

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.19.012

实验研究

扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导 HSC-T6 细胞增殖及 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响

肖政华^{*}, 邹艳², 杨辉¹, 谭芊任¹, 崔峻松¹, 胡芳¹

(1. 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵州省贵阳市飞山街 83 号, 550002; 2. 贵州中医药大学)

摘要 目的 探讨扶肝化纤汤抗肝纤维化的可能作用机制。方法 将 40 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、扶肝化纤汤组, 每组 20 只, 扶肝化纤汤组以 16.78g/kg 扶肝化纤汤灌胃, 正常对照组予等体积生理盐水灌胃, 每日 1 次, 连续 7 天, 末次给药后于大鼠腹主动脉取血制备含药血清。培养大鼠肝星状细胞 HSC-T6, 设置空白对照组及 1%、2%、5%、8%、10%、15%、20% 扶肝化纤汤含药血清组, 检测不同浓度扶肝化纤汤含药血清对转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 诱导的 HSC-T6 活化增殖的影响, 确定 15% 扶肝化纤汤含药血清为最佳给药浓度。细胞实验分为空白对照组 (HSC-T6 细胞)、正常组 (HSC-T6 细胞 + 正常对照血清 + TGF- β 1)、中药组 (HSC-T6 细胞 + 15% 扶肝化纤汤含药血清 + TGF- β 1); 阻断组 1 (HSC-T6 细胞 + SIS3)、阻断组 2 (HSC-T6 细胞 + 正常对照血清 + TGF- β 1 + SIS3) 及阻断组 3 (HSC-T6 细胞 + 15% 扶肝化纤汤含药血清 + TGF- β 1 + SIS3), 培养 24 h 后比较各组 HSC-T6 细胞增殖抑制率及细胞中 Smad 3、Smad 7、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原 mRNA 表达。结果 与空白对照组比较, 正常组、中药组、阻断组 2、阻断组 3 HSC-T6 细胞增殖抑制率差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与正常组比较, 中药组、阻断组 2、阻断组 3 HSC-T6 细胞增殖抑制率差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与中药组比较, 阻断组 3 抑制率明显升高 ($P < 0.01$)。与空白对照组比较, 中药组、阻断组 2、阻断组 3 均可下调 Smad 3、I 型胶原 mRNA 表达, 上调 Smad 7、 α -SMA mRNA 表达 ($P < 0.01$); 正常组可上调 Smad 3、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 表达, 下调 Smad 7 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。与正常组比较, 中药组、阻断组 2、阻断组 3 均可下调 Smad 3、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 表达, 上调 Smad 7 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。与中药组比较, 阻断组 3 可下调 Smad 3、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 表达, 上调 Smad 7 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。结论 扶肝化纤汤能够抑制 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞的活化增殖, 其可能通过影响 TGF- β 1/Smad 信号转导通路发挥抗肝纤维化作用。

关键词 肝纤维化; 肝星状细胞; 扶肝化纤汤; 细胞增殖; 转化生长因子 β 1; Smad

肝纤维化是在各种慢性肝损伤因素的作用下, 损伤与修复过程中细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的合成和降解不平衡, 最终导致 ECM 在肝内过度沉积所致^[1-2]。肝纤维化的发生发展是一个复杂的病理过程, 主要由肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 增殖和激活引起^[3]。激活的 HSC 是产生大量 ECM 造成肝纤维化的主要细胞, 细胞因子通过各种信号途径介导 HSC 的活化是

肝纤维化过程的中心环节, 已有研究^[4]证实, TGF- β 1/Smad 是肝纤维化主要的信号转导通路, 起着关键的调控作用, 抑制该通路可以有效逆转纤维化。转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 是目前公认的已知最能激活 HSC 的细胞因子, 也是最重要的致肝纤维化因子^[5], 具有促进胶原基因表达、促进 ECM 合成与沉积等作用。Smads 是 TGF- β 1 信号通路的关键转导分子, 其中 Smad 3 蛋白参与 TGF- β 1 在细胞膜上的 TGF- β 受体磷酸化后的转运, 调控相关基因的转录, 导致 ECM 产生; Smad 7 是 TGF- β 1 信号通路的抑制性蛋白, 通过与 I 型受体结合干扰其他 Smad 磷酸化, 从而阻断信号通路的后续传

基金项目: 国家自然科学基金 (81660790); 贵州省科学技术基金; 贵州省卫生厅科学技术基金 (gzwkj2012-1-044); 贵州中医药大学校内博士启动基金

* 通讯作者: 435204673@qq.com

导^[9]。实验研究显示, Smad 3 基因敲除小鼠肝中 I 型胶原 mRNA $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 链表达分别下降 58%、36%^[10], 通过抑制 Smad 3 或增加 Smad 7 的表达可以发挥抗纤维化作用^[9]。此外, α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 是 HSC 活化的标志^[11], 参与合成 I 型胶原、III 型胶原、纤维连接蛋白等多种 ECM 成分, 促进肝纤维化的发生。

扶肝化纤汤是我们临床治疗肝纤维化经验方, 具有健脾益气、补益肝肾、行气活血、扶正解毒之效。前期研究^[12]表明, 扶肝化纤汤能较好地改善肝纤维化患者的临床症状, 恢复肝功能, 降低血清肝纤维化指标水平; 同时能够改善肝纤维化大鼠肝功能, 降低透明质酸、IV 型胶原、III 型前胶原、层粘连蛋白、羟脯氨酸含量^[13]。本研究观察扶肝化纤汤含药血清对 TGF- $\beta 1$ 诱导的 HSC-T6 细胞活化增殖及 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路的影响, 并通过加入 Smad 3 阻断剂 SIS3, 来探讨扶肝化纤汤抗肝纤维化的可能机制及其靶点。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 40 只, 体重 180 ~ 200 g, 由辽宁长生生物技术股份有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (辽) 2015-001, 均饲养于贵阳中医学院动物实验室。室内自然采光, 通风、清洁条件良好, 实验室温度控制在 18 ~ 26℃, 常规喂养、饮水, 实验期间自由饮食, 适应性喂养 1 周。

大鼠肝星状细胞 HSC-T6 由长沙赢润生物技术有限公司提供, 货号: NC015, 批号: 2017042003。

1.2 药物

扶肝化纤汤组成: 北柴胡 10 g, 白芍 20 g, 枳实 15 g, 炙甘草 6 g, 三七粉 5 g, 丹参 20 g, 鳖甲 20 g, 黄芪 20 g, 白术 20 g, 当归 20 g, 黄精 15 g, 绞股蓝 10 g。药物均购于贵阳中医学院第二附属医院智能颗粒药房 (广东一方智能颗粒, 批号: 7051263)。加入 100℃ 纯净水 200 ml 充分搅拌均匀后, 用恒温水浴锅浓缩至含生药 2 g/ml, 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

胰酶 (批号: J170026, GBICO 公司), 胎牛血清 (批号: 20170424, 浙江天杭生物科技有限公司提供), 高糖 DMEM 培养液 (批号: AC10953681, HYCLONE 公司), TGF- $\beta 1$ (批号: 100212, Pepro-

Tech 公司), Smad 3 阻断剂 SIS3 (批号: 21565, MCE 公司), MTT 溶液 (批号: 20170505, 北京索宝生物科技有限公司), 纯化试剂盒 (批号: 00577151, Thermo Fisher Scientific 公司), SYBR Premix Ex TaqII (批号: AK412002)、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (批号: AK4301), 均由大连宝生物工程有限公司提供。

倒置显微镜 (IX71 型, OLYMPUS 公司), 酶联免疫检测仪 (Multiskan GO 型, Thermo Fisher Scientific 公司), 离心机 (TDZ4-WS 型, 长沙平凡仪器仪表有限公司), 实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96 型, Bio-Rad 公司), CO₂ 恒温培养箱 (3111 型, Thermo Fisher 公司)。

1.4 扶肝化纤汤含药血清的制备

40 只 Wistar 雄性大鼠按随机数字表分为正常对照组、扶肝化纤汤组, 每组 20 只。按照大鼠与成人的每千克体重等效剂量折算系数 6.25^[14] 换算大鼠用药剂量, 扶肝化纤汤组以 16.78 g/kg 扶肝化纤汤灌胃, 正常对照组予等体积生理盐水灌胃。每日 1 次, 连续 6 天, 第 7 天重复给药 2 次, 间隔时间 2 h。于末次给药后 1 h 予 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 无菌条件下分离血清, 将分离好的血清置于 56℃ 水浴 30 min 灭活抗体, 再经 0.2 μ m 滤膜过滤除菌分装, 分别得到正常对照血清和扶肝化纤汤含药血清, -20℃ 冰箱保存备用。

1.5 细胞培养及传代

HSC-T6 细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 视细胞生长情况进行换液, 细胞 80% ~ 90% 融合时传代。弃掉原培养液, PBS 缓冲液冲洗培养瓶 2 次, 每瓶细胞中加入 2 ml 胰酶消化细胞, 倒置显微镜下观察细胞变圆分散后, 加入完全培养基进行吹打, 将细胞完全吹打脱落并吸出, 1500 r/min、4℃ 离心 5 min, 离心半径为 5 cm, 弃上清; 加入 3 ml PBS 吹打均匀, 1500 r/min、4℃ 离心 5 min, 离心半径为 5 cm, 按 1 : 3 比例传代至新的培养瓶中。

1.6 扶肝化纤汤最佳给药浓度的确定

于 96 孔板中接种 2×10^6 个/ml HSC-T6 细胞 180 μ l, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。设置 8 个实验组, 包括空白对照组及 1%、2%、5%、8%、10%、15%、20% 扶肝化纤汤含药血清组, 每组设置 6 个复孔。待细胞贴壁生长后, 扶肝化纤汤含药血清组分别加入 100 μ l 上述不同浓度的含药

血清及 100 μ l TGF- β 1, 继续培养 24 h。小心吸去上清, 加入 90 μ l 新鲜培养液, 再加入 10 μ l MTT 溶液, 继续培养 4 h。小心吸掉上清, 每孔加入 110 μ l 蓝紫色结晶甲瓚 (Formazan 溶液), 置于摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在酶联免疫检测仪 490 nm 处测各孔的吸光值 (OD 值), 同时设置调零孔 (Formazan 溶液)。据吸光值计算抑制率并绘制浓度-抑制率曲线。抑制率 = $\frac{[(\text{扶肝化纤汤含药血清组平均 OD 值} - \text{调零孔}) / (\text{空白对照组平均 OD 值} - \text{调零孔})] \times 100\%}{}$ 。结果显示, 15% 扶肝化纤汤含药血清对 HSC-T6 细胞增殖的抑制率最明显 (5% 中药组抑制率 9.76%、10% 中药组抑制率 9.72%、15% 中药组抑制率 39.75%、20% 中药组抑制率 39.56%)。据此, 后续实验以 15% 扶肝化纤汤含药血清干预。

1.7 扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞活化增殖的影响

实验分为空白对照组 (HSC-T6 细胞)、正常组 (HSC-T6 细胞 + 正常对照血清 + TGF- β 1)、中药组 (HSC-T6 细胞 + 15% 扶肝化纤汤含药血清 + TGF- β 1)、阻断组 1 (HSC-T6 细胞 + SIS3)、阻断组 2 (HSC-T6 细胞 + 正常对照血清 + TGF- β 1 + SIS3) 及阻断组 3 (HSC-T6 细胞 + 15% 扶肝化纤汤含药血清 + TGF- β 1 + SIS3)。

于 96 孔板中接种 2×10^6 个/ml 的 HSC-T6 细胞 180 μ l, 每组设置 9 个复孔, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁生长后, 正常组加入正常对照血清 100 μ l, 中药组及阻断组 3 分别加入 15% 扶肝化纤汤含药血清 100 μ l, 正常组、中药组及阻断组 2、3 加入 100 μ l TGF- β 1, 阻断组 1、2、3 中分别加入 Smad 3 阻断剂 SIS3 50 μ l。后续培养及检测方法同上, 据吸光值计算抑制率 (抑制率计算公式同 1.6)。

1.8 各组 HSC-T6 细胞中 Smad 3、Smad 7、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 表达检测

按照纯化试剂盒操作说明进行细胞总 RNA 制备与纯化, 以 1 μ g 总 RNA 于 10 μ l 逆转录体系中进行逆转录; cDNA 产物 10 倍稀释后进行实时荧光定量 PCR 检测, 程序为: 50 $^{\circ}$ C 2 min (1 个循环), 95 $^{\circ}$ C 10 min (1 个循环), 95 $^{\circ}$ C 15s, 55 $^{\circ}$ C 1 min (40 个循环)。目的基因 Ct 值经同一样本的内参基因 β -actin 校正后计算各组每个基因的 Δ Ct, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算组间对应基因的表达差异。

β -actin、Smad 3、Smad 7、 α -SMA、I 型胶原引物委托上海生工生物股份有限公司设计与合成, 其具体引物设计见表 1。

表 1 Smad 3、Smad 7、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 引物

指标		引物序列	扩增片段大小
Smad 3	正向	TGAACACCAAGTGCATTACCA	164bp
	反向	GTTGAAGGCGAACTCACAGAG	
Smad 7	正向	CTGTACCTTCTCCGATGAAAC	165bp
	反向	AGGGCTCTTGGACACAGTAGAG	
α -SMA	正向	TCTTTCATTGGAATGGAGTCG	164bp
	反向	GCTGTGATCTCCTTCTGCACT	
I 型胶原	正向	GAAGTGGTACATCAGCCCAAA	100bp
	反向	GGAACCTTCGCTTCCATACTC	
β -actin	正向	CACCCGCGAGTACAACCTTC	207bp
	反向	CCCATACCCACCATCACACC	

1.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析, 计量资料用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐者采用 LSD 法进行比较, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 法进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HSC-T6 细胞增殖抑制率比较

表 2 示, 与空白对照组比较, 正常组、中药组、阻断组 2、阻断组 3 HSC-T6 细胞增殖抑制率差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 阻断组 1 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常组比较, 中药组、阻断组 2、阻断组 3 HSC-T6 细胞增殖抑制率差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与中药组比较, 阻断组 2 HSC-T6 细胞增殖抑制率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而阻断组 3 抑制率明显升高 ($P < 0.01$)。与阻断组 2 比较, 阻断组 3 HSC-T6 细胞增殖抑制率亦明显升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组 HSC-T6 细胞增殖抑制率比较

组别	样本数	24 h 抑制率 (%)
空白对照组	9	-
正常组	9	-10.60*
中药组	9	39.75* Δ
阻断组 1	9	-0.07
阻断组 2	9	41.09* Δ
阻断组 3	9	62.52* Δ ▲#

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与正常组比较, Δ $P < 0.01$; 与中药组比较, ▲ $P < 0.01$; 与阻断组 2 比较, # $P < 0.01$

2.2 各组 HSC-T6 细胞中 Smad 3、Smad 7、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 相对表达量比较

表 3 示, 与空白对照组比较, 中药组、阻断组 2、

表 3 各组 HSC-T6 细胞中 Smad 3、Smad 7、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Smad 3	Smad 7	α -SMA	I 型胶原
空白对照组	9	1	1	1	1
正常组	9	1.61 $\pm$ 0.61*	0.58 $\pm$ 0.08*	3.34 $\pm$ 0.92*	1.62 $\pm$ 0.52*
中药组	9	0.65 $\pm$ 0.38* Δ	1.51 $\pm$ 0.20* Δ	2.21 $\pm$ 0.60* Δ	0.47 $\pm$ 0.06* Δ
阻断组 1	9	1.08 $\pm$ 0.08	0.91 $\pm$ 0.18	0.96 $\pm$ 0.45	0.95 $\pm$ 0.24
阻断组 2	9	0.58 $\pm$ 0.05* Δ	1.45 $\pm$ 0.21* Δ	2.37 $\pm$ 0.48* Δ	0.37 $\pm$ 0.04* Δ
阻断组 3	9	0.43 $\pm$ 0.26* Δ ▲#	1.83 $\pm$ 0.25* Δ ▲#	1.82 $\pm$ 0.47* Δ ▲#	0.33 $\pm$ 0.03* Δ ▲#

注: α -SMA, α 平滑肌肌动蛋白; 与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与正常组比较, $\Delta P < 0.01$; 与中药组比较, ▲ $P < 0.01$; 与阻断组 2 比较, # $P < 0.01$

阻断组 3 均可下调 Smad 3、I 型胶原 mRNA 表达, 上调 Smad 7、 α -SMA mRNA 表达 ($P < 0.01$); 正常组可上调 Smad 3、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 表达, 下调 Smad 7 mRNA 表达 ($P < 0.01$); 阻断组 1 各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常组比较, 中药组、阻断组 2、阻断组 3 均可下调 Smad 3、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 表达, 上调 Smad 7 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。与中药组比较, 阻断组 3 可下调 Smad 3、 α -SMA、I 型胶原 mRNA 表达, 上调 Smad 7 mRNA 表达 ($P < 0.01$); 阻断组 2 各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与阻断组 2 比较, 阻断组 3 亦可下调 Smad 3 mRNA、 α -SMA mRNA、I 型胶原 mRNA 表达, 上调 Smad 7 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。

3 讨论

肝纤维化属于中医学“癥瘕”“积聚”“臌胀”“肝着”等范畴, 其病因病机历代医家各有不同的观点。我们认为, 肝纤维化的形成发展与正气不足、易感邪毒, 或无力驱邪, 邪毒内蕴, 肝郁气滞血瘀密切相关, 肝郁、脾虚、血瘀相互错杂, 致该病迁延难愈。据此提出肝纤维化中医病机关键是“正虚毒蕴血瘀”, 治疗关键在肝病实脾、从脾论治, 培土荣木, 扶正解毒, 并依此设扶肝化纤汤治疗。方中黄芪、白术补中益气健脾为君; 黄精、当归、鳖甲补益肝肾之精血, 益气健脾强正气, 鳖甲还可软坚散结, 丹参、三七活血化瘀消积, 绞股蓝益气扶正解毒, 合而为臣; 柴胡、枳实疏肝理气, 白芍柔肝, 共为佐药; 而柴胡又引药入肝经, 甘草调和诸药为使药, 同时柴胡、白芍、枳实、甘草组成调和肝脾的基本方四逆散。诸药合用则有健脾益气、补益肝肾、行气活血、扶正解毒之效。

肝纤维化形成与活化的 HSC 密切相关, 正常情况下, HSC 处于静止状态, 当肝脏受各种肝损因素及细胞因子刺激后导致 HSC 激活, 转化为肌

成纤维样细胞, 并通过信号转导通路作用产生大量的 ECM, 形成肝纤维化。已有研究证实, 活化的 HSC 可以导致 TGF- β 1、白细胞介素 6 (IL-6)、 α -SMA 的表达和胶原的生成^[13], 故肝纤维化的治疗可通过抑制活化的 HSC 生成及促进活化的 HSC 凋亡两个方面进行^[14-16]。本研究运用 MTT 法检测扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞活化增殖的影响, 结果发现扶肝化纤汤含药血清能够明显抑制 HSC-T6 活化增殖, 且和阻断 Smad 3 有协同增强抑制作用, 但同时与阻断组 3 比较在 HSC-T6 细胞活化增殖抑制率及相关因子 mRNA 表达方面差异均存在统计学意义。这一结果也说明, 扶肝化纤汤可能不仅仅通过抑制 Smad 3 途径发挥作用, 可能还存有其他干预途径。

活化 HSC 增殖过程中所涉及的信号转导较为复杂, 包括 TGF- β 1/Smad 信号通路、MAPK 信号通路、JAK/STAT 信号通路、PDGF 信号通路等^[17-18]。TGF- β 1 是细胞因子 TGF- β 超家族成员之一, 其抑制大多数细胞的增殖、促进 ECM 合成及调节胶原生成, 与器官纤维化发生发展密切相关^[19], 是激活 HSC 并导致肝纤维化的最强细胞因子。TGF- β 1 主要通过 TGF- β 1/Smad 信号通路促进肝纤维化的发展, TGF- β 1 先与 HSC 表面自我磷酸化而活化的 II 型 TGF- β 受体结合, 后与 I 型 TGF- β 受体形成活性异源复合体, 进一步活化下游信号传导分子 Smads, 通过催化 Smad 2、Smad 3 磷酸化, 形成同源或异源寡聚体后进入细胞核, 调节相应基因的转录, 导致 ECM 产生^[20]。因此, Smad 是 TGF- β 1 信号通路的关键转导分子。Smad 3 蛋白是受体激活型 Smad, 也是其他信号通路中 Smad 蛋白相互影响的关键平台; Smad 7 为抑制型 Smad, 能与受体结合, 竞争性抑制受体激活型 Smad 与受体结合, 阻止 Smad 2、Smad 3 磷酸化, 对 TGF- β 受体信号传递起主要的负调控作用^[21]; α -SMA 是 HSC 活化的标志, 参与合成 I 型、III 型胶原等多

种 ECM 成分,促进肝纤维化的发生。本研究结果显示,扶肝化纤汤含药血清可显著下调 Smad 3 mRNA、I 型胶原 mRNA、 α -SMA mRNA 表达,上调 Smad 7 mRNA 表达,且扶肝化纤汤和阻断 Smad 3 有协同作用;但阻断组 3 各项结果均与中药组差异有统计学意义,这也说明扶肝化纤汤可能不仅仅通过抑制 Smad 3、上调 Smad 7 途径发挥作用。

综上所述,扶肝化纤汤可以通过 TGF- β 1/Smad 信号转导通路发挥抗肝纤维化作用,能够抑制 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞的活化增殖,抑制 α -SMA、I 型胶原、Smad 3 mRNA 的表达、上调 Smad 7 mRNA 的表达,减少 ECM 的合成,抑制肝纤维化的发生发展,这可能是其抗肝纤维化作用的重要机制之一。但同时本研究也发现,扶肝化纤汤可能不仅仅通过 TGF- β 1/Smad 信号转导通路发挥作用,仍需要进一步开展扶肝化纤汤对多条信号通路的影响及其交互作用的探讨研究,以明确其抗纤维化的作用机制及靶点。

参考文献

- [1] BATALLER R, BRENNER DA. Liver fibrosis [J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209-218.
- [2] TSUKADA S, PARSONS CJ, RIPPE RA. Mechanisms of liver fibrosis [J]. Clin Chim Acta, 2006, 364(1/2): 33-60.
- [3] KUO LM, KUO CY, LIN CY, et al. Intracellular glutathione depletion by oridonin leads to apoptosis in hepatic stellate cells [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2014, 19(3): 3327-3344.
- [4] 卢玮, 刘学恩, 庄辉. 肝纤维化相关细胞因子和信号通路研究进展 [J]. 中国病毒病杂志, 2016, 6(5): 385-390.
- [5] FRIEDMAN SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Gastroenterology, 2008, 134(6): 1655-1669.
- [6] HELDIN CH, MIYAZONO K, TEN DIJKE P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins [J]. Nature, 1997, 390(6659): 465-471.
- [7] SCHNABL B, KWEON YO, FREDERICK JP, et al. The role of Smad 3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation [J]. Hepatology, 2001, 34(1): 89-100.
- [8] YAO QY, XU BL, WANG JY, et al. Inhibition by curcumin of multiple sites of the transforming growth factor- β 1 signalling pathway ameliorates the progression of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2012, 12: 156. doi: 10.1186/1472-6882-12-156.
- [9] 武希润, 吕敏和, 王琦, 等. α -平滑肌肌动蛋白表达及血浆转化生长因子 β 1 变化在肝纤维化发生发展中的作用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(7): 21-23.
- [10] 崔峻松, 谭芊任, 肖政华. 扶肝化纤汤治疗慢性乙型病毒性肝炎肝纤维化临床研究 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(4): 131-133.
- [11] 崔峻松. 扶肝化纤汤对肝纤维化模型大鼠病理及 TGF- β 1 mRNA 表达的影响 [J]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2017.
- [12] 汪晖. 药理学实验 [M]. 2 版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2007: 20.
- [13] TAN Z, LIU Q, JIANG R, et al. Interleukin-33 drives hepatic fibrosis through activation of hepatic stellate cells [J]. Cellul Molecul Immunol, 2018, 15(4): 388-398.
- [14] LI Y, LIU S, HAN M, et al. S5ATP13 promotes liver fibrogenesis via activation of hepatic stellate cells [J]. J Cllul Biochem, 2017, 118(8): 2463-2473.
- [15] 焦云涛, 杨先照, 刘蕊洁, 等. 抗纤抑癌方干预肝纤维化大鼠肝星状细胞活化的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(5): 1099-1101.
- [16] 徐文洋, 吴若云, 鲁玉辉. 基于 TGF- β 1/Smad 信号通路探讨加味茵芍散含药血清对大鼠肝星状细胞增殖作用的影响及机制 [J]. 世界中西医结合杂志, 2016, 11(5): 630-635.
- [17] 谭玉婷, 王正根. 肝纤维化相关信号通路研究进展 [J]. 中国现代医药杂志, 2014, 16(1): 106-109.
- [18] 尤俊勇, 王效民. 肝星状细胞的激活与凋亡相关信号通路研究进展 [J]. 中外医学研究, 2011, 9(16): 155-158.
- [19] 汪美凤, 平键, 成扬. 肝星状细胞主要信号转导通路与肝纤维化的关系 [J]. 实用肝脏病杂志, 2010, 13(6): 466-469.
- [20] GRESSNER AM, WEISKIRCHEN R, BREITKOPF K, et al. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis [J]. Front Biosci, 2002, 7: d793-d807.
- [21] YAN X, CHEN YG. Smad 7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling [J]. Biochem J, 2011, 434(1): 1-10.

Effects of Serum Containing *Fugan Huaxian Decoction* (扶肝化纤汤) on TGF- β 1 Induced HSC-T6 Proliferation and TGF- β 1/Smad Signaling Pathway

XIAO Zhenghua¹, ZOU Yan², YANG Hui¹, TAN Qianren¹, CUI Junsong¹, HU Fang¹

(1. The Second Clinical Medical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001; 2. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of anti-liver fibrosis in *Fugan Huaxian Decoction* (扶肝化纤汤). **Methods** A total of 40 male Wistar rats were randomly divided into a normal control group and a *Fugan Huaxian Decoction* group, with 20 rats in each group. *Fugan Huaxian Decoction* group was intragastrically administered with 16.78 g/kg *Fugan Huaxian Decoction*, and the normal control group was given equal volume of normal saline by gavage, once a day for 7 consecutive days. After the last administration, blood was taken from the abdominal aorta of the rats to prepare the drug-containing serum. Rat hepatic stellate cells HSC-T6 were cultured, and blank control group as well as 1%, 2%, 5%, 8%, 10%, 15% and 20% *Fugan Huaxian Decoction* containing serum group were set up. The effects of different concentrations of *Fugan Huaxian Decoction* serum on the activation and proliferation of HSC-T6 induced by transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) were determined. The serum containing 15% *Fugan Huaxian Decoction* was determined as the optimal concentration. Cell experiments were divided into a blank control group (HSC-T6 cells), a normal group (HSC-T6 cells + normal control serum + TGF- β 1), a Chinese medicine group (HSC-T6 cells + 15% *Fugan Huaxian Decoction* serum + TGF- β 1); a blocking group 1 (HSC-T6 cells + SIS3), a blocking group 2 (HSC-T6 cells + normal control serum + TGF- β 1 + SIS3) and a blocking group 3 (HSC-T6 cells + 15% *Fugan Huaxian Decoction* containing serum + TGF- β 1 + SIS3). After 24 hours of culture, the proliferation inhibition rate of HSC-T6 cells and Smad 3, Smad 7, α smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen mRNA of each group were compared. **Results** Compared with the blank control group, the inhibition rate of HSC-T6 cell proliferation in the normal group, the Chinese medicine group, the blocking group and the blocking group had statistically significant difference ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the inhibition rate of HSC-T6 cell proliferation in the Chinese medicine group, the blocking group 2 and the blocking group 3 had statistically significant difference ($P < 0.01$). Compared with the Chinese medicine group, the inhibition rate of blocking group 3 was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the blank control group, the expression of Smad 3 and type I collagen mRNA was down-regulated in the Chinese medicine group, blocking group 2 and blocking group 3, and the expression of Smad 7 and α -SMA mRNA was up-regulated ($P < 0.01$). The normal group could up-regulate Smad 3 and α -SMA and type I collagen mRNA expression, down-regulated Smad 7 mRNA expression ($P < 0.01$). Compared with the normal group, the Chinese medicine group, the blocking group 2 and the blocking group 3 all down-regulated the expression of Smad 3, α -SMA and type I collagen and up-regulated the expression of Smad 7 mRNA ($P < 0.01$). Compared with the Chinese medicine group, blocking group 3 could down-regulate the expression of Smad 3, α -SMA and type I collagen and up-regulate the expression of Smad 7 mRNA ($P < 0.01$). **Conclusion** *Fugan Huaxian Decoction* could inhibit the activation and proliferation of HSC-T6 cells induced by TGF- β 1, which may play an anti-fibrosis effect by affecting TGF- β 1/Smad signal transduction pathway.

Keywords hepatic fibrosis; hepatic stellate cells; *Fugan Huaxian Decoction* (扶肝化纤汤); transforming growth factor β 1; Smad

(收稿日期: 2019-01-21; 修回日期: 2019-04-28)

编辑: 崔京艳