

• 研究论文 •

Pepstatin Pr 通过 YAP-TGF β -Smad 通路发挥体外抗肝纤维化作用

牛伟晓, 陈明华, 张 娜, 葛茂旭, 鲍云洋, 司书毅, 邵荣光, 何红伟*

(中国医学科学院、北京协和医学院, 医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 肝纤维化是各种慢性因素引起的肝脏损伤后组织修复代偿反应, 其进一步恶化会导致肝硬化、肝功能衰竭甚至是肝细胞癌。肝星状细胞的异常活化是肝纤维化发生发展的细胞学基础。化合物 pepstatin Pr 是从链霉菌 CICC 202950 中分离得到的 pepstatin A 衍生物。本实验目的在于研究 pepstatin Pr 的抗肝纤维化活性并探索其分子机制。通过给予 TGF β 1 诱导人肝星状细胞 LX-2 活化并进行不同浓度的 pepstatin Pr 处理后, 应用磺酰罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB) 比色法检测 pepstatin Pr 对 LX-2 细胞的细胞毒性, 应用 real time PCR 和 Western blot 方法检测 pepstatin Pr 对 COL1A1、 α -SMA、组织蛋白酶 D (cathepsin D)、TGF β 、Smad 以及 YAP/TAZ 蛋白表达与磷酸化水平的影响。结果显示 pepstatin Pr 对 LX-2 细胞无明显细胞毒性, 并且可显著降低肝纤维化标志物 COL1A1 及 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达, 同时在蛋白水平上抑制 cathepsin D、TGF β 1、YAP 和 TAZ 的表达, Smad2 的磷酸化水平, 以及 YAP 核转位。综上, pepstatin Pr 可通过调控 YAP-TGF β -Smad 通路抑制由 TGF β 1 诱导的肝星状细胞活化, 具有良好的体外抗肝纤维化活性。

关键词: 肝纤维化; 组织蛋白酶 D; TGF β -Smad; YAP/TAZ

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)01-0089-06

Pepstatin Pr show anti-fibrosis effect related to YAP-TGF β -Smad pathwayNIU Wei-xiao, CHEN Ming-hua, ZHANG Na, GE Mao-xu, BAO Yun-yang, SI Shu-yi,
SHAO Rong-guang, HE Hong-wei*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,
Beijing 100050, China)

Abstract: Liver fibrosis is a tissue repair compensatory response to liver injury caused by various chronic factors, ultimately leading to liver cirrhosis, liver failure and even hepatocellular carcinoma. Abnormal activation of hepatic stellate cells is the cellular basis of liver fibrosis development. Pepstatin Pr, the derivative of pepstatin A, was isolated from *Streptomyces* sp. CICC 202950. Our purpose was to investigate the anti-fibrotic activity of pepstatin Pr and explore its molecular mechanism. Hepatic stellate cell LX-2 was stimulated by TGF β 1 and subsequently treated with pepstatin Pr. Its cytotoxicity was detected by sulforhodamine B (SRB) assay. The expression of COL1A1, α -SMA and cathepsin D, signaling proteins TGF β , Smad and YAP/TAZ were detected by Western blot or real-time PCR. The results showed that pepstatin Pr was not cytotoxic to LX-2 cells. And pepstatin Pr significantly reduced the mRNA and protein expression of COL1A1 and α -SMA, which are important liver fibrosis markers. Pepstatin Pr also repressed the protein expression level of cathepsin D, TGF β 1, YAP/TAZ, the phosphorylation level of Smad2, and YAP nuclear translocation. In conclusion, pepstatin Pr exhibits anti-fibrotic effects in TGF β 1-stimu-

收稿日期: 2018-08-03; 修回日期: 2018-10-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673497); 北京市自然科学基金资助项目 (7162130); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助 (2016-12M-2-002); 协和青年科研基金资助项目 (3332015134).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-83166673, E-mail: hehwei@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0705

laed LX-2 cells by mediating YAP-TGF β -Smad pathway.

Key words: liver fibrosis; cathepsin D; TGF β -Smad; YAP/TAZ

慢性肝脏疾病严重危害人类健康, 纤维化是继发于各种慢性因素引起的肝脏损伤和炎症后组织修复过程中的代偿反应, 肝纤维化的进一步发展会导致肝硬化、肝功能衰竭和肝癌^[1]。研究发现, 肝纤维化是一种可逆性病变, 如果能在这一阶段给予有效的治疗, 对慢性肝炎的治疗、肝硬化及肝癌等严重致死性疾病的预防具有重要的意义^[2]。

目前认为活化的肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 是肝纤维化发生时细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的主要来源, 而转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF β 1) 是导致肝纤维化的最重要的细胞因子之一^[3]。TGF β 1 信号通路在启动并促进 HSC 活化过程中发挥重要作用, 此外还可促进胶原 (collagen) 的合成以及 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 组成以及应力纤维形成^[4,5]。外源的 TGF β 1 可以激活肝星状细胞 LX-2 并且导致肝纤维化相关基因的大量表达, 如 TGF β 、collagen、MMP 等。TGF β -Smad 通路是自激活通路, 通路激活后产生更多的 TGF β , 使该通路以及星状细胞维持在激活状态^[4]。Hippo 通路被公认为是肝脏发育的重要调节通路, 其通路下游主要的效应分子 Yes 相关蛋白 (yes-associated protein, YAP) 在肝星状细胞活化早期就会被激活^[6]。Hippo 通路和 TGF β -Smad 通路密切相关^[7], YAP 不仅可以与 TGF β -Smad 通路中的 Smad2/3/4 复合体相互作用, 激活下游关键转录因子, 促进 ECM 的沉积^[8,9], 而且 YAP 易位到细胞核后, 与转录因子 TEAD 1~4 相互作用, 促进下游靶基因结缔组织因子 (connective tissue grow factor, CTGF)、SPPI 和 TGF β 等基因的表达, TGF β 1 的表达增多, 又会进一步促进细胞纤维化程度^[10]。

化合物 pepstatin Pr (图 1) 是 pepstatin A 的衍生物, 由本所陈明华副研究员从链霉菌 CICC 202950 的大

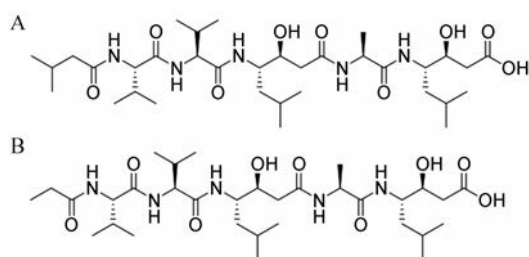


Figure 1 The structures of pepstatin A (CAS: 26305-03-3, A) and pepstatin Pr (CAS: 50655-19-1, B)

米发酵产物中分离得到^[11]。Pepstatin A 作为天冬氨酸蛋白酶抑制剂, 可以抑制胃蛋白酶、肾素、组织蛋白酶 D (cathepsin D) 等天冬氨酸蛋白酶。cathepsin D 是组织蛋白酶家族中必需的天冬氨酸蛋白酶, 可以调节多种过程, 包括细胞生长、肿瘤生物学和组织稳态^[12]。最近的数据显示, cathepsin D 也参与肝损伤和纤维发生^[13]。

材料与方 法

试剂与仪器 CO₂培养箱 (Thermo 公司); 单功能化学发光酶标仪 SpectraMaxRL (Molecular Devices 公司); 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems 公司); 化学发光仪 (上海 Tanon 公司)。DMEM 高糖培养基、Trizol (Invitrogen 公司); 胰酶、PBS (中科迈晨 (北京) 科技有限公司); Bright-Glo 单荧光素酶测定试剂盒 (Promage 公司); 脱脂奶粉 (OXOID 公司); PVDF 膜、化学发光液 (Millipore 公司); RNA 纯化试剂盒 Nucleospin RNA Clean-up (Macherey - Nagel 产品); 胞浆核提取试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司); 逆转录试剂盒、Fast Start Universal Probe Master (ROX) (Roche 公司); Taqman 探针 ACTA2 (表达 α -SMA 的基因)、COL1A1 (Thermo Fisher 公司); COL1A1 抗体、 α -SMA 抗体、TGF β 1 (Abnova 公司); GAPDH、cathepsin D、p-Smad2 (S465/467)、Smad2 (Cell Signaling Technology 公司); Second antibody (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

磺酰罗丹明 B (SRB) 比色法 将处于对数生长期的 LX-2 细胞以 1.5×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板, 细胞贴壁后, 将完全培养基更换为无血清培养基, 24 h 后加药, 分别设置空白对照组、TGF β 1 ($2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 诱导组、以及含有 TGF β 1 ($2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 pepstatin Pr (50 、 100 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的无血清培养基, 每个浓度设 4 个复孔, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 条件下培养, 24 h 后加入三氯乙酸 (TCA) $50 \mu\text{L}$ 固定细胞, 1 h 后弃固定液, 蒸馏水清洗并干燥后, 加 SRB 溶液染色, 用 $1\% \text{ 醋酸}$ 洗涤晾干后, 每孔加入 $150 \mu\text{L}$ Tris-HCl 溶解, 于波长 515 nm 处测定 OD 值。

单荧光素酶 稳定表达 COL1A1 启动子的单克隆细胞株 (LX-2-COL 细胞) 于 DMEM 培养基、 $5\% \text{ CO}_2$ 恒温 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养, 待细胞汇合度至 $90\% \sim 95\%$ 时, 以 1.5×10^4 个/孔将细胞铺至 96 孔板中, 细胞贴壁后加入梯度浓度的 pepstatin Pr, 加药 24 h 后, 吸弃原培养基, PBS 洗 1 次, 使用 Bright-Glo 单荧光素酶测定

试剂盒测定荧光值。

Real-time PCR 取对数生长期的 LX-2 细胞铺于 6 孔板中, 每孔细胞数为 2×10^5 个, 细胞贴壁后, 将完全培养基更换为无血清培养基, 24 h 后加 TGF β 1 诱导同时加药, 即分别更换为无血清培养基、含有 TGF β 1 ($2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 或含有 TGF β 1 ($2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 pepstatin Pr (20 、 40 和 $80 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的无血清培养基, 继续于 5% CO_2 恒温 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养 24 h。采用 Trizol 法提取细胞的总 RNA, 并使用 RNA 纯化试剂盒进行纯化。纯化后的 RNA 使用 Roche 公司的逆转录试剂盒合成 cDNA, 以得到的 cDNA 为模板, 采用 Roche 公司的 FastStart Universal Probe Master (ROX) 进行 real-time PCR 反应。

Western blot 细胞处理同 real-time PCR, 收取蛋白样品加入上样缓冲液, 或根据胞浆核提取试剂盒说明书分别提取浆蛋白和核蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 采用湿转的方法将蛋白转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 孵育一抗于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床过夜, 然后 PBST 洗 3 次, 加入相应的二抗, 室温孵育 2 h, 弃去二抗, PBST 洗 3 次, 将化学发光液 A 液和 B 液 1:1 混合, 加到膜上, 采用化学发光仪进行图像采集。

统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Image J 软件进行灰度扫描, GraphPad Prism 5 软件对数据进行分析和作图, 两样本均数比较采用 t 检验, 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学显著性差异。

结果

1 化合物 pepstatin Pr 对 LX-2 细胞存活的影响

SRB 方法检测不同浓度的 pepstatin Pr (50 、 100 和 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用于无血清及 TGF β 1 诱导处理后 24 h 的 LX-2 细胞, 没有表现出细胞毒性, 结果表明, pepstatin Pr 在 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之内对体外培养的 LX-2 细胞无细胞毒性 (图 2), 为后续研究的药物浓度确定提供了一定的依据。

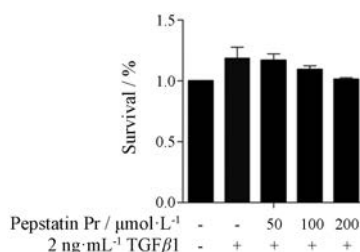


Figure 2 The viability of LX-2 cells was analyzed by sulforhodamine B assay after pepstatin Pr treatment. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2 化合物 pepstatin Pr 在体外对肝纤维化标志物的抑制作用

本研究应用基于 COL1A1 启动子的高通量抗肝纤维化筛选模型^[14], 采用单荧光素酶基因报告检测系统检测不同浓度的 pepstatin Pr (3 、 20 、 50 和 $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及阳性对照 $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 对 LX-2-COL1A1 细胞中 COL1A1 启动子活性的影响^[15], 结果表明, 不同浓度的 pepstatin Pr 能够显著抑制 COL1A1 启动子的活性, 20 和 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pepstatin Pr 的抑制率分别为 56.05% 和 62.39% , 阳性对照 $25 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 的抑制率为 61.58% , 相比于空白对照组均能够显著抑制 COL1A1 启动子的活性 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (图 3A)。Real-time PCR 和 Western blot 结果显示, pepstatin Pr 处理由 TGF β 1 诱导的 LX2 细胞 24 h 后, 能够浓度依赖性地抑制肝纤维化标志物 COL1A1 以及 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达水平 (图 3B~D), 并且具有时间依赖性 (图 3E)。

3 化合物 pepstatin Pr 抑制 cathepsin D 的蛋白表达水平

采用 Western blot 方法检测化合物 pepstatin Pr 在 LX-2 细胞中对 cathepsin D 蛋白表达的影响, 结果显示, 加入 TGF β 1 诱导后, pro-cathepsin D 以及 cathepsin D 的表达水平无明显变化, 而加入不同浓度的化合物 pepstatin Pr 作用 24 h 后, cathepsin D 蛋白表达明显降低, 证明 pepstatin Pr 作为 pepstatin A 的衍生物, 可以抑制 cathepsin D 的蛋白表达水平 (图 4)。

4 化合物 pepstatin Pr 通过 YAP-TGF β -Smad 通路发挥抗肝纤维化作用

肝纤维化发生过程中, 多种促炎、促纤维化因子以自分泌和旁分泌的形式作用于 HSC, 使其发生活化和表型转化, 具备增殖、纤维形成、收缩反应和趋化性等特性, 其中 TGF β 1 是促进肝纤维化的关键细胞因子, 加入外源 TGF β 1 可诱导 LX2 细胞活化, 而在 HSC 活化的早期, Hippo 通路下游主要的效应分子 YAP 激活并调节基因的表达。研究表明, YAP 的抑制会导致 TGF β 表达降低, 从而抑制下游 Smad 复合物的活性^[8,16,17]。在 LX2 细胞中, 加入 TGF β 1 诱导同时加 pepstatin Pr 作用 24 h 后, 采用 Western blot 方法检测化合物 pepstatin Pr 对 YAP 及其旁系同源蛋白 PDZ 结合域转录共激活因子 (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ) 的表达, 结果显示, 化合物 pepstatin Pr 能够抑制 LX-2 细胞中 YAP、TAZ、CTGF 的蛋白表达水平 (图 5A、B)。检测细胞浆和细胞核蛋白显示, 相比于 TGF β 1 诱导组, 化合物 pepstatin Pr 作用后, 也分别降低了胞浆和胞核中 YAP 的蛋白水平 (图 5C)。化合物 pepstatin Pr

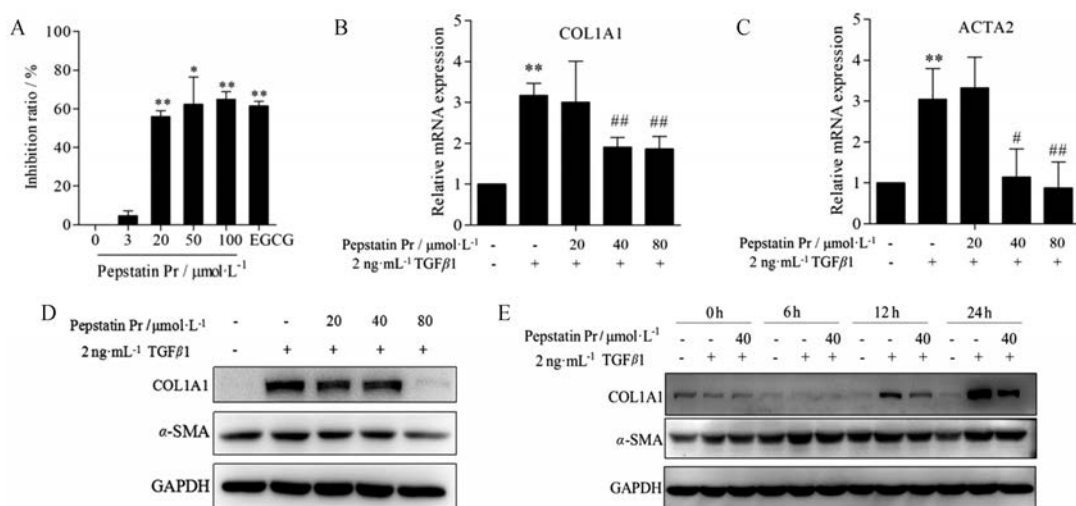


Figure 3 Pepstatin Pr inhibited fibrogenesis genes expression in LX-2 cells. A: Pepstatin Pr significantly inhibited *COL1A1* promoter activity in LX-2 cells, data were analyzed by Bright-Glo luciferase assay system. B-E: Data were analyzed by real-time PCR and Western blot assay. The mRNA/protein expression levels were normalized against GAPDH. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs TGF β 1 group

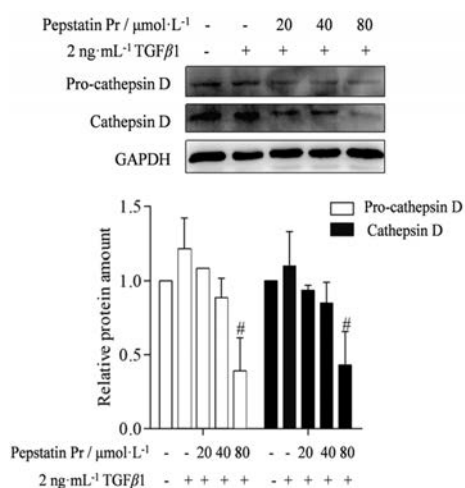


Figure 4 Pepstatin Pr inhibited the expression of cathepsin D in LX-2 cells. Data were analyzed by Western blot assay and the protein expression levels were normalized against GAPDH. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$ vs TGF β 1 group

能够抑制 LX-2 细胞中 TGF β 1 及 p-Smad2 的蛋白表达水平 (图 5D), 表明 pepstatin Pr 可以通过调控 YAP-TGF β -Smad 通路抑制由 TGF β 1 诱导的肝星状细胞活化。

讨论

Pepstatin A 作为天冬氨酸蛋白酶抑制剂, 可以抑制胃蛋白酶、肾素、cathepsin D 等天冬氨酸蛋白酶, 研究发现 pepstatin A 不仅与肾和心肌纤维化相关, 与肝纤维化也有一定的联系^[16,17]。本研究在筛选中发现化合物 pepstatin Pr 对 *COL1A1* 启动子具有良好的抑制作用, 进而探讨了 pepstatin Pr 在人肝星状细胞 LX-2 中的

抗肝纤维化效果。

转化生长因子 β (TGF β) 是慢性肝脏病最重要的细胞因子, 作用于从最初的肝损伤到炎症和纤维化, 再到肝硬化和肝细胞癌的各个阶段。肝损伤诱导的 TGF- β 水平和活性增强, 肝细胞破坏并介导肝脏星状细胞和成纤维细胞活化, 产生肌成纤维细胞和细胞外基质过度沉积^[4]。TGF- β 1 诱导肌成纤维细胞标志物 α -SMA 和 CTGF 的转录激活^[18]。Smad 蛋白家族是 TGF- β 1 关键的下游信号, 包括膜受体激活 Smads (Smad1、2、3、5、8)、通用 Smad (Smad4) 及抑制性 Smads (Smad6、7) 三大类^[4]。静息 HSC 会通过 Smad 活化响应 TGF- β 诱导, 而肌成纤维细胞通过自分泌 TGF- β 信号传导完全刺激并显示出强烈的内在 R-Smad 活化。YAP 是 Hippo 通路的关键节点蛋白, 在肝脏发育^[10]、肝纤维化^[8] 以及肝癌^[6] 的发生发展有重要调节作用, YAP 去磷酸化入核后, 可以与其他转录因子相互作用, 促进下游靶基因 CTGF、TGF β 1 等的表达。YAP 活化是肝星状细胞活化的关键驱动因素, 抑制 YAP 是治疗肝纤维化的一种新方法。Western blot 结果显示, 化合物 pepstatin Pr 能够抑制 LX-2 细胞中 YAP 及其旁系同源物 TAZ 及其下游 CTGF、蛋白表达水平, 并抑制 Smad2 的磷酸化水平, 表明 Pepstatin Pr 的体外抗肝纤维化作用可能与 YAP-TGF β -Smad 通路相关。

最近的数据显示, cathepsin D 也参与肝损伤和纤维发生^[13]。如在实验性纤维发生和肝硬化和肝细胞癌的临床患者中观察到 cathepsin D 激活^[19]。Kristensen 等^[20] 通过蛋白质组学分析发现, HSC 活化期间 cathepsin D

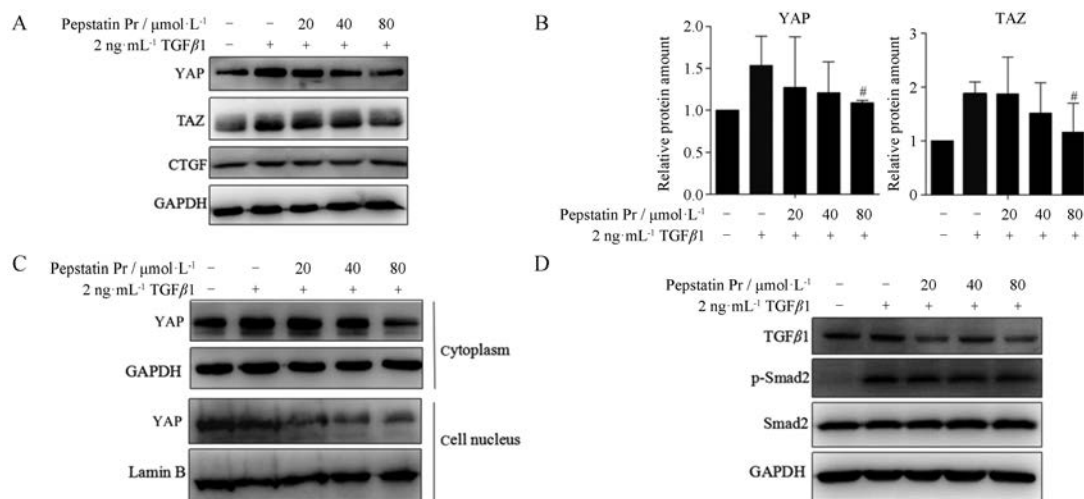


Figure 5 Pepstatin Pr showed its anti-fibrosis effect relating to Hippo and TGF β -Smad pathway in LX2 cells induced by TGF β 1. Pepstatin Pr inhibited the expression of YAP and TAZ (A-C), TGF β 1 and p-Smad2 (D) in LX-2 cells and the protein expression levels were normalized against GAPDH. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$, # $P < 0.05$ vs TGF β 1 group. YAP: Yes-associated protein; TAZ: Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif

的表达上调。此外, Moles 等^[21]发现 cathepsin D 在 HSC 活化中起关键作用, 促进其纤维化潜能, 表明抑制 cathepsin D 的表达可能与肝纤维化的治疗有关。目前文献^[12]表明, 联合治疗可以通过下调 cathepsin D 来调节 HSC 活化的持续期, 从而抑制 ECM 的广泛积累, 这是调节纤维化潜能和抑制肝纤维化的关键步骤。本研究发现, 化合物 pepstatin Pr 作为 pepstatin A 的衍生物, 能够显著地下调 pro-cathepsin D 以及 cathepsin D 的蛋白表达水平, 说明 pepstatin Pr 可以通过下调 cathepsin D 发挥体外抗肝纤维化作用。

综上所述, 化合物 pepstatin Pr 能够抑制 LX-2 细胞中肝纤维化标志物的表达, 其体外抗肝纤维化作用可能与其下调 cathepsin D 的蛋白水平, 进而抑制 YAP-TGF β -Smad 信号通路相关。

References

- [1] Torok NJ. Recent advances in the pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis [J]. *J Gastroenterol*, 2008, 43: 315-321.
- [2] Trappoliere M, Caligiuri A, Schmid M, et al. Silybin, a component of silymarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells [J]. *J Hepatol*, 2009, 50: 1102-1111.
- [3] Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10: 76-99.
- [4] Dooley S, ten Dijke P. TGF- β in progression of liver disease [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347: 245-256.
- [5] Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, et al. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125: 178-191.
- [6] Mannaerts I, Leite SB, Verhulst S, et al. The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation [J]. *J Hepatol*, 2015, 63: 679-688.
- [7] Ge M, Liu H, Zhang Y, et al. The anti-hepatic fibrosis effects of dihydrotanshinone I are mediated by disrupting the Yes-associated protein and transcriptional enhancer factor D2 complex and stimulating autophagy [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174: 1147-1160.
- [8] Zhang H, von Gise A, Liu Q, et al. Yap1 is required for endothelial to mesenchymal transition of the atrioventricular cushion [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 18681-18692.
- [9] Narimatsu M, Labibi B, Wrana JL, et al. Analysis of Hippo and TGF β signaling in polarizing epithelial cells and mouse embryos [J]. *Differentiation*, 2016, 91: 109-118.
- [10] Wang C, Zhang L, He Q, et al. Differences in Yes-associated protein and mRNA levels in regenerating liver and hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5: 410-414.
- [11] Chen MH, Chang SS, Dong B, et al. Ahmpatinin iBu, a new HIV-1 protease inhibitor, from *Streptomyces* sp. CCCC 202950 [J]. *RSC Adv*, 2018, 8: 5138-5144.
- [12] Cao W, Li Y, Li M, et al. Txn1, Ctsd and Cdk4 are key proteins of combination therapy with taurine, epigallocatechin gallate and genistein against liver fibrosis in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 611-619.
- [13] Gohda E, Nagahama J, Nakamura O, et al. Increased activities of liver cathepsins T and D in carbon tetrachloride-treated rats [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 802: 362-371.
- [14] Zhao SS, Wang JX, Wang YC, et al. Establishment and application of a high-throughput drug screening model based on *COL1A1* promoter for anti-liver fibrosis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 169-173.
- [15] Yu DK, Zhang CX, Zhao SS, et al. The anti-fibrotic effects of

- epigallocatechin-3-gallate in bile duct-ligated cholestatic rats and human hepatic stellate LX-2 cells are mediated by the PI3K/Akt/Smad pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36: 473-482.
- [16] Moles A, Tarrats N, Morales A, et al. Acidic sphingomyelinase controls hepatic stellate cell activation and *in vivo* liver fibrogenesis [J]. Am J Pathol, 2010, 177: 1214-1224.
- [17] Liu PP, Liu HH, Sun SH, et al. Aspirin alleviates cardiac fibrosis in mice by inhibiting autophagy [J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38: 488-497.
- [18] Uemura M, Swenson ES, Gaca MD, et al. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16: 4214-4224.
- [19] Leto G, Tumminello FM, Pizzolanti G, et al. Cathepsin D serum mass concentrations in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis [J]. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1996, 34: 555-560.
- [20] Kristensen DB, Kawada N, Imamura K, et al. Proteome analysis of rat hepatic stellate cells [J]. Hepatology, 2000, 32: 268-277.
- [21] Moles A, Tarrats N, Fernandez-Checa JC, et al. Cathepsins B and D drive hepatic stellate cell proliferation and promote their fibrogenic potential [J]. Hepatology, 2009, 49: 1297-1307.