

基于 JNK 信号通路探讨扶肝化纤汤对肝星状细胞活化增殖的影响

肖政华¹, 李婷婷^{2,3}, 石以石^{2,4}, 杨庆万², 李珊珊²

1. 贵州中医药大学第二附属医院 消化内科, 贵州 贵阳 550001

2. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

3. 兰州新区第一人民医院, 甘肃 兰州 730300

4. 眉山市中医医院, 四川 眉山 620000

摘要: 目的 探讨扶肝化纤汤对肝星状 HSC-T6 细胞活化增殖及 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路的影响。方法 SD 大鼠 ig 扶肝化纤汤制备含药血清, 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导 HSC-T6 细胞活化, 设置对照组 (10%胎牛血清)、模型组 (15%正常血清)、扶肝化纤汤含药血清组 (15%含药血清)、JNK 抑制剂组 (15%正常血清、20 μ mol/L SP600125), 干预 24 h。CCK-8 法检测各组 HSC-T6 细胞增殖情况; ELISA 法检测细胞上清液中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平; Western blotting 检测 p-JNK 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 表达; qRT-PCR 检测 JNK 和 α -SMA mRNA 表达; 细胞免疫荧光检测 α -SMA 表达。结果 TGF- β 1 诱导 24 h 后, HSC-T6 细胞变长, 胞体变大, 胞质内折光颗粒减少, 部分细胞融合成片状。与模型组比较, 各给药组均可明显抑制 HSC-T6 增殖 ($P < 0.05$), 显著抑制炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的分泌 ($P < 0.05$), 下调 p-JNK、 α -SMA 蛋白表达及 JNK、 α -SMA mRNA 表达水平 ($P < 0.05$), 扶肝化纤汤含药血清与 JNK 抑制剂作用相当。结论 扶肝化纤汤可抑制 HSC 细胞活化增殖, 减少活化 HSC-T6 细胞 JNK、 α -SMA mRNA 表达, 降低 p-JNK、 α -SMA 蛋白表达水平。抑制 JNK 信号通路激活可能是扶肝化纤汤抗肺纤维化的另一种作用机制。

关键词: 扶肝化纤汤; 肝星状细胞; JNK 信号通路; 肝纤维化; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 柴胡皂苷 A

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2023)16 - 5283 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.16.017

Effect of Fugan Huaxian Decoction on activation and proliferation of hepatic stellate cells based on JNK signaling pathway

XIAO Zheng-hua¹, LI Ting-ting^{2,3}, SHIYI Shi-ze^{2,4}, YANG Qing-wan², LI Shan-shan²

1. Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

2. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

3. The First People's Hospital of Lanzhou New Area, Lanzhou 730300, China

4. Meishan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Meishan 620000, China

Abstract: Objective To explore the effect of Fugan Huaxian Decoction (扶肝化纤汤) on activation and proliferation of hepatic stellate HSC-T6 cells and the signal pathway of c-Jun N-terminal kinase (JNK). **Methods** SD rats were ig Fugan Huaxian Decoction to prepare medicated serum, and HSC-T6 cells were activated by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). The rats were divided into control group (10% fetal bovine serum), model group (15% normal serum), Fugan Huaxian Decoction medicated serum group (15% medicated serum) and JNK inhibitor group (15% normal serum and 20 μ mol/L SP600125). The proliferation of HSC-T6 cells in each group was detected by CCK-8 method. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cell supernatant were detected by ELISA. Western blotting was used to detect the expressions of p-JNK and α -smooth muscle actin (α -

收稿日期: 2023-04-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660790); 青年岐黄学者项目 (国中医药人教发[2020]7号); 贵州省高等学校中西医结合防治疾病转化医学重点实验室项目 (黔教技[2023]017号)

作者简介: 肖政华 (1977—), 男, 博士生导师, 教授, 青年岐黄学者, 研究方向为中西医结合防治消化系统疾病基础及临床。

E-mail: 435204673@qq.com

SMA). The expressions of *JNK* and α -SMA mRNA was detected by qRT-PCR. The expression of α -SMA was detected by cell immunofluorescence. **Results** After 24 h of TGF- β 1 induction, HSC-T6 cells became longer, the cell body became larger, the refractive particles in cytoplasm was decreased, and some cells merged into sheets. Compared with model group, each drug group significantly inhibited the proliferation of HSC-T6 ($P < 0.05$), significantly inhibited the secretion of inflammatory factors IL-1 β , IL-6 and TNF- α ($P < 0.05$), and down-regulated p-JNK and α -SMA protein and *JNK*, α -SMA mRNA expressions ($P < 0.05$). Fugan Huaxian Decoction medicated serum had the same effect as JNK inhibitor. **Conclusion** Fugan Huaxian Decoction can inhibit the activation and proliferation of HSC cells, reduce the expressions of *JNK* and α -SMA mRNA in activated HSC-T6 cells, and reduce the expression levels of p-JNK and α -SMA protein. Inhibition of JNK signaling pathway activation may be another mechanism of anti-hepatic fibrosis of Fugan Huaxian Decoction.

Key words: Fugan Huaxian Decoction; hepatic stellate cells; JNK signaling pathway; hepatic fibrosis; astragaloside IV; calycosin-7-glucoside; saikosaponin A

肝纤维化是在各种慢性损肝因素的作用下, 损伤与修复过程中细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的合成和降解不平衡, 最终导致 ECM 在肝内过度沉积所致。肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理基础^[1]。肝硬化和终末期肝病已是全球健康负担和致死的主要原因之一^[2]。如何有效防治及逆转肝纤维化一直是当今世界医学热点和难题, 但迄今还没有理想的抗肝纤维化生物或化学药物, 中医药治疗肝纤维化有较好的疗效, 近年来备受关注^[3]。c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 通路参与调节细胞增殖、凋亡、自噬和炎症等多种细胞过程, 与肝纤维化密切相关^[4-5]。课题组长期采用扶肝化纤汤治疗肝纤维化并取得较好临床疗效, 前期研究发现该方可能通过调控 p-JNK、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、p38 蛋白表达, 抑制有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路延缓肝纤维化大鼠的肝脏病理进展^[6], 但尚未对扶肝化纤汤调节 MAPK 信号通路是否介导了肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 的活化增殖过程进行探讨。因此, 本研究以 HSC-T6 细胞为对象, 加入 5 ng/mL 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导建立体外肝纤维化模型, 探究扶肝化纤汤含药血清对 HSC-T6 细胞活化增殖、JNK 信号通路和炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的影响, 为进一步开发和临床应用提供基础。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 40 只, 体质量 (200 \pm 20) g, 购自长沙市天勤生物技术有限公司, 动物许可证编

号 SCXK (湘) 2019-0014。动物饲养于贵州中医药大学甲秀校区动物实验中心, 自然采光, 通风, 室温 18~20 $^{\circ}$ C, 自由进食饮水。动物实验经贵州中医药大学第二附属医院伦理委员会批准 (批准号 20210035)。

1.2 细胞

HSC-T6 细胞购自北京北纳创联生物技术研究院。

1.3 药材

扶肝化纤汤由黄芪 20 g、当归 20 g、白芍 20 g、鳖甲 20 g、丹参 20 g、白术 20 g、枳实 15 g、黄精 15 g、柴胡 10 g、绞股蓝 10 g、炙甘草 6 g、三七 5 g 组成, 以上药材均购自贵州中医药大学第二附属医院中药房, 由贵州中医药大学第二附属医院药学部杨亮副主任药师分别鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲、唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果、百合科植物黄精 *Polygonatum sibiricum* Red 的干燥根茎、伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根、葫芦科植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 的全草、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 干燥根和根茎的蜜炙法加工品、五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎, 符合《中国药典》2020 年版规定。

1.4 药品与试剂

DMEM 培养基 (批号 11995065)、胎牛血清 (批

号 10099141) 购自美国 Gibco 公司; TGF- β 1 (批号 0713AF354K1115) 购自美国 Peprotech 公司; 胰蛋白酶 (批号 C0201)、CCK-8 试剂盒 (批号 C0039)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 A0208)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液均购自碧云天生物技术有限公司; IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 202211)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 202206)、TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 202206) 购自江苏晶美生物科技公司; qRT-PCR 引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成; RNAiso plus (批号 9109) 购自日本 Takara 公司; p-JNK 兔抗 (批号 4468S) 购自美国 CST 公司; α -SMA 鼠抗 (批号 ab7817)、FITC 标记的 α -SMA 抗体 (批号 ab7817)、Alexa Fluor 二抗 (批号 ab6785) 购自英国 Abcam 公司; β -actin 兔抗 (批号 380624) 购自杭州华安生物技术有限公司; JNK 抑制剂 SP600125 (批号 SP60012501) 购自美国 Selleck 生物技术有限公司。

1.5 仪器

Varioskan LUX 多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Stepone plus qRT-PCT 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 170-3930 型 Trans-Blot 转印槽 (美国 Bio-Rad 公司); Tanon-1600 型凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); SP8 型激光共聚焦荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 扶肝化纤汤的制备

按处方配比称取药材, 加水浸泡 1 h, 用 10 倍水量煎煮 2 次 (第 1 次多加 2 倍量水), 每次 1 h, 滤过, 滤液浓缩至 1 g/mL 的药液。扶肝化纤汤中黄芪、柴胡为君药, 其主要药效成分为黄芪甲苷和柴胡皂苷。经高效液相色谱测定, 黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、柴胡皂苷 A 的质量浓度分别为 0.093、0.038、0.029 mg/mL。

2.2 扶肝化纤汤含药血清的制备

据动物与成人每千克体质量剂量折算系数 6.25 计算大鼠中药临床等效量^[7], 即扶肝化纤汤给药剂量为 18.75 g/kg。大鼠随机分为正常组和给药组, 给药组 ig 药物, 正常组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 1 周。给药结束后, 大鼠麻醉, 腹主动脉采血, 4 °C 静置分离 2 h, 4 °C、3000 r/min 离心 10 min, 取上清, 合并同组血清。将血清密封用隔水薄膜包装后, 置于 56 °C 恒温水浴锅内灭活 30 min, 再经 0.22 μ m 滤膜滤过除菌, 于 -20 °C 保存备用。

2.3 细胞培养及分组

HSC-T6 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养, 2~3 d 更换细胞培养液, 观察细胞贴壁情况。设置对照组 (含 15% 正常血清的培养基)、模型组 (含 15% 正常血清的培养基)、扶肝化纤汤含药血清组 (含 15% 扶肝化纤汤含药血清的培养基) 和 JNK 抑制剂组 (含 15% 正常血清和 20 μ mol/L SP600125 的培养基), 模型组和各给药组加入 TGF- β 1 (5 ng/mL), 各给药组加入药物干预 24 h 后进行相关检测。

2.4 CCK-8 法检测扶肝化纤汤含药血清对细胞存活率的影响

取 3~5 代 HSC-T6 细胞, 以 2×10^4 /孔接种于 96 孔板中, 设置对照组、模型组和含药血清 (5%、8%、10%、15%、20%) 组, 对照组加入 200 μ L 含 10% 胎牛血清的培养基, 其余组加入 1 μ L TGF- β 1 (终质量浓度为 5 ng/mL), 含药血清组分别加入 190 μ L 不同体积分数的含药血清培养 24 h, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光值 (A) 值, 计算细胞存活率。

2.5 ELISA 检测细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平

按“2.3”项下方法处理细胞, 收集上清液, 4 °C、1200 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

2.6 Western blotting 检测 p-JNK 和 α -SMA 蛋白表达

按“2.3”项下方法处理细胞, 收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入裂解液于冰上裂解 30 min, 提取细胞总蛋白, BCA 法测定总蛋白浓度, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后, 加入一抗 (1:500), 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次, 加入二抗 (1:5000), 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, ECL 化学发光法显色, 于凝胶成像仪中观察并拍照。

2.7 qRT-PCR 检测 JNK 和 α -SMA mRNA 表达

按“2.3”项下方法处理细胞, 收集细胞, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: GAPDH 上游引物 5'-GATGGTGAAGGTCGGTGTGA-3'、下游引物 5'-GTCAATGAAGGGGTCGTTGA-3'; JNK 上游引物 5'-GGAGCGAACTAAGAATGGCG-3'、下游引物 5'-ACTGCTGTCTGTATCCGAGGC-3'; α -SMA 上游引

物 5'-GGCATCCACGAAACCACCT-3'、下游引物 5'-CCGCCGATCCAGACAGAATA-3'。

2.8 免疫荧光法检测 α -SMA 的蛋白表达

24孔培养板中放入制备好的盖玻片，细胞接种至盖玻片上进行培养，按“2.3”项下方法处理细胞，加入一抗、二抗孵育，含抗荧光淬灭剂封片，激光扫描聚焦显微镜下采集图像。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析，计量资料采用 Shapiro-Wilk (S-W) 法进行正态分布检验，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异采用单因素方差分析，满足正态分布且方差齐的数据用

Bonferroni 检验进行组间两两比较，方差不齐先用 Welch 检验进行总体均值比较，再用 Dunnett's T3 检验进行两两比较。

3 结果

3.1 扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞形态的影响

如图 1 所示，对照组细胞伸展生长，透光度好，呈扁圆形。模型组细胞变长，胞体变大，胞质内折光颗粒减少，部分细胞融合成片状，符合激活型 HSC 表现；扶肝化纤汤含药血清组和 JNK 抑制剂组均可抑制 HSC-T6 细胞生长，细胞趋向表现为静止型 HSC。

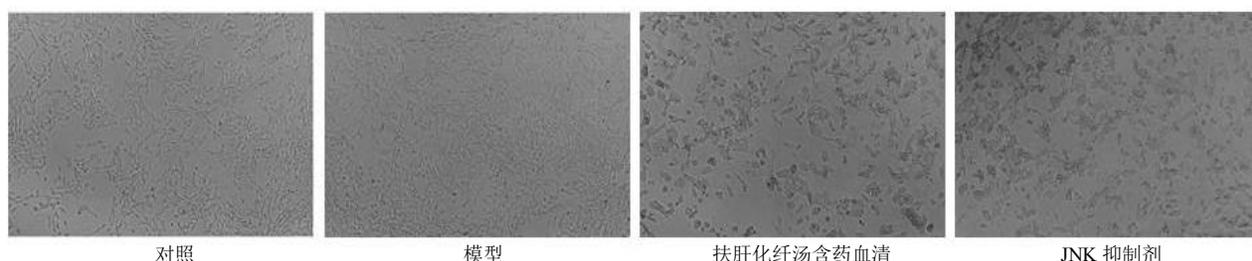


图 1 扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞形态的影响 ($\times 100$)

Fig. 1 Effect of serum containing Fugan Huaxian Decoction on morphology of TGF- β 1-induced HSC-T6 cells ($\times 100$)

3.2 扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞增殖的影响

如表 1 所示，与模型组比较，5%、8%、10%、15%、20%的扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞增殖均有抑制作用 ($P < 0.05$)，以 15%、20%含药血清抑制作用最佳，两组之间无显著性差异，选择 15%含药血清进行后续实验。

3.3 扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平的影响

如表 2 所示，与对照组比较，模型组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均明显升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各给药组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均显著降低 ($P < 0.05$)。

表 1 扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 1 Effect of serum containing Fugan Huaxian Decoction on viability of TGF- β 1-induced HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量	细胞存活率/%
对照	—	104.23 \pm 2.20
模型	—	144.00 \pm 4.02 [#]
扶肝化纤汤含药血清	5%	121.96 \pm 2.27*
	8%	118.42 \pm 1.76*
	10%	112.18 \pm 3.16*
	15%	93.82 \pm 6.14*
	20%	92.75 \pm 5.76*
JNK 抑制剂	20 μ mol·L ⁻¹	92.05 \pm 3.86*

与对照组比较：[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ，下表同
[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group, same as below figures

表 2 扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Table 2 Effect of serum containing Fugan Huaxian Decoction on levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in supernatant of TGF- β 1-induced HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	12.76 \pm 1.38	52.32 \pm 3.39	94.87 \pm 3.51
模型	—	26.74 \pm 2.49 [#]	113.72 \pm 8.06 [#]	175.26 \pm 3.71 [#]
扶肝化纤汤含药血清	15%	13.50 \pm 1.38*	56.43 \pm 5.09*	107.90 \pm 8.21*
JNK 抑制剂	20 μ mol·L ⁻¹	15.55 \pm 1.72*	55.59 \pm 4.25*	107.86 \pm 6.87*

3.4 扶肝化纤汤含药血清对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞 p-JNK 和 α-SMA 蛋白表达的影响

如图 2 和表 3 所示, 与对照组比较, 模型组 p-JNK、α-SMA 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组 p-JNK、α-SMA 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。

3.5 扶肝化纤汤含药血清对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞 JNK 和 SMA mRNA 表达的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组 JNK、α-SMA mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组 JNK、α-SMA mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。

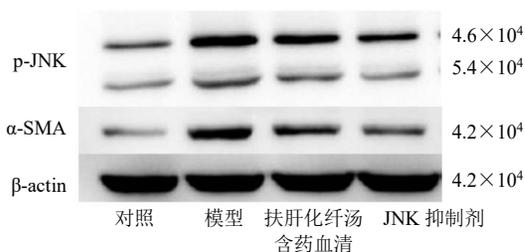


图 2 扶肝化纤汤含药血清对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞 p-JNK 和 α-SMA 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of serum containing Fugan Huaxian Decoction on p-JNK and α-SMA protein expressions in TGF-β1-induced HSC-T6 cells

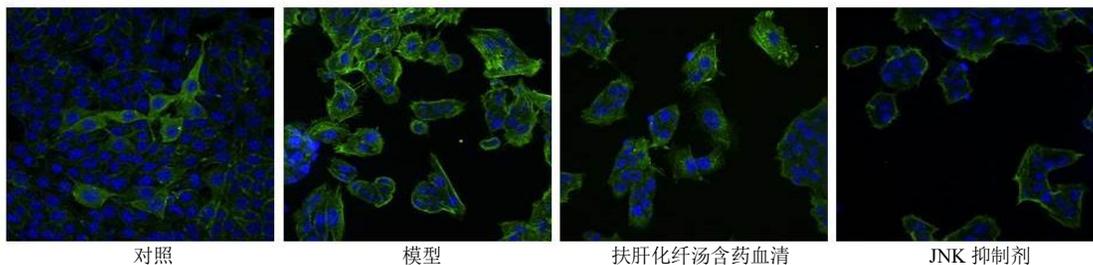


图 3 扶肝化纤汤含药血清对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞 α-SMA 表达的影响 (×400)

Fig. 3 Effect of serum containing Fugan Huaxian Decoction on α-SMA expression in TGF-β1-induced HSC-T6 cells (×400)

活化态, α-SMA 在细胞核内表达。与对照组比较, 模型组 α-SMA 绿色荧光数量增多; 与模型组比较, 各给药组 α-SMA 绿色荧光数量减少。

4 讨论

JNK 激活参与了炎症损伤、伤口愈合等过程中各种细胞的应激反应, 并参与毒性、代谢性、自身免疫性和肿瘤性等肝病损伤的调节, JNK 信号激活可以促使静默的 HSC 转化为肌成纤维细胞^[8]。研究显示在肝纤维化动物模型中 JNK 表达明显升高, 且主要富集在肌成纤维细胞中, 拮抗 JNK 表达后可以缓解肝纤维化动物模型的肝脏纤维化程度^[9], 细胞实验中还发现 JNK 抑制剂阻止了 TGF-β、血小板衍

3.6 免疫荧光法检测各组 α-SMA 的表达

如图 3 所示, TGF-β1 诱导后的 HSC-T6 细胞呈

表 3 扶肝化纤汤含药血清对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞 p-JNK 和 α-SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effect of serum containing Fugan Huaxian Decoction on p-JNK and α-SMA protein expressions in TGF-β1-induced HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量	p-JNK/ β-actin	α-SMA/ β-actin
对照	—	0.385 ± 0.016	0.190 ± 0.046
模型	—	$0.800 \pm 0.006^{\#}$	$0.486 \pm 0.047^{\#}$
扶肝化纤汤含 药血清	15%	$0.503 \pm 0.001^*$	$0.267 \pm 0.028^*$
JNK 抑制剂	$20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.496 \pm 0.023^*$	$0.260 \pm 0.119^*$

表 4 扶肝化纤汤含药血清对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞 JNK 和 SMA mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of serum containing Fugan Huaxian Decoction on JNK and α-SMA mRNA expressions in TGF-β1-induced HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	mRNA 相对表达量	
		JNK	α-SMA
对照	—	1.000	1.000
模型	—	$3.028 \pm 0.212^{\#}$	$4.490 \pm 1.476^{\#}$
扶肝化纤汤 含药血清	15%	$1.501 \pm 0.057^*$	$1.424 \pm 4.617^*$
JNK 抑制剂	$20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.332 \pm 0.095^*$	$1.379 \pm 4.819^*$

生生长因子等细胞因子诱导的小鼠 HSC 活化。

诸多研究证实了 JNK 信号通路与肝纤维化的密切关系, JNK 主要位于细胞质, 在细胞因子 IL-1β、TNF-α 等刺激下发生核转位, 进入细胞核级联激活相应核内转录因子而被磷酸化激活, 促进 c-Jun 及其下游基因转录和蛋白表达, 进一步释放致炎细胞因子, 放大炎症损伤, 参与肝纤维化的发生、发展, 在肝脏疾病发病中有关键作用^[9]。IL-1 对 HSC 活化中具有关键作用, 并调节肝损伤引起的纤维化的发展, 已经确定了 IL-1 家族表达与肝纤维化严重程度呈正相关^[10]。IL-6 主要由巨噬细胞和 Th2 细胞产生, 其与 TNF-α 作为促炎介质, 高表达水平可导

致肝细胞坏死,参与肝损伤期间的炎症过程^[11]。Li等^[12]研究发现川陈皮素通过靶向 JNK 信号通路诱导肝细胞凋亡来保护急性肝损伤。Cubero等^[13]研究发现 Myostatin 通过 JNK 信号激活肝星状细胞的成纤维表型发生增殖活化,其 JNK 蛋白直接激活 HSC,促进 I 型胶原纤维形成,使 α -SMA 表达增多。González-Vázquez等^[14]研究发现 JNK 信号通路抑制剂可以有效抑制肝星状细胞的增殖活化从而达到抗肝纤维化的作用。这些研究表明抑制 JNK 信号通路可能实现抗肝纤维化作用。

肝纤维化与中医学“肝癖”“肝着”“积聚”等病内涵相似,中医认为肝脾密切相关,生理上,肝主疏泄,脾主运化;肝藏血,脾统血。脾为气血生化之源,脾得肝之疏泄,则升降协调,运化健旺,气血生化有源,肝血充足则肝有所藏,肝体得以濡养,才会肝气冲和条达,疏泄正常。即所谓“土得木而达”“木赖土以培之”“培土荣木”。《难经·第七十七难》中言:“肝病当传之于脾,故先实其脾气”,仲景承其思想,在《金匱要略》里有云:“见肝之病,知肝传脾,当先实脾,……故实脾,则肝自愈。此治肝补脾之要妙也”。叶天士曰“补脾必以疏肝,疏肝即以补脾也”。因此在慢性肝病中,强调“从脾论治、培土荣木”^[16]。扶肝化纤汤由黄芪、当归、白芍、鳖甲、丹参、白术、枳实、黄精、柴胡、绞股蓝、炙甘草、三七粉组成,临床用于肝纤维化治疗效果明显,前期实验表明^[6,16-17],扶肝化纤汤可保护肝细胞、改善肝功能、控制肝纤维化进展。其机制可能是通过影响 TGF- β 1/Smad 信号转导通路,抑制 TGF- β 1 诱导的 HSC 的活化增殖发挥抗肝纤维化作用。本次实验再次验证扶肝化纤汤含药血清可抑制 HSC 的活化增殖,能够显著下调活化 HSC 的 JNK、 α -SMA mRNA 表达,降低了活化 HSC 的 p-JNK 和 α -SMA 蛋白水平,抑制炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的释放。通过调控 JNK 信号通路抑制 HSC 活化增殖,减少炎症介质分泌,继而减少 ECM 的合成,可能是扶肝化纤汤抗肝纤维化的可能机制之一。但肝纤维化病因病机复杂,介导的细胞信号通路众多,而中药复方制剂往往又具有多层面、多靶点、多途径的作用特性,因此,扶肝化纤汤抗纤维化的作用机制值得进一步研究探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Vyas K, Patel M M. Insights on drug and gene delivery

systems in liver fibrosis [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2023, 18(2): 100779.

- [2] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets [J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1): 76-99.
- [3] 柏兆方,湛小燕,吕桂基,等. 复方中药阻断逆转肝纤维化:超越已知的前沿 [J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(2): 273-277.
- [4] 肖政华,杨辉,杨君,等. 扶肝化纤汤对肝纤维化模型大鼠 MAPK 信号通路的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3374-3381.
- [5] 林琳,刘琪,周文倩,等. JNK 信号通路和纤维化疾病 [J]. 生命的化学, 2020, 40(5): 701-706.
- [6] Wang Q X, Feng J G, Tang L L. Non-coding RNA related to MAPK signaling pathway in liver cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11908.
- [7] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [8] Shan S L, Liu Z X, Liu Z D, et al. MitoQ alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice through regulating JNK/YAP pathway [J]. *Toxicol Res*, 2022, 11(5): 852-862.
- [9] Kluwe J, Pradere J P, Gwak G Y, et al. Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(1): 347-359.
- [10] Gieling R G, Wallace K, Han Y P. Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(6): G1324-G1331.
- [11] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) immunotherapy [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(8): a028456.
- [12] Li M M, Zhao H, Wu J Y, et al. Nobiletin protects against acute liver injury via targeting c-Jun N-terminal kinase (JNK)-induced apoptosis of hepatocytes [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(27): 7112-7120.
- [13] Cubero F J, Mohamed M R, Woitok M M, et al. Loss of c-Jun N-terminal kinase 1 and 2 function in liver epithelial cells triggers biliary hyperproliferation resembling cholangiocarcinoma [J]. *Hepatol Commun*, 2020, 4(6): 834-851.
- [14] González-Vázquez A, Raftery R M, Günbay S, et al. Accelerating bone healing *in vivo* by harnessing the age-altered activation of c-Jun N-terminal kinase 3 [J]. *Biomaterials*, 2021, 268: 120540.
- [15] 肖政华,王敏. 从脾论治肝硬化腹水的临证探析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(12): 1358-1359.
- [16] 肖政华,杨辉,雷伟,等. 扶肝化纤汤对肝纤维化大鼠 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2019, 57(6): 51-60.
- [17] 肖政华,邹艳,杨辉,等. 扶肝化纤汤含药血清对 TGF- β 1 诱导 HSC-T6 细胞增殖及 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(19): 1673-1678.

[责任编辑 李亚楠]