

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.003

肉苁蓉苯乙醇总苷脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的肝星状细胞增殖的影响及作用机制研究*

马晓婷,张石蕾,王志强,陈文龙,由淑萍,刘涛[△]
(新疆医科大学公共卫生学院,乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的** 探讨肉苁蓉苯乙醇总苷(CPhGs)脂质体对重组大鼠血小板衍生生长因子-BB(rrPDGF-BB)诱导的大鼠肝星状细胞(HSC)增殖作用的影响及其抗肝纤维化的相关分子机制。**方法** 取生长状态良好的对数生长期 HSC 用于实验,置于 CPhGs 脂质体浓度为 117.79、58.90、29.45、14.72、7.36、3.68、1.84、0.92 和 0.46 mg/L 的完全培养液,求出半数抑制浓度(IC₅₀);rrPDGF-BB 刺激后,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定 29.45、14.72、7.36 mg/L CPhGs 脂质体对 HSC 增殖的影响;采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I 型胶原、ATF-2 mRNA 的表达水平;采用 Western blot 法检测 CPhGs 脂质体对 p-p38 蛋白表达的影响。**结果** (1)对细胞增殖的影响:对不同时间点结果分析显示,与 Normal 组比较,细胞培养 48 h 时,rrPDGF-BB 组 HSC 细胞明显增多;CPhGs 脂质体各剂量组抑制 rrPDGF-BB 诱导的 HSC 增殖作用,培养 48 h 效率最高;对不同浓度结果分析显示,与 rrPDGF-BB 组比较,不同浓度 CPhGs 脂质体组均可抑制 rrPDGF-BB 诱导的 HSC-T6 的增殖。(2)qRT-PCR 结果:CPhGs 脂质体各剂量组间比较,随 CPhGs 脂质体药物浓度增大, α -SMA、I 型胶原和 ATF-2 mRNA 水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中以 CPhGs 脂质体 29.45 mg/L 组抑制效果最明显。(3)Western blot 分析结果:p-p38 蛋白的表达水平在 CPhGs 脂质体不同浓度组表达均下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);CPhGs 脂质体各剂量组间比较,p-p38 蛋白随 CPhGs 脂质体干预剂量增大,表达水平显著下降($P < 0.05$)。**结论** CPhGs 脂质体能抑制 rrPDGF-BB 诱导的大鼠 HSC 增殖,从而起到抗肝纤维化的作用。

[关键词] 肝星状细胞;肝纤维化;重组大鼠血小板衍生生长因子-BB;肉苁蓉苯乙醇总苷脂质体

[中图分类号] R332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)10-1630-05

Study on effect of liposomes from cistanche phenylethanoid glycosides on proliferation of rrPDGF-BB induced hepatic stellate cells and its action mechanism*

MA Xiaoting, ZHANG Shilei, WANG Zhiqiang, CHEN Wenlong, YOU Shuping, LIU Tao[△]
(College of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of cistanche phenylethanoid glycosides (CPhGs) liposomes on the proliferation of rat hepatic stellate cells (HSC) induced by platelet-derived growth factor-BB (rrPDGF-BB) and the related molecular mechanisms of its anti-hepatic fibrosis. **Methods** HSC in logarithmic growth phase were cultured in complete medium with CPhGs liposome concentrations of 117.79, 58.90, 29.45, 14.72, 7.36, 3.68, 1.84, 0.92 and 0.46 mg/L. And the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. After rrPDGF-BB stimulation, the effects of liposome concentrations of 29.45, 14.72, 7.36 mg/L on HSC proliferation were detected by MTT method. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of α -SMA, collagen I and ATF-2 mRNA. Western blot was used to detect the influence of CPhGs liposome on the expression of p-p38 protein. **Results** (1) Effect on cell proliferation: compared with the normal group, HSC in the rrPDGF-BB group increased significantly after 48 hours of cell culture. CPhGs liposome inhibited the proliferation of HSC induced by rrPDGF-BB with the highest efficiency after 48 hours of culture. CPhGs liposome inhibited the proliferation of HSC at different concentrations compared with the rrPDGF-BB group, and CPhGs liposome at different concentrations all could inhibit the proliferation of HSC-6 induced by rrPDGF-BB. (2) The results of qRT-PCR: the content of α -SMA, Collagen I and ATF-2 mRNA decreased significantly with the increase of CPhGs liposome concentration among the different dosage groups ($P < 0.05$), and the inhibition effect of CPhGs liposome 29.45 mg/L was most effective. (3) Western blot analysis: the expression of p-p38 protein decreased in different concentration of CPhGs liposomes with statistical significance ($P < 0.05$). Compared among different dose of CPhGs liposomes, the expression of

p-p38 protein decreased significantly with the increase of CPhGs liposomes intervention dose ($P < 0.05$). **Conclusion** CPhGs liposomes can inhibit the proliferation of HSC induced by rrPDGF-BB, thereby plays the anti-liver fibrosis role.

[Key words] hepatic stellate cells; liver fibrosis; recombinant rat platelet-derived growth factor-BB; herba cistanche benzoside liposomes

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是一种常见的慢性肝损伤过程,许多与肝损伤相关的因素都可以导致 HF^[1]。在 HF 病理过程中常出现以下症状:肝细胞坏死、结缔组织异常增生、肝循环紊乱等,最终导致肝硬化继而引发肝衰竭^[2]。之前的研究报道指出, HF 是一种可逆的病理现象,早期预防或治疗 HF 对慢性肝病的治疗有重要意义^[3]。目前研究的重点是寻找疗效确切、不良反应小的药物,以延缓、抑制甚至逆转 HF 的进程^[4]。一些临床实践和试验研究证明,中药通过多成分、多路径、多层次、多目标的综合药理作用能减缓 HF 的进程^[5-7]。肉苁蓉是名贵的补益类中药,分布于中国北部的干旱地区和沙漠地区^[8]。脂质体作为载体在临床应用中具有安全性好、生物相容性好、载药及靶向效果明确的优点,也是最早用于靶向给药的载体^[9]。本研究旨在探讨肉苁蓉苯乙醇总苷(CPhGs)脂质体对重组大鼠血小板衍生生长因子(rrPDGF-BB)诱导的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)增殖的作用,为肝纤维化的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

用薄膜分散二次包封法制备 pPB 修饰的肉苁蓉总苷靶向脂质体,其粒径为 212.7 nm,电位 35~50 mV,包封率(38.46±7.85)%,由本实验室保存。HSC(中乔新舟),胎牛血清(美国 Gibco 公司),青霉素(美国 Hyclone 公司),链霉素(美国 Hyclone 公司),DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司),四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司),磷酸盐缓冲液(PBS, BI 公司),0.25%胰酶(美国 Hyclone 公司),TRIzol Reagent(赛默飞公司),RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(赛默飞公司),SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa 公司),PIPA 裂解液(赛默飞公司),蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF,博士德生物),蛋白定量试剂盒(BioMIGA 公司),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒(北京索莱宝公司),5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液(北京索莱宝公司),10×电转液(北京索莱宝公司),10×TBST(北京索莱宝公司),无水乙醇(天津大茂化学试剂厂),异丙醇(天津富宇精细化工有限公司),氯仿(天津大茂化学试剂厂),甲醇(天津市大茂化学试剂厂),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(中杉金桥),rrPDGF-BB(R&D 公司),4×蛋白上样缓冲液(北京索莱宝公司),兔抗 β-actin 多克隆抗体(北京博奥森生物科技有限公司),兔抗 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)多克隆抗体(北京博奥森生物科技有限公司),兔抗 p-p38 MAPK 多克隆抗体(北京博奥森生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代

大鼠 HSC 在含有 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素和 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 细胞培养液,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞隔日换液,待生长融合至 80%~90% 时,使用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,按 1:2 进行传代培养,实验均采用对数生长期细胞。

1.2.2 抑制率为 50% 时的药物浓度计算

实验设 9 个 CPhGs 脂质体系列浓度组和 1 个空白对照组,共 10 组,每组 3 个复孔。CPhGs 脂质体系列浓度组剂量分别为 117.79、58.90、29.45、14.72、7.36、3.68、1.84、0.92 和 0.46 mg/L。将处于对数生长期,浓度为 5×10^4 /mL 的 HSC-T6 细胞悬液接种于 96 孔板,每孔添加量为 100 μL,每组设 3 个复孔,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,观察细胞生长状态,若贴壁则弃上清液,根据分组设计分别更换含 117.79、58.90、29.45、14.72、7.36、3.68、1.84、0.92 和 0.46 mg/LCPhGs 脂质体的完全培养液和空白完全培养液。加药后轻晃混匀,放至培养箱继续培养 48 h,镜下观察细胞状态,拿至工作台,避光,每孔加浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,放至培养箱,4 h 后,吸去孔里的液体,每孔加入 DMSO 150 μL,于摇床轻晃 10 min,用酶标仪于 492 nm 波长测定,记录吸光度(A)值。计算各复孔 A 值能平均值,计算抑制率,以此找寻 CphGs 脂质体的最佳作用浓度。抑制率(%) = (1 - 各浓度的平均 A 值) / 空白组平均 A 值 × 100%; 以 CPhGs 脂质体作用浓度为横轴,细胞生长抑制率为纵轴,绘制 CPhGs 脂质体作用于 HSC-T6 的量效反应曲线,采用 Probit 分析计算 50% 存活率的 CPhGs 脂质体浓度,即为半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.2.3 细胞分组

(1) Normal 组; (2) rrPDGF-BB 组; (3) rrPDGF-BB + 29.45 mg/L CPhGs 脂质体组; (4) rrPDGF-BB + 14.72 mg/L CPhGs 脂质体组; (5) rrPDGF-BB + 7.36 mg/L CPhGs 脂质体组。各组细胞均培养 24 h 后进行后续实验。

1.2.4 不同浓度 CPhGs 脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的 HSC 增殖的影响

大鼠 HSC 以 1×10^5 /mL 密度接种至 96 孔板,待细胞贴壁后进行分组干预,每组设 3 个复孔。分别培养 24、48 和 72 h,每孔加入 20 μL 的 MTT 溶液,培养箱内 37 °C 培养 4 h 后,弃去 MTT 溶液,再向各孔内加入 150 μL 的 DMSO,置于摇床室温摇动 10 min,待结晶充分溶解后,于酶标仪 492 nm 波长处测定 A 值。抑制率 = [(模型组 - 空白组) - (用药组 - 空白组)] / (模型组 - 空白组) × 100%。

1.2.5 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测

α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I 型胶原和 ATF-2 的 mRNA 的表达 Trizol 试剂盒提取大鼠 HSC 总 RNA,经纯度及完整性鉴定后反转录反应生成 cDNA。按照 qRT-PCR 试剂盒说明书建立 qRT-PCR 反应体系,使用 qRT-PCR 检测仪进行检测。qRT-PCR 热循环参数:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,共 40 个循环。结果分析以 β -actin 为内参基因,确定每个样品、每个基因扩增的循环阈值(CT),按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因的相对表达水平,所用引物序列见表 1。

表 1 目的基因和内参基因的实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列
α -SMA	F:5'-GCGTGGCTATTCCTTCGTGACTAC-3'
	R:5'-CCATCAGGCAGTTCGTAGCTCTTC-3'
I 型胶原	F:5'-AACGCTATTGCCTGATGGACAGTC-3'
	R:5'-CGCTGAGTCAAGGATGACGAAGAG-3'
ATF-2	F:5'-ACATACAGAAGCGATCCAGCACAG-3'
	R:5'-GGAGGAAGGAGCCATGACAATCTG-3'
β -actin	F:5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'
	R:5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'

F:正向;R:反向

1.2.6 Western blot 法分析 p-p38 蛋白表达水平 收集细胞,运用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取相同质量的蛋白上样,经 SDS-PAGE 转移至硝酸纤维素膜,5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗(1:1 000 兔抗 p-p38 多克隆抗体;1:1 000 兔抗 p38 多克隆抗体)4 °C 摇床孵育过夜,TBST 漂洗 3 次,二抗(1:25 000 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG)室温避光孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次后,电化学发光(ECL)显影试剂盒曝光显影。利用图像分析软件 Image J 对条带进行灰度值的测定,计算分析各组蛋白相对表达水平,以 p-p38 与 p38 条带信号强度的比值表示 p-p38 蛋白表达水平。

表 2 不同浓度 CPhGs 脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的 HSC 增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	A 值		
	24 h	48 h	72 h
Normal 组	0.56 \pm 0.02	0.92 \pm 0.03	1.42 \pm 0.02
rrPDGF-BB 组	0.84 \pm 0.04 ^a	1.31 \pm 0.01 ^a	1.95 \pm 0.05 ^a
rrPDGF-BB+29.45 mg/L CPhGs 脂质体组	0.75 \pm 0.03 ^{ab}	1.11 \pm 0.03 ^{ab}	1.66 \pm 0.07 ^{ab}
rrPDGF-BB+14.72 mg/L CPhGs 脂质体组	0.77 \pm 0.04 ^{ab}	1.15 \pm 0.01 ^{ab}	1.73 \pm 0.02 ^{ab}
rrPDGF-BB+7.36 mg/L CPhGs 脂质体组	0.81 \pm 0.02 ^a	1.20 \pm 0.02 ^{ab}	1.84 \pm 0.05 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与 Normal 组比较;^b: $P<0.05$,与 rrPDGF-BB 组比较

表 3 不同浓度 CPhGs 脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的 HSC 增殖抑制率的影响($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	抑制率		
	24 h	48 h	72 h
rrPDGF-BB+29.45 mg/L CPhGs 脂质体组	32.45 \pm 4.90	50.73 \pm 2.03	54.68 \pm 8.25
rrPDGF-BB+14.72 mg/L CPhGs 脂质体组	26.63 \pm 6.91	41.32 \pm 8.38 ^a	40.77 \pm 3.65 ^a
rrPDGF-BB+7.36 mg/L CPhGs 脂质体组	10.77 \pm 7.08 ^{ab}	26.50 \pm 1.76 ^{ab}	20.75 \pm 3.90 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与 rrPDGF-BB+29.45 mg/L CPhGs 脂质体组比较;^b: $P<0.05$,与 rrPDGF-BB+14.72 mg/L CPhGs 脂质体组比较

2.3 不同时间、不同浓度 GPhGs 脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的 HSC 增殖抑制的影响 在 24 h 时,与

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间计量资料比较采用两独立样本 t 检验,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GPhGs 脂质体对 HSC 的 IC₅₀ 由于 CPhGs 脂质体药物浓度的递增,HSC 的抑制率随之增加,当 CPhGs 脂质体药物浓度为 117.79 mg/L 时,抑制率为(69.09 \pm 1.06)%,经过 Probit 分析,CPhGs 脂质体药物的 IC₅₀ 为 29.06 mg/L,见图 1。

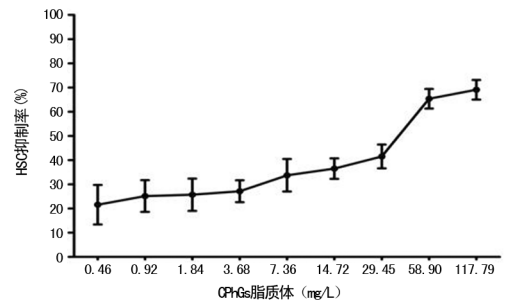
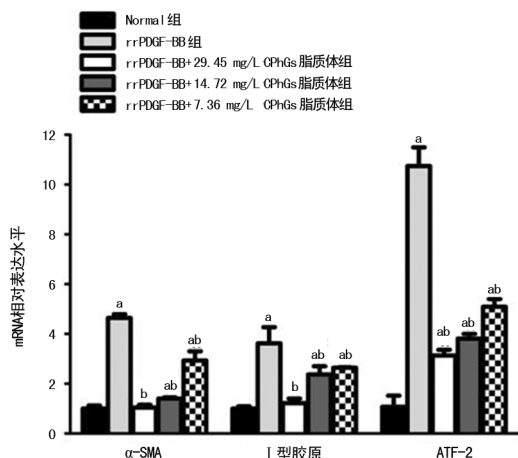


图 1 GPhGs 脂质体对 HSC 的 IC₅₀

2.2 不同时间、不同浓度 GPhGs 脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的 HSC 增殖的影响 MTT 实验结果显示在 24 h 时,与 Normal 组比较,rrPDGF-BB 组和不同浓度 CPhGs 脂质体组 A 值显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 rrPDGF-BB 组比较,除 7.36 mg/L CPhGs 脂质体组外,其余浓度 CPhGs 脂质体组 A 值显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。在 48 h 和 72 h 时,与 Normal 组比较,rrPDGF-BB 组和不同浓度 CPhGs 脂质体组 A 值显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 rrPDGF-BB 组比较,不同浓度 CPhGs 脂质体组 A 值显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

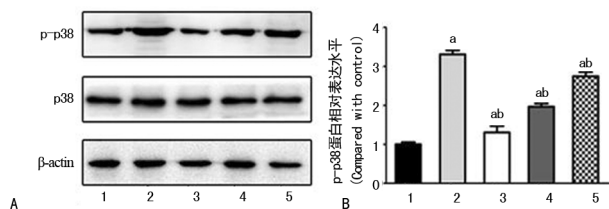
29.45 mg/L 和 14.72 mg/L CPhGs 脂质体组比较, 7.36 mg/L CPhGs 脂质体组抑制率显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 48 h 和 72 h 与 29.45 mg/L CPhGs 脂质体组比较, 14.72 mg/L 和 7.36 mg/L CPhGs 脂质体组抑制率显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 14.72 mg/L CPhGs 脂质体组比较, 7.36 mg/L CPhGs 脂质体组抑制率显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.4 GPhGs 脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的 HSC α -SMA、I 型胶原、ATF-2 mRNA 表达的影响 qRT-PCR 实验结果显示, 与 Normal 组比较, α -SMA 和 I 型胶原基因在 rrPDGF-BB 组、14.72 mg/L 和 7.36 mg/L CPhGs 脂质体组表达显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 rrPDGF-BB 组比较, α -SMA 和 I 型胶原基因在不同浓度 CPhGs 脂质体组表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Normal 组比较, ATF-2 基因在 rrPDGF-BB 组和不同浓度 CPhGs 脂质体组表达显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 rrPDGF-BB 组比较, ATF-2 基因在不同浓度 CPhGs 脂质体组表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



a: $P < 0.05$, 与 Normal 组比较, b: $P < 0.05$, 与 rrPDGF-BB 组比较

图 2 GPhGs 脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的 HSC α -SMA、I 型胶原、ATF-2 mRNA 表达的影响



A: Western blot 检测蛋白条带; B: Western blot 条带灰度统计分析图; a: $P < 0.05$, 与 Normal 组比较, b: $P < 0.05$, 与 rrPDGF-BB 组比较; 1: Normal 组; 2: rrPDGF-BB 组; 3: rrPDGF-BB + 29.45 mg/L CPhGs 脂质体组; 4: rrPDGF-BB + 14.72 mg/L CPhGs 脂质体组; 5: rrPDGF-BB + 7.36 mg/L CPhGs 脂质体组

图 3 GPhGs 脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的 HSC p-p38 蛋白表达的影响

2.5 GPhGs 脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的 HSC p-p38 蛋白表达的影响 Western blot 实验结果显示,

与 Normal 组比较, p-p38 蛋白在 rrPDGF-BB 组和不同浓度 CPhGs 脂质体组表达显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 rrPDGF-BB 组比较, p-p38 蛋白在不同浓度 CPhGs 脂质体组表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

3 讨 论

HF 是世界范围内的健康问题, 50% 的肝癌患者死于 HF^[10]。尽管 HF 发病率高, 但目前尚无有效的治疗方法。目前抗 HF 的治疗策略的主要目的是抑制 HSC 活化和增殖。血小板生长因子 (PDGF)-BB 存在于肝脏中, 对 HSC 的增殖有着较强的促进作用, 能促进 HSC 活化增殖及胶原分泌, 是一个高度有效的 HSC 促有丝分裂原, PDGF 与其受体 PDGFR 结合形成二聚体后, 激活 MAPK 信号通路, 诱导 HSC 持续活化; 促进 HSC 迁移、增殖的同时抑制其凋亡^[11]。PDGF 信号中断, 通过其受体阻断 MAPK 信号通路, HSC 的增殖和胶原的分泌受到抑制。有学者在研究羟基红花黄色素 A (HSYA) 对 HF 的作用时发现, HSYA 对 PDGF-BB 诱导的 HSC 的增殖有明显的抑制作用^[12]。

本研究用 50 μ g/L 的 rrPDGF-BB 刺激 HSC, 所有实验分组在同一刺激因子作用下进行。MTT 实验结果显示: CPhGs 脂质体作用 24 h 抑制率为 10.77%~32.45%, 且抑制率与实验时间和药物浓度呈线性增加关系, 48 h 抑制率为 26.50%~50.73%, 72 h 抑制率为 20.75%~54.68%。从实验结果可以看出, 实验时间的延长并没有使抑制率发生较大的改变, 作者认为 48 h 是药物的最佳反应时间。研究结果表明, 不同浓度的 CPhGs 脂质体均能抑制 HSC 的增殖。

任何病因的肝损伤最终都会导致 HSC 的活化、肌成纤维细胞分化转为 HF。也就是说, 肌成纤维细胞来自活化和增殖的 HSC, 且被视为是 HF 形成的中介^[13]。而 HSC 的活化则是 HF 的主要过程^[14]。活化的 HSC 通过积累产生 ECM, 分泌细胞因子, 增强趋化能力进而促进肝上皮细胞的再生^[15]。在慢性肝病中, HSC 的反复激活导致肝纤维化, 其特征是广泛的瘢痕形成和干扰肝脏正常结构与功能。最近的临床试验提示, HF 在清除潜在病原体过程中是可逆的^[16]。肝损伤后 HSC 经历一个复杂的从静止状态向肌成纤维细胞转换或激活过程, 其中 α -SMA 在肌成纤维细胞分化中起作用。 α -SMA 降低了收缩力和 I 型胶原合成并抑制伤口收缩。I 型胶原和 α -SMA 被认为是肝纤维化中诱导 HSC 活化的标志物。在四氯化碳 (CCl₄) 所致的 HF 研究中发现, HSC 活化过程中 α -SMA 和 I 型胶原表达上调^[17]。而最近的研究表明, HSC 的活化可以由几个促有丝分裂原推动, 包括 PDGF、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)^[18] 和结缔组织生长因子 (CTGF)^[19]。在关于 TRPM7 通道调节 PDGF-BB 诱导的 HSC 增殖的研究数据表明, TRPM7 可降低 α -SMA 和 I 型胶原的表达, 抑制 HF^[20]。

ATF-2 参与多条信号通路的传导,同时在肝组织表达的 ATF-2 的碱基在 p38 磷酸化后出现转录活性和 DNA 结合的增加。本研究探讨不同浓度 CPhGs 脂质体对 rrPDGF-BB 诱导的 HSC 增殖的影响。qRT-PCR 扩增检测 α -SMA、I 型胶原、ATF-2 mRNA 结果提示,与 Normal 组相比,rrPDGF-BB 组 α -SMA、I 型胶原、ATF-2 mRNA 表达明显增高;与 rrPDGF-BB 组相比,不同浓度的 CPhGs 脂质体均可不同程度下调 α -SMA、I 型胶原、ATF-2 mRNA 表达,其中 29.45 mg/L CPhGs 脂质体组下调作用最明显, α -SMA、I 型胶原 mRNA 与 Normal 组比较,差异无统计学差异,作者认为产生这种现象的原因在于浓度越高,其对 rrPDGF-BB 引起的 HSC 增殖的抑制效果越明显,越趋近于正常。作者认为 CPhGs 脂质体能有效抑制 rrPDGF-BB 刺激的 HSC 中 I 型胶原和 ATF-2 mRNA 表达,下调 α -SMA mRNA 表达,进而减少 ECM 合成与分泌,阻止 HF 的形成。

此外,MAPK 信号转导途径及其子系统 p38 通路参与 HSC 的活化,因而可能成为治疗 HF 的靶点。p38 MAPK 是 MAPK 家族成员之一,p38 是由各种刺激引起的许多细胞的传感器,且在调节棕色脂肪细胞、肌肉细胞和肝细胞的能量平衡过程中起着重要的作用,p38 MAPK 也被认为在调节炎症因子方面扮演重要角色。因此,p38 MAPK 激活可能在 HSC 损伤与炎症过程中发挥作用。研究证明 PDGF-BB 可通过 MAPK 信号通路诱导 HSC 细胞活化与增殖^[21]。槲子昔可抑制 p-p38 蛋白的表达从而起到抑制 HF 的作用^[22]。本研究结果显示,与 Normal 组比较,rrPDGF-BB 组 p-p38 的蛋白表达水平明显增高,表明 rrPDGF-BB 可通过影响 MAPK 信号而使 HSC 活化增殖。不同浓度的 CPhGs 脂质体组,p-p38 的蛋白表达水平随着药物浓度的升高逐渐降低,且将不同浓度的 CPhGs 脂质体组 p-p38 的蛋白表达水平与 rrPDGF-BB 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。由此可见,CPhGs 脂质体可在一定程度上抑制 rrPDGF-BB 诱导的 HSC 增殖与活化,从而抑制 HF 的形成。当前,对 HF 的了解较少,全新的方法及技术手段将会对 HF 进行深入研究,从而对干预、早期诊断和治疗 HF 提供全新的治疗策略。

参考文献

[1] ZOIS C D, BALTAYIANNIS G H, KARAYIANNIS P, et al. Systematic review: hepatic fibrosis-regression with therapy [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, 28(10): 1175-1187.

[2] 周光德, 赵景民. 不同病因致肝纤维化/肝硬化的病理特点[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(6): 1086-1091.

[3] 盛婷, 傅念, 阳学风, 等. 肝纤维化发病机制中细胞和分子机制的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(12): 2358-2362.

[4] LI Y, SHI Y, SUN Y, et al. Restorative effects of hydroxysafflor yellow A on hepatic function in an experimental regression model of hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 47-56.

[5] SPENGLER U. Hepatic microcirculation; a critical but neglected factor for the outcome of viral hepatitis[J]. *J Hepatol*, 2009, 50(3): 631-633.

[6] LIU Y W, CHIU Y T, FU S L, et al. Osthole ameliorates hepatic fibrosis and inhibits hepatic stellate cell activation [J]. *J Biomed Sci*, 2015, 22(1): 63.

[7] YANG F R, WEN D S, FANG B W, et al. Prevention of extract from cistanche salsa on hepatic fibrosis induced by Carbon tetrachloride in rats [J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2013, 5(3): 199-204.

[8] 屠鹏飞, 姜勇, 郭玉海, 等. 发展肉苁蓉生态产业推进西部荒漠地区生态文明[J]. *中国现代中药*, 2015, 17(4): 297-301.

[9] SERCOMBE L, VEERATI T, MOHEIMANI F, et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6(3): 286.

[10] LEE Y A, WALLACE M C, FRIEDMAN S L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story[J]. *Gut*, 2015, 64(5): 830-841.

[11] WANG Y, GAO J C, ZHANG D I, et al. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2010, 53(1): 132-144.

[12] LI Y, SHI Y, SUN Y, et al. Restorative effects of hydroxysafflor yellow A on hepatic function in an experimental regression model of hepatic fibrosis induced by Carbon tetrachloride[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 47-56.

[13] 孔德松, 郑仕中, 陆茵, 等. 肝内肌成纤维细胞的来源及其在肝纤维化中作用的研究[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(3): 297-300.

[14] SCHUPPAN D, KIM Y O. Evolving therapies for liver fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 1887-1901.

[15] FRIEDMAN S L. Evolving challenges in hepatic fibrosis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(8): 425-436.

[16] 陈宵瑜, 杨长青. 肝纤维化发生机制研究新进展[J]. *实用肝脏病杂志*, 2016, 19(1): 121-124.

[17] 冯芹, 夏文凯, 王现珍, 等. 连翘苷元对四氯化碳大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(3): 426-429.

[18] 聂钱, 李香丹, 许东元, 等. IGF-1 对糖尿病大鼠肝纤维化的作用及其机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 41(10): 1878-1879.

[19] 詹迪迪, 李飞龙, 张功武, 等. 转化生长因子- β /CTGF 在肝纤维化发生机制中的作用[J]. *肝胆外科杂志*, 2016, 24(3): 233-237.

[20] FANG L, ZHAN S X, HUANG C, et al. TRPM7 Channel regulates PDGF-BB-induced proliferation of hepatic stellate cells via PI3K and ERK pathways[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272(3): 713-725.

[21] 郑娜娜, 岳雅伦, 郑勇, 等. 硫化氢通过 p38MAPK 信号通路对肝纤维化大鼠肝细胞增殖、凋亡的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(6): 901-906.

[22] 孔令娜, 占书箱, 黄成, 等. 槲子昔对 PDGF 诱导的 HSC-T6 增殖活化的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 61(4): 481-485.