

藏药波棱瓜子总木脂素对大鼠肝星状细胞增殖与凋亡的影响

刘 伟, 石林琳, 石晏丞, 巴 珂, 李佳川, 顾 健*

西南民族大学药学院, 四川 成都 610000

摘要: **目的** 通过研究藏药波棱瓜子总木脂素(TLHPS)对大鼠肝星状HSC-T6细胞的增殖抑制作用及诱导其凋亡的作用, 进一步探讨TLHPS抗肝纤维化的作用机制。**方法** 实验分为对照组, TLHPS 10、20、30、40 $\mu\text{g/mL}$ 组, 阳性药秋水仙碱0.1 $\mu\text{g/mL}$ 组。用加入各组药物的培养基分别培养HSC-T6细胞24、48、72 h, 采用CCK8法检测各组细胞24、48、72 h的增殖抑制率, 流式细胞术检测细胞凋亡率及细胞周期, Western blotting法检测凋亡蛋白Bcl-2、Bax、核转录因子- κB (NF- κB)的表达水平。**结果** 与对照组相比, TLHPS 10、20、30、40 $\mu\text{g/mL}$ 组对HSC-T6细胞24、48、72 h时的增殖抑制率明显增高($P < 0.01$), 且各组HSC-T6细胞早期凋亡率与晚期凋亡率明显升高($P < 0.05, 0.01$), G_0/G_1 期细胞数明显增多($P < 0.01$), G_2/M 期细胞数无明显差异($P > 0.05$), S期细胞数明显减少($P < 0.01$)。Western blotting结果显示, 与对照组相比, TLHPS 10、20、30、40 $\mu\text{g/mL}$ 组Bcl-2蛋白表达明显降低($P < 0.05, 0.01$), TLHPS 40 $\mu\text{g/mL}$ 组Bax蛋白表达明显升高($P < 0.01$), TLHPS 20、30、40 $\mu\text{g/mL}$ 组NF- κB 表达明显降低($P < 0.01$)。**结论** TLHPS抗肝纤维化的作用机制可能是通过降低Bcl-2、NF- κB 的表达抑制肝星状细胞增殖并诱导其凋亡。

关键词: 波棱瓜子总木脂素; 大鼠肝星状细胞; 增殖; 凋亡; Bcl-2; Bax; 核转录因子- κB

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)14-2912-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.018

Effects of total lignans from Tibetan medicine *Herpetospermum pedunculatum* seeds on proliferation and apoptosis of rat hepatic stellate cells

LIU Wei, SHI Lin-lin, SHI Yan-cheng, BA Ke, LI Jia-chuan, GU Jian

School of Pharmacy, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610000, China

Abstract: **Objective** To observe the possible mechanism of total lignans from *Herpetospermum pedunculatum* seeds (TLHPS) in fighting against hepatic fibrosis of hepatic stellate cell-T6 (HSC-T6) by studying the effects of TLHPS on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of HSC-T6. **Methods** The cells were divided into totally six groups such as control group, TLHPS groups (10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/mL}$), and colchicine positive control group (0.1 $\mu\text{g/mL}$). HSC-T6 cells were cultivated for 24, 48, and 72 h by six groups of culture medium containing different drugs. The proliferation inhibitory rate of HSC-T6 cells was detected by CCK8 method at 24, 48, and 72 h respectively. The apoptotic rate and cell cycle were detected by flow cytometry. Protein expression levels of B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) and transcription factors- κB (NF- κB) were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, 24, 48, and 72 h proliferation inhibitory rate of HSC-T6 was obviously elevated in TLHPS 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/mL}$ groups ($P < 0.01$). Early- and late-stage apoptosis rates of HSC-T6 cells obviously increased in TLHPS 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/mL}$ groups ($P < 0.05, 0.01$). The cell numbers in G_0/G_1 phase were obviously increased in TLHPS groups ($P < 0.01$) and cell numbers in G_2/M phase have no significant difference ($P > 0.05$), cell numbers in S phase obviously decreased ($P < 0.01$). Compared with control group, Bcl-2 protein expression obviously decreased in TLHPS 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/mL}$ groups ($P < 0.05, 0.01$), Bax protein expression obviously increased in TLHPS 40 $\mu\text{g/mL}$ group ($P < 0.01$) and NF- κB protein expression obviously decreased in TLHPS 20, 30, 40 $\mu\text{g/mL}$ groups ($P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of total lignans from Tibetan medicine *Herpetospermum* fighting against hepatic fibrosis might be associated with inhibiting proliferation and inducing apoptosis of HSC-T6. The inhibition of hepatic stellate cells proliferation and induction of its apoptosis may be related to lowering the expression of Bcl-2 and NF- κB .

Key words: total lignans from *Herpetospermum pedunculatum* seeds; HSC-T6; proliferation; apoptosis; B cell lymphoma-2; Bcl-2-associated X protein; transcription factors- κB

收稿日期: 2017-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274168, 81573563); 四川省中医药管理局科研项目(2016C062)

作者简介: 刘 伟(1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药及民族药开发与研究。Tel: 18215626028 E-mail: 903244575@qq.com

*通信作者 顾 健(1967—), 男, 博士, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药及民族药创新研究与开发。

Tel: 13882156288 Fax: (028)85523968 E-mail: gujiancd@163.com

波棱瓜子是葫芦科波棱瓜 *Herpetospermum pedunculatum* (Ser.) C. B. Clarke 的干燥成熟种子, 常用于藏药方剂中, 具有助消化、清热降火的作用, 性寒、味苦, 在民间主要用来治疗消化不良、赤巴病、胆病、肝病(肝热、黄疸型传染性肝炎)等^[1,2]。前期研究发现波棱瓜子对各类肝病有很好的疗效, 如抗乙肝病毒、保肝降酶、治疗免疫性肝损伤^[2,3]。本课题组前期实验中确定了波棱瓜子有效部位为总木脂素部位, 并且在鼠体内实验中已初步证明波棱瓜子总木脂素(total lignans from *Herpetospermum pedunculatum* seeds, TLHPS)对CCl₄致肝纤维化大鼠的肝组织及肝功能损伤具有明显的保护作用^[2]。本实验以大鼠肝星状HSC-T6细胞为研究对象, 进一步探讨TLHPS在体外抗肝纤维化的作用机制, 为该药的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

波棱瓜子药材, 采自西藏, 经西南民族大学顾健教授鉴定其为葫芦科波棱瓜 *Herpetospermum pedunculatum* (Ser.) C. B. Clarke 的干燥成熟种子; 秋水仙碱, 批号C2580000, 质量分数>95%, Sigma公司; 南美胎牛血清, 批号FB15011, Clark公司; DMEM培养基、0.25%胰酶(+EDTA)、双抗、PBS缓冲液, Hyclone公司; CCK8试剂盒, Biosharp公司; 凋亡试剂盒, Roche公司; 周期试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒, 南京凯基生物科技发展有限公司; 预染蛋白Marker, 美国NEB公司; ECL发光试剂盒, 美国Thermo公司; PVDF膜, 美国Hybond公司; Bax、Bcl-2、核转录因子- κ B(NF- κ B)抗体、生物素化山羊抗兔IgG(H+L), 英国abcam(上海)贸易有限公司。

1.2 细胞

大鼠肝星状HSC-T6细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.3 仪器

AE31 倒置生物显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司; 80-2 台式电动离心机, 金坛市科析仪器有限公司; MCO-15AC 二氧化碳培养箱, 三洋电机国际贸易有限公司; Multiskan 酶标仪, 赛默飞世尔仪器有限公司; SYQ-DSX-280B 压力蒸汽灭菌器, 上海宜川仪表厂; XH-B 漩涡混合器, 江苏康健医疗用品有限公司; FC500 流式细胞仪, Beckman Coulter 公司。垂直电泳槽、DYY-6C 电泳仪, 美国Bio-RAD公司; TS-2 水平脱色摇床, 海门Kylin-Bell 仪器制

造有限公司; UV Transilluminator 化学发光凝胶成像仪, 美国Bio-RAD公司; MK3 Thermo 多功能酶标仪, 美国Thermo Fisher 仪器有限公司; MDF-U50V 型超低温冰箱, 日本Sanyo公司; TGL-16G-A 型高速低温离心机, 上海安亭科学仪器厂; ChemiDoc XRS+Systems 凝胶扫描成像仪、Image Lab 凝胶分析系统, 美国Bio-Rad公司。

2 方法

2.1 TLHPS 提取

取500 g波棱瓜子打成粉末状, 用6倍量80%乙醇回流提取2 h, 滤过, 取滤液旋蒸至水溶液。用石油醚洗脱, 至石油醚基本无色, 弃去上层石油醚部位。下层液体用2倍体积的醋酸乙酯洗2~3次, 取醋酸乙酯部位旋蒸, 水浴烘干得到总木脂素部位约5 g。

2.2 细胞培养

HSC-T6细胞用含有10%胎牛血清的DMEM培养基, 在37℃、5%CO₂条件下孵箱培养。

2.3 CCK8 法检测细胞增殖

取对数生长期的HSC-T6细胞用胰酶消化, 吸入15 mL塑料离心管中, 1 000 r/min, 离心5 min, 吹打成单细胞悬液, 弃上清, 重力重悬细胞。调节细胞浓度约为 3×10^4 /mL, 将细胞悬液接种于96孔细胞培养板中, 100 μ L/孔, 将96孔板置37℃、5%CO₂孵箱孵育过夜。实验分为空白组(仅加入培养液), 对照组, TLHPS10、20、30、40 μ g/mL组, 阳性药秋水仙碱(0.1 μ g/mL)组。待细胞贴壁后, 吸弃旧液, 分别依组加入含不同药物的血清培养液及DMEM进行培养, 每组6个复孔。药物处理24、48、72 h后, 向每孔加入10 μ L CCK8溶液, 将培养板在培养箱内孵育2.5 h后, 用酶标仪测定在450 nm处的吸光度(A)值, 按照公式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

取“2.3”项下不同药物处理24 h后的细胞, 消化收集细胞, 1 200 r/min, 离心5 min, 吸弃上清, 加入500 μ L PBS洗涤, 离心, 弃上清。将Annexin-V-Fluos、碘化丙啶、Binding Buffer缓冲液以1:1:48混匀, 避光放置, 作为工作液; 每管分别加入100 μ L工作液, 避光孵育10 min。加入300 μ L Binding Buffer重悬, 流式细胞仪检测, 实验重复3次。

2.5 流式细胞术检测细胞周期

取“2.3”项下不同药物处理24 h后的细胞, 消化收集细胞, 1 200 r/min, 离心5 min, 吸弃上清,

加入 500 μL 预冷的 PBS 洗涤, 离心, 弃上清; 每组加入 1 mL 预冷 75% 乙醇, 转移入 1.5 mL EP 管中, 吹匀后放置冰箱隔夜。3 500 r/min, 离心 5 min, 吸弃上清, 加入 500 μL PBS 洗涤, 离心, 弃上清; 加入 100 μL RNase, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min; 加入 400 μL PI 混匀, 染色 30 min, 流式细胞仪检测, 实验重复 3 次。

2.6 Western blotting 法检测凋亡蛋白 Bcl-2、Bax、NF- κB 的表达

取“2.3”项下不同药物处理 24 h 后的细胞, 弃去上清液, 按照试剂盒说明书提取蛋白, BCA 蛋白定量法测各组蛋白质量浓度。每孔按蛋白量 100 μg 上样, 稳定电压 100 V, 电泳 15 min, 将电压调至 180 V 继续电泳; 电泳结束后 200 mA、90 min 转膜至 PVDF 膜, 放入用 TBST Buffer 稀释的 5% BSA 液, 用保鲜膜封好, 摇床轻摇 2 h; TBST 洗 3 次, 每次 5 min; 加入一抗(Bax 1:200, Bcl-2 1:200, NF- κB 1:1 000, GAPDH 1:5 000), 置于摇床上轻摇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入二抗(1:5 000), 置于摇床上轻摇, 室温孵育 2~3 h; 将 ECL 发光液 A、B 试剂等体积混合后, 均匀滴加到膜上, 反应 1 min, 放入化学发光凝胶成像仪的暗室中曝光; 用凝胶图像分析成像系统进行扫描分析, 结果以目的蛋白相对表达量表示。实验重复 3 次。

2.7 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计分析软件对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 TLHPS 对 HSC-T6 细胞增殖的影响

各组药物作用于 HSC-T6 细胞 24、48、72 h 后, 与对照组相比, TLHPS 10、20、30、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞增殖抑制率明显升高 ($P < 0.01$)。TLHPS 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组 24、48 h 增殖抑制率较秋水仙碱高, 72 h 的增殖抑制率低于秋水仙碱。结果见图 1。

3.2 TLHPS 对 HSC-T6 细胞凋亡率的影响

结果见图 2、表 1。LR 区 (PI $^{-}$ /Annexin V $^{+}$) 表示早期凋亡细胞, UR 区 (PI $^{+}$ /Annexin V $^{+}$) 表示晚期凋亡细胞。与对照组相比, TLHPS 20、30、40

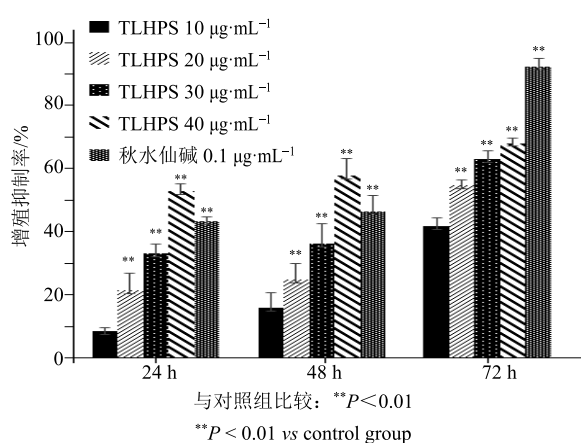


图 1 TLHPS 对 HSC-T6 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of TLHPS on proliferation of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

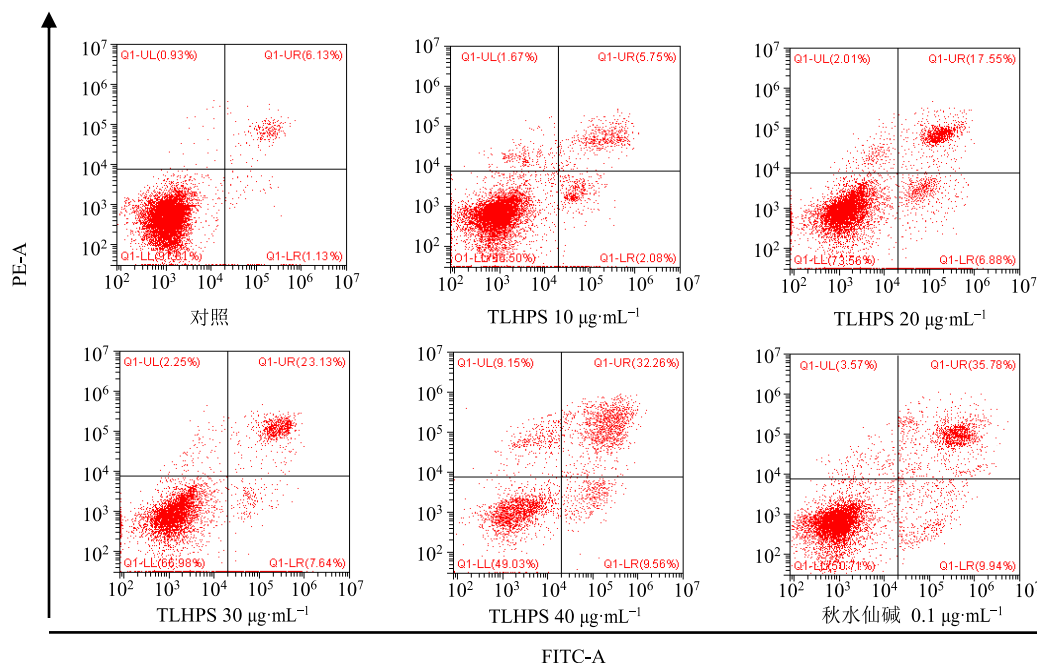


图 2 TLHPS 对 HSC-T6 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of TLHPS on apoptosis of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$\mu\text{g/mL}$ 组早期凋亡率与晚期凋亡率均明显升高 ($P<0.01$)。TLHPS $10\ \mu\text{g/mL}$ 组早期凋亡率升高 ($P<0.05$)。

3.3 TLHPS 对 HSC-T6 细胞周期的影响

药物作用于 HSC-T6 细胞 24 h 后, 与对照组相

表 1 TLHPS 对 HSC-T6 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Effect of TLHPS on apoptosis rate of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%
对照	—	1.34 ± 0.20	6.43 ± 0.64
TLHPS	10	$2.49 \pm 0.66^*$	5.30 ± 0.41
	20	$5.70 \pm 1.51^{**}$	$16.48 \pm 1.11^{**}$
	30	$7.71 \pm 0.42^{**}$	$22.16 \pm 1.25^{**}$
	40	$10.08 \pm 0.49^{**}$	$31.04 \pm 1.10^{**}$
秋水仙碱	0.1	$10.02 \pm 0.38^{**}$	$35.90 \pm 0.33^{**}$

与对照组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$, 下同

$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs control group, same as below

表 2 TLHPS 对 HSC-T6 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of TLHPS on cycle in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞周期分布/%		
		G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照	—	49.03 ± 0.26	39.62 ± 0.64	11.33 ± 0.39
TLHPS	10	$57.51 \pm 0.62^{**}$	$30.47 \pm 1.94^{**}$	12.02 ± 2.53
	20	$56.30 \pm 0.38^{**}$	$31.83 \pm 1.77^{**}$	11.87 ± 1.39
	30	$57.37 \pm 1.91^{**}$	$31.81 \pm 0.58^{**}$	10.82 ± 2.11
	40	$63.77 \pm 0.31^{**}$	$24.83 \pm 0.42^{**}$	11.40 ± 0.41
秋水仙碱	0.1	$65.86 \pm 0.31^{**}$	$15.08 \pm 1.09^{**}$	$19.06 \pm 0.92^{**}$

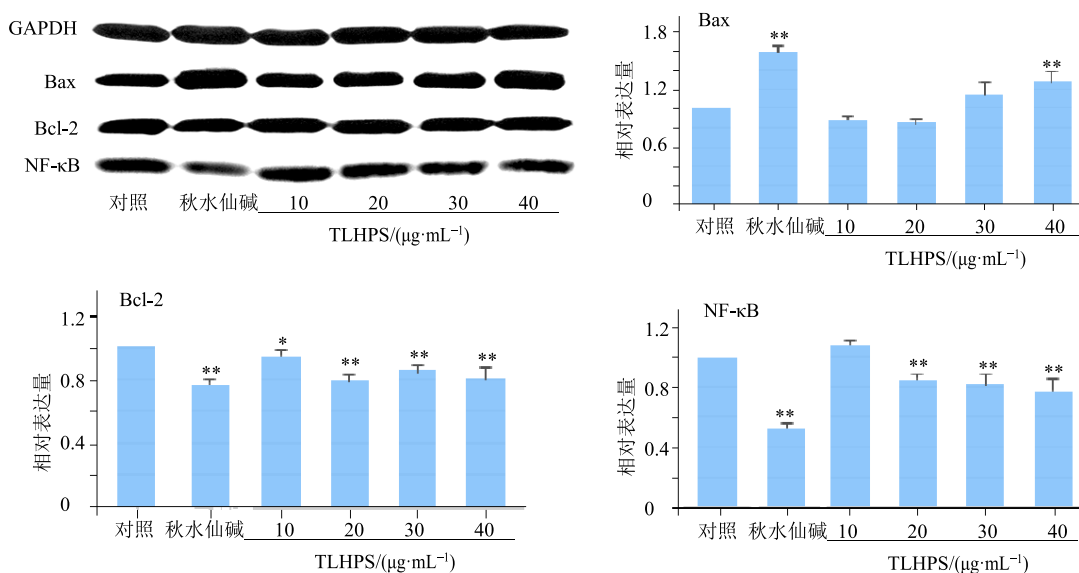


图 3 TLHPS 对 HSC-T6 细胞 Bax、Bcl-2、NF- κ B 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of TLHPS on protein expression of Bax, Bcl-2, and NF- κ B in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

比, TLHPS 10 、 20 、 30 、 $40\ \mu\text{g/mL}$ 各组 G₀/G₁ 期细胞数明显增多 ($P<0.01$), G₂/M 期细胞数无明显差异 ($P>0.05$), S 期细胞数明显减少 ($P<0.01$), 结果见表 2。

3.4 TLHPS 对 Bcl-2、Bax、NF- κ B 蛋白表达的影响

与对照组相比, TLHPS 10 、 20 、 30 、 $40\ \mu\text{g/mL}$ 组 Bcl-2 蛋白表达明显降低 ($P<0.05, 0.01$), TLHPS $40\ \mu\text{g/mL}$ 组 Bax 蛋白表达明显升高 ($P<0.01$), TLHPS 20 、 30 、 $40\ \mu\text{g/mL}$ 组 NF- κ B 表达明显降低 ($P<0.01$), 结果见图 3。

4 讨论

肝纤维化是肝脏对各种原因所致肝损伤的创伤愈合反应, 是各种慢性肝病共有的病理过程。肝纤维化的发生以细胞外基质 (ECM) 的合成与降解失衡后, ECM 过度沉积为病理特征。ECM 主要来源于肝星形细胞 (hepatic stellate cells, HSC), 并通过 HSC 的激活与分化调控机制最终形成 ECM 过度

沉积, 导致肝纤维化的发生^[3-4]。HSC 的激活和增殖促进肝纤维化, 抑制其增殖、诱导其凋亡, 可减轻甚至逆转肝纤维化^[4-6]。秋水仙碱具有直接抑制肝细胞内微血管形成、干扰胶原分泌、促进胶原降解、抑制细胞分裂增殖等作用, 但由于秋水仙碱为细胞分裂抑制剂, 在治疗肝纤维化过程中部分病人出现造血系统及消化道副作用, 在临床应用上受到限制^[7]。目前对肝纤维化的治疗尚无安全有效的药物, 而近年来中药及天然产物在肝纤维化治疗中的独特疗效日益凸显。本研究采用秋水仙碱为对照药物, 研究 TLHPS 抗肝纤维化的作用机制, 为临床应用提供实验依据。

在本实验中, 用 CCK8 法检测 TLHPS 对细胞增殖的影响。结果显示, 随着 TLHPS 浓度及作用时间的增加, HSC-T6 细胞的增殖抑制率明显增高。TLHPS 40 $\mu\text{g/mL}$ 组的 24 h 和 48 h 增殖抑制率较秋水仙碱高, 72 h 的增殖抑制率低于秋水仙碱。

细胞凋亡是一种主动的细胞死亡过程, 是由生理或病理信号引发的自发性细胞清除过程, 是区别于坏死的一种细胞程序性死亡方式。近年研究表明, 肝纤维化的消退、活化状态 HSC 的减少主要是由于 HSC 发生凋亡, 而不是其表型的转化。HSC 凋亡是消除活化 HSC 的一种理想方式, 可以在不引起溶酶体等细胞器的破坏以及微环境发生炎症损伤的情况下减少活化的 HSC 数量, 也是导致活化的 HSC 减少的中心环节^[4,8-10]。细胞发生凋亡时, 细胞膜成分发生改变, 如磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 外翻^[4,11]。Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 能与 PS 高亲和力特异性结合, 以荧光素标记的 Annexin V 作为探针, 利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。本实验采用流式细胞术 Annexin V FITC/PI 双染法检测 HSC 的凋亡情况, 结果显示, HSC-T6 细胞经 TLHPS 作用后, 细胞增殖受抑制, 细胞膜上磷脂酰丝氨酸外翻 (Annexin V⁺ 细胞), 表明 TLHPS 可以显著诱导肝星状细胞凋亡, 且凋亡程度与药物浓度有关。TLHPS 40 $\mu\text{g/mL}$ 与秋水仙碱 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 效果接近。

HSC 的增殖、凋亡与细胞周期的调控有密切关系。细胞周期分为 G_1 、S、 G_2 、M 期 4 个连续的时期, 细胞不增殖时处于 G_0 期^[10,12]。其中 G_0/G_1 期细胞的 DNA 量为二倍体 ($2n$), G_2/M 期细胞的 DNA 量增加为四倍体 ($4n$), S 期细胞的 DNA 量介于二倍体和四倍体之间 ($2n \sim 4n$)。流式细胞仪通过检测细胞的 DNA 量, 将细胞分为 G_0/G_1 、S、 G_2/M 期。在细胞周期的 G_0/G_1 期及 G_2/M 期存在着具有确保

细胞有丝分裂同步进行功能的细胞周期调控检验点, 保证细胞周期在上游事件正确完成的情况下才能启动下游事件。因此, 在细胞周期 G_0/G_1 期及 G_2/M 期发生改变将会导致细胞分裂不能正常进行, 进而影响细胞的增殖与分化。为进一步研究细胞凋亡发生的周期时间点, 本研究通过流式细胞仪检测 HSC-T6 细胞内 DNA 量来确定细胞所处的周期时相。研究结果表明, TLHPS 可导致 HSC-T6 细胞发生 G_1 期阻滞, 阻止其正常进入 S 期, 导致 S 期细胞数量明显减少。说明 TLHPS 可能通过阻滞 HSC-T6 细胞在 G_1 期, 抑制 HSC-T6 细胞的增殖并诱导其凋亡。

Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡相关基因中研究最多的一类蛋白质, Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最有代表性的抑制凋亡基因和促进凋亡基因, 并且 Bax 是 Bcl-2 活性的主要调控因子^[10,13]。另一方面, Bcl-2 又具有细胞周期阻滞作用, 降低细胞的增殖能力, 且其抗凋亡与抗增殖的能力可能是独立的, 而 Bax 却可加速 S 期的进程, 促进增殖。研究表明 Bcl-2 和 Bax 在 HSC 凋亡中具有重要的作用, 但其调节细胞凋亡的确切作用机制尚未阐明^[13-14]。本研究结果显示 TLHPS 可以提高 Bax 蛋白的表达, 降低 Bcl-2 蛋白的表达, 说明了二者既有可能是相互作用又有可能是相对独立作用在 HSC-T6 细胞的增殖和凋亡上, 而作用机制需进一步验证。

近年来, 随着对肝纤维化产生的分子机制研究的不断深入, 人们发现在肝纤维化发生发展的过程中, HSCs 的激活、凋亡与许多细胞因子及细胞内信号转导系统的调控有关, 其中, 调节 HSCs 凋亡这一关键过程的细胞因子是 NF- κ B^[15]。在肝纤维化产生的损伤过程中, NF- κ B 刺激枯否细胞 (KC) 产生各种炎性因子, 扩大肝脏炎症, 还同时促进 HSCs 的活化, 从而参与调控肝细胞的凋亡和增殖。大量的研究证明, NF- κ B 在 HSCs 和肝细胞中均具有抗凋亡作用。本研究结果显示, TLHPS 可以明显降低 NF- κ B 的表达, 也说明了其促进 HSC-T6 凋亡的可能机制与抑制 NF- κ B 的表达有关。

目前, 就肝纤维化形成机制的研究已初步完成, 尚有很多影响纤维化形成的原因尚不明确。前期研究已初步证明 TLHPS 对 CCl_4 致肝纤维化大鼠的肝组织及肝功能损伤具有明显的保护作用^[2]。本实验在此基础上, 进一步探讨了 TLHPS 对 HSC-T6 细胞增殖和凋亡的影响。在后续工作中, 将对其肝纤维化治疗作用作进一步的研究, 为临床用药提供强有力的证据。

参考文献

- [1] 张洪彬. 波棱瓜子抗肝损伤有效部位化学成分及其活性研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2007.
- [2] 刘伟, 符小红, 黄思远, 等. 藏药波棱瓜子总木脂素对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用及机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3): 61-65.
- [3] 李隆云, 德吉拉姆, 卫莹芳, 等. 藏药波棱瓜子的文献查考 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 893-894.
- [4] Kubo N, Saito R, Hamano K, *et al.* Conophylline suppresses hepatic stellate cells and attenuates thioacetamide-induced liver fibrosis in rats [J]. *Liver Int*, 2014, 34(7): 1057-1067.
- [5] 樊尔艳, 贺松其, 文彬, 等. 鳖甲煎丸对大鼠肝星状细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(8): 960-966.
- [6] 孔德松, 张自力, 雷娜, 等. 姜黄素对血小板衍生长因子诱导活化的肝星状细胞细胞外基质的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 70-74.
- [7] 张国民, 王鑫, 赵新辉. 肝纤维化形成机制的研究进展 [J]. 中国健康月刊, 2011, 30(8): 56-58.
- [8] 夏海珊, 陈少茹, 钟月春, 等. 肝纤维化的发病机制和药物治疗现状 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(18): 162-165.
- [9] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239-257.
- [10] 陶庆, 胡义扬. 中药抗肝纤维化作用与诱导肝星状细胞凋亡机制研究概述 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2007, 17(2): 125-127.
- [11] 倪春艳, 郑仕中, 陆茵, 等. 以瘦素为靶点中药单体成分防治肝纤维化研究策略及进展 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1837-1841.
- [12] Taylor R C, Cullen S P, Martin S J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1): 231-241.
- [13] 吴丹, 谷秋红, 李智伟. 细胞周期素依赖性激酶、细胞周期调控与肝纤维化 [J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(22): 2158-2163.
- [14] 梁红梅, 朱清静, 杨玲, 等. 别毒护肝方药物血清对肝星状细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 的影响 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 19(2): 98-99.
- [15] 赵晓芳, 李中华, 付蕾, 等. 半枝莲含药血清对肝星状细胞凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 的影响 [J]. 临床医药实践, 2013, 22(2): 112-114.