

花旗松素对转化生长因子 β 1诱导肝星状细胞的激活作用及基因表达谱分析

李亚菊¹, 郭闪², 魏飞力² (1.首都医科大学附属北京友谊医院 医疗保健中心七区, 北京 100050; 2.首都医科大学附属北京佑安医院 北京肝病研究所, 北京 100069)

摘要: **目的** 探索花旗松素对肝星状细胞的激活作用, 通过转录组测序表征基因表达谱, 分析潜在的作用机制。 **方法** 在10 μ g/L转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导下, 体外培养大鼠肝星状细胞HSC-T6, 分别给予62.5 μ mol/L、125 μ mol/L和250 μ mol/L花旗松素处理, 在24 h、48 h分别加入CCK8试剂, 450 nm波长测定吸光度, 计算不同浓度和时间下的细胞增殖率。在24 h通过AnnexinV/7AAD染色, 流式细胞检测细胞凋亡。通过荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 法检测 α -平滑肌肌动蛋白 (alpha smooth muscle actin, α -SMA)、I型胶原 α 1链 (Collagen1A1) 及III型胶原 α 1链 (Collagen3A1) 基因mRNA相对表达量。通过Western blot检测 α -SMA、Collagen1A1蛋白表达量。通过转录组测序, 表征细胞基因表达谱并对差异基因进行基因本体论 (Gene Ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 功能注释及功能富集分析。 **结果** 花旗松素可显著抑制肝星状细胞增殖, 处理24 h, 125 μ mol/L组和250 μ mol/L组细胞增殖率分别为 (66.7 \pm 8.6) %和 (45.6 \pm 3.0) %。处理48 h, 125 μ mol/L组和250 μ mol/L组的细胞增殖率分别为 (60.5 \pm 2.9) %和 (43.9 \pm 1.9) %, 均显著低于模型组 (P 均 $<$ 0.05)。花旗松素可促进细胞凋亡, 处理24 h, 花旗松素62.5 μ mol/L组、125 μ mol/L组、250 μ mol/L组细胞凋亡率分别为 (8.537 \pm 0.445) %、(8.85 \pm 0.169) %及 (14.453 \pm 0.577) %, 均显著高于模型组 (P 均 $<$ 0.05)。处理24 h, 花旗松素125 μ mol/L组、250 μ mol/L组可抑制 α -SMA、Collagen1A1、Collagen3A1基因和 α -SMA、Collagen1A1蛋白表达 (P 均 $<$ 0.05)。差异基因表达表现为促肝纤维化发生相关基因下调, 如氧化型低密度脂蛋白受体1 (oxidized low-density lipoprotein receptor 1, *Olr1*)、人从状蛋白 (Plexin A4, *Plxna4*)、反应蛋白1 (Spondin 1, *Spon1*)、聚集蛋白 (*Agrn*) 等, 以及细胞抗氧化及死亡相关的基因上调, 如血红素加氧酶1 (heme oxygenase 1, *Hmox1*) 等。 **结论** 花旗松素对肝星状细胞具有抑制增殖、促进凋亡、抑制激活的作用, 推测其可能通过调控多项基因表达, 主要调控因子之间相互作用信号通路、卟啉与叶绿素代谢信号通路、Hedgehog信号通路和PPAR γ 信号通路发挥作用。

关键词: 花旗松素; 转化生长因子- β 1; 肝星状细胞; 转录组测序

Effect of taxifolin on transforming growth factor- β 1 induced hepatic stellate cell activation and gene expression profile analysis

Li Yaju¹, Guo Shan², Wei Feili² (1.No.7 Deptmenet, Medical Care Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2.Beijing You'an Hospital, Beijing Institute of Hepatology, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2023.03.006

基金项目: 北京市属医学科院所公益发展改革试点项目 (京医研2021-10)

通讯作者: 魏飞力 Email: wflcn@126.com

Abstract: Objective To investigate the effect of taxifolin on inhibiting the activation of hepatic stellate cells, characterize the gene expression profile through transcriptome sequencing and elucidate the potential mechanisms. **Methods** In presence of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), HSC-T6 were cultured in vitro and treated with 62.5 μ mol/L, 125 μ mol/L and 250 μ mol/L of taxifolin, CCK 8 reagent was added at 24 h and 48 h, the absorbance was measured at 450 nm, and cell proliferation rate was calculated at different concentrations and times. Cell apoptosis was detected by flow cytometry with AnnexinV/7AAD staining at 24 h. Relative mRNA expression levels of alpha smooth muscle actin (α -SMA), *Collagen1A1* and *Collagen3A1* were detected by quantitative fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). Relative protein expression levels of α -SMA and Collagen1A1 were detected by Western blot. The gene expression profile was characterized by transcriptome sequencing. The functional annotation and enrichment of differential genes were analyzed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). **Results** Taxifolin can inhibit the proliferation of hepatic stellate cells. At 24 h, the cell proliferation rates of taxifolin 125 μ mol/L group and taxifolin 250 μ mol/L group were $(66.7 \pm 8.6)\%$ and $(45.6 \pm 3.0)\%$, respectively; at 48 h, the cell proliferation rates of taxifolin 125 μ mol/L group and taxifolin 250 μ mol/L group were $(60.5 \pm 2.9)\%$ and $(43.9 \pm 1.9)\%$, respectively, which were significantly lower than those of model group (all $P < 0.05$). Taxifolin can promote the apoptosis rates of hepatic stellate cell. At 24 h, the apoptosis rates of taxifolin 62.5 μ mol/L, taxifolin 125 μ mol/L group and taxifolin 250 μ mol/L group were $(8.537 \pm 0.445)\%$, $(8.85 \pm 0.169)\%$ and $(14.453 \pm 0.577)\%$, respectively, which were significantly higher than those of model group (all $P < 0.05$). At 24 h, the expression of α -SMA, *Collagen1A1*, *Collagen3A1* gene and α -SMA and Collagen1A1 protein were inhibited by 125 μ mol/L and 250 μ mol/L taxifolin (all $P < 0.05$). Differential gene expression were characterized by downregulation of genes related to liver fibrosis, such as oxidized low-density lipoprotein receptor1 (*Olr1*), Plexin A4 (*Plxna4*), Spondin 1 (*Spon1*), *Agrn* and upregulation of genes related to antioxidant activity and cell death, such as heme oxygenase 1 (*Hmox1*) etc. **Conclusions** Taxifolin could inhibit HSC-T6 proliferation, promote apoptosis and inhibit cell activation through the interaction signal pathway between influencing factors, porphyrin and chlorophyll metabolism signal pathway, Hedgehog signal pathway and PPAR γ signal pathway.

Key words: Taxifolin; Transforming growth factor- β 1; Hepatic stellate cells; Transcriptome sequencing

肝纤维化是病毒性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、胆道疾病、自身免疫性肝病、代谢疾病及毒物暴露接触等多种原因引起的慢性肝损伤的共同病理学过程,最终导致肝硬化失代偿及肝癌的发生,因此有效逆转肝纤维化至关重要^[1,2]。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化和增殖是肝纤维化发生发展的中心环节,是肝纤维化时细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要来源^[3-5]。一旦HSC激活,便进入纤维化的延续阶段,通过炎性介质、生长因子以及细胞因子持续作用维持细胞的活化表型,如细胞增殖性、趋化性、纤维化样改变,ECM的沉积增加、收缩力改变、疤痕形成、基质降解改变等^[6-8]。

因此,抑制HSC增殖、活化,诱导纤维蛋白溶解酶的产生可作为有效的抗肝纤维化策略^[9-11]。花旗松素在很多疾病中具有药物治疗的潜在开发价值,目前主要应用于癌症、心血管疾病和肝脏疾病方面^[12-14]。本研究在转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导下,通过体外培养大鼠肝星状细胞HSC-T6,并给予不同浓度花旗松素处理,探索花旗松素对HSC激活的作用,同时通过转录组测序,表征基因表达谱改变,分析其中潜在的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂 大鼠肝星状细胞HSC-T6由首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心惠赠。花旗松

素(中国食品药品检定研究院), TGF- β 1因子(美国peproTech公司), Annexin V/7-AAD细胞凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司), PrimeScriptTM1st Strand cDNA Synthesis Kit(宝生物工程(大连)有限公司), RIPA蛋白裂解液(北京博迈德生物科技有限公司), α -平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α -SMA)抗体、I型胶原 α 1链(Collagen1A1)抗体(美国CST公司), zymoBIOMICS RNA Miniprep Kit [简石生物技术(浙江)有限公司], VAHTS® Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina(南京诺唯赞科技有限公司), 流式细胞仪(美国BD公司), ViiA7TM型荧光定量PCR仪(美国Life-Tech公司), 垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司), 荧光定量PCR检测引物由上海生工生物工程有限公司合成, 序列见表1。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 以DMEM培养基培养HSC-T6细胞, 细胞置于5% CO₂的孵育箱内37℃培养, 待细胞生长至80%~90%密度时, 按1:3传代, 根据不同实验需要准备不同规格细胞培养板。

1.2.2 CCK8检测细胞增殖 模型组培养基为含0.1% DMSO的DMEM, 以含0.1% DMSO的DMEM培养基稀释花旗松素, 浓度分别为62.5 μ mol/L、125 μ mol/L和250 μ mol/L, 上述组每孔加入10 μ g/L的TGF- β 1因子, 对照组为仅含0.1% DMSO的DMEM培养基。37℃培养箱中培养, 每孔分别在24 h、48 h加入CCK8试剂, 450 nm测定吸光度, 计算细胞增殖率。

1.2.3 AnnexinV/7AAD染色流式细胞检测细胞凋亡 按照1.2.2方式处理细胞, 37℃培养箱中培养。在24 h时利用流式细胞分析法检测细胞凋亡。收集细胞后, 500 \times g、4℃离心5 min后弃上清; 冰PBS洗细胞1次, 重悬。400目筛网过滤计数, 再次离心弃上清, 将细胞调为1 \times 10⁶/ml取100 μ l细胞悬液加入5 μ l Annexin 和2.5 μ l 7AAD染液, 轻轻振荡混匀, 避

光10 min。加入400 μ l 1 \times binding buffer轻轻振荡, 30 min内进行流式细胞定量分析。

1.2.4 荧光定量PCR检测HSC-T6细胞 α -SMA、Collagen1A1、Collagen3A1基因表达 按照1.2.2方式处理细胞, 在24 h时使用trizol法提取细胞总RNA, 根据试剂盒说明书进行反转录制备cDNA。使用荧光定量PCR仪检测GAPDH、 α -SMA、Collagen1A1、Collagen3A1 mRNA的表达, 扩增条件为94℃预变性5 min, 进入循环, 94℃变性20 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸45 s, 共40个循环, 4℃2 min, 以GAPDH为内参基因, 用2^{- $\Delta\Delta$ ct}法计算目的基因表达量, 引物序列见表1。

1.2.5 Western blot检测细胞 α -SMA、Collagen1A1蛋白表达 按照1.2.2方式处理细胞, 培养24 h, 参考说明书提取对应孔细胞蛋白。采用Western blot检测肝组织GAPDH、 α -SMA、Collagen1A1蛋白表达量变化。

1.2.6 RNAseq转录组测序 测序由北京贝瑞和康生物技术有限公司完成。简要过程如下: 利用zyzoBIOMICS RNA Miniprep Kit从细胞样品中提取总RNA, 质检合格后, 通过VAHTS® Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina进行建库, 最后基于Illumina Novaseq 6000 (Illumina, 美国)测序平台进行测序, 每个样品数据量为6 G。利用DESeq2软件对两组样本进行样本间基因的表达差异分析, 鉴定出样本间差异表达的基因。对获得的差异表达基因进行GO和KEGG功能注释及功能富集研究, 获得该基因集中的基因主要具有哪些功能或主要参与哪些代谢通路。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行统计学分析, 细胞增殖率、细胞凋亡率、肝纤维化相关基因及蛋白的相对表达均为正态分布的计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD-*t*检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 荧光定量PCR检测引物序列

名称	引物序列(5'-3')	GenBank登录号
GAPDH	上游: GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	NM_017008.3
	下游: ATGGTGGTGAAGACGGTA	
α -SMA	上游: CCGAGATCTCACC GACTACC	NM_031004
	下游: TCCAGAGCGACATAGCACAG	
Collagen1A1	上游: CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT	NM_053304
	下游: GCAGCTGACTTCAGGGAATG	
Collagen3A1	上游: CTTGCCCTCTACAACCAACA	NM_032085
	下游: CTTGCGACCCACGTAAGTAGA	

2 结果

2.1 花旗松素对HSC-T6增殖的抑制作用 花旗松素处理24 h和48 h, 模型组与对照组相比细胞增殖率升高, 但差异无统计学意义 ($t = -0.402$ 、 $P = 0.708$; $t = -1.034$ 、 $P = 0.359$)。不同浓度花旗松素能够抑制细胞增殖, 在24 h, 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、125 $\mu\text{mol/L}$ 组和250 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞增殖率分别为 (93.1 ± 4.2) %、(66.7 ± 8.6) %和 (45.6 ± 3.0) %。在48 h, 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、125 $\mu\text{mol/L}$ 组和250 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞增殖率分别为 (89.6 ± 8.5) %、(60.5 ± 2.9) %和 (43.9 ± 1.9) %。与模型组比较, 在24 h和48 h, 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下细胞增殖抑制率差异无统计学意义 ($t = 1.357$ 、 $P = 0.250$; $t = 1.764$ 、 $P = 0.162$) ; 处理24 h, 125 $\mu\text{mol/L}$ 和250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 细胞增殖均受到显著抑制, 差异具有统计学意义 ($t = 6.802$ 、 $P = 0.002$; $t = 30.779$ 、 $P < 0.001$)。处理48 h, 125 $\mu\text{mol/L}$ 和250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 细胞增殖均受到显著抑制, 差异具有统计

学意义 ($t = 19.066$ 、 $P < 0.001$; $t = 32.685$ 、 $P < 0.001$) , 见表2、图1。

2.2 花旗松素对HSC-T6凋亡的影响 花旗松素处理24 h, 对照组、模型组、花旗松素62.5 $\mu\text{mol/L}$ 组、花旗松素125 $\mu\text{mol/L}$ 组、花旗松素250 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率分别为 (5.637 ± 0.685) %、(2.463 ± 0.378) %、(8.537 ± 0.445) %、(8.85 ± 0.169) %及 (14.453 ± 0.577) %。与对照组比较, 模型组细胞凋亡显著降低 ($t = 7.002$ 、 $P = 0.002$)。随花旗松素浓度增加, 细胞增殖下降, 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 、125 $\mu\text{mol/L}$ 和250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下与对照组的差异均具有统计学意义 ($t = -18.010$ 、 $P < 0.001$; $t = -23.839$ 、 $P < 0.001$; $t = -30.095$ 、 $P < 0.001$) , 见图2。

2.3 花旗松素对HSC-T6 α -SMA、Collagen1A1及Collagen3A1基因激活的抑制作用 与对照组比较, 模型组 α -SMA、Collagen1A1及Collagen3A1 mRNA相对表达量升高, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05) ; 花旗松素处理24 h, α -SMA、Collagen1A1

表2 各组 HSC-T6 细胞增殖率 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	24 h	48 h
对照组	99.7 \pm 2.90	100.3 \pm 0.5
模型组	100.4 \pm 0.6	101.7 \pm 2.4
花旗松素62.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	93.1 \pm 4.2	89.6 \pm 8.5
花旗松素125 $\mu\text{mol/L}$ 组	66.7 \pm 8.6	60.5 \pm 2.9
花旗松素250 $\mu\text{mol/L}$ 组	45.6 \pm 3.0	43.9 \pm 1.9
F值	74.395	106.694
P值	< 0.001	< 0.001

注: 24 h时, 与对照组相比, 模型组 $t = -0.402$, $P = 0.708$, 花旗松素 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 8.901$, $P = 0.001$, 花旗松素 125 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 6.313$, $P = 0.003$, 花旗松素 250 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 22.191$, $P < 0.001$; 与模型组相比, 花旗松素 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 1.357$, $P = 0.250$, 花旗松素 125 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 6.802$, $P = 0.002$, 花旗松素 250 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 30.779$, $P < 0.001$; 与花旗松素 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 花旗松素 125 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 1.161$, $P = 0.310$, 花旗松素 250 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 9.155$, $P < 0.001$; 与花旗松素 125 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 花旗松素 250 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 4.037$, $P = 0.016$; 48 h时, 与对照组相比, 模型组 $t = -1.034$, $P = 0.359$, 花旗松素 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 6.244$, $P = 0.003$, 花旗松素 125 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 23.562$, $P < 0.001$, 花旗松素 250 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 49.403$, $P < 0.001$; 与模型组相比, 花旗松素 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 1.764$, $P = 0.162$, 花旗松素 125 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 19.066$, $P < 0.001$, 花旗松素 250 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 32.685$, $P < 0.001$; 与花旗松素 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 花旗松素 125 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 1.764$, $P = 0.152$, 花旗松素 250 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 5.121$, $P = 0.007$; 与花旗松素 125 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 花旗松素 250 $\mu\text{mol/L}$ 组 $t = 8.324$, $P = 0.001$ 。

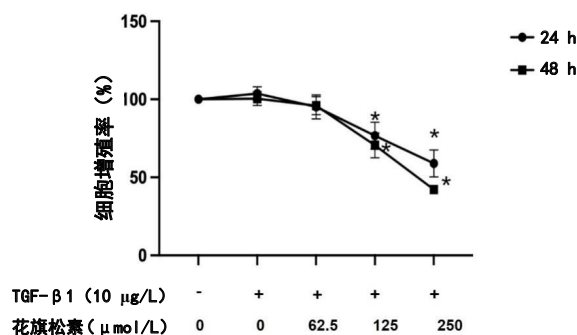


图1 花旗松素对HSC-T6增殖的抑制作用

注: *表示与模型组比较, 处理24 h和48 h, 62.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下细胞增殖抑制率差异无统计学意义 ($t = 1.357$ 、 $P = 0.250$; $t = 1.764$ 、 $P = 0.162$) ; 125 $\mu\text{mol/L}$ 和250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 细胞增殖均受到显著抑制, 差异具有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

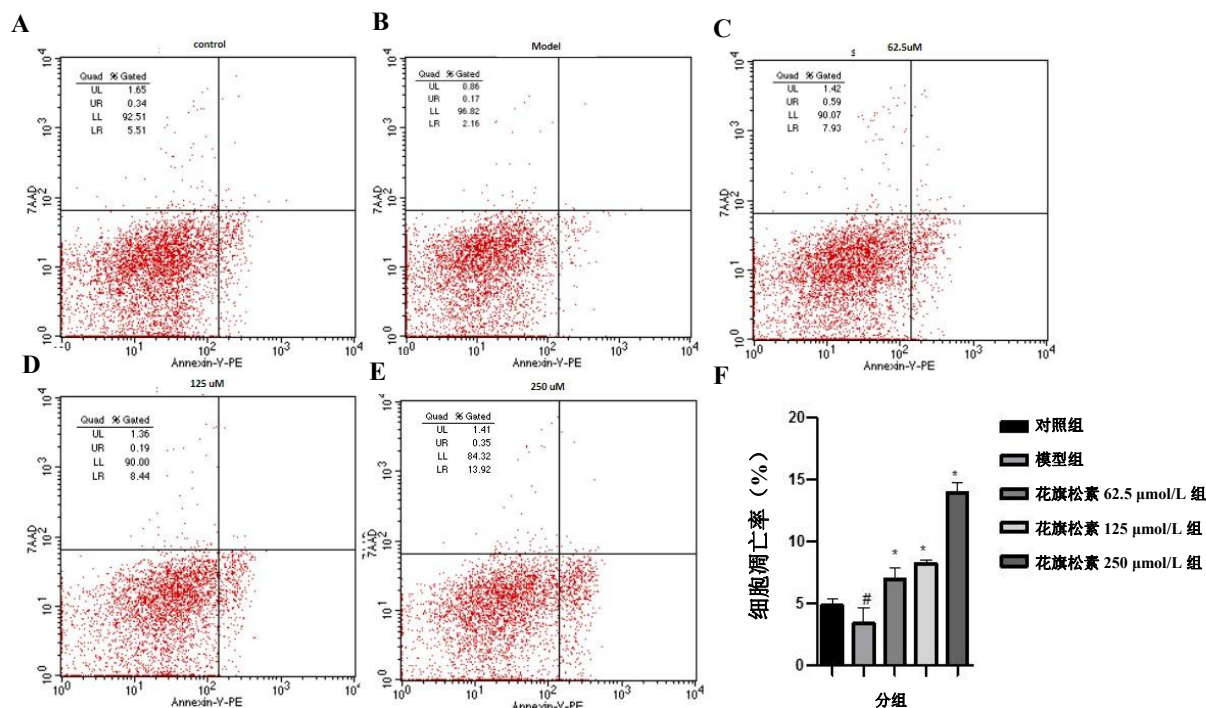


图2 AnnexinV/7AAD染色流式细胞检测细胞凋亡

注: A 为对照组; B 为模型组; C 为花旗松素 62.5 μmol/L 组; D 为花旗松素 125 μmol/L 组; E 为花旗松素 250 μmol/L 组; F 为各组细胞凋亡率, 整体比较, $F=243.197$, $P<0.001$, 与对照组相比, 模型组 $t=7.002$, $P=0.002$, 花旗松素 62.5 μmol/L 组 $t=-6.146$, $P=0.004$, 花旗松素 125 μmol/L 组 $t=-7.559$, $P=0.002$, 花旗松素 250 μmol/L 组 $t=-17.042$, $P<0.001$; 与模型组相比, 花旗松素 62.5 μmol/L 组 $t=-18.010$, $P<0.001$, 花旗松素 125 μmol/L 组 $t=-23.839$, $P<0.001$, 花旗松素 250 μmol/L 组 $t=-30.095$, $P<0.001$; 与花旗松素 62.5 μmol/L 组相比, 花旗松素 125 μmol/L 组 $t=-1.043$, $P=0.356$, 花旗松素 250 μmol/L 组 $t=-14.057$, $P<0.001$; 与花旗松素 125 μmol/L 组相比, 花旗松素 250 μmol/L 组 $t=-15.238$, $P<0.001$; # 表示模型组与对照组比较, 凋亡比例降低 ($P<0.05$); * 表示花旗松素处理组与模型组比较, 凋亡比例升高 ($P<0.05$)。

及 *Collagen3A1* mRNA 表达均随花旗松素浓度增加而下降, 其中 α -SMA、*Collagen1A1* 及 *Collagen3A1* mRNA 相对表达量在 125 μmol/L 和 250 μmol/L 时差异均有统计学意义 (P 均 <0.05), 见表 3、图 3。

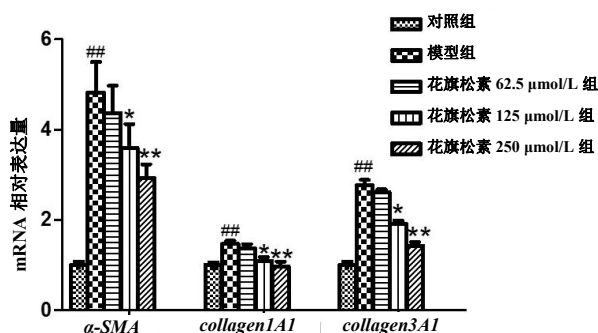
2.4 花旗松素对肝纤维化相关蛋白表达的影响 与对照组比较, 模型组 α -SMA 及 *Collagen1A1* 蛋白表达升高, 但差异无统计学意义 ($t=-0.452$, $P=0.675$; $t=-0.263$, $P=0.806$)。花旗松素处理组 α -SMA 及 *Collagen1A1* 表达量随药物浓度增加而下降, 与模型组比较, α -SMA 蛋白和 *Collagen1A1* 蛋白相对表达量在 125 μmol/L 组和 250 μmol/L 组差异均有统计学意义 (P 均 <0.05), 见表 4、图 4。

2.5 基因表达谱及差异基因分析 在 125 μmol/L 花旗松素处理 24 h, 与模型组相比, 130 个 GO_terms 被富集, 其中包括 GO_BP 99 个, GO_CC 13 个, GO_MF 18 个。GO_BP 主要影响细胞转录、死亡、对过氧化氢反应、对药物反应、淋巴细胞黏附、肝脏发育、JNK 信号分子负调控、细胞内信号传导、器官再生等; GO_CC 主要影响细胞质、细胞核、细胞外区域、细胞外空间、核小体等; GO_MF 主要影响 DNA 结合、RNA 结合、酶结合、ATP 结合、受

体活性等, 分别选取了不同模块中排在前 10 位的进行展示, 见图 5。差异基因 KEGG 通路富集分析显示其主要通路富集在酮的合成与降解、Hedgehog 信号通路、PPAR γ 信号转导通路、卟啉与叶绿素代谢等方面, 见图 6。前 10 项差异基因中, 5 条基因通过 GO 分析以及 KEGG 注释, 与 HSC-T6 激活有较强关系, 包括氧化型低密度脂蛋白受体 1 (Oxidized low-density lipoprotein receptor 1, *Olr1*)、人从状蛋白 (Plexin A4, *Plxna4*)、反应蛋白 1 (Spondin 1, *Spon1*)、聚集蛋白 (*Agrn*) 及血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, *Hmox1*)。Olr1、Plxna4、Spon1、Agrn 等 4 个基因发生下调, 这些基因功能主要与炎症反应、对过氧化氢的反应、ECM、细胞黏附、蛋白质结合等有关, Hmox1 基本表达上调, 其功能主要与血管生成、血红素加氧酶、血红素氧化、细胞死亡、DNA 损伤反应、信号转导导致的细胞凋亡、对过氧化氢的反应、DNA 结合负调控、序列特异性 DNA 结合转录因子活性的负调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录、对氧化反应的调节作用、血管生成的正调节、平滑肌细胞增殖的负性调控等有关, 见表 5。

表3 各组 HSC-T6 α -SMA、Collagen1A1 及 Collagen3A1 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA	Collagen1A1	Collagen3A1
对照组	1.030 \pm 0.095	1.020 \pm 0.095	0.983 \pm 0.100
模型组	4.727 \pm 0.329	1.440 \pm 0.066	3.107 \pm 0.100
花旗松素 62.5 μ mol/L 组	4.447 \pm 0.290	1.340 \pm 0.072	2.947 \pm 0.068
花旗松素 125 μ mol/L 组	4.030 \pm 0.151	1.073 \pm 0.083	2.357 \pm 0.100
花旗松素 250 μ mol/L 组	3.257 \pm 0.136	0.943 \pm 0.047	1.803 \pm 0.099
F值	136.505	24.958	154.719
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001
对照组vs模型组	-18.676, < 0.001	-6.284, 0.003	-25.834, < 0.001
对照组vs花旗松素 62.5 μ mol/L 组 (t值、P值)	-19.391, < 0.001	-4.635, 0.010	-27.984, < 0.001
对照组vs花旗松素 125 μ mol/L 组 (t值、P值)	-29.093, < 0.001	-7.30, 0.506	-16.750, < 0.001
对照组vs花旗松素 250 μ mol/L 组 (t值、P值)	-23.201, < 0.001	1.247, 0.280	-10.077, 0.001
模型组vs花旗松素 62.5 μ mol/L 组 (t值、P值)	1.105, 0.331	1.777, 0.150	2.281, 0.085
模型组vs花旗松素 125 μ mol/L 组 (t值、P值)	3.331, 0.029	5.992, 0.004	9.148, 0.001
模型组vs花旗松素 250 μ mol/L 组 (t值、P值)	7.146, 0.002	10.643, < 0.001	16.016, < 0.001
花旗松素 62.5 μ mol/L 组vs花旗松素 125 μ mol/L 组 (t值、P值)	2.208, 0.092	4.191, 0.014	8.438, 0.001
花旗松素 62.5 μ mol/L 组vs花旗松素 250 μ mol/L 组 (t值、P值)	6.436, 0.003	7.969, 0.001	16.522, < 0.001
花旗松素 125 μ mol/L 组vs花旗松素 250 μ mol/L 组 (t值、P值)	6.588, 0.003	2.352, 0.078	6.817, 0.002

图3 TGF β 1 (10 μ g/L) 刺激下花旗松素抑制 HSC-T6 mRNA 表达

注: ## 表示模型组与对照组比较, mRNA 表达升高 (P 均 < 0.01); * 表示花旗松素处理组与模型组比较, mRNA 表达降低 (P 均 < 0.05); ** 表示花旗松素处理组与模型组比较, mRNA 表达降低 (P 均 < 0.01)。

表4 各组 HSC-T6 α -SMA 和 Collagen1A1 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA	Collagen1A1
对照组	0.656 \pm 0.075	0.616 \pm 0.095
模型组	0.676 \pm 0.012	0.633 \pm 0.055
花旗松素 62.5 μ mol/L 组	0.447 \pm 0.040	0.540 \pm 0.050
花旗松素 125 μ mol/L 组	0.413 \pm 0.025	0.427 \pm 0.050
花旗松素 250 μ mol/L 组	0.420 \pm 0.087	0.397 \pm 0.032
F值	14.954	4.384
P值	< 0.001	0.044

注: 对于 α -SMA, 与对照组相比, 模型组 $t = -0.452$, $P = 0.675$, 花旗松素 62.5 μ mol/L 组 $t = 2.220$, $P = 0.091$, 花旗松素 125 μ mol/L 组 $t = 5.282$, $P = 0.006$, 花旗松素 250 μ mol/L 组 $t = 3.550$, $P = 0.024$; 与模型组相比, 花旗松素 62.5 μ mol/L 组 $t = 1.957$, $P = 0.098$, 花旗松素 125 μ mol/L 组 $t = 16.473$, $P < 0.001$, 花旗松素 250 μ mol/L 组 $t = 5.055$, $P = 0.034$; 与花旗松素 62.5 μ mol/L 组相比, 花旗松素 125 μ mol/L 组 $t = 4.851$, $P = 0.008$, 花旗松素 250 μ mol/L 组 $t = 2.283$, $P = 0.084$; 与花旗松素 125 μ mol/L 组相比, 花旗松素 250 μ mol/L 组 $t = -0.127$, $P = 0.905$; 对于 Collagen1A1, 与对照组相比, 模型组 $t = -0.263$, $P = 0.806$, 花旗松素 62.5 μ mol/L 组 $t = 1.236$, $P = 0.284$, 花旗松素 125 μ mol/L 组 $t = 0.442$, $P = 0.183$, 花旗松素 250 μ mol/L 组 $t = 2.257$, $P = 0.087$; 与模型组相比, 花旗松素 62.5 μ mol/L 组 $t = 2.173$, $P = 0.095$, 花旗松素 125 μ mol/L 组 $t = 2.708$, $P = 0.044$, 花旗松素 250 μ mol/L 组 $t = 3.887$, $P = 0.018$; 与花旗松素 62.5 μ mol/L 组相比, 花旗松素 125 μ mol/L 组 $t = 1.437$, $P = 0.056$, 花旗松素 250 μ mol/L 组 $t = 3.578$, $P = 0.023$; 与花旗松素 125 μ mol/L 组相比, 花旗松素 250 μ mol/L 组 $t = 0.917$, $P = 0.411$ 。

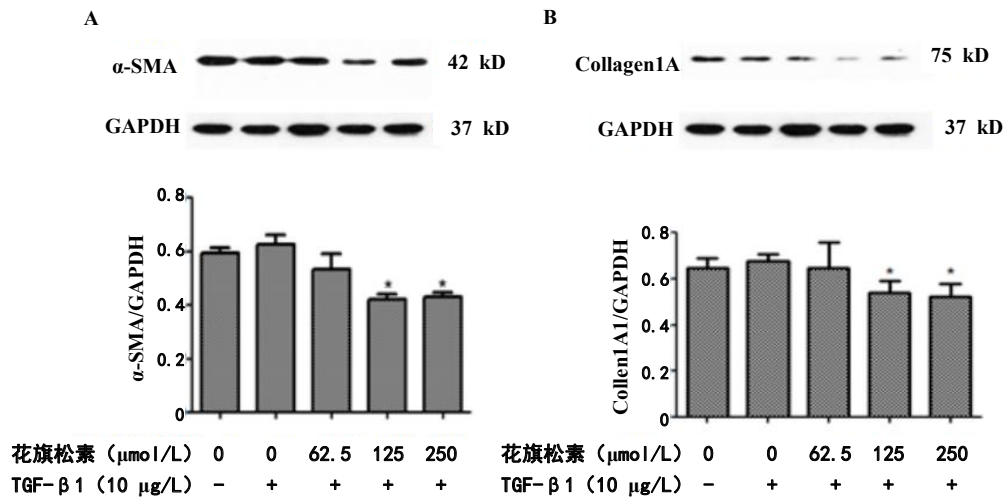


图4 花旗松素抑制 HSC-T6 肝纤维化相关蛋白 α-SMA 及 Collagen1A1 表达

注: A 为 α-SMA 蛋白表达情况, B 为 Collagen1A1 蛋白表达情况, * 表示花旗松素处理组 α-SMA 及 Collagen1A1 蛋白表达降低, 与模型组比较, 在 125 μmol/L 组和 250 μmol/L 组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

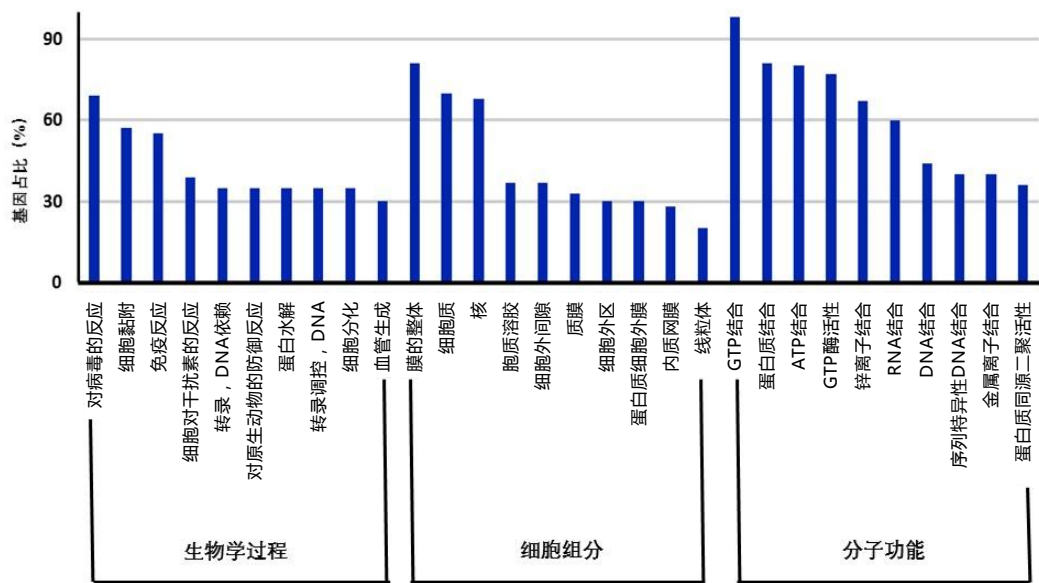


图5 与模型组比较, 花旗松素处理细胞 24 h 差异基因 GO 富集性分析

表5 前5项差异基因列表及功能注释

基因识别符	基因名称	表达状态	GO_条目注释	KEGG
XLOC_024179	<i>Olr1</i>	下调	胞外区域、炎症反应、细胞死亡、脂蛋白代谢过程、对过氧化氢的反应	PPAR γ 信号转导通路
XLOC_023554	<i>Plxna4</i>	下调	受体活性、蛋白质结合	轴突导向
XLOC_001301	<i>Spon1</i>	下调	蛋白质的ECM、细胞黏附	黏附斑
XLOC_026437	<i>Aggrn</i>	下调	细胞板、细胞外空间、神经元凋亡的正调控、RNA聚合酶II启动子转录的正调控	ECM-受体互作
XLOC_015314	<i>Hmox1</i>	上调	血管生成、血红素加氧酶、血红素氧化;细胞死亡、DNA损伤反应、信号 叶啉与叶绿素代谢转导致细胞凋亡、对过氧化氢的反应、DNA结合的负调控、序列特异性DNA结合转录因子活性的负调控、RNA聚合酶II启动子转录、对氧化反应的调节作用、血管生成的正调节、平滑肌细胞增殖的负性调控	

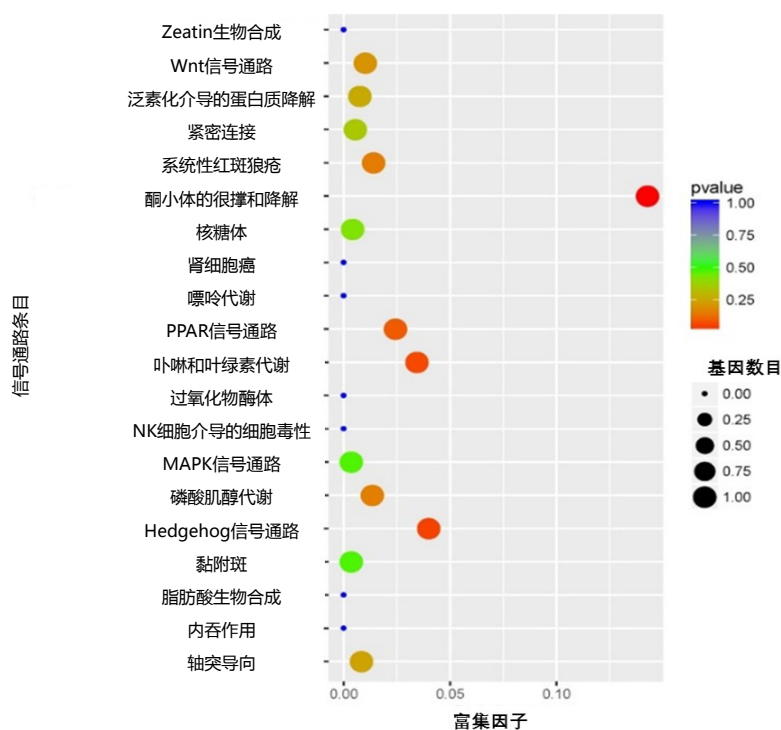


图6 与模型组比较,花旗松素处理细胞24 h后KEGG信号通路分析

注:图中气泡的大小代表富集到这个信号通路的基因数量有多少;气泡颜色代表显著性,颜色越红, P 值越小,统计学差异越显著。

3 讨论

肝纤维化是肝损伤持续存在、ECM在组织修复时分泌失衡而引起的病理改变, HSC激活和增殖是其中的核心环节^[15]。因此,抑制HSC增殖、活化,诱导凋亡的产生可作为有效抗肝纤维化策略^[16,17]。花旗松素具有良好的药物开发价值,近年来在心脏病、肿瘤和肝脏疾病方面也得到了广泛研究^[18-20]。本研究通过体外培养大鼠肝星状细胞HSC-T6,并给予不同浓度花旗松素处理,结果显示花旗松素对HSC的增殖活化都具有抑制作用。与模型组比较,在24 h, CCK8实验显示可显著抑制细胞增殖。AnnexinV/7AAD染色流式检测结果显示,花旗松素可诱导HSC凋亡。而抑制HSC细胞增殖、促进凋亡是治疗肝纤维化的一个重要途径。肝纤维化相关分子基因及蛋白表达均受到显著抑制, 125 $\mu\text{mol/L}$ 花旗松素在作用24 h即可显著抑制 $\alpha\text{-SMA}$ 、 Collagen1A1 及 Collagen3A1 mRNA以及蛋白的表达, $\alpha\text{-SMA}$ 、 Collagen1A1 及 Collagen3A1 是HSC活化的经典产物^[21,22]。结果证明花旗松素能够在体外抑制HSC增殖,促进凋亡,抑制其激活。

随着研究人员对花旗松素结构及药效学认识的深入,对其作用机制的研究逐渐展开^[23,24]。本研究通过转录组测序结果显示125 $\mu\text{mol/L}$ 花旗松素处理

HSC细胞24 h, 基因表达以下调为主。通过将差异表达的mRNA进行定位和功能分类,发现这些功能相关的基因调节细胞代谢、抗氧化、抑制增殖、促进死亡等生物学功能,多个基因共同参与了花旗松素的作用过程。

通过KEGG富集,差异基因显著富集于细胞间相互作用信号通路、卟啉与叶绿素代谢通路, Hedgehog信号通路和PPAR γ 信号通路。前10项差异基因中4项基因与炎症、纤维化、ECM、细胞黏附、蛋白质结合等发生相关的基因表现为表达下调,如 *Olr1*、*Plxna4*、*Spon1*、*Aggrn*。文献报道 *Olr1* 可被氧化应激、促炎性因子、血管紧张素等多种因素诱导,在HSC激活过程中 *Olr1* 下调,有利于抑制其反应^[25]。在既往研究中 *Spon1* 基因被认为是高血压相关基因,且在盐和水代谢中发挥作用,其编码的R-脊椎蛋白是一种多功能蛋白,在小鼠肝纤维化模型及活化的HSC中, R-脊椎蛋白显著升高^[26]。而 *Hmox1* 发生上调,其功能主要与血管生成、血红素加氧酶、血红素氧化、对过氧化氢的反应、对氧化反应的调节作用、滑肌细胞增殖的负性调控等有关^[27,28]。文献报道, *Hmox1* 发生上调,可调控细胞的抗氧化系统表达,进而抑制对细胞的氧化损伤^[29,30]。

总之,花旗松素对HSC具有抑制增殖、促进

凋亡、抑制活化的作用。花旗松素可能通过下调 *Olr1*、*Plxn4*、*Spon1*、*Agrn* 等多个促肝纤维发生基因表达及上调 *Hmox1* 等抗氧化基因表达, 影响因子间相互作用信号通路、吡啶与叶绿素代谢信号通路、Hedgehog 信号通路和 PPAR γ 信号通路发挥抑制 HSC 激活的功能。

参考文献

- [1] HERNANDEZ-GEA V, FRIEDMAN S L. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 425-456.
- [2] 杜文涛, 任万雷, 胡豆豆, 等. 肝纤维化可逆转动物模型研究进展[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2022, 14(3): 18-21.
- [3] BAGHAEI K, MAZHARI S, TOKHANBIGLI S, et al. Therapeutic potential of targeting regulatory mechanisms of hepatic stellate cell activation in liver fibrosis[J]. Drug Discov Today, 2022, 27(4): 1044-1061.
- [4] KAMM D R, MCCOMMIS K S. Hepatic stellate cells in physiology and pathology[J]. J Physiol, 2022, 600(8): 1825-1837.
- [5] 李贵芝, 刘莎, 张艳, 等. RhoA/ROCK 信号转导通路介导高糖诱导的大鼠肝星状细胞的增殖和胶原合成[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2023, 15(2): 28-35.
- [6] ROCKEY D C, FRIEDMAN S L. Fibrosis regression after eradication of hepatitis C virus: from bench to bedside[J]. Gastroenterology, 2021, 160(5): 1502-1520.
- [7] 杜文涛, 任万雷, 胡豆豆, 等. 肝纤维化可逆转动物模型研究进展[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2022, 14(3): 18-21.
- [8] NOKKEAW A, THAMJAMRASSRI P, TANGKIYANICH P, et al. Regulatory functions and mechanisms of circular RNAs in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis[J]. Cells, 2023, 12(3): 378.
- [9] ODAGIRI N, MATSUBARA T, SATO-MATSUBARA M, et al. Anti-fibrotic treatments for chronic liver diseases: the present and the future[J]. Clin Mol Hepatol, 2021, 27(3): 413-424.
- [10] ROSENBLOOM J, MENDOZA F A, JIMENEZ S A. Strategies for anti-fibrotic therapies[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(7): 1088-1103.
- [11] XI Y, LI Y, XU P, et al. The anti-fibrotic drug pirfenidone inhibits liver fibrosis by targeting the small oxidoreductase glutaredoxin-1[J]. Sci Adv, 2021, 7(36): eabg9241.
- [12] DAS A, BAIDYA R, CHAKRABORTY T, et al. Pharmacological basis and new insights of taxifolin: a comprehensive review[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 142: 112004.
- [13] LI W, ZHANG L, XU Q, et al. Taxifolin alleviates DSS-induced Ulcerative colitis by acting on gut microbiome to produce butyric acid[J]. Nutrients, 2022, 14(5): 1069.
- [14] LI Y, SU H, YIN Z P, et al. Metabolism, tissue distribution and excretion of taxifolin in rat[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 150: 112959.
- [15] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(7): 397-411.
- [16] RAY G. Management of liver diseases: current perspectives[J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(40): 5818-5826.
- [17] BOUREBABA N, MARYCZ K. Hepatic stellate cells role in the course of metabolic disorders development - a molecular overview[J]. Pharmacol Res, 2021, 170: 105739.
- [18] SAITO S, TANAKA M, SATOH-ASAHARA N, et al. Taxifolin: a potential therapeutic agent for cerebral amyloid angiopathy[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 643357.
- [19] LIU X, MA Y, LUO L, et al. Dihydroquercetin suppresses cigarette smoke induced ferroptosis in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease by activating Nrf2-mediated pathway[J]. Phytomedicine, 2022, 96: 153894.
- [20] DAS A, BAIDYA R, CHAKRABORTY T, et al. Pharmacological basis and new insights of taxifolin: a comprehensive review[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 142: 112004.
- [21] EZHILARASAN D. Hepatic stellate cells in the injured liver: perspectives beyond hepatic fibrosis[J]. J Cell Physiol, 2022, 237(1): 436-449.
- [22] LI C, ZHANG R, ZHAN Y, et al. Resveratrol inhibits hepatic stellate cell activation via the hippo pathway[J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 3399357.
- [23] 张星艳, 李新, 李虎玲, 等. 花旗松素植物来源、提取方法和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(7): 2214-2226.
- [24] 陈海燕, 曾雪莉. 花旗松素通过 PI3K/AKT/mTOR 通路对宫颈癌 SiHa 细胞自噬、凋亡和衰老的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(6): 789-796.
- [25] ZHANG Q, LIU J, HUANG W, et al. oxLDL induces injury and defenestration of human liver sinusoidal endothelial cells via LOX1[J]. J Mol Endocrinol, 2014, 53(2): 281-293.
- [26] HUO Y, YANG J, ZHENG J, et al. Increased SPON1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression by enhancing IL-6 trans-signalling[J]. Cell Prolif, 2022, 55(5): e13237.
- [27] DUAN Z J, YANG D, WANG F, et al. Heme oxygenase-1 regulates the major route involved in formation of immune hepatic fibrosis in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(22): 3304-3308.
- [28] MENON A V, LIU J, TSAI H P, et al. Excess heme upregulates heme oxygenase 1 and promotes cardiac ferroptosis in mice with sickle cell disease[J]. Blood, 2022, 139(6): 936-941.
- [29] RYTER S W. Heme oxygenase-1: an anti-inflammatory effector in cardiovascular, lung, and related metabolic disorders[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(3): 555.
- [30] FACCHINETTI M M. Heme-oxygenase-1[J]. Antioxid Redox Signal, 2020, 32(17): 1239-1242.

收稿日期: 2023-03-01

李亚菊, 郭闪, 魏飞力. 花旗松素对转化生长因子 β 1 诱导肝星状细胞的激活作用及基因表达谱分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2023, 15(3): 34-42.