

# 蒙药额力根-7对肝纤维化的改善作用及机制研究<sup>△</sup>

颜羽昕\*,张春艳,高晓阳,马月宏<sup>#</sup>(内蒙古医科大学基础医学院,呼和浩特 010000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)23-2832-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.23.04



**摘要** 目的:研究蒙药额力根-7对肝纤维化的改善作用及机制。方法:以大鼠肝星状细胞HSC-T6为研究对象,将细胞分为模型组(空白血清)和额力根-7含药血清低、中、高剂量组(10%、15%、20%额力根-7含药血清)。各组细胞均先加入转化生长因子 $\beta$ 溶液(0.2 mg/mL)培养48 h以复制肝纤维化模型,然后再加入相应空白或含药血清。检测各组细胞的光密度(OD)值并计算增殖抑制率(加血清后培养24、48、72 h时);检测各组细胞的凋亡率、周期分布和细胞中I型胶原蛋白(Collagen I)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)以及磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路相关因子[PI3K、Akt、磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)]的mRNA和蛋白表达水平(加血清后培养24 h时)。进一步以Wistar大鼠为研究对象,将大鼠分为空白组、模型组和额力根-7低、中、高剂量组(135、270、405 mg/kg),每组10只。空白组和模型组大鼠灌胃0.5%羧甲基纤维素钠溶液,其余各组大鼠均灌胃相应药物,每天1次,连续10周。末次灌胃后,观察大鼠肝组织病理形态学变化,检测肝组织中Collagen I、 $\alpha$ -SMA、PI3K、Akt、PTEN的mRNA和蛋白表达水平。结果:与模型组比较,各剂量给药组细胞的OD值(培养72 h时的中、高剂量组除外)、S期细胞比例均显著降低( $P<0.01$ ),晚期凋亡率、早期凋亡率(低剂量除外)、总凋亡率和G<sub>2</sub>/M期细胞比例均显著升高( $P<0.01$ );细胞和大鼠肝组织中Collagen I、 $\alpha$ -SMA、PI3K、Akt的mRNA和蛋白表达水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),PTEN的mRNA和蛋白表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:额力根-7具有抗肝纤维化作用,其作用机制可能与调控PI3K/Akt信号通路活性、促进肝星状细胞凋亡有关。

**关键词** 肝纤维化;额力根-7;PI3K/Akt信号通路;细胞凋亡;肝星状细胞;大鼠

## Study on Improvement Effects of Mongolian Medicine Eligen-7 on Hepatic Fibrosis and Its Mechanism

YAN Yuxin, ZHANG Chunyan, GAO Xiaoyang, MA Yuehong (School of Basic Medicine, Inner Mongolian Medical University, Hohhot 010000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the improvement effects of Mongolian medicine eligen-7 on hepatic fibrosis (HF) and its mechanism. METHODS: Taking rat hepatic stellate cells HSC-T6 as research object, the cells were divided into model group (blank serum) and low-dose, medium-dose and high-dose groups of eligen-7 containing serum (10%, 15% and 20% eligen-7 containing serum). Transforming growth factor  $\beta$  solution (0.2 mg/mL) was added into the cells for 48 h to induce liver fibrosis model, and then added into the corresponding blank or drug-contained serum. The optical density (OD) of cells in each group was measured and inhibition rate of cell proliferation was calculated (after treated for 24, 48 and 72 h). The apoptotic rate and cycle distribution of cells were detected; mRNA and protein expression of type I collagen (Collagen I),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), phosphatidylinositol-3-kinase and protein-serine-threonine kinase (PI3K/Akt) signaling pathway related factors (PI3K, Akt, PTEN) were also detected (after treated for 24 h). Wistar rats were further divided into blank group, model group and low-dose, medium-dose and high-dose groups of eligen-7 (135, 270, 405 mg/kg), with 10 rats in each group. Blank group and model group were given 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution intragastrically; other groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 10 weeks. After last intragastric administration, the pathomorphological changes of liver tissue were observed; mRNA and protein expression of Collagen I,  $\alpha$ -SMA, PI3K, Akt and PTEN were detected in liver tissue. RESULTS: Compared with model group, OD value (except for medium-dose and high-dose groups of eligen-7 containing serum) and the proportion of cells at S phase in administration groups were decreased significantly ( $P<0.01$ ); late apoptotic rate, early apoptotic rate (except for low-dose group), total apoptotic rate and the proportion of cells at G<sub>2</sub>/M phase increased significantly ( $P<0.01$ ); mRNA and protein expression of Collagen I,  $\alpha$ -SMA, PI3K and Akt in cells and liver tissue were decreased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), those of PTEN were increased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). CONCLUSIONS:

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81960759, No.81560706);内蒙古自治区自然科学基金项目(No.2019MS08010);内蒙古自治区“草原英才”工程青年创新人才培养计划项目(No.内人社办发[2016]348号);内蒙古自治区教坛新秀培养计划项目

\* 硕士。研究方向:中蒙药药理学。E-mail:1341940070@qq.com  
<sup>#</sup> 通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中蒙药药理学。电话:0471-6636834。E-mail:myh19982002@sina.com

Eligen-7 shows the effect of anti-hepatic fibrosis, the mechanism of which may be related to regulating the activity of PI3K/Akt signaling pathway and promoting the apoptosis of hepatic stellate cells.

**KEYWORDS** Hepatic fibrosis; Eligen-7; PI3K/Akt signaling pathway; Cell apoptosis; Hepatic stellate cells; Rat

肝纤维化是慢性肝损伤进展为肝硬化的必经阶段,主要表现为细胞外基质(ECM)的异常沉积,对肝脏功能具有重要影响<sup>[1]</sup>。相关研究发现,药物可通过作用于转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )/Smad、磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)等信号通路来降低肝组织中ECM的异常沉积,从而发挥治疗肝纤维化的目的<sup>[2]</sup>。肝星状细胞(HSC)是肝脏中关键的纤维化效应细胞,当其活化后,可在肝脏内产生过多的ECM,从而导致肝纤维化<sup>[3-4]</sup>。

蒙药传统方剂额力根-7由蓝盆花、红花、人工牛黄、石膏、香青兰、瞿麦、五灵脂等7味药材组成,具有清肝热的作用,临床可用于治疗黄疸、肝区疼痛、肝纤维化等<sup>[5]</sup>。但额力根-7仅有临床应用经验,并无具体药理机制研究,从而使其推广受限。

$\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)在HSC处于不活化的静止状态时不表达或低表达<sup>[6]</sup>;I型胶原蛋白(Collagen I)是ECM的主要组成部分之一,在HSC活化时其表达逐渐增强<sup>[7]</sup>。因此,通过测定二者含量能够反映出肝纤维化的病理情况。相关研究发现,PI3K/Akt信号通路的激活可促使HSC活化,从而影响ECM的产生和降解,并和众多致纤维化因子发生关联<sup>[8]</sup>。磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)是PI3K活化的主要负调控因子,能抑制PI3K通路下游蛋白的激活,如Akt和蛋白激酶C(PKC)<sup>[9]</sup>。但额力根-7是否能通过PI3K/Akt信号通路发挥治疗肝纤维化的作用,尚不明确。

基于此,本研究拟采用大鼠HSC-T6细胞为对象<sup>[10]</sup>,从细胞实验层面研究额力根-7的抗肝纤维化作用;再结合动物实验,进一步探讨额力根-7抗肝纤维化的作用及机制,以期为该方剂抗肝纤维化的机制阐明提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有JP-1000B-8W型药物粉碎机(永康市久品工贸有限公司),CT15RE型高速离心机(日本Hitachi公司),DYY-6C型电泳槽、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),SM2010R型切片机(德国Leica公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

本研究所用蓝盆花(批号171219)、红花(批号171103)、瞿麦(批号170910)、香青兰(批号171109)、五灵脂(批号171215)、人工牛黄(批号171030)、石膏(批号171217)等药材均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呼日乐巴根副教授鉴定为真品。重组人TGF- $\beta$ (美国Peprotech公司,批号0918AF35451419);胰酶(美国Proemga公司,批号121652);FastKing cDNA第一链合

成试剂盒、SuperReal荧光定量预混试剂(北京天根生化科技有限公司,批号分别为U8305、S8129);兔抗大鼠 $\alpha$ -SMA多克隆抗体、兔抗大鼠GAPDH多克隆抗体、兔抗大鼠Collagen I多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为00075696、00075847、00066288);兔抗大鼠PI3K多克隆抗体、兔抗大鼠Akt多克隆抗体、兔抗大鼠PTEN多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-10657R、bs-6951R、bs-0748R);Dylight 800标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Abbkine公司,批号ATSMR2201);Annexin V-FITC细胞凋亡试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为092120201021、081820200917);MTT试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号20210727);PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成(PCR引物序列及产物长度见表1);其余试剂为实验室常用规格,水为超纯水。

表1 PCR引物序列及产物长度

Tab 1 PCR primary sequence and product length

基因	引物序列(5'→3')	产物长度, bp
Collagen I	上游: TGTGGTCCTGCTGGCAAGAATG	145
	下游: GTCACCTGTTCGCTGTCTCAC	
$\alpha$ -SMA	上游: CATCCACGAACCACCTA	431
	下游: GGGCAGGAATGATTTGGA	
PI3K	上游: GCTGTGTAGACACCGCTTCC	89
	下游: TGCCCTGTCTCTGCTTCC	
Akt	上游: CAAGCACCCTGTGACCATGA	171
	下游: TCAGTAAGCGTGTGGCAAC	
PTEN	上游: TTGAAGACCATAACCCACCACAGC	134
	下游: CATTACACCAGTCCGCTCTTCCC	

### 1.3 动物

本研究所用动物为清洁级Wistar大鼠,雄性,鼠龄8周,体质量为190~220 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)2016-0006,动物使用许可证为SYXK(蒙)2015-0001。大鼠均饲养于内蒙古医科大学实验动物中心清洁区,室温为18~22℃。

### 1.4 细胞

大鼠HSC-T6细胞购自北京北纳科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞实验研究

2.1.1 额力根-7含药血清的制备 除人工牛黄外,将额力根-7处方中其余药材均粉碎,过100目筛,然后取红花180 g、香青兰60 g、蓝盆花60 g、瞿麦60 g、石膏180 g、五灵脂60 g(均为药材粉末)和人工牛黄80 g混合均匀后得到额力根-7(临用时以0.5%羧甲基纤维素钠溶液溶解)。将大鼠随机分为对照组和给药组(1.35 g/kg额力根-7,剂量为临床等效剂量的10倍),每组8只。对照组大鼠灌胃等量羧甲基纤维素钠溶液,给药组大鼠灌胃相应药物,每天1次,连续8 d。第8天时,给药组大鼠于腹

主动脉取血适量,血样静置 20 min 后,以 3 000 r/min 离心 15 min;取上清液,以 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,即得含药血清<sup>[6-7]</sup>。对照组同法操作,制备空白血清。

**2.1.2 细胞分组、造模与给药** 将 HSC-T6 细胞复苏种板后置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的条件下(以下培养条件相同)培养 12 h,然后调整细胞密度为  $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,分为模型组和额力根-7 含药血清低、中、高剂量组,每组设 3 个复孔。各组细胞先加入 0.2 mg/mL TGF- $\beta$  溶液 10  $\mu\text{L}$ ,培养 48 h 以复制肝纤维化模型<sup>[10]</sup>;然后弃培养基,模型组加入 10% 空白血清,额力根-7 含药血清各剂量组分别加入 10%、15%、20% 含药血清(剂量根据课题组前期预实验结果设置)。

**2.1.3 细胞增殖抑制率的检测** 采用 MTT 法进行检测。取 HSC-T6 细胞,调整细胞密度为  $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,按“2.1.2”项下方法分组、造模与给药(同时设不加细胞的空白对照组),分别培养 24、48、72 h 后,按 MTT 试剂盒说明书方法测定各孔吸光度(OD)值,并计算 HSC-T6 细胞的增殖抑制率[增殖抑制率=(模型组平均 OD 值-实验组平均 OD 值)/(模型组平均 OD 值-空白对照组平均 OD 值) $\times 100\%$ ]。

**2.1.4 细胞凋亡率的检测** 采用流式细胞仪进行检测。取 HSC-T6 细胞,调整细胞密度为  $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,按“2.1.2”项下方法分组、造模与给药,培养 24 h。收集细胞,按 Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒说明书方法操作后,采用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

**2.1.5 细胞周期的检测** 采用流式细胞仪进行检测。取 HSC-T6 细胞,调整细胞密度为  $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,按“2.1.2”项下方法分组、造模与给药,培养 24 h。收集细胞,按细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书方法操作后,采用流式细胞仪检测各组细胞的周期分布。

**2.1.6 细胞中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 和 PI3K/Akt 信号通路相关因子 mRNA 表达水平的检测** 采用 q-PCR 法进行检测。取 HSC-T6 细胞,调整细胞密度为  $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,按“2.1.2”项下方法分组、造模与给药,培养 24 h。收集细胞,采用 TRIzol 法提取总 RNA,然后根据试剂盒说明书相关方法,将总 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应体系为:cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , $2 \times$  SuperReal PreMix Plus 10  $\mu\text{L}$ , $50 \times$  ROX Reference Dye 0.4  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 0.6  $\mu\text{L}$ ,RNase-free ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 15 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,共 40 个循环。以  $\beta$ -actin 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 Collagen I、 $\alpha$ -SMA、PI3K、Akt、PTEN mRNA 的表达水平。

**2.1.7 细胞中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 蛋白和 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达水平的检测** 采用 Western blot 法进行检测。取 HSC-T6 细胞,调整细胞密度为  $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ ,按“2.1.2”项下方法分组、造模与给药,培养 24 h。收集

细胞,以磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2~3 次,加入适量 RIPA 裂解液提取总蛋白,并置于冰上充分裂解 20 min 后于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下以 13 000 r/min 离心 15 min;取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白经煮沸变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE);转膜,以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h;加入 GAPDH(稀释度为 1:20 000)、 $\alpha$ -SMA(稀释度为 1:2 500)、Collagen I(稀释度为 1:1 000)、PI3K(稀释度为 1:1 000)、Akt(稀释度为 1:1 000)、PTEN(稀释度为 1:1 000)一抗,于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;以 TBST 清洗 10 min $\times 3$  次,加入荧光标记二抗(稀释度为 1:10 000)常温孵育 1 h;以 TBST 清洗 10 min $\times 3$  次,采用近红外激光成像系统成像。采用 Image Studio 软件进行分析,以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

## 2.2 动物实验研究

**2.2.1 造模、分组与给药** 将 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组和额力根-7 低、中、高剂量组(135、270、405 mg/kg,剂量分别为临床等效剂量的 1、2、3 倍),每组 10 只。除空白组外,其余 4 组大鼠参考文献[11-12]灌胃  $\text{CCl}_4$ (2 mL/kg)以复制肝纤维化模型,每周 2 次,连续 10 周。造模的同时,空白组和模型组大鼠灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,其余各组大鼠均灌胃相应药物,每天 1 次,连续 10 周。

**2.2.2 大鼠肝组织病理形态学的观察** 末次灌胃结束后,处死各组大鼠,取其肝组织,一部分置于 4% 甲醛溶液中固定,一部分于 -80  $^{\circ}\text{C}$  下保存,备用。将固定 48 h 的肝组织进行乙醇梯度脱水,再以二甲苯透明替换、浸蜡、包埋、切片(厚度约 5  $\mu\text{m}$ )后,分别进行苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 染色,然后于光学显微镜下观察肝组织病理形态变化。

**2.2.3 大鼠肝组织中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 和 PI3K/Akt 信号通路相关因子 mRNA 表达水平的检测** 取“2.2.2”项下冻存的各组大鼠肝组织,同“2.1.6”项下“采用 TRIzol 法提取总 RNA……PTEN mRNA 的表达水平”操作,检测肝组织中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 和 PI3K/Akt 信号通路相关因子 mRNA 的表达水平。

**2.2.4 大鼠肝组织中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 蛋白和 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达水平的检测** 取“2.2.2”项下冻存的各组大鼠肝组织,同“2.1.7”项下“以 PBS 洗涤 2~3 次……表示目的蛋白的表达水平”操作,检测肝组织中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 蛋白和 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达水平。

## 2.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。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 LSD 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

### 3 结果

#### 3.1 细胞实验结果

3.1.1 额力根-7含药血清对HSC-T6细胞增殖的影响 与模型组比较,给药培养24 h后,额力根-7含药血清各剂量组细胞的OD值均显著降低( $P<0.01$ ),增殖抑制率分别为49.42%、33.96%和59.56%;培养48 h后,额力根-7含药血清各剂量组细胞的OD值均显著降低( $P<0.01$ ),增殖抑制率分别为26.29%、22.45%、35.21%;培养72 h后,额力根-7含药血清低剂量组细胞的OD值显著降低( $P<0.05$ ),增殖抑制率为18.12%。结果见表2。

表2 各组细胞的OD值和增殖抑制率的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 OD value and proliferation inhibition rate of cells in each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	培养24 h		培养48 h		培养72 h	
	OD值	增殖抑制率, %	OD值	增殖抑制率, %	OD值	增殖抑制率, %
模型组	2.02±0.02		2.07±0.10		1.90±0.06	
额力根-7含药血清低剂量组	1.13±0.08**	49.42	1.59±0.06**	26.29	1.59±0.04*	18.12
额力根-7含药血清中剂量组	1.41±0.08**	33.96	1.66±0.03**	22.45	1.73±0.05	9.88
额力根-7含药血清高剂量组	0.95±0.09**	59.56	1.42±0.07**	35.21	1.69±0.05	11.99

注:与模型组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

Note: vs. model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

3.1.2 额力根-7含药血清对HSC-T6细胞凋亡的影响 与模型组比较,额力根-7含药血清各剂量组细胞的晚期凋亡率、早期凋亡率(低剂量组除外)以及总凋亡率均显著升高( $P<0.01$ )。结果见表3、图1。

表3 各组细胞凋亡率的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

Tab 3 Apoptotic rate of cells in each group( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

组别	晚期凋亡率	早期凋亡率	总凋亡率
模型组	3.28±0.73	8.64±0.26	11.92±0.88
额力根-7含药血清低剂量组	11.92±4.42**	8.93±3.94	20.84±0.57**
额力根-7含药血清中剂量组	13.00±1.95**	14.64±3.45**	27.64±1.80**
额力根-7含药血清高剂量组	20.78±2.67**	20.65±3.86**	41.43±1.20**

注:与模型组比较, \*\* $P<0.01$

Note: vs. model group, \*\* $P<0.01$

3.1.3 额力根-7含药血清对HSC-T6细胞周期的影响 与模型组比较,额力根-7含药血清各剂量组的S期细胞比例均显著降低( $P<0.01$ ),G<sub>2</sub>/M期细胞比例均显著升高( $P<0.01$ )。结果见表4、图2。

3.1.4 额力根-7含药血清对HSC-T6细胞中Collagen I、 $\alpha$ -SMA和PI3K/Akt信号通路相关mRNA表达的影响 与模型组比较,额力根-7含药血清各剂量组细胞中Collagen I、 $\alpha$ -SMA、PI3K、Akt的mRNA表达水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),PTEN mRNA表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。结果见表5。

3.1.5 额力根-7含药血清对HSC-T6细胞中Collagen I、 $\alpha$ -SMA蛋白和PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的影响 与模型组比较,额力根-7含药血清各剂量组细胞中

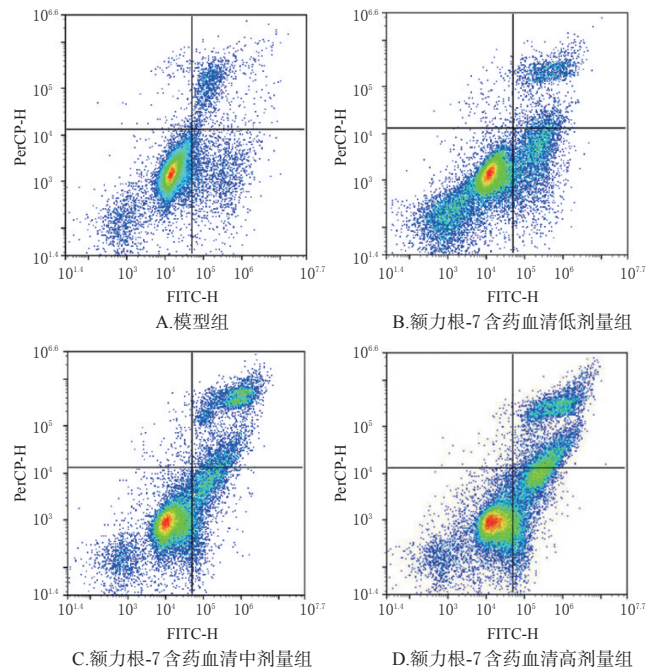


图1 各组细胞凋亡的流式散点图

Fig 1 Flow cytometry scatter diagram of cell apoptosis in each group

表4 各组细胞周期分布比例的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

Tab 4 Cycle distribution proportion of cells in each group( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S期	G <sub>2</sub> /M期
模型组	51.09±1.04	36.93±1.01	13.39±0.76
额力根-7含药血清低剂量组	53.48±2.79	18.38±1.59**	28.14±1.20**
额力根-7含药血清中剂量组	49.33±2.29	20.53±2.20**	30.15±0.10**
额力根-7含药血清高剂量组	46.92±1.92	21.43±0.52**	31.65±1.57**

注:与模型组比较, \*\* $P<0.01$

Note: vs. model group, \*\* $P<0.01$

Collagen I、 $\alpha$ -SMA、PI3K、Akt蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),PTEN蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。结果见表6、图3。

#### 3.2 动物实验结果

3.2.1 额力根-7对大鼠肝组织病理形态学的影响 HE染色和Masson染色结果均显示,空白组大鼠肝小叶完整,肝细胞排列整齐且未见纤维组织增生;模型组大鼠肝细胞排列不规则,肝索紊乱,可见大量胶原纤维同时伴有假小叶形成;额力根-7各剂量组大鼠纤维化程度均较模型组减轻,肝索排列趋于正常,肝小叶清晰。结果见图4。

3.2.2 额力根-7对大鼠肝组织中Collagen I、 $\alpha$ -SMA和PI3K/Akt信号通路相关因子mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠肝组织中Collagen I、 $\alpha$ -SMA、PI3K、Akt的mRNA表达水平均显著升高( $P<0.01$ ),PTEN mRNA表达水平均显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,额力根-7各剂量组大鼠肝组织中上述指标水平

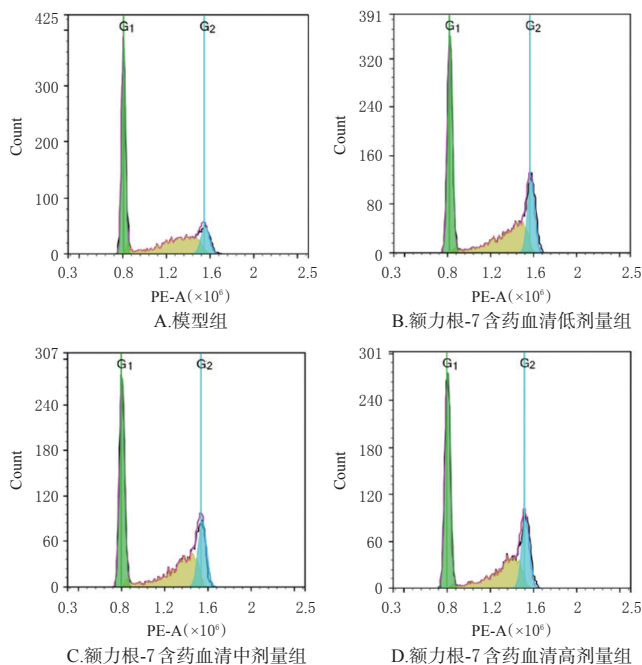


图2 各组细胞周期分布的流式直方图

Fig 2 Flow cytometry histogram of cycle distribution of cells in each group

表5 各组细胞中Collagen I、 $\alpha$ -SMA和PI3K/Akt信号通路相关因子mRNA表达水平的检测结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab 5 mRNA expression levels of Collagen I,  $\alpha$ -SMA and PI3K/Akt signaling pathway related factors of cells in each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	Collagen I	$\alpha$ -SMA	PI3K	Akt	PTEN
模型组	1.00±0.00	1.01±0.01	1.09±0.06	1.00±0.00	1.00±0.00
额力根-7低剂量组	0.74±0.06*	0.67±0.02**	0.12±0.01**	0.45±0.01**	5.43±0.11**
额力根-7中剂量组	0.33±0.10**	0.40±0.01**	0.27±0.04**	0.40±0.08**	5.54±1.95**
额力根-7高剂量组	0.28±0.09**	0.28±0.04**	0.17±0.04**	0.64±0.15*	13.53±0.90**

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

均显著逆转( $P<0.01$ )。结果见表7。

3.2.3 额力根-7对大鼠肝组织中Collagen I、 $\alpha$ -SMA蛋白和PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠肝组织中Collagen I、 $\alpha$ -SMA、PI3K、Akt蛋白的表达水平均显著升高( $P<0.01$ ),PTEN蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,额力根-7各剂量组大鼠肝组织中上述指标水平均显著逆转( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结果见表8、图5。

#### 4 讨论

肝纤维化是由一种或多种物理、化学或微生物因子引起的常见慢性疾病,其特征是成纤维细胞的异常积累和ECM的过度沉积,并伴有明显的炎性病变和结构改变<sup>[13-14]</sup>。HSC是在肝损伤过程中促进纤维化发生的细胞,主要位于肝窦空间和Disse空间,可分泌ECM并产生胶原酶,从而参与肝脏中胶原蛋白的合成<sup>[15-16]</sup>。静止

表6 各组细胞中Collagen I、 $\alpha$ -SMA蛋白和PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达水平的检测结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab 6 Expression levels of Collagen I,  $\alpha$ -SMA and PI3K/Akt signaling pathway related protein of cells in each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	Collagen I / GAPDH	$\alpha$ -SMA / GAPDH	PI3K / GAPDH	Akt / GAPDH	PTEN / GAPDH
模型组	0.08±0.01	0.83±0.05	0.63±0.03	0.84±0.04	0.02±0.00
额力根-7低剂量组	0.06±0.01*	0.64±0.04**	0.50±0.03*	0.68±0.03**	0.09±0.01**
额力根-7中剂量组	0.05±0.00**	0.70±0.02*	0.49±0.07**	0.49±0.04**	0.09±0.01**
额力根-7高剂量组	0.03±0.00**	0.68±0.02**	0.42±0.03**	0.51±0.05**	0.19±0.01**

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. model group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

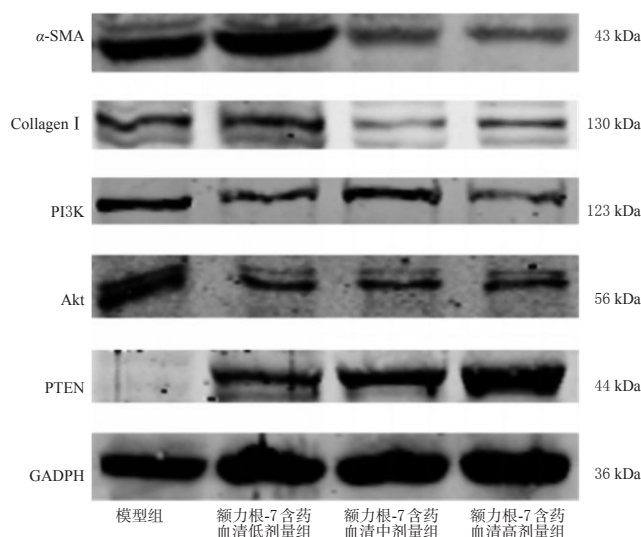


图3 各组细胞中Collagen I、 $\alpha$ -SMA蛋白和PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretogram of Collagen I,  $\alpha$ -SMA and PI3K/Akt signaling pathway related protein expression in cells of each group

状态下的HSC对肝脏的正常代谢功能至关重要;但当肝脏出现损伤时,静止的HSC会向其活化表型转分化,从而加快肝损伤后的纤维化进程<sup>[17]</sup>。

PI3K/Akt信号通路是肝纤维化形成过程中的重要信号通路,其可调控HSC的活化来干预肝纤维化的进程<sup>[13]</sup>。PI3K/Akt信号通路的激活是一个多步骤的过程,包括两种方式:一种是与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或连接蛋白相互作用,引起二聚体构象改变而被激活;另一种是通过Ras蛋白和p110蛋白直接结合从而被激活<sup>[13]</sup>。PI3K/Akt信号源于膜受体酪氨酸激酶(RTK)的激活,当细胞外的配体与膜受体RTK结合后,RTK被激活而发生同源或异源寡聚化或者自身磷酸化,从而为p85蛋白亚单位的SH2结构域提供锚定位点,进而激活p85蛋白<sup>[18-19]</sup>。相关研究发现,解除p85蛋白对p110蛋白亚单位的抑制作用,可活化p110蛋白,进而催

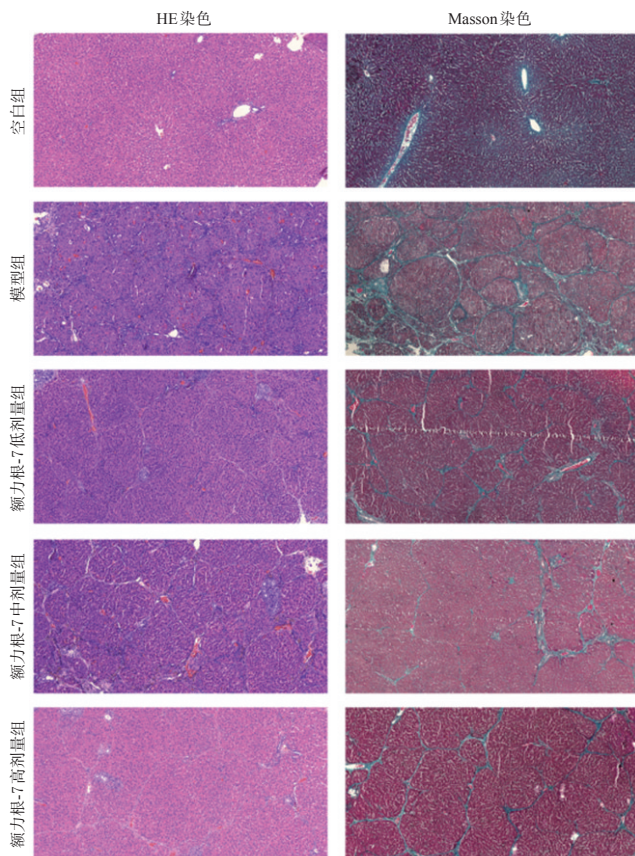


图4 各组大鼠肝组织的病理形态学显微图( $\times 100$ )

Fig 4 Pathomorphological micrograph of liver tissue of rats in each group( $\times 100$ )

表7 各组大鼠肝组织中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 和 PI3K/Akt 信号通路相关 mRNA 表达水平的检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 7 mRNA expression of Collagen I,  $\alpha$ -SMA and PI3K/Akt signaling pathway related factors in liver tissue of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Collagen I	$\alpha$ -SMA	PI3K	Akt	PTEN
空白组	1.00 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型组	2.92 $\pm$ 0.18 <sup>##</sup>	2.84 $\pm$ 0.22 <sup>##</sup>	1.82 $\pm$ 0.27 <sup>##</sup>	2.18 $\pm$ 0.26 <sup>##</sup>	0.38 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>
额力根-7低剂量组	1.18 $\pm$ 0.10 <sup>**</sup>	1.07 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup>	0.93 $\pm$ 0.14 <sup>**</sup>	1.35 $\pm$ 0.07 <sup>**</sup>	1.76 $\pm$ 0.13 <sup>**</sup>
额力根-7中剂量组	1.60 $\pm$ 0.30 <sup>**</sup>	1.42 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup>	1.20 $\pm$ 0.18 <sup>**</sup>	1.52 $\pm$ 0.08 <sup>**</sup>	1.64 $\pm$ 0.26 <sup>**</sup>
额力根-7高剂量组	1.20 $\pm$ 0.19 <sup>**</sup>	1.03 $\pm$ 0.06 <sup>**</sup>	1.12 $\pm$ 0.22 <sup>**</sup>	1.56 $\pm$ 0.02 <sup>**</sup>	1.76 $\pm$ 0.25 <sup>**</sup>

注:与空白组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

Note: vs. blank group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; vs. model control, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

化膜表面的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2),生成磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3)<sup>[20]</sup>;然后,PIP3作为第二信使与Akt的普列克底物蛋白同源结构域结合,使Akt从细胞质转移至细胞膜,从而定位于磷酸肌醇依赖性激酶1(PDK1)和磷酸肌醇依赖性激酶2(PDK2)附近<sup>[21]</sup>。当Akt的构象发生变化时,将暴露其磷酸化位点,使PDK1磷酸化Akt的Thr308结构域,PDK2磷酸化Akt的Ser473结构域<sup>[22]</sup>;然后磷酸化的Akt脱离细胞膜进入细胞质和细胞核,从而引起信号通路的级联反应,进而调节细胞

表8 各组大鼠肝组织中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 蛋白和 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达水平的检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 8 Expression levels of Collagen I,  $\alpha$ -SMA and PI3K/Akt signaling pathway related protein in liver tissue of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Collagen I / GAPDH	$\alpha$ -SMA / GAPDH	PI3K / GAPDH	Akt / GAPDH	PTEN / GAPDH
空白组	0.19 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.01
模型组	0.40 $\pm$ 0.02 <sup>##</sup>	0.66 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>	0.69 $\pm$ 0.03 <sup>##</sup>	0.67 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>	0.02 $\pm$ 0.00 <sup>##</sup>
额力根-7低剂量组	0.22 $\pm$ 0.05 <sup>**</sup>	0.43 $\pm$ 0.09 <sup>**</sup>	0.50 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup>	0.50 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>**</sup>
额力根-7中剂量组	0.20 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>	0.26 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>	0.42 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>	0.47 $\pm$ 0.02 <sup>**</sup>	0.19 $\pm$ 0.00 <sup>**</sup>
额力根-7高剂量组	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>**</sup>	0.23 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup>	0.42 $\pm$ 0.03 <sup>**</sup>	0.47 $\pm$ 0.06 <sup>**</sup>	0.21 $\pm$ 0.00 <sup>**</sup>

注:与空白组比较,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

Note: vs. blank group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; vs. model control, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,

<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

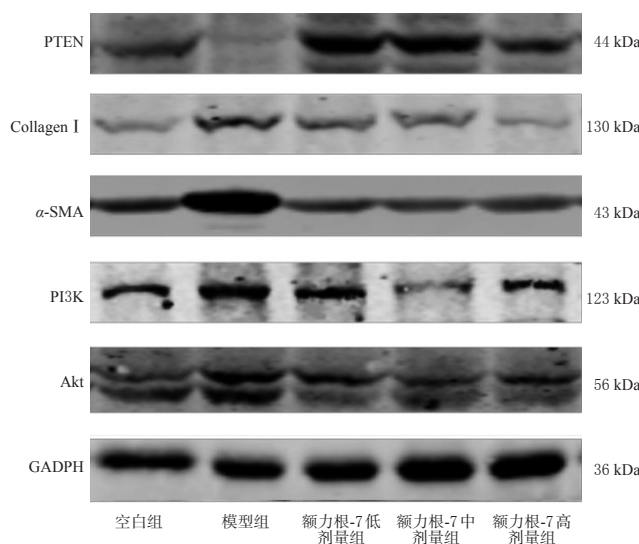


图5 各组大鼠肝组织中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 蛋白和 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的电泳图

Fig 5 Electrophoretogram of Collagen I,  $\alpha$ -SMA and PI3K/Akt signaling pathway related protein expression in liver tissue of rats in each group

的增殖、分化以及凋亡<sup>[23]</sup>。PI3K/Akt信号通路的激活能够促使HSC活化和凋亡来干预肝纤维化的进程,影响ECM的产生和降解,并和众多致纤维化因子发生关联,从而起到促进肝纤维化发生发展的作用。PTEN是细胞生长和存活信号传导途径的负调节物<sup>[24]</sup>,可通过去磷酸化作用将PIP3转换成PIP2,从而导致PIP3和依赖于PIP3的信号均减少<sup>[25]</sup>。因此,PTEN能够通过降低细胞内的PIP3水平,抑制PI3K信号通路下游蛋白Akt的激活,从而抑制PI3K/Akt信号通路的活化,进而阻止肝纤维化的持续发生发展。

本研究结果发现,经不同剂量额力根-7含药血清干预后,HSC-T6细胞的晚期凋亡率、早期凋亡率(低剂量

组除外)、总凋亡率以及G<sub>2</sub>/M期的细胞比例均显著升高,OD值(培养72 h时的中、高剂量组除外)和S期细胞比例均显著降低,表明额力根-7含药血清能通过阻滞细胞于G<sub>2</sub>/M期,来抑制细胞的增殖。q-PCR和Western blot实验显示,经额力根-7含药血清干预后,HSC-T6细胞中Collagen I、 $\alpha$ -SMA、PI3K、Akt的mRNA和蛋白表达水平均显著降低,PTEN mRNA和蛋白表达水平均显著升高。为了证明额力根-7对肝纤维化有明确的改善作用,笔者又基于动物实验,研究不同剂量额力根-7的抗肝纤维化作用。结果显示,经额力根-7干预后,大鼠肝纤维化程度减轻,肝索排列趋于正常,肝小叶清晰;大鼠肝组织中Collagen I、 $\alpha$ -SMA、PI3K、Akt的mRNA和蛋白表达水平变化情况与细胞实验一致。这表明额力根-7抗肝纤维化的作用机制可能与调控PI3K/Akt信号通路活性有关。

综上所述,额力根-7具有抗肝纤维化的作用,其作用机制可能与调控PI3K/Akt信号通路活性、促进HSC凋亡有关。

### 参考文献

[1] LACHENMEIER D W, MONAKHOVA Y B, REHM J. Influence of unrecorded alcohol consumption on liver cirrhosis mortality[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(23): 7217-7222.

[2] LEPREUX S, DESMOULIÈRE A. Human liver myofibroblasts during development and diseases with a focus on portal (myo) fibroblasts[J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 173.

[3] LI D, HE L, GUO H Z, et al. Targeting activated hepatic stellate cells (aHSCs) for liver fibrosis imaging[J]. *EJNMMI Res*, 2015, 5(1): 71.

[4] YILMAZ Y, EREN F. Serum biomarkers of fibrosis and extracellular matrix remodeling in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2019, 31(1): 43-46.

[5] 马月宏,段申,金蓉,等.蒙药额力根-7抗大鼠肝纤维化作用研究[J].*内蒙古大学学报(自然科学版)*, 2016, 47(5): 526-532.

[6] 高强,李旭光,樊莉,等.肝纤维化发病机制的研究进展[J].*现代生物医学进展*, 2017, 17(14): 2780-2785, 2677.

[7] ZENG P, LI J, CHEN Y. The structures and biological functions of polysaccharides from traditional Chinese herbs[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 163: 423-444.

[8] LI T, YANG Y, SONG H, et al. Activated NK cells kill hepatic stellate cells via p38/PI3K signaling in a TRAIL-involved degranulation manner[J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 105(4): 695-704.

[9] PAPA A, PANDOLFI P P. The PTEN-PI3K axis in cancer[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(4): 153.

[10] 刘晔,齐荔红,王硕丰,等.肝星状细胞HSC-T6体外肝纤维化模型的建立[J].*药学实践杂志*, 2005, 23(6): 339-

342.

[11] 李志钢,杨晋翔,张伟,等.肝纤维化实验动物模型的建立与评价[J].*北京中医药大学学报(中医临床)*, 2009, 16(4): 43-46.

[12] 魏伟,吴希美,李元建.药理学实验方法学[M]. 4版.北京:人民卫生出版社, 2010: 1137-1138.

[13] XIE G H, KARACA G, MARZENA S S, et al. Cross-talk between Notch and Hedgehog regulates hepatic stellate cell fate in mice[J]. *Hepatology*, 2013, 58(5): 1801-1813.

[14] WANG S Y, LEE Y J, KIM J, et al. Potential role of Hedgehog pathway in liver response to radiation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74141.

[15] LUCKEY S W, PETERSEN D R. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride induced liver injury and fibrosis in rats[J]. *Exp Mol Pathol*, 2001, 71(3): 226-240.

[16] HEYMANN F, TRAUTWEIN C, TACKE F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(4): 307-318.

[17] CHEN X, LI W X, CHEN Y, et al. Suppression of SUN<sub>2</sub> by DNA methylation is associated with HSCs activation and hepatic fibrosis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 1021.

[18] LI S, YI Z, DENG M, et al. TSLP protects against liver I/R injury via activation of the PI3K/Akt pathway[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(22): e129013.

[19] LIU W, JING Z T, XUE C R, et al. PI3K/AKT inhibitors aggravate death receptor-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 381: 114729.

[20] CARNERO A, BLANCO-APARICIO C, RENNER O, et al. The PTEN/PI3K/Akt signalling pathway in cancer, therapeutic implications[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(3): 187-198.

[21] PORTA C, PAGLINO C, MOSCA A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer[J]. *Front Oncol*, 2014, 144: 64.

[22] LIEN E C, DIBBLE C C, TOKER A. PI3K signaling in cancer: beyond Akt[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 62-71.

[23] ERSAHIN T, TUNCBAG N, CETIN-ATALAY R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway[J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(7): 1946-1954.

[24] WORBY C A, DIXON J E. PTEN[J]. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83: 641-669.

[25] CHEN C Y, CHEN J, HE L, et al. PTEN: Tumor suppressor and metabolic regulator[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 338.

(收稿日期:2021-06-20 修回日期:2021-09-09)

(编辑:唐晓莲)