文章编号:1000-5404(2014)05-0427-05

论著

熊果酸对肝星状细胞NADPH氧化酶-Hedgehog信号通路的影响

陈 璐[1],何文华[1],朱 萱[1],李弼民[1],张焜和[2],施 凤[1],张新华[1] (330006南昌,南昌大学第一附属医院消化内科[1],江西省消化疾病研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨熊果酸(ursolic acid,UA)对大鼠肝星状细胞(HSC-T6)的NADPH氧化酶(NOX)-Hedgehog(Hh)信号通路的影响。**方法** 将处于对数生长期的HSC-T6细胞分为6组:正常对照组、瘦素组(100 ng/mL)、熊果酸自身对照组(50 μmol/L)、DPI自身对照组(20 μmol/L)、熊果酸干预组(瘦素+熊果酸)、DPI干预组(瘦素+DPI)。在药物作用12 h后,提取总RNA,采用RT-PCR法检测Shh、Smo、Gli1/2的表达;药物作用HSC-T6细胞24 h后,提取总蛋白,采用Western blot分别检测Rac1和Gli2的表达;药物作用12、24、48 h后,采用MTT法检测HSC-T6细胞的增殖情况。**结果** RT-PCR分析显示,瘦素刺激HSC-T6细胞12 h后Smo mRNA表达较正常对照组升高($P<0.05$);Shh、Gli2 mRNA表达稍高于正常对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$);熊果酸干预后Shh、Smo和Gli2 mRNA表达明显低于瘦素组及正常对照组(均$P<0.05$);瘦素对HSC-T6细胞Gli1 mRNA的表达无影响,而熊果酸及DPI干预也不影响HSC-T6细胞Gli1 mRNA的表达。瘦素刺激HSC-T6细胞24 h后,Rac1和Gli2蛋白的表达较正常对照组升高($P<0.01$);熊果酸干预后Rac1和Gli2蛋白的表达明显低于瘦素组($P<0.01$)。MTT分析显示瘦素促进HSC-T6细胞增殖,熊果酸干预12 h后HSC-T6细胞的生长抑制率均显著高于瘦素组($P<0.01$),随着作用时间延长,熊果酸对细胞生长的抑制作用进一步增强。**结论** 熊果酸能抑制瘦素诱导的HSC-T6细胞Hh信号通路Shh、Smo、Gli2 mRNA和Gli2蛋白表达。熊果酸通过抑制NOX亚基Rac1蛋白表达进而抑制Hh信号通路可能是它抑制肝星状细胞生长增殖的机制之一。

[关键词] 熊果酸;肝星状细胞;Hedgehog信号通路;NADPH氧化酶;Rac1
[中图法分类号] R285.5; R322.47; R329.26 [文献标志码] A

Ursolic acid suppressed NADPH oxidase-Hedgehog signaling pathway in hepatic stellate cells *in vitro*

Chen Lu[1], He Wenhua[1], Zhu Xuan[1], Li Bimin[1], Zhang Kunhe[2], Shi Feng[1], Zhang Xinhua[1]([1]Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Nanchang University, [2]Jiangxi Provincial Institute of Gastroenterology, Nanchang, Jiangxi Province, 330006, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of ursolic acid (UA) on NADPH oxidase (NOX)-Hedgehog (Hh) signaling pathway in hepatic stellate cells (HSCs). **Methods** Culture-activated HSC-T6 cells were divided into 6 groups: normal control group, leptin group (100 ng/mL), UA group (50 μmol/L), NOX inhibitor DPI (20 μmol/L) group, and the 2 intervention groups pretreated with UA or DPI followed by stimulation with leptin for different times. The mRNA expression of Shh, Smo and Gli1/2 was detected in above cells after 12 hours' treatment by RT-PCR. The protein expression of Rac1 and Gli2 were analyzed in the cells in 24 h of treatment by Western blotting. The proliferation of HSC-T6 cells was detected in 12, 24 and 48 h after treatment by MTT assay. **Results** RT-PCR analysis showed that Smo mRNA expression was increased when leptin stimulated HSC-T6 cells for 12 h ($P<0.05$). The expression of Shh and Gli2 mRNA was also increased compared with normal control group, but without significant difference. UA pretreatment significantly down-regulated the mRNA expression of Shh, Smo and Gli2 compared with control and leptin group (all $P<0.05$). Leptin, UA and DPI had no effect on Gli1 mRNA expression. The protein expression of Rac1 and Gli2 was increased when leptin stimulated HSC-T6 cells for 24 h ($P<0.01$). UA pretreatment significantly down-regulated Rac1 and Gli2 protein expression compared with leptin group (all $P<0.01$). MTT assay showed that leptin promoted the proliferation in HSC-T6 cells. After 12 hours' pretreatment with UA, the cell growth was

[基金项目] 国家自然科学基金(81260082);江西省自然科学基金(20122BAB205019)
[通信作者] 朱 萱,电话:(0791)8692505,E-mail: jyyfyzx@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131220.1210.021.html(2013-12-20)

inhibited significantly than in leptin treated cells ($P<0.01$) in a time-dependent manner. **Conclusion** UA inhibits the expression of Shh, Smo, Gli2 mRNA and down-regulates the expression of Gli2 protein in HSC-T6 cells. One mechanism of UA inhibiting cell proliferation is probably *via* its inhibiting NOX subunit Rac1 and then NOX-Hh signaling pathway.

[**Key words**] ursolic acid; hepatic stellate cells; Hedgehog signal pathway; NADPH oxidase; Rac1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81260082) and the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20122BAB205019).
Corresponding author: Zhu Xuan, Tel: 86-791-8692505, E-mail: jyyfyzx@163.com

近年来研究表明,Hedgehog(Hh)信号通路参与肝纤维化的发生[1]。死亡的肝细胞能够释放Hh配体,从而激活Hh信号通路[2],导致静止的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)转化为肌成纤维细胞(muscle into fibrous, MFB)[3-4]。MFB自分泌或旁分泌的Hh配体使Hh信号通路持续激活的状态,促进HSC增殖,抑制凋亡[5]。Choi等[6]发现瘦素与ObR结合后通过PI3K/Akt途径激活Hh信号通路,促进静止型HSC向MFB转化。而NADPH氧化酶(NADPH oxidase, NOX)在肝纤维化发病中参与许多信号通路的调控,有研究发现NOX参与对Hh信号通路的调控,NOX亚基Rac1能激活Hh信号通路,促进HSC向MFB转化并抑制其凋亡[7]。本课题组前期研究发现,中药单体熊果酸(ursolic acid, UA)能下调HSC-T6中NOX亚基Rac1、$p22^{Phox}$ mRNA表达及$p47^{Phox}$的膜移位,抑制NOX活性而抑制ERK1/2信号通路、JAK2-STAT3信号通路活化,而减少Ⅰ型胶原的产生并抑制HSC-T6细胞的增殖[8-10]。本研究拟进一步观察熊果酸抑制NOX亚基Rac1表达后,是否影响Hh信号通路的激活。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DMEM(高糖)购自美国Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,重组大鼠瘦素购自美国PeproTech公司,熊果酸、DPI均购自Sigma-Aldrich公司,LY294002、SB203580购自碧云天生物技术研究所,Trizol、dNTP、Oligo(dT)$_{15}$、*Taq* PCR MasterMix、DNA Marker Ⅰ、2×*Taq* PCR MasterMix购自北京天根生化科技有限公司,M-MLV Reverse Transcriptase购自美国Promega公司,NOX亚基的引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成;四唑盐(MTT)购自普利来基因技术有限公司,Mouse Anti-β-actin Monoclonal Antibody、辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)购自北京中杉金桥公司,辣根酶标记山羊抗兔IgG(H+L)购自美国Cell Signaling Technology公司,Anti-Rac1 antibody、Anti-Gli2 antibody、Anti-Cytochrome b245 Light Chain antibody购自英国Abcam公司。

1.2 细胞培养与分组

HSC-T6细胞(大鼠肝星状细胞株)由上海中医药大学肝病研究所提供。细胞用含10%胎牛血清、青霉素(120 μg/mL)和链霉素(100 μg/mL)的DMEM培养液,在37 ℃、5% CO_2及饱和湿度条件下培养,待细胞生长至80%~90%时,分组传代至培养瓶继续培养。按加入药物不同,将细胞分为6组:正常对照组(给予含0.1%二甲基亚砜的DMEM培养液)、瘦素刺激组(100 ng/mL)、熊果酸对照组(50 μmol/L)、DPI对照组(DPI 20 μmol/L)、熊果酸干预组(熊果酸50 μmol/L+瘦素)、DPI干预组(DPI 20 μmol/L+瘦素)。当细胞铺满孔底面积70%~80%时,吸去原培养液,干预组加入含不同药物的培养液预处理30 min,再加入瘦素孵育12、24 h或48 h;瘦素刺激组、熊果酸对照组和DPI对照组不经预处理,直接加入相应药物孵育。

1.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测Shh、Smo、Gli1/2 mRNA的表达

培养瓶中的各组细胞进行不同的药物处理12 h后,按Trizol试剂说明书提取总RNA,并反转录成cDNA。大鼠Ⅰ型胶原和β-actin引物序列采用Primer Premier 5.0软件设计(引物序列见表1),由上海捷瑞生物工程有限公司合成。PCR反应参数:预变性,95 ℃,5 min;变性,94 ℃,30 s;退火,Shh、Smo、Gli1/2和β-actin的退火温度分别是:55 ℃、57 ℃、56 ℃和55 ℃,30 s;延伸,72 ℃,1 min;终末延伸,72 ℃,7 min;保存,4 ℃,10 min。将PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,用凝胶图像分析系统进行摄像和灰度值扫描并作相对量分析,将每组所测的Ⅰ型胶原mRNA灰度值,分别与相对应的β-actin mRNA的灰度值相比较,计算出两者的灰度值比,实验重复6次。

表1 Shh、Gli1/2和β-actin引物序列

基因	序列	扩增长度(bp)
Shh	正义链:5′-CTGGCCAGATGTTTTCTGGT-3′	117
	反义链:5′-TAAAGGGGTCAGCTTTTTGG-3′	
Smo	正义链:5′-GCCTGGTGCTTATTGTGG-3′	75
	反义链:5′-GGTGGTTGCTCTTGATGG-3′	
Gli1	正义链:5′-AACTCCACAGGCACACAGG-3′	79
	反义链:5′-GCTCAGGCTTCTCCTCTCTC-3′	
Gli2	正义链:5′-CCATTCATAAGCGGAGCAAG-3′	105
	反义链:5′-CCAGGTCTTCCTTGAGATCG-3′	
β-actin	正义链:5′-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3′	432
	反义链:5′-AAAGAAAGGGTGTAAAACGCA-3′	

1.4 Western blot检测Rac1和Gli2蛋白的表达

药物作用HSC-T6细胞24 h,加入含蛋白酶抑制剂的蛋白提取液提取细胞总蛋白,BCA法检测蛋白浓度。配制10%的分离胶和5%浓缩胶。蛋白样品加入SDS上样缓冲液,100 ℃变性5 min。聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至硝酸纤维素膜(NC膜),5%的牛奶封闭2 h,将NC膜放入一抗溶液中,4 ℃孵育过夜。Rac1抗体浓度1∶1 000,Gli2抗体浓度1∶800。洗膜后将NC膜置入二抗溶液中,孵育4 h;再次洗膜后,采用化学发光液显影,用Molecular Imager ChemiDoc™ XRS分析系统进行曝光、

摄像及灰度值扫描,将每组所测的 Rac1 及 Gli2 的灰度值,分别与相对应的 β-actin 的灰度值相比较,计算出两者的灰度值比。

1.5 MTT 法检测大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)细胞增殖

待 HSC-T6 细胞生长融合成单层后,用 0.25% 胰蛋白酶消化后,细胞计数并接种至 96 孔板内,细胞密度约为每孔 5 000 个,培养至细胞生长约占 60%;按分组加药,每组另设 6 个复孔,分别培养 12、24、48 h;每孔加入无菌 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL,继续放入培养箱中孵育 4 h 后终止培养,每孔加入150 μL 的二甲基亚砜(DMSO)振荡 10 min;在酶标仪上选择波长 490 nm 检测各孔的光密度值[$D(490)$]。

细胞抑制率 = [正常对照组 $D(490)$ − 实验组 $D(490)$]/正常对照组 $D(490)$ ×100%

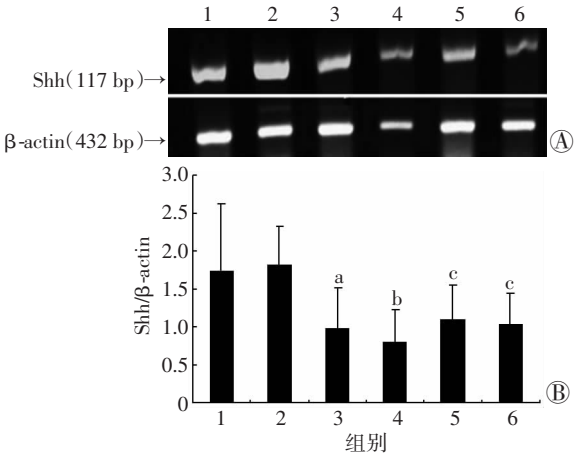
1.6 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,总体服从正态性分布,采用方差齐性行单因素方差分析和 SNK-q 检验;如果不服从正态性分布或方差不齐,则采用秩和检验(包括 Kruskal-Wallis H 和 Nemenyi 法),使用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 熊果酸对肝星状细胞 Shh mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果(图 1)显示,瘦素刺激 HSC-T6 细胞 12 h 后 Shh mRNA 表达与正常对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);熊果酸干预组 Shh mRNA 表达明显低于瘦素组及正常对照组($P < 0.05$);DPI 干预组 Shh mRNA 表达也显著低于瘦素组及正常对照组($P < 0.01$);熊果酸干预组、熊果酸对照组与 DPI 干预组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明熊果酸和 NOX 抑制剂 DPI 均能下调 HSC-T6 细胞 Shh mRNA 的表达。

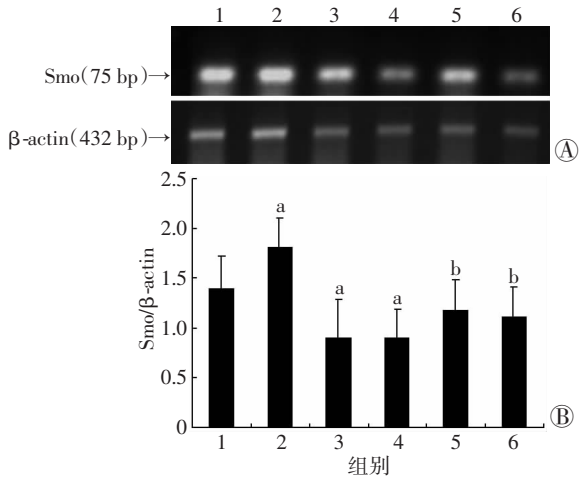


1:正常对照组;2:瘦素组;3:熊果酸对照组;4: DPI 对照组;5:熊果酸干预组;6:DPI 干预组;A:RT-PCR 检测结果;B:半定量分析
a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与正常对照组比较;c:$P < 0.05$,与瘦素组比较

图 1 RT-PCR 检测各组 HSC-T6 细胞 Shh mRNA 的表达

2.2 熊果酸对肝星状细胞 Smo mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果(图 2)显示,瘦素刺激 HSC-T6 细胞 12 h 后,Smo mRNA 表达较正常对照组升高($P < 0.05$);熊果酸干预组和 DPI 干预组 Smo mRNA 表达均显著低于瘦素组及正常对照组($P < 0.01$);熊果酸干预组与 DPI 干预组间相比,两者之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。熊果酸对照组、DPI 对照组 Smo mRNA 表达均显著低于正常对照组($P < 0.05$),与相应的干预组之间相比差异无统计学意义($P > 0.05$);表明熊果酸、DPI 均能下调瘦素介导的 HSC-T6 细胞 Smo mRNA 的表达。

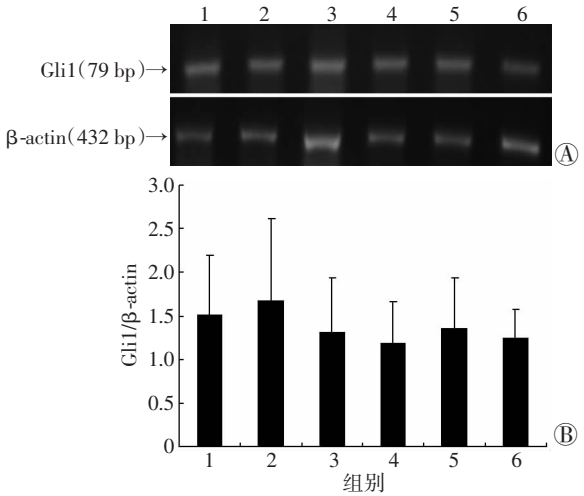


1:正常对照组;2:瘦素组;3:熊果酸对照组;4: DPI 对照组;5:熊果酸干预组;6:DPI 干预组;A:RT-PCR 检测结果;B:半定量分析
a:$P < 0.05$,与正常对照组比较;b:$P < 0.01$,与瘦素组比较

图 2 RT-PCR 检测各组 HSC-T6 细胞 Smo mRNA 的表达

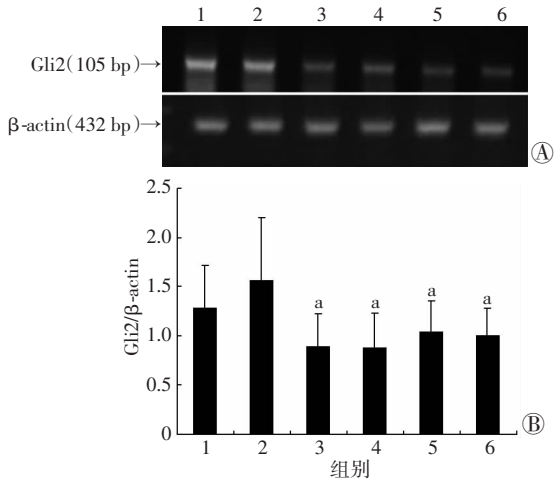
2.3 熊果酸对肝星状细胞 Gli1/2 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果(图 3、4)显示,各组 HSC-T6 细胞的 Gli1 mRNA 表达差异无统计学意义($F = 0.487$, $P > 0.05$),但 Gli2 mRNA 表达差异有统计学意义($F = 2.587$, $P < 0.05$)。瘦素刺激 HSC-T6 细胞 12 h 后,Gli2 mRNA 表达稍高于正常对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$);熊果酸干预组和 DPI 干预组的 Gli2 mRNA 表达均显著低于瘦素组($P < 0.05$),熊果酸干预组与 DPI 干预组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明 Gli1 mRNA 表达不受瘦素及药物干预的影响,但熊果酸和 DPI 可下调 HSC-T6 细胞 Gli2 mRNA 的表达。



1:正常对照组;2:瘦素组;3:熊果酸对照组;4: DPI 对照组;5:熊果酸干预组;6:DPI 干预组;A:RT-PCR 检测结果;B:半定量分析
a:$P < 0.01$,与瘦素组比较

图 3 RT-PCR 检测各组 HSC-T6 细胞 Gli1 mRNA 的表达

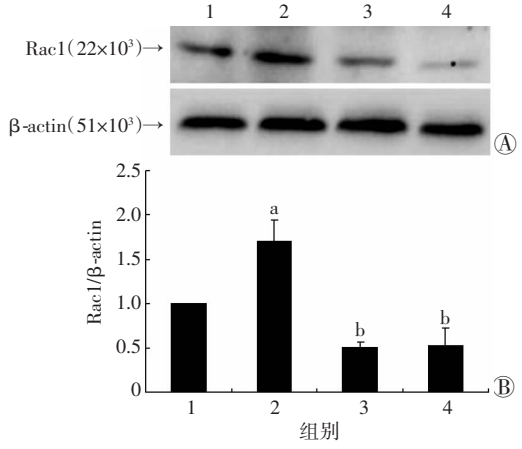


1:正常对照组;2:瘦素组;3:熊果酸对照组;4: DPI 对照组;5:熊果酸干预组;6:DPI 干预组;A:RT-PCR 检测结果;B:半定量分析
a:$P<0.01$,与瘦素组比较

图4 RT-PCR 检测各组 HSC-T6 细胞 Gli2 mRNA 的表达

2.4 熊果酸干预对瘦素诱导的 NOX 亚基 Rac1 蛋白的影响

Western blot 结果(图5)显示,瘦素刺激 HSC-T6 细胞 24 h 后 Rac1 蛋白的表达较正常对照组升高($P<0.01$);熊果酸干预组 Rac1 蛋白的表达显著低于瘦素组($P<0.01$);DPI 干预组 Rac1 蛋白的表达也低于瘦素组($P<0.01$);熊果酸干预组与 DPI 干预组组间比较,Rac1 蛋白表达无统计学意义($P>0.05$)。结果表明熊果酸、DPI 均能抑制瘦素诱导的 NOX 亚基蛋白 Rac1 的表达。

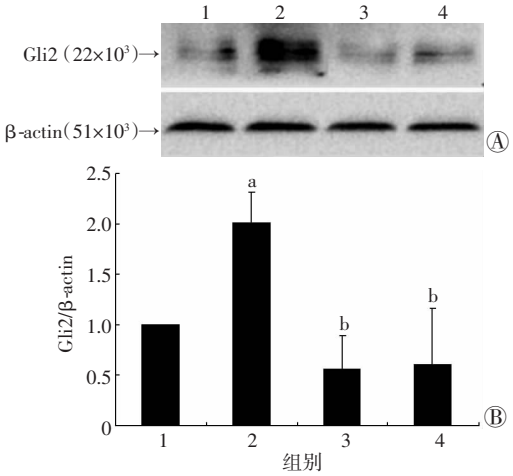


1:正常对照组;2:瘦素组;3:熊果酸干预组;4:DPI 干预组;A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与瘦素组比较

图5 Western blot 检测各组 HSC-T6 细胞 NOX 亚基 Rac1 蛋白的表达

2.5 熊果酸对瘦素诱导的 HSC-T6 细胞 Gli2 蛋白的影响

Western blot 结果(图6)显示,瘦素刺激 HSC-T6 细胞 24 h 后,细胞内 Gli2 蛋白的表达较正常对照组升高($P<0.01$);熊果酸干预后 Gli2 蛋白的表达明显低于瘦素组($P<0.01$);DPI 干预组 Gli2 蛋白的表达低于瘦素组($P<0.01$);熊果酸干预组与 DPI 干预组组间相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。上述结果表明熊果酸和 NOX 抑制剂 DPI 均可以抑制瘦素诱导的 Gli2 蛋白的表达。

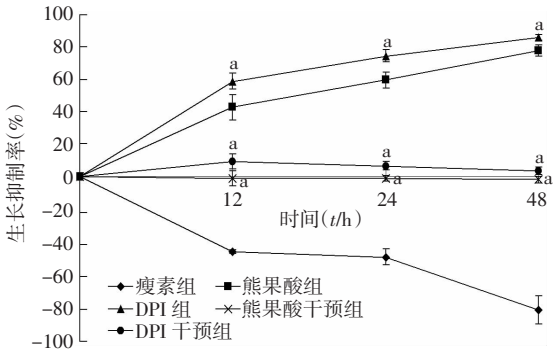


1:正常对照组;2:瘦素组;3:熊果酸干预组;4:DPI 干预组;A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与瘦素组比较

图6 Western blot 检测各组 HSC-T6 细胞 Gli2 蛋白的表达

2.6 熊果酸对瘦素诱导的 HSC-T6 细胞增殖的影响

MTT 分析结果(图7)显示,瘦素刺激 HSC-T6 细胞 12 h 后,细胞生长抑制率显著低于正常对照组($P<0.01$),并随时间延长细胞生长抑制率进一步降低;熊果酸干预组、DPI 干预组 12 h 后细胞生长抑制率均显著高于瘦素组($P<0.01$)。熊果酸干预组、DPI 干预组和正常对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$),熊果酸干预组各时间点之间没有统计学差异($P>0.05$)。结果表明瘦素可以促进 HSC-T6 细胞的增殖,并随着处理时间延长,其促增殖用增强。熊果酸及 DPI 可以完全抑制瘦素诱导的细胞增殖作用。



a:$P<0.01$,与瘦素组比较

图7 MTT 法检测熊果酸对瘦素诱导的 HSC-T6 细胞增殖的影响

3 讨论

HSCs 是位于肝窦周 Disse 腔内肝细胞与内皮细胞之间的导致肝脏纤维化的主要效应细胞,当病毒、药物等造成肝脏急慢性损伤时,静止型 HSCs 被激活,转化为活化的肝星状细胞(即 MB)。过去大量的研究表明,瘦素、TGF-β、PDGF、AgⅡ等各种促肝纤维化因子均可调控 MAPKs、PI3K/AKT、NF-κB、AP-1、Hh 等信号通路的激活,引起 HSC 活化、增殖及纤维形成[1]。近

年来研究发现 Hh 信号通路也与肝脏损伤修复及肝纤维化的发生有密切关系[1]。当肝脏受损后,Hh 配体 Shh 结合于跨膜受体 Ptch,诱导它从原始纤毛上解离[11],并解除对跨膜蛋白 Smo 的抑制,而 Smo 激活至细胞核内的 Gli 转录因子家族,从而调控基因的表达[12]。因此 Hh 信号通路的激活与否,最终取决于锌指转录因子 Gli 表达情况。在脊椎动物中存在 3 种 Gli 的同源基因,分别是 Gli1、Gli2 及 Gli3[13-14]。本研究证明活化的肝星状细胞(HSC-T6)有 Shh、Smo、Gli1/2 基因的表达。Choi 等[6]发现瘦素与 ObR 结合后通过 PI3K/Akt 途径激活 Hh 信号通路,促进 HSC 向 MFB 转化。本研究中也以瘦素作为促进肝纤维化的因子,发现它可以上调 Hh 信号通路中 Shh、Smo 及 Gli2 的 mRNA 表达,但 Gli1 mRNA 表达却没有明显变化,推测瘦素激活 Hh 信号通路后 Gli2 是参与肝星状细胞增殖、参与肝纤维化的重要转录因子。

NOX 是由 6 个亚基构成的多蛋白复合体,包括细胞膜上的催化亚基 $gp91^{Phox}$ 和调节亚基 $p22^{Phox}$ 以及位于细胞质的亚基 $p47^{Phox}$、$p40^{Phox}$、$p67^{Phox}$ 和小 G 蛋白 Rac,它的生理功能是专职产生活性氧簇(reactive oxygen species,ROS),参与信号转导、天然免疫和激素合成等许多生物学功能[15]。De-Minicis 等[15]研究发现,瘦素与 HSC 上的 Ob 受体结合后,在激活 JAK1/2-STAT3 信号通路的同时,JAK 还通过激活 NOX 产生 ROS,进而激活 AKT、ERK1/2,使信号级联放大。新近研究报道 NOX 亚基 Rac1 可激活 Hh 信号通路,促进 HSC 由静止型向活化型转变[7]。这些研究表明,NOX 通过产生 ROS 参与 HSC 内信号转导的调控,扮演信号枢纽角色。本课题组前期研究发现熊果酸能下调 HSC-T6 中 NOX 亚基 Rac1、$p22^{Phox}$ mRNA 表达及 $p47^{Phox}$ 的膜移位,抑制 NOX 活性而抑制 ERK1/2 信号通路、减少Ⅰ型胶原的产生并抑制 HSC-T6 细胞的增殖[8-10]。但熊果酸是否通过抑制 NOX 的表达而影响 Hh 信号通路尚不清楚。

本研究显示,瘦素可上调 NOX 亚基 Rac1 蛋白和 Hh 信号通路 Gli2 蛋白的表达,瘦素通过 NOX 激活 Hh 信号通路后,促进了 HSC-T6 细胞增殖。给予熊果酸干预后下调了 Hh 信号通路的 Shh、Smo 和 Gli2 的 mRNA 表达,说明熊果酸能抑制 Hh 信号通路分子的基因表达。进一步行 Western blot 检测显示,熊果酸显著抑制了瘦素诱导的 Rac1 蛋白表达,并且下调 Gli2 蛋白表达,说明熊果酸能阻断瘦素诱导的 NOX-Hh 信号通路的激活。Hh 信号通路激活会促进 HSC 的增殖[4,16],我们前期研究结果也显示熊果酸能够抑制 HSC-T6 细胞增殖,促进其凋亡[17]。本研究的 MTT 检测结果也进一步证实熊果酸能抑制 HSC-T6 细胞增殖。结合本研究和前期研究结果,我们认为熊果酸在抑制 NOX 的表达和活性后,能抑制 NOX 调控的各种促细胞增殖、促肝纤维化信号通路(如 Hh 信号通路、ERK1/2 信号通路和 JAK2-STAT3 信号通路),提示熊果酸可以成为有效的抗肝纤维化药物。

参考文献:

[1] Wynn T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis[J]. J Pathol, 2008, 214(2): 199-210.
[2] Jung Y, Witek R P, Syn W K, *et al*. Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors[J]. Gut, 2010, 59(5): 655-665.
[3] Omenetti A, Porrello A, Jung Y, *et al*. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans[J]. J Clin Invest, 2008, 118(10): 3331-3342.
[4] Choi S S, Omenetti A, Witek R P, *et al*. Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblastic transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 297(6): G1093-G1106.
[5] Seong K H, Akimaru H, Dai P, *et al*. Inhibition of the nuclear import of cubitus interruptus by roadkill in the presence of strong hedgehog signal[J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15365.
[6] Choi S S, Syn W K, Karaca G F, *et al*. Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway[J]. J Biol Chem, 2010, 285(47): 36551-36560.
[7] Choi S S, Witek R P, Yang L, *et al*. Activation of Rac1 promotes hedgehog-mediated acquisition of the myofibroblastic phenotype in rat and human hepatic stellate cells[J]. Hepatology, 2010, 52(1): 278-290.
[8] 何文华, 朱萱, 李弼民, 等. 熊果酸对肝星状细胞烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶的影响[J]. 中华消化杂志, 2011, 31(7): 484-486.
[9] 张新华, 何文华, 朱萱, 等. 熊果酸对活化型肝星状细胞 NADPH 氧化酶亚基 p47Phox 表达及 ERK1/2 信号通路活化的影响[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(6): 590-594.
[10] 刘戈云, 何文华, 李弼民, 等. 熊果酸对瘦素诱导的肝星状细胞 JAK2-STAT3 活化及活性氧产生的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(19): 2016-2020.
[11] Rohatgi R, Milenkovic L, Scott M P. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium[J]. Science, 2007, 317(5836): 372-376.
[12] Lees C, Howie S, Sartor R B, *et al*. The hedgehog signalling pathway in the gastrointestinal tract: implications for development, homeostasis, and disease[J]. Gastroenterology, 2005, 129(5): 1696-1710.
[13] Bai C B, Stephen D, Joyner A L. All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3[J]. Dev Cell, 2004, 6(1): 103-115.
[14] Kasper M, Regl G, Frischauf A M, *et al*. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(4): 437-445.
[15] De-Minicis S, Seki E, Oesterreicher C, *et al*. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase mediates fibrotic and inflammatory effects of leptin on hepatic stellate cells[J]. Hepatology, 2008, 48(6): 2016-2026.
[16] Sicklick J K, Li Y X, Choi S S, *et al*. Role for hedgehog signaling in hepatic stellate cell activation and viability[J]. Lab Invest, 2005, 85(11): 1368-1380.
[17] 申月明, 朱萱, 张昆和, 等. 熊果酸对肝星状细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(4): 298-301.

(**收稿**:2013-10-03;**修回**:2013-11-24)
(编辑 王 红)