

# 黄芩素通过 Smad 信号通路抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HSC-T6 细胞活化

吉家兴<sup>1</sup>, 马俊<sup>3</sup>, 李博<sup>2</sup>, 王丽萍<sup>3</sup>, 许鸣<sup>2\*</sup>

(广东省第二人民医院 1. 药学部, 2. 消化内科, 广东 广州 510317; 3. 佛山市第二人民医院 消化科, 广东 佛山 528031)

**摘要:** 探讨黄芩素是否通过 Smad 信号通路抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的肝星状细胞(HSC-T6)活化。用不同浓度黄芩素和/或 5  $\mu$ g/L 的转化生长因子  $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)刺激细胞,用免疫细胞化学法测定  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达,用 Western blot 法检测 p-Smad 2、p-Smad 3 表达。结果显示,TGF- $\beta$ 1 可使 HSC-T6 细胞  $\alpha$ -SMA 表达增加,黄芩素预处理后,可剂量依赖性降低  $\alpha$ -SMA 表达;TGF- $\beta$ 1 可使 HSC-T6 细胞 p-Smad 2 和 p-Smad 3 的蛋白水平增加,500 nmol/L 黄芩素预处理并未显著降低 p-Smad 2 和 p-Smad 3 的蛋白水平。结果说明,黄芩素可抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HSC-T6 细胞活化,其机制与 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路无关。

**关键词:** 黄芩素; 肝星状细胞; 转化生长因子  $\beta$ ; Smad 蛋白

中图分类号:R96 文献标识码:A

## Baicalein inhibits TGF- $\beta$ 1-induced activation of HSC-T6 cells through smad signaling pathway

JI Jiaxin<sup>1</sup>, MA Jun<sup>3</sup>, LI Bo<sup>2</sup>, WANG Liping<sup>3</sup>, XU Ming<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, 2. Department of Gastroenterology, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, Guangdong, China; 3. Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Foshan, Foshan 528031, Guangdong, China)

**Abstract:** To investigate whether baicalin inhibits TGF- $\beta$ 1-induced activation of HSC-T6 cells via Smad signaling pathway. Hepatic Stellate (HSC-T6) cells were treated with TGF- $\beta$ 1 (5  $\mu$ g/L) and/or with different concentration of baicalin. Expression of  $\alpha$ -SMA was determined using immunocytochemistry, while protein levels of p-Smad 2 and p-Smad 3 by western blot. Results indicated that baicalin decreased  $\alpha$ -SMA expression induced by TGF- $\beta$ 1. However, pretreatment with 500 nmol/L baicalin did not significantly change protein levels of p-Smad 2 and p-Smad 3 induced by TGF- $\beta$ 1. In summary, baicalin could suppress TGF- $\beta$ 1-induced activation of HSC-T6 cells independent of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway.

**Key words:** baicalin; hepatic stellate cells; TGF- $\beta$ ; smad protein

转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 是一种促纤维化细胞因子,在大部分器官系统纤维化的发展中起着核心作用。肝星状细胞 (Hepatic stellate cell, HSC) 是各种原因导致肝纤维化发生纤维化的最终共同途径。研究表明, TGF- $\beta$  可诱导 HSC 增殖和分化<sup>[1]</sup>。前期研究显示,黄芩素可抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HSC-T6 细胞活化,其机制与

其抑制 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)介导的活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生有关。Smad 信号通路在 TGF- $\beta$  介导的纤维化过程中起核心调控作用<sup>[2]</sup>。本研究拟以 HSC-T6 细胞为研究对象,阐明黄芩素是否通过 Smad 信号通路抑制 TGF- $\beta$ 1 介导的 HSC-T6 活化。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)购自上海复祥生

物科技有限公司,具有活化 HSC 的表型;黄芩素购自成都曼思特生物科技有限公司(质量分数>98%);RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自吉泰生物公司;鼠抗  $\alpha$ -SMA 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;磷酸化 Smad 2 和 Smad 3 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司;总 Smad 2 和 Smad 3 单克隆抗体为美国 Bioworld 公司产品。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 HSC-T6 放在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基的培养瓶内,在 37 °C, 50% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养,传代至 6 孔板或 15 cm<sup>2</sup> 培养瓶内。除对照组和 TGF- $\beta$ 1 (5  $\mu$ g/L) 刺激组外,其他加药组分别加入各终浓度的黄芩素预处理 HSC-T6 细胞 30 min 后,再加入含 TGF- $\beta$ 1 (5  $\mu$ g/L) 的 DMEM 培养液处理细胞 48 h。

1.2.2 细胞的分组 细胞分 6 组,A 组:空白对照组;B 组:TGF- $\beta$ 1 刺激组;C 组:TGF- $\beta$ 1+125 nmol/L 黄芩素组;D 组:TGF- $\beta$ 1+250 nmol/L 黄芩素组;E 组:TGF- $\beta$ 1+500 nmol/L 黄芩素组;F 组:TGF- $\beta$ 1+1 000 nmol/L 黄芩素组。黄芩素剂量参照文献[3]。

1.2.3 免疫细胞化学 取出细胞爬片,4% 多聚甲醛固定 30 分钟,灭活内源性过氧化物酶,滴加适当稀释的一抗,4 °C 过夜后在 37 °C 复温 45 分钟,滴加生物素化二抗,DAB 显色,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀加至爬片,苏木素轻度复染。脱水、透明、封片。每组图片取 6 个视野,采取日本 OLYMPUS 摄像系统和日本 MetaMorph/BX41 图像

数据分析系统测定平均光密度值,光密度值越大,代表样本中目的蛋白含量越多。

1.2.4 Western blot 法 细胞用 RIPA 裂解缓冲液加 PMSF 冰上裂解 30 min,收集裂解物,于 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白上样量为 50  $\mu$ g,进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h,再转移到 PVDF 膜上,封闭 3 h,加入一抗,4 °C 过夜。次日辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h,后洗膜 4 次,最后用发光剂进行检测,曝光、显影,以  $\beta$ -actin 作为内参,分别以目的蛋白与  $\beta$ -actin 光密度比值作为该目的蛋白的相对表达量。

## 1.3 统计方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量数据使用均数 $\pm$ 标准差表示,组间均数比较采用方差分析后,进行双侧 *t* 检验。取  $\alpha=0.05$  为检验水准,以  $P<0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 黄芩素对 TGF- $\beta$ 1 诱导活化的 HSC-T6 细胞 $\alpha$ -SMA 表达的影响

免疫细胞化学结果如图 1 所示,各组相对密度分析如图 2 所示,与对照组比较,TGF- $\beta$ 1 处理后,HSC-T6 细胞  $\alpha$ -SMA 表达明显增加;与 TGF- $\beta$ 1 处理组比较,黄芩素预处理后,随着黄芩素浓度的增加  $\alpha$ -SMA 表达显著下降( $F=72.40, P<0.05$ ),并呈现剂量依赖效应,其中 500 nmol/L 黄芩素预处理组作用最强,因此选择 500 nmol/L 黄芩素预处理做后续试验。

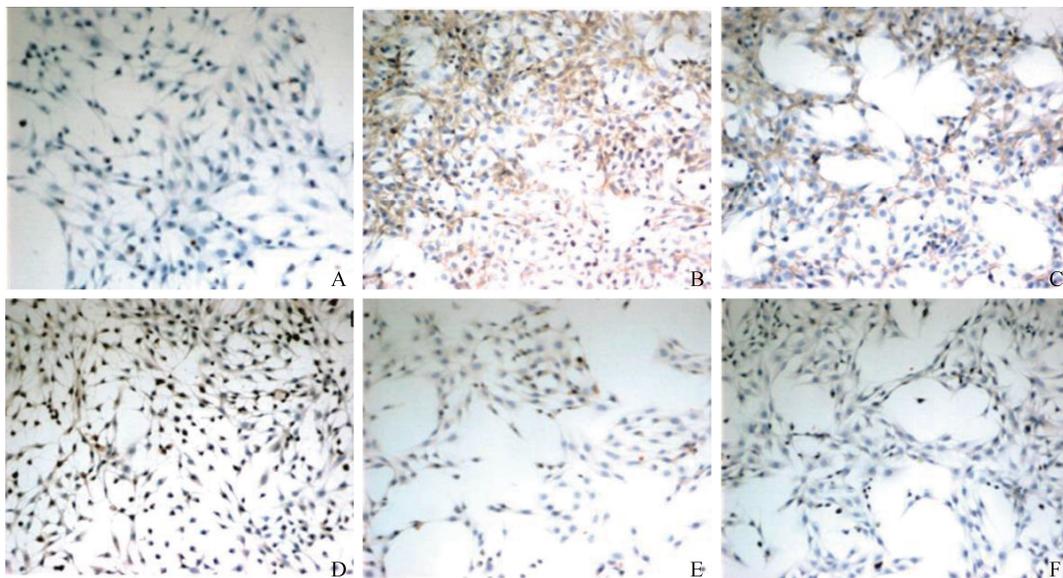


图 1 免疫组织化学分析 HSC-T6 细胞  $\alpha$ -SMA 表达(HE 200 $\times$ )

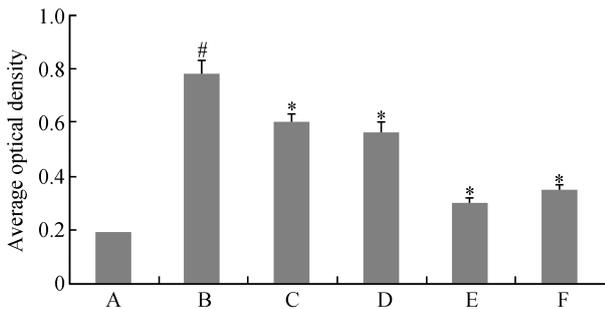


图2 HSC-T6 细胞  $\alpha$ -SMA 表达的相对密度分析

A 组:对照组;B 组:TGF- $\beta$ 1 刺激组;C 组:TGF- $\beta$ 1+125 nmol/L 黄芩素组;D 组:TGF- $\beta$ 1+250 nmol/L 黄芩素组;E 组:TGF- $\beta$ 1+500 nmol/L 黄芩素组;F 组:TGF- $\beta$ 1+1 000 nmol/L 黄芩素组. 与对照组比较, # $P$ <0.01;与 TGF- $\beta$ 1 刺激组比较, \* $P$ <0.05

## 2.2 黄芩素对 TGF- $\beta$ 1 诱导活化的 HSC-T6 细胞 Smad 表达的影响

Western blot 法实验结果表明, HSC-T6 细胞经 TGF- $\beta$ 1 作用后, 与对照组相比, Smad 磷酸化水平 p-Smad 2、p-Smad 3 明显上调 ( $t = 5.841, 7.453, P < 0.01$ )。经 500 nmol/L 黄芩素预处理后, p-Smad 2、p-Smad 3 表达与 TGF- $\beta$ 1 处理组比较 p-Smad 2、p-Smad 3 表达差异无统计学意义 ( $t = 1.886, 1.638, P > 0.05$ )。

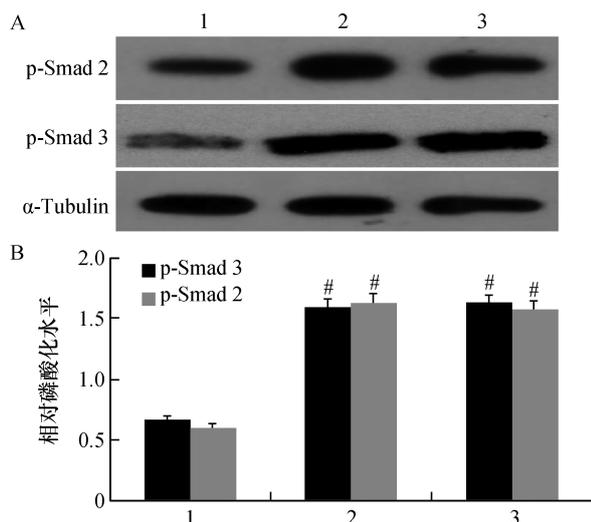


图3 黄芩素对 TGF- $\beta$ 1 诱导活化的 HSC-T6 细胞 Smad 表达的影响

A: 蛋白电泳图; B: 蛋白表达的相对密度图

1: 对照组; 2: TGF- $\beta$ 1 刺激组; 3: TGF- $\beta$ 1+500 nmol/L 黄芩素组. 与对照组比较, # $P$ <0.01

## 3 讨 论

TGF- $\beta$  能够促进肝纤维化, 其机理与其能显著

促进肝星状细胞的增殖与活化有关。前期研究表明, 给予 TGF- $\beta$ 1 处理 HSC-T6 细胞后, HSC-T6 细胞的增殖活性明显增强, 本实验中亦观察到 TGF- $\beta$ 1 刺激 HSC-T6 细胞后, 后者  $\alpha$ -SMA 表达升高, 给予黄芩素预处理细胞可抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导 HSC-T6 细胞的  $\alpha$ -SMA 表达升高, 说明黄芩素抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导 HSC-T6 细胞的活化。

NOX 是一组含血红素的跨膜蛋白, 是吞噬细胞和非吞噬细胞的重要 ROS 产生因子<sup>[4]</sup>。已鉴定出 NOX 家族中的 7 个成员: Nox 1, NOX 2, NOX 3, NOX 4, NOX 5, 双氧化酶 1 (Duox1) 和双氧化酶 2 (DUOX 2)。转化生长因子- $\beta$  可诱导不同类型细胞中 NOX 1、NOX 2 和 NOX 4 等 NOX 酶的表达<sup>[5]</sup>。我们在前期实验中, 观察到不同浓度 (125、250、500、1 000 nmol/L) 黄芩素预处理 HSC-T6 后细胞内 NOX 的活性显著低 TGF- $\beta$ 1 处理组, 而 500、1 000 nmol/L 黄芩素组 NOX 的活性比较无明显差异; 黄芩素预处理后 HSC-T6 后细胞内 ROS 表达较 TGF- $\beta$ 1 刺激组明显下降, 说明黄芩素可通过抑制 HSC-T6 细胞内 NOX 活性, 降低 ROS 的产生, 从而抑制由 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HSC-T6 细胞活化。

TGF- $\beta$ 1 与细胞膜上的 II 型受体 (TGF- $\beta$ R-II) 结合, 激活 I 型受体 (TGF- $\beta$ R-I), 导致 Smad 2 和 Smad 3 磷酸化。磷酸化的 Smad 2 和 Smad 3 与共同介质 Smad 4 形成复合物转位到细胞核, 通过与靶基因启动子中存在的 Smad 结合元件结合而调控基因转录<sup>[6]</sup>。研究发现, TGF- $\beta$ 1 通过 smad 2/3 途径在多种病理条件下的肝纤维化的发展中起着核心作用<sup>[7]</sup>。因此, 我们以 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路为靶标, 进一步研究黄芩素通过降低 NOX 活性下调的 ROS, 是否通过 Smad 途径达到抑制 HSC-T6 活化的目的。实验发现, HSC-T6 经 500 nmol/L 黄芩素预处理后, p-Smad 2、p-Smad 3 表达与 TGF- $\beta$ 1 处理组比较 p-Smad 2、p-Smad 3 表达差异无统计学意义。本研究表明 TGF- $\beta$ 1 可以通过 smad 2/3 途径诱导 HSC-T6 细胞活化。黄芩素虽然可以通过其抗氧化特性抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HSC-T6 细胞活化, 但将其作用于 HSC-T6 后未能影响 p-Smad 2、p-Smad 3 的表达。研究表明, 通过其他非经典途径, 包括丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3k) 途径和 Rho-类似 GTP 酶途径等途径的信号传递对 TGF- $\beta$  的促纤维化活性也是至关重要的<sup>[8-9]</sup>。

(下转第 256 页)

肿瘤生长和转移的蛋白,研究表明胃癌组织中的 SRF 表达水平显著高于癌旁组织,并且 SRF 可以调节 E-cadherin 以及  $\beta$ -catenin 等的水平调节胃癌细胞的迁移和侵袭过程。本次的研究结果还显示治疗前两组组织 SRF 蛋白相对表达量无显著差异,治疗后均显著降低,治疗后观察组的组织 SRF 蛋白相对表达量显著低于对照组。这说明 DC-CIK 可能通过抑制 SRF 蛋白水平,降低胃癌细胞的迁移和侵袭能力,从而减少胃癌的术后复发率,提高预后。

综上所述,腹腔镜辅助 D2 根治性全胃切除术联合 DC-CIK 对胃癌具有更好的临床效果,可抑制 CA19-9、SRF 水平。

#### 参考文献:

- [1] KITAMURA K, YAMAGUCHI T, TANIGUCHI H, et al. Analysis of lymph node metastasis in early gastric cancer: rationale of limited surgery[J]. *J Surgical Oncology*, 2015, 64(1):42-7.
- [2] YUANYING Y, LIZHI N, FENG M, et al. Therapeutic outcomes of combining cryotherapy, chemotherapy and DC-CIK immunotherapy in the treatment of metastatic non-small cell lung cancer[J]. *Cryobiology*, 2013, 67(2):235-40.
- [3] SONG YX, HUANG XZ, GAO P, et al. Clinicopathologic and prognostic value of serum carbohydrate antigen 19-9 in gastric cancer: a meta-analysis[J]. *Disease Markers*, 2015, 2015(23):1-11.
- [4] O'HURLEY G, PRENCIPE M, LUNDON D, et al. The analysis of serum response factor expression in bone and soft tissue prostate cancer metastases[J]. *Prostate*, 2014, 74(3):306-13.
- [5] 所剑. 第5版日本《胃癌治疗指南》更新要点[J]. *中国实用外科杂志*, 2017, 37(4):402-5.
- [6] 龚福生, 陈路川, 杨建伟, 等. 自体肿瘤抗原负载 DC-CIK 细胞治疗胃癌的疗效分析[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(6):813-8.
- [7] 邹文斌, 李兆申. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2014, 14(4):408-15.
- [8] SANO T, SASAKO M, KINOSHITA T, et al. Recurrence of early gastric cancer. Follow-up of 1475 patients and review of the Japanese literature[J]. *Cancer*, 2015, 72(11):3174-8.
- [9] KIM HH, HAN SU, KIM MC, et al. Long-term results of laparoscopic gastrectomy for gastric cancer: a large-scale case-control and case-matched Korean multicenter study[J]. *J Surgical Oncology*, 2014, 32(7):627-33.
- [10] 高作文, 郑劼, 姜金书, 等. DC-CIK 细胞免疫治疗胃癌的临床疗效及预后分析[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(2):174-9.
- [11] Li DP, Li W, FENG J, et al. Adjuvant chemotherapy with sequential cytokine-induced killer (CIK) cells in stage IB non-small cell lung cancer[J]. *Oncology Research*, 2015, 22(2):67-8.
- [12] HU J, HU J, LIU X, et al. Effect and safety of cytokine-induced killer (CIK) cell immunotherapy in patients with breast cancer: a meta-analysis[J]. *Medicine*, 2017, 96(42):1-6.
- [13] 孙伟红, 魏晓芳, 赵鹏, 等. 胃癌患者 DC-CIK 治疗前后外周血 Treg 细胞及相关细胞因子的变化[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2015, 22(1):79-83.
- [14] ZHAO YJ, JIANG N, SONG QK, et al. Continuous DC-CIK infusions restore CD8+ cellular immunity, physical activity and improve clinical efficacy in advanced cancer patients unresponsive to conventional treatments[J]. *APJCP*, 2015, 16(6):2419-23.
- [15] 高俊, 王静东, 王琦三. 含  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸的肠外营养对胃癌病人免疫功能影响的 Meta 分析[J]. *肠外与肠内营养*, 2015, 22(2):107-11.
- [16] 鲁力, 谢敏, 魏少忠, 等. 术前与术后早期肠内营养对老年胃癌患者术后免疫功能及营养状态的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(18):1170-3.
- [17] 程鹏. 胃癌诊断中肿瘤标志物 CEA、CA19-9、CA125 的水平变化及临床意义[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 14(20):5679-81.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 252 页)

综上所述,本研究结果表明,黄芩素可能不是通过 Smad 信号途径影响 HSC-T6 的活化。黄芩素是否通过非经典途径如 MAPK 等途径抑制 TGF- $\beta$  表达,达到其抗肝纤维化的作用是我们下一步研究的目标。

#### 参考文献:

- [1] MACKINNON AC, GIBBONS MA, FARNWORTH SL, et al. Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1-driven lung fibrosis by galectin-3 [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(5):537-46.
- [2] HIGASHI T, FRIEDMAN SL, HOSHIDA Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121:27-42.
- [3] INOUE T, JACKSON EK. Strong antiproliferative effects of baicalin in cultured rat hepatic stellate cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 378(1):129-35.
- [4] RASTOGI R, GENG X, LI F, et al. NOX activation by subunit interaction and underlying mechanisms in disease[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 10:301.
- [5] KIENHÖFER D, BOELTZ S, HOFFMANN MH. Reactive oxygen homeostasis-the balance for preventing autoimmunity[J]. *Lupus*, 2016, 25(8):943-54.
- [6] ASK K, BONNIAUD P, MAASS K, et al. Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(3):484-95.
- [7] LI M, KRISHNAVENI MS, LI C, et al. Epithelium-specific deletion of TGF-beta receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1):277-87.
- [8] 张文青, 顾广祥, 夏强. 转化生长因子  $\beta$  和信号转导和转录激活因子 3 在肝纤维化发生中的相互作用[J]. *中华肝脏病杂志*, 2018, 26(10):792-6.
- [9] FABREGAT I, CABALLERO-DÍAZ D. Transforming growth factor- $\beta$ -induced cell plasticity in liver fibrosis and hepatocarcinogenesis [J]. *Front Oncol*, 2018, 8:357.

(本文编辑:秦旭平)