DOI:10.16016/j.1000-5404.201910149

连翘苷对脂多糖诱导肝脏星状细胞活化的抑制作用

李佳行[1],杨胜乾[1,2],刘娟娟[1],罗明明[1],陈 杰[1],李晓辉[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系药物研究所[1],264005 山东 烟台,烟台大学分子药理和药物评价教育部重点实验室[2]

[摘要] **目的** 探讨连翘苷对脂多糖诱导肝脏星状细胞活化的抑制作用及其机制。**方法** 体外培养大鼠肝星状细胞 HSC-T6,实验分 4 组:空白对照组、脂多糖(1 μg/mL)处理组、1 μmol/L 连翘苷加脂多糖处理组和 10 μmol/L 连翘苷加脂多糖处理组。采用 MTT 法检测 HSC-T6 细胞的增殖;Transwell 实验分析细胞的迁移;流式细胞仪检测细胞内的 ROS 水平;ELISA 法检测细胞上清中促炎细胞因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 的浓度;Western blot 分析细胞内 α-SMA、NF-κB p65 蛋白表达或蛋白磷酸化水平。**结果** 浓度为 1~100 μmol/L 连翘苷对 HSC-T6 细胞的增殖无明显影响。脂多糖可明显促进 HSC-T6 细胞增殖及迁移,1 μmol/L 和 10 μmol/L 连翘苷均可显著抑制脂多糖诱导的细胞增殖及迁移,分别降低 16.13%、17.14%,48.99%、58.86%。脂多糖处理 HSC-T6 细胞能明显增加细胞内 α-SMA 蛋白的表达,而 10 μmol/L 连翘苷处理后,细胞内 α-SMA 的表达量减少 27.33%。1 μmol/L 和 10 μmol/L 连翘苷对脂多糖诱导细胞内 ROS 含量(30.03%、51.26%)、促炎细胞因子 TNF-α、IL-6、IL-1β(25.16%、39.51%,36.57%、43.75%,58.99%、73.01%)的分泌和 NF-κB p65 蛋白的磷酸化水平(13.90%、24.96%)也具有显著抑制作用。相关性分析表明:连翘苷处理肝星状细胞后,其降低 NF-κB p65 磷酸化蛋白表达和对 ROS、炎症因子(IL-1β、TNF-α)的作用与其抑制肝星状细胞活化标志物 α-SMA 蛋白表达的作用呈正相关。**结论** 天然产物连翘苷能够显著抑制脂多糖诱导肝星状细胞的活化,其机制可能与其下调 NF-κB 信号途径介导的炎症反应有关。

[关键词] 连翘苷;脂多糖;肝星状细胞;α-SMA;炎症反应

[中图法分类号] R282.71;R285.5;R575.2 [文献标志码] A

Inhibitory effect of phillyrin on lipopolysaccharide-induced activation of rat hepatic stellate cells *in vitro*

LI Jiahang[1], YANG Shengqian[1,2], LIU Juanjuan[1], LUO Mingming[1], CHEN Jie[1], LI Xiaohui[1] [1]Institute of Materia Medica, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation of Ministry of Education, Yantai University, Yantai, Shangdong Province, 264005, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the inhibitory effect of phillyrin (PHI) on lipopolysaccharide (LPS)-induced hepatic stellate cell (HSC) activation and explore the possible mechanisms. **Methods** Cultured rat hepatic stellate cells (HSC-T6) were divided into blank control group, LPS (1 μg/mL) group, LPS (1 μg/mL) + PHI (1 μg/mL) group, and LPS (1 μg/mL) + PHI (10 μg/mL) group. We assessed the changes in the proliferation and migration of the cells (HSC-T6) after the treatments using MTT assay and Transwell migration assay, respectively. The intracellular reactive oxygen species (ROS) level in the cells was determined with flow cytometry, and the concentrations of proinflammatory cytokines in the supernatant were tested using enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). The expression levels of α-SMA and phosphorylated nuclear factor-κB (NF-κB) p65 in the cells were analyzed with Western blotting. **Results** PHI from the concentration of 1 to 100 μmol/L did not significantly affect the proliferation of HSC-T6 cells. LPS

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473210);烟台大学分子药理和药物评价教育部重点实验室开放课题(P201902)

[通信作者] 李晓辉,E-mail: lpsh008@aliyun.com

stimaulation significantly promoted the proliferation and migration of the cells, and such effects were obviously suppressed by PHI treatment at both 1 (16.13% and 17.14%) and 10 μmol/L(48.99% and 58.86%). PHI at 10 μmol/L significantly reduced the expression of α-SMA (27.33%) in HSC-T6 cells exposed to LPS; at both 1 and 10 μmol/L, PHI strongly suppressed LPS-induced elevation of intracellular ROS level (30.03% and 51.26%), lowered the levels of proinflammatory cytokines TNF-α(23.16% and 39.51%), IL-6(36.57% and 43.75%) and IL-1β(58.99% and 73.01%) and decreased the expression of phosphorylated NF-κB p65(13.90% and 24.96%) in LPS-stimulated cells. The decreased expression level of phosphorylated NF-κB p65 protein in HSC-T6 cells was positively correlated with intracellular ROS level, concentrations of TNF-α and IL-1β, and the expression level of HSC activation marker α-SMA protein. **Conclusion** PHI can inhibit HSC activation induced by LPS possibly by down-regulating inflammatory responses mediated by NF-κB signaling pathway.

[**Key words**] phillyrin; lipopolysaccharide; hepatic stellate cells; α-smooth muscle actin; inflammatory response

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81473210) and the Open Funding Project of Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation of Ministry of Education (P201902). Corresponding author: LI Xiaohui, E-mail: lpsh008@aliyun.com

肝脏纤维化是一种继发于肝炎病毒或寄生虫感染、脂肪肝、胆汁淤积、自身免疫等因素所致慢性肝脏损伤及炎症的共同反应,是肝硬化发生的关键病理环节[1]。据世界卫生组织估计,2019 年全球约有 3.28 亿病毒性肝炎患者(仅指乙肝和丙肝患者),而中国约占三分之一[2]。中商情报大健康数据显示:随着国民生活水平的不断提高,我国脂肪性肝病的发病人数于 2015 年超过 3 亿。预计 2020 年,我国乙肝、丙肝和脂肪性慢性肝病患者将达到 4.47 亿。有效防治慢性肝病患者的肝脏纤维化,是阻止病情由慢性肝炎进一步发展为肝硬化和肝癌的重要途径。然而,目前世界各国尚无有效药物上市用于肝脏纤维化的防治。因此,寻找有效防治肝纤维化的药物,日益紧迫。

肝脏星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝脏非实质细胞之一,位于肝细胞和肝血窦内皮细胞之间的狄氏腔内。肝星状细胞的活化是慢性肝炎发生肝脏纤维化的主要原因。正常状态下,HSCs 处于静息状态,即非活化状态,具有储存维生素 A 和脂滴的功能;在肝脏炎症微环境的因素刺激下,肝星状细胞增殖加快,迁移至肝细胞受损伤处,被激活、分化为肌成纤维细胞,细胞内 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)等基因表达显著升高,其细胞外基质(extracellular matrix, ECM)分泌也明显增加[3]。研究发现:脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)通过激活 NF-κB 信号通路能够强化 HSCs 的增殖、迁移能力,并使其活化;而阻断 HSCs 内 NF-κB 信号可以实现抑制细胞的活化[4-5]。表明通过调控炎症信号途径的激活以抑制肝星状细胞的活化,可能是防治肝纤维化的一个有效策略。

连翘苷(phillyrin, PHI)是木犀科植物连翘干燥果实的有效成分之一,具有抗炎、抗氧化等[6-9]广泛的药理学作用。据报道,连翘在中医上被广泛应用于清热、解毒、散结和消肿等,有较好的安全性与药物疗效[10]。连翘的提取物能够明显改善四氯化碳(CCl_4)诱导小鼠的肝脏损伤、减轻肝脏纤维化[11]。研究表明:PHI 通过抑制 LPS 诱导的炎症反应能够显著性缓解小鼠的急性肺损伤[8];在体外,通过抑制 LPS 诱导巨噬细胞内氧自由基(ROS)的产生,PHI 也可明显抑制细胞的氧化应激和炎症反应[9]。然而,迄今 PHI 对 HSCs 活化的调节作用尚不清楚。因此,本研究以大鼠肝星状细胞 HSC-T6 为研究对象,观察 PHI 对 LPS 诱导肝星状细胞活化的影响,并探讨其作用机制,旨在为寻找有效抑制肝星状细胞活化的药物提供实验依据和有益线索。

1 材料与方法

1.1 材料

PHI(纯度大于 98%)购自成都瑞芬思科技有限公司;HSC-T6 细胞来源于北京北纳生物科技有限公司;DMEM 细胞培养基、胰酶购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自以色列 BI 公司;LPS、MTT 购自美国 Sigma 公司;ELISA 试剂盒购自武汉博士德公司;磷酸化 NF-κB p65(Ser536)(93H1)兔单克隆抗体、NF-κB p65(D14E12)XP© 兔单克隆抗体、α-SMA(D4K9N) XP© 兔单克隆抗体均购自美国 CST 公司;β-actin 小鼠单克隆抗体购自南京金斯瑞生物科技公司;ROS 检测试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)和山羊

抗小鼠 IgG(H+L)均购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞培养瓶、培养板和 Transwell 小室购自美国康宁公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏及培养 从液氮中取出冻存的 HSC-T6 细胞悬液后,迅速放置于 37 ℃水浴中,待细胞悬液完全融化,转移至有 5 mL DMEM 培养基的离心管中,1 200 r/min 离心 5 min。弃上清培养基,用含有 10%FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基重悬细胞,并转移至培养瓶中。于 37 ℃、5%CO_2 的细胞孵箱中培养。

1.2.2 MTT 检测 利用胰酶消化处于对数生长期的 HSC-T6 细胞,制成细胞悬液,调整细胞数为 4×10^4/mL。将细胞悬液接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL。培养箱中放置过夜后,弃上清,用 DMEM 完全培养基配制不同浓度的 PHI 溶液,加入有细胞的 96 孔培养板中,每孔 100 μL。培养箱中孵育 2 h 后,每孔再加入 100 μL 不含或含有 2 μg/mL LPS 的培养基稀释液,使 LPS 的终浓度为 1 μg/mL。设空白对照组、LPS(1 μg/mL)处理组、1 μmol/L PHI+ LPS 处理组和 10 μmol/L PHI+ LPS 处理组,每组 6 个复孔。培养箱中继续培养 24 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,37 ℃孵育 4 h。弃上清,每孔加入 100 μL DMSO 使紫色结晶完全溶解,振板混匀 15 min,采用酶标仪检测波长 570 nm 处的光密度值 D(570)。

1.2.3 Transwell 迁移试验 取对数生长期的 HSC-T6 细胞,胰酶消化,用无血清培养基制成细胞悬液并调整细胞数为 4×10^5/mL。实验分 4 组:空白对照组、LPS 处理组、1 μmol/L PHI+LPS 处理组、10 μmol/L PHI+LPS 处理组。下室均先加入 500 μL 无血清培养基,空白对照组和 LPS 处理组加 100 μL 无血清培养基于上室,2 个 PHI+LPS 处理组分别加入 100 μL 含有 2、20 μmol/L PHI 的培养基,各组再加入 100 μL 细胞悬液,37 ℃孵育 2 h。将上室分别轻轻转移至另一下室中,空白对照组下室为 500 μL 无血清 DMEM 培养基,LPS 处理组的下室为 500 μL 含 1 μg/mL LPS 的 DMEM 培养基,2 个 PHI+LPS 处理组分别为含有 500 μL 1 μmol/L 和 10 μmol/L PHI 以及 1 μg/mL LPS 的 DMEM 培养基。继续培养 6 h 后,4%中性多聚甲醛室温固定 30 min,用棉签轻轻擦去上室膜上侧的细胞,0.1%结晶紫室温染色 30 min,常温 PBS 洗 3 次,显微镜下随机选取 6 个视野,拍照,采用 Image J 软件统计每个视野中的细胞数。

1.2.4 ELISA 检测 取对数生长期的细胞,按照每孔 4×10^4/500 μL 接种于 12 孔培养板中,培养过夜。弃上清,分别加入不含或含有化合物的培养基 400 μL,于 37 ℃处理 2 h,实验分 4 组:空白对照组、LPS 处理组、1 μmol/L PHI+ LPS 处理组、10 μmol/L PHI+ LPS 处理组,每组 4 个复孔。除空白对照组正常培养外,其余 3 组再加入 2 μg/mL 的 LPS 400 μL,继续培养 24 h 后收集上清 500 μL,按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.2.5 ROS 检测 按照 1.2.4 步骤处理细胞后,用 PBS 洗涤细胞 2 次,用无血清 DMEM 培养基配制 DCFH-DA 探针(10 μmol/L),加入细胞后 37 ℃孵育 30 min。弃掉培养基,再用 PBS 洗涤细胞 2 次,胰酶消化细胞,1 200 r/min 离心 5 min。弃上清,使用 200 μL 的 PBS 重悬细胞,采用流式细胞仪检测荧光强度(激发波长 500 nm,发射波长 525 nm)。

1.2.6 Western blot 检测 取对数生长期的 HSC-T6 细胞,按照 1×10^5/mL 接种于 6 孔培养板中,培养箱中培养过夜。弃上清,分别加入含 PHI 的培养基(每孔 500 μL),37 ℃孵育 2 h 后,加入 LPS,每孔 500 μL,使 PHI 最终浓度为 1 μmol/L 和 10 μmol/L,LPS 终浓度为 1 μg/mL。继续孵育 24 h 后,弃上清,用预冷 PBS 洗 3 次,每孔加入 100 μL RIPA 裂解液(含有 PMSF、蛋白酶抑制剂、磷酸化蛋白酶抑制),置于冰上边刮边裂解,裂解 20 min,12 000 r/min 离心 10 min。取上清溶液,采用 BCA 法测定蛋白质浓度。然后,加上样缓冲液,95 ℃煮 10 min 使蛋白变性。用 10% SDS-PAGE 电泳分离;200 mA 转膜 2 h;37 ℃,5%BSA 封闭 2 h;一抗 4 ℃处理过夜,TBST 洗 3 次,二抗孵育 2 h,TBST 洗 3 次,加 ECL 发光液进行曝光。

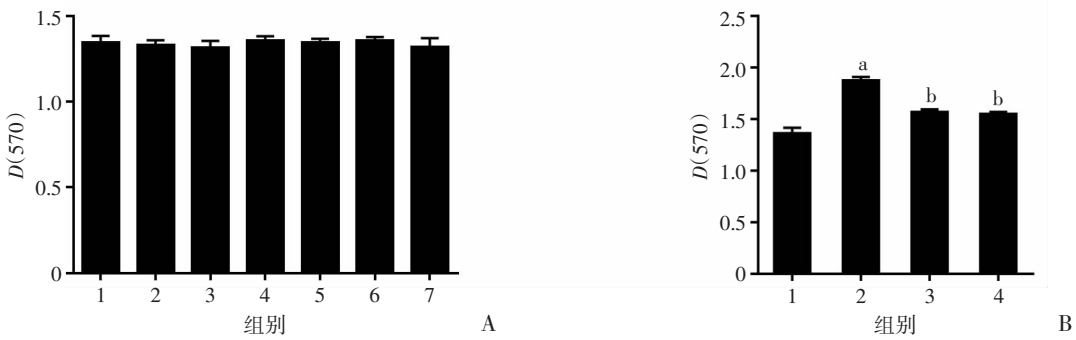
1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验,相关性分析采用斯伯尔曼检验法。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

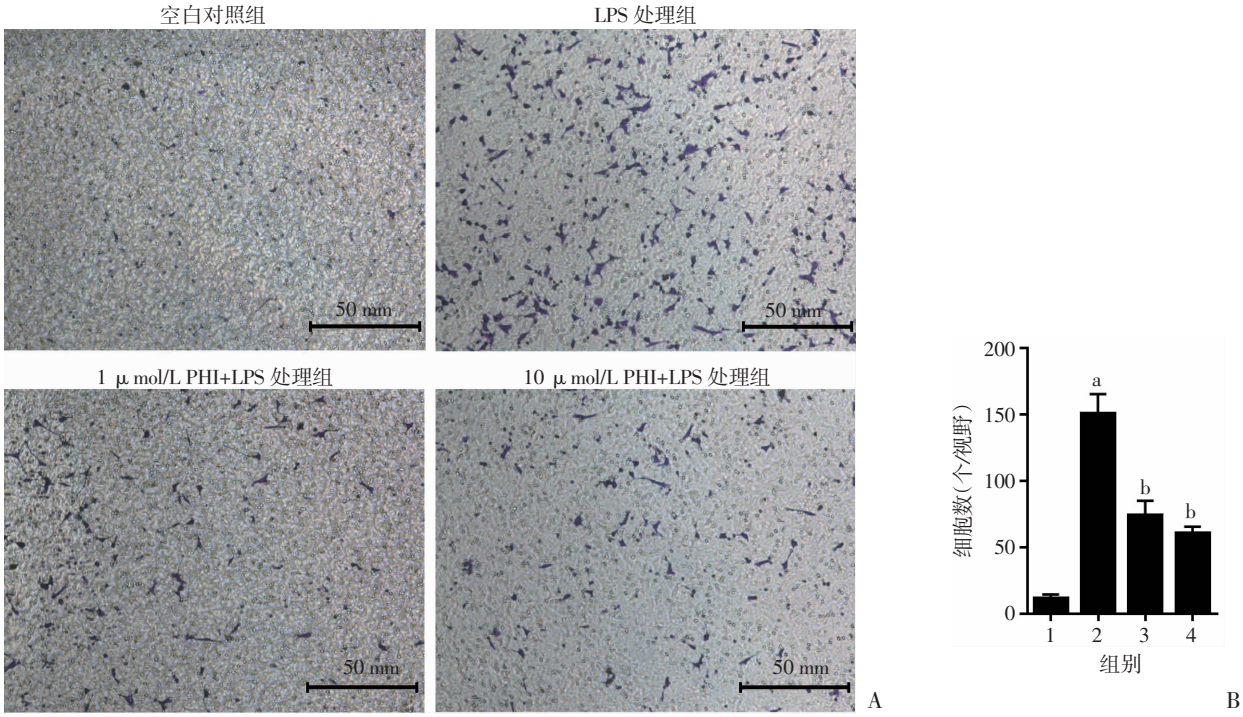
2.1 PHI 对肝星状细胞及 LPS 刺激肝星状细胞增殖的影响

采用 MTT 法检测肝脏星状细胞的增殖情况。结果显示:24 h 内 1 ~100 μmol/L PHI 对 HSC-T6 细胞增殖无影响(图 1A)。浓度为 1 μg/mL 的 LPS 刺激 HSC-T6 细胞 24 h,与空白对照组比较,LPS 处理组 D(570)值增加 37.73%,细胞增殖明显($P<0.05$);与 LPS 刺激细胞相比,1 μmol/L 和 10 μmol/L PHI 处理能显著抑制 LPS 刺激所引起的细胞增殖,其 D(570)值分别降低 16.13%和 17.14%(图 1B)。结果表明:PHI 能够抑制 LPS 刺激肝星状细胞的增殖。



A:PHI 对 HSC-T6 细胞增殖的影响 1:空白对照组;2:0.1%DMSO 对照组;3~7:分别为 1、3、10、30、100 μmol/L PHI 组;B:PHI 对 LPS 诱导 HSC-T6 细胞增殖的影响 1~4:分别为空白对照组、LPS 处理组、1 μmol/L PHI + LPS 处理组、10 μmol/L PHI + LPS 处理组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 处理组比较

图 1 MTT 检测 24 h 内 PHI 对 HSC-T6 细胞增殖的影响 ($n=6$)



A:Transwell 检测细胞迁移;B:各组迁移细胞数分析($n=6$) 1:空白对照组;2:LPS 处理组;3:1 μmol/L PHI + LPS 处理组;4:10 μmol/L PHI + LPS 处理组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 处理组比较

图 2 PHI 对 LPS 诱导 HSC-T6 细胞迁移的抑制作用

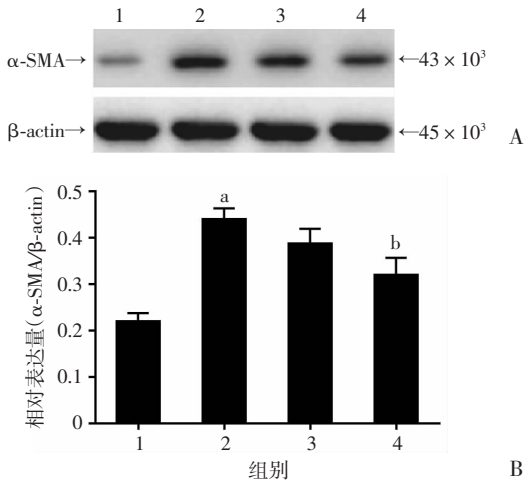
2.2 PHI 对 LPS 诱导肝星状细胞迁移的抑制作用

采用 Transwell 实验分析肝星状细胞的迁移能力。结果显示:1 μg/mL LPS 明显诱导 HSC-T6 细胞跨膜迁移,与空白对照组比较,LPS 处理组的细胞迁移数增加 6.57 倍($P<0.05$);与 LPS 处理组比较,加用 1 μmol/L 和 10 μmol/L PHI 后能明显减少跨膜迁移的细胞数,分别减少 48.99%和 58.86%(图 2)。结果表明:PHI 可以显著抑制肝星状细胞的迁移。

2.3 PHI 对 LPS 诱导肝星状细胞表达 α-SMA 蛋白的抑制作用

为了分析肝星状细胞的活化程度,采用 Western blot 检测细胞内 α-SMA 蛋白的表达。结果显示:1 μg/mL LPS 处理 HSC-T6 细胞 24 h,细胞内 α-SMA 蛋白表达较空白对照组升高 1 倍($P<0.05$),加用 1 μmol/L 和 10 μmol/L PHI 处理细胞后降低 HSC-T6 细胞内 α-SMA 蛋白的表达(分别降低 11.82%和 27.33%),10 μmol/L PHI 处理组较 LPS 组明显降低($P<0.05$,

图3)。结果表明:PHI能够明显抑制肝星状细胞的活化。



1:空白对照组;2:LPS处理组;3:1 μmol/L PHI + LPS处理组;4:10 μmol/L PHI + LPS处理组

A:Western blot检测;B:半定量分析(n=5)　a:P<0.05,与空白对照组比较;b:P<0.05,与LPS处理组比较

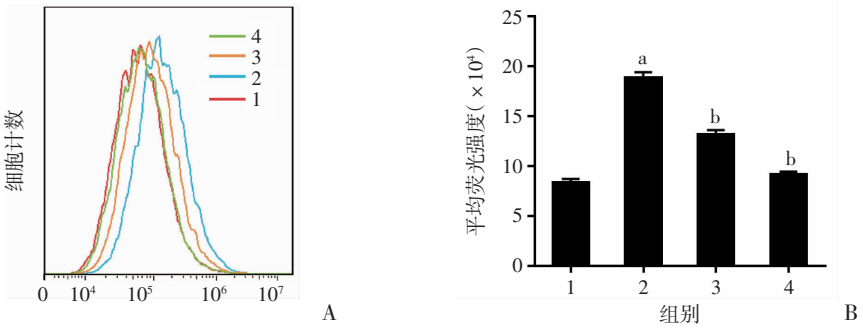
图3　PHI对LPS诱导HSC-T6细胞内α-SMA蛋白表达的抑制作用

2.4　PHI对LPS诱导肝星状细胞内ROS水平的作用

为了探索PHI抑制肝星状细胞活化的机制,采用流式细胞仪分析PHI对细胞内ROS含量的影响。与空白对照组相比,1 μg/mL LPS处理HSC-T6细胞24 h,使细胞内ROS含量显著升高1.25倍(P<0.05),而加用1 μmol/L和10 μmol/L PHI处理后细胞内的ROS含量明显降低,分别降低30.03%和51.26%(图4)。结果表明:PHI可明显降低LPS诱导肝星状细胞内产生的ROS含量。

2.5　PHI对LPS诱导HSC-T6细胞分泌炎症因子的影响

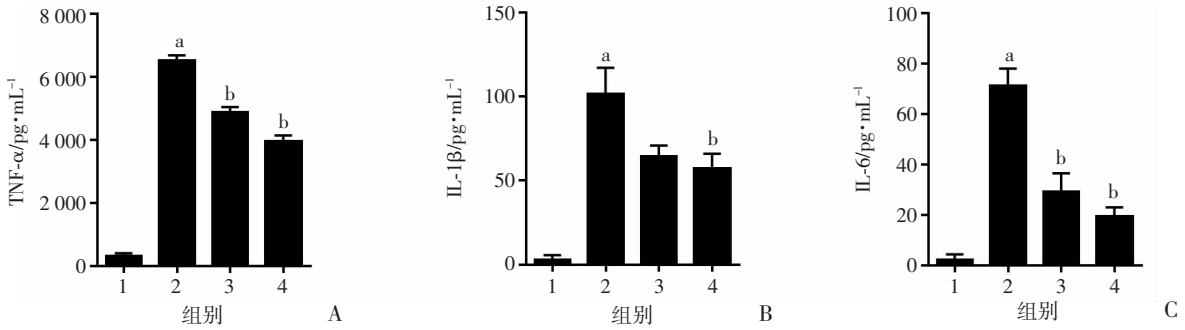
采用ELISA试剂盒检测细胞培养基上清中TNF-α、白介素-6(IL-6)和白介素-1β(IL-1β)的含量。与空白对照组比较,1 μg/mL LPS刺激HSC-T6细胞24 h,细胞培养基上清中3种炎症因子的浓度均显著升高,分别升高19.66、34.54、31.29倍。与LPS处理组比较,加用1 μmol/L和10 μmol/L PHI处理后,细胞上清中炎症因子的浓度分别降低25.16%和39.51%、36.57%和43.75%、58.99%和73.01%(图5)。结果表明:PHI能够有效抑制LPS诱导肝星状细胞分泌炎症因子。



1:空白对照组;2:LPS处理组;3:1 μmol/L PHI + LPS处理组;4:10 μmol/L PHI + LPS处理组

A:流式细胞仪检测结果;B:ROS含量分析(n=3)　a:P<0.05,与空白对照组比较;b:P<0.05,与LPS处理组比较

图4　PHI对LPS诱导HSC-T6细胞内ROS的抑制作用



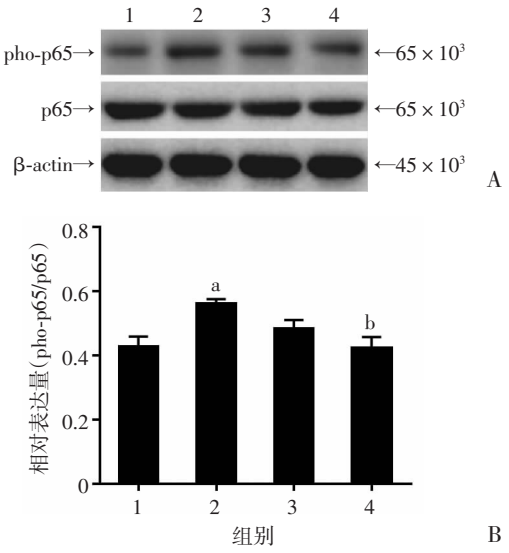
1:空白对照组;2:LPS处理组;3:1 μmol/L PHI + LPS处理组;4:10 μmol/L PHI + LPS处理组;a:P<0.05,与空白对照组比较;b:P<0.05,与LPS处理组比较

A:细胞上清中TNF-α的浓度;B:细胞上清中IL-6的浓度;C:细胞上清中IL-1β的浓度

图5　PHI对LPS诱导HSC-T6细胞分泌炎症因子的影响(n=4)

2.6 PHI 降低 LPS 诱导 HSC-T6 细胞内 NF-κB p65 蛋白磷酸化

为了探索 PHI 抑制肝星状细胞活化的机制,采用 Western blot 分析细胞内 NF-κB p65 蛋白磷酸化水平。结果显示:与空白对照组相比,1 μg/mL LPS 刺激 HSC-T6 细胞 24 h,细胞内 NF-κB p65 蛋白磷酸化水平增加 31.38% ($P<0.05$),而加用 1 μmol/L 和 10 μmol/L PHI 处理后,HSC-T6 细胞内 NF-κB p65 蛋白磷酸化水平分别降低 13.90%和 24.96%,10 μmol/L PHI 处理组较 LPS 处理组显著降低 ($P<0.05$,图 6)。表明 PHI 可以抑制 LPS 诱导肝星状细胞内 NF-κB p65 蛋白的磷酸化。



1:空白对照组;2:LPS 处理组;3:1 μmol/L PHI+LPS 处理组;4:10 μmol/L PHI + LPS 处理组

A: Western blot 检测 HSC-T6 细胞内 NF-κB p65 的表达及磷酸化水平;B:NF-κB p65 磷酸化统计分析($n=5$) a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 处理组比较

图 6 PHI 对 LPS 诱导 HSC-T6 细胞内 NF-κB p65 蛋白磷酸化的影响

2.7 相关性分析

应用斯伯尔曼等级相关性分析进行统计推断,肝星状细胞 α-SMA 的表达与 ROS 的含量、炎症因子(IL-1β、TNF-α)的浓度、NF-κB p65 蛋白磷酸化水平成正相关(相关系数分别为 0.865、0.863、0.709、0.697,$P<0.05$);PHI 处理肝星状细胞后,PHI 降低 P65 磷酸化蛋白、ROS、炎症因子(IL-1β、TNF-α)的能力与其抑制 α-SMA(肝星状细胞活化标志物)的表达能力显著正相关(相关系数分别为 0.853、0.685、0.709、0.661,$P<0.05$)。表明 NF-κB 介导的炎症反应是 LPS 诱导肝星状细胞的活化的重要原因,而 PHI 抑制 LPS 诱导肝星状细胞活化的机制与其抑制 NF-κB 介导的炎症反应有关。

3 讨论

肝星状细胞的活化是肝脏纤维化发生的关键步骤,抑制肝星状细胞活化被认为是防治肝脏纤维化的有效途径[12]。本研究建立体外炎症刺激物诱导肝星状细胞活化的细胞模型,发现天然产物 PHI 能够有效抑制 LPS 诱导的肝星状细胞增殖和迁移、显著性地抑制细胞内 α-SMA 蛋白的表达。进一步研究发现:PHI 明显降低肝星状细胞内 ROS 水平、减少炎症因子分泌,可以有效抑制 NF-κB p65 的磷酸化。上述结果表明:PHI 可以通过降低 LPS 诱导肝星状细胞的炎症反应而抑制细胞的活化。

异常增殖、迁移及高表达 α-SMA 蛋白是肝星状细胞活化的重要特征和细胞表型[13]。研究显示:采用 LPS 刺激可以促进细胞增殖[4]和迁移[14]。α-SMA 的表达是肝星状细胞活化、分化的早期标志[15],且随着肝脏纤维化程度的不断加重,其表达量也不断增加[16]。本研究发现:PHI 不仅可以抑制 LPS 刺激肝星状细胞的增殖和迁移,还能明显抑制 LPS 诱导肝星状细胞表达 α-SMA 蛋白。研究结果表明:PHI 对 LPS 诱导的肝星状细胞活化具有很明确的抑制作用。

氧化自由基的产生在 HSCs 活化及肝纤维化的发生过程中扮演着重要的角色。ROS 不仅可以通过刺激免疫细胞,释放促纤维化因子,还能够直接活化 HSCs 细胞,引发或加重肝脏纤维化[17]。据报道,通过腹腔注射 LPS 可使小鼠发生氧化应激型肝脏损伤[18]。本研究发现体外利用 LPS 直接处理 HSC-T6 细胞,能引起细胞内 ROS 含量升高;而 PHI 可明显降低细胞内 LPS 诱导产生的 ROS。此结果说明 PHI 对 LPS 诱导肝星状细胞内的 ROS 含量也具有明显的降低作用。这与研究报道的 PHI 抗氧化作用一致[9]。

促炎性细胞因子,主要包括 TNF-α、IL-6、IL-1β,在慢性肝脏炎症的发生和 HSCs 细胞活化的过程中也起着重要作用[19]。LPS 可以直接通过与 HSCs 细胞上的 TLR4 等受体结合,诱导细胞分泌促炎细胞因子,激活 HSCs 细胞[20]。本研究数据显示:PHI 可显著性地降低 LPS 诱导所致 HSCs 细胞分泌的促炎细胞因子。这说明 PHI 对 LPS 诱导肝星状细胞炎症反应具有抑制作用。

NF-κB 是 LPS 诱导炎症发生信号途径中一个重要的转录因子。LPS 通过调节 NF-κB p65 的磷酸化,激活 NF-κB 信号通路,促进 HSCs 细胞的活化[21-22]。本研究发现 PHI 可以明显抑制 LPS 诱导 HSC-T6 细胞

内 NF-κB p65 蛋白磷酸化。表明 PHI 对 LPS 诱导肝星状细胞内 NF-κB 信号途径激活也具有明显的抑制作用。

采用斯伯尔曼等级相关性分析法对 PHI 抑制 LPS 诱导肝星状细胞活化和炎症的指标进行相关性分析,发现肝星状细胞内 α-SMA 表达的增加与 LPS 诱导细胞内 ROS 含量、细胞上清中炎症因子(IL-1β、TNF-α)和细胞内 NF-κB p65 蛋白磷酸化水平的增加呈正相关,而 PHI 处理后 α-SMA 的表达水平与 ROS 含量、炎症因子浓度和 NF-κB p65 蛋白磷酸化水平降低的趋势一致。据文献报道,ROS 可以通过抑制 IκBα 蛋白磷酸化,或抑制 IKK 蛋白磷酸化,或干扰 IκB 蛋白的泛素化而活化 NF-κB 信号途径;同时,NF-κB 信号的活化又可以通过上调抗氧化蛋白酶的表达,抑制 ROS 的含量[23]。此外,细胞 NF-κB 信号的活化,促进 IL-1β、TNF-α 等因子的表达上调;TNF-α 等又可以通过与其受体结合,激活受体下游的 NF-κB 信号途径[24]。然而,NF-κB 信号途径活化又促进 TGF-β1 的表达,促使肝星状细胞活化,继而表现出增殖、迁移、α-SMA 蛋白表达增加的特性[25-27]。本研究的相关性分析与文献报道一致。表明 PHI 抑制 LPS 诱导肝星状细胞的活化的作用机制与其抑制 NF-κB 信号通路及细胞炎症反应密切相关。但仍有待需要通过定量蛋白组学等技术手段,进一步明确鉴定与 PHI 相互作用的蛋白质,以期发现可以调控炎症、抑制肝星状细胞活化的新药靶点。

综上所述,LPS 直接通过激活细胞内在的炎症反应,促进肝星状细胞增殖、迁移和活化。天然产物 PHI 能够显著性地抑制 LPS 诱导的炎症反应,从而降低肝星状细胞增殖和迁移的能力,抑制细胞活化。尽管 PHI 抑制肝星状细胞活化的机制有待深入研究,但 PHI 通过直接抑制炎症刺激物诱导的信号途径,达到抑制肝星状细胞活化的作用,为开发防治肝脏纤维化有效药物提供了有益思路。

参考文献:

[1] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues[J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 37-55. DOI: 10.1016/j.mam.2018.09.002.

[2] HOWELL J, PEDRANA A, COWIE B C, *et al*. Aiming for the elimination of viral hepatitis in Australia, New Zealand, and the Pacific Islands and Territories: where are we now and barriers to meeting world health organization targets by 2030[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2019, 34(1): 40-48. DOI: 10.1111/jgh.14457.

[3] HIGASHI T, FRIEDMAN S L, HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 121: 27-42. DOI: 10.1016/j.addr.2017.05.007.

[4] CHEN Y H, WU Z F, YUAN B Y, *et al*. MicroRNA-146a-5p attenuates irradiation-induced and LPS-induced hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis through inhibition of TLR4 pathway[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 22. DOI: 10.1038/s41419-017-0038-z.

[5] SHI H T, DONG L, DANG X Y, *et al*. Effect of chlorogenic acid on LPS-induced proinflammatory signaling in hepatic stellate cells[J]. Inflamm Res, 2013, 62(6): 581-587. DOI: 10.1007/s00011-013-0610-7.

[6] QU H H, ZHANG Y M, WANG Y, *et al*. Antioxidant and antibacterial activity of two compounds (forsythiaside and forsythin) isolated from Forsythia suspensa[J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(2): 261-266. DOI: 10.1211/jpp.60.2.0016.

[7] WEI T, TIAN W L, YAN H Y, *et al*. Protective effects of phillyrin on H_2O 2-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2014, 34(8): 1165-1173. DOI: 10.1007/s10571-014-0091-4.

[8] ZHONG W T, WU Y C, XIE X X, *et al*. Phillyrin attenuates LPS-induced pulmonary inflammation *via* suppression of MAPK and NF-κB activation in acute lung injury mice[J]. Fitoterapia, 2013, 90: 132-139. DOI: 10.1016/j.fitote.2013.06.003.

[9] PAN X L, CAO X, LI N, *et al*. Forsythin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by suppressing JAK-STAT and p38 MAPK signalings and ROS production[J]. Inflamm Res, 2014, 63(7): 597-608. DOI: 10.1007/s00011-014-0731-7.

[10] 王小芸, 赵怀舟, 倪艳. 连翘应用源流初考[J]. 中医文献杂志, 2016, 34(5): 21-24.
WANG X Y, ZHAO H Z, NI Y. Preliminary historical research on application of lianqiao[J]. J Tradit Chin Med Lit, 2016, 34(5): 21-24.

[11] ZHANG Y, MIAO H, YAN H Y, *et al*. Hepatoprotective effect of Forsythiae Fructus water extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 218: 27-34. DOI: 10.1016/j.jep.2018.02.033.

[12] EZHILARASAN D, SOKAL E, NAJIMI M. Hepatic fibrosis: It is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets[J]. Hepatobil Pancreati Dis Int, 2018, 17(3): 192-197. DOI: 10.1016/j.hbpd.2018.04.003.

[13] PUCHE J E, SAIMAN Y, FRIEDMAN S L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Compr Physiol, 2013, 3(4): 1473-1492. DOI: 10.1002/cphy.c120035.

[14] CHEN H J, LIANG T M, LEE I J, *et al*. Scutellariae radix suppresses LPS-induced liver endothelial cell activation and inhibits hepatic stellate cell migration[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 150(3): 835-842. DOI: 10.1016/j.jep.2013.08.049.

[15] ATZORI L, POLI G, PERRA A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(8/9): 1639-1642. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.03.001.

[16] LAN T, LI C Z, YANG G Z, *et al*. Sphingosine kinase 1 promotes liver fibrosis by preventing miR-19b-3p-mediated inhibition of CCR2[J]. Hepatology, 2018, 68(3): 1070-1086. DOI: 10.1002/hep.29885.

[17] SÁNCHEZ-VALLE V, CHÁVEZ-TAPIA N C, URIBE M, *et al*. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(28): 4850-4860. DOI: 10.2174/092986712803341520.

[18] ZHONG W H, QIAN K J, XIONG J B, *et al*. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced Sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation *via* PI3K/AKT and NF-κB related signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 302-313. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.06.036.

[19] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(7): 397-411. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.38.

[20] CHEN Y H, ZENG Z C, SHEN X Y, *et al*. MicroRNA-146a-5p negatively regulates pro-inflammatory cytokine secretion and cellactivation in lipopolysaccharide stimulated human hepatic stellate cells through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathways[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(7): E1076. DOI: 10.3390/ijms17071076.

[21] GAN F, LIU Q, LIU Y H, *et al*. Lycium barbarum polysaccharides improve CCl4-induced liver fibrosis, inflammatory response and TLRs/NF-kB signaling pathway expression in wistar rats[J]. Life Sci, 2018, 192: 205-212. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.11.047.

[22] LUEDDE T, SCHWABE R F. NF-κB in the liver: linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(2): 108-118. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.213.

[23] ZHANG J X, WANG X L, VIKASH V, *et al*. ROS and ROS-mediated cellular signaling[J]. Oxidative Med Cell Longev, 2016, 2016: 1-18. DOI: 10.1155/2016/4350965.

[24] LIU T, ZHANG L Y, JOO D, *et al*. NF-κB signaling in inflammation[J]. Sig Transduct Target Ther, 2017, 2: 17023. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.

[25] PAIK Y H, KIM J, AOYAMA T, *et al*. Role of NADPH oxidases in liver fibrosis[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(17): 2854-2872. DOI: 10.1089/ars.2013.5619.

[26] KOYAMA Y, BRENNER D A. Liver inflammation and fibrosis[J]. J Clin Investig, 2017, 127(1): 55-64. DOI: 10.1172/jci88881.

[27] LI X, JIN Q, WU Y L, *et al*. Tetrandrine regulates hepatic stellate cell activationvia TAK1 and NF-κB signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2016, 36: 263-270. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.04.039.

(收稿:2019-10-22;修回:2019-12-09)

(编辑 汪勤俭)