheng H, Wang B, et al. Sorafenib and fluvastatin synergistically alleviate hepatic fibrosis via inhibiting the TGFbeta1/Smad3 pathway[J]. *Dig Liver Dis*, 2018, 50(4):381

(2018-02-07 收稿)

(上接第 380 页)

- [9] Massey A J. Inhibition of ATR-dependent feedback activation of Chk1 sensitises cancer cells to Chk1 inhibitor monotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(1):41
- [10] Huntoon C J, Flatten K S, Wahner Hendrickson A E, et al. ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(12):3683
- [11] Li W, Saud S M, Young M R, et al. Cryptotanshinone, a Stat3 inhibitor, suppresses colorectal cancer proliferation and growth in vitro[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 406(1/2):63
- [12] Jackson S P, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease[J]. *Nature*, 2009, 461(7267):1071
- [13] Reaper P M, Griffiths M R, Long J M, et al. Selective killing of

- ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(7):428
- [14] Massey A J. Inhibition of ATR-dependent feedback activation of Chk1 sensitises cancer cells to Chk1 inhibitor monotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2016, 383(1):41
- [15] Shigechi T, Tomida J, Sato K, et al. ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(5):1149
- [16] Singh T R, Ali A M, Paramasivam M, et al. ATR-dependent phosphorylation of FANCM at serine 1045 is essential for FANCM functions[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(14):4300

(2018-03-13 收稿)