

白屈菜碱对活化后大鼠肝星状细胞 CFSC-8B 的增殖、胶原合成及 TGF- β_1 受体的影响[△]

李晓明^{1*}, 林鹏飞², 董妙先¹, 徐天娇¹, 于春磊¹, 荣 华¹, 王晓丽^{2#}(1.齐齐哈尔医学院医药科学研究院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2.齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R361[†].3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)13-1759-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.13.07

摘要 目的:考察白屈菜碱对活化后大鼠肝星状细胞 CFSC-8B 的增殖、胶原合成及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)受体的影响。方法:取对数生长期的 CFSC-8B 细胞,分为正常对照组、模型组、溶剂组(乙醇)、阳性对照组(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 秋水仙碱乙醇溶液)和白屈菜碱低、中、高浓度组(2.1、4.2、8.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白屈菜碱乙醇溶液)。除正常对照组外,其余各组细胞利用 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的 TGF- β_1 作用 24 h 进行活化,后 5 组细胞给予相应药物干预 24 h。采用 CCK-8 法检测各组细胞增殖情况,酶消化法检测细胞上清液中羟脯氨酸(Hyp)含量,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清液中 I 型胶原蛋白(Col-I)和 III 型胶原蛋白(Col-III)水平,Western blot 法检测细胞中 TGF- β_1 I 型受体(T β R-I)和 T β R-II 蛋白的表达,实时荧光定量-聚合酶链式反应法检测细胞中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、T β R-I 和 T β R-II mRNA 的表达。结果:与正常对照组比较,模型组细胞增殖率、Hyp 含量、Col-I 和 Col-III 水平、T β R-I 和 T β R-II 的蛋白表达水平以及 α -SMA、T β R-I、T β R-II 的 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,溶剂组细胞的上述指标均无明显差异($P>0.05$);白屈菜碱低浓度组细胞增殖率无明显差异($P>0.05$);阳性对照组和白屈菜碱高浓度组细胞的上述指标均显著降低($P<0.05$);白屈菜碱中浓度组细胞除 Hyp 和 Col-III 水平降低不显著外,上述其余指标均显著降低($P<0.05$)。与白屈菜碱中浓度组比较,白屈菜碱高浓度组细胞增殖率、Col-I 水平、T β R-I 和 T β R-II 的蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低($P<0.05$)。结论:白屈菜碱能抑制活化后 CFSC-8B 细胞的增殖、胶原合成以及 T β R-I、T β R-II 蛋白和 mRNA 的表达。

关键词 白屈菜碱;大鼠肝星状细胞 CFSC-8B;细胞增殖;胶原合成;转化生长因子 β_1 受体

Effects of Chelidionine on Proliferation, Collagen Synthesis and TGF- β_1 Receptor of Activated Hepatic Stellate Cells CFSC-8B in Rats

LI Xiaoming¹, LIN Pengfei², DONG Miaoxian¹, XU Tianjiao¹, YU Chunlei¹, RONG Hua¹, WANG Xiaoli²(1.Institute of Medical Science, Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2.School of Pharmacy, Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of chelidionine on proliferation, collagen synthesis and TGF- β_1 receptor of activated hepatic stellate cells CFSC-8B. METHODS: CFSC-8B cells in logarithmic phase were collected and then divided into normal control group, model group, solvent group (ethanol), positive control group (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ colchicine ethanol solution), chelidionine low, medium and high concentration groups (2.1, 4.2, 8.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chelidionine ethanol solution). Except for normal control group, other groups were activated with 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ TGF- β_1 for 24 h; the latter 5 groups were intervened with relevant medicine for 24 h. Cell proliferation of activated cells was assayed by CCK-8 assay. Hydroxyprolin (Hyp) content was assayed by enzyme digestion; the levels of type I collagen (Col-I) and type III collagen (Col-III) were assayed by ELISA; the expressions of T β R-I and T β R-II protein were assessed by Western blot; mRNA expressions of α -SMA, T β R-I and T β R-II in hepatic stellate cells were assessed by RT-PCR. RESULTS: Compared with normal control group, cell proliferation rate, Hyp content, the levels of Col-I and Col-III, the protein expressions of T β R-I and T β R-II as well as mRNA expressions of α -SMA, T β R-I and T β R-II were increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, there were no significant difference in above indexes of hepatic stellate cells in solvent group ($P>0.05$); there were no significant difference in the proliferation rate of hepatic stellate cells in chelidionine low concentration group ($P>0.05$), above indexes of hepatic stellate cells were decreased significantly in positive control group and chelidionine high concentration group ($P<0.05$). The decrease of Hyp and Col-III levels were not significant in chelidionine medium concentration, but other above indexes were decreased significantly ($P<0.05$). Compared with chelidionine medium concentration group, the rate of cell proliferation, Col-I level, protein and mRNA expressions of T β R-I and

T β R-II were decreased significantly in chelidionine high concentration group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Chelidionine can inhibit the proliferation, collagen synthesis as well as the protein and mRNA expressions of T β R-I and T β R-II in activated CFSC-8B cells.

[△] 基金项目:黑龙江省自然科学基金面上项目(No.H2016098)

* 副研究员,硕士。研究方向:中药药理学。电话:0452-2663375。

E-mail:Liming992@126.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:中药的药理作用及其作用机制。电话:0452-2663375。E-mail:ccwxl@126.com

肝星状细胞(Hepatic stellate cells)是一种位于肝脏的非实质细胞,肝星状细胞的活化、增殖是肝纤维化发生过程中结缔组织异常增生、肝内细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)过度沉积的主要原因^[1-2]。研究显示,肝纤维化发生后,若能经过积极的方法干预,抑制肝星状细胞的活化、增殖,肝纤维化的病理改变能发生可逆性恢复,从而避免肝纤维化进一步恶化为肝硬化,甚至肝癌^[3-4]。因此,寻找一种能有效控制肝星状细胞活化、增殖的药物,对降低肝硬化和肝癌发病率具有重要意义。中药白屈菜为罂粟科白屈菜属多年生草本植物白屈菜(*Chelidonium majus* L.)的全草,花盛期割取地上部分,晒干或鲜用。其味苦,性凉,有毒,主要活性成分为白屈菜碱(Chelidone)、原阿片碱、白屈菜红碱等生物碱,具有抗菌、镇痛、兴奋平滑肌作用,白屈菜治疗各种肿瘤在民间也广为流传,对多种肿瘤具有一定的抑制效果^[5]。但关于白屈菜碱抑制肝纤维化的研究未见报道。笔者前期研究结果发现,白屈菜中活性成分白屈菜红碱可抑制肝纤维化小鼠的病理学改变^[6],而白屈菜碱也是白屈菜中活性成分之一,因此,本文以转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)活化大鼠肝星状细胞CFSC-8B为肝纤维化模型,观察白屈菜碱对TGF- β_1 活化后CFSC-8B的增殖和胶原合成的影响。

1 材料

1.1 仪器

UV-2550型紫外分光光度计、CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司);Countess C10227型细胞计数器(美国Invitrogen公司);3111型二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);ELX800型全自动酶标仪(美国Bio-Tek公司);5417R型离心机(德国Eppendorf公司);Stratagene Mx3005P型实时定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Agilent公司);HL-2000型分子杂交箱(美国UVP公司);JY-ZY2型转移电泳槽和JY-CZ1型单垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);SmartChemi II型一体式微型化学发光成像仪(北京赛智创业科技有限公司);XP504型分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

白屈菜碱对照品(上海鼓臣生物技术有限公司,批号:18041303,纯度: $\geq 98\%$);秋水仙碱片(西双版纳药业有限责任公司,批号:H53021369,规格:0.5 mg);TRIzol试剂(美国Ambion公司);实时荧光定量PCR试剂盒与逆转录试剂盒(宝生物工程大连有限公司);TGF- β_1 (批号:SF7926,纯度:98%)、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒均由上海碧云天生物技术有限公司提供;兔抗鼠TGF- β_1 受体(T β R)-I多克隆抗体(美国

Cell Signaling公司,批号:3);兔抗鼠T β R-II多克隆抗体(美国Santa Cruz公司,批号:F1915);兔抗鼠磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(美国Sigma公司,批号:106M4851V);山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(北京康为世纪生物科技有限公司,批号:00051405);ECL超敏发光检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、T β R-I、T β R-II引物(上海生工生物工程股份有限公司合成);羟脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)试剂盒、CCK-8细胞活力检测试剂盒、I型胶原蛋白(Col-I)和III型胶原蛋白(Col-III)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 细胞

大鼠肝星状细胞CFSC-8B购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 CFSC-8B细胞的培养与分组

用完全培养基培养大鼠肝星状细胞CFSC-8B,于37℃含5%CO₂饱和湿度培养箱内孵育传代培养,取对数生长期细胞用于试验,以 5×10^5 mL⁻¹接种于96孔板中,每孔加入100 μ L。试验分为正常对照组、模型组、溶剂组(乙醇)、阳性对照组(1 μ g/mL秋水仙碱乙醇溶液)和白屈菜碱低、中、高浓度组(2.1、4.2、8.4 μ g/mL白屈菜碱乙醇溶液),每组3个复孔,各组加入药物浓度依据前期试验研究结果设定。模型组细胞中加入20 μ g/L的TGF- β_1 作用24 h进行活化,促使肝纤维化^[7],白屈菜碱低、中、高浓度组分别加入20 μ g/L的TGF- β_1 和相应质量浓度的白屈菜碱乙醇溶液共同作用24 h,溶剂组加入20 μ g/L的TGF- β_1 和乙醇溶液共同作用24 h,阳性对照组加入20 μ g/L的TGF- β_1 和1 μ g/mL秋水仙碱乙醇溶液共同作用24 h,正常对照组不加药物及TGF- β_1 。

2.2 CCK-8法检测细胞增殖

药物处理24 h后,按照CCK-8细胞活力检测试剂盒说明书中方法,在各孔中加入CCK-8溶液10 μ L,37℃孵育2 h,置于酶标仪中,设定检测波长为450 nm,测定吸光度,计算细胞增殖率:细胞增殖率(%)=(正常对照孔的吸光度-加药孔的吸光度)/(正常对照孔的吸光度-空白孔的吸光度) $\times 100\%$,式中空白孔只含有培养基和CCK-8,不含细胞和药物。

2.3 酶消化法检测细胞上清液中Hyp含量

药物处理24 h后,吸取细胞上清液,按照Hyp试剂盒说明书中方法进行消化操作后,置于酶标仪中,设定检测波长为550 nm,测定吸光度,计算上清液中Hyp含量。

2.4 ELISA法检测细胞上清液中Col-I和Col-III水平

药物处理24 h,按照Col-I和Col-III ELISA试剂盒

说明书中方法处理上清液,置于酶标仪中,设定检测波长为 450 nm,测定吸光度,计算上清液中 Col- I 和 Col- III 水平。

2.5 Western blot 法检测细胞中 TβR- I、TβR- II 蛋白的表达

药物处理 24 h 后,参照文献处理方法^[9],收集细胞,加入裂解液,按照试剂盒说明书操作提取 CFSC-8B 细胞总蛋白,采用二喹啉甲酸(BCA)法定量蛋白浓度,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),进行蛋白分离,湿转法转至偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉室温下封闭 2 h。加入兔抗鼠 TβR- I、TβR- II 和 GAPDH 多克隆抗体(1:1 000)4 ℃孵育过夜,次日 TBST 缓冲液洗膜 3 次,再加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000)37 ℃孵育 2 h。利用 ECL 超敏发光检测试剂盒检测,一体式微型化学发光成像仪扫描,分析各蛋白质印迹条带的光密度,以目标蛋白与内参(GAPDH)光密度的比值计算目标蛋白的表达量,再与正常对照组的比值计算目标蛋白的相对表达量。

2.6 实时荧光定量-PCR 法检测细胞中 α-SMA、TβR- I 和 TβR- II mRNA 的表达

药物处理 24 h 后,收集细胞,根据 RNA 提取试剂盒说明书中方法提取细胞总 RNA,各取 1 μg 总 RNA 进行逆转录,获得 cDNA。再以 cDNA 为模板,依照实时荧光定量-PCR 试剂盒说明书操作进行 PCR 反应,检测细胞中 α-SMA、TβR- I 和 TβR- II mRNA 的表达。反应条件:95 ℃预变性 4 min;95 ℃变性 20 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共循环 40 次。以 GAPDH 作为内参基因,采用 2^{-ΔΔCt}法计算细胞中 α-SMA、TβR- I 和 TβR- II mRNA 相对表达量。引物序列及片断长度见表 1。

表 1 引物序列及片断长度

Tab 1 Primer sequence and fragment length

基因	引物	引物序列	片断长度, bp
α-SMA	上游	5'-CCGAGATCTCACC GACTACC-3'	20
	下游	5'-TCCAGAGCGACATAGCACAG-3'	20
TβR- I	上游	5'-GCTGACATCTATGCAATGGGCTTA-3'	24
	下游	5'-AGGCAACTGGTAGTCTTCGTGGA-3'	23
TβR- II	上游	5'-GCGATCTAACCTGTTCCTGTG-3'	22
	下游	5'-GGGCCATGTATCTCGCTGTTTC-3'	21
GAPDH	上游	5'-GACAACCTTTGGCATCGTGA-3'	20
	下游	5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'	20

2.7 统计学方法

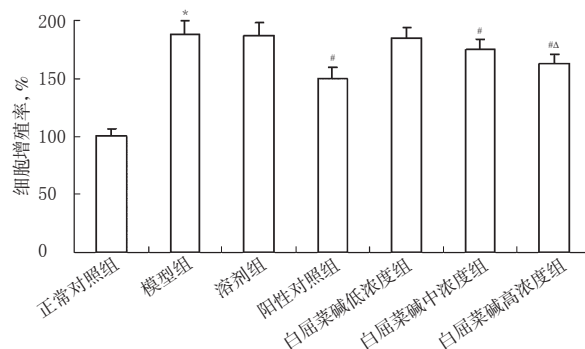
采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用单因素方差分析进行多组间差异显著性比较,采用 SNK 检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 白屈菜碱对 CFSC-8B 细胞增殖的影响

与正常对照组比较,模型组细胞增殖率显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和白屈菜碱中、

高浓度组细胞增殖率显著降低($P < 0.05$),并且白屈菜碱高浓度组细胞增殖率降低程度较中浓度组更显著($P < 0.05$);白屈菜碱低浓度组细胞增殖率无明显变化($P > 0.05$)。因白屈菜碱低浓度组细胞增殖率无明显变化,故仅选用白屈菜碱中、高浓度组进行后续试验。各组细胞增殖率测定结果见图 1。



注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与白屈菜碱中浓度组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal control group,* $P < 0.05$; vs. model group,# $P < 0.05$; vs. chelidonium medium concentration group,^Δ $P < 0.05$

图 1 各组细胞增殖率测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig 1 Results of cell proliferation rate in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 白屈菜碱对 CFSC-8B 细胞上清液中 Hyp、Col- I 和 Col- III 水平的影响

与正常对照组比较,模型组细胞上清液中 Hyp、Col- I 和 Col- III 水平显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和白屈菜碱中、高浓度组细胞上清液中 Col- I 水平显著降低($P < 0.05$),白屈菜碱高浓度组和阳性对照组细胞上清液中 Hyp、Col- III 水平显著降低($P < 0.05$)。与白屈菜碱中浓度组比较,白屈菜碱高浓度组细胞上清液中 Col- I 水平显著降低($P < 0.05$),Hyp、Col- III 水平有所下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组细胞上清液中 Hyp、Col- I 和 Col- III 水平测定结果见表 2。

表 2 各组细胞上清液中 Hyp、Col- I 和 Col- III 水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 2 Results of levels determination of Hyp, Col- I and Col- III in cell supernatant of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	Hyp, mg/L	Col- I, μg/L	Col- III, μg/L
正常对照组	1.85 ± 0.10	13.83 ± 0.85	23.51 ± 1.62
模型组	2.94 ± 0.20*	24.91 ± 1.45*	40.43 ± 2.66*
溶剂组	2.94 ± 0.18	25.08 ± 1.86	40.27 ± 2.17
白屈菜碱中浓度组	2.67 ± 0.18	21.43 ± 1.35 [#]	37.57 ± 2.57
白屈菜碱高浓度组	2.42 ± 0.14 [#]	18.62 ± 1.39 ^Δ	34.14 ± 1.97 [#]
阳性对照组	2.23 ± 0.19 [#]	16.29 ± 1.20 [#]	28.71 ± 1.81 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与白屈菜碱中浓度组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. normal control group,* $P < 0.05$; vs. model group,# $P < 0.05$; vs. chelidonium medium concentration group,^Δ $P < 0.05$

3.3 白屈菜碱对CFSC-8B细胞中TβR-I、TβR-II蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中TβR-I、TβR-II蛋白表达显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和白屈菜碱中、高浓度组细胞中TβR-I、TβR-II蛋白表达显著降低($P<0.05$)。与白屈菜碱中浓度组比较,白屈菜碱高浓度组细胞中TβR-I、TβR-II蛋白表达显著降低($P<0.05$)。各组细胞中TβR-I、TβR-II蛋白表达的电泳图见图2,测定结果见图3。

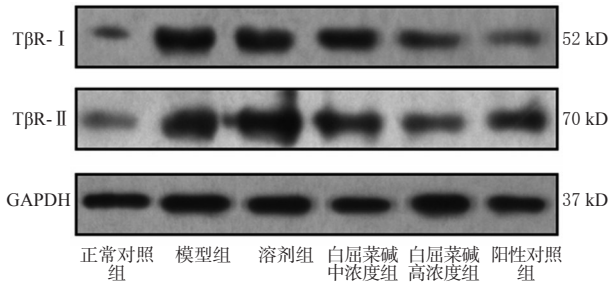
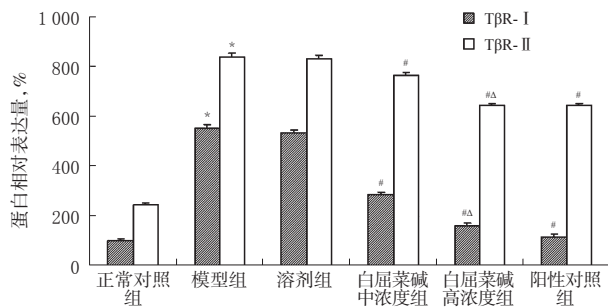


图2 各组细胞中TβR-I、TβR-II蛋白表达的电泳图
Fig 2 Electropherogram of protein expression of TβR-I and TβR-II in cells of each group



注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与白屈菜碱中浓度组比较, $\Delta P<0.05$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$; vs. model group, # $P<0.05$; vs. chelidone medium concentration group, $\Delta P<0.05$

图3 各组细胞中TβR-I、TβR-II蛋白表达测定结果($n=3$)

Fig 3 Results of protein expression of TβR-I and TβR-II in cells of each group($n=3$)

3.4 白屈菜碱对CFSC-8B细胞中α-SMA、TβR-I、TβR-II mRNA表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中α-SMA、TβR-I、TβR-II mRNA表达显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和白屈菜碱中、高浓度组细胞中α-SMA、TβR-I、TβR-II mRNA表达显著降低($P<0.05$)。与白屈菜碱中浓度组比较,白屈菜碱高浓度组细胞中TβR-I、TβR-II mRNA表达显著降低($P<0.05$);α-SMA mRNA表达有所下降,但差异无统计学意义($P>0.05$)。各组细胞中α-SMA、TβR-I、TβR-II mRNA相对表达量测定结果见表3。

表3 各组细胞中α-SMA、TβR-I、TβR-II mRNA相对表达量测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 3 Results of mRNA expressions of α-SMA, TβR-I and TβR-II in cells of each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	α-SMA	TβR-I	TβR-II
正常对照组	1.00±0.090	1.00±0.068	1.00±0.080
模型组	1.82±0.129*	3.34±0.111*	4.92±0.127*
溶剂组	1.81±0.134	3.32±0.107	4.94±0.146
白屈菜碱中浓度组	1.60±0.128 [#]	2.52±0.102 [#]	4.13±0.109 [#]
白屈菜碱高浓度组	1.42±0.119 [#]	1.64±0.125 ^{#A}	2.96±0.118 ^{#A}
阳性对照组	1.24±0.131 [#]	1.21±0.123 [#]	2.79±0.463 [#]

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与白屈菜碱中浓度组比较, $\Delta P<0.05$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$; vs. model group, # $P<0.05$; vs. chelidone medium concentration group, $\Delta P<0.05$

4 讨论

活化的肝星状细胞是引发肝纤维化的细胞学基础,在肝纤维化病变过程中扮演重要角色^[9]。当肝脏受到损伤、炎症等各种致病因素的作用时,处于静止期的肝星状细胞被激活,转化成为肌成纤维样细胞。肌成纤维样细胞分泌多种促炎因子和促纤维化因子,细胞中α-SMA合成增加并产生大量以Col-I、Col-III为主的ECM成分,并在肝脏内过度沉积,形成肝纤维化^[10]。可见,观察Col-I、Col-III含量变化,是评价肝星状细胞活化、增殖以及胶原蛋白合成的重要依据。Hyp是胶原组织代谢的重要产物,且为胶原中特有的氨基酸,观察Hyp含量变化,对于判断肝星状细胞的增殖、ECM的沉积、肝纤维化的程度具有重要意义^[11]。因此本研究检测了外源性TGF-β₁活化的肝星状细胞的增殖、Hyp含量和Col-I、Col-III水平,结果显示,TGF-β₁诱导活化的肝星状细胞,通过白屈菜碱干预后,当白屈菜碱质量浓度为4.2、8.4 μg/mL时,与模型组比较,细胞增殖率显著降低($P<0.05$),而白屈菜碱质量浓度为2.1 μg/mL时细胞增殖率差异无统计学意义($P>0.05$),因此在后续试验中只保留白屈菜碱的4.2、8.4 μg/mL(中、高)浓度组。模型组细胞中Hyp含量、Col-I和Col-III水平较正常对照组显著升高,说明本研究中肝星状细胞活化成功。而与模型组比较,白屈菜碱中浓度组细胞中Col-I含量显著降低($P<0.05$),Col-III及Hyp含量差异无统计学意义($P>0.05$);白屈菜碱高浓度组细胞中Hyp含量、Col-I和Col-III水平均显著降低,说明白屈菜碱能够抑制大鼠肝星状细胞的增殖和胶原合成。

TGF-β₁是公认的重要的致纤维化因子,在肝纤维化的形成、发展中起着重要的作用^[12]。其通过促进肝星状细胞活化、增殖,产生前胶原mRNA,使肝星状细胞失去脂质液滴,逐渐向肌成纤维样细胞和成纤维细胞的转化,促进胶原蛋白的合成与沉积,并最终导致肝纤维化^[13]。De Bleser PJ等^[14]研究发现,TGF-β₁在激活的肝星

状细胞中的表达量是静止时的12倍,而外源性TGF- β_1 又可以促进肝星状细胞的活化,刺激肝星状细胞持续合成ECM。T β R- I、T β R- II是具有丝苏氨酸激酶活性的转膜蛋白,由胞外区、胞内区和跨膜区组成,在细胞膜表面具有高亲和力,同属T β R的亚型,在组织中分布最为广泛^[15]。T β R- I的胞内侧富含高度保守的丝氨酸-甘氨酸序列(GS)区域,是T β R- I特有的,而T β R- II的胞内侧含有丝氨酸-苏氨酸激酶功能区,具有磷酸化功能^[16]。活化的TGF- β_1 首先结合T β R- II,形成异聚体复合物,然后寡集并磷酸化T β R- I,使丝氨酸-苏氨酸残基立体构象改变,从而具有激酶活性,激活胞内信号分子Smads蛋白,继续TGF- β_1 的信号转导^[17]。因此本研究用TGF- β_1 活化肝星状细胞,观察白屈菜碱对大鼠肝星状细胞T β R- I、T β R- II表达的干预作用。本研究显示,与正常对照组比较,模型组细胞中T β R- I、T β R- II mRNA表达和T β R- I、T β R- II的蛋白表达显著升高;与模型组比较,白屈菜碱中、高浓度组细胞中T β R- I、T β R- II mRNA表达和T β R- I、T β R- II的蛋白表达显著降低。

以上结果表明,白屈菜碱对TGF- β_1 活化的肝星状细胞具有一定的增殖抑制作用,进而说明其具有逆转肝纤维化的作用。白屈菜碱为白屈菜的主要活性成分之一,因此,白屈菜可能成为临床治疗肝纤维化的潜在中药。通过本研究,旨在为白屈菜在临床应用提供理论依据,同时为中药的现代化奠定基础。对于白屈菜碱抗纤维化作用机制还需进一步的研究。

参考文献

- [1] CABANTOUS S, HOU X, LOUIS L, et al. Evidence for an important role of host microRNAs in regulating hepatic fibrosis in humans infected with *Schistosoma japonicum* [J]. *Int J Parasitol*, 2017, 47(13): 823-830.
- [2] WONG RJ, LE A, NGUYEN MT, et al. Significant hepatic fibrosis among treatment-naive chronic hepatitis B virus with increased hepatitis B virus DNA and normal alanine aminotransferase[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2018, 16(1): 146-148.
- [3] KHIMJI AK, SHAO R, ROCKEY DC. Divergent transforming growth factor-beta signaling in hepatic stellate cells after liver injury: functional effects on ECE-1 regulation[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(3): 716-727.
- [4] SELIMOVIC D, EL-KHATTOUTI A, GHOZLAN H, et al. Hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: an insight into molecular mechanisms and therapeutic strategies [J]. *World J Hepatol*, 2012, 4(12): 342-355.
- [5] 韦祖巧, 邹翔, 曲中原, 等. 白屈菜化学成分和药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2009, 40(增刊): 38-40.
- [6] 李晓明, 欧阳婷庭, 董妙先, 等. 白屈菜红碱对肝纤维化小鼠 TGF- β /Smads 信号通路的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(7): 1323-1328.
- [7] 郭金波, 尹凤荣, 霍晓霞, 等. 氯喹对体外活化肝星状细胞自噬与胶原代谢的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(9): 1648-1653.
- [8] 王晓丽, 董妙先, 徐天娇, 等. β -细辛醚对缺氧再灌注损伤原代大鼠海马神经元的保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(5): 928-932.
- [9] 李婕, 李星霞, 霍炎, 等. 木犀草素对肝星状细胞迁移和增殖的影响[J]. *中国药房*, 2014, 25(7): 580-582.
- [10] 马官英, 张庆刚, 钟瑞华, 等. 金银花总黄酮对氧化应激中肝星状细胞的保护作用[J]. *中国药房*, 2014, 25(31): 2895-2897.
- [11] PUCHE JE, SAIMAN Y, FRIEDMAN SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(4): 1473-1492.
- [12] MURATA M, MATSUZAKI K, YOSHIDA K, et al. Hepatitis B virus X protein shifts human hepatic transforming growth factor (TGF)-beta signaling from tumor suppression to oncogenesis in early chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2009, 49(4): 1203-1217.
- [13] TANG LY, HELLER M, MENG Z, et al. Transforming growth factor- β (TGF- β) directly activates the JAK1-STAT3 axis to induce hepatic fibrosis in coordination with the SMAD pathway[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(10): 4302-4312.
- [14] DE BLESER PJ, NIKI T, ROGIERS V, et al. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver[J]. *J Hepatol*, 1997, 26(4): 886-893.
- [15] XU YT, SHEN MH, JIN AY, et al. Maternal circulating levels of transforming growth factor- β superfamily and its soluble receptors in hypertensive disorders of pregnancy [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2017, 137(3): 246-252.
- [16] LIU Z, YI J, YE R, et al. miR-144 regulates transforming growth factor- β 1 induced hepatic stellate cell activation in human fibrotic liver[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4): 3994-4000.
- [17] ZHANG X, ZHANG J, JIA L, et al. Diclptera Chinensis polysaccharides target TGF- β /Smad pathway and inhibit stellate cells activation in rats with dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2016, 62(1): 99-103.

(收稿日期:2019-02-21 修回日期:2019-05-12)

(编辑:邹丽娟)