

活血消癥益气方对转化生长因子 $\beta 1$ 诱导的 AML12 细胞凋亡的影响及其机制研究

吴伟斌¹, 张贵锋¹, 李力强^{1,2}, 吴晓玲¹, 杨坚¹ (1. 肇庆医学高等专科学校, 广东 肇庆 526020; 2. 肇庆市第一人民医院, 广东 肇庆 526020)

摘要: **目的** 研究活血消癥益气方对体外转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 诱导的小鼠肝实质细胞 AML12 凋亡的影响及其可能的机制。**方法** 利用 TGF- $\beta 1$ ($5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 诱导 AML12 细胞建立凋亡模型 (诱导 24 h) 及氧化应激模型 (诱导 4 h), 设置空白对照组、模型对照组、不同剂量活血消癥益气方 (0.1 、 0.2 、 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 组。采用 CCK-8 法检测药物对细胞活力的影响, Hoechst 33342 法及 Annexin V-FITC 法检测药物对凋亡的影响, DCFH-DA 法检测药物对细胞内活性氧含量的影响, 蛋白印迹法检测药物对 Bcl-2、Bax、Caspase-3 及 Nrf2 蛋白表达量的影响。**结果** 与空白对照组比较, 凋亡模型对照组细胞活力下降, 凋亡细胞占比及出现核固缩细胞比例等明显增加 ($P < 0.05$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 明显下调, 同时 Bax 及 Caspase-3 等凋亡蛋白明显上调 ($P < 0.05$); 且氧化应激模型对照组细胞内活性氧含量明显升高 ($P < 0.05$), 细胞内 Nrf2 表达增加但核转位减少 ($P < 0.05$)。与凋亡模型组比较, 活血消癥益气方各剂量组可明显恢复细胞活力, 减少凋亡细胞占比及核固缩细胞比例 ($P < 0.05$); 同时上调 Bcl-2 表达, 下调 Bax 及 Caspase-3 的表达 ($P < 0.05$)。与氧化应激模型组比较, 活血消癥益气方各剂量组可明显减少细胞内活性氧的含量 ($P < 0.05$), 增加 Nrf2 蛋白的表达及促进其核转位 ($P < 0.05$)。**结论** 活血消癥益气方可逆转 TGF- $\beta 1$ 诱导的肝细胞凋亡, 其机制可能与调控线粒体凋亡途径及 Nrf2 通路功能有关。

关键词: 活血消癥益气方; 转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$); 肝实质细胞 AML12; 凋亡; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1276-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.09.007

Effect and Mechanism of *Huoxue Xiaozheng Yiqi* Recipe on TGF- $\beta 1$ -induced Apoptosis of AML12 Cells

WU Weibin¹, ZHANG Guifeng¹, LI Liqiang^{1,2}, WU Xiaoling¹, YANG Jian¹ (1. Zhaoqing Medical College, Zhaoqing 526020 Guangdong, China; 2. Zhaoqing First People's Hospital, Zhaoqing 526020 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of *Huoxue Xiaozheng Yiqi* recipe on TGF- $\beta 1$ -induced apoptosis of alpha mouse liver 12 (AML12) cells and its possible mechanism. **Methods** AML12 cells were used to establish apoptotic model by incubating with TGF- $\beta 1$ ($5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 24 h and oxidative stress model by incubating with the same concentration of TGF- $\beta 1$ for 4 h. Blank control group, model control group and different doses of HXXZYQ (0.1 , 0.2 and $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) groups were set up. CCK-8 method was used to detect cell viability. Hoechst 33342 staining and Annexin V-FITC method were used to detect apoptosis. DCFH-DA method was performed to detect intracellular ROS. The protein expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 and Nrf2 was detected by Western Blot. **Results** Compared with the blank control group, the cell viability, the proportion of apoptotic cells and the proportion of pyknotic nuclei in the apoptotic model group were significantly increased ($P < 0.05$). Bcl-2 protein was significantly down-regulated, while Bax and Caspase-3 were significantly up-regulated ($P < 0.05$). Moreover, the content of intracellular ROS was significantly increased in the oxidative stress model group, and the expression of intracellular Nrf2 was increased but nuclear translocation was decreased ($P < 0.05$). Compared with the apoptotic

收稿日期: 2021-03-24

作者简介: 吴伟斌, 男, 讲师, 硕士, 研究方向: 中药药理研究。Email: wuweibin@zqmc.edu.cn。通信作者: 李力强, 男, 教授, 主任中医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 中医脾胃病基础与临床研究。Email: zqyzllq@163.com。

基金项目: 广东省高校重点平台及科研项目(2017GKTSCX093); 广东省建设中医药强省重点科研课题(20183019)。

model group, different doses of *Huoxue Xiaozheng Yiqi* recipe could significantly restore the cell viability, reduce the proportion of apoptotic cells and pyknotic nuclei ($P < 0.05$), and up-regulate the expression of Bcl-2, while down-regulate the expression of Bax and caspase 3 ($P < 0.05$). Compared with the oxidative stress model, different doses of HXXZYQ could significantly reduce the content of intracellular ROS ($P < 0.05$), increase the expression of Nrf2 protein and promote its nuclear translocation ($P < 0.05$). **Conclusion** *Huoxue Xiaozheng Yiqi* recipe can reversed TGF- β 1-induced apoptosis of AML12 cells. The mechanism may be related to the regulation of mitochondrial apoptosis pathway and Nrf2 pathway.

Keywords: *Huoxue Xiaozheng Yiqi* recipe; TGF- β ; alpha mouse liver 12(AML12); apoptosis; oxidative stress

肝硬化是各种慢性肝病进展至以肝脏弥漫性纤维化、假小叶形成、肝内外血管增殖为特征的病理阶段,代偿期无明显临床症状,失代偿期以门静脉高压和肝功能严重损伤为特征的重大疾病^[1]。在肝硬化的早期,当肝细胞受到损伤时,可分泌多种因子激活肝星状细胞转化为成纤维细胞样细胞,对损伤进行修复;然而当肝细胞坏死修复持续存在时,则激活的肝星状细胞不断分泌细胞外基质并下调组织金属蛋白酶抑制剂的表达,逐渐形成肝纤维化,并最终引发肝硬化^[2]。因此,肝细胞受到外界因素损伤引发凋亡,是肝硬化的核心起始因素,也是推动因素之一^[3],而在肝细胞受损启动和推动肝纤维化乃至肝硬化及肝癌形成的过程中,转化生长因子 β (TGF- β) 是重要的调控因子^[4]。已有研究^[5-6]表明, TGF- β 可通过多种途径诱导肝细胞的凋亡。因此干预 TGF- β 对肝细胞的作用,可能是一种有效的治疗肝硬化的手段^[7]。

鳖甲消癥丸是一种具有知识产权^[8]的肇庆市中医院院内制剂(粤药制备字 Z20180012000),已在临床应用 30 余年,临床及实验研究^[9-11]已证明该药对病毒性肝炎、肝纤维化及肝硬化等有较好的临床疗效。为探索鳖甲消癥丸治疗肝硬化等肝病的机制,以提高该方在临床使用时的安全性及有效性,本研究利用 TGF- β 1 建立小鼠肝实质细胞株 AML12 凋亡模型,以鳖甲消癥丸原方的配方颗粒——活血消癥益气方为研究对象,探究其保护肝细胞的作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养 小鼠肝实质细胞 AML12 由中国科学院细胞库提供,培养方案参照细胞库要求,用 DMEM/F12(1:1)基础培养基加入 10% FBS、1% ITS 及 40 ng·mL⁻¹ 地塞米松配成,隔日换液,取对数生

长期细胞进行相关实验。

1.2 药物及试剂 醋鳖甲、醋莪术、醋三棱、西洋参、炙黄芪、醋白芍、炒白术、茯苓、生大黄、生甘草等中药配方颗粒,华润三九医药股份有限公司,批号分别为:1808001W、1809002C、1709001S、1809001S、1810001W、1809002C、1808001C、1810004C、1805001W、1712005S; DMEM/F12(1:1),美国 Hyclone 公司,批号:8120214;胎牛血清(FBS),浙江天杭生物科技股份有限公司,货号:13011-8611;胰岛素-转铁因子-硒补充剂(ITS),美国 Gibco 公司,货号:51500056;地塞米松,上海麦克林生化科技有限公司,货号:D829854;TGF- β 1,上海近岸科技有限公司,货号:CK33;CCK-8,上海 MedChemExpress 公司,货号:HY-K0301;抗荧光淬灭封片液(含 Hoechst 33342)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、裂解液、封闭液、ECL 化学发光试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为:P0133、C1062、S0033、P0010、P0028、P0013、P0252、P0018A;兔抗鼠 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Nrf2、 β -actin、Lamin B1 抗体及 Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) HRP 抗体,江苏亲科生物研究中心有限公司,货号:AF6139、AF0120、AF6311、AF0639、AF7018、AF5161、S0001。

1.3 主要仪器 SPARK 多功能酶标仪,瑞士 Tecan 公司;BX53 荧光正置显微镜及 IX73 荧光倒置显微镜,日本 Olympus 公司;CytoFLEX 流式细胞仪,美国 Beckman Coulter 公司;PowerPac 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;iBright FL1000 显影仪,美国 Invitrogen 公司。

1.4 药物配置 取配方颗粒按专利^[7]配方,按处方:醋鳖甲 1.5 g(相当于饮片 15 g,下同)、醋莪术

1.5 g(15 g)、醋三棱 1.5 g(15 g)、西洋参 4.5 g(15 g)、炙黄芪 1 g(10 g)、醋白芍 1.5 g(15 g)、炒白术 1.67 g(10 g)、茯苓 1 g(10 g)、生大黄 7.5 g(5 g)、生甘草 1.25 g(7.5 g)、人工麝香 0.5 g, 混合后, 溶解于 100 mL 超纯水中, 旋蒸制备浓缩混悬液后冻干获得均匀疏松的药物冻干粉, 1 g 冻干粉相当于 4.72 g 饮片。取 100 mg 冻干粉溶解于 10 mL 基础培养基中制备 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌后备用。

1.5 细胞活力检测 取对数生长期细胞消化重悬后, 按每孔 1×10^3 个细胞铺入 96 孔板, 无血清培养过夜; 然后换入含活血消癥益气方(0、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)的基础培养基, 或按空白对照组(给予基础培养基)、模型对照组(给予 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TGF- $\beta 1$)及活血消癥益气方低、中、高(0.1、0.2、 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)剂量组的分组换入相应培养基, 每孔 100 μL 。诱导 24 h 后, 换入含 CCK-8 的完全培养基, 置于培养箱中孵育 30 min, 用多功能酶标仪在 450 nm/620 nm(检测波长/参照波长)处检测吸光度。每组设置 6 个复孔, 实验重复 3 次。

1.6 细胞凋亡检测 取对数生长期细胞消化重悬后, 按每孔 1×10^5 个细胞铺入预先放置盖玻片的 6 孔板制备细胞爬片, 无血清培养过夜; 然后按空白对照组、模型对照组及活血消癥益气方低、中、高(0.1、0.2、 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)剂量组的分组换入相应培养基, 每孔 2 mL; 诱导 24 h 后, 取细胞爬片按照 Hoechst 33342 染色液的说明书进行封片染色, 在荧光显微镜下观察。每组设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。

取对数生长期细胞消化重悬后, 按每孔 1×10^5 个细胞铺入 6 孔板, 无血清培养过夜; 然后按上述分组换入相应培养基, 诱导 24 h 后, 收集细胞上清及细胞, 以 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min(离心半径 10 cm)收集细胞; 吸弃上清后, 加入配置好的 Annexin V-FITC 试剂, 避光 37°C 孵育 10 min, 最后利用流式细胞仪进行检测。每组设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.7 活性氧检测 取对数生长期细胞消化重悬后, 按每孔 1×10^5 个细胞铺入 6 孔板, 无血清培养过夜; 然后按“1.6”项中分组换入相应培养基, 诱导 4 h 后, 消化收集细胞, 以 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min(离心半径 10 cm)收集细胞; 吸弃上清后, 加入配置好的 ROS 检测试剂, 避光 37°C 孵育 15 min, 最后利用流式细胞仪进行检测。每组设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.8 蛋白印迹检测 取对数生长期细胞消化重悬后每孔 1×10^5 个细胞铺入 6 孔板, 无血清培养过夜; 然后

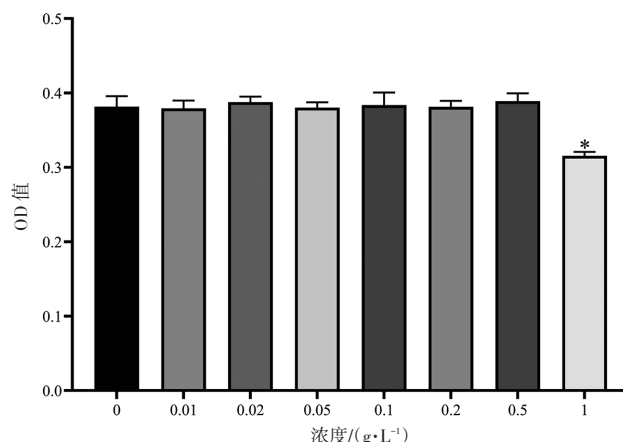
按“1.6”项中分组换入相应培养基, 诱导 24 h 后, 消化离心收集细胞, 裂解后定量; 然后加入上样缓冲液制备蛋白样品; 电泳分离后湿法转膜, 丽春红染色观察后封闭液封闭 1 h; 然后 4°C 过夜孵育一抗($1:1\,000$), 次日回收一抗并 PBST 荡洗 4 次后, 二抗($1:5\,000$)孵育 1 h, 再荡洗 4 次, 最终利用 ECL 发光液在显影仪中获得结果图像。实验重复 3 次。

1.9 统计学处理方法 图像数据利用 ImageJ 进行半定量处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 利用 SPSS 25.0 软件对数据进行分析, Prism 8 软件进行图表制作, 多组间差异采用 One-way ANOVA 进行分析并进行方差齐性检验。若方差齐, 组间两两比较使用 LSD 法, 若不齐, 则使用 Tamhane's T2 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 活血消癥益气方对 AML12 细胞的细胞活力的影响 由图 1 可以看出, 活血消癥益气方冻干粉在 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时, 细胞活力明显下降($P < 0.05$), 与 $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较, 差异有统计学意义。因此后续研究使用不超过 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的剂量进行。

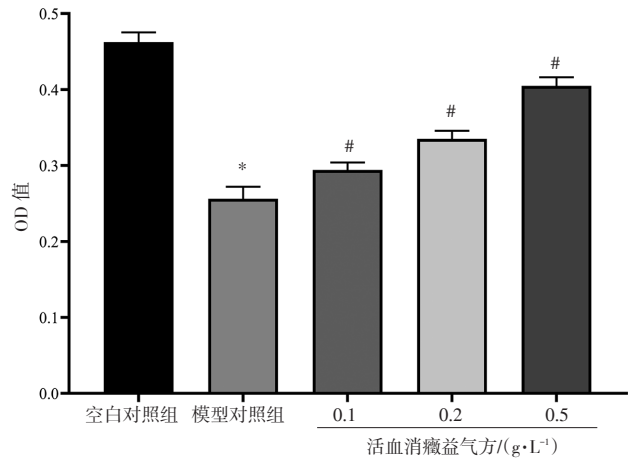
由图 2 可以看出, TGF- $\beta 1$ 诱导 24 h 后, 与空白对照组比较, 模型对照组细胞活力明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 证明在 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下, TGF- $\beta 1$ 对 AML12 细胞产生损伤。而与模型对照组比较, 各剂量的活血消癥益气方给药组能明显回升 TGF- $\beta 1$ 诱导的细胞活力降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明活血消癥益气方对 AML12 细胞产生保护作用。



注: 与 $0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较, * $P < 0.05$

图 1 活血消癥益气方对 AML12 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 1 Effect of Huoxue Xiaozheng Yiqi recipe on AML12 cells viability($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ，与模型对照组比较，# $P < 0.05$

图 2 活血消癥益气方对 AML12 细胞的保护作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

Figure 2 Protective effect of *Huoxue Xiaozheng Yiqi* recipe on AML12 cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.2 活血消癥益气方对 TGF- β 1 诱导的 AML12 细胞凋亡及凋亡蛋白的影响 已有研究^[4,6]表明，TGF- β 1 能有效诱导肝细胞凋亡，在介导肝脏损伤修复过程

中起关键作用。由图 3 及图 4 的结果可知，与空白对照组比较，模型对照组形态学上细胞出现明显的细胞核固缩及浓染，流式细胞术显示凋亡细胞比例明显高于空白对照组，差异有统计学意义($P < 0.05$)。而与模型对照组比较，活血消癥益气方各剂量组可剂量依赖性地明显改善形态学上的核固缩的细胞数，并减少凋亡细胞的占比，差异有统计学意义($P < 0.05$)。

同时，通过对凋亡通路蛋白表达量的研究发现(见图 5)，与空白对照组比较，模型对照组出现 Bcl-2 蛋白表达量减少，Bax 及 Caspase-3 蛋白表达明显升高等凋亡过程常见的蛋白表达情况变化，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而与模型对照组比较，活血消癥益气方各剂量组可明显下调 Caspase-3 的表达量，同时增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达并下调促凋亡蛋白 Bax 的表达，差异均有统计学意义($P < 0.05$)；可提高 Bcl-2/Bax 的比率，提高细胞抗凋亡能力，对抗 TGF- β 1 诱导的细胞凋亡。

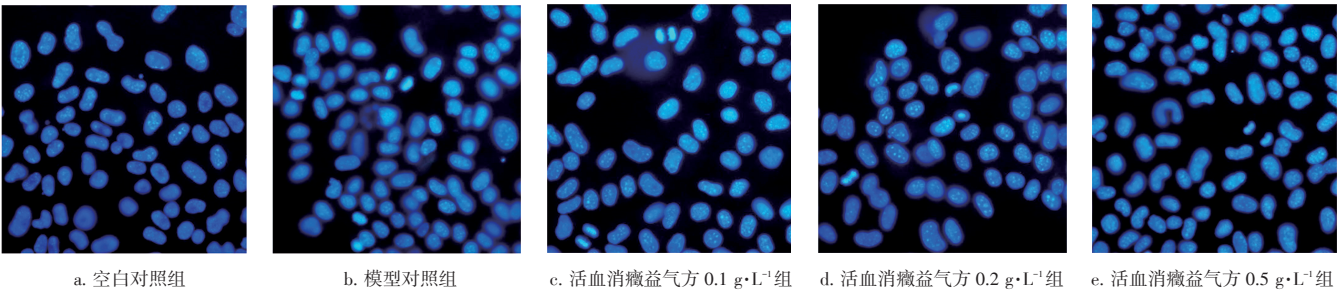
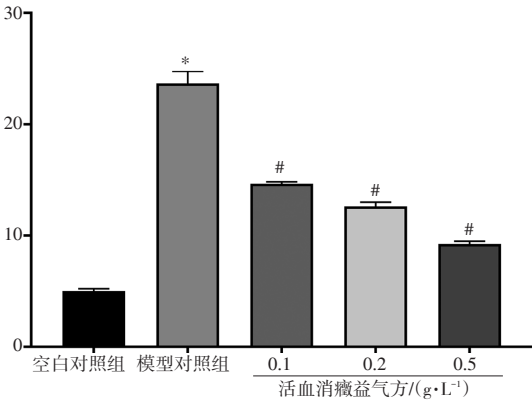
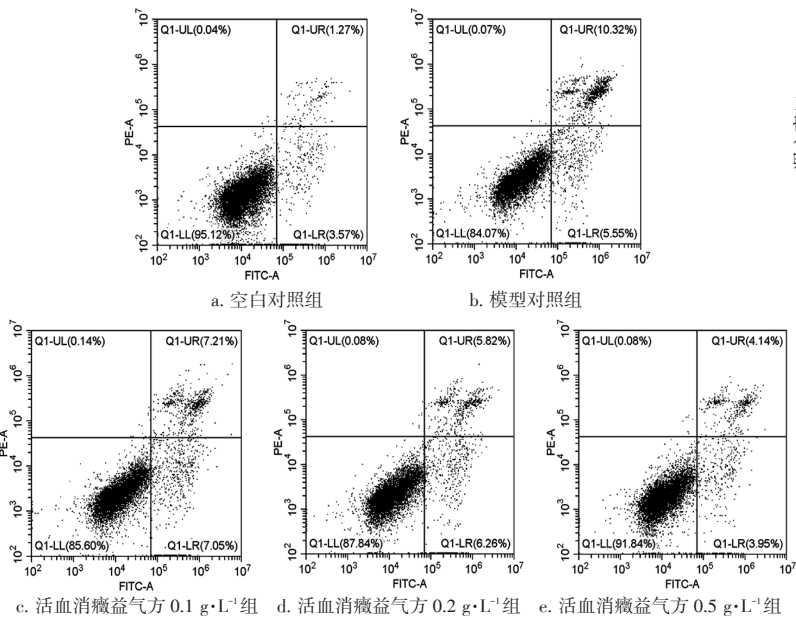


图 3 活血消癥益气方对 TGF- β 1 诱导的 AML12 细胞凋亡形态学的影响($\times 400$)

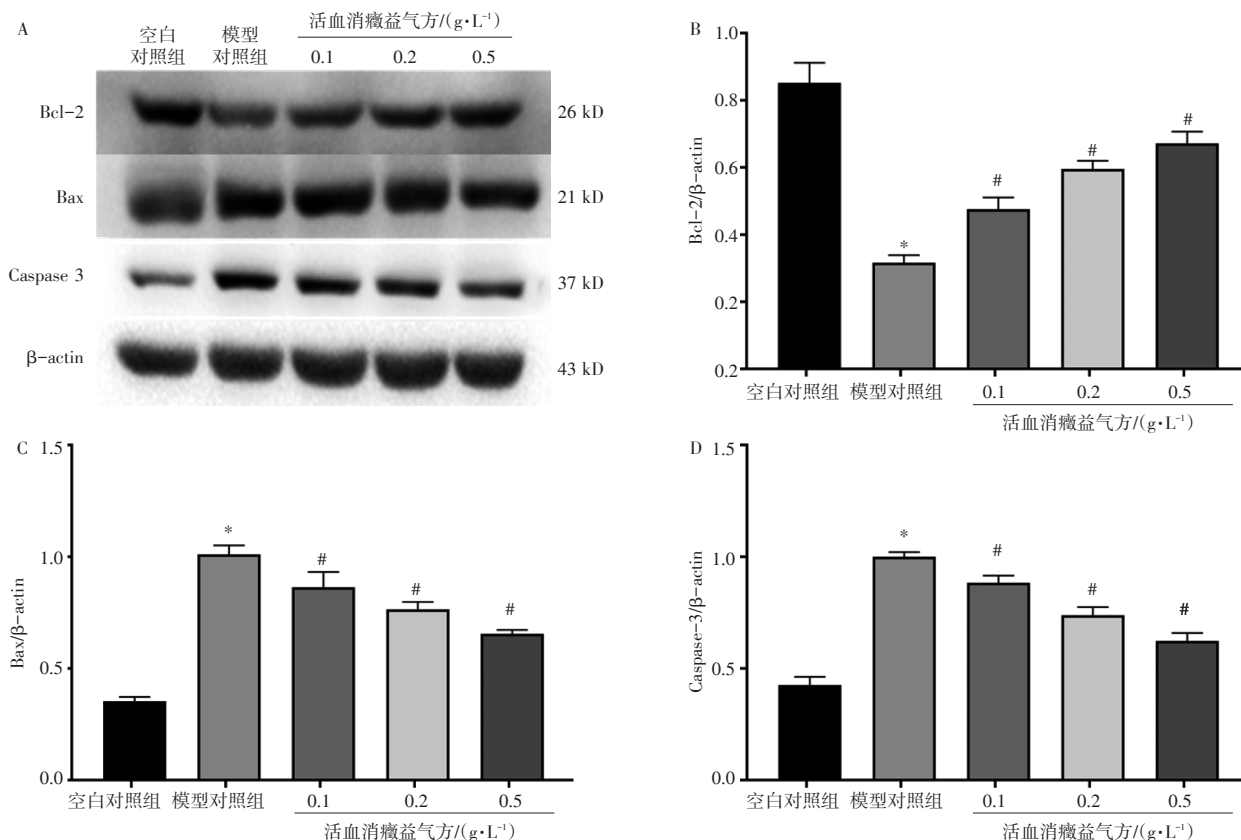
Figure 3 Effect of *Huoxue Xiaozheng Yiqi* recipe on TGF- β 1-induced morphological changes of apoptosis of AML12 cells($\times 400$)



注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型对照组比较，# $P < 0.05$

图 4 活血消癥益气方对 TGF- β 1 诱导的 AML12 细胞凋亡的保护作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 4 Protective effect of *Huoxue Xiaozheng Yiqi* recipe on TGF- β 1-induced apoptosis of AML12 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)



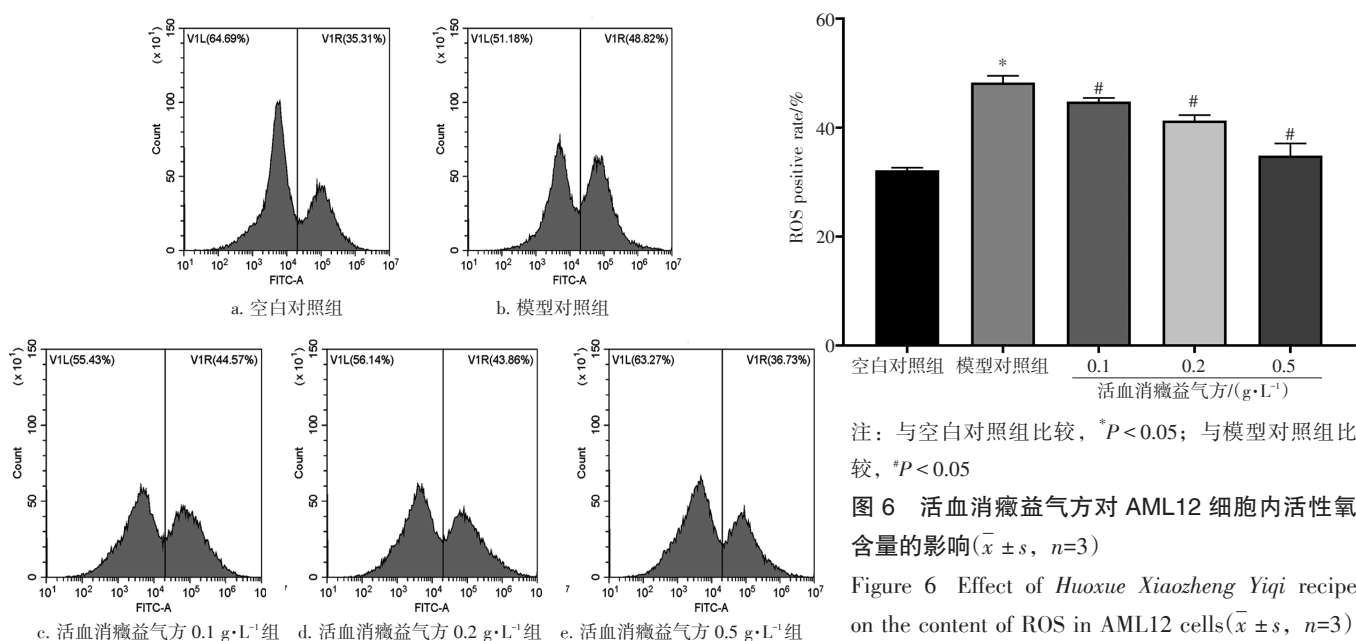
注：与空白对照比较，* $P < 0.05$ ；与模型对照组比较，# $P < 0.05$

图5 活血消癥益气方对凋亡相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 5 Effect of *Huoxue Xiaozheng Yiqi* recipe on apoptotic protein($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.3 活血消癥益气方对 AML12 细胞内活性氧及 NRF2 通路的影响 过往研究^[13-14]表明，活性氧参与了 TGF-β1 诱导肝细胞凋亡的过程，因此抗氧化应激是一种对抗 TGF-β1 诱导肝细胞凋亡的有效方法。如图 6 所示，与空白对照组比较，TGF-β1 诱导 4 h

后，模型对照组细胞内活性氧明显升高，差异有统计学意义($P < 0.05$)，AML12 细胞处于氧化应激状态。与模型对照组比较，活血消癥益气方各剂量组呈剂量依赖性地明显减少细胞内活性氧的含量，差异有统计学意义($P < 0.05$)。



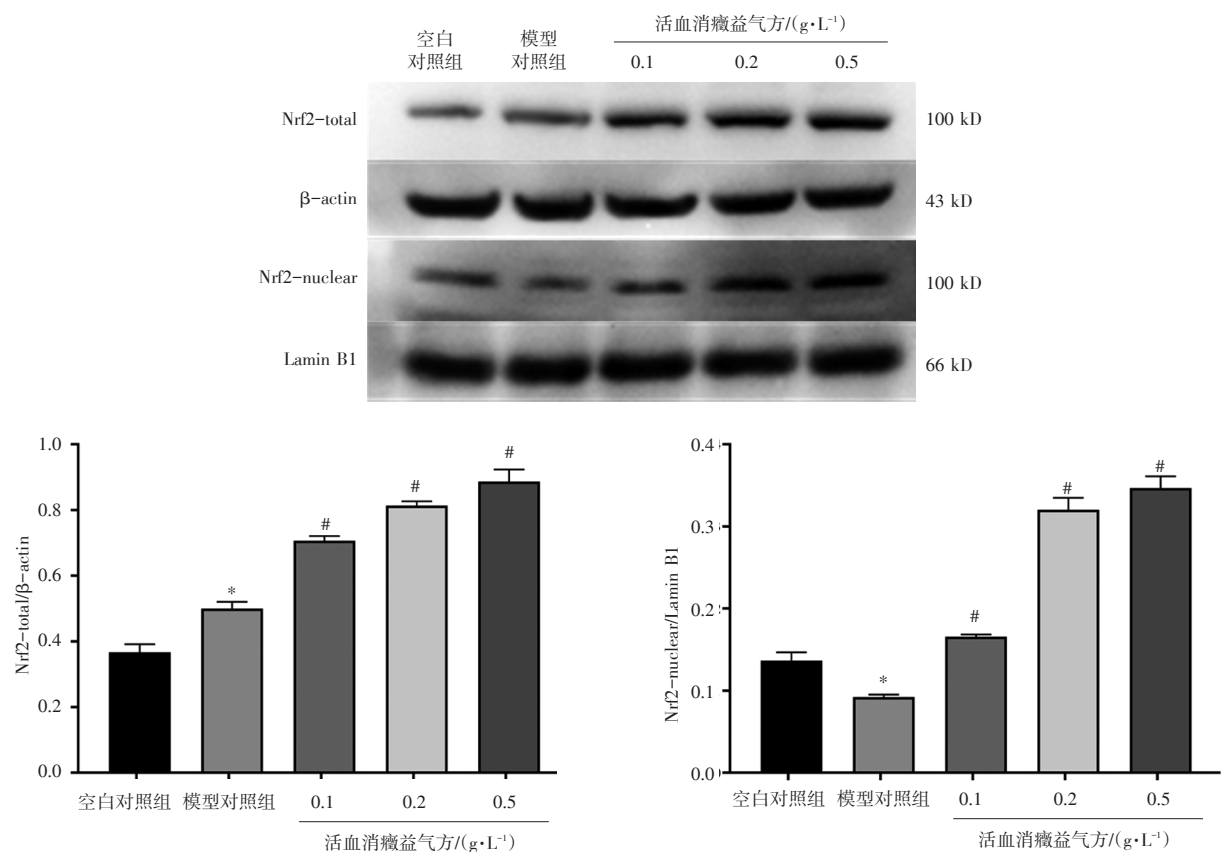
注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型对照组比较，# $P < 0.05$

图6 活血消癥益气方对 AML12 细胞内活性氧含量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 6 Effect of *Huoxue Xiaozheng Yiqi* recipe on the content of ROS in AML12 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

而从图 7 可以看出,与空白对照组比较,模型对照组细胞内 Nrf2 蛋白表达明显增加,但核转位则明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$),进一步说明细胞明显处于氧化应激状态。与模型对照组比较,活血消癥益气方各剂量组在明显地增加了 Nrf2

表达的同时明显促进其核转位,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Nrf2 核转位后,可诱导细胞内抗氧化应激相关蛋白的表达增加,有利于缓解细胞内氧化应激状态。



注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型对照组比较,* $P < 0.05$

图 7 活血消癥益气方对 Nrf2 蛋白表达及核转位的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 7 Effect of Huoxue Xiaozheng Yiqi recipe on Nrf2 protein expression and nuclear translocation($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3 讨论

研究^[14]表明,我国肝硬化患者在 1990—2016 年间,由 680 万人升高到约 1 200 万人。临床上诱导肝硬化的病因是多样的,常见的有病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性肝病及自身免疫性疾病等^[3]。在这众多的致病因素中,病毒性肝炎是最为常见的,但随着全球平均医疗水平的逐步提升,病毒性肝炎的占比逐年下降,同时酒精性及非酒精性肝病等因素的占比逐年提升^[15-16]。肝硬化作为我国常见慢性非传染性疾病之一,即使在近年国家实行药品零差价政策的前提下,仍对患者家庭及国家社会造成了巨大的经济和心理负担^[17-21]。在现有的临床治疗体系下,

尚无经有效验证的抗肝纤维化药物可供选择,在肝纤维化的治疗中,中医中药的使用具有重大的临床意义^[3]。活血消癥益气方已在临床上使用三十余年,对慢性肝病具有良好的疗效^[10-11],且已在动物实验上证实其抗纤维化的作用^[9],但潜在的机制尚未有报道。

肝脏损伤发生时,凋亡肝细胞 DNA 可以诱导肝星状细胞中 TGF- β 1 及胶原表达的升高^[22],启动并推进肝纤维化,并最终导致肝硬化及肝癌等重大疾病。而过度表达的 TGF- β 1 又可以通过 ROS/线粒体等途径持续诱导肝细胞凋亡^[13, 23-24],推进肝脏纤维化,并最终通过激活 EMT 途径诱导肝癌的发生^[25-26]。

因此,在肝细胞发生损伤的早中期,有效保护肝细胞对减少肝内 TGF- β 1 分泌,抑制肝星状细胞过度激活,对阻断肝纤维化、肝硬化及肝癌的发生发展具有一定治疗意义。

本研究通过体外建立 TGF- β 1 诱导的小鼠肝实质细胞 AML12^[27]建立损伤及氧化应激模型,以研究活血消癥益气方对肝细胞的保护作用及其潜在的机制。结果显示,5 ng·mL⁻¹的 TGF- β 1 分别诱导 4 h 及 24 h,能有效建立 AML12 细胞氧化应激及凋亡模型。受试浓度内的活血消癥益气方能有效地逆转 TGF- β 1 诱导的细胞活力下降,减少凋亡细胞的比例,并通过下调促凋亡的 Caspase-3 及 Bax 蛋白、上调抗凋亡的 Bcl-2 蛋白的表达以减少细胞凋亡的发生。上述结果说明,活血消癥益气方逆转 TGF- β 1 诱导肝细胞凋亡与下调 Caspase-3 表达及抑制线粒体相关凋亡有关。同时已有研究发现,TGF- β 1 诱导肝细胞凋亡时,Caspase 家族的作用和活性氧途径可能相互独立^[12],而细胞内核心抗氧化应激 Nrf2 通路在多种肝病中都具有明显的治疗潜力^[28-29]。本研究建立了 TGF- β 1 诱导 AML12 细胞活性氧升高的非损伤模型,研究药物是否能够通过 Nrf2 通路实现保护肝细胞的作用。结果显示,活血消癥益气方可明显增加细胞内 Nrf2 蛋白的表达量且明显增加其核转位,入核后的 Nrf2 可有效上调如 HO-1、SOD 及 GSH 等细胞抗氧化应激相关物质的表达^[28-29],进而减轻细胞内氧化应激,对抗 TGF- β 1 诱导氧化应激,保护肝细胞。

由本课题组前期研究^[10,30]可知,活血消癥益气方对正在形成的肝纤维化具有延缓纤维化的作用,而对已经形成的肝硬化、肝纤维化则具有一定的逆转作用。在肝损伤、肝纤维化及肝硬化乃至肝癌的发生发展过程中,TGF- β 1 是核心因子之一^[4,22,25],对肝细胞损伤、肝星状细胞激活、胶原蓄积等具有较强的推动作用。本研究证明了活血消癥益气方能有效对抗 TGF- β 1 对肝细胞的损伤作用,说明活血消癥益气可通过保护肝细胞实现对肝纤维化及肝硬化的预防及治疗作用。

综上所述,活血消癥益气方可增强 Nrf2 蛋白的表达及核转位以减轻细胞氧化应激,下调 Caspase-3 及 Bax 表达,同时上调 Bcl-2 的表达以抑制细胞凋亡,并通过上述两种机制对抗 TGF- β 1 诱导的

AML12 细胞凋亡,保护肝细胞,实现对肝纤维化及肝硬化等疾病的治疗作用。

参考文献:

- [1] 单姗,赵连晖,马红,等.肝硬化的定义、病因及流行病学[J].临床肝胆病杂志,2021,37(1):14-16.
- [2] ZHAN X L, JI Y, WANG Y D. Laparoscopic splenectomy for hypersplenism secondary to liver cirrhosis and portal hypertension[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(19): 5794-800.
- [3] 徐小元,丁惠国,李文刚,等.肝硬化诊治指南[J].实用肝脏病杂志,2019,22(6):770-786.
- [4] ZHANG K, ZHANG M, LUO Z, et al. The dichotomous role of TGF-beta in controlling liver cancer cell survival and proliferation[J]. J Genet Genomics, 2020, 47(9): 497-512.
- [5] LUEDDE T, KAPLOWITZ N, Schwabe R F. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance [J]. Gastroenterology, 2014, 147(4): 765-783.
- [6] 王春雷,黄志强,周宁新,等. TGF- β 1 诱导鼠肝细胞凋亡信号转导机制的研究[J]. 军医进修学院学报, 2005, 26(3): 175-177.
- [7] 连娇燕,虞必光. 转化生长因子 β 信号通路在肝细胞癌生物学行为中的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(24): 3874-3881.
- [8] 李力强,张贵锋,邹锦慧. 一种防治肝硬化食道静脉曲张破裂出血的中药组合物: CN10519453A[P]. 2015-12-30.
- [9] 黄胜英,吴铁,李力强,等. 鳖甲消癥丸抗大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 46(5): 56-58.
- [10] 李力强,黄胜英,宾建平,等. 鳖甲消癥丸预防肝硬变患者食道胃底静脉曲张破裂出血的临床研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2000, 10(S1): 75-77.
- [11] 李力强,黄胜英,宾建平,等. 鳖甲消癥丸治疗慢性乙型肝炎的临床观察[J]. 实用中医内科杂志, 1998, 13(3): 3-5.
- [12] HERRERA B, FERNANDEZ M, ALVAREZ A M, et al. Activation of caspases occurs downstream from radical oxygen species production, Bcl-xL down-regulation, and early cytochrome C release in apoptosis induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes[J]. Hepatology (Baltimore, Md.), 2001, 34(3): 548-556.
- [13] CARMONA- CUENCA I, RONCERO C, SANCHEZ P, et al. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity[J]. J Hepatol, 2008, 49(6): 965-976.
- [14] LI M, WANG Z Q, ZHANG L, et al. Burden of cirrhosis and other chronic liver diseases caused by specific etiologies in China, 1990-2016: findings from the global burden of disease study 2016 [J]. Biomed Environ Sci, 2020, 33(1): 1-10.
- [15] GBD 2017 Cirrhosis Collaborators. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease

- Study 2017[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(3): 245–266.
- [16] BAO X Y, XU B B, FANG K, et al. Changing trends of hospitalisation of liver cirrhosis in Beijing, China[J]. BMJ Open Gastroenterol, 2015, 2(1): e51.
- [17] 崔立君, 李洋, 王启昭, 等. 常见慢性病住院患者医疗费用影响因素分析[J]. 中国卫生经济, 2020, 39(7): 62–64.
- [18] 廖海宁. 药品零差价政策对慢乙肝相关疾病患者费用负担及诊疗情况影响研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- [19] 梁首勤, 李翔, 高飞, 等. 中年肝硬化患者自我感受负担与家庭功能的相关性分析[J]. 护士进修杂志, 2019, 34(11): 999–1001.
- [20] XIE L, YIN J, XIA R, et al. Cost-effectiveness of antiviral treatment after resection in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma patients with compensated cirrhosis[J]. Hepatology, 2018, 68(4): 1476–1486.
- [21] ESTES C, ANSTEE Q M, ARIAS-LOSTE M T, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030[J]. J Hepatol, 2018, 69(4): 896–904.
- [22] WATANABE A, HASHMI A, GOMES D A, et al. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9[J]. Hepatology (Baltimore, Md.), 2007, 46(5): 1509–18.
- [23] FABREGAT I, MORENO-CACERES J, SANCHEZ A, et al. TGF- β signalling and liver disease[J]. FEBS J, 2016, 283(12): 2219–2232.
- [24] SCHWABE R F, LUEDDDE T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(12): 738–752.
- [25] MORENO-CACERES J, FABREGAT I. Apoptosis in liver carcinogenesis and chemotherapy[J]. Hepat Oncol, 2015, 2(4): 381–397.
- [26] CHEN Y L, LV J, YE X L, et al. Sorafenib inhibits transforming growth factor β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis in mouse hepatocytes[J]. Hepatology, 2011, 53(5): 1708–1718.
- [27] WU J C, MERLINO G, FAUSTO N. Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor α [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(2): 674–678.
- [28] RAMOS-TOVAR E, MURIEL P. Molecular mechanisms that link oxidative stress, inflammation, and fibrosis in the liver[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(12): 1279.
- [29] GALICIA-MORENO M, LUCANO-LANDEROS S, MONROY-RAMIREZ H C, et al. Roles of Nrf2 in liver diseases: molecular, pharmacological, and epigenetic aspects[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(10): 980.
- [30] 吴晓玲, 李力强, 吴伟斌, 等. 活血消癥益气方对肝硬化模型大鼠肝功能与血管内皮功能及炎性因子的影响[J]. 实用中医杂志, 2021, 37(5): 719–723.

(编辑: 修春)

《中药新药与临床药理》“临床研究”栏目扩大征稿

为更全面地反映中医药学术研究成果, 打造高质量的中医药学术交流平台, 优化杂志学科内容结构及满足作者的需求, 本刊从2021年起加强对临床中药研究科研成果的报道。栏目论文基本要求:

1. 研究对象: 中药新药(各期临床研究)、新上市后的中药制剂、医院中药制剂及已有一定研究基础的中药汤剂等。

2. 研究类型: 临床随机对照试验。

本刊投稿网站: www.zyxy.com.cn。本刊只接受稿件采编系统投稿, 不接收纸质和Email投稿, 系统投稿不收取审稿费。

本刊入选核心期刊: 中国中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊(CSCD, 核心库)及RCCSE中国核心学术期刊。