

文章编号 1006-8147(2020)04-0309-04

论 著

## 虎杖苷抑制肝星状细胞增殖活化的作用和机制研究

张丽, 方步武

(天津医科大学基础医学院药理学系, 天津 300070)

**摘要** 目的:研究虎杖苷(Polydatin)在体外对HSC-T6细胞的影响,探讨虎杖苷抑制肝纤维化发生的作用及相关机制。方法:体外培养大鼠肝星状细胞HSC-T6,分为对照组和虎杖苷低、中、高浓度(125、250、500  $\mu\text{mol/L}$ )给药组。MTT法检测细胞增殖情况;比色法检测细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的活性;酶消化法检测细胞培养上清液中羟脯氨酸(Hyp)的含量;蛋白印迹法检测 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、I型胶原(Collagen I)、核因子NF-E2相关因子2(Nrf2)和血红素加氧酶-1(HO-1)蛋白表达水平。多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐则采用LSD检验,若方差不齐采用Dunnnett T3检验,以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。结果:与对照组比较,虎杖苷125、250、500  $\mu\text{mol/L}$ 给药组细胞活力显著降低( $F=252.01, P<0.001$ ),Hyp含量明显减少( $F=16.50, P<0.05$ ), $\alpha$ -SMA和Collagen I蛋白表达显著减少( $F=19.89, 182.91$ , 均 $P<0.05$ ),且随着浓度的增加,抑制作用越强,呈一定的剂量依赖性;与对照组比较,虎杖苷125、250、500  $\mu\text{mol/L}$ 给药组Nrf2蛋白表达显著增加( $F=23.70, P<0.05$ ),虎杖苷250、500  $\mu\text{mol/L}$ 给药组HO-1蛋白表达显著增加( $F=12.40, P<0.01$ ),且随着浓度增加,上调作用越明显,呈一定的剂量依赖性。结论:虎杖苷通过抑制肝星状细胞增殖活化及胶原合成发挥抑制肝纤维化发生的作用,该作用可能与其上调Nrf2/HO-1通路有关。

**关键词** 虎杖苷;肝纤维化;肝星状细胞;Nrf2;HO-1

**中图分类号** R96

**文献标志码** A

### Inhibitory effects and mechanism of Polydatin on the proliferation and activation of hepatic stellate cell

ZHANG Li, FANG Bu-wu

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To examine the effect of Polydatin on HSC-T6 cells *in vitro*, and to investigate the inhibitory effects and related mechanism of Polydatin on liver fibrogenesis. **Methods:** Rat hepatic stellate cells HSC-T6 were cultured *in vitro* and were divided into control group and low, middle and high concentration(125, 250, 500  $\mu\text{mol/L}$ )Polydatin groups. Cell proliferation was measured by MTT assay. LDH activity in cell supernatant was detected by colorimetry assay. Hyp content in cell supernatant was examined by enzyme digestion assay. Protein expression levels of  $\alpha$ -SMA(Alpha-smooth muscle actin), Collagen I, Nrf2(NF-E2-related factor 2) and HO-1(heme oxygenase-1) were detected by Western blot. One-Way ANOVA was used for comparison among multiple groups. If the variances were homogeneous, LSD test was used; if the variances were heterogeneous, Dunnnett T3 test was used. A value of  $P<0.05$  was considered different significantly. **Results:** Compared with the control group, for the Polydatin 125, 250, 500  $\mu\text{mol/L}$  groups, the cell viability was significantly reduced ( $F=252.01, P<0.001$ ), the Hyp content was significantly reduced ( $F=16.50, P<0.05$ ), the protein expression of  $\alpha$ -SMA and Collagen I were decreased significantly ( $F=19.89, 182.91$ , all  $P<0.05$ ). And with the increase of the concentration, the inhibitory effect was stronger and in a certain dose-dependent manner. Compared with control group, the protein expression of Nrf2 was increased significantly in Polydatin 125, 250, 500  $\mu\text{mol/L}$  groups ( $F=23.70, P<0.05$ ) and the protein expression of HO-1 was increased significantly in Polydatin 250, 500  $\mu\text{mol/L}$  groups ( $F=12.40, P<0.01$ ), and with the increase of the concentration, the upregulative effect was stronger and in a certain dose-dependent manner. **Conclusion:** Polydatin can inhibit hepatic fibrogenesis by inhibiting the collagen synthesis and proliferation and activation of hepatic stellate cells, which may be associated with the upregulation of Nrf2/HO-1 pathway.

**Key words** Polydatin; hepatic fibrosis; hepatic stellate cell; Nrf2; HO-1

肝纤维化是慢性肝损伤引起的一种病理性伤口愈合反应,主要表现为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度沉积<sup>[1]</sup>。在肝纤维化发展过程中肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是ECM的主要来源细胞<sup>[2]</sup>。核因子NF-E2相关因子2(NF-

E2-related factor 2, Nrf2)是重要的转录因子,Nrf2可促进抗氧化基因如血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的转录,进而保护组织和细胞抵抗氧化应激<sup>[3-4]</sup>。本研究采用的虎杖苷由于具有抗氧化及保肝作用,可用于一些肝脏疾病的治疗<sup>[5-6]</sup>。但关于虎杖苷对肝星状细胞活化的影响及作用机制尚未深入研究。本研究通过体外培养HSC-T6细胞,用

作者简介 张丽(1995-),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。

不同浓度虎杖苷处理,探讨虎杖苷对肝星状细胞活化的作用及相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞 本实验所用细胞是大鼠肝星状细胞 HSC-T6,由北京地坛医院提供。

1.1.2 主要试剂 虎杖苷(Polydatin)购于大连美仑生物公司,Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT)购于北京鼎国昌盛生物技术公司,羟脯氨酸测定试剂盒和 LDH 活力测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所, $\beta$ -actin 抗体、 $\alpha$ -tubulin 抗体和 BCA 蛋白定量试剂盒购于碧云天生物技术研究, Collagen I 抗体购于北京博奥森生物技术公司, $\alpha$ -SMA 抗体购于 Cell Signaling Technology(CST),HO-1 抗体购于 Abconal,Nrf2 抗体购于 Pepro Tech 公司。

1.1.3 主要仪器 680 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司),CO<sub>2</sub> 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 细胞培养在含有 10% FBS(Gibco,USA),50 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM(Gibco,USA)中,置于 37℃,5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中。实验分 4 组:(1)对照组。(2)不同浓度虎杖苷(Polydatin)给药组:125、250、500  $\mu$ mol/L。给药时间为 48 h。

1.2.2 细胞活力测定 使用 MTT 法测定虎杖苷对肝星状细胞增殖的影响。将 HSC-T6 细胞根据实验分组以  $5 \times 10^4$  个/mL 的密度接种于 96 孔板中。培养 24 h 后用不含血清的 DMEM 饥饿 12 h,然后用不同浓度的虎杖苷处理细胞。处理 48 h 后每孔加入 20  $\mu$ L 0.5%MTT,继续孵育 4 h,吸出废液,每孔加入 200  $\mu$ L DMSO 溶解产生的蓝紫色结晶甲臜(formazan),震荡 10 min,490 nm 处测定每孔的吸光度值。细胞活力计算公式:细胞活力(%)=(实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.2.3 LDH 活力测定 根据实验分组处理细胞后收集细胞培养上清液。比色法测定细胞培养液中 LDH 的活性,取 20  $\mu$ L 细胞上清液,按照 LDH 活力测定试剂盒说明书进行操作,波长 450 nm 酶标仪测定吸光度值。LDH 活性(U/L)=[(测定 OD 值-对照 OD 值)/(标准 OD 值-空白 OD 值)] $\times 1\,000 \times$ 标准品浓度(0.2  $\mu$ mol/mL)。

1.2.4 羟脯氨酸(Hyp)含量测定 根据实验分组处理细胞后收集细胞培养上清液。酶消化法测定细胞培养液中 Hyp 的含量,取 500  $\mu$ L 细胞上清液,根据 Hyp 测定试剂盒说明书进行操作,波长 550 nm 处,1 cm 光径,双蒸水调零,测定各管吸光度。羟脯氨酸含量( $\mu$ g/mL)=[(测定 OD 值-空白 OD 值)/(标准 OD 值-空白 OD 值)] $\times$ 标准品浓度(5  $\mu$ g/mL)。

1.2.5 蛋白免疫印迹法检测 I 型胶原(collagen I)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达 按照实验分组,将 HSC-T6 细胞以  $5 \times 10^4$  个/mL 密度接种于 6 孔板中,培养 24 h 后用不含血清的 DMEM 饥饿 12 h,然后用不同浓度虎杖苷处理细胞 48 h。药物处理后,弃去培养液,每孔加入适量含有 1%PMSF 的 RIPA 裂解液来提取蛋白并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性后,取等量蛋白 SDS-PAGE 电泳分离后转移到 PVDF 膜上,使用 5%脱脂牛奶阻断非特异性蛋白结合,4℃下孵育一抗(collagen I 1:500, $\alpha$ -SMA 1:1 000、Nrf2 1:1 000、HO-1 1:1 000)过夜。次日,TBST 洗膜 3 次,每次 7 min,HRP 结合二抗(1:1 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次后,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 采用 SPSS 17.0 统计分析软件,所有符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐则采用 LSD 检验,若方差不齐采用 Dunnett T3 检验。以  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

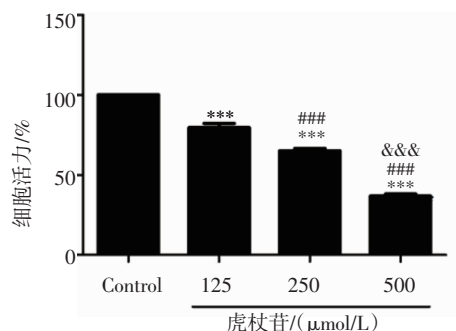
## 2 结果

2.1 虎杖苷对细胞增殖的影响 如图 1 所示,与对照组比较,不同浓度的虎杖苷(125、250、500  $\mu$ mol/L)作用于 HSC-T6 细胞 48 h 后,对 HSC-T6 细胞增殖有明显的抑制作用( $F=252.01, P < 0.001$ );与虎杖苷 125  $\mu$ mol/L 组比较,虎杖苷 250、500  $\mu$ mol/L 组中细胞活力显著降低( $F=252.01, P < 0.001$ );与虎杖苷 250  $\mu$ mol/L 组比较,虎杖苷 500  $\mu$ mol/L 组中细胞活力显著降低( $F=252.01, P < 0.001$ )。

2.2 虎杖苷对 LDH 活力的影响 与对照组(80.34 $\pm$ 13.61)U/L 比较,虎杖苷 125、250、500  $\mu$ mol/L 组中 LDH 活性无明显变化[(84.83 $\pm$ 8.71)、(82.91 $\pm$ 12.26)、(79.91 $\pm$ 10.28) U/L],如图 2 所示,差异无统计学意义( $F=0.246, P > 0.05$ )。

2.3 虎杖苷对 Hyp 含量的影响 如图 3 所示,与对照组[(2.91 $\pm$ 0.18)  $\mu$ g/mL]比较,虎杖苷 125、250、500  $\mu$ mol/L 组中 Hyp 含量显著降低[(2.61 $\pm$ 0.13)、(2.29 $\pm$ 0.13)、

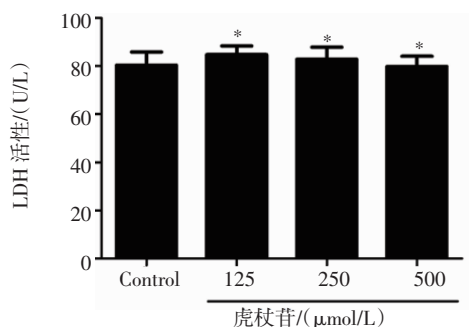
( $2.05 \pm 0.19$ )  $\mu\text{g/mL}$ ;  $F=16.50$ ,  $P<0.05$ ]; 与虎杖苷 125  $\mu\text{mol/L}$  组比较, 虎杖苷 250、500  $\mu\text{mol/L}$  组 Hyp 含量显著减少 ( $F=16.50$ ,  $P<0.05$ ), 且随着浓度的增高, 抑制作用越明显, 呈一定的剂量依赖性。



注: 与对照组相比, \*\*\* $P<0.001$ ; 与虎杖苷 125  $\mu\text{mol/L}$  组相比, ### $P<0.001$ ; 与虎杖苷 250  $\mu\text{mol/L}$  组相比, &&& $P<0.001$

图1 虎杖苷对细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=6$ )

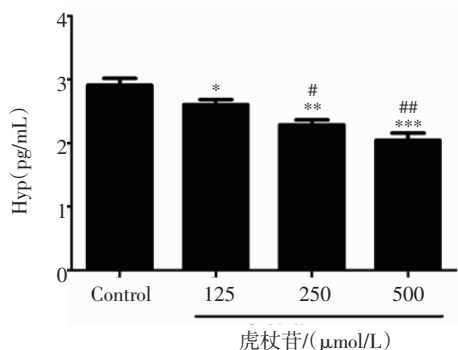
Fig 1 Effects of Polydatin on the proliferation of cell( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=6$ )



注: 与对照组相比, \* $P>0.05$

图2 虎杖苷对 LDH 活力的影响( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=6$ )

Fig 2 Effects of Polydatin on the activity of LDH( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=6$ )



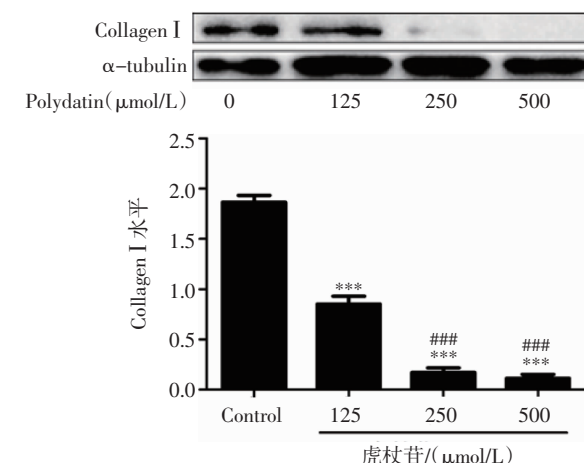
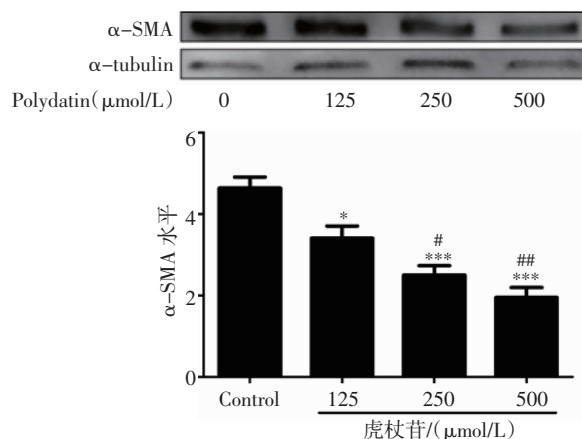
注: 与对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ ; 与虎杖苷 125  $\mu\text{mol/L}$  组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

图3 虎杖苷对 Hyp 含量的影响( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=9$ )

Fig 3 Effects of Polydatin on the content of Hyp( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=9$ )

2.4 虎杖苷对  $\alpha$ -SMA 和 Collagen I 蛋白表达的影响 如图4所示, 与对照组比较, 虎杖苷 125、250、500  $\mu\text{mol/L}$  组中  $\alpha$ -SMA 和 Collagen I 蛋白表达水平显著降低 ( $F=19.89$ ,  $P<0.05$ ;  $F=182.91$ ,  $P<0.001$ ); 与虎杖苷 125  $\mu\text{mol/L}$  组比较, 虎杖苷 250、500  $\mu\text{mol/L}$  组中  $\alpha$ -SMA 和 Collagen I 蛋白表达水平显著降低 ( $F=19.89$ ,

$P<0.05$ ;  $F=182.91$ ,  $P<0.001$ ), 随着剂量增大, 抑制作用越明显, 表现出一定的剂量依赖性。



注: 与对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ ; 与虎杖苷 125  $\mu\text{mol/L}$  组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$ ;  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; Collagen I: I 型胶原

图4 虎杖苷对  $\alpha$ -SMA 和 Collagen I 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ )

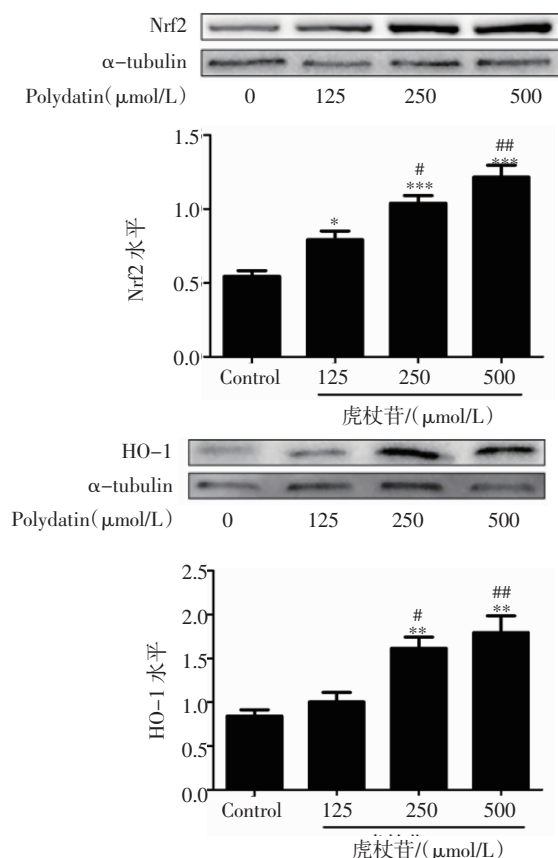
Fig 4 Effects of Polydatin on the protein expression of  $\alpha$ -SMA and Collagen I ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ )

2.5 虎杖苷对 Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响 如图5所示, 与对照组比较, 虎杖苷 125、250、500  $\mu\text{mol/L}$  组中 Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ( $F=23.70$ ,  $P<0.05$ ), 虎杖苷 250、500  $\mu\text{mol/L}$  组中 HO-1 蛋白表达水平显著增加 ( $F=12.40$ ,  $P<0.01$ ); 与虎杖苷 125  $\mu\text{mol/L}$  组比较, 虎杖苷 250、500  $\mu\text{mol/L}$  组中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平显著升高 ( $F=23.70$ ,  $P<0.05$ ;  $F=12.40$ ,  $P<0.05$ ), 随着剂量增大, 上调作用越明显, 表现出一定的剂量依赖性。

### 3 讨论

肝纤维化是慢性肝损伤引起的一种病理性伤口愈合反应, 随着病程的发展将导致肝硬化, 最终导致肝衰竭或肝癌<sup>[7]</sup>。在肝纤维化阶段逆转其进展是治疗慢性肝病, 避免肝功能衰竭的有效策略。





注:与对照组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ ;与虎杖苷 125  $\mu\text{mol/L}$  组相比,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ;Nrf2:核因子 NF-E2 相关因子 2;HO-1:血红素加氧酶-1

图5 虎杖苷对 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm\text{SD},n=3$ )

Fig 5 Effects of Polydatin on the protein expression of Nrf2 and HO-1( $\bar{x}\pm\text{SD},n=3$ )

HSCs 的活化是导致肝纤维化的重要因素<sup>[8]</sup>。活化的 HSCs 表达  $\alpha$ -SMA, 合成成纤维细胞因子并促进胶原(如 I 型胶原、III 型胶原和 IV 型胶原)的产生从而加速肝纤维化的进程。当在体外培养时,HSCs 会发生自发激活<sup>[9]</sup>。本研究发现虎杖苷处理 HSC-T6 细胞能抑制细胞增殖,降低细胞培养液中 Hyp 的含量并下调  $\alpha$ -SMA 及 Collagen I 蛋白的表达。其中 Hyp 是一种几乎只存在于胶原蛋白中的氨基酸,被作为衡量肝纤维化的指标<sup>[10]</sup>。由此可得,虎杖苷可以抑制 HSC-T6 细胞的活化及胶原的产生,在体外具有抑制肝纤维化的作用。

Nrf2/HO-1 可以减轻肝脏炎症、减缓肝纤维化的发展<sup>[11-12]</sup>。诱导 HO-1 的表达可以抑制 HSCs 增殖,降低 Collagen I 的产生,减轻肝脏氧化应激水平,进而抑制肝纤维化的发生、发展<sup>[13]</sup>。本实验采用的虎杖苷是从虎杖根中提取的有效成分,由于具有抗氧化作用在一些肝脏疾病的防治中具有重要作用<sup>[14-17]</sup>。本研究使用不同浓度的虎杖苷处理 HSC-T6 细胞,结果表明,随着虎杖苷浓度增加,Nrf2、HO-1 蛋白表达逐渐增加。

本研究发现,虎杖苷通过抑制肝星状细胞活化及胶原的产生,发挥抑制肝纤维化发生的作用,其作用机制可能与上调 Nrf2/HO-1 信号通路有关,这为虎杖苷在肝纤维化治疗中应用提供了新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Aydın M M, Akçali K C. Liver fibrosis[J]. Turk J Gastroenterol, 2018, 29(1): 14
- [2] Hu D, Hu Y, Xu W, et al. miR-203 inhibits the expression of collagen-related genes and the proliferation of hepatic stellate cells through a SMAD3-dependent mechanism[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1248
- [3] Fujiki T, Ando F, Murakami K, et al. Tolvaptan activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway through PERK phosphorylation[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 9245
- [4] Suzuki T, Yamamoto M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress[J]. J Biol Chem, 2017, 292(41): 16817
- [5] Jiao Y, Wu Y, Du D. Polydatin inhibits cell proliferation, invasion and migration, and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Braz J Med Biol Res, 2018, 51(4): e6867
- [6] Du Q H, Peng C, Zhang H. Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics[J]. Pharm Biol, 2013, 51(11): 1347
- [7] Zhang D Y, Friedman S L. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis[J]. Hepatology, 2012, 56(2): 769
- [8] Ezhilarasan D, Sokal E, Najimi M. Hepatic fibrosis: it is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2018, 17(3): 192
- [9] Tsuchida T, Friedman S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(7): 397
- [10] Li P, Wu G. Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth[J]. Amino Acids, 2018, 50(1): 29
- [11] Cai Z, Lou Q, Wang F, et al. N-acetylcysteine protects against liver injury induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(7):8655
- [12] Zhang G, Cui R, Kang Y, et al. Testosterone propionate activated the Nrf2-ARE pathway in ageing rats and ameliorated the age-related changes in liver[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 18619
- [13] Yang H, Chen B, Zhao Z, et al. Heme oxygenase-1 exerts pro-apoptotic effects on hepatic stellate cells *in vitro* through regulation of nuclear factor- $\kappa$ B[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(1): 291
- [14] Jiang J, Chen Y, Dong T, et al. Polydatin inhibits hepatocellular carcinoma via the AKT/STAT3-FOXO1 signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2019, 17(5): 4505
- [15] Lai Y, Zhou C, Huang P, et al. Polydatin alleviated alcoholic liver injury in zebrafish larvae through ameliorating lipid metabolism and oxidative stress[J]. J Pharmacol Sci, 2018, 138(1): 46
- [16] Xu L Q, Xie Y L, Gui S H, et al. Polydatin attenuates d-galactose-induced liver and brain damage through its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in mice[J]. Food Funct, 2016, 7(11): 4545
- [17] Liu Y H, Huang Q H, Wu X, et al. Polydatin protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice via anti-oxidative and anti-apoptotic activities[J]. Food Funct, 2018, 9(11): 5891

(2019-12-06 收稿)