

# 灯盏花乙素对肝星状细胞及 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路的作用评价

闫榕均 方慧 迟莉

**【摘要】 目的** 观察灯盏花乙素 (scutellarin) 对肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 及转化生长因子  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)/Smad 信号通路的影响, 探讨 scutellarin 抗肝纤维化的机制。**方法** 建立 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HSC LX-2 模型, CCK-8 法检测 scutellarin 对细胞增殖的作用, 化学发光法检测 scutellarin 对 Caspase3/7 活性的影响, 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测细胞上清液 I 型前胶原的含量, ELISA 法检测细胞 Smad2 和 Smad3 磷酸化水平。**结果** scutellarin 能抑制 HSC 增殖, 增强细胞 Caspase3/7 活力, 抑制 I 型前胶原分泌, 降低 LX-2 细胞 Smad2 和 Smad3 磷酸化水平。**结论** 抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路可能是 scutellarin 抗肝纤维化的作用机制。

**【关键词】** 灯盏花乙素; 肝星状细胞; TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路

**【中图分类号】** R285 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.11.008

**Effect of scutellarin on TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway in hepatic stellate cell** YAN Rong-di, FANG Hui, CHI Li. Department of Occupational Disease, the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250001, China

Corresponding author: CHI Li, E-mail: 13911824903@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of scutellarin on signaling pathway in hepatic stellate cells (HSC) and transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1), to explore the mechanisms of anti-hepatic fibrosis. **Methods** Experiments were conducted by human HSC cells line. Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) was used to induce HSC model. The inhibitory effect of scutellarin on LX-2 cells was observed. Chemiluminescence measurement was used to measure the activity of caspase3/7 in LX-2 cells. ELISA was used to detect the content of pro-collagen I in LX-2 supernatant. The expressions of Phospho-

---

基金项目: 2015 年首都中医药研究专项 (15ZM08)

作者单位: 250001 济南, 山东中医药大学第二附属医院职业病科 (闫榕均); 首都医科大学中医药学院中医基础学系 [方慧 (本科生)、迟莉]

作者简介: 闫榕均 (1978-), 女, 硕士, 主治医师。研究方向: 职业性疾病和中毒性疾病的诊治。E-mail: kellycat813@163.com

通讯作者: 迟莉 (1980-), 女, 博士, 讲师。研究方向: 肝脏疾病的文献和实验研究。E-mail: 13911824903@163.com

Smad2 and Phospho-Smad3 were measured by ELISA. **Results** Scutellarin could Inhibit LX-2 cells proliferation, pro-collagen, I secretion, and phosphorylation of Smad2, Smad3 expressions. Scutellarin could improve the activities of caspase3/7. **Conclusion** The mechanism of scutellarin to anti hepatic fibrosis may be the inhibition of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway

**【Key words】** Scutellarin; Hepatic stellate cell; TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway

肝纤维化是指在各种致病因子作用下,肝星形细胞(hepatic Stellate cell, HSC)被活化并增殖,分泌出大量的胶原纤维,过度沉积于肝脏的病理过程,它不是一个独立的疾病,而是许多慢性肝脏疾病的共同阶段。肝纤维化属于可逆的阶段,肝纤维化阶段的治疗非常重要<sup>[1]</sup>。灯盏花乙素(scutellarin, scu)又名野黄芩苷,是从灯盏花中提取的一种黄酮类成分,具有广泛的生物学活性。近年来发现灯盏花乙素对多种器官纤维化<sup>[2-3]</sup>有治疗作用,可以减轻 CCl<sub>4</sub> 和猪血清诱导的肝纤维化大鼠模型的纤维化程度<sup>[4-5]</sup>,但其抗肝纤维化的作用机制研究较少。转化生长因子  $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)是促进 HSC 增殖和胶原纤维分泌作用最强的细胞因子之一<sup>[6]</sup>。本研究拟在人肝星形细胞系 LX-2 细胞上观察灯盏花乙素对肝星形细胞生物学活性及 TGF- $\beta$ 1 信号通路的影响,初步探讨灯盏花乙素治疗肝纤维化的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品、试剂和器材

灯盏花乙素,成都贝斯特试剂有限公司,纯度  $\geq 98\%$ ,批号:150615; LX-2 细胞,Scott L. Friedman 教授赠送<sup>[7]</sup>;胎牛血清(fetal bovin serum, FBS),GIBCO 公司,批号:1616496;DMEM 高糖培养基,HyClone,批号:NAC1363;Cell Counting Kit-8 (CCK-8)试剂盒,日本同仁化学研究所,批号:GX612;Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 检测试剂盒,普洛麦格(北京)生物技术有限公司,批号:0000116968;转化生长因子  $\beta$ 1, Peprotech Inc,批号:100-21;Pro-collagen Type I C-peptide (PIP) EIA 试剂盒, Takara Bio Inc,批号:AK1801;PathScan<sup>®</sup> Phospho-Smad2 (Ser465/467) Sandwich ELISA Kit, Cell Signaling Technology, Inc,批号:0015;PathScan<sup>®</sup> Phospho-Smad3 (Ser423/425) Sandwich ELISA Kit, Cell Signaling Technology, Inc,批号:0028。

十万分之一电子天平, OHAUS, 型号: AP2500;

酶标仪,美国 BIO-RAD 公司,型号:MODEL 6800;倒置荧光显微镜,西安测维光电技术有限公司,型号:LWD300-38LT1; Ensipire<sup>®</sup> 多功能酶标仪, PerkinElmer, 型号:2300;二氧化碳培养箱,赛默飞世尔科技(中国)有限公司,型号:371。

### 1.2 CCK-8 法检测灯盏花乙素对 LX-2 细胞增殖的影响<sup>[8]</sup>

分别在正常状态和 TGF- $\beta$ 1 刺激下观察灯盏花乙素对 LX-2 细胞增殖的影响。将 LX-2 细胞消化成单细胞悬液,按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 小时后,加入灯盏花乙素, TGF- $\beta$ 1 刺激的组别同时加入 2 pg/L 的 TGF- $\beta$ 1,培养 24 小时,加入 CCK-8 20  $\mu$ L,培养 0.5 小时,采用酶标仪在 450 nm 波长处测定其光吸收值。

### 1.3 化学发光法检测灯盏花乙素对 LX-2 细胞 Caspase3/7 活力的影响

将 LX-2 细胞消化成单细胞悬液,按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中,接种于 96 孔板中,培养 24 小时后,加入灯盏花乙素,再分别培养 10 小时和 22 小时,加入检测试剂,每孔 100  $\mu$ L,继续培养 2 小时,用化学发光仪检测其化学发光值。

### 1.4 ELISA 法检测灯盏花乙素对 LX-2 细胞 I 型前胶原分泌的影响<sup>[9]</sup>

将 LX-2 细胞消化成单细胞悬液,按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 小时,加入 2 pg/L 的 TGF- $\beta$ 1 和灯盏花乙素,再培养 48 小时,采用 ELISA 法检测上清中 Pro-collagen I 的影响。

### 1.5 ELISA 法检测灯盏花乙素对 LX-2 细胞 TGF- $\beta$ 1 信号通路 Smad2、Smad3 磷酸化水平的影响

将  $1.5 \times 10^5$  个 LX-2 细胞接种于 12 孔板中,培养 24 小时后,换为无血清培养基,培养 24 小时,加入灯盏花乙素培养 2 小时,加入 2 ng/mL TGF- $\beta$ 1, 30 分钟后,将上清吸出,用 PBS 冲洗细胞 1 次,加入细胞裂解液,在冰上孵育 5 分钟,将细胞刮下来,超声 2 次, 3000 rpm, 离心 10 分钟,将上清取出,每孔加 100  $\mu$ L 稀释后的细胞裂解液到酶标板中,之后按试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学处理

实验数据采用 SPSS 14.0 进行数据分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,对各组数据先进行方差齐性检验。如方差齐,用 GraphPad Prism 软件进行单因素方差分析, Dunnet-*t* 检验;如果方差不齐,进行对数转化后,再进行方差分析。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 灯盏花乙素对 LX-2 细胞增殖的影响

1、10、100  $\mu\text{mol/L}$  3 个浓度的灯盏花乙素作用 24 小时对正常 LX-2 细胞活力无明显影响;2  $\text{pg/L}$  TGF- $\beta 1$  作用 24 小时可明显诱导 HSC 的增殖,10  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  灯盏花乙素对 TGF- $\beta 1$  诱导的 LX-2 细胞增殖有抑制作用,提示灯盏花素有抑制 TGF- $\beta 1$  诱导的 HSC 增殖的作用。见表 1。

2.2 灯盏花乙素对 LX-2 细胞 Caspase3/7 活力的影响

灯盏花乙素作用 12 小时和 24 小时,只有 100  $\mu\text{mol/L}$  的灯盏乙素能提高 LX-2 细胞的 Caspase3/7 活力,表明只有高浓度的灯盏花素可在一定程度上诱导 HSC 的凋亡,灯盏花乙素对 HSC 增殖的抑制作用并非全部通过诱导凋亡而实现。见表 1。

表 1 灯盏花乙素对 LX-2 细胞增殖、Caspase3/7 水平的影响( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

组别	灯盏花乙素 浓度( $\mu\text{mol/L}$ )	细胞活力 (OD450)	Caspase3/7 活力
TGF- $\beta 1$ (-)	0	0.40±0.01	0.47±0.06
	1	0.44±0.07	0.56±0.12
	10	0.35±0.07	0.72±0.07
	100	0.32±0.03	0.91±0.04
TGF- $\beta 1$ (+)	0	0.88±0.10	4.29±0.50
	1	0.79±0.04	4.78±0.68
	10	0.54±0.05 <sup>a</sup>	5.04±0.80
	100	0.45±0.02 <sup>a</sup>	7.49±1.02 <sup>a</sup>

注:与 0  $\mu\text{mol/L}$  比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

2.3 灯盏花乙素对 LX-2 细胞 I 型前胶原分泌的影响

灯盏花乙素对正常 HSC 分泌 I 型前胶原没有影响;TGF- $\beta 1$  刺激 LX-2 细胞后,细胞分泌 I 型前胶原显著增多,1、10、100  $\mu\text{mol/L}$  3 个浓度的灯盏花乙素都抑制了 I 型前胶原的分泌,提示灯盏花

乙素具有抑制星形细胞分泌胶原的能力。见表 2。

表 2 灯盏花乙素对 LX-2 细胞上清 Pro-collagen Type I C-peptide 的影响( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

组别	灯盏花乙素 浓度( $\mu\text{mol/L}$ )	I 型前胶原 ( $\text{pg/L}$ )
TGF- $\beta 1$ (-)	0	345.00±111.00
	1	369.70±154.80
	10	251.00±44.31
	100	166.30±22.03
TGF- $\beta 1$ (+)	0	1460.00±118.00
	1	1052.00±138.50 <sup>a</sup>
	10	702.00±90.74 <sup>a</sup>
	100	474.30±102.00 <sup>a</sup>

注:与 0  $\mu\text{mol/L}$  比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

2.4 灯盏花乙素对 LX-2 细胞 TGF- $\beta 1$  下游信号通路分子 p-Smad2 和 p-Smad3 水平的影响

TGF- $\beta 1$  刺激 LX-2 细胞后,TGF- $\beta 1$  信号通路 Smad2 和 Smad3 磷酸化水平显著提高,灯盏花乙素 10 和 100  $\mu\text{mol/L}$  不同程度上抑制了 2 个分子磷酸化的程度,提示灯盏花乙素可以抑制 TGF- $\beta 1$  信号通路相关分子,灯盏花乙素对星形细胞增殖和胶原分泌的抑制作用可能是通过抑制 TGF- $\beta 1$  信号通路而实现的。见表 3。

表 3 灯盏花乙素对 TGF- $\beta 1$  诱导的 LX-2 细胞 p-Smad2、p-Smad3 的影响( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

组别	浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	p-Smad2 (OD450)	p-Smad3 (OD450)
Control	/	0.42±0.03	0.11±0.02
TGF- $\beta 1$	/	1.20±0.20 <sup>a</sup>	1.37±0.32 <sup>a</sup>
灯盏花乙素	1	1.09±0.26	1.04±0.19
	10	0.67±0.16 <sup>a</sup>	0.70±0.08
	100	0.54±0.10 <sup>b</sup>	0.42±0.02 <sup>b</sup>

注:与 Control 比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 TGF- $\beta 1$  比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

3 讨论

灯盏花又名灯盏细辛,为云南地方性中草药,具有散寒解表、活血舒筋、止痛消积等功效,以灯盏花乙素为主要成分的灯盏花注射液在临床治疗脑血管疾病取得了很好的效果<sup>[10-12]</sup>。近年来发现灯盏花乙素在抗器官纤维化方面有一定作用。灯盏花乙素抗心肌间质纤维化的机制之一是能够抑制 TGF- $\beta 1$  信号通路<sup>[13]</sup>,笔者推测灯盏花乙素可能也是通过作用于 TGF- $\beta 1$  信号通路而发挥抗肝纤维化作用。

肝脏 TGF- $\beta$ 1 由肝细胞、Kupffer 细胞和内皮细胞分泌<sup>[14-15]</sup>,被认为是在肝纤维化过程中发挥关键作用的细胞因子<sup>[16-17]</sup>,它不但能促使肝星形细胞转化为成纤维细胞,而且是促进成纤维细胞分泌胶原纤维作用最强的细胞因子<sup>[18]</sup>,能刺激细胞外基质的合成并抑制基质的降解<sup>[19]</sup>。正常情况下,TGF- $\beta$ 1 是失活的状态,一旦激活,TGF- $\beta$ 1 就会和细胞膜表面的 TGF- $\beta$  受体结合,形成二聚体,转入膜内,引起 Smads 家族转导子主要是 Smad2 和 Smad3 的磷酸化,之后和 Smad4 结合,转入细胞核,调节靶基因的表达<sup>[20-21]</sup>。Smads 被认为是 TGF- $\beta$ 1 介导胶原合成、促进纤维化的关键通路。

笔者检测了灯盏花乙素对肝星形细胞的作用及对 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路相关因子的影响。实验结果表明灯盏花乙素能抑制肝星状细胞的增殖,降低细胞活力,抑制 Smad 2 和 Smad3 的磷酸化,从而抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路,这可能是灯盏花乙素抗肝纤维化的作用机制之一。

总之,灯盏花乙素能抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的肝星形细胞增殖,呈剂量依赖性的抑制 Smad2/3 磷酸化,从而逆转肝纤维化的进程。笔者的研究探讨了灯盏花乙素抗肝纤维化可能的作用机制。

### 参 考 文 献

- [1] Christian Trautwein, Scott L. Friedman, Detlef Schuppan, et al. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *Journal of hepatology* [J]. 2015, 62 (1 Suppl): 15-24.
- [2] 吴先闯,杜钢军. 灯盏花素抗纤维化和抗肿瘤作用研究 [D]. 开封:河南大学,2010.
- [3] 林明华,孟庆媛,郭梦凡. 灯盏花素干预大鼠肝星状细胞 Caspase-3、NF- $\kappa$ B 表达的研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2012, 35(5): 46-48.
- [4] 王银辉,耿玲,李辉. 灯盏乙素抗大鼠肝纤维化作用的研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (10): 1999-2003.
- [5] 孟庆媛,苏亚楠,郭梦凡,等. 灯盏花素对肝纤维化模型大鼠 MMP-13 及 TIMP-1 表达的研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36 (3): 96-97.
- [6] Cornel Balta, Hildegard Herman a, Oana Maria Boldura, et al. Chrysin attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2015, 240: 94-101.
- [7] Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis [J]. *Gut*, 2005, 54(1): 142-151.
- [8] Hideaki Shimada, Nicholas R. Staten, Lakshman E. Rajagopalan, et al. TGF- $\beta$ 1 mediated activation of Rho kinase induces TGF- $\beta$ 2 and endothelin-1 expression in human hepatic stellate cells [J]. *Journal of Hepatology*, 2011, 54(3): 521-528.
- [9] Marco Trappoliere, Alessandra Caligiuri, Monika Schmid, et al. Silybin, a component of silymarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells [J]. *Journal of Hepatology*, 2009, 50(6): 1102-1111.
- [10] 侯凌波,乔利军,郭建文. 灯盏细辛注射液对血瘀型急性脑梗死患者血清 VEGF、MMP-9、EPCs 水平的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(11): 2373-2378.
- [11] 周峰. 灯盏花素注射液治疗急性脑梗死 30 例 [J]. 河南中医, 2015, 35(9): 2095-2096.
- [12] 黄振坚,何世安,雷斌. 急性脑梗死灯盏花、芎嗪注射液联合血管通治疗的临床分析 [J]. 中药材, 2014, 37(6): 1110-1113.
- [13] PAN E, ZHAO W, ZHANG X, et al. Scutellarin alleviates interstitial fibrosis and cardiac dysfunction of infarct rats by inhibiting TGF $\beta$ 1 expression and activation of p38-MAPK and ERK1/2 [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162(3): 688-700.
- [14] Virginia Hernandez-Gea, Scott L. Friedman. Pathogenesis of Liver Fibrosis [J]. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2011, (6): 425-456.
- [15] Zhiwen Fan, Chenzhi Hao, Min Li, et al. MKL1 is an epigenetic modulator of TGF- $\beta$  induced fibrogenesis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1849 (9): 1219-1228.
- [16] Ming-Yi Xu, Jun-Jie Hu, Jie Shen, et al. Stat3 signaling activation crosslinking of TGF- $\beta$ 1 in hepatic stellate cell exacerbates liver injury and fibrosis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1842 (11): 2237-2245.
- [17] Ling Fang, Cheng Huang, Xiaoming Meng, et al. TGF- $\beta$ 1 elevated TRPM7 channel regulates collagen expression in hepatic stellate cells via TGF- $\beta$ 1/Smad pathway [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 280 (2): 335-344.
- [18] Jin Won Yang, Tran Thi Hien, Sung Chul Lim, et al. Pin1 induction in the fibrotic liver and its roles in TGF- $\beta$ 1 expression and Smad2/3 phosphorylation [J]. *Journal of Hepatology*, 2014, 60(6): 1235-1241.
- [18] Y. Jiang, C. Wang, Y. Y. Li, et al. Mistletoe alkaloid fractions alleviates carbon tetrachloride- induced liver fibrosis through inhibition of hepatic stellate cell activation via TGF- $\beta$ /Smad interference [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158Pt A: 230-238.
- [20] Lingyuan Xu, Ni Zheng, Qiaoling He, et al. Puerarin, isolated from *Pueraria lobata* (Willd.), protects against hepatotoxicity via specific inhibition of the TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway, thereby leading to anti-fibrotic effect [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(13): 1172-1179.
- [21] J. H. Lee, E. J. Jang, H. L. Seo, et al. Sauchinone attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 224C: 58-67.

(收稿日期: 2016-01-21)

(本文编辑: 韩虹娟)