

苦参碱对乙醛活化的肝星状细胞CFSC-8B增殖和胶原合成的影响及机制研究^Δ

王晓丽*(齐齐哈尔医学院药学院,黑龙江齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R962 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)11-1353-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.11.12

摘要 目的:研究苦参碱对乙醛活化的大鼠肝星状细胞CFSC-8B增殖和胶原合成的影响,并探讨其可能的作用机制。方法:取体外培养的CFSC-8B细胞,分为空白对照组、模型组、阳性对照组(2.5 μmol/L秋水仙碱)和苦参碱低、中、高浓度组(30、60、120 μmol/L)。除空白对照组外,其余各组细胞均加入200 μmol/L乙醛溶液诱导活化,并同时加入相应药液(空白对照组和模型组加入等体积空白培养液),共同作用24 h后,采用CCK-8法检测各组细胞的存活率。另取细胞分为空白对照组、模型组、阳性对照组(2.5 μmol/L秋水仙碱)和苦参碱中、高浓度组(60、120 μmol/L),同法活化和加药处理。分别采用酶消化法检测细胞培养液中羟脯氨酸(Hyp)含量;采用酶联免疫吸附法检测细胞培养液中I型胶原蛋白(Col-I)和III型胶原蛋白(Col-III)含量;采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法检测细胞中 α -平滑肌激动蛋白(α -SMA)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、TGF- β_1 I型受体(T β R-I)、TGF- β_1 II型受体(T β R-II)、Smad3、Smad4和Smad7 mRNA表达水平;采用Western blotting法检测细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R-I、T β R-II、Smad3、Smad4和Smad7蛋白表达水平。结果:与空白对照组比较,模型组细胞存活率显著升高($P < 0.05$);细胞培养液中Hyp、Col-I、Col-III含量和细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R-I、T β R-II、Smad3和Smad4 mRNA及其蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$),细胞中Smad7 mRNA及其蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性对照组和苦参碱中、高浓度组细胞存活率和细胞培养液中Hyp、Col-I、Col-III含量以及细胞中 α -SMA、Smad4 mRNA及其蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$),细胞中Smad7 mRNA及其蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$);阳性对照组和苦参碱高浓度组细胞中TGF- β_1 、T β R-I、T β R-II、Smad3 mRNA及其蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。与苦参碱中浓度组比较,苦参碱高浓度组细胞各指标水平改善程度均更显著($P < 0.05$)。结论:苦参碱能抑制乙醛活化的CFSC-8B细胞的增殖和胶原合成,且具有一定的浓度依赖性;其机制可能与调控TGF- β_1 /Smad信号通路的传导有关。

关键词 苦参碱;肝星状细胞;增殖;胶原合成;转化生长因子 β_1 /Smad通路;机制

Study on the Effects and Mechanism of Matrine on Proliferation and Collagen Synthesis of Hepatic Stellate Cells CFSC-8B Activated by Acetaldehyde

WANG Xiaoli(School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of matrine on proliferation and collagen synthesis of rat hepatic stellate cells CFSC-8B activated by acetaldehyde, and to investigate its possible mechanism. METHODS: CFSC-8B cells cultured *in vitro* were divided into blank control group, model group, positive control group (2.5 μmol/L colchicine) and matrine low, medium and high concentration groups (30, 60, 120 μmol/L). Except for blank control group, other groups were activated with 200 μmol/L acetaldehyde for 24 h; medicine groups were intervened with relevant medicine for 24 h (blank control group and model group were intervened with equal volume blank medium). Survival rate of cell was detected by CCK-8 assay. Cells were divided into blank control group, model group, positive control group (2.5 μmol/L colchicine), matrine medium and high concentration groups (60, 120 μmol/L), then activated and treated with same method. Hydroxyprolin (Hyp) content in cell culture solution was tested by enzyme digestion. The contents of Col-I and Col-III in cell culture solution were determined by ELISA. mRNA expressions of α -SMA, TGF- β_1 , T β R-I, T β R-II, Smad3, Smad4 and Smad7 in cells were detected by RT-PCR. The protein expressions of α -SMA, TGF- β_1 , T β R-I, T β R-II, Smad3, Smad4 and Smad7 in cells were detected by Western blotting. RESULTS: Compared with blank control group, survival rate of cells in model group was increased significantly ($P < 0.05$); the contents of Hyp, Col-I and Col-III in cell culture solution, mRNA and its protein expressions of α -SMA, TGF- β_1 , T β R-I, T β R-II, Smad3, Smad4 in cells were increased significantly in model group ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expression of Smad7 was decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, survival rate of cells, the contents of Hyp, Col-I and Col-III in cell culture solution, the mRNA and protein expressions of α -SMA and Smad4 were decreased significantly in positive control group and

^Δ基金项目:黑龙江省自然科学基金面上项目(No.H2016098);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(No.2018-KYY-WF-0099)

*副教授,博士。研究方向:中药的药理作用及其作用机制。电话:0452-2664571。E-mail:ccwxl@126.com

matrine medium and high concentration groups ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expression of Smad7 was increased significantly ($P < 0.05$); the mRNA and protein expressions of TGF- β_1 , T β R-I, T β R-II and Smad3 were decreased significantly in positive control group and matrine

high concentration group ($P < 0.05$). Compared with matrine medium concentration group, all above indexes were improved significantly in matrine high concentration group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Matrine can suppress the proliferation and collagen synthesis of CFSC-8B cells activated by acetaldehyde, with a certain concentration dependence, the mechanism of which may be associated with regulating the conduction of TGF β /Smad signal pathway.

KEYWORDS Matrine; Hepatic stellate cells; Proliferation; Collagen synthesis; TGF- β /Smad pathway; Mechanism

肝纤维化是肝硬化的必经阶段,也是肝细胞癌的前兆^[1]。在遗传性或非遗传性损伤因素的慢性刺激下,肝脏内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后,分泌多种促炎因子/促纤维因子,合成 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),并产生大量以 I 型胶原蛋白(Col- I)、III 型胶原蛋白(Col- III)为主的肝内细胞外基质(ECM)成分,ECM 在肝脏内过度沉积,继而造成肝纤维化^[2]。引起肝纤维化的因素包括肝炎病毒、血吸虫病、酒精、药物、胆汁淤积及自身代谢疾病等^[3]。研究显示,由酒精性肝损伤造成的肝纤维化的发生率逐年升高^[4]。因此,寻找有效防治酒精性肝纤维化的药物,以防止其发展成肝硬化甚至肝癌,具有重要的临床意义。

中药苦参为豆科植物苦参(*Sophora flavescens* Ait.)的干燥根,具有抗菌、抗病毒、抗炎、免疫调节、抗肿瘤、保肝等多种药理作用^[5-6]。苦参碱是苦参中的有效成分之一,在临床上已被应用于病毒性肝炎的治疗^[7-8],但其对酒精性肝损伤造成的肝纤维化是否存在逆转作用尚未见报道。转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)/Smad 信号通路在肝胶原合成与肝纤维化发展过程中起着关键性的作用^[9]。因此,本研究以乙醛活化的大鼠肝星状细胞 CF-SC-8B 为模型,探讨苦参碱对活化后肝星状细胞增殖和胶原合成的影响,并从 TGF- β_1 /Smad 信号通路着手探究其可能的作用机制,为苦参碱的进一步临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);UV-2550 型紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司);XPE504 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);ELX800 型全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);Countess C10227 型细胞计数器(美国 Invitrogen 公司);5417R 型离心机(德国 Eppendorf 公司);Stratagene Mx3005P 型实时荧光定量-聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(美国 Agilent 公司);SmartChemi II 型一体式化学发光成像仪(北京赛智创业科技有限公司);HL-2000 型分子杂交箱(美国 UVP 公司);JY-ZY2 型转移电泳槽、JY-CZ1 型单垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

苦参碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140905,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);CCK-8 细胞

活力检测试剂盒、肝组织羟脯氨酸(Hyp)检测试剂盒以及 Col- I、Col- III 酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20190401、20181205、20181210、20181210);细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(北京碧云天生物技术公司,批号:P0028-1);RNA 抽提试剂盒(美国 Ambion 公司,批号:47323);超敏发光(ECL)检测试剂盒[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号:RG239143];兔抗鼠 α -SMA 多克隆抗体、兔抗鼠 TGF- β_1 I 型受体(T β R- I)多克隆抗体、兔抗鼠 TGF- β_1 多克隆抗体、兔抗鼠 Smad4 多克隆抗体、兔抗鼠磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(美国 CST 公司);兔抗鼠 TGF- β_1 II 型受体(T β R- II)多克隆抗体、兔抗鼠 Smad7 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);兔抗鼠 Smad3 多克隆抗体(美国 Sigma 公司);生物素标记的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); α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4、Smad7 引物均由上海生工生物工程有限公司合成;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

大鼠肝星状细胞 CFSC-8B 购于赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将细胞接种于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱(下同)中培养 24 h 后,更换为不含血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h。取生长状态良好并处于对数生长期的细胞,加胰酶消化后,以 1 000 r/min 离心 3 min,收集细胞并制成密度为 1×10^5 个/mL 的细胞悬液。

2.2 苦参碱对细胞增殖的影响考察

采用 CCK-8 法检测。取细胞悬液,按 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中。将细胞分为空白对照组、模型组、阳性对照组(2.5 μ mol/L 秋水仙碱,根据预试验结果设置浓度)和苦参碱低、中、高浓度组(30、60、120 μ mol/L,根据预试验结果设置浓度),每组设置 3 个复孔。将以上 18 个孔记为试验孔,并另设对照孔和空白孔。培养 24 h 后,除空白对照组外,其余各组细胞均加入 200 μ mol/L 乙醛溶液诱导细胞活化^[10];同时,各给药组细胞加入相应浓度的药液,空白对照组和模型组细胞加入等体积空白培养液。继续培养 24 h 后,更换培养基,加入 CCK-8 试剂(10 μ L/孔),继续培养 2 h。采用酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔吸光度(A),根据公式计算细胞增殖率:细

胞增殖率(%)=($A_{\text{试验}} - A_{\text{空白}}$)/($A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}$) $\times 100\%$ 。式中, $A_{\text{试验}}$ 为试验孔吸光度值, $A_{\text{对照}}$ 为对照孔吸光度值(不含药物), $A_{\text{空白}}$ 为空白孔吸光度值(不含细胞和药物)。试验重复10次。

2.3 苦参碱对细胞培养液中Hyp含量的影响考察

采用酶消化法检测。取细胞悬液,按 1×10^4 个/孔的密度接种于96孔板中。将细胞分为空白对照组、模型组、阳性对照组(2.5 $\mu\text{mol/L}$ 秋水仙碱)和苦参碱中、高浓度组(60、120 $\mu\text{mol/L}$),每组设置3个复孔。按“2.2”项下方法进行细胞活化、给药和培养后,吸取上清液,以3 000 r/min离心10 min,取上清,按照Hyp试剂盒说明书操作,检测细胞培养液中Hyp的含量。试验重复10次。

2.4 苦参碱对细胞培养液中Col- I、Col- III含量的影响考察

采用ELISA法检测。按“2.3”项下方法分组,每组设置3个复孔,按“2.2”项下方法进行细胞活化、给药和培养后,吸取上清液,以3 000 r/min离心10 min,取上清,按照Col- I和COL- III ELISA检测试剂盒说明书操作,检测细胞培养液中Col- I和Col- III的含量。试验重复6次。

2.5 苦参碱对细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4和Smad7 mRNA表达的影响考察

采用RT-PCR法检测。按“2.3”项下方法分组,每组设置3个复孔,按“2.2”项下方法进行细胞活化、给药和培养后,吸弃培养基,收集细胞,按RNA提取试剂盒说明书操作,提取细胞中总RNA。验证提取RNA的纯度和浓度后,取1 μg 总RNA进行反转录合成cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩增。反应体系:cDNA模板2 μL , dNTP溶液1.6 μL , BeyoTaq Buffer 2 μL , BeyoTaq DNA Polymerase 0.1 μL ,上、下游引物各0.8 μL ,双蒸水12.7 μL ,总体积为20 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性20 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 mRNA的表达水平(C_t 表示每个反应管内荧光信号强度达到设定阈值时所经历的循环数)。试验重复6次。引物序列及扩增产物片段长度见表1。

2.6 苦参碱对细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3和Smad4蛋白表达的影响考察

采用Western blotting法检测。按“2.3”项下方法分组,每组设置3个复孔,按“2.2”项下方法进行细胞活化、给药和培养后,吸弃培养基,参照文献[11]的方法,收集细胞,按照细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒说明书操作步骤,分别提取细胞浆蛋白和细胞核蛋白,将两者合并,以二喹啉甲酸(BCA)法测定总蛋白含量。将合并的总蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、湿转法转膜、5%脱脂奶粉室温封闭2 h后,按1:1 000的稀释度加入T β R- I、T β R- II、Smad4、Smad7和GAPGH

表1 引物序列及扩增产物长度

Tab 1 Primer sequence and the length of amplified product

基因	引物序列	扩增产物长度, bp
TGF- β_1	上游: 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTCT-3'	24
	下游: 5'-CGCTGAATCGAAAGCCCTGTA-3'	21
T β R- I	上游: 5'-GCTGACATCTATGCAATGGGCTTA-3'	24
	下游: 5'-AGGCAACTGGTAGTCTTCGTGGA-3'	23
T β R- II	上游: 5'-GCGATCTAACCTGTTGCCTGTG-3'	22
	下游: 5'-GGGCCATGTATCTCGTGTTC-3'	21
α -SMA	上游: 5'-CCGAGATCTCACCAGACTACC-3'	20
	下游: 5'-TCCAGAGCGACATAGCACAG-3'	20
Smad3	上游: 5'-CTGGTACTCTGAGTGAAGATG-3'	21
	下游: 5'-TGTGAAGCGTGAATGTCTC-3'	20
Smad4	上游: 5'-TGGAAAGTAGGACTGCACCATACAC-3'	24
	下游: 5'-AGCAATGGAACACCAATATTCAGG-3'	24
Smad7	上游: 5'-GCATCTTCTGTCCCTGCTTC-3'	20
	下游: 5'-CCGGTCTTCTTCTTCTTTC-3'	20
GAPDH	上游: 5'-GACAACCTTGGCATCGTGA-3'	20
	下游: 5'-ATCGAGGGATGATGTTCTGG-3'	20

一抗,于37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育4 h;TBST缓冲液洗膜3次,按1:1 000的稀释度加入IgG二抗,于37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下继续孵育2 h。采用ECL检测试剂显影,以一体式微型化学发光成像仪扫描、分析各蛋白质条带的灰度值,以目标蛋白条带与内参GAPGH条带的灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平。试验重复6次。

2.7 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析。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,组间两两比较采用SNK检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞存活率测定结果

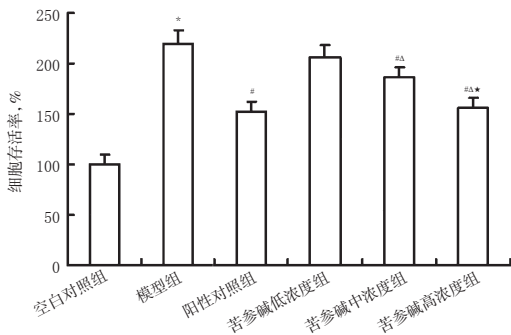
与空白对照组比较,模型组细胞的存活率显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和苦参碱中、高浓度组细胞存活率显著降低($P < 0.05$),且苦参碱的作用具有量效关系($P < 0.05$)。这提示中、高浓度苦参碱可以有效抑制活化细胞的异常增殖,故后续试验选择这2个浓度进行研究。各组细胞存活率测定结果见图1。

3.2 细胞培养液中Hyp、Col- I和Col- III的含量测定结果

与空白对照组比较,模型组细胞培养液中Hyp、Col- I和Col- III的含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和苦参碱中、高浓度组细胞培养液中Hyp、Col- I和Col- III的含量均显著降低($P < 0.05$);与苦参碱中浓度组比较,苦参碱高浓度组细胞培养液中Hyp、Col- I和Col- III的含量均显著降低($P < 0.05$)。各组细胞中培养液中Hyp、Col- I和Col- III的含量测定结果见表2。

3.3 细胞中TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、 α -SMA、Smad3、Smad4和Smad7的mRNA表达水平测定结果

与空白对照组比较,模型组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、



注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与苦参碱低浓度组比较, $\Delta P<0.05$;与苦参碱中浓度组比较,* $P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$; vs. model group, # $P<0.05$; vs. matrine low-concentration group, $\Delta P<0.05$; vs. matrine medium-concentration group, * $P<0.05$

图1 各组细胞存活率测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

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

T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$), Smad7 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,阳性对照药组和苦参碱高浓度组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 mRNA 表达水平以及苦参碱中浓度组细胞中 α -SMA、

表3 各组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4和Smad7 mRNA 表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 mRNA expressions of α -SMA, TGF- β_1 , T β R- I, T β R- II, Smad3, Smad4 and Smad7 in cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	α -SMA	TGF- β_1	T β R- I	T β R- II	Smad3	Smad4	Smad7
空白对照组	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.07
模型组	2.56 \pm 0.13*	1.87 \pm 0.16*	1.72 \pm 0.09*	1.69 \pm 0.14*	2.08 \pm 0.14*	2.29 \pm 0.10*	0.27 \pm 0.04*
阳性对照组	1.56 \pm 0.09 [#]	1.40 \pm 0.13 [#]	1.37 \pm 0.09 [#]	1.25 \pm 0.12 [#]	1.69 \pm 0.14 [#]	1.54 \pm 0.11 [#]	0.73 \pm 0.06 [#]
苦参碱中浓度组	2.11 \pm 0.15*	1.66 \pm 0.13	1.69 \pm 0.10	1.52 \pm 0.10	1.99 \pm 0.10	1.93 \pm 0.09*	0.58 \pm 0.07 [#]
苦参碱高浓度组	1.59 \pm 0.09**	1.44 \pm 0.12**	1.42 \pm 0.08**	1.28 \pm 0.12**	1.67 \pm 0.13**	1.54 \pm 0.08**	0.80 \pm 0.05**

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与苦参碱中浓度组比较,* $P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$; vs. model group, # $P<0.05$; vs. matrine medium-concentration group, * $P<0.05$

3.4 细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 和 Smad7 的蛋白表达水平测定结果

与空白对照组比较,模型组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$), Smad7 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,阳性对照药组和苦参碱高浓度组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 蛋白表达水平以及苦参碱中浓度组细胞中 α -SMA、Smad4 的蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),阳性对照药组和苦参碱中、高浓度组细胞中 Smad7 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。与苦参碱中浓度组比较,苦参碱高浓度组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$), Smad7 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。各组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 和 Smad7 蛋白表达的电泳图见图2,蛋白表达水平测定结果见表4。

4 讨论

乙醛是酒精在体内氧化、代谢、分解和排出体外过

表2 各组细胞培养液中 Hyp、Col- I 和 Col- III 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=10, \mu\text{g/L}$)

Tab 2 Content of Hyp, Col- I and Col- III in cells culture solution in each group($\bar{x} \pm s, n=10, \mu\text{g/L}$)

组别	Hyp	Col- I	Col- III
空白对照组	1.60 \pm 0.12	20.14 \pm 1.73	22.23 \pm 1.45
模型组	2.94 \pm 0.16*	35.03 \pm 1.55*	38.71 \pm 1.73*
阳性对照组	2.14 \pm 0.19 [#]	27.22 \pm 1.88 [#]	27.73 \pm 1.33 [#]
苦参碱中浓度组	2.59 \pm 0.14*	32.75 \pm 1.84*	33.40 \pm 1.48 [#]
苦参碱高浓度组	2.17 \pm 0.17**	27.42 \pm 1.42**	28.74 \pm 1.95**

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与苦参碱中浓度组比较,* $P<0.05$

Note: vs. blank control group, * $P<0.05$; vs. model group, # $P<0.05$; vs. matrine medium-concentration group, * $P<0.05$

Smad4 mRNA 表达水平均显著降低($P<0.05$),各给药组细胞中 Smad7 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$);与苦参碱中浓度组比较,苦参碱高浓度组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 mRNA 表达水平均显著降低($P<0.05$), Smad7 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$)。各组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4、Smad7 mRNA 表达水平测定结果见表3。

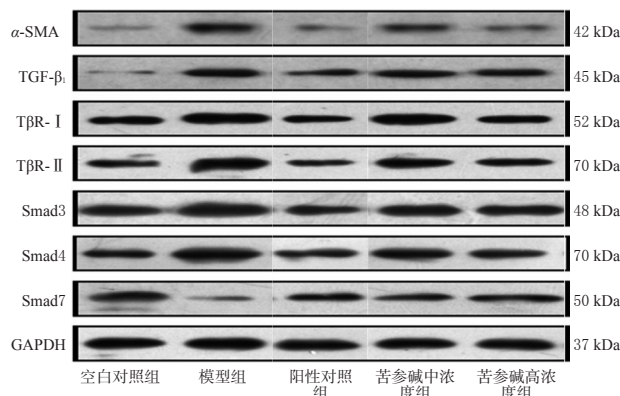


图2 各组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 和 Smad7 蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of protein expression of α -SMA, TGF- β_1 , T β R- I, T β R- II, Smad3, Smad4 and Smad7 in cells in each group

程中的一个中间产物^[12]。张志毕等^[13]研究发现,人体大量、持续地摄入含酒精的饮品,便会造成乙醛在体内不

表4 各组细胞中 α -SMA、TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4和Smad7蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 Protein expressions of α -SMA, TGF- β_1 , T β R- I, T β R- II, Smad3, Smad4 and Smad7 in cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	α -SMA/GAPDH	TGF- β_1 /GAPDH	T β R- I/GAPDH	T β R- II/GAPDH	Smad3/GAPDH	Smad4/GAPDH	Smad7/GAPDH
空白对照组	0.07±0.02	0.10±0.02	0.64±0.03	0.55±0.04	0.71±0.07	0.51±0.04	0.59±0.05
模型组	0.69±0.05*	0.74±0.06*	1.16±0.08*	1.11±0.07*	1.19±0.10*	1.20±0.06*	0.14±0.01*
阳性对照组	0.19±0.04 [#]	0.41±0.05 [#]	0.95±0.07 [#]	0.86±0.05 [#]	0.89±0.07 [#]	0.98±0.06 [#]	0.50±0.04 [#]
苦参碱中浓度组	0.47±0.06 [#]	0.72±0.07	1.13±0.07	1.04±0.06	1.12±0.08	1.09±0.06 [#]	0.34±0.03 [#]
苦参碱高浓度组	0.28±0.05**	0.57±0.05**	0.98±0.05**	0.92±0.06**	0.95±0.06**	0.96±0.08**	0.53±0.04**

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与苦参碱中浓度组比较,* $P<0.05$

Note: vs. blank control group,* $P<0.05$; vs. model group,[#] $P<0.05$; vs. matrine medium-concentration group,* $P<0.05$

能及时代谢、分解和排出,从而导致肝内分泌系统功能的紊乱、胶原蛋白的加速生成,进而引发酒精性肝纤维化、肝硬化甚至是肝癌,可见抑制乙醛对肝细胞的影响是预防酒精性肝纤维化发生的一个重要靶点。Moshage H等^[14]的研究也进一步证明了这一结论。因此,本研究利用乙醛诱导肝星状细胞活化,模拟酒精性肝损伤引发的肝纤维化,以观察苦参碱对细胞损伤的保护作用。肝星状细胞被激活后会合成 α -SMA,产生大量以Col- I、Col- III为主的ECM成分,而Hyp是胶原组织代谢的重要产物。检测 α -SMA、Col- I、Col- III和Hyp的含量变化,对于判断肝星状细胞增殖、胶原蛋白合成及肝脏纤维化的程度具有重要意义^[15]。本研究结果显示,乙醛能够促进肝星状细胞的增殖,提高细胞中Hyp的含量和上调 α -SMA mRNA及其蛋白的表达,加速Col- I和Col- III的生成,这说明模型组肝星状细胞被成功活化。与模型组比较,中、高浓度苦参碱能够抑制活化细胞的增殖,降低细胞中Col- I、Col- III、Hyp含量,下调细胞中 α -SMA mRNA及其蛋白表达,这说明苦参碱能够抑制大鼠肝星状细胞的增殖和胶原合成。

TGF- β_1 是一种重要的多功能调节蛋白,是TGF- β 超家族的重要成员,能够诱导肝星状细胞活化和增殖,生成前胶原mRNA,从而促进胶原蛋白的合成和过度蓄积,是目前最强的致纤维化因子之一^[16]。T β R- I、T β R- II是TGF- β_1 受体的亚型,是同属于丝氨酸/苏氨酸激酶受体家族的高亲和力结合蛋白,T β R- II与TGF- β_1 结合形成具有磷酸化功能的异聚体复合物,然后通过磷酸化T β R- I的GS区,使丝氨酸/苏氨酸残基立体构象改变,从而具有激酶活性,特异性识别并激活Smad2/3,活化下游Smad蛋白^[17]。Smads蛋白是TGF- β 受体的胞内激酶底物^[18],包括通用型Smad4、受体激活型Smad2/3及抑制型Smad7。在TGF- β 介导的Smad信号通路中,激活的Smad2/3与受体解离并与细胞质内Smad4结合,传导至细胞核内,与特定DNA序列结合,促进ECM的生成和过度沉积;Smad7可抑制Smad2/3表达,竞争性地与Smad4结合,抑制ECM的生成与蓄积^[19]。本研究发现,高浓度苦参碱可显著下调乙醛活化的肝星状细胞中TGF- β_1 、T β R- I、T β R- II、Smad3、Smad4 mRNA及其蛋白表达,并上调Smad7 mRNA及其蛋白表达,这提示苦参碱可通过

调节TGF- β_1 /Smad信号通路抑制肝星状细胞的增殖和胶原合成。

综上所述,苦参碱对大鼠肝星状细胞的增殖和胶原合成具有抑制作用,其机制可能与调控TGF- β_1 /Smad信号通路传导有关。然而苦参碱抑制肝星状细胞活化增殖的作用机制复杂,具体机制还需后续进一步深入研究证实。

参考文献

- [1] LENA S, MICHAEL D, SARA A, et al. Dectin-1 regulates hepatic fibrosis and hepatocarcinogenesis by suppressing TLR4 signaling pathways[J]. *Cell Rep*, 2015, 13 (9) : 1909-1921.
- [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] 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.
- [4] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA-Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [5] DAI MQ, CAI Z, CHEN NN, et al. Matrine suppresses stemness of hepatocellular carcinoma cells by regulating β -catenin signaling pathway[J]. *J South Med Univ*, 2019, 39(10): 1239-1245.
- [6] 刘晶晶, 牟艳玲. 苦参碱抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. *中国药房*, 2017, 28(19): 2707-2711.
- [7] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱对病毒性肝炎临床疗效评价的研究进展[J]. *抗感染药学*, 2019, 16(1): 5-9.
- [8] 李洪, 许小莉, 郑婷婷, 等. 苦参制剂联合扶正化瘀胶囊对乙型肝炎肝硬化患者肝血流动力学及纤维化指标的影响[J]. *中国药房*, 2017, 28(8): 1114-1116.
- [9] WONGNOPPAVICH A, DUKAEW N, CHOONATE S, et al. Upregulation of maspin expression in human cervical carcinoma cells by transforming growth factor β_1 through the convergence of Smad and non-Smad signaling

药物经济学评价中采用映射法获取健康效用值的文献计量研究^Δ

李梦楠^{1*}, 伍红艳^{2,3#}, 苟琴², 蔡一凡¹, 肖熠², 张堂钦², 宋沈超¹, 黄艳¹, 谢卓君¹, 林巢²(1. 贵州医科大学公共卫生学院, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学医药卫生管理学院, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学贵州省卫生发展研究院, 贵阳 550004)

中图分类号 R956 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)11-1358-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.11.13

摘要 目的: 了解药物经济学评价中采用映射法获取健康效用值的研究现状, 为药物经济学评价中映射研究的开展提供参考。方法: 以“映射法”“健康效用值”“成本-效用”“效用积分体系”“Mapping”“Health utility value”“Cost-utility”“Utility point system”“Value set”为中英文关键词检索中国知网、万方数据库、PubMed、Medline、Ebsco、Ovid、Wiley 数据库中自建库起至2018年12月31日发表的有关映射法获取健康效用值的实证类期刊文献, 采用文献计量法对纳入文献的基本信息、模型的构建与检验、最佳模型的类型等内容进行统计分析。结果: 纳入研究的124篇文献均发表在英文期刊; 在映射模型的构建与检验中, 应用频次最多的计量经济学方法、性能评价指标和模型检验方法分别是普通最小二乘法(OLS)、平均绝对误差(MAE)和残差正态性检验, 应用频次分别为97次(31.60%)、89次(24.93%)和62次(21.09%); 明确最佳映射模型的有117篇, 其中, 直接映射效果最佳的有101篇(86.32%), 非效用表中大多采用的是特异性量表(92篇, 77.97%), 少数文献采用了普适性量表(26篇, 22.03%), 而效用表采用最多的则是3水平欧洲5维健康量表(79篇, 66.95%)。结论: 国内采用映射法获取健康效用值的实证类研究还有待发展。国外学者成功开发的一系列映射模型不仅为采用非效用表进行成本-效用分析提供了可行性, 也为我国在今后的映射法实证研究中选用相应的计量经济学方法、评价指标及映射方式等提供了更多的思路。

关键词 映射法; 健康效用值; 成本-效用; 量表; 药物经济学评价; 文献计量研究

- pathways[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3646-3652.
- [10] 李晓明, 于春磊, 荣华, 等. 白屈菜红碱抑制肝星状细胞活化和胶原合成[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2019, 40(9): 1057-1059.
- [11] 王晓丽, 董妙先, 徐天娇, 等. β -细辛醚对缺糖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.
- [12] GAO B, BATAILLER R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(5): 1572-1585.
- [13] 张志毕, 蔡婷, 缪紫娥, 等. 阿魏酸钠对乙醛诱导的肝星状细胞增殖、活化和胶原合成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12): 123-128.
- [14] MOSHAGE H, CASINI A, LIEBER CS. Acetaldehyde selectively stimulates collagen production in cultured rat liver fat-storing cells but not in hepatocytes[J]. *Hepatology*, 1990, 12(1): 511-518.
- [15] PUCHE JE, SAIMAN Y, FRIEDMAN SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. *Compr Physiol*, 2013, 3(4): 1473-1492.
- [16] PARK SJ, CHOI YS, LEE S, et al. BIX02189 inhibits TGF- β_1 -induced lung cancer cell metastasis by directly targeting TGF- β type I receptor[J]. *Cancer Lett*, 2016, 381(2): 314-322.
- [17] MURATA M, YOSHIDA K, YAMAGUCHI T, et al. Linker phosphorylation of Smad3 promotes fibro-carcinogenesis in chronic viral hepatitis of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(41): 15018-15027.
- [18] LAKSHMI SP, REDDY AT, REDDY RC. Transforming growth factor β suppresses peroxisome proliferator-activated receptor γ expression via both Smad binding and novel TGF- β inhibitory elements[J]. *Biochem J*, 2017, 474(9): 1531-1546.
- [19] NIGDELIOGLU R, HAMANAKA RB, MELITON AY, et al. Transforming growth factor (TGF)- β promotes de Novo serine synthesis for collagen production[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(53): 27239-27251.

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.71463007); 贵州医科大学贵州省卫生发展研究院项目(No.gywf2019-17); 贵阳市健康城市建设理论研究及业务培训项目[No.GYZXYG-2017-12-635-GY-G公(C99)]

* 硕士研究生。研究方向: 社会医学、卫生事业管理、卫生服务。E-mail: 372801010@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 卫生事业管理、卫生经济学、药物经济学。E-mail: why376570155@126.com

(收稿日期: 2020-03-09 修回日期: 2020-04-14)

(编辑: 林静)