柚皮素通过激活凋亡信号抑制肝星状细胞活化Δ

吴丽霞[1*]，王雨薇[2]，吴红雁[3#]（1.安徽省庐江县人民医院儿科，合肥 231501；2.南京中医药大学药学院，南京 210023；3.江苏医药职业学院医药生物技术研究院，江苏 盐城 224005）

中图分类号 R965　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2023）10-1187-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.10.07

摘　要　目的 研究柚皮素对肝星状细胞活化的体外抑制作用及可能机制。**方法** 以人正常肝细胞LO2为参照，在MTT法筛选药物干预浓度的基础上，考察柚皮素（Western blot实验和台盼蓝染色实验浓度为10、20、40 μmol/L，免疫荧光实验浓度为40 μmol/L）对人肝星状细胞LX2肝纤维化标志物蛋白[胶原纤维Ⅰ（collagenⅠ）、α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）]及mRNA（collagen Ⅰ前体α1-pro collagen Ⅰ、α-SMA）表达、细胞凋亡及凋亡相关蛋白[Bcl-2、Bax、剪切的胱天蛋白酶3（cleaved caspase-3）]表达的影响；选择凋亡抑制剂（Z-VAD-FMK，FMK）、铁死亡通路抑制剂ferrostatin-1、程序性死亡通路抑制剂necrostatin-1对上述作用机制进行验证。**结果** 柚皮素可显著下调LX2细胞中collagen Ⅰ（柚皮素10 μmol/L除外）、α-SMA蛋白及α1-pro collagen Ⅰ（柚皮素10 μmol/L除外）、α-SMA mRNA的表达（$P<0.05$），可诱导LX2细胞凋亡并提高其凋亡比例，可显著下调Bcl-2蛋白的表达并上调Bax（柚皮素10 μmol/L除外）、cleaved caspase-3（柚皮素10 μmol/L除外）蛋白的表达；FMK可逆转柚皮素对LX2细胞的上述作用（$P<0.05$）。**结论** 柚皮素可通过激活肝星状细胞LX2的凋亡信号来抑制其活化，从而发挥对肝纤维化的改善作用。

关键词 柚皮素；肝星状细胞；肝纤维化；细胞凋亡信号

Inhibitory effects of naringenin on the activation of hepatic stellate cells through activating the apoptosis signal

WU Lixia[1], WANG Yuwei[2], WU Hongyan[3] (1. Dept. of Pediatrics, Lujiang County People's Hospital of Anhui Province, Hefei 231501, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Institute of Biomedical Technology, Jiangsu Vocational College of Medicine, Jiangsu Yancheng 224005, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the inhibitory effects and possible mechanism of naringenin on the activation of hepatic stellate cells. **METHODS** Using human hepatocytes LO2 as reference, based on drug intervention concentration screened by MTT assay, the effects of naringenin (Western blot assay and trypan blue staining test in 10, 20, 40 μmol/L, immunofluorescence assay in 40 μmol/L) on the expressions of liver fibrosis markers protein (collagen Ⅰ, α-SMA) and mRNA (α1-pro collagen Ⅰ, α-SMA) in human hepatic stellate cells LX2, and the expressions of cell apoptosis and apoptosis-related proteins (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3) were investigated. The apoptosis agents (Z-VAD-FMK, FMK), ferroptosis pathway inhibitor ferrostatin-1, and programmed death pathway inhibitor necrostatin-1 were used to verify the mechanism of the above effects. **RESULTS** The naringenin could significantly down-regulate protein expressions of collagen Ⅰ (except for naringenin 10 μmol/L) and α-SMA, mRNA expressions of α1-pro collagen Ⅰ (except for naringenin 10 μmol/L) and α-SMA ($P<0.05$); it also induced LX2 cell apoptosis and increased its apoptotic ratio, down-regulated the protein expression of Bcl-2 while up-regulated the protein expressions of Bax (except for naringenin 10 μmol/L) and cleaved caspase-3 (except for naringenin 10 μmol/L). FMK could reverse above effects of naringenin on LX2 cells ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Naringenin can inhibit the activation of hepatic stellate cells LX2 through activating the cell apoptosis signal, which plays ameliorative role in liver fibrosis.

KEYWORDS naringenin; hepatic stellate cells; liver fibrosis; cell apoptosis signal

肝纤维化是一种由饮酒过量、病毒（乙型和丙型肝炎病毒）感染和非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪肝病、自身免疫性肝炎等多种致病因素引起的慢性肝损伤性疾病[1]。有研究指出，若不及时干预肝纤维化患者的肝损伤，其病情将进一步发展为肝硬化甚至肝细胞癌[2]。幸运的是，肝纤维化是一个可逆的过程。目前，肝星状细胞（hepatic stellate cell，HSC）被认为肝纤维化的驱动

Δ **基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.81873134，No.82274339）；江苏高校“青蓝工程”中青年学术带头人培养对象资助项目（No.苏教师函〔2020〕10号）；江苏高校“青蓝工程”优秀教学团队培养对象资助项目（No.苏教师函〔2021〕11号）

＊ **第一作者** 副主任医师。研究方向：儿童肝脏疾病。E-mail：1094988007@qq.com

通信作者 副教授，博士。研究方向：分子药理学。E-mail：why20133055@163.com

中心，其持续活化是肝纤维化进展的主要因素[3－4]。近年来，有学者围绕调控HSC活化（如抑制HSC增殖、诱导HSC凋亡、调控HSC自噬进程等）开展了相关研究，以期找到有效的肝纤维化防治药物。研究发现，在肝纤维化恢复期，HSC数量的减少主要是通过细胞凋亡信号实现的[5]。可见，抑制HSC活化和增殖是逆转肝纤维化的重要机制，诱导活化HSC凋亡也可能是逆转肝纤维化的重要策略。

柚皮素（naringenin）是一种广泛存在于柑橘类水果中的天然黄酮类成分，在葡萄柚中的含量最为丰富[4]。研究显示，柚皮素具有抗炎[6]、抗氧化[7]等一系列生物效应，还具有改善肥胖[8]和代谢综合征[9]的作用。本课题组一直致力于研究中药及其活性成分对肝纤维化等慢性肝病的防治作用，前期体内预实验结果显示，柚皮素对四氯化碳（CCl_4）致肝纤维化有抑制作用，因此本研究拟从体外细胞分子水平出发，基于凋亡信号探讨柚皮素对肝纤维化关键中枢HSC活化的抑制作用及可能机制，旨在为寻找有效的抗肝纤维化药物提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Varioskan LUX型多功能酶标仪、Thermo 311型CO_2细胞培养仪均购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；IX53型光学显微镜购自日本Olympus公司；5200型全自动化学发光成像分析系统购自上海天能科技有限公司；qTOWER3G型荧光定量聚合酶链反应（quantitative PCR，q-PCR）仪购自德国Analytik Jena AG公司。

1.2 主要药品与试剂

柚皮素对照品（批号MUAT-21032406，纯度98%）购自成都曼斯特生物科技有限公司；凋亡抑制剂Z-VAD-FMK（FMK，批号HY-16658B）、铁死亡通路抑制剂ferrostatin-1（F1，批号HY-100579）、程序性死亡通路抑制剂necrostatin-1（NEC-1，批号HY15760）均购自美国MedChem Express公司，浓度均为10 μmol/L；胎牛血清和DMEM培养液均购自美国Gibco公司；RIPA裂解液、十二烷基硫酸钠（sodium laurylsulfonate，SDS）、牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）均购自北京兰杰柯科技有限公司；台盼蓝、JC-1试剂盒均购自江苏凯基生物技术股份有限公司；兔源β-肌动蛋白（β-actin）、α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）多克隆抗体均购自武汉爱博泰克生物科技有限供公司；兔源胶原蛋白Ⅰ（collagen Ⅰ）、Bcl-2、Bax、胱天蛋白酶3（caspase-3）、剪切的胱天蛋白酶3（cleaved caspase-3）多克隆抗体和山羊抗兔IgG二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 细胞株

人正常肝细胞LO2和人HSC LX2均购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

取LO2和LX2细胞，接种于含10%胎牛血清的DMEM培养液中，于37 ℃、5%CO_2条件下培养。每2 d更换1次培养液，取对数生长期细胞进行后续实验。

2.2 柚皮素对细胞增殖抑制率影响的检测

采用MTT法进行检测。按“2.1”项下方法体外培养LO2和LX2细胞，取培养4～5 d且处于对数生长期的细胞，用含10%胎牛血清的DMEM培养液稀释制得细胞悬液。取上述细胞悬液，按每孔1×10^4个（每孔100 μL）接种于96孔板中，于37 ℃、5%CO_2条件下培养24 h，分别用不同浓度（2、5、10、20、40 μmol/L）的柚皮素干预，每浓度设置6个复孔，同时设置不含细胞、不含药物的调零组和不含药物的空白对照组。培养24 h后，弃去上清液，每孔加入DMEM培养液180 μL和5 mg/mL的MTT溶液20 μL，37 ℃温育4 h后，弃去上清液，每孔加入二甲基亚砜150 μL，摇匀。使用多功能酶标仪在490 nm波长处检测每孔的吸光度，并计算增殖抑制率：增殖抑制率＝（空白对照组吸光度－实验组吸光度）/（空白对照组吸光度－调零组吸光度）。

2.3 柚皮素对LX2细胞肝纤维化标志物蛋白表达影响的检测

2.3.1 Western blot实验 取对数生长期的LX2细胞，按每孔1×10^6个（每孔2 mL）接种于6孔板中，于37 ℃、5%CO_2条件下培养24 h，分别用不同浓度（10、20、40 μmol/L，浓度按“2.2”项下实验结果设置，下同）的柚皮素干预，每浓度设置3个复孔，同时设置不含药物的空白对照组。培养24 h后，收集各组细胞并提取蛋白，电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上，用5%脱脂奶粉室温封闭2 h；以TBST缓冲液洗膜，加入collagen Ⅰ、α-SMA、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；以TBST缓冲液洗膜，加入山羊抗兔IgG二抗（稀释比例为1∶10 000），室温孵育2 h；以TBST缓冲液洗膜，用ECL化学发光底物显影液进行显色，置于全自动化学发光成像分析系统下曝光成像并使用Image J 1.53e软件进行分析。以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。实验重复3次。

2.3.2 免疫荧光实验 将经75%乙醇浸泡（30 min）过的玻片置于24孔板中，加入含2×10^5个LX2细胞的悬液2 mL。待细胞贴壁后，用柚皮素（40 μmol/L，设置3个复孔）干预，同时设置不含药物的空白对照组。培养24 h后，收集各组细胞，以磷酸盐缓冲液清洗5 min×3次，置于4%多聚甲醛溶液中固定，37 ℃孵育30 min，以0.1%TritonX-100溶液在室温下通透10 min，用含1%BSA的磷酸盐缓冲液封片60 min；加入collagen Ⅰ、α-SMA一抗（稀释比例均为1∶2 000），4 ℃孵育过夜；加

入山羊抗兔IgG二抗（稀释比例为1∶10 000），37 ℃避光孵育2 h；使用DAPI染色，室温避光孵育5 min，封片并加入荧光淬灭封片液后，置于光学显微镜下观察并拍照。以绿色荧光的强度来表示目的蛋白的表达水平。

2.4 柚皮素对LX2细胞肝纤维化标志物mRNA表达影响的检测

采用q-PCR法进行检测。取对数生长期的LX2细胞，按“2.3.1”项下方法分组、给药。培养24 h后，提取细胞总RNA。待测定浓度后，将总RNA逆转录成cDNA，随后进行PCR扩增。PCR反应体系（总体积15 μL）为：cDNA模板1 μL、SYBR Premix Ex Taq（Ti RNaseH plus）7.5 μL、上/下游引物各0.6 μL、ddH_2O 5.3 μL。PCR反应条件为：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火10 s，72 ℃延伸30 s，共循环40次。反应结束后，以磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算collagen Ⅰ前体α1-pro collagen Ⅰ、α-SMA mRNA的表达水平。各引物由生工生物工程（上海）股份有限公司设计、合成，其具体序列和产物长度见表1。

表1 引物序列和产物长度

目的基因	引物序列	产物长度/bp
α1-pro collagen I	上游：5′-ATTCCAGTTCGAGTATGGCGG-3′	234
	下游：5′-GTTGCTTGTCTGTTTCCGGGT-3′	
α-SMA	上游：5′-GCGTGGCTATTCCTTCGTTAC-3′	148
	下游：5′-CATAGTGGTGCCCCCTGATAG-3′	
GAPDH	上游：5′-CCAACCGCGAGAAGATGA-3′	83
	下游：5′-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3′	

2.5 柚皮素对LX2细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达影响的检测

2.5.1 台盼蓝染色实验 将经75%乙醇浸泡（30 min）过的玻片置于24孔板中，加入含2×10^5个LX2细胞的悬液2 mL。待细胞贴壁后，用不同浓度（10、20、40 μmol/L）的柚皮素干预，每浓度设置3个复孔，同时设置不含药物的空白对照组。培养24 h后，以磷酸盐缓冲液清洗2次；加入台盼蓝染液，孵育3 min；以磷酸盐缓冲液清洗，置于光学显微镜下观察、拍照（凋亡细胞被染成蓝色）并计算凋亡细胞比例。

2.5.2 Western blot实验 取对数生长期的LX2细胞，按“2.3.1”项下方法分组、给药。培养24 h后，收集各组细胞并提取蛋白，电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上，用5%脱脂奶粉室温封闭2 h；以TBST缓冲液洗膜，加入β-actin、Bcl-2、Bax、caspase-3、cleaved caspase-3一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；以TBST缓冲液洗膜，加入山羊抗兔IgG二抗（稀释比例为1∶10 000），室温孵育2 h；以TBST缓冲液洗膜，用ECL化学发光底物显影液进行显色，置于全自动化学发光成像分析系统下曝光成像并使用Image J 1.53e软件进行分析。以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平（cleaved caspase-3蛋白的表达还需以caspase-3蛋白为对照）。实验重复3次。

2.6 验证实验

使用凋亡通路抑制剂进一步验证柚皮素的促凋亡作用机制。

2.6.1 MTT实验 取对数生长期的LX2细胞，按每孔1×10^4个（每孔100 μL）接种于96孔板中，于37 ℃、5%CO_2条件下培养24 h。将细胞分为柚皮素组（40 μmol/L）、柚皮素+FMK组（二者浓度分别为40、10 μmol/L）、柚皮素+F1组（二者浓度分别为40、1 μmol/L）、柚皮素+NEC-1组（二者浓度分别为40、10 μmol/L），每组设置6个复孔，同时设置不含细胞、不含药物的调零组和不含药物的空白对照组。按“2.2”项下方法处理并计算增殖抑制率。柚皮素的干预浓度参考“2.2”项下实验结果，FMK、F1、NEC-1的干预浓度参考相关文献[10]。

2.6.2 台盼蓝染色实验 将经75%乙醇浸泡（30 min）过的玻片置于24孔板中，加入含2×10^5个LX2细胞的悬液2 mL。待细胞贴壁后，将其分为空白对照组、柚皮素组（40 μmol/L）、柚皮素+FMK组（二者浓度分别为40、10 μmol/L，抑制剂的选择参考“2.6.1”项下实验结果），每组设置3个复孔。培养24 h后，按“2.5.1”项下方法染色、观察各组细胞的凋亡情况并计算凋亡细胞比例。

2.6.3 JC-1实验 将经75%乙醇浸泡（30 min）过的玻片置于24孔板中，加入含2×10^5个LX2细胞的悬液2 mL。待细胞贴壁后，按“2.6.2”项下方法分组、给药。培养24 h后，加入JC-1染色工作液1 mL，混匀，37 ℃孵育20 min；吸弃上清液，细胞以JC-1染色缓冲液清洗2次，置于光学显微镜下观察细胞染色情况（红色荧光表示细胞线粒体膜电位完整，细胞活性较高；绿色荧光表示线粒体膜电位消失，细胞发生凋亡；叠加黄色区域越小，表明细胞凋亡越多）。

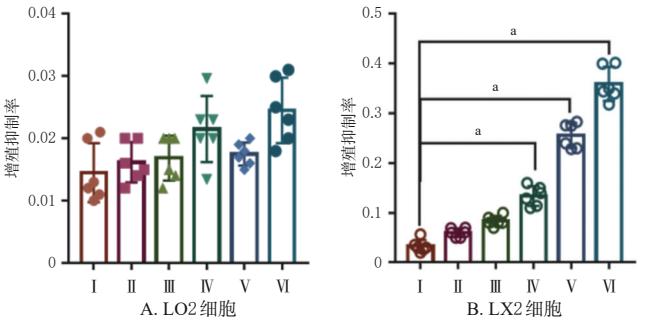
2.7 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析，采用GraphPad Prism 7软件作图。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 柚皮素对LO2和LX2细胞增殖抑制率的影响

不同浓度的柚皮素对正常肝细胞LO2的增殖抑制率无明显影响，而10、20、40 μmol/L的柚皮素能显著升高LX2细胞的增殖抑制率（$P<0.05$）。因此，后续实验以10、20、40 μmol/L作为柚皮素的干预浓度。结果见图1。

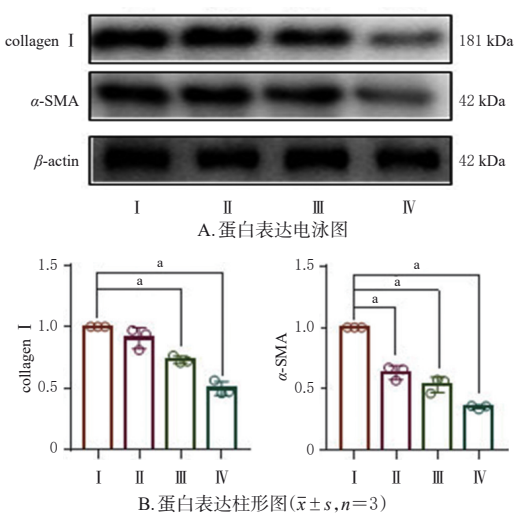


Ⅰ：空白对照组；Ⅱ：柚皮素2 μmol/L组；Ⅲ：柚皮素5 μmol/L组；Ⅳ：柚皮素10 μmol/L组；Ⅴ：柚皮素20 μmol/L组；Ⅵ：柚皮素40 μmol/L组；a：与空白对照组比较，$P<0.05$

图1　柚皮素对LO2和LX2细胞增殖抑制率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

3.2　柚皮素对LX2细胞中肝纤维化标志物蛋白及mRNA表达的影响

Western blot实验结果显示，与空白对照组比较，柚皮素各浓度组collagen Ⅰ（柚皮素10 μmol/L组除外）、α-SMA蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$），且上述作用有浓度依赖趋势；免疫荧光实验也证实了上述结果。结果见图2、图3。



Ⅰ：空白对照组；Ⅱ：柚皮素10 μmol/L组；Ⅲ：柚皮素20 μmol/L组；Ⅳ：柚皮素40 μmol/L组；a：与空白对照组比较，$P<0.05$

图2　柚皮素对LX2细胞中collagen Ⅰ、α-SMA蛋白表达的影响（Western blot实验）

q-PCR实验结果显示，柚皮素各浓度组α1-pro collagen Ⅰ（柚皮素10 μmol/L组除外）、α-SMA mRNA的表达水平均显著降低（$P<0.05$），且上述作用有浓度依赖趋势。结果见图4。

3.3　柚皮素对LX2细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响

台盼蓝染色实验结果显示，不同浓度的柚皮素均可诱导LX2细胞凋亡并提高其凋亡比例，且上述作用有浓度依赖趋势。结果见图5。

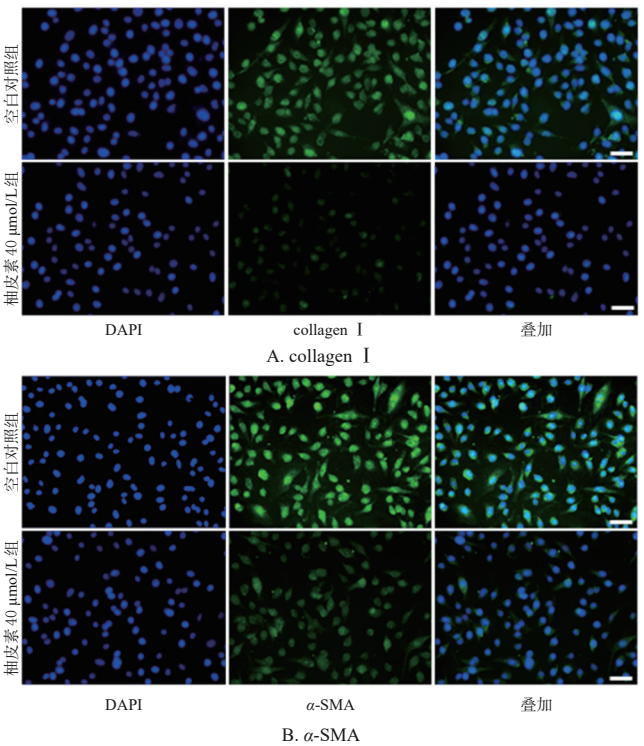
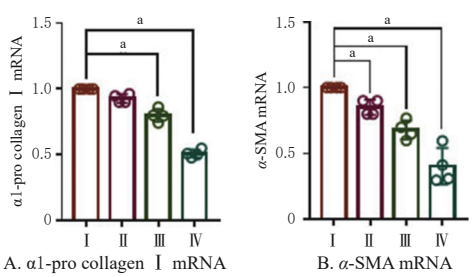
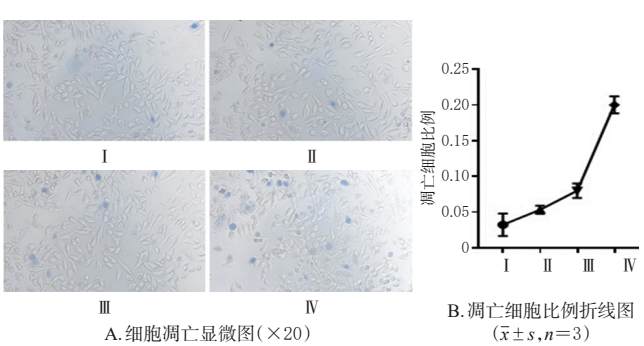


图3　柚皮素对LX2细胞中collagen Ⅰ、α-SMA蛋白表达的影响（免疫荧光实验，×20）



Ⅰ：空白对照组；Ⅱ：柚皮素10 μmol/L组；Ⅲ：柚皮素20 μmol/L组；Ⅳ：柚皮素40 μmol/L组；a：与空白对照组比较，$P<0.05$

图4　柚皮素对LX2细胞中α1-pro collagen Ⅰ、α-SMA mRNA表达的影响（q-PCR实验，$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

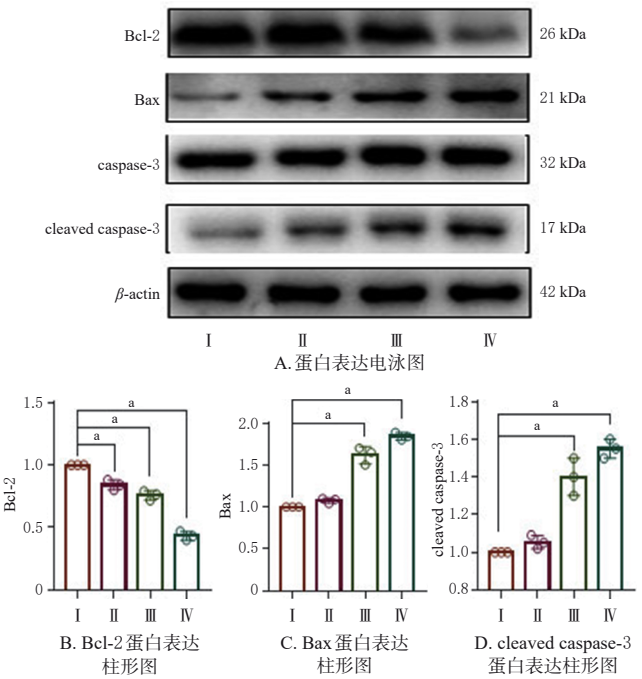


Ⅰ：空白对照组；Ⅱ：柚皮素10 μmol/L组；Ⅲ：柚皮素20 μmol/L组；Ⅳ：柚皮素40 μmol/L组

图5　柚皮素对LX2细胞凋亡的影响（台盼蓝染色实验）

Western blot实验结果显示，与空白对照组比较，柚皮素各浓度组细胞中Bcl-2蛋白的表达水平均显著降低，Bax（柚皮素10 μmol/L组除外）、cleaved caspase-3

（柚皮素10 μmol/L组除外）蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$），且上述作用有浓度依赖趋势。结果见图6。

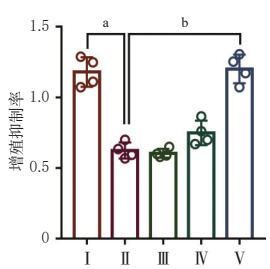


Ⅰ：空白对照组；Ⅱ：柚皮素10 μmol/L组；Ⅲ：柚皮素20 μmol/L组；Ⅳ：柚皮素40 μmol/L组；a：与空白对照组比较，$P<0.05$

图6　柚皮素对LX2细胞中凋亡相关蛋白表达的影响（Western blot实验，$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

3.4　验证实验结果

MTT实验结果（图7）显示，柚皮素组细胞的增殖抑制率较空白对照组显著降低（$P<0.05$）；柚皮素+FMK组细胞的增殖抑制率较柚皮素组显著升高（$P<0.05$），而柚皮素+NEC-1组、柚皮素+F1组细胞的增殖抑制率与柚皮素组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。台盼蓝染色实验结果（图8）显示，40 μmol/L的柚皮素可诱导细胞凋亡，提高凋亡细胞比例；而FMK可逆转柚皮素的这种作用。JC-1实验结果（图9）进一步说明，柚皮素能造成细胞线粒体膜电位的降低，从而诱导细胞凋亡，而FMK可逆转柚皮素的这种作用。



Ⅰ：空白对照组；Ⅱ：柚皮素组；Ⅲ：柚皮素+NEC-1组；Ⅳ：柚皮素+F1组；Ⅴ：柚皮素+FMK组；a：与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与柚皮素组比较，$P<0.05$

图7　柚皮素诱导细胞凋亡的验证实验结果（MTT实验，$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

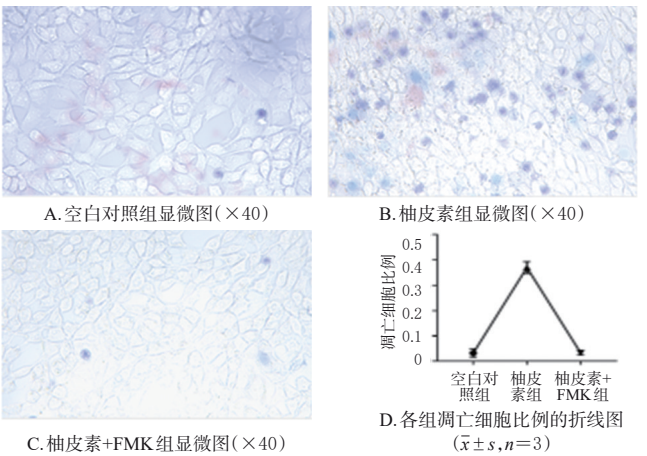


图8　柚皮素诱导细胞凋亡的验证实验结果（台盼蓝染色实验）

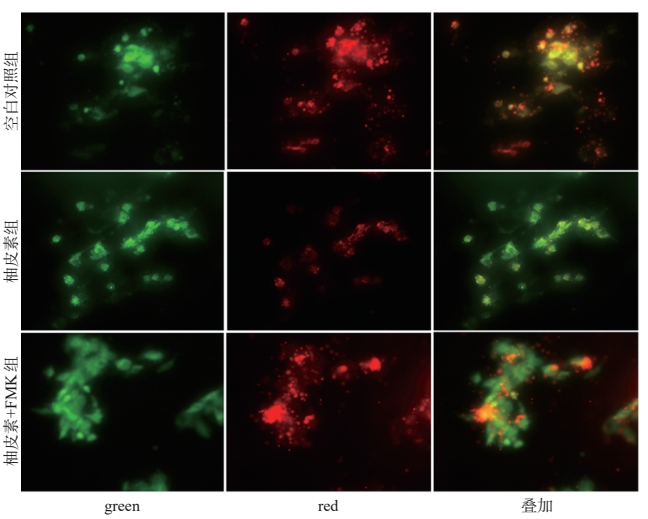


图9　柚皮素诱导细胞凋亡的验证实验结果（JC-1实验，×40）

4　讨论

肝纤维化是机体对肝实质损伤的一种修复反应，反映了肝脏修复与瘢痕组织进行性肝实质置换之间的平衡，在此过程中，HSC是负责纤维细胞外基质沉积的主要细胞，能驱动肝脏瘢痕的形成[11]。HSC的活化、迁移和增殖由涉及生长因子、脂毒性、炎症和应激的复杂信号网络控制；相反，清除活化的HSC是解决细胞纤维化的先决条件。因此，调节HSC活性的途径可能是防治肝纤维化的潜在靶点[3]。近年来，天然化合物逐渐走入研究人员的视野，柚皮素就是其中之一。作为一种天然黄酮类成分，其具有广泛的抗炎、抗氧化等多种生物学活性，且也有文献证实了该成分具有良好的保肝活性[12]，但其是否能够改善肝纤维化及其作用分子机制尚不清楚。基于此，本研究拟通过体外实验来初步探究柚皮素抗肝纤维化的潜在作用及机制。

α-SMA是HSC活化的标志物；collagen Ⅰ是HSC活化后所释放的细胞外基质的主要成分，也是纤维的重要

来源[12]。因此，本研究在以MTT法筛选柚皮素干预浓度的基础上，通过Western blot、荧光免疫和q-PCR实验探究了柚皮素对LX2细胞中α-SMA、collagen Ⅰ蛋白及α-SMA、α1-pro collagen Ⅰ（collagen Ⅰ前体）mRNA表达的影响，结果显示，经10、20、40 μmol/L柚皮素干预后，细胞中α-SMA、collagen Ⅰ蛋白及α-SMA、α1-pro collagen Ⅰ mRNA的表达水平均显著降低（柚皮素10 μmol/L组细胞collagen Ⅰ蛋白、α1-pro collagen Ⅰ mRNA除外），且这种作用具有浓度依赖趋势，提示柚皮素可通过下调collagen Ⅰ和α-SMA的表达来抑制HSC的活化。

随后，本研究就柚皮素对细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响进行了探讨。台盼蓝染色实验结果表明，随着柚皮素干预浓度的增加，凋亡细胞数量及比例均明显增加。凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3表达水平的检测结果显示，柚皮素各浓度组细胞中Bax、cleaved caspase-3蛋白的表达水平（柚皮素10 μmol/L组除外）均显著升高，Bcl-2蛋白的表达水平显著降低，提示柚皮素可激活LX2细胞的凋亡通路。为验证上述作用机制，本研究纳入了3种细胞通路抑制剂，分别是凋亡抑制剂FMK、铁死亡抑制剂F1和程序性死亡抑制剂NEC-1。MTT实验结果显示，只有FMK可阻断柚皮素对LX2细胞增殖的抑制作用。本研究进一步将柚皮素和FMK联合使用，分别进行了细胞台盼蓝染色和JC-1实验，结果显示，FMK的确可逆转柚皮素诱导的LX2细胞凋亡。在凋亡通路抑制剂FMK的作用下，柚皮素对LX2细胞活力的抑制作用和对细胞凋亡的促进作用均被逆转，表明当凋亡通路被抑制后，柚皮素减少LX2细胞活化的能力被减弱，进一步证实了该成分是通过细胞凋亡信号来抑制LX2细胞活化的。

本研究在细胞水平上初步明确了天然活性成分柚皮素可通过激活LX2细胞的凋亡信号来发挥抗肝纤维化作用，为抗肝纤维化药物的进一步开发提供了理论基础。

参考文献

[1] RAIMONDO G, SAITTA C, LOMBARDO D, et al. Occult hepatitis B virus infection predicts non-alcoholic steatohepatitis in severely obese individuals from Italy[J]. Liver Int, 2020, 40(7): 1601-1609.

[2] CALCAGNO D M, CHU A, GAUL S, et al. NOD-like receptor protein 3 activation causes spontaneous inflammation and fibrosis that mimics human NASH[J]. Hepatology, 2022, 76(3): 727-741.

[3] ZISSER A, IPSEN D H, TVEDEN-NYBORG P. Hepatic stellate cell activation and inactivation in NASH-fibrosis-roles as putative treatment targets? [J]. Biomedicines, 2021, 9(4): 365.

[4] ZHANG Z L, GUO M, LI Y J, et al. RNA-binding protein ZFP36/TTP protects against ferroptosis by regulating autophagy signaling pathway in hepatic stellate cells[J]. Autophagy, 2020, 16(8): 1482-1505.

[5] YU H X, YAO Y, BU F T, et al. Blockade of YAP alleviates hepatic fibrosis through accelerating apoptosis and reversion of activated hepatic stellate cells[J]. Mol Immunol, 2019, 107: 29-40.

[6] WANG Q Y, OU Y J, HU G M, et al. Naringenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the NLRP3/NF-κB pathway in mice[J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(8): 1806-1821.

[7] JIN L T, ZENG W F, ZHANG F Y, et al. Naringenin ameliorates acute inflammation by regulating intracellular cytokine degradation[J]. J Immunol, 2017, 199(10): 3466-3477.

[8] ZHAO M H, LI C, SHEN F J, et al. Naringenin ameliorates LPS-induced acute lung injury through its anti-oxidative and anti-inflammatory activity and by inhibition of the PI3K/AKT pathway[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(3): 2228-2234.

[9] BURKE A C, SUTHERLAND B G, TELFORD D E, et al. Intervention with citrus flavonoids reverses obesity and improves metabolic syndrome and atherosclerosis in obese Ldlr$^{-/-}$ mice[J]. J Lipid Res, 2018, 59(9): 1714-1728.

[10] SHEN M, LI Y J, WANG Y Q, et al. N^6-methyladenosine modification regulates ferroptosis through autophagy signaling pathway in hepatic stellate cells[J]. Redox Biol, 2021, 47: 102151.

[11] ALAM M A, SUBHAN N, RAHMAN M M, et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action[J]. Adv Nutr, 2014, 5(4): 404-417.

[12] CHEN L, XIA S W, WANG S Q, et al. Naringenin is a potential immunomodulator for inhibiting liver fibrosis by inhibiting the cGAS-STING pathway[J]. J Clin Transl Hepatol, 2023, 11(1): 26-37.

（收稿日期：2022-10-02　修回日期：2023-03-25）
（编辑：张元媛）