·重大新药创制专项巡礼·

舒肝宁注射液体外抗纤维化作用实验研究

思兰兰[1],柏兆方[2],葛斐林[2],李　乐[1],陈容娟[1],王伽伯[2],徐东平[1],肖小河[2],刘　妍[1]
(解放军总医院第五医学中心 1 感染病医学部,2 肝病医学部,北京 100039)

[摘要]　**目的**:研究舒肝宁注射液对人肝星状细胞 LX2(HSC-LX2)细胞生长的影响,探讨其抗纤维化机制。**方法**:使用舒肝宁注射液处理 HSC-LX2 细胞,用细胞计数试剂盒-8(CCK8)法测定细胞的吸光度值,计算细胞增殖率。荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法和免疫印迹法分别检测Ⅰ型胶原蛋白、Ⅲ型胶原蛋白和转化生长因子-β(TGF-β)的 mRNA 和蛋白水平。流式细胞术检测细胞周期分布及细胞凋亡率。**结果**:与未用药组比较,低、中、高浓度的舒肝宁注射液处理 HSC-LX2 细胞 120 h 对细胞增殖的抑制率分别为 14.27%,16.37 和 18.67%($P<0.05$)。舒肝宁注射液处理组细胞Ⅰ型胶原蛋白和Ⅲ型胶原蛋白的 mRNA 和蛋白水平较未用药组明显降低($P<0.05$)。舒肝宁注射液阻滞细胞周期在 G_2/M 期,诱导细胞的早期和晚期凋亡,最大凋亡率达到 2.69%,诱导凋亡作用呈浓度依赖性($P<0.05$)。**结论**:舒肝宁注射液通过阻滞细胞周期进而抑制细胞增殖,同时促进细胞早期和晚期凋亡,下调Ⅰ型胶原蛋白和Ⅲ型胶原蛋白 mRNA 和蛋白表达水平,从而起到抗纤维化作用。

[关键词]　舒肝宁注射液;人肝星状细胞;肝纤维化;Ⅰ型胶原蛋白;Ⅲ型胶原蛋白
[中图分类号]　R965.1;R975.5　[文献标志码]　A　[文章编号]　1003－3734(2021)11－1001－07

The anti-fibrosis effect of Shuganning Zhusheye *in vitro*

SI Lan-lan[1], BAI Zhao-fang[2], GE Fei-lin[2], LI Le[1], CHEN Rong-juan[1], WANG Jia-bo[2], XU Dong-ping[1], XIAO Xiao-he[2], LIU Yan[1]
(*The Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital* 1 *Department of Infectious Diseases*, 2 *Department of Hepatology*, *The Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital*, *Beijing* 100039, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To examine the effect of Shuganning Zhusheye on the growth of human hepatic stellate cells LX2 (HSC-LX2), and to explore its anti-fibrosis mechanism. **Methods**: The HSC-LX2 cells were treated with Shuganning Zhusheye and the absorbance of the cells was measured by the CCK8 assay to calculate the cell proliferation rate. The expression levels of mRNA and protein such as collagen Ⅰ, collagen Ⅲ and TGF-β were detected by fluorescence quantitative PCR and Western Blot. The effect of Shuganning Zhusheye on the cell cycle distribution and apoptotic rate of HSC-LX2 cell was detected by flow cytometry. **Results**: Compared to the untreated group, the inhibition rates of the low, medium and high concentrations of Shuganning Zhusheye on HSC-LX2 cells for 120 h were 14.27%, 16.37% and 18.67% respectively ($P<0.05$). The quantitative results showed that the mRNA levels and the protein expression levels of collagen Ⅰ and collagen Ⅲ in HSC-LX2 cells were lower than those in the untreated group ($P<0.05$). Shuganning Zhusheye blocked the cycle of HSC-LX2 cells in G_2/M

[基金项目]　国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2017ZX09301022);国家自然科学基金面上资助项目(81573676);国家自然科学基金重点资助项目(81930110)

[作者简介]　思兰兰,女,硕士研究生,主要从事抗病毒、抗肿瘤、抗纤维化药物功能及机制的研究。联系电话:(010)66933392,E-mail:sll1900@163.com。

[通讯作者]　刘妍,女,博士,副研究员,主要从事乙型肝炎病毒感染慢性化重症化机制及抗 HBV 治疗研究。联系电话:(010)66933392,E-mail:liuyan5360@163.com。肖小河,男,博士生导师,研究员,主要从事中药鉴定学和临床中药学研究。联系电话:(010)66933322,E-mail:pharmacy_302@126.com。

phase and induced the early and late apoptosis of the cells with a maximum apoptosis rate of 2.69%. And the effect of inducing apoptosis was concentration-dependent ($P<0.05$). **Conclusion**: Shuganning Zhusheye inhibited cell proliferation by blocking the cell cycle, and promoted the early and late cell apoptosis. At the same time, it down-regulated the expression levels of mRNA and protein regarding collagen Ⅰ and collagen Ⅲ, so as to play an anti-fibrosis effect.

[**Key words**] Shuganning Zhusheye; human hepatic stellate cell; hepatic fibrosis; collagen Ⅰ; collagen Ⅲ

肝纤维化(hepatic fibrosis)是肝脏受到炎症等损伤因素的持续刺激而发生的病变,是肝脏中胶原蛋白等细胞外基质(ECM)的增生和降解失去平衡,产生纤维结缔组织异常沉积的病理过程。如果不及时治疗,大多数患者可能将进一步发展为肝硬化,进而发展成为肝癌。目前肝纤维化的病理机制有 3 个方面:① 各种细胞因子调控及活化肝星状细胞(hepatic stellate cells,HSC),活化的 HSC 可发生表型转变,进而合成大量的 ECM,ECM 的主要成分是Ⅰ型胶原蛋白(collagen Ⅰ)和Ⅲ型胶原蛋白(collagen Ⅲ)。② ECM 分泌可以促进具有收缩功能的平滑肌 α-肌动蛋白(α-SMA)的表达,促进肝纤维化形成。③ 肝纤维化的形成还受多种细胞因子的影响,这些细胞因子是由活化的 HSC 分泌,然后通过旁分泌途径来进一步促进 HSC 的转化及增殖,进而加速纤维化的形成。其中 TGF-β 是调节 ECM 合成和代谢的最主要细胞因子。HSC 是肝纤维化 ECM 的主要来源,其活化与否关系到大量促纤维化因子和生长因子的产生,是肝纤维化过程中最重要的因素[1-2]。因此,靶向 HSC 可能成为预防和治疗肝纤维化的有效手段。

截至目前,尚无明确可用于临床的抗纤维化化学或生物药物[3]。近年,随着中医药学的深入发展,中药在治疗肝纤维化方面有着明显的优势。舒肝宁注射液是一种中药复方制剂,内含茵陈提取物、栀子提取物、黄芩苷、板蓝根提取物、灵芝提取物。它主要的功能是清热解毒、利湿退黄、益气扶正、保肝护肝。我们前期的研究结果显示,该药物有抗乙型肝炎病毒的作用[4]。HSC 的活化是肝纤维化形成的中心环节,如何减少 HSC 的活化和增殖已成为抗肝脏纤维化研究的热点。本研究通过舒肝宁注射液体外处理 HSC-LX2 细胞,观察舒肝宁注射液对 HSC-LX2 细胞的增殖、周期和凋亡以及相关分子表达的影响,为明确舒肝宁注射液在体外 HSC-LX2 细胞模型的抗纤维化作用及机制提供实验依据。

材料与方法

1 实验细胞

人肝星状细胞系 HSC-LX2,由首都医科大学附属北京地坛医院的成军教授惠赠并由本研究室保存。用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基在 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育培养,0.25% 胰酶消化传代。

2 药物及试剂

舒肝宁注射液(贵州瑞和制药有限公司馈赠,批号:20190604),组成成分为茵陈提取物、栀子提取物、黄芩苷、板蓝根提取物和灵芝提取物,1 mL 注射液中上述成分含量分别为 4,3,22,5,3.5 g;胎牛血清及高糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胰酶(Promega 公司);细胞计数试剂盒-8(CCK8)检测试剂盒(上海翊圣公司);RNA 提取试剂(Invitrogen 公司);反转录试剂盒(Thermo 公司);荧光定量聚合酶链式反应(PCR)试剂盒[北京康润诚业生物科技有限公司,2 × RealStar Green Fast Mixture (with ROX)];引物合成(北京天一辉远生物科技有限公司);TGF-β,collagen Ⅰ,collagen Ⅲ抗体(Proteintech 公司);细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(BD 公司)。

3 CCK8 法检测细胞增殖的影响

取对数生长期的 HSC-LX2 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,重悬于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,调整细胞悬液浓度为 $2\times10^4\cdot mL^{-1}$,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL 细胞悬液,周边空白孔补加 250 μL PBS·孔$^{-1}$。置于 37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中继续培养。配药:采用完全培养基稀释舒肝宁注射液贮存液,配得药物浓度依次为 4,8 和 16 $\mu g\cdot mL^{-1}$(此浓度范围选择参照前期研究结果[4],不影响肝实质细胞活力),对照组则采用相应量的完全培养基。待细胞贴壁后,各孔中加入 100 μL 已配好的舒肝宁注射液稀释液,使得终浓度为 4,8 和 16 $\mu g\cdot mL^{-1}$,相应浓度的对照组加等体积的

DMEM 培养基,每个浓度设 3 个复孔,每孔终体积为 200 μL。药物分别作用 24,48,72,96 和 120 h,每个时间节点分别吸净培养基,10 mmol·L^{-1} PBS 洗涤细胞 2 次,并加入 CCK8 和完全培养基的混合液(100 μL·孔$^{-1}$),于培养箱中继续培养 2 h。培养完成后,将 96 孔板置于酶标仪中,设定波长为 450 nm,检测各孔吸光(*A*)值。依次记录每天的吸光度值并依此计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(%) =(实验对照组 *A* 值 - 干预加药组 *A* 值)/实验对照组 *A* 值 ×100%,进行 3 次独立重复实验。

4 细胞总 RNA 提取

① 经舒肝宁注射液处理后的 HSC-LX2 细胞用 1 mL Trizol 处理,室温放置 5 min,使其充分裂解。12 000 r·min^{-1}离心 5 min,弃沉淀。② 加入 200 μL 氯仿,振荡混匀后室温放置 15 min。③ 4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心 15 min。吸取上层水相至另一离心管中。④ 加入 0.5 mL 异丙醇混匀,室温放置 5 ~ 10 min。⑤ 4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心 10 min,弃上清液,RNA 沉于管底。⑥ 加入 75% 乙醇,温和振荡离心管,悬浮沉淀。⑦ 4 ℃、8 000 r·min^{-1}离心 5 min,尽量弃上清。⑧ 室温晾干或真空干燥 5 ~ 10 min。⑨ 50 μL RNA-free H_2O 溶解 RNA 样品,55 ℃ ~ 60 ℃,5 ~ 10 min。⑩ 检测 RNA 浓度值。

5 mRNA 荧光定量检测

0,4,8 和 6 μg·mL^{-1}舒肝宁注射液处理 HSC-LX2 细胞 120 h,提取细胞 RNA,按反转录试剂盒操作说明将 RNA 反转录成 cDNA。将 cDNA 按 0.4 μL cDNA、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、10 μL 2 × PCR 反应混合液,8.8 μL 双蒸水(ddH_2O)的反应体系用 SLAN 荧光定量 PCR 仪进行基因 mRNA 的定量扩增。循环条件为 95 ℃、2 min 预反应;95 ℃、15 s 和 60 ℃、20 s 共 40 个循环;内参基因为 β-actin。定量基因的引物序列为:β-actin:F:5'-AGAGCCTCGCCTTTGCCGAT-3',R:5'-CCATCACGCCCTGGTGCCT-3'(186 bp);TGF-β:F:5'-ACAGCAACAATTCCTGGCGATAC-3',R:5'-GCTAAGGCGAAAGCCCTCAAT-3'(140 bp);collagen Ⅰ(COL1A1):F:5'-AACATGACCAAAAACCAAAAGTG-3',R:5'-CATTGTTTCCTGTGTCTTCTGG-3'(252 bp);collagen Ⅲ(COL3A1):F:5'-GTTGCACGAAACACACTGGG-3',R:5'-AAAAGCAAACAGGGCCAACG-3'(150 bp);扩增产物均跨越 1 个内含子,以防止扩增出基因组 DNA。荧光定量 PCR 中每个样本重复 3 次,取热循环仪中荧光达到荧光阈值的循环数(CT)的平均值,采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$法比较目的基因表达变化情况。

6 Western Blot 检测蛋白的表达

12 孔板中每孔铺种 1 × 10^5 个 HSC-LX2 细胞,用 0,4,8 和 16 μg·mL^{-1}舒肝宁注射液处理细胞 72 h 后,吸弃上清,1 × PBS 清洗 1 遍,加入适量 RIPA 蛋白裂解液(含上样缓冲液),均匀铺满皿底,至冰上充分裂解。裂解完全后,采用细胞刮取皿中蛋白,收集于 1.5 mL 的 EP 管中。煮沸 10 min 使蛋白质变性。取变性后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(5% 浓缩胶,10% 分离胶),分离不同分子量的蛋白质。200 mA 转膜 80 min,脱脂奶封闭。一抗孵育,1 × TBST 洗膜 5 min,3 次。二抗孵育 5 min,3 次,显影。Image J 软件进行图像分析,该软件可测出每一样品的目的蛋白和内参蛋白(GAPDH)的灰度值,通过同一蛋白样品中两 OD 值之比进行半定量分析。进行 3 次独立重复实验。

7 细胞周期的流式检测

胰酶消化收集对数生长期的 HSC-LX2 细胞,完全培养基混悬细胞,以 3 × 10^5 个·孔$^{-1}$计数种植于 6 cm 培养板中,每孔体积为 2 mL。待细胞贴壁后,在各孔中加入 2 mL 已配好的终浓度为 4,8 和 16 μg·mL^{-1}舒肝宁注射液系列稀释液,相应体积的 DMEM 培养基作为对照组,各浓度设 3 个复孔,每孔终体积为 2 mL。继续培养 48 h,培养结束后,胰酶消化,分别收集不同处理组细胞,采用 10 mmol·L^{-1} PBS 洗涤 1 次后重悬于该缓冲液中,随即加入 -20 ℃预冷 70% 乙醇中固定,-20 ℃固定过夜。染色:检测前去除固定液,10 mmol·L^{-1} PBS 洗涤 2 遍后每管加入 200 μL 染液(PI 终浓度为 50 μg·mL^{-1},RNase A 终浓度为 100 μg·mL^{-1}),37 ℃避光孵育 30 min。染色完成的细胞悬液采用流式细胞仪检测细胞周期分布情况,所得数据均使用 MFLT32 软件进行分析。进行 3 次独立重复实验。

8 细胞凋亡的流式检测

胰酶消化收集对数生长期的 HSC-LX2 细胞,完全培养基混悬细胞,以 3 × 10^5 个·孔$^{-1}$计数种植于 6 cm 培养板中,每孔体积为 2 mL。待细胞贴壁后,在各孔中加入 2 mL 已配好的终浓度为 4,8 和 16 μg·mL^{-1}舒肝宁注射液系列稀释液,相应体积的 DMEM 培养基作为对照组,各浓度设 3 个复孔,每孔终体积为 2 mL。继续培养 72 h 结束后,用不含 EDTA

的胰酶消化,分别收集不同处理组细胞,采用预冷的 10 mmol·L^{-1} PBS 洗涤 2 次后重悬于该缓冲液中,随即转移到流式检测管。测定前 1 h 加入标记 5 μL FITC Annexin V 和 5 μL 7-AAD 染液,轻轻混匀,室温避光孵育 15 min,1 h 内进行流式检测。进行 3 次独立重复实验。

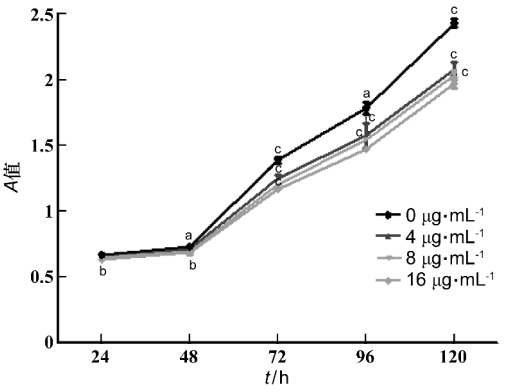
9 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件处理实验数据,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD-t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1 舒肝宁注射液对细胞增殖的影响

与未用药组(0 μg·mL^{-1})相比,4,8 和 16 μg·mL^{-1}舒肝宁注射液对 HSC-LX2 细胞增殖有抑制作用,且随着浓度的增加抑制作用更加明显。16 μg·mL^{-1}的舒肝宁注射液 24 h 时可抑制细胞增殖($P<0.01$);48 h 时 8 和 16 μg·mL^{-1}舒肝宁注射液对细胞的增殖有抑制作用($P<0.05$,$P<0.01$);72 h 后 3 种浓度舒肝宁注射液对 HSC-LX2 细胞的增殖均有抑制作用($P<0.001$)。结果见图 1。



与未用药组比较,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$

图 1　不同浓度的舒肝宁注射液对 HSC-LX2 细胞增殖作用的影响

2 舒肝宁注射液对细胞 collagen Ⅰ,collagen Ⅲ,TGF-β mRNA 的影响

按照操作说明提取细胞 RNA,电泳检测 RNA 质量完好。mRNA 反转录成 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR 检测,结果显示,与未用药组相比,4,8 和 16 μg·mL^{-1}舒肝宁注射液作用 HSC-LX2 细胞 5 d,可下调 collagen Ⅰ和 collagen Ⅲ的 mRNA 水平,且呈浓度依赖性下调,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1　舒肝宁注射液对细胞 collagen Ⅰ,collagen Ⅲ和 TGF-βmRNA 表达影响　　$\bar{x} \pm s$

浓度	collagen Ⅰ		collagen Ⅲ		TGF-β	P 值
/μg·mL^{-1}	相对倍数	P 值	相对倍数	P 值	相对倍数	
0	1.000 ± 0.087	—	1.000 ± 0.057	—	1.000 ± 0.070	—
4	0.812 ± 0.070	0.040 05	0.559 ± 0.062	0.007 77	1.109 ± 0.100	0.463 18
8	0.633 ± 0.061	0.001 27	0.391 ± 0.069	0.000 22	0.967 ± 0.172	0.595 00
16	0.186 ± 0.011	2.89×10^{-6}	0.057 ± 0.001	7.06×10^{-6}	0.955 ± 0.122	0.746 53

3 舒肝宁注射液对细胞 collagen Ⅰ,collagen Ⅲ和 TGF-β 蛋白表达的影响

0,4,8 和 16 μg·mL^{-1}舒肝宁注射液处理 HSC-LX2 细胞 7 d,Western Blot 检测结果使用 Image J 软件进行条带灰度扫描后与内参 GAPDH 灰度扫描结果进行校准:collagen Ⅰ的校准表达值为 1.13,1.42,0.68 和 0.36;collagen Ⅲ的校准表达值为 0.95,0.86,0.35 和 0.24;TGF-β 的校准表达值为 0.96,0.93,0.91 和 0.89。与未用药组相比,舒肝宁注射液下调细胞中 collagen Ⅰ(分别下调了 -1.3,1.7 和 3.1 倍)和 collagen Ⅲ(分别下调了 1.1,2.7 和 4.0 倍)的蛋白表达水平,且随药物浓度增加蛋白表达逐渐减弱。但 TGF-β 蛋白水平则不变(是未处理组的 1.1,1.1 和 1.1 倍),且 TGF-β 的蛋白水平的变化情况与 mRNA 的水平变化情况一致,检测结果见图 2。

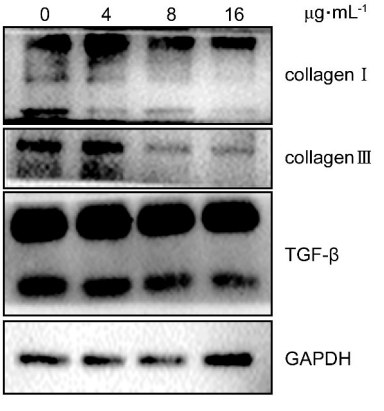


图 2　不同浓度的舒肝宁注射液对 HSC-LX2 细胞 collagen Ⅰ,collagen Ⅲ和 TGF-β 的蛋白表达的影响

4 舒肝宁注射液对细胞周期的影响

0,4,8 和 16 μg·mL^{-1}低中高浓度舒肝宁注射液作用 HSC-LX2 细胞 48 h 后进行细胞周期流式检测，处于 G_1 期的 HSC-LX2 细胞比例分别为(43.19 ± 2.88)%，(40.10 ± 1.46)%，(35.42 ± 0.4)% 和(35.31 ± 0.35)%；而处于 S 期(DNA 合成期)的细胞比例分别为(38.85 ± 2.22)%，(38.55 ± 0.88)%，(42.49 ± 0.87)% 和(41.91 ± 0.69)%；与此同时，处于 G_2/M 期的 HSC-LX2 细胞比例分别为(17.97 ± 0.66)%，(21.36 ± 0.58)%，(22.11 ± 0.47)% 和(22.78 ± 0.34)%。结果显示舒肝宁注射液作用 HSC-LX2 细胞后，与未用药组相比，G_0/G_1 期细胞随药物浓度增加而减少($P < 0.05$)，G_2 期和 S 期细胞则随药物浓度增加而增加($P < 0.05$)。结果见图 3。

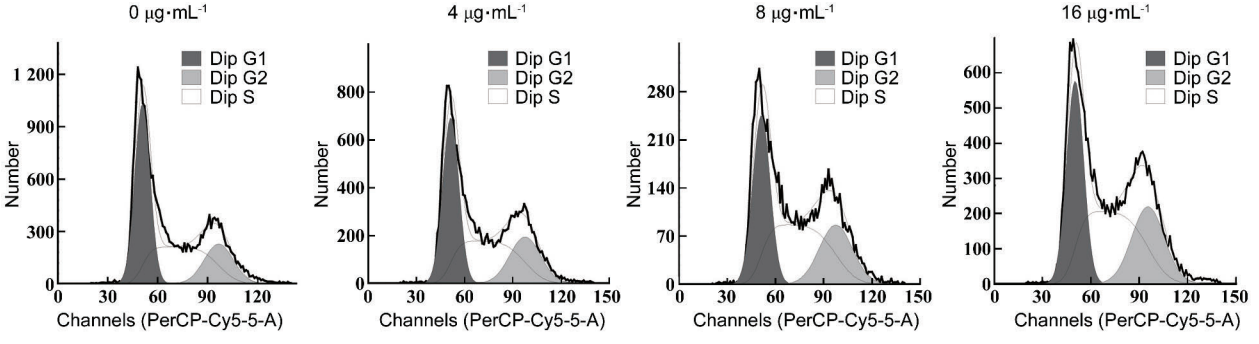
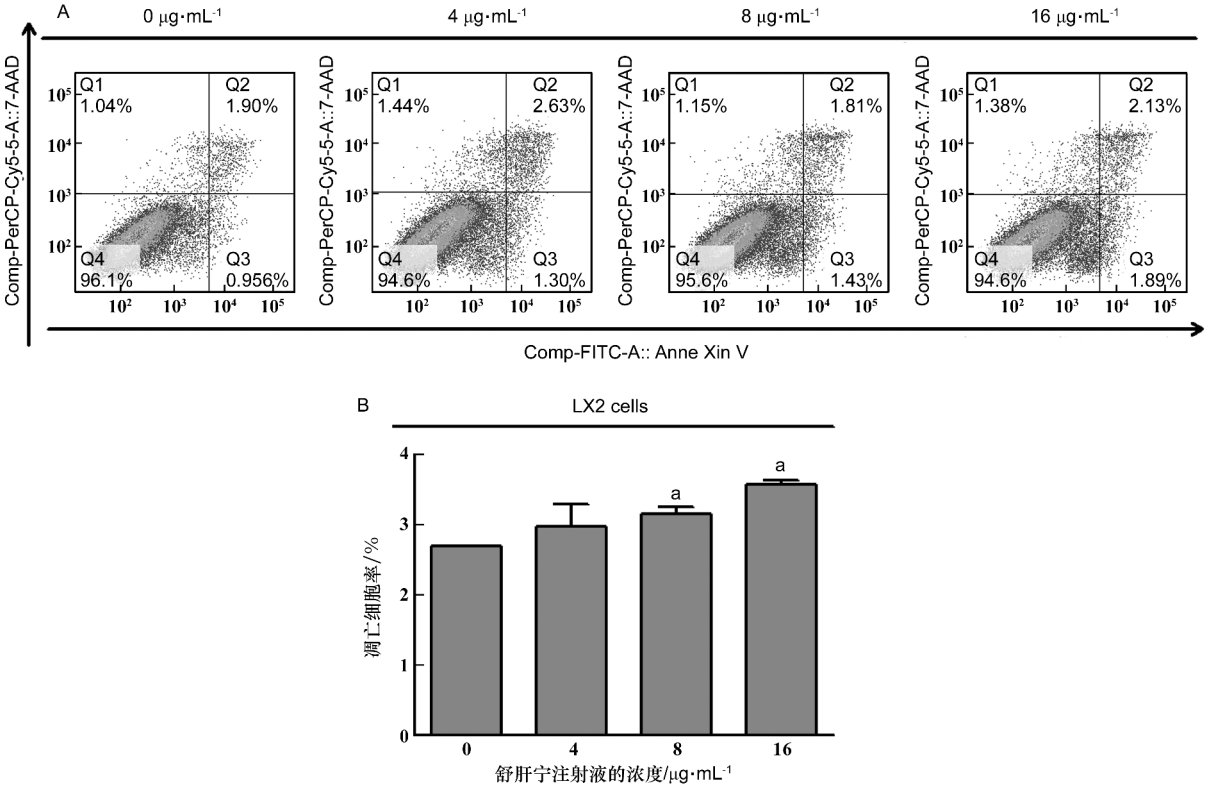


图 3 不同浓度的舒肝宁注射液对 HSC-LX2 细胞周期的影响

5 舒肝宁注射液对细胞凋亡的影响

0,4,8 和 16 μg·mL^{-1}的舒肝宁注射液作用 HSC-LX2 细胞 72 h 后进行细胞凋亡检测，结果发现舒肝宁注射液可以诱导 HSC-LX2 细胞的早期和晚期细胞凋亡，凋亡率分别(2.696 ± 0.01)%，(2.980 ± 0.33)%，(3.170 ± 0.09)% 和(3.585 ± 0.06)%，与未用药组相比，8 和 16 μg·mL^{-1}舒肝宁注射液处理组诱导细胞的凋亡率增加($P < 0.05$)，结果见图 4。



与未用药组比较，a：$P < 0.05$

图 4 不同浓度的舒肝宁注射液对 HSC-LX2 细胞凋亡的影响

讨　论

研究显示有效的肝纤维化治疗可阻断病程进展,提高患者的生存率及生命质量。舒肝宁注射液是一种纯中药复方注射剂,目前临床上主要用于急性及慢性肝炎的治疗[5-7]。其各种组分都有特定的药理作用,其中板蓝根清热解毒、凉血利咽,同时还可以抑制病毒的复制,提高免疫力;茵陈可清热、退黄、降酶、降脂;栀子可抑制或逆转肝细胞的纤维化;黄芩可抗炎消肿、降酶、利尿;灵芝有护肝的功能。因此,从上述药理作用上,舒肝宁注射液在治疗病毒性肝炎及其他原因引起的肝损伤中有疗效,是一种保肝、降酶、退黄的抗纤维化药物[6]。

肝纤维化是机体对慢性损伤的一种自我修复反应,是一种基质增生性的病理过程。肝纤维化形成的细胞学基础是 HSC 的活化[8-9]。HSC 活化后可以合成大量的 ECM,这一过程在肝纤维化形成中起着关键作用。HSC 的增生和活化是发生肝纤维化的中心环节,所以药物是否能够抑制 HSC 的增殖可直接反映其抗纤维化作用的强弱。各种动物 HSC 作为研究人类肝纤维化发病机制和逆转过程的细胞模型,已成为肝纤维化研究的热点[10-11]。其中 HSC-LX2 细胞是西药及中药抗纤维化靶标和疗效的机制分析的主要细胞模型[12-16]。截至目前,对于舒肝宁注射液体外细胞模型的抗纤维化作用少见研究报道,本研究使用 HSC-LX2 细胞对舒肝宁注射液体外抗纤维化作用及机制进行初步探讨。

本研究通过 CCK8 方法检测舒肝宁注射液作用于 HSC-LX2 细胞的增殖情况,发现舒肝宁注射液可以明显抑制 HSC-LX2 细胞增殖,而且抑制作用随着药物浓度的增加而增强,呈剂量依赖性。表明舒肝宁注射液逆转肝纤维化作用与抑制 HSC 细胞的增殖有关。细胞的分裂增殖是细胞最基本的生命活动之一,反映细胞增殖最常用的指标是细胞周期。舒肝宁注射液作用于 HSC-LX2 细胞后,G_1 期细胞减少,S 期(DNA 合成期)和 G_2/M 期细胞增加。推测细胞由 G_1 期进入 S 期,进而停滞于 G_2/M 期或使 G_2/M 期的时间延长,使细胞周期进程减缓,抑制增殖。细胞凋亡增加也是 HSC 活化及增殖受到抑制的一个重要原因。多项研究显示[17-20],HSC 活化后其表型很难被逆转,但通过凋亡方式可使 HSC 数量减少,是逆转肝纤维化的重要途径之一。本研究通过流式双染法检测细胞凋亡,发现舒肝宁注射液作用 HSC-LX2 细胞后,细胞早期凋亡率和晚期凋亡率均明显增高,诱导作用呈剂量依赖性。可见舒肝宁注射液逆转肝纤维化作用与其能诱导 HSC-LX2 细胞发生细胞凋亡有关。

肝脏内 HSC 主要有以下功能[21]:① 存储脂肪为机体细胞供能。② 主要合成 collagen Ⅰ 和 collagen Ⅲ 等胶原蛋白。③ 刺激产生金属蛋白酶及其抑制剂。④ 可以合成糖蛋白和蛋白多糖等。collagen Ⅲ 在纤维化早期会明显增多,但随纤维化进展,可逐渐被 collagen Ⅰ 替代。活化的 HSC 可合成大量的 ECM。collagen Ⅰ 和 collagen Ⅲ 的沉积量直接反映肝纤维化程度,所以测定 collagen Ⅰ 和 collagen Ⅲ 表达水平是观察 HSC 细胞功能最直接的指标。本研究发现,中、高剂量舒肝宁注射液组 collagen Ⅰ 和 collagen Ⅲ 表达水平明显低于未用药组。推测舒肝宁注射液有降低 HSC 细胞胶原蛋白合成功能、逆转肝纤维化的作用。

综上所述,舒肝宁注射液可通过阻滞细胞周期于 G_2/M 期和诱导细胞早期及晚期凋亡抑制 HSC-LX2 细胞增殖,降低 collagen Ⅰ 和 collagen Ⅲ 合成能力,从而逆转肝纤维化发生。

[参 考 文 献]

[1] LIU Z, YI J, YE R, *et al*. MiR-144 regulates transforming growth factor-β1 induced hepatic stellate cell activation in human fibrotic liver[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4):3994-4000.

[2] LAMBRECHT J, MANNAERTS I, VAN GRUNSVEN LA. The role of miRNAs in stress-responsive hepatic stellate cells during liver fibrosis[J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 209.

[3] 中国中西医结合学会肝病专业委员. 肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019 年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(7): 1444-1449.

[4] 思兰兰, 刘妍, 徐东平, 等. 舒肝宁注射液体外抗 HBV 作用[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018,10(4): 66-72.

[5] 陈曙红, 邵剑锋, 何灿明, 等. 舒肝宁注射液治疗急性黄疸性病毒性肝炎 49 例[J]. 中国中医急症, 2011, 20(10): 1686-1687.

[6] 梁海雄, 黎丽群. 舒肝宁注射液治疗慢性乙型病毒性肝炎临床研究 Meta 分析[J]. 世界中西医结合杂志, 2016,11(8): 1057-1062, 1066.

[7] 陈明泉, 李谦, 张琼华, 等. 舒肝宁注射液治疗急慢性病毒性肝炎的临床疗效观察[J]. 肝脏, 2007, 12(3):194-196.

[8] TSUCHIDA T, FRIEDMAN SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(7):397-411.

[9] CHEN RJ, WU HH, WANG YJ. Strategies to prevent and reverse liver fibrosis in humans and laboratory animals[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(10): 1727-1750.

[10] ZHANGDI HJ, SU SB, WANG F, *et al*. Crosstalk network among multiple inflammatory mediators in liver fibrosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(33): 4835-4849.

[11] HIGASHI T, FRIEDMAN SL, HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 27 - 42.
[12] 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.
[13] HU NH, WANG C, DAI XY, *et al*. Phillygenin inhibits LPS-induced activation and inflammation of LX2 cells by TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 248: 112361.
[14] ZHOU Y, WU R, CAI FF, *et al*. Xiaoyaosan decoction alleviated rat liver fibrosis via the TGFβ/Smad and Akt/FoxO3 signaling pathways based on network pharmacology analysis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113021.
[15] CAI FF, BIAN YQ, WU R, *et al*. Yinchenhao decoction suppresses rat liver fibrosis involved in an apoptosis regulation mechanism based on network pharmacology and transcriptomic analysis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108863.
[16] DU XS, LI HD, YANG XJ, *et al*. Wogonin attenuates liver fibrosis via regulating hepatic stellate cell activation and apoptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105671.
[17] HERNÁNDEZ-GEA V, GHIASSI-NEJAD Z, ROZENFELD R, *et al*. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4): 938 - 946.
[18] JIN SZ, LI HL, HAN MZ, *et al*. Mesenchymal stem cells with enhanced bcl-2 expression promote liver recovery in a rat model of hepatic cirrhosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(5): 1117 - 1128.
[19] 李正阳, 吴健, 蒋淼, 等. 间充质干细胞免疫调节在肝纤维化中的治疗作用[J]. 世界临床药物, 2020, 41(2): 89 - 93.
[20] MENG D, LI Z, WANG G, *et al*. Carvedilol attenuates liver fibrosis by suppressing autophagy and promoting apoptosis in hepatic stellate cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 1617 - 1627.
[21] AYDIN MM, AKÇALI KC. Liver fibrosis[J]. *Turk J Gastroenterol*, 2018, 29(1): 14 - 21.

编辑: 刘卓越/接受日期: 2021 - 01 - 22