

肝宁方含药血清对人肝星状细胞增殖及凋亡的影响

银艳桃¹, 王建超¹, 廖娟¹, 玉叶¹, 朱朝阳², 邓鑫^{1,2*} (1.广西中医药大学, 南宁 530000; 2.广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

摘要: 目的 研究肝宁方含药血清对人肝星状细胞(HSC-LX2)增殖及凋亡的影响。方法 40只SD大鼠随机分为4组, 每组10只, 空白对照组与TGF- β 1组SD大鼠给予生理盐水灌胃, TGF- β 1+肝宁方组及肝宁方组SD大鼠给予肝宁方灌胃给药($7\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 连续灌胃10d后取血离心, 制备干燥血清粉末备用。将HSC-LX2分为空白对照组、TGF- β 1组、TGF- β 1+肝宁方组及肝宁方组。根据分组加入相应的20%大鼠血清对HSC-LX2进行培养造模。CCK8检测各组HSC-LX2细胞增殖率; 流式细胞术检测各组HSC-LX2细胞的周期和细胞凋亡; qRT-PCR以及Western blotting分别检测各组 α -SMA、Samd2、Samd3、Samd4、Samd7 mRNA及蛋白的表达。结果 CCK8结果显示, TGF- β 1+肝宁方组及肝宁方组HSC-LX2增殖受到抑制; 流式细胞术结果显示, TGF- β 1+肝宁方组及肝宁方组HSC-LX2周期停滞在G0/G1期并能促进细胞凋亡; qRT-PCR及Western blotting结果显示, TGF- β 1+肝宁方组及肝宁方组 α -SMA、Samd2、Samd3、Samd4 mRNA及蛋白的表达受到抑制, Samd7 mRNA及蛋白的表达增强。结论 肝宁方具有抑制HSC-LX2增殖、促进HSC-LX2凋亡的作用, 其作用与调控TGF- β 1/Samd信号通路相关。

关键词: 肝宁方; 肝星状细胞; 增殖; 凋亡; TGF- β 1/Samd

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)03-0269-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.03.003

引用本文: 银艳桃, 王建超, 廖娟, 等. 肝宁方含药血清对人肝星状细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(3): 269-274.

Effect of Ganning Formula on Proliferation and Apoptosis of Human Hepatic Stellate Cells

YIN Yantao¹, WANG Jianchao¹, LIAO Juan¹, YU Ye¹, ZHU Chaoyang², DENG Xin^{1,2*} (1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China; 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of Ganning formula on proliferation and apoptosis of human hepatic stellate cells(HSC-LX2). **METHODS** Forty SD rats were randomly divided into 4 groups, 10 in each group. The blank control group and the TGF- β 1 group were given normal saline gavage, and the TGF- β 1+Ganning formula group and Ganning formula group were given gavage($7\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). HSC-LX2 was divided into blank control group, TGF- β 1 group, TGF- β 1+Ganning formula group and Ganning formula group. The corresponding rat serum was added to the corresponding groups according to the data for the culture and modeling of HSC-LX2. The proliferation of HSC-LX2 cells in each group was detected by CCK8. Flow cytometry was used to detect the cell cycle and apoptosis of HSC-LX2 cells in each group. The mRNA and protein expressions of α -SMA, Samd2, Samd3, Samd4 and Samd7 were detected by qRT-PCR and Western blotting. **RESULTS** The results of CCK8 showed that the proliferation of HSC-LX2 was inhibited in the serum group containing Ganning formula. The results of flow cytometry showed that the cycle of HSC-LX2 in the G0/G1 phase of the serum group containing Ganning formula was stagnated and cell apoptosis was promoted. qRT-PCR and Western blotting results showed that the mRNA and protein expressions of α -SMA, Samd2, Samd3 and Samd4 were inhibited and the mRNA and protein expressions of Samd7 were enhanced. **CONCLUSION** Ganning formula can inhibit the proliferation of HSC-LX2 and promote the apoptosis of HSC-LX2, which may be related to the regulation of TGF- β 1/Samd signaling pathway.

KEYWORDS: Ganning formula; hepatic stellate cells; proliferation; apoptosis; TGF- β 1/Samd

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX10303501); 国家自然科学基金项目(81860790, 81360532); 广西医疗卫生适宜技术与开发项目(S201503); 广西研究生教育创新课题(xjyb151)

作者简介: 银艳桃, 女, 硕士生 Tel: 18376705536 E-mail: funnynpc@163.com *通信作者: 邓鑫, 男, 博士, 主任医师, 教授 Tel: (0771)2238038 E-mail: dx8849@163.com

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)属于慢性肝细胞损伤的伤口愈合反应,包括肝内结缔组织非典型增生和肝窦周围细胞外基质蛋白(extracellular matrix, ECM)过度沉淀的病理过程。导致 HF 形成的因素很多,例如病毒、药物、酒精、毒素、胆汁淤积、代谢紊乱及脂肪变性等^[1]。这些因素的持续存在,是维持不同肝细胞群之间发生相互作用释放炎症因子、生长因子、趋化因子以及血管活性剂等介质并激活肝星状细胞的关键^[2]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)活化后 ECM 和 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)合成增加,并向肌成纤维细胞样细胞转化,导致 HF 发生^[3]。如果抑制 HSC 增殖、诱导 HSC 凋亡,可以延缓甚至逆转 HF^[4]。

转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是作用极强的促纤维化因子,主要通过 Smad 信号通路调控 HSC 的活化增殖,影响纤维化的进展^[5]。Smad 蛋白作为 TGF- β 1 的胞内信号转导分子,主要分为受体型(Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8)、通用型(Smad4)和抑制型(Smad6、Smad7) 3 类蛋白^[6]。肝宁方是广西中医药大学附属瑞康医院全国名老中医蓝青强教授的经验方,由黄芪、白术、白芍、柴胡、葫芦茶、猛老虎等组成。前期研究证明该方具有调控肝细胞内质网葡萄糖-6-磷酸酶、细胞色素 P450 酶、N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶 V 等作用,并具有减少甘油三酯、胆固醇的脂肪沉积,修正内质网蛋白折叠功能,减轻内质网应激损伤,保护肝细胞抗 HF 的作用^[7-9]。本研究旨在观察肝宁方对 HSC-LX2 的增殖、凋亡的影响,探讨 TGF- β 1/Samd 信号通路在肝宁方的作用下对 HSC 生物活性的调控。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及细胞 8 周龄 SPF 级 SD 大鼠 40 只,♂,体质量 180~240 g,购自卡文斯实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(苏)2016-0010;动物合格证号:201806127。人肝星状细胞 HSC-LX2(无锡菩禾)。

1.1.2 药品及试剂 肝宁方组成:黄芪 15 g、白术 20 g、白芍 15 g、柴胡 10 g、葫芦茶 10 g、猛老虎 10 g、鳖甲 10 g、泽兰 10 g、当归 10 g、茵陈 15 g 以及赤芍 15 g。DMEM 高糖培养基(广州展

晨生物有限公司,批号:17112);青霉素-链霉素溶液(批号:BL505A)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号:BL521A)均购自广州赛国生物有限公司;10%FBS(批号:16000-044)、Trizol(批号:16000-047)、蛋白预染 Marker(批号:1600-053)、SYBRGreen PCR 试剂盒(批号:F-415XL)、逆转录试剂盒(批号:K1622)均购自美国 Thermo 公司;PI(批号:C1052)、0.25%胰蛋白酶(批号:C0077)均购自碧云天; α -SMA(批号:ab5612)、TGF- β 1(批号:ab5613)、Samd2(批号:ab5614)、Samd3(批号:ab5615)、Samd4(批号:ab5616)、Samd7(批号:ab5617)抗体均购自北京博奥森生物有限公司。75%乙醇(无锡展望,批号:1119227);DEPC 处理水(批号:3035562)、PBS 磷酸盐缓冲液(批号:4000130)均购自无锡菩禾;氯仿/异丙醇/无水乙醇(批号:180708,180962,180215)、30%丙烯酰胺(批号:180601)、1.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl 电泳缓冲液(批号:180375)、1.0 mol·L⁻¹ Tris-HCl 电泳缓冲液(批号:180524)、4×蛋白上样缓冲液(批号:180116)均购自上海国药;PVDF 膜(上海根生生物有限公司,批号:H0010)。

1.1.3 仪器 MK3 酶标检测仪、细胞培养箱(美国 Thermo 公司);TD5M-WS 低速离心机(上海卢湘仪器);BD-C6 流式细胞仪(BD Bioscience);3K30 低温冷冻离心机(美国 Sigma 公司);7500 Real-time 检测仪(罗氏诊断产品有限公司);1658001 电泳仪、5300 一体式化学发光成像仪(美国 Bio-Rad 公司);IX53 倒置拍照显微镜(美国 Leica 公司);PS-9 电转仪(大连竞迈科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 含药血清制备 40 只 SD 大鼠置于环境温度 20~24 °C、湿度 40%~50%、白昼/黑暗交替 12 h 适应性饲养 1 周后进行后续实验。TGF- β 1+肝宁方组及肝宁方组大鼠给予肝宁方灌胃,按成人体质量 60 kg 每天服用 400 mL 汤药计算,大鼠给药量为 7 mL·kg⁻¹·d⁻¹;空白对照组、TGF- β 1 组大鼠给予等量生理盐水灌胃;连续灌胃 10 d 后经腹主动脉取血,离心血液并取上清液过滤除菌,-50 °C 真空条件制备干燥血清粉末,将血清粉末置于-80 °C 冰箱冷冻保存备用。

1.2.2 CCK8 摸索肝宁方含药血清浓度 将 HSC-LX2 分为 HSC-LX2 组、HSC-LX2+10%肝宁方含药血清组、HSC-LX2+20%肝宁方含药血清

组、HSC-LX2+30%肝宁方含药血清组、HSC-LX2+40%肝宁方含药血清组。按照分组给药不同浓度的血清处理 24 h 后,显微镜拍照观察细胞状态。MTT 检测试验结果发现,10%的肝宁方含药血清对 HSC-LX2 的抑制率为 9.32%,20%的肝宁方含药血清对 HSC-LX2 的抑制率为 28.26%,30%的肝宁方含药血清对 HSC-LX2 的抑制率为 36.05%,40%的肝宁方含药血清对 HSC-LX2 的抑制率为 42.61%。肝宁方含药血清浓度越高,对细胞的损伤越大,本实验选取 20%的肝宁方含药血清作为后续实验的血清浓度。

1.2.3 细胞培养及分组造模 取对数生长期的 HSC-LX2,调整细胞浓度为 $3 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL ,用 DMEM 高糖培养基培养,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱内无血清饥饿培养 24 h。将培养后的 HSC-LX2 分为:空白对照组,加入 20%无药大鼠血清;TGF- β 1 组,加入终浓度 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- β 1 处理 2 h 后,加入 20%无药大鼠血清;TGF- β 1+肝宁方组,加入终浓度 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- β 1 处理 2 h 后,加入 20%肝宁方含药血清;肝宁方组,加入 20%肝宁方含药血清。以上各组 HSC-LX2 在加入相应血清后,继续培养 24 h^[10]。

1.2.4 CCK8 检测 HSC-LX2 增殖 取“1.2.3”项下的各组细胞,每孔加入 15 μL 的 CCK8,避光孵育 4 h;酶标仪 450 nm 波长测出同一时间点 OD 值,根据 OD 值分析细胞增殖变化。

1.2.5 流式细胞术检测 HSC-LX2 周期及凋亡 细胞处理及分组同“1.2.3”项下。用胰酶消化处理后的各组细胞,离心取细胞沉淀,用 PBS 洗涤后离心去 PBS、固定液,加入含有 RNase A 的 PBS 孵育,加入 PI 调整浓度后孵育并离心,取单细胞悬液,进行流式检测。

1.2.6 qRT-PCR 检测 α -SMA、Samd2、Samd3、Samd4 及 Samd7 mRNA 的表达 TRIZOL 法提取各组 HSC-LX2 总 RNA,合成 cDNA 并进行 PCR 扩增。扩增体系:SYBRGreen Mix 12.5 μL ,上下游引物各 0.5 μL ,双蒸水 14.5 μL ,cDNA 模板 2 μL ;扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,40 个循环。实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析。GAPDH 作为内控基因,大鼠相关引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Sequence of PCR primers

基因	引物序列(5', 3')	
	上游	下游
α -SMA	TCCTGACCCTGAAGTA TCCG	ATCTCCAGAGTCCAGC ACAAT
Samd2	CCACTACCAGAGGGTG GAGA	CCTGCTGGGAAATTTG TGTT
Samd3	TTCGCAACAAGGGCAG TCGT	GCCAGGGTGAAGATGA CAGGT
Samd4	GTGGCTGGTCGGAAAG GATT	CCGTGGGTAAGGATGG CTGT
Samd7	GGTGCTCAAGAACTC AAGGAG	AGTAAGGAGGAGGGG GAGACT
GAPDH	ACAGCAACAGGGTGGT GGAC	TTTGAGGGTGCAGCGA ACTT

1.2.7 Western blotting 检测 α -SMA、Samd2、Samd3、Samd4 及 Samd7 蛋白的表达 收集各组 HSC-LX2 蛋白,按照配方制备 PAGE 胶,进行上样、电泳及转膜。一抗:抗体加入封闭液中稀释到所需浓度(1:2 000),与膜孵育过夜。二抗:孵育一抗的膜用 TBST 洗涤。随后根据用量,按 1:2 000 稀释与一抗相对应的二抗,与膜孵育,随后用 TBST 洗涤。使用一体式化学发光仪拍摄照片进行显色。

1.2.8 数据分析 采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析。实验数据资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝宁方对 HSC-LX2 增殖的影响

与空白对照组、TGF- β 1 组比较,TGF- β 1+肝宁方组、肝宁方组 HSC-LX2 的增殖受到抑制($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 肝宁方对 HSC-LX2 增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Effect of Ganning formula on the proliferation of HSC-LX2($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	OD 值	抑制率/%
空白对照组	0.619 $\pm$ 0.021	—
TGF- β 1 组	0.702 $\pm$ 0.030	—
TGF- β 1+肝宁方组	0.559 $\pm$ 0.025 ¹⁾²⁾	9.64
肝宁方组	0.446 $\pm$ 0.020 ¹⁾²⁾	27.95

注:与空白对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与 TGF- β 1 组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with TGF- β 1 group, ²⁾ $P < 0.05$.

2.2 肝宁方对 HSC-LX2 周期的影响

与空白对照组比较,TGF- β 1 组 G0/G1 期百分比降低,S 期、G2/GM 期百分比升高($P < 0.05$);

TGF- β 1+肝宁方组和肝宁方组 G0/G1 期百分比升高, S 期、G2/GM 期百分比降低($P<0.05$)。与 TGF- β 1 组比较, TGF- β 1+肝宁方组和肝宁方组 G0/G1 期百分比升高, S 期、G2/GM 期百分比降低($P<0.05$)。结果见表 3。

表 3 肝宁方对 HSC-LX2 周期的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 3 Effect of Ganning formula on the cycle of HSC-LX2 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$) %

组别	G0/G1 期	S 期	G2/GM 期
空白对照组	43.05 $\pm$ 1.12	47.39 $\pm$ 1.33	8.38 $\pm$ 0.42
TGF- β 1 组	38.53 $\pm$ 1.25 ¹⁾	49.62 $\pm$ 1.10 ¹⁾	11.35 $\pm$ 0.59 ¹⁾
TGF- β 1+肝宁方组	47.39 $\pm$ 1.33 ¹²⁾	44.71 $\pm$ 1.05 ¹²⁾	8.23 $\pm$ 1.41 ¹²⁾
肝宁方组	57.03 $\pm$ 1.29 ¹²⁾	38.36 $\pm$ 1.35 ¹²⁾	5.45 $\pm$ 0.96 ¹²⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 TGF- β 1 组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with TGF- β 1 group, ²⁾ $P<0.05$ 。

2.3 肝宁方对 HSC-LX2 凋亡的影响

空白对照组、TGF- β 1 组、TGF- β 1+肝宁方组、肝宁方组的 HSC-LX2 凋亡率分别为(6.02 $\pm$ 0.71)%, (4.02 $\pm$ 0.55)%, (16.97 $\pm$ 2.48)%, (41.83 $\pm$ 6.12)%。与空白对照组比较, TGF- β 1 组、TGF- β 1+肝宁方组和肝宁方组差异具有显著性($P<0.05$); 与 TGF- β 1 组比较, TGF- β 1+肝宁方组和肝宁方组差异具有显著性($P<0.05$)。结果见图 1。

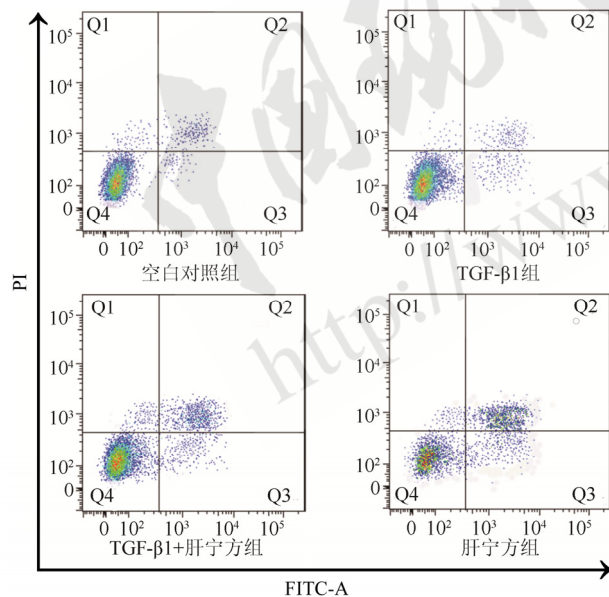


图 1 肝宁方对 HSC-LX2 凋亡的影响

Fig. 1 Effect of Ganning formula on the regulation of apoptosis of HSC-LX2

2.4 肝宁方对 HSC-LX2 的 α -SMA、Samd2、Samd3、Samd4 及 Samd7 mRNA 表达影响

与空白对照组比较, TGF- β 1 组 α -SMA、

Samd2、Samd3 及 Samd4 mRNA 表达水平显著升高, Samd7 mRNA 表达水平显著降低($P<0.01$); TGF- β 1+肝宁方组和肝宁方组 α -SMA、Samd2、Samd3 及 Samd4 mRNA 表达水平显著降低, Samd7 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$)。与 TGF- β 1 组比较, TGF- β 1+肝宁方组和肝宁方组 α -SMA、Samd2、Samd3 及 Samd4 mRNA 表达水平显著降低, Samd7 mRNA 表达水平显著升高($P<0.01$)。结果见图 2。

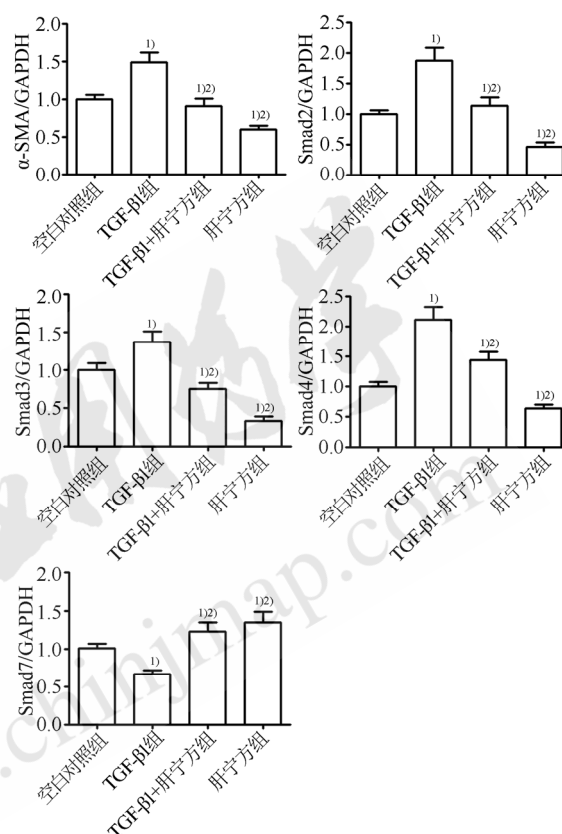


图 2 肝宁方对 HSC-LX2 的 α -SMA、Samd2、Samd3、Samd4 及 Samd7 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 TGF- β 1 组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of Ganning formula on mRNA expression of α -SMA, Samd2, Samd3, Samd4 and Samd7 in HSC-LX2 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Compared with the blank control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with TGF- β 1 group, ²⁾ $P<0.01$ 。

2.5 肝宁方对 HSC-LX2 的 α -SMA、Samd2、Samd3、Samd4 及 Samd7 蛋白表达影响

与空白对照组比较, TGF- β 1 组 α -SMA、Samd2、Samd3 及 Samd4 表达水平显著升高, Samd7 表达水平显著降低($P<0.01$); TGF- β 1+肝宁方组和肝宁方组 α -SMA、Samd2、Samd3 及 Samd4 表达水平显著降低, Samd7 表达水平显著升高($P<0.01$)。与 TGF- β 1 组比较, TGF- β 1+肝宁方组和肝宁方组

α -SMA、Samd2、Samd3 及 Samd4 表达水平显著降低, Samd7 表达水平显著升高($P<0.01$)。结果见图 3。

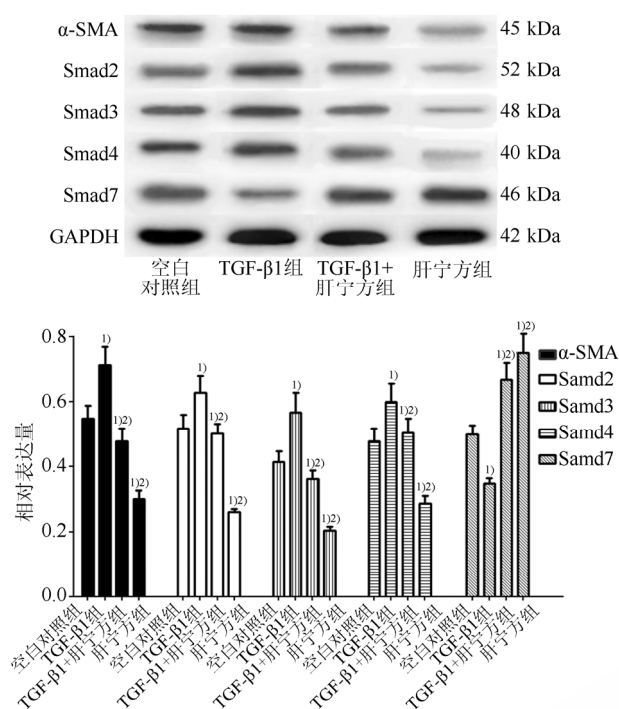


图 3 肝宁方对 HSC-LX2 的 α -SMA、Samd2、Samd3、Samd4 及 Samd7 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 TGF- β 1 组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of Ganning formula on expression of α -SMA, Samd2, Samd3, Samd4 and Samd7 in HSC-LX2 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$) Compared with the blank control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with TGF- β 1 group, ²⁾ $P<0.01$.

3 讨论

HSC 是由 Carl-von Kupffer 在 1876 年发现, 它是肝脏中胶原合成的主要细胞, 其活化、增殖是肝脏纤维化改变的核心环节^[11]。在健康人的肝脏中, 每 100 个肝实质细胞约有 10 个 HSC, 且均处于静止状态^[12]。静止的 HSC 具有维持维生素 A 稳态、维持正常肝细胞外基质合成与降解平衡、调控配体转录、调节肝窦微血管血流以及分泌旁分泌素等作用^[13]。当肝脏受到持续性损伤时, HSC 活化并促进 α -SMA、ECM、弹性蛋白以及多种纤维胶原分泌, 从而发生 HF^[3,14]。其中, α -SMA 过度表达是 HSC 活化最显著的特征之一。本研究发现, 肝宁方含药血清作用于 HSC-LX2 后, 能明显抑制增殖、促使细胞周期停滞在 G0/G1 期并促进凋亡。肝宁方对 HSC-LX2 生物活性的调控, 可以进一步从 α -SMA 的表达体现出来, 在经肝宁方含药血清处理后, α -SMA 的表达显著降低。

TGF- β 1 是促进纤维化进展的重要信号因

子^[5,15]。在活化的 HSC 中, TGF- β 1 型受体易与 Samd2、Samd3 结合并促进活化, 活化后的 Samd2、Samd3 与 Samd4 结合并迁移至核内, 调控相关靶基因转录, 影响 ECM 等基因表达^[6]。Samd7 作为主要的抑制型转导分子, 具有抑制 TGF- β 1/Samd 相关信号通路转导的作用^[16]。本研究发现, 经肝宁方含药血清处理后 Samd2、Samd3 与 Samd4 mRNA 及其蛋白表达水平显著降低, Samd7 mRNA 及其蛋白表达水平显著升高。因此, 肝宁方可能通过上调 Samd7 的表达, 负性调节 TGF- β 1/Samd 相关通路的转导, 抑制 ECM 等基因的表达。

肝宁方由黄芪、白术、白芍、柴胡、葫芦茶及猛老虎等组成, 具有疏肝健脾, 清热利湿等功效。现代研究证明, 方中黄芪、柴胡的有效成分黄芪甲苷、柴胡皂苷 d 均具有抑制 HSC 氧化应激, 保护肝细胞的作用^[17-19]; 白术、白芍的有效成分白术多糖、白芍总苷均具有减轻肝细胞损伤作用^[20-21]; 葫芦茶、猛老虎作为广西壮瑶族民间特色药材, 有清湿热、杀虫毒功效, 有保护肝细胞、抗 HF 作用^[22-23]。前期临床研究亦证明, 肝宁方有减轻肝硬化患者临床症状、降低 HF 指标的作用^[24]。

综上所述, 肝宁方通过调节 TGF- β 1/Samd 信号通路, 发挥抑制 HSC-LX2 增殖、促进 HSC-LX2 凋亡的作用, 从而阻碍 HF 进展。另外, 肝宁方如何调控 TGF- β 1/Samd 信号分子的转录机制仍需进一步研究。

REFERENCES

- [1] FRIEDMAN S L. Liver fibrosis-from bench to bedside [J]. J Hepatol, 2003, 38(1): 38-53.
- [2] NOVO E, CANNITO S, MORELLO E, et al. Hepatic myofibroblasts and fibrogenic progression of chronic liver diseases [J]. Histol Histopathol, 2015, 30(9): 1011-1032.
- [3] AKPOLAT N, YAHSI S, GODEKMERDAN A, et al. The value of α -SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development [J]. Histopathology, 2005, 47(3): 276-280.
- [4] HUANG Y, DENG X, LIANG J. Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis [J]. Exp Cell Res, 2017, 352(2): 420-426.
- [5] FANG L, HUANG C, MENG X, et al. TGF- β 1-elevated TRPM7 channel regulates collagen expression in hepatic stellate cells via TGF- β 1/Smad pathway [J]. Toxicol Appl Pharm, 2014, 280(2): 335-344.
- [6] XU F, LIU C, ZHOU D, et al. TGF/SMAD pathways and its regulation in hepatic fibrosis [J]. J Histochem Cytochem, 2016, 64(3): 157.
- [7] WEN B, LI F Y, CHEN R, et al. Effect of the Ganning formula on the survival signal molecules induced by tunicamycin under endoplasmic reticulum stress [J]. J Med

- Res(医学研究杂志), 2017, 46(11): 62-65.
- [8] LI C Y, WEN B, LI F Y, et al. Effect of Ganning decoction on the mRNA and protein expression levels of GRP78 associated with hepatic endoplasmic reticulum stress [J]. J Chin Gen Pract(中国全科医学), 2017, 20(21): 2644-2648.
 - [9] WEN B, LIANG J, DENG X, et al. Effect of fluid shear stress on portal vein remodeling in a rat model of portal hypertension [J]. Gastroenterol Res Pract, 2015(2015): 545018. Doi: 10.1155/2015/545018.
 - [10] WU H C, LI M, ZHOU Z H, et al. Effects of PI3K/PKB signaling pathway on expression of osteopontin in human hepatic stellate cells induced by transforming growth factor- β 1 [J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2015, 31(1): 93-97.
 - [11] FRIEDMAN S L, ROLL F J, BOYLES J, et al. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver [J]. Pro Natl Acad Sci, 1985, 82(24): 8681-8685.
 - [12] BALLARDINI G, DEGLI ESPOSTI S, BIANCHI F B, et al. Correlation between Ito cells and fibrogenesis in an experimental model of hepatic fibrosis. A sequential stereological study [J]. Liver, 1983, 3(1): 58-63.
 - [13] GEERTS A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells [J]. Semin Liver Dis, 2001, 21(3): 311-335.
 - [14] PELLICORO A, AUCOTT R L, RAMACHANDRAN P, et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase(MMP-12) during experimental liver fibrosis [J]. Hepatology, 2012, 55(6): 1965-1975.
 - [15] PERUMAL N, PERUMAL M, HALAGOWDER D, et al. Morin attenuates diethylnitrosamine-induced rat liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by co-ordinated regulation of Hippo/Yap and TGF- β 1/Smad signaling [J]. Biochimie, 2017(140): 10-19.
 - [16] ZHOU J, ZHONG D W, WANG Q W, et al. Paclitaxel ameliorates fibrosis in hepatic stellate cells via inhibition of TGF- β /Smad activity [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(26): 3330-3334.
 - [17] XU T J, ZHANG Y B, YANG Y, et al. Effects of active component compatibility of Danggui Buxue decoction on oxidative stress and phase-II enzymes in hepatic stellate cell-T6 [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2018, 36(9): 2134-2137.
 - [18] ZHOU Q. Process of the anti-apoptotic mechanism of astragaloside IV [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学杂志), 2017, 34(5): 783-788.
 - [19] LIN L B, QUE R Y, LIU J K, et al. Effect of saikosaponin-d on expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in activated HSC-T6 cells: Underlying mechanism [J]. World Chin J Dig(世界华人消化杂志), 2016, 24(8): 1159-1165.
 - [20] CHE C Y, LI H S, YING H, et al. Research of prevention and treatment function of atractylodes polysaccharides on non-alcoholic steatohepatitis [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2017, 35(7): 1801-1803.
 - [21] YANG Y L, PAN J Q, TAN S Z, et al. Effect of total glucosides of paeony on omentin and TLR4 in liver tissue of NAFLD rat [J]. Pharm Clin Chin Mat Med(中药药理与临床), 2017, 33(3): 62-65.
 - [22] TANG A C, CHEN Z N, LU Q Y, et al. Hepatoprotective effects of tadehaginocide on caspase-3 and caspase-8 activity of hepatic tissues of rats with acute hepatic injury [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2017, 35(3): 689-692.
 - [23] CHEN S F, HUANG L Y, ZHONG M, et al. Effects of Yao nationality herb named "MengLaoHu" on PCIII, LN, HA, IFN- γ and TNF- α in immunity hepatic fibrosis in rats immunity hepatic fibrosis in rats [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2008(8): 1813-1815.
 - [24] DENG X, LIANG J, WU F S, et al. Effects of the Ganning formula on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B [J]. J Tradit Chin Med, 2011, 31(4): 282-287.

收稿日期: 2019-05-09

(本文责编: 沈倩)