蓝盆花醇提物抗肝纤维化的作用及机制研究Δ

金　蓉*，赵晓璐，颜羽昕，高晓阳，张春艳，李明奇，马月宏#（内蒙古医科大学基础医学院，呼和浩特　010110）

中图分类号　R965；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）03-0277-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.03.03

摘　要　目的　探讨蓝盆花醇提物抗肝纤维化（HF）的作用及机制。**方法**　采用四氯化碳灌胃法建立HF模型。通过观察肝组织病理学变化，检测HF指标[α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、胶原蛋白Ⅰ（Collagen Ⅰ）]及磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）/蛋白激酶B（Akt）信号通路相关因子mRNA和蛋白表达水平，考察低、中、高剂量（50、100、200 mg/kg）蓝盆花醇提物对HF模型大鼠的改善作用及可能机制。按1 800 mg/（kg·d）（以生药量计）灌胃大鼠蓝盆花醇提物制备含药血清，以低、中、高浓度（将含药血清稀释至10%、15%、20%）蓝盆花醇提物含药血清干预HSC-T6细胞，观察其对微小RNA-21（miRNA-21）表达的影响；将miRNA-21模拟物/抑制剂转染至HSC-T6细胞，并检测PI3K/Akt信号通路相关因子的mRNA和蛋白表达水平。**结果**　体内实验结果表明，低、中、高剂量蓝盆花醇提物均可显著改善HF模型大鼠肝组织病理学变化，降低其胶原百分比（$P<0.01$），下调其HF指标及PI3K、Akt的mRNA和蛋白表达（$P<0.01$），上调其磷酸酶及张力蛋白同源基因（PTEN）的mRNA及其蛋白表达（$P<0.01$）。体外实验结果表明，低、中、高浓度蓝盆花醇提物含药血清均可显著抑制miRNA-21的表达（$P<0.01$）；转染miRNA-21模拟物后，细胞中PI3K、Akt的mRNA和蛋白表达上调（$P<0.01$），PTEN的mRNA及其蛋白表达下调（$P<0.01$）；而转染miRNA-21抑制剂后，细胞中上述指标的变化与转染miRNA-21模拟物相反（$P<0.01$）。**结论**　蓝盆花醇提物可通过抑制miRNA-21表达、上调PTEN表达，进而抑制PI3K/Akt信号通路活性，最终发挥抗HF的作用。

关键词　蓝盆花醇提物；肝纤维化；磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路；磷酸酶及张力蛋白同源基因；微小RNA-21

Study on the effect and mechanism of the alcoholic extract from *Scabiosa comosa* against hepatic fibrosis

JIN Rong, ZHAO Xiaolu, YAN Yuxin, GAO Xiaoyang, ZHANG Chunyan, LI Mingqi, MA Yuehong (School of Basic Medical Sciences, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the effect and mechanism of the alcoholic extract from *Scabiosa comosa* against hepatic fibrosis (HF). **METHODS** Intragastrical administration of carbon tetrachloride was given to induce HF model. By observing the pathological changes in liver tissue, mRNA and protein expressions of HF indexes [α-smooth muscle actin (α-SMA), collagen type Ⅰ] and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway-related factors were detected, and the improvement effects and possible mechanism of low-dose, medium-dose and high-dose (50, 100, 200 mg/kg) of alcoholic extract from *S. comosa* on HF model rats were investigated. Drug-containing serum was prepared by intragastrical administration of alcoholic extract from *S. comosa* at a concentration of 1 800 mg/(kg·d) (calculated by the amount of raw material). The effects of drug-containing serum of alcoholic extract from *S. comosa* on the expression of miRNA-21 were observed through the intervention of HSC-T6 cells with low, medium and high concentrations of drug-containing serum of alcoholic extract from *S. comosa* (diluted to 10%, 15%, 20%). miRNA-21 mimics or inhibitors were used to transfect HSC-T6 cells, and the mRNA and protein expressions of factors related to the PI3K/Akt signaling pathway were detected. **RESULTS** The results of *in vivo* experiments showed that low, medium and high doses of alcoholic extract from *S. comosa* significantly ameliorated the histopathological changes in liver tissue of HF rats, and the percentage of collagen was significantly reduced ($P<0.01$); mRNA and protein expressions of the indicators related to HF as well as PI3K and Akt were significantly reduced ($P<0.01$), and mRNA and protein expressions of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) were increased in liver tissue of rats ($P<0.01$). The results of *in vitro* experiments showed that drug-containing serum of alcoholic extract from *S. comosa* significantly inhibited the expression of miRNA-21 at low, medium and high concentrations ($P<0.01$); whereas after transfection with miRNA-21 mimics, it was found that miRNA-21 mimics significantly increased mRNA and protein expressions of PI3K and Akt ($P<0.01$), while significantly decreased mRNA and

Δ**基金项目**　国家自然科学基金项目（No.81960759）；内蒙古自治区自然科学基金项目（No.2019MS08010）；内蒙古自治区人才开发基金项目（No.22056）；内蒙古医科大学重点项目（No.YKD2022ZD019）；内蒙古医科大学蒙药抗肝纤维化作用研究科技创新团队项目（No.YKD2022TD039）

*　**第一作者**　讲师，硕士。研究方向：中蒙药的肝纤维化药理。E-mail：623633856@qq.com

#　**通信作者**　教授，硕士。研究方向：中蒙药的肝纤维化药理。E-mail：myh19982002@sina.com

protein expressions of PTEN ($P<0.01$); after transfection with miRNA-21 inhibitor, the changes of above indexes were opposite to the above results ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** Alcoholic extracts of *S. comosa* may inhibit the PI3K/Akt signaling pathway by affecting the expression of miRNA-21, so as to achieve the effect of anti-hepatic fibrosis.

KEYWORDS alcoholic extract from *Scabiosa comosa*; hepatic fibrosis; PI3K/Akt signaling pathway; PTEN; miRNA-21

肝纤维化（hepatic fibrosis，HF）是指肝脏受到损伤或异常刺激时发生的一种病理性改变，其最显著的病理特征是细胞外基质（extracellular matrix，ECM）过度沉积[1-2]。已有研究证实，在肝脏损伤的情况下，肝星状细胞（hepatic stellate cell，HSC）活化转变为肌成纤维细胞，α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）、胶原蛋白Ⅰ（collagen type Ⅰ，Collagen Ⅰ）和Collagen Ⅲ表达量增加，进而导致HF的发生[3]。有研究发现，微小RNA-21（miRNA-21）可通过靶向磷酸酶及张力蛋白同源基因（phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten，PTEN）调控磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）信号通路，即通过上调PTEN表达抑制PI3K/Akt信号通路，进而阻断HF的发生发展[4]。目前，抗HF药物的研发速度较为缓慢，尚无确切疗效的药物可应用于临床。

蒙药蓝盆花，又称蒙古山萝卜花，主产于内蒙古、黑龙江、吉林等地[5]。其味甘、涩，性凉，具有清肝热、肺热及解毒、“燥合日乌”（即干燥积水、消肿、祛风湿）的作用[6]。前期本课题组通过超高效液相色谱-飞行时间质谱法鉴定发现，蓝盆花中含有氨基酸类、酚类、皂苷类、黄酮类、生物碱类等多种有效成分，其中黄酮类成分为其主要药效成分[7]。相关研究显示，在德都红花-7、额力根-7等蒙医经典药方中，黄酮类成分均具有明显抗HF的作用[4,8]。此外，本课题组前期通过转录组测序和京都基因与基因组百科全书富集差异基因发现，蓝盆花可使PI3K/Akt信号通路相关蛋白及miRNA-21表达显著下调[7]。本研究拟在前期研究基础上，采用四氯化碳（CCl_4）诱导HF大鼠模型，初步揭示蓝盆花醇提物改善HF的作用，并围绕miRNA-21/PTEN/PI3K/Akt轴探讨其可能的作用机制，为明确蒙药蓝盆花的适应证及其开发应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有1000B-8W型药物粉碎机、SM2010R型切片机（德国Leica公司），CLx800型酶标仪（美国Bio-Tek公司），CT15RE型高速离心机（日本Hitachi公司），DYY-6C型电泳仪（北京六一生物科技有限公司），7500 Fast型荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）。

1.2 主要药品与试剂

蓝盆花药材（批号191219）购自内蒙古天盛蒙中医有限责任公司，由内蒙古医科大学蒙医药学院蒙药炮制实验中心主任呼日乐巴根教授鉴定为真品；苏木素-伊红（HE）染色液（批号BA4099）购自珠海贝索生物技术有限公司；SDS-PAGE凝胶配制试剂盒（批号20210727）、Masson染色试剂盒（批号2109001）均购自北京索莱宝科技有限公司；miRNA-21模拟物、模拟物NC（阴性对照）（批号均为20210813010），miRNA-21抑制剂、抑制剂NC（阴性对照）（批号均为PA20210813010）和转染试剂riboFECT™CP（批号W0728）均购自广州锐博生物技术有限公司；FastKing cDNA第一链合成试剂盒（批号Y1302）、SuperReal荧光定量预混试剂（批号s8129）均购自天根生化科技（北京）有限公司；兔源α-SMA、Collagen Ⅰ、PTEN、PI3K、Akt单克隆抗体（批号分别为bs-10196R、bs-0578R、bs-0686R、bs-0128R、bs-6951R）均购自北京博奥森生物技术有限公司；兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）多克隆抗体（批号10494-1-AP）、兔源β-肌动蛋白（β-actin）多克隆抗体（批号20536-1-AP）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；DyLight 800标记的山羊抗兔IgG二抗（批号ATWF15081）购自亚科因（武汉）生物技术有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为健康清洁级雄性Wistar大鼠，共78只，体重（200±20）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2021-0006。大鼠于内蒙古医科大学实验动物中心先适应性饲养1周后进行实验，饲养环境温度为20～22 ℃、相对湿度为45%～65%、昼夜明暗交替。本研究动物实验经内蒙古医科大学医学伦理学会批准后实施（伦理审批号为YKD2019144）。

1.4 细胞株

大鼠肝星状细胞株HSC-T6购于北京北纳科技有限公司。

2 方法

2.1 蓝盆花醇提物的制备

蓝盆花药材经粉碎后，按药液比1∶10（g/mL）加入70%乙醇回流提取，重复2次；过滤，取滤液合并，旋转蒸发仪干燥浓缩，即得蓝盆花醇提物粉末，详细提取过程参考文献[9]。采用紫外-可见分光光度法测得该醇提物中总黄酮含量为38%。

2.2 蓝盆花醇提物含药血清的制备

将28只Wistar大鼠随机分为空白组与含药血清制备组，每组14只。含药血清制备组大鼠按1 800 mg/(kg·d)（以生药量计）灌胃蓝盆花醇提物（蓝盆花的成人临床用量为2～3 g，在制备含药血清时按成人用量2.4 g换算，本实验剂量相当于8倍成人临床等效剂量），空白组大鼠灌胃等体积生理盐水，每天给药1次，持续1周。末次给药/生理盐水2 h后，麻醉大鼠，腹主动脉取血，静置20 min，然后在4 ℃离心机中以3 000 r/min离心15 min，收集上层血清，用0.22 μm滤膜过滤，即得空白血清和含药血清，－80 ℃冰箱中保存备用。

2.3 体内动物实验

2.3.1 动物造模及分组

将剩余的50只大鼠按随机数字表法分成5组，即空白组、模型组和蓝盆花醇提物低、中、高剂量组（50、100、200 mg/kg，以生药量计；按成人用量2.0 g换算，分别为成人临床等效剂量的0.5、1、2倍），每组10只。除空白组外，其余各组大鼠均参考文献[10]采用CCl_4灌胃法进行造模：每周二和周五的上午8：00按2 mL/kg的剂量灌胃50%CCl_4溶液，连续8周。造模的同时，蓝盆花醇提物各剂量组大鼠灌胃相应药液[以0.5%羧甲基纤维素钠（sodium carboxymethyl cellulose，CMC-Na）溶液为溶剂]，空白组和模型组大鼠灌胃等体积0.5%CMC-Na溶液，每天下午4：00给药1次，连续8周。

2.3.2 样本取材及处理

末次给药结束后，禁食不禁水12 h，麻醉并解剖大鼠，取出肝脏，并用生理盐水进行肝脏灌流，观察肝脏形态特征。将部分肝组织放入4%多聚甲醛中固定48 h，剩余肝组织则放入冻存管中于－80 ℃冰箱中保存。

2.3.3 大鼠肝组织病理形态学观察

（1）HE染色检测。取“2.3.2”项下经4%多聚甲醛固定的肝组织样本，常规制备石蜡切片（厚度为4 μm）后，行常规HE染色，然后在显微镜下观察肝组织病理形态。

（2）Masson染色检测。取“2.3.2”项下经4%多聚甲醛固定的肝组织样本，常规脱蜡后，按照Masson染色试剂盒说明书操作进行染色，每组选取3个不同的视野，在显微镜下进行观察。细胞质、肌纤维及红细胞染色后呈红色，胶原染色后呈蓝色。使用Image J软件对Masson染色阳性区域的胶原面积进行分析，并计算胶原百分比[胶原百分比＝胶原阳性区域面积/总面积×100%]。

2.3.4 大鼠肝组织中HF指标及PI3K/Akt信号通路相关mRNA表达的检测

采用RT-PCR法检测。取“2.3.2”项下冻存的肝组织，常规解冻后，用Trizol法提取肝组织中总RNA，测定其浓度和纯度后，将RNA逆转录为cDNA，然后以cDNA为模板进行PCR扩增。扩增体系如下：95 ℃预变性15 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火/延伸30 s，共40个循环。以β-actin为内参，采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法分析目的基因mRNA表达水平。实验重复3次。PCR引物序列由生工生物工程（上海）股份有限公司设计并合成，详细信息见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因名称	引物序列（5′→3′）	扩增产物长度/bp
PI3K	上游：GCTGTTGATAGACCACCGCTTCC	24
	下游：TGCCCTGTTCCTCTGCCTTCC	
Akt	上游：CAAGCACCGTGTGACCATGA	20
	下游：TCAGTAAGCGTGTGGGCAAC	
PTEN	上游：TTGAAGACCATAACCCACCACAGC	24
	下游：CATTACACCAGTCCGTCCTTTCCC	
Collagen I	上游：TGTTGGTCCTGCTGGCAAGAATG	23
	下游：GTCACCTTGTTCGCCTGTCTCAC	
α-SMA	上游：CATCCACGAAACCACCTA	18
	下游：GGGCAGGAATGATTTGGA	
β-actin	上游：ACCCGCGAGTACAACCTTCT	20
	下游：TTCAGGGTCAGGATGCCTCT	

2.3.5 大鼠肝组织中HF指标及PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的检测

采用Western blot法进行检测。取“2.3.2”项下冻存的肝组织，加入RIPA裂解液提取组织中总蛋白，加入5×蛋白上样缓冲液后在金属浴100 ℃下煮沸10 min。取变性后蛋白进行SDS-PAGE电泳（分离胶恒压80 V、电泳时间30 min，浓缩胶恒压120 V、电泳时间90 min），然后在恒流200 mA的条件下湿转至0.45 μm NC膜（转膜时间根据蛋白分子量大小而定，每1 kDa约转膜1 min），加入5%脱脂奶粉在室温下封闭4 h；加入GAPDH（稀释比例为1∶10 000）和α-SMA、Collagen Ⅰ、PI3K、Akt、PTEN一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；TBST清洗3次，加入二抗（稀释比例为1∶1 000），室温孵育1 h。再次用TBST清洗3次后显影条带，用Image J软件分析条带灰度值，以目的蛋白与内参GAPDH蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2.4 体外细胞实验

2.4.1 蓝盆花醇提物含药血清对细胞中miRNA-21表达的影响

用含10%胎牛血清的高糖培养基将HSC-T6细胞常规培养至对数生长期。将对数生长期细胞接种至6孔板中（每孔5×10^4～1×10^5个细胞），实验设置对照组和蓝盆花醇提物含药血清低、中、高浓度组（将大鼠含药血清稀释至10%、15%、20%，浓度根据本课题组前期预实验结果设置），每组设置3个复孔。常规培养细胞至贴壁后，给予空白血清/含药血清干预24 h。采用Trizol法提取各组细胞的总RNA，以*U6*为内参，采用RT-PCR法检测miRNA-21的表达水平，具体检查条件同“2.3.4”项。其中，内参*U6*的引物序列为5′-AGAGAAGATTAGCATGGCCCCTG-3′，扩增产物长度为23 bp；miRNA-21的引物序列为5′-TGTGGTAGCTTATCAGACTGATGTTG-3′，扩增产物长度为26 bp。实验重复3次。

2.4.2　转染 miRNA-21 模拟物/抑制剂对细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关 mRNA 及其蛋白表达的影响

取对数生长期 HSC-T6 细胞，接种至 24 孔板中（每孔 1×10^5～5×0^5 个细胞），实验设置 miRNA-21 模拟物组、miRNA-21 模拟物 NC 组、miRNA-21 抑制剂组和 miRNA-21 抑制剂 NC 组，每组设置 5 个复孔。各组的转染方法如下：当各组细胞在常规培养后密度为 30%～50% 时，分别加入 miRNA-21 模拟物（50 nmol/L）、miRNA-21 模拟物 NC（50 nmol/L）、miRNA-21 抑制剂（100 nmol/L）、miRNA-21 抑制剂 NC（100 nmol/L）混合液，继续培养 48 h。分别按照“2.3.4”“2.3.5”项下方法提取和测定各组细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关 mRNA 及其蛋白的表达水平。

2.5　统计学方法

采用 Graphpad Prism 8 软件进行数据统计分析及作图。满足正态分布和方差同质性检验的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　体内动物实验结果

3.1.1　大鼠肝组织病理变化观察结果

HE 染色结果显示，空白组大鼠肝组织中肝细胞核大而圆，肝细胞排列均匀，无脂肪变性和纤维组织增生。模型组大鼠肝组织中实质细胞减少，ECM 过度沉积，肝细胞排列不规则，有大量的炎症细胞浸润。与模型组比较，各给药组大鼠肝组织中纤维组织增生、炎症细胞浸润及纤维化程度均得到一定改善。结果见图 1。

Masson 染色结果显示，空白组仅有少量胶原出现在汇管区；而模型组大鼠肝组织有大量胶原纤维沉积，且出现较多纤维间隔；各给药组大鼠肝组织中胶原纤维明显减少，纤维间隔变窄，详见图 2。统计分析结果显示，与空白组[(23.60±0.03)%]比较，模型组大鼠肝组织中胶原百分比[(42.80±0.01)%]显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，蓝盆花醇提物低、中、高剂量组大鼠肝组织中胶原百分比[分别为(34.90±0.06)%、(32.30±0.04)%、(28.50±0.02)%]均显著降低（$P<0.01$）。

3.1.2　大鼠肝组织中 HF 指标及 PI3K/Akt 信号通路相关 mRNA 表达的测定结果

与空白组比较，模型组大鼠肝组织中 α-SMA、Collagen Ⅰ、PI3K 和 Akt 的 mRNA 表达水平均显著升高（$P<0.01$），PTEN 的 mRNA 表达水平显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大鼠肝组织中 α-SMA、Collagen Ⅰ、PI3K、Akt 的 mRNA 表达水平均显著降低（$P<0.01$），PTEN 的 mRNA 表达水平均显著升高（$P<0.01$）。结果见表 2。

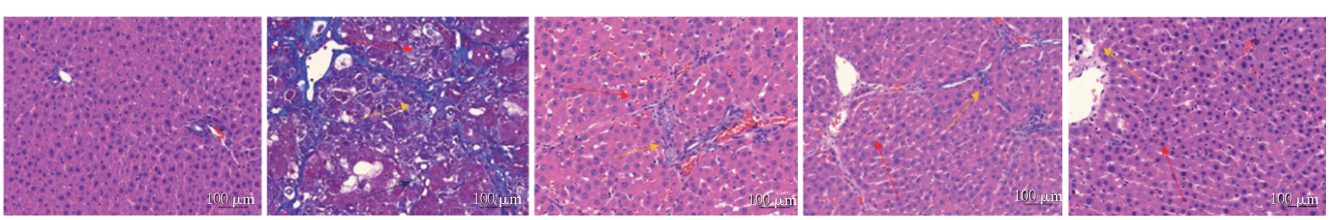
表 2　各组大鼠肝组织中 HF 指标及 PI3K/Akt 信号通路相关 mRNA 的表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	α-SMA	Collagen Ⅰ	PI3K	Akt	PTEN
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	2.82±0.27[a]	2.92±0.22[a]	1.82±0.33[a]	2.18±0.32[a]	0.39±0.02[a]
蓝盆花醇提物低剂量组	1.08±0.44[b]	1.18±0.12[b]	0.86±0.10[b]	1.18±0.24[b]	1.76±0.16[b]
蓝盆花醇提物中剂量组	1.42±0.26[b]	1.60±0.37[b]	1.13±0.18[b]	1.22±0.13[b]	1.64±0.32[b]
蓝盆花醇提物高剂量组	1.03±0.08[b]	1.20±0.23[b]	1.05±0.18[b]	1.14±0.17[b]	1.76±0.30[b]

a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$。

3.1.3　大鼠肝组织中 HF 指标及 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的测定结果

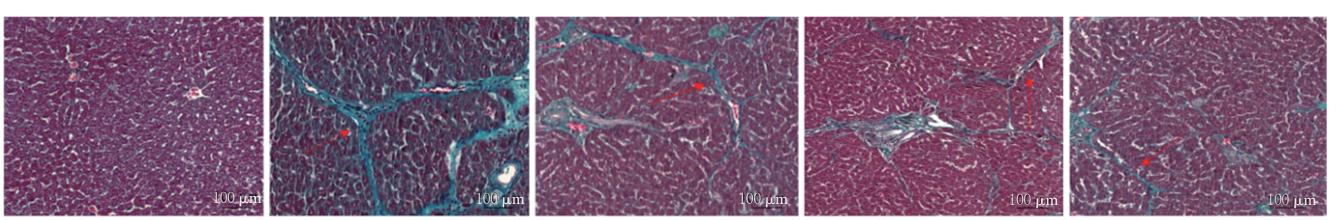
与空白组比较，模型组大鼠肝组织中 α-SMA、Collagen Ⅰ、PI3K、Akt 蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.01$），PTEN 蛋白的表达水平显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组大鼠肝组织中 α-SMA、Collagen Ⅰ、PI3K、Akt 蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.01$），PTEN 蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.01$）。结果见图 3、表 3。



A. 空白组　B. 模型组　C. 蓝盆花醇提物低剂量组　D. 蓝盆花醇提物中剂量组　E. 蓝盆花醇提物高剂量组

注：红色剪头所指的是肝细胞排列紊乱；黄色剪头所指的是炎症细胞浸润；黑色剪头所指的是脂肪细胞变性。

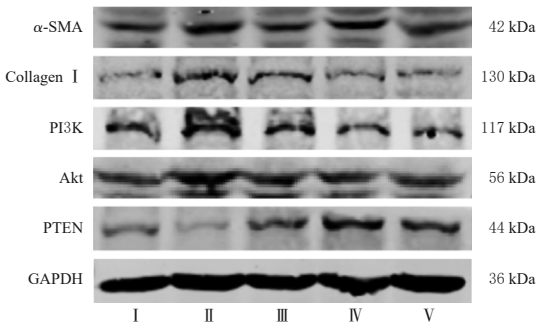
图 1　各组大鼠肝组织的 HE 染色显微图



A. 空白组　B. 模型组　C. 蓝盆花醇提物低剂量组　D. 蓝盆花醇提物中剂量组　E. 蓝盆花醇提物高剂量组

注：红色剪头所指的是胶原沉积部位。

图 2　各组大鼠肝组织的 Masson 染色显微图



Ⅰ：空白组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：蓝盆花醇提物低剂量组；Ⅳ：蓝盆花醇提物中剂量组；Ⅴ：蓝盆花醇提物高剂量组。

图3　各组大鼠肝组织中HF指标及PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的电泳图

表3　各组大鼠肝组织中HF指标及PI3K/Akt信号通路相关蛋白的表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

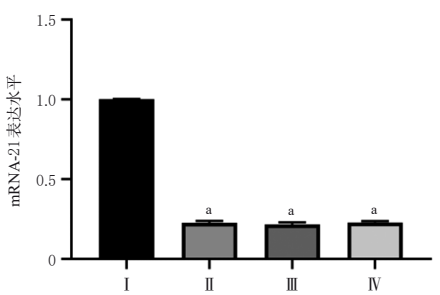
组别	α-SMA/GAPDH	Collagen Ⅰ/GAPDH	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	PTEN/GAPDH
空白组	0.49±0.07	0.19±0.02	0.33±0.05	0.67±0.06	0.06±0.01
模型组	0.66±0.05[a]	0.40±0.02[a]	0.69±0.04[a]	1.29±0.05[a]	0.02±0.01[a]
蓝盆花醇提物低剂量组	0.43±0.12[b]	0.22±0.06[b]	0.50±0.04[b]	1.03±0.06[b]	0.19±0.01[b]
蓝盆花醇提物中剂量组	0.26±0.05[b]	0.20±0.05[b]	0.42±0.05[b]	0.93±0.02[b]	0.17±0.02[b]
蓝盆花醇提物高剂量组	0.23±0.04[b]	0.23±0.01[b]	0.42±0.04[b]	0.92±0.07[b]	0.20±0.05[b]

a：与空白组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$。

3.2　体外细胞实验结果

3.2.1　蓝盆花醇提物含药血清对HSC-T6细胞中miRNA-21表达的影响

与对照组比较，蓝盆花醇提物含药血清低、中、高浓度组细胞中miRNA-21表达水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见图4。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：蓝盆花醇提物含药血清低浓度组；Ⅲ：蓝盆花醇提物含药血清中浓度组；Ⅳ：蓝盆花醇提物含药血清高浓度组；a：与对照组比较，$P<0.01$。

图4　蓝盆花醇提物含药血清干预后细胞中miRNA-21表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

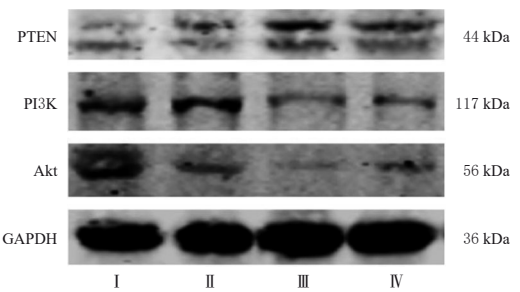
3.2.2　转染miRNA-21模拟物/抑制剂后对细胞中PI3K、Akt、PTEN mRNA及其蛋白表达的影响

与miRNA-21模拟物NC组比较，miRNA-21模拟物组细胞中PI3K、Akt的mRNA和蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$），PTEN的mRNA和蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$）；与miRNA-21抑制剂NC组比较，miRNA-21抑制剂组细胞中PI3K、Akt的mRNA和蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$），PTEN的mRNA和蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）。结果见表4、图5。

表4　转染miRNA-21模拟物/抑制剂后细胞中PI3K/Akt信号通路相关mRNA和蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	PI3K		Akt		PTEN	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
miRNA-21模拟物NC组	0.51±0.46	0.99±0.00	0.31±0.03	0.61±0.02	0.34±0.03	0.10±0.01
miRNA-21模拟物组	0.80±0.01[a]	2.16±0.12[a]	1.69±0.15[a]	0.84±0.06[a]	0.17±0.01[a]	0.02±0.05[a]
miRNA-21抑制剂NC组	0.54±0.03	1.00±0.03	0.29±0.02	0.51±0.06	0.43±0.05	0.10±0.01
miRNA-21抑制剂组	0.40±0.01[a]	0.84±0.02[a]	0.07±0.06[a]	0.49±0.05[a]	0.53±0.02[a]	0.41±0.02[a]

a：与对应的NC组比较，$P<0.01$。



Ⅰ：miRNA-21模拟物组；Ⅱ：miRNA-21模拟物NC组；Ⅲ：miRNA-21抑制剂组；Ⅳ：miRNA-21抑制剂NC组。

图5　转染miRNA-21模拟物/抑制剂后细胞中PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的电泳图

4　讨论

HF作为肝脏损伤及修复时发生的病理过程，如不及时干预治疗，则有逐渐演变为肝硬化、肝癌等的危险。传统医药在肝病治疗方面积累了很多好的经验，本课题组基于前期研究结果，通过体内外实验验证蒙药蓝盆花醇提物抗HF的作用机制。

PI3K/Akt信号通路中的一系列磷酸化过程可以激活转录因子，而这些转录因子参与并改变了重要的细胞过程，如分化、增殖、凋亡等[11]。PTEN作为PI3K/Akt信号通路的负性调控因子，可以抑制PI3K/Akt信号通路的激活，进而抑制细胞增殖和肿瘤进展[12]。有文献报道，PI3K/Akt信号通路可以有效地调节HF的进展，如促进ECM重塑、肌成纤维细胞转化和胶原表达[13]。miRNA作为一种短链非编码RNA，被证实可以参与HF的发生和演变过程。PTEN的mRNA是miRNA-21的靶标之一，miRNA-21可以抑制PTEN蛋白的表达，从而调控PI3K/Akt通路[14]。在HF动物模型中，miRNA-21在血清和肝脏中的表达均明显上调[15]。且研究发现，转染miRNA-21模拟物促进了HSC-T6细胞的增殖，而转染miRNA-21抑制物抑制了HSC-T6细胞的增殖[16]。上述研究表明，调控miRNA-21的表达能影响HSC-T6细胞的活化与增殖。

在体内实验中，笔者发现蓝盆花醇提物能明显改善模型大鼠肝组织中炎症细胞浸润，减少模型大鼠纤维化增生。此外，笔者还观察到，经蓝盆花醇提物灌胃后模型大鼠肝组织中HF指标（α-SMA、Collagen Ⅰ）及PI3K/Akt信号通路相关指标（PI3K、Akt）的mRNA和蛋白表

达水平均显著降低，这提示蓝盆花醇提物改善HF的作用机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路有关。同时，体外实验也发现，HSC-T6细胞经蓝盆花醇提物含药血清干预后，细胞中miRNA-21表达下调。抑制miRNA-21后，PI3K/Akt信号通路中PTEN的mRNA和蛋白表达上调，PI3K、Akt的mRNA和蛋白表达下调；而过表达miRNA-21后，上述指标变化相反。

综上所述，蒙药蓝盆花醇提物通过抑制miRNA-21表达、上调PTEN表达，进而抑制PI3K/Akt信号通路活性，最终发挥抗HF的作用。笔者在本研究中还发现蓝盆花醇提物中黄酮含量较高，但由于时间所限，未对蓝盆花醇提物中的化合物进行定性研究，具体是提取物中的何种化合物、通过何种途径发挥抗HF的作用，有待进一步深入研究。

参考文献

[1] YANG Y, LIU X, CHEN H, et al. HPS protects the liver against steatosis, cell death, inflammation, and fibrosis in mice with steatohepatitis[J]. FEBS J, 2022, 289(17): 5279-5304.

[2] TASNIM S, HAZAM R, DAVE D, et al. Reversible decerebrate posture in hepatic encephalopathy: case report and literature review[J]. Cureus, 2022, 14(2): e21960.

[3] LUO J L, LI L, CHANG B, et al. Mannan-binding lectin via interaction with cell surface calreticulin promotes senescence of activated hepatic stellate cells to limit liver fibrosis progression[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2022, 14(1): 75-99.

[4] 颜羽昕，张春艳，高晓阳，等. 蒙药额力根-7对肝纤维化的改善作用及机制研究[J]. 中国药房，2021，32(23)：2832-2838.
YAN Y X, ZHANG C Y, GAO X Y, et al. Study on improvement effects of Mongolian medicine eligen-7 on hepatic fibrosis and its mechanism[J]. China Pharm, 2021, 32(23): 2832-2838.

[5] 孙媛媛，焦丹，董聪聪，等. 蓝盆花研究进展[J]. 亚热带植物科学，2018，47(3)：299-304.
SUN Y Y, JIAO D, DONG C C, et al. Advances in research of *Scabiosa comosa*[J]. Subtrop Plant Sci, 2018, 47(3): 299-304.

[6] 苏达毕力格，何陈林，朝格巴达拉夫，等. 蓝盆花属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代应用药学，2023，40(8)：1136-1146.
Sudabilige, HE C L, Chaogebadalafu, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological plants of genus *Scabiosa*[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2023, 40(8): 1136-1146.

[7] 张春艳，金蓉，颜羽昕，等. 基于药效学和网络药理方法探讨蓝盆花抗肝纤维化的作用机制[J]. 中国中药杂志，2022，47(13)：3609-3618.
ZHANG C Y, JIN R, YAN Y X, et al. To explore mechanism of *Scabiosa comosa* against liver fibrosis based on pharmacodynamics and network pharmacology[J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(13): 3609-3618.

[8] 曹瑞珍，白靓，张国文，等. 蒙药德都红花-7味散各组方的化学成分和现代药理作用研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版)，2018，33(1)：79-84.
CAO R Z, BAI L, ZHANG G W, et al. Research progress on the chemical composition and modern pharmacological action of each component in Mongolian medicine deduhonghua-7 powder[J]. J Inn Mong Univ Natl Nat Sci, 2018, 33(1): 79-84.

[9] 金蓉，赛那，苏晓丽，等. 蒙药蒙古山萝卜花中总黄酮的含量测定方法[J]. 中国民族医药杂志，2018，24(2)：25-27.
JIN R, SAI N, SU X L, et al. Research on method for determination of total flavonoids from the Mongolian medicine of *Mongolian scabious* flower[J]. J Med Pharm Chin Minor, 2018, 24(2): 25-27.

[10] 南洋，董辉，王志刚，等. 肝纤维化动物实验模型的研究进展[J]. 中国医药导报，2022，19(12)：34-37.
NAN Y, DONG H, WANG Z G, et al. Research progress of animal experimental model of hepatic fibrosis[J]. China Med Her, 2022, 19(12): 34-37.

[11] EIDI A, MOGHADAM J Z, MORTAZAVI P, et al. Hepatoprotective effects of *Juglans regia* extract against CCl_4-induced oxidative damage in rats[J]. Pharm Biol, 2013, 51(5): 558-565.

[12] HASHEMI M, TAHERIAZAM A, DANEII P, et al. Targeting PI3K/Akt signaling in prostate cancer therapy[J]. J Cell Commun Signal, 2023, 17(3): 423-443.

[13] 潘澎，刘绍能. PI3K/Akt信号通路与肝纤维化[J]. 临床肝胆病杂志，2013，29(5)：389-392，396.
PAN P, LIU S N. PI3K/Akt signaling pathway and hepatic fibrosis[J]. J Clin Hepatol, 2013, 29(5): 389-392, 396.

[14] LIU H W, CHENG L, CAO D K, et al. Suppression of miR-21 expression inhibits cell proliferation and migration of liver cancer cells by targeting phosphatase and tensin homolog (PTEN)[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 3571-3577.

[15] QIAN G E, MORRAL N. Role of non-coding RNAs on liver metabolism and NAFLD pathogenesis[J]. Hum Mol Genet, 2022, 31(R1): R4-R21.

[16] 杨欢，李三强，程维刚，等. miRNA-21通过对血小板源性生长因子B和血管内皮生长因子的调控促进肝星状细胞活化的研究[J]. 中国临床药理学杂志，2022，8(11)：1223-1226.
YANG H, LI S Q, CHENG W G, et al. miRNA-21 promotes the activation of hepatic stellate cells by regulating platelet-derived growth factor beta and vascular endothelial growth factor[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2022, 38(11): 1223-1226.

（收稿日期：2023-07-02　修回日期：2024-01-15）
（编辑：林　静）