

本文引文格式:袁喜东,黄媛恒,吴耀生,等.木鳖子丝石竹皂苷元-3-O-β-D-葡萄糖醛酸甲酯体外抗肝纤维化研究[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):193-199,214.

【论著与临床报道】

## 木鳖子丝石竹皂苷元-3-O-β-D-葡萄糖醛酸甲酯体外抗肝纤维化研究

袁喜东<sup>1,2</sup>,黄媛恒<sup>2,3</sup>,吴耀生<sup>1,2</sup>

- 广西医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,广西南宁 530021;
- 广西高校生物分子医学研究重点实验室,广西南宁 530021;
- 广西医科大学基础医学院机能学实验教学中心,广西南宁 530021)

**摘要:**目的 研究木鳖子丝石竹皂苷元-3-O-β-D-葡萄糖醛酸甲酯(gypsogenin-3-O-β-D-glucuronide,GYP)对人肝星状细胞株 LX2 细胞增殖、细胞外基质分泌情况及其潜在的作用通路机制。方法 在 LX2 细胞中分别加入 400 μmol/L 乙醛和不同浓度的 GYP 进行培养;用 CCK-8 检测试剂盒来测 GYP 作用于 LX2 细胞的 IC<sub>50</sub> 值及 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞增殖情况;划痕实验检测 LX2 细胞迁移情况;实时荧光定量(qPCR)检测 COL1A1 和 ACTA2 基因的表达水平;Western Blot 检测 Col-I、α-SMA、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、TGFβR II、p-Smad3、Smad3、Bax 和 Bcl-2 蛋白水平的情况。结果 GYP 对 LX2 细胞 24 h 半数抑制率(IC<sub>50</sub>)为 80.22 μmol/L;GYP 能浓度依赖性地抑制乙醛诱导的 LX2 细胞存活状态( $P < 0.05$ );一定浓度的 GYP 能抑制 LX2 细胞的迁移( $P < 0.05$ )和下调乙醛诱导的 LX2 细胞 COL1A1 和 ACTA2 基因的表达( $P < 0.05$ );GYP 可浓度依赖性地下调 Col-I、α-SMA、p-PI3K、p-AKT、AKT、TGFβR II、p-Smad3 和 Bcl-2 蛋白的表达( $P < 0.05$ ),并且 GYP 可浓度依赖性地上调 Bax 的表达( $P < 0.05$ )。结论 GYP 可能是通过调控 PI3K/AKT、TGF-β1/Smad 和凋亡通路来抑制 LX2 细胞增殖活化,从而发挥抗肝纤维化作用。

**关键词:**木鳖子;丝石竹皂苷元-3-O-β-D-葡萄糖醛酸甲酯;肝纤维化;PI3K/AKT 通路;TGF-β1/Smad 通路

中图分类号:R259;R28

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0193-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.001

### Study on anti-hepatic fibrosis of gypsogenin-3-O-β-D-glucuronide isolated from Semen Momordicae *in vitro*

Yuan Xidong<sup>1,2</sup>, Huang Yuanheng<sup>2,3</sup>, Wu Yaosheng<sup>1,2</sup>

- Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China;
- Guangxi Key Laboratory of Biological Molecular Medicine in Colleges and Universities, Nanning 530021, Guangxi, China;
- Experimental Teaching Center of Functional Sciences, School of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of gypsogenin-3-O-β-D-glucuronide (GYP) isolated from Semen Momordicae on the proliferation and extracellular matrix secretion of human hepatic stellate LX2 cells and its underlying signaling pathways. **Methods** LX2 cells were cultured with 400 μmol/L acetaldehyde and different concentrations of GYP respectively. The CCK-8 detection kit was used to measure the IC<sub>50</sub> value of

基金项目:广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281209)

第一作者:袁喜东,在读硕士研究生,研究方向:中草药有效成分药效研究,E-mail:1756211687@qq.com

通讯作者:吴耀生,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:中草药有效成分药效研究,E-mail:2681138707@qq.com

GYP acting on LX2 cells and the proliferation of LX2 cells induced by acetaldehyde treated with GYP. The scratch wound healing assay was used to detect the migration of LX2 cells. Real-time fluorescence quantitative (qPCR) was used to detect the expression levels of *COL1A1* and *ACTA2* genes. Western Blot was performed to detect the protein levels of Col- I,  $\alpha$ -SMA, p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT, TGF $\beta$ R II, p-Smad3, Smad3, Bax and Bcl-2. **Results** The 24-hour median inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of GYP on LX2 cells was 80.22  $\mu$ mol/L; GYP could inhibit the survival state of LX2 cells induced by acetaldehyde in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ); A certain concentration of GYP could inhibit the migration of LX2 cells ( $P < 0.05$ ) and downregulated the expression of *COL1A1* and *ACTA2* genes in LX2 cells induced by acetaldehyde ( $P < 0.05$ ). GYP downregulated the expression of Col- I,  $\alpha$ -SMA, p-PI3K, p-AKT, AKT, TGF $\beta$ R II, p-Smad3 and Bcl-2 proteins ( $P < 0.05$ ) and GYP upregulated the expression of Bax ( $P < 0.05$ ) in a concentration-dependent manner. **Conclusion** GYP may inhibit the proliferation and activation of LX2 cells by regulating PI3K/AKT, TGF- $\beta$ 1/Smad and apoptotic pathways, thereby exerting anti-hepatic fibrosis effect.

**Key words:** Semen Momordicae; gypsogenin-3-O- $\beta$ -D-glucuronide; hepatic fibrosis; PI3K/AKT pathway; TGF- $\beta$ 1/Smad pathway

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是因慢性肝损伤而导致的渐进性病理过程,可由肝炎(尤其是乙型肝炎和丙型肝炎)、寄生虫、酒精及药物、化学毒物等因素诱发。多数的慢性肝脏疾病几乎最终都会导致 HF。如果在 HF 可逆阶段不及时进行治疗,最后会逐渐发展成肝硬化甚至肝癌<sup>[1]</sup>。每年因慢性肝病而死亡的人数在全球约有 200 万人,在全球死亡原因的排行上肝硬化并发症位于第 11 位,肝癌位于全球死亡原因第 16 位<sup>[2]</sup>。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的过度增殖与活化已被诸多学者证实是导致 HF 主要原因<sup>[3]</sup>。当 HSC 受到各种损伤因素刺激时, HSC 由静止期活化增殖为肌成纤维细胞,进而分泌大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),伴随纤维降解相对或绝对不足,导致 ECM 过度沉积,造成 HF<sup>[4]</sup>。然而,由于 HF 病理机制的复杂性,临床上仍缺乏有效的治疗药物。因此,研发有效的抗 HF 的药物就成了迫在眉睫的研究课题。研究表明,中药木鳖子可以显著降低慢性肝病患者血清 HF 指标即透明质酸(hyaluronic acid, HA)、Ⅲ型前胶原(Type III procollagen, PC-Ⅲ)和Ⅳ型胶原(Collagen type IV, IV-C)的水平,有一定的抗 HF 作用<sup>[5]</sup>。另有研究表明,木鳖子总皂苷明显减轻四氯化碳( $CCl_4$ )所致的大鼠肝细胞坏死、肝组织纤维化和肝硬化的程度,表明木鳖子总皂苷有一定的抗 HF 作用<sup>[6]</sup>。丝石竹皂苷元 3-O- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸甲酯(gypsogenin-3-O- $\beta$ -D-glucuronide, GYP)是 2020 年版《中华人民共和国药典》(一部)规定的中药木鳖子质量检测的主要指标,是木鳖子皂苷降解后的次级苷<sup>[7]</sup>。但 GYP 是否是木鳖子抗 HF 的有效成分有待进一步探究。因本课题前期通过网络药理学对木鳖子 GYP 抗肝纤维化靶点及通路富集分析发现,其主要靶点富集在 TGF- $\beta$ 1/Smad 通路及 PI3K/AKT

通路、细胞凋亡通路上,故主要针对这些通路中的关键蛋白及基因进行检测分析。乙醛(AcCHO)作为机体内乙醇氧化的主要活性代谢产物,是导致酒精相关性肝纤维化的主要介质之一,能够激活肝星状细胞,导致分泌 ECM 增加,最终促进肝纤维化的形成。已有较多的实验研究采用乙醛作为激活剂,在体外用于激活 LX-2 细胞模型进行一些药物抗肝纤维化机制的研究<sup>[8-11]</sup>。LX-2 是正常人肝星状细胞株,具有较稳定的肝星状细胞表型特征,可增殖并合成胶原等肝纤维化功能,常用作抗肝纤维研究细胞模型。本研究旨在通过乙醛激活 LX2,在细胞水平上经体外实验探讨 GYP 对 HF 的作用机制,为 HF 治疗提供新的思路。

## 1 材料与方 法

1.1 实验材料 GYP 购于美仑生物科技有限公司,从木鳖子提取(HPLC $\geq$ 98%,标准品);人肝星状细胞株 LX-2 购于武汉赛维尔生物科技有限公司;GYP、胎牛血清、DMEM(高糖)基础培养基、青链霉素(双抗)、细胞计数试剂盒(CCK-8 试剂盒)购于美仑生物科技有限公司;40%乙醛溶液购于上海麦克林化学试剂有限公司;RNA 提取试剂盒购于苏州优逸兰迪生物技术有限公司;逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司;兔抗 I 型胶原(Collagen I, Col- I)抗体、兔抗磷酸化母亲抗 DPP 同源物 3(mothers against decapentaplegic homolog 3, Smad3)抗体购于英国 Cohesion biosciences 公司;兔抗  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体购于美国 Cell Signaling 公司;兔抗磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抗体、兔抗转化生长因子- $\beta$ 受体 II(transforming growth factor- $\beta$  receptor II, TGF $\beta$ R II)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 购于北京博奥森生

物技术有限公司;小鼠抗磷酸化蛋白激酶 B(Protein kinase B,AKT)、小鼠抗 AKT、小鼠抗 BCL2-相关 X(BCL2-Associated X,Bax)、小鼠抗 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/ Leukemia-2, Bcl-2)抗体购于美国 Santa 公司;小鼠抗 PI3K、小鼠抗 Smad3、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购于武汉三鹰生物技术有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 LX-2 细胞培养 LX-2 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM(高糖)中培养,保持 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。细胞每天传代培养 1 次,每次实验取对数生长期细胞进行。

1.2.2 CCK-8 法测半数抑制率(IC<sub>50</sub>) LX-2 细胞接种在 96 孔板(5×10<sup>3</sup> 个细胞/孔)中,培养 24 h 后加入不同浓度(0 μmol/L、2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L、16 μmol/L、32 μmol/L、64 μmol/L、128 μmol/L)的 GYP 继续培养 24 h,CCK-8 法测定细胞活力并计算 IC<sub>50</sub> 值。后续选择 <IC<sub>50</sub> 的浓度进行实验。

1.2.3 CCK-8 法测 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞活力 根据 GYP 对 LX-2 半数抑制率实验的结果,选择小于半数抑制率的 GYP 安全浓度,再按等比依次递减设置高、中、低 3 个浓度;参照袁亚平等<sup>[12]</sup>研究,乙醛诱导 LX-2 细胞活化的最佳浓度是 400 μmol/L,设置空白对照组(不加试剂)、模型组(400 μmol/L 乙醛)、GYP 低剂量组(400 μmol/L 乙醛+16.25 μmol/L GYP)、GYP 中剂量组(400 μmol/L 乙醛+32.5 μmol/L GYP)、GYP 高剂量组(400 μmol/L 乙醛+65 μmol/L GYP)进行实验。LX-2 细胞接种在 96 孔板(5×10<sup>3</sup> 个细胞/孔)中,培养 24 h 后按上述分组加入试剂后继续培养 24 h,CCK-8 法测定细胞活力。

1.2.4 划痕实验 分组设置同 1.2.3。于 6 孔板背面用 marker 笔平行画 5 条横线。培养 LX-2 细胞,接种原则为过夜后融合率达到 100%。接着按照上述分组处理细胞 24 h。所有培养孔在培养 0 h 和 24 h 时置于倒置显微镜(10 倍镜)下观察结果并拍照,使用 ImageJ 软件测量分析。

1.2.5 实时荧光定量 PCR(qPCR) 分组设置同 1.2.3。用 60 mm 细胞培养皿培养 LX-2 细胞,每皿接种 4×10<sup>5</sup> 个细胞,培养 24 h。接着按照分组处理细胞 24 h,用 RNA 试剂盒提取总 RNA;再用逆转录试剂盒逆转录 RNA,获得 cDNA。逆转录程序为:去除基因组 DNA:42 °C,2 min;逆转录:37 °C 15 min,85 °C 5 s;根据 NCBI 设计 COL1A1、ACTA2、GAPDH 的引物,由宝生物工程(大连)有限公司设计,见表 1。反应程序:95 °C 30 s,1 个循环;95 °C 5 s,60 °C 34 s,

40 个循环。用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算基因的相对表达量。

表 1 qPCR 检测 COL1A1、ACTA2 所需引物

序号	基因	引物序列(5'→3')	
1	COL1A1	CCCCGAGGCTCTGAAGGT	COL1A1-F
		GCAATACCAGGAGCACCATTG	COL1A1-R
2	ACTA2	GTTCGCTCCTCTCTCCAAC	ACTA2-F
		GTGCGGACAGGAATTGAAGC	ACTA2-R
3	GAPDH	GAAAGCCTGCCGGTGACTAA	GAPDH-F
		GCCCAATACGACCAAATCAGAG	GAPDH-R

1.2.6 Western Blot 分组设计同 1.2.3。细胞培养和处理同 1.2.5。用含有蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解细胞,裂解液在离心机中 12 000 r/min 4 °C 离心 30 min,收集上清液用于进一步分析,使用 BCA 测定试剂盒测量蛋白浓度,100 °C 变性 10 min,总蛋白经 10% 凝胶电泳分离后转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h,1×TBST 摇床洗涤 3 次,每次 5 min。与下列一抗孵育:Col-I、α-SMA、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、TGFβR II、p-Smad3、Smad3、Bcl-2、Bax 和 GAPDH。4 °C 孵育过夜。1×TBST 摇床洗涤 3 次,每次 10 min。将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次后使用化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)采集图像,并通过 ImageJ 分析软件进行量化,测定蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参对目的蛋白进行半定量分析。

1.3 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.5.0 统计软件对数据进行分析并作图,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,进行方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 GYP 对 LX-2 细胞增殖的影响 GYP 对 LX-2 的 IC<sub>50</sub> 为 80.22 μmol/L,即细胞存活率降到 50% 时的 GYP 浓度。后续实验选择相对安全的浓度,即 ≤ 65 μmol/L 的 GYP 进行后续实验。细胞存活率 = (OD<sub>实验孔</sub> - OD<sub>空白孔</sub>) / (OD<sub>对照组</sub> - OD<sub>空白孔</sub>) × 100%,见图 1。

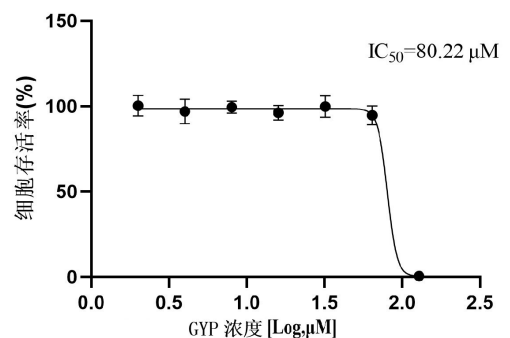
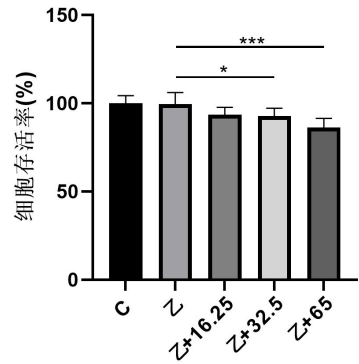


图 1 GYP 对 LX-2 细胞增殖的影响

2.2 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞增殖的影响 选择对 LX-2 细胞增殖没有影响也就是安全的 GYP 浓度进行实验。结果虽然显示乙醛并没有进一步促进 LX-2 细胞增殖,但所采用的 GYP 剂量依赖性地抑制了乙醛作用后 LX-2 细胞增殖,细胞存活率下降。其中,32.5  $\mu\text{mol/L}$ 、65  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对 LX-2 细胞增殖的抑制有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ ),见图 2。

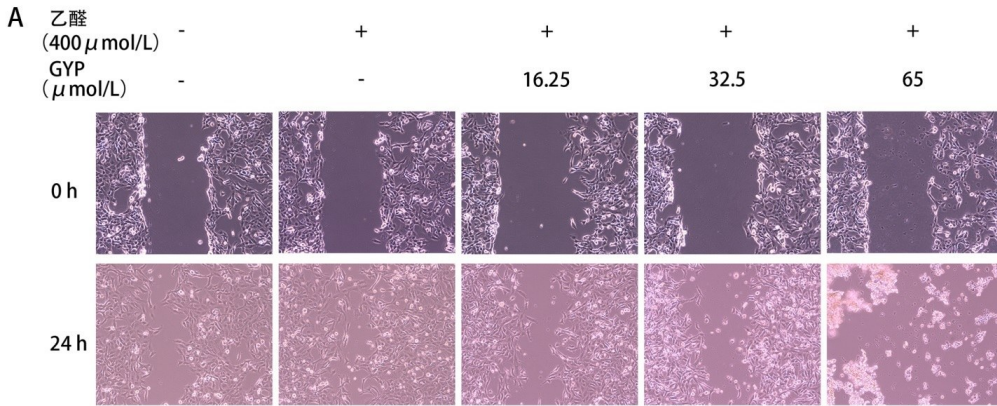
2.3 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞迁移的影响 与对照组相比,乙醛具有一定的促进 LX2 细胞迁移能力的趋势,但差异无统计学意义。而 GYP 对这种促进有一定的抑制作用,32.5  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对 LX2 细胞迁移能力的抑制具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图

3。而无血清下 LX2 细胞无法耐受 65  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP。



注:与乙醛对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 2 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞存活率的影响

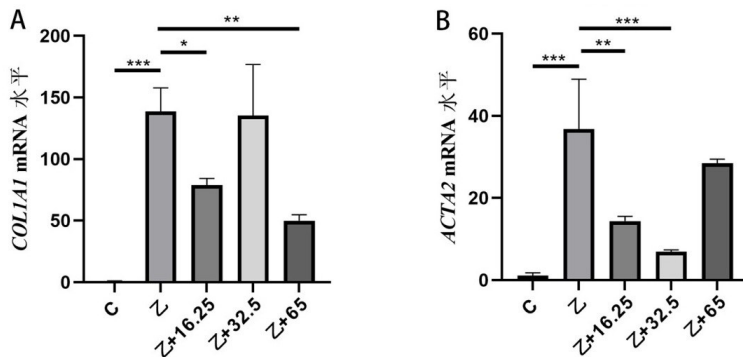


注:A 为 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞迁移能力的影响;B 为相对迁移率;与乙醛对照组相比,\* $P < 0.05$ 。

图 3 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞迁移的影响( $\times 10$ )

2.4 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞 COL1A1 和 ACTA2 的 mRNA 水平的影响 与对照组相比,乙醛上调了 LX2 细胞 COL1A1 和 ACTA2 mRNA 水平,具有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ )。而 GYP 对 COL1A1 和 ACTA2 mRNA 水平的上调有抑制作用,

其中 16.25  $\mu\text{mol/L}$ 、65  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对 COL1A1 mRNA 水平的上调抑制具有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),16.25  $\mu\text{mol/L}$ 、32.5  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对 ACTA2 mRNA 水平的上调抑制具有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ),见图 4。



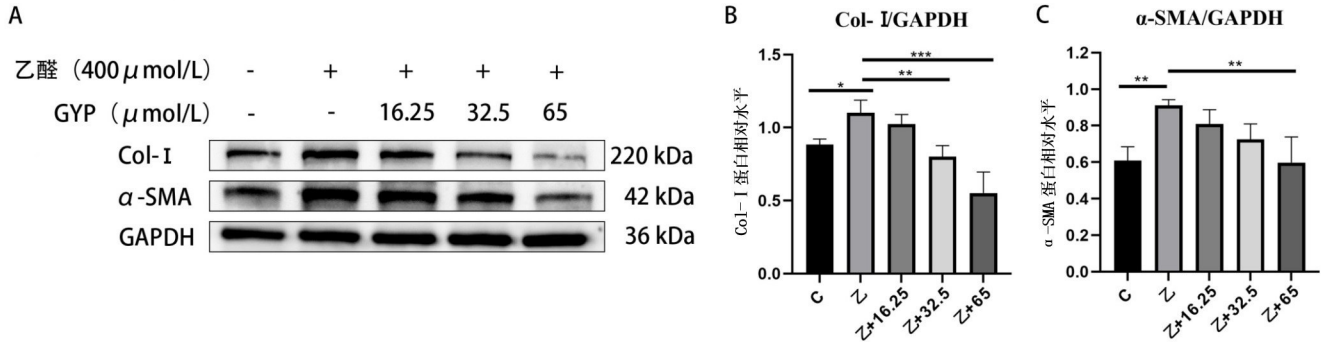
注:A 为 COL1A1 mRNA 水平;B 为 ACTA2 mRNA 水平;

\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 4 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞 COL1A1 和 ACTA2 mRNA 水平的影响

2.5 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 蛋白水平的影响 与对照组相比,乙醛上调了 LX2 细胞 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 蛋白水平,具有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。而 GYP 呈剂量依赖性地抑制了

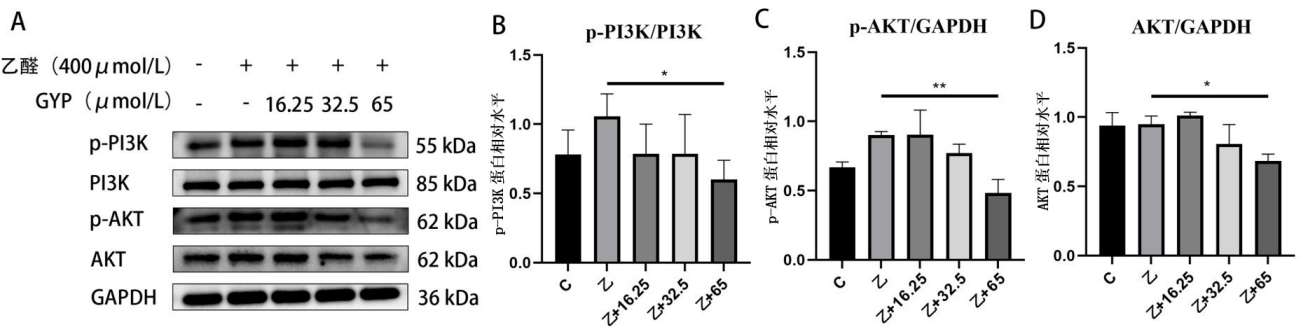
蛋白上调,其中 32.5  $\mu\text{mol/L}$ 、65  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对 Col-I 蛋白的上调抑制有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ),65  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对  $\alpha$ -SMA 蛋白的上调抑制有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 5。



注:A为 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 的 WB 条带图;B为 Col-I 蛋白相对水平;C为  $\alpha$ -SMA 蛋白相对水平; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。  
图 5 GYP 对乙醛诱导的 LX-2 细胞 Col-I 和  $\alpha$ -SMA 蛋白水平的影响

2.6 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞 PI3K/AKT 通路的影响 与对照组相比,乙醛有上调 LX2 细胞 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白水平的趋势。而 GYP 对这种上调有一定的抑制作用,其中 65  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白的上调抑制有统计学意义( $P < 0.05$  或

$P < 0.01$ )。此外,乙醛没有诱导 AKT 蛋白的表达,但 GYP 抑制了乙醛作用后的 LX2 细胞 AKT 蛋白的表达,其中 65  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对 AKT 蛋白表达的抑制有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 6。

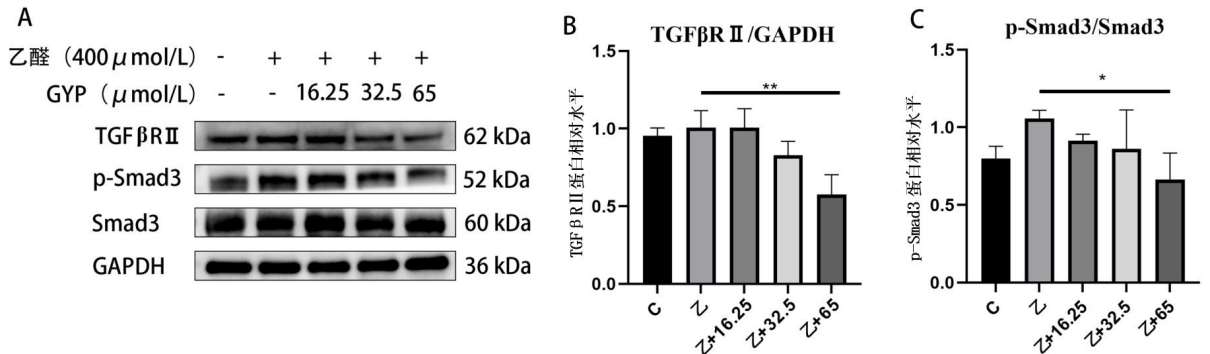


注:A为 p-PI3K,PI3K,p-AKT 和 AKT 的 WB 条带图;B为 p-PI3K 蛋白相对水平;C为 p-AKT 蛋白相对水平;D为 AKT 蛋白相对水平; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。  
图 6 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞 PI3K/AKT 通路的影响

2.7 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞 TGF- $\beta$ 1/SMAD 通路的影响 与对照组相比,尽管乙醛上调 LX2 细胞 TGF $\beta$ R II 和 p-Smad3 蛋白水平趋势不明显,但 GYP 呈剂量依赖性地抑制蛋白上调趋势;其中 65  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对 TGF $\beta$ R II 和 p-Smad3 蛋白的上调抑制有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),见图 7。

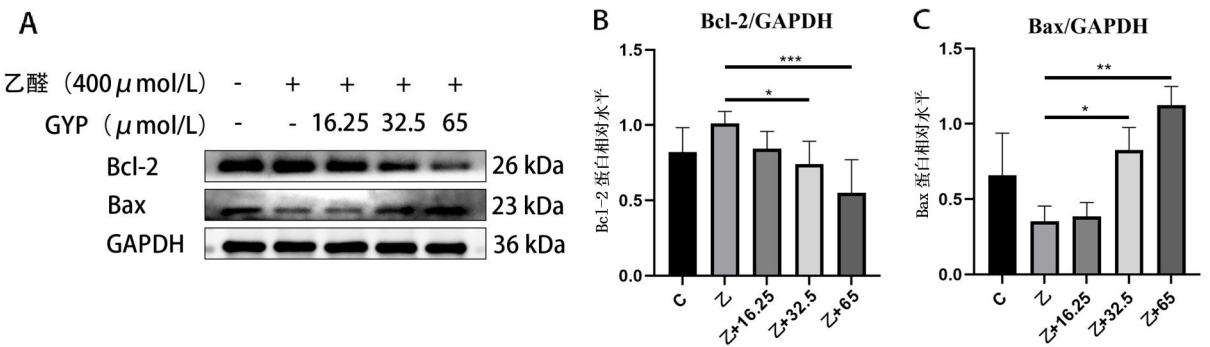
2.8 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞凋亡通路的影响 与对照组相比,乙醛有一定的上调 LX2 细胞 Bcl-2 蛋

白水平的作用。而 GYP 呈剂量依赖性地抑制了这种上调,其中 32.5  $\mu\text{mol/L}$ 、65  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对 Bcl-2 蛋白的上调抑制有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ )。同时,乙醛还有下调 LX2 细胞 Bax 蛋白水平的趋势,而 GYP 呈剂量依赖性地促进了 Bax 蛋白的表达,其中 32.5  $\mu\text{mol/L}$ 、65  $\mu\text{mol/L}$  的 GYP 对 Bax 蛋白的促进表达有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图 8。



注:A 为 TGFβII, p-Smad3 和 Smad3 的 WB 条带图;B 为 TGFβII 蛋白相对水平; C 为 p-Smad3 蛋白相对水平; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 7 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞 TGF-β1/SMAD 通路的影响



注:A 为 Bcl-2 和 Bax 的 WB 条带图;B: Bcl-2 蛋白相对水平;C: Bax 蛋白相对水平; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 8 GYP 对乙醛诱导的 LX2 细胞凋亡通路的影响

### 3 讨论

木鳖子<sup>[5]</sup>及木鳖子总皂苷<sup>[6]</sup>可以发挥抗 HF 作用,但木鳖子皂苷单体 GYP 的抗 HF 研究鲜少报道。有报道木鳖子总皂苷对小鼠具有一定毒性<sup>[13]</sup>。本研究采用木鳖子总皂苷的降解产物 GYP(纯度 HPLC ≥ 98%),探讨了 GYP 在体外抗 HF 作用的潜在机制。实验中所使用的 GYP 浓度,是经细胞毒性实验后选择对 LX-2 未呈现毒性的安全剂量。结果表明,GYP 抑制 HF 和抑制 HSC 增殖、活化、迁移有关,其可能机制是通过调节 PI3K/AKT、TGF-β1/Smad 和凋亡信号通路来实现的。

HSC 的增殖与活化为 HF 发生的中心环节<sup>[14]</sup>。各种致病因子导致肝损伤,诱发 HSC 增殖分化为肌成纤维细胞后大量分泌 ECM 在肝内蓄积,诱发 HF 的发生<sup>[15]</sup>。α-SMA 被认为是 HSC 激活的标志<sup>[16]</sup>。Col-I 和纤维连接蛋白是 ECM 的主要成分,其过度蓄积是 HF 的特征性病理改变<sup>[17]</sup>。在本研究中,用乙醛诱导 LX-2 细胞建立了体外 HF 模型,乙醛诱导 LX-2 细胞后,ECM Col-I 和 HSC 激活的标志成分 α-SMA 不论从转录水平还是蛋白水平,均明显表达增加。说明采用乙醛作用后的 LX-2 细胞的确是活化的,可用作

GYP 抗肝纤维化的细胞模型。GYP 处理显著下调了乙醛诱导的 Col-I、α-SMA 的蛋白和 mRNA 的表达。这表明 GYP 在体外能抑制 LX-2 的活化而减弱 HF 进程。TGF-β1/Smad 通路是 HF 的经典通路之一,当转化生长因子 β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)与细胞膜表面 TGFβR II 形成复合物,使 TGFβR I 被 TGFβR II 磷酸化,从而激活 TGFβR I 的激酶活性,激活的 TGFβR I 通过其丝氨酸/苏氨酸激酶活性磷酸化受体调节的 Smad 蛋白如 Smad2 和 Smad3,磷酸化的 Smad2/3 与 Smad4 形成三聚体复合物,进入细胞核调节特异性促纤维化的基因转录,从而导致 HF 的发生<sup>[18]</sup>。周林华等<sup>[19]</sup>研究表明栀子苷显著改善了 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠 HF,其可能机制是通过抑制 TGF-β1/Smad 信号通路 TGF-β1、p-Smad2 和 p-Smad3 蛋白的表达来实现。本研究中,GYP 显著下调了乙醛诱导 LX-2 细胞的 TGFβR II 和 p-Smad3 蛋白的表达, TGFβR II 和 p-Smad3 蛋白是 TGF-β1/Smad 通路上的关键蛋白。提示 GYP 在体外抑制 HSC 活化和 HF 可能是通过抑制 TGF-β1/Smad 信号通路实现的。

PI3K/AKT 是 HF 一个重要的信号通路,其中 PI3K 是一种磷脂酰肌醇 3 激酶,可因磷酸化修饰激

活,能够将细胞膜上的磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸转化为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸,从而引发磷酸化 AKT 而激活。AKT 被激活后调节多个 HSC 细胞代谢、生存和增殖相关的通路。LI H G 等<sup>[20]</sup>研究表明郁肝龙通过抑制 PI3K/AKT 通路 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达,显著改善 CCl<sub>4</sub> 诱导的 HF。本研究中,GYP 显著下调了乙醛作用 LX-2 细胞后 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达,提示 GYP 在体外抑制 HF 和 HSC 活化也可能与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

本课题前期做了 GYP 抗肝纤维化作用靶点及通路的网络药理学分析,发现 GYP 的抗肝纤维化靶点及通路主要富集在 PI3K-Akt 信号通路、Ras 信号通路、MAPK 信号通路、TGF- $\beta$  信号通路、细胞凋亡等(数据待发表)。因 TGF- $\beta$ 1/Smad 通路是 HF 的经典通路之一,且 PI3K/AKT 也是 HF 一个重要的信号通路,故本研究主要选择 TGF- $\beta$ 1/Smad 通路、PI3K-Akt 信号通路进行实验验证,结果也说明 GYP 抗肝纤维化与上述两条通路有关。由上述研究可知,GYP 抗 HF 是一个多通路、多靶点的复杂过程,GYP 调控的 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路和 PI3K/AKT 信号通路可能互为上下游,也可能是单独同时作用的两条通路,需要做进一步深入探究。但其 GYP 调控的最终效应都是抑制 HSC 活化增殖,从而减少 ECM 的分泌和蓄积,进而减轻 HF。

Bcl-2 家族主要由抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 组成,其主要作用是通过促进线粒体蛋白的释放对 HSC 的凋亡进行控制<sup>[21]</sup>。活化的 HSC 中,Bcl-2/Bax 比值升高,即 Bcl-2 过表达,Bax 的表达基本消失,从而抑制 HSC 的凋亡,使 HSC 持续处于活化状态,不断分泌 ECM,最终导致 ECM 过度沉积,形成 HF<sup>[22]</sup>。本研究中,GYP 显著下调了乙醛诱导的 LX-2 细胞 Bcl-2 蛋白的表达并且显著上调了 Bax 蛋白的表达。本研究中 GYP 也显著抑制乙醛作用 LX-2 细胞后 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达,而抑制 PI3K/Akt 信号通路传导可降低 Bcl-2/Bax 比率来调节线粒体功能,诱导成纤维细胞凋亡,并激活 Caspase-9 和 Caspase-3 及 PARP-2,诱导凋亡逆转纤维化<sup>[23]</sup>。提示 GYP 可能是通过 PI3K-Akt 信号通路进一步促进 LX-2 细胞凋亡,从而发挥体外抗 HF 作用的。

综上所述,GYP 在体外能抑制 HF 和 HSC 增殖、活化、迁移,其机制可能是通过抑制 PI3K/AKT、TGF- $\beta$ 1/Smad 和凋亡通路来实现的。本研究结果表明,木鳖子 GYP 可能是一种有前途的抗 HF 治疗药物,但其抗 HF 的分子机制尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 陈艳,郭朋. 活血化瘀法治疗肝纤维化的理论基础及作用机制探讨[J]. 中西医结合肝病杂志,2019,29(4):299-300.
- [2] ASRANI S K,DEVARBHAVI H,EATON J,et al. Burden of liver diseases in the world[J]. J Hepatol,2019,70(1):151-171.
- [3] KAMM D R,MCCOMMIS K S. Hepatic stellate cells in physiology and pathology[J]. J Physiol,2022,600(8):1825-1837.
- [4] DU K,HYUN J,PREMONT R T,et al. Hedgehog-YAP signaling pathway regulates glutaminolysis to control activation of hepatic stellate cells[J]. Gastroenterology,2018,154(5):1465-1479. e13.
- [5] 牛玉东,牛玉红,王亚雄. 中药抗肝纤维化 60 例疗效观察[J]. 陕西中医,2003,24(1):31-32.
- [6] 汪斌. 木鳖子总皂苷的制备及其抗肝纤维化作用的研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2011.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部):2020 年版[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:66-67.
- [8] 武雪. CD73 通过调控肝星状细胞自噬加重酒精相关性肝纤维化及机制研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2023.
- [9] YANG Y,YANG F,WU X J,et al. EPAC activation inhibits acetaldehyde-induced activation and proliferation of hepatic stellate cell *via* Rap1[J]. Can J Physiology Pharmacol,2016,94(5):498-507.
- [10] WANG Q,DAI X F,YANG W Z,et al. Caffeine protects against alcohol-induced liver fibrosis by dampening the cAMP/PKA/CREB pathway in rat hepatic stellate cells[J]. Int Immunopharmacol,2015,25(2):340-352.
- [11] SVEGLIATI-BARONI G,RIDOLFI F,DI SARIO A,et al. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells[J]. Hepatology,2001,33(5):1130-1140.
- [12] 袁亚平,孙启山,周小倩,等. 草乌甲素对乙醛诱导的 LX-2 细胞 ECM 分泌及相关蛋白表达的影响[J]. 皖南医学院学报,2022,41(5):416-419.
- [13] 汪斌,程德怀,黄带,等. 木鳖子中总皂苷的提取分离工艺及其急性毒性的研究[J]. 安徽医药,2011,15(2):147-149.
- [14] 孙竟然,卢秉久,郑佳连,等. 扶正化纤方调控 PI3K/AKT/BAD 信号通路对肝纤维化小鼠的作用及机制[J]. 中药新药与临床药理,2024,35(11):1652-1660.
- [15] LACKNER C,TINIAKOS D. Fibrosis and alcohol-related liver disease[J]. J Hepatol,2019,70(2):294-304.

- Nuclear pores promote lethal prostate cancer by increasing POM121-driven E2F1, MYC, and AR nuclear import [J]. *Cell*, 2018, 174(5):1200-1215, e20.
- [24] ZHANG S D, ZHENG C J, LI D, et al. Clinical significance of POM121 expression in lung cancer[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2020, 24(12):819-824.
- [25] ZHAO R H, TANG G X, WANG T Q, et al. POM121 is a novel marker for predicting the prognosis of laryngeal cancer[J]. *Histol Histopathol*, 2020, 35(11):1285-1293.
- [26] GUAN L R, ZHANG L L, WANG T Q, et al. POM121 promotes proliferation and metastasis in non-small-cell lung cancer through TGF- $\beta$ /SMAD and PI3K/AKT pathways[J]. *Cancer Biomark*, 2021, 32(3):293-302.
- [27] RASALA B A, RAMOS C, HAREL A, et al. Capture of AT-rich chromatin by ELYS recruits POM121 and NDC1 to initiate nuclear pore assembly [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(9):3982-3996.
- [28] ZHANG C, ZHOU L J, ZHANG M Y, et al. H3K18 lactylation potentiates immune escape of non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2024, 84(21):3589-3601.
- [29] XU C R, XU Z, ZHANG Y, et al.  $\beta$ -Catenin signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(4):e154515.
- [30] MA H R, LI L J, JIA L Z, et al. POM121 is identified as a novel prognostic marker of oral squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer*, 2019, 10(19):4473-4480.
- 收稿日期:2025-02-06;修回日期:2025-03-09  
(本文编辑 覃洪含)

(上接第 199 页)

- [16] MU M, ZUO S, WU R M, et al. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation *via* inhibition of TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12:4107-4115.
- [17] ZHAO Y Q, DENG X W, XU G Q, et al. Mechanical homeostasis imbalance in hepatic stellate cells activation and hepatic fibrosis [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10:1183808.
- [18] 赵卫华, 王燕红, 丛敏. TGF- $\beta$ 1/Smads 信号通路在肝脏纤维化中的作用研究进展[J]. *肝脏*, 2016, 21(10):877-879.
- [19] 周林华, 陈晓. 栀子苷通过 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路抑制肝纤维化和肝星状细胞活化[J]. *生理学报*, 2022, 8(2):217-224.
- [20] LI H G, YOU P T, XIA Y, et al. Yu Gan long ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting PI3K/AKT, ras/ERK and JAK1/STAT3 signaling pathways in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis rats [J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(3):539-547.
- [21] 冯健愉, 朱玉山, 陈佳, 等. Bcl-2 家族蛋白的生理功能及结构基础[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(8):1477-1489.
- [22] BADR G, SAYED E A, WALY H, et al. The therapeutic mechanisms of *Propolis* against CCl<sub>4</sub>-mediated liver injury by mediating apoptosis of activated hepatic stellate cells and improving the hepatic architecture through PI3K/AKT/mTOR, TGF- $\beta$ /Smad2, Bcl2/BAX/P53 and iNOS signaling pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 53(2):301-322.
- [23] 韩蕾, 林姗姗, 王帅, 等. 中药靶向干预 PI3K/Akt 通路治疗纤维化机制研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2025, 32(3):180-185.
- 收稿日期:2025-01-03;修回日期:2025-02-15  
(本文编辑 覃黎黎)