

研究论文

栀子苷通过TGF- β 1/Smad信号通路抑制肝纤维化和肝星状细胞活化

周林华^{1,*}, 陈晓²

¹宜春学院美容医学院; ²宜春职业技术学院护理学院, 宜春 336000

摘要: 本研究旨在观察栀子苷对肝纤维化和肝星状细胞活化的影响, 并探讨其可能机制。人肝星状细胞LX-2用5 ng/mL转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)处理, 并用不同浓度(0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ mol/L)的栀子苷联合培养, MTT法进行细胞活力测定, LX-2分别经5 ng/mL TGF- β 1、TGF- β 1+栀子苷(20 μ mol/L)处理后, 用qPCR和Western blot分别检测I型胶原蛋白(collagen I)、纤连蛋白(fibronectin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、p-Smad2和p-Smad3基因和蛋白的表达。BALB/c小鼠用CCl₄ (25%, 1 mL/kg)诱导肝纤维化, 设立对照组、CCl₄组和CCl₄+栀子苷组(40 mg/kg), 4周后检测肝功能及血清肝纤维化指标, 用HE和Masson染色进行组织学观察, 免疫组织化学分析组织 α -SMA表达, Western blot检测 α -SMA、TGF- β 1、p-Smad2和p-Smad3蛋白的表达。结果显示, 栀子苷显著抑制TGF- β 1诱导的LX-2细胞增殖、collagen I、fibronectin和 α -SMA的基因和蛋白表达及TGF- β 1/Smad信号相关蛋白表达。组织学观察显示栀子苷显著抑制CCl₄诱导的小鼠肝纤维化, 显著抑制肝星状细胞活化和TGF- β 1/Smad信号相关蛋白表达。以上结果提示, 栀子苷抑制肝纤维化和肝星状细胞活化, 其机制可能是通过抑制TGF- β 1/Smad信号传导。

关键词: 栀子苷; 肝纤维化; 肝星状细胞; TGF- β 1/Smad

Geniposide inhibits hepatic fibrosis and hepatic stellate cell activation through blocking the TGF- β 1/Smad signaling pathway

ZHOU Lin-Hua^{1,*}, CHEN Xiao²

¹School of Cosmetology, Yichun University; ²School of Nursing, Yichun Vocational Technical College, Yichun 336000, China

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effect of Geniposide on hepatic fibrosis and activation of hepatic stellate cells (HSCs) and to explore possible underlying mechanism. Human HSCs (LX-2) were treated with 5 ng/mL transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), followed by co-culture with Geniposide at various concentrations (0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ mol/L). Cell viability was determined by MTT assay. Then, LX-2 cells were divided into control, TGF- β 1 (5 ng/mL) and TGF- β 1 + Geniposide (20 μ mol/L) groups, and the gene and protein expression of collagen I, fibronectin, α -smooth muscle actin (α -SMA), p-Smad2 and p-Smad3 was detected by qPCR and Western blot, respectively. BALB/c mice were treated with CCl₄ (25%, 1 mL/kg) to generate a model of hepatic fibrosis (CCl₄ group), and the control group and CCl₄ + Geniposide group were administered with olive oil and CCl₄ + 40 mg/kg Geniposide, respectively. After 4 weeks of treatment, the liver function and serum hepatic fibrosis indexes of mice were detected, histological observation was performed by HE and Masson staining, and α -SMA expression in the tissue was analyzed by immunohistochemistry. Western blot was utilized for the determination of the protein expression of α -SMA, TGF- β 1, p-Smad2 and p-Smad3. The results showed that Geniposide inhibited LX-2 cell proliferation. In addition, Geniposide significantly downregulated the gene and protein expression of collagen I, fibronectin and α -SMA and the expression of TGF- β 1/Smad signaling-related proteins induced by TGF- β 1 *in vitro*. Histological observations showed that Geniposide significantly inhibited CCl₄-induced hepatic fibrosis, HSC activation and expression of TGF- β 1/Smad signaling-related proteins in mice. In summary, Geniposide prevents the hepatic fibrosis

This work was supported by the Science and Technology Project of Jiangxi Provincial Department of Education, China (No. GJJ190854).

*Corresponding author. E-mail: ycxzlh@163.com

and HSC activation possibly through the inhibition of the TGF- β 1/Smad signaling pathway.

Key words: Geniposide; hepatic fibrosis; hepatic stellate cell; TGF- β 1/Smad

肝纤维化是肝脏对各种损伤的修复反应,是由肝脏中细胞外基质的过度增生和沉积引起的^[1,2]。作为一种瘢痕形成过程,肝纤维化通常由病毒性肝炎、胆汁淤积和代谢疾病引起,最终导致肝硬化、肝衰竭甚至肝细胞癌^[3]。研究表明,肝纤维化是一个可逆的病理过程^[1,4];因此,有必要寻找有效的药物来阻断或逆转肝纤维化的发生和进展,避免肝硬化或肝癌,改善患者的预后。

肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 是主要的胶原生成细胞,其活化已在肝纤维化的发病机理中得到证实^[5]。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是 HSC 转化和增殖最有效的细胞因子,其激活下游信号传导途径,促进 Smad2 和 Smad3 的磷酸化^[6]。因此,抑制 HSC 的激活和调节相关细胞因子是治疗肝纤维化的目标。栀子苷是从中草药栀子中分离得到的一种环烯醚萜苷,具有保肝、抗氧化、抗糖尿病和抗炎等多种药理作用^[7,8]。我们前期研究已经表明栀子苷具有较好的抗肝纤维化作用^[9],但对 HSC 活化的影响及其机制尚不明确。本文旨在研究栀子苷对肝纤维化和 HSC 活化的影响,并探讨其可能机制,希望为栀子苷治疗肝纤维化的作用和机制提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 栀子苷购自中国药品生物制品检定所,临用前溶于生理盐水中,过滤除菌。重组人 TGF- β 1 购自上海诺华生物科技有限公司;橄榄油购自上海化学试剂公司;四氯化碳 (CCl₄) 购自上海凌峰化学试剂有限公司;透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、III 型前胶原蛋白 (type III procollagen, PC-III)、IV 型胶原蛋白 (type IV collagen, CIV)、层粘连蛋白 (laminin, LN)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒、RIPA 裂解缓冲液和 BCA 测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所;Trizol 试剂、Dulbecco 的改良 Eagle 培养基 (DMEM) 购自 Thermo Fisher Science;胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自上海生工生物工程公司;3-[4,5-二甲基噻唑-2]-2,5-二苯基四氮唑溴化物 (MTT) 购自 Sigma-Aldrich;I

型胶原蛋白 (collagen I)、纤连蛋白 (fibronectin)、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、p-Smad2、p-Smad3、 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗购自 Cell Signaling Technology。

1.2 细胞培养和处理 人 HSC (LX-2) 购自中国科学院细胞库。LX-2 细胞在含 10% FBS、2 mmol/L L-谷氨酰胺和抗生素 (100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素) 的 DMEM 中培养,保持 37 °C、5% CO₂。细胞每天传代培养一次,每次实验取对数生长期细胞进行。

1.3 MTT 法检测细胞活力 使用 MTT 比色法进行细胞活力测定,LX-2 细胞接种在 96 孔板 (1 × 10⁴ 细胞/孔) 中。在大约 80% 汇合时,LX-2 经 5 ng/mL TGF- β 1 处理 24 h 后,与不同浓度 (0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ mol/L) 的栀子苷共培养 24 h,MTT 法测定细胞活力^[10]。LX-2 在后续实验中分组设置为对照组 (不加试剂)、TGF- β 1 组 (5 ng/mL TGF- β 1)、TGF- β 1+ 栀子苷 (5 ng/mL TGF- β 1+20 μ mol/L 栀子苷) 组,处理 48 h。

1.4 小鼠分组及给药 雄性 BALB/c 小鼠 (6~8 周龄,体重 18~22 g) 购自斯贝福生物技术有限公司,许可证:SCXK(京)2019-0010,每只笼中 5 只小鼠。实验前在控制温度 [(25 ± 3) °C] 和 12 h 明暗循环下适应环境 1 周,自由饮水和进食。将小鼠随机分为 3 组:对照组、CCl₄ 组和 CCl₄+ 栀子苷组 (每组 n = 6)。CCl₄ 组小鼠每周 2 次腹腔注射 CCl₄ (1 mL/kg,用橄榄油稀释至 25%) 诱导小鼠肝纤维化,对照组小鼠腹腔注射等量橄榄油代替 CCl₄,CCl₄+ 栀子苷组在 CCl₄ 给药后给小鼠灌胃栀子苷 (40 mg/kg,每 12 h 1 次)^[8],对照组和 CCl₄ 组灌胃等量的生理盐水,连续 4 周。实验结束后小鼠颈椎脱臼处死,收集血清、细胞或肝脏组织进行相应的分析。动物实验遵照《实验动物饲养管理和使用指南》第八版进行,所有动物实验方案均经宜春学院伦理委员会批准。

1.5 肝功能及肝纤维化指标检查 用奥林巴斯 AU5400 全自动生化分析仪检测血清 ALT 和 AST。采用 ELISA 法检测小鼠血清 HA、PC-III、CIV 和 LN 水平^[9]。肝脏组织羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 含量根据 HYP 检测试剂盒 (南京建成生物技术研

究所)说明进行测定,以 $\mu\text{g/g}$ 肝脏湿重表示。

1.6 组织学和免疫组织化学分析 肝组织固定于10%中性福尔马林溶液中,石蜡包埋,5 μm 切片,用苏木精-伊红(HE)和Masson染色以进行一般形态学观察,用光学显微镜(Olympus Bx41)进行检查并拍摄照片。对于组织化学染色,石蜡包埋的肝切片经脱蜡、再水化和热诱导的抗原修复进行预处理,然后将切片在4 $^{\circ}\text{C}$ 与一抗 $\alpha\text{-SMA}$ 抗体孵育过夜,后在室温下与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1h,用光学显微镜(Olympus Bx41)获得图像。

1.7 Western blot 分析 用含有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液裂解肝组织或细胞。裂解液以10 000 g离心,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置10 min。收集上清液用于进一步分析,使用BCA测定试剂盒测量总蛋白。总蛋白经10%凝胶电泳分离后转移到PVDF膜上,与下列一抗孵育:collagen I、fibronectin、 $\alpha\text{-SMA}$ 、p-Smad2、p-Smad3及 $\beta\text{-actin}$ 抗体。将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育,使用ChemiDoc™触摸成像系统(Bio-Rad)采集图像,并通过ImageJ分析软件进行量化。

1.8 qPCR 分析 用Trizol试剂提取LX-2细胞总RNA。用NanoDrop 8000分光光度计对RNA进行定量。用逆转录试剂盒逆转录RNA(2 μg),获得cDNA。逆转录程序为:25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。本实验采用Thermo Fisher Science公司的7500实时PCR检测系统。引物购自Sangon Biotech公司,引物序列见表1。GAPDH作为内源性对照,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法测定相对表达量的变化。

1.9 统计学分析 结果用mean \pm SD表示。使用SPSS 20.0进行统计分析。采用单因素方差分析(ANOVA)来确定多组间的差异显著性,组间比较采用SNK-Q检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 槲子苷抑制TGF- β 1诱导的LX-2细胞活化和纤维化基因表达

如图1所示,槲子苷对TGF- β 1诱导的LX-2细胞增殖具有显著的抑制作用($P < 0.05$)。然而,当槲子苷浓度高于20 $\mu\text{mol/L}$ 时,槲子苷对LX-2细胞增殖的抑制作用随着剂量的增加而显著降低($P < 0.05$)。因此,我们选择20 $\mu\text{mol/L}$ 槲子苷进行后续体外研究。

TGF- β 1处理显著上调LX-2细胞中collagen I、fibronectin和 $\alpha\text{-SMA}$ 的基因和蛋白表达水平,而槲子苷处理后明显下调($P < 0.05$)(图2)。这些结果表明,槲子苷对TGF- β 1诱导的LX-2细胞活化和纤

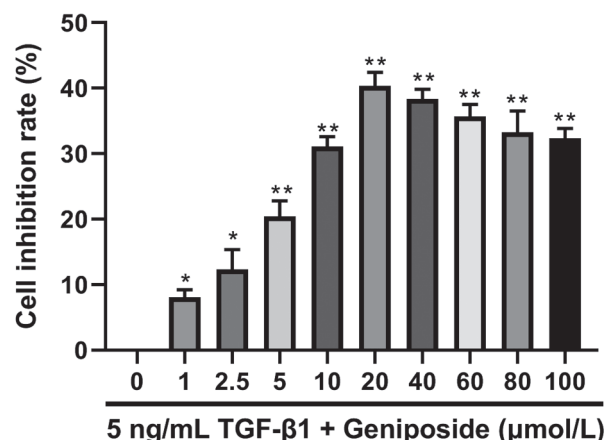


图 1. 槲子苷抑制TGF- β 1诱导的LX-2细胞增殖
Fig. 1. Geniposide inhibited the proliferation of LX-2 cells induced by TGF- β 1. LX-2 cells were co-cultured with 5 ng/mL TGF- β 1 and Geniposide (0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h, and the cell proliferation ability was detected by MTT assay. Mean \pm SD ($n = 6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs TGF- β 1+0 $\mu\text{mol/L}$ Geniposide.

表1. qPCR引物序列

Table 1. qPCR primer sequence

Gene	Primer sequence
Collagen I	Forward: 5'-TGGCCAAGAAGACATCCCTGAAGT-3' Reverse: 5'-ACATCAGGTTTCCACGTCTCACCA-3'
Fibronectin	Forward: 5'-CCATCGCAAACCGCTGCCAT-3' Reverse: 5'-AACACTTCTCAGCTATGGGCTT-3'
$\alpha\text{-SMA}$	Forward: 5'-ACTG AGCGTGGCTATTCCTCCGTT-3' Reverse: 5'-GCAGTGGCCATCTCATTTTCA-3'
GAPDH	Forward: 5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3' Reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

维化基因的表达有抑制作用。

2.2 槲子苷抑制活化LX-2细胞中TGF- β 1/Smad信号通路

为了进一步研究 TGF- β 1/Smad 信号是否受槲子苷处理的影响, 我们检测了 p-Smad2/3 的表达。如图 3 所示, TGF- β 1 处理后 LX-2 细胞中 p-Smad2 和 p-Smad3 表达升高, 但其表达被槲子苷抑制 ($P < 0.05$), 这些结果表明槲子苷能抑制 LX-2 细胞中的

TGF- β 1/Smad 信号。

2.3 槲子苷抑制CCl₄肝损伤小鼠HSC激活和肝纤维化进展

与对照组相比, CCl₄ 组小鼠的肝脏表面粗糙, 有明显结节, 而用槲子苷治疗的 CCl₄ 组小鼠的肝脏表面粗糙、无明显结节 (图 4A)。组织学观察显示, CCl₄ 组小鼠肝切片显示典型的病理特征, 包括门脉炎症和坏死、明显的脂肪变性、胶原沉积、肝细胞

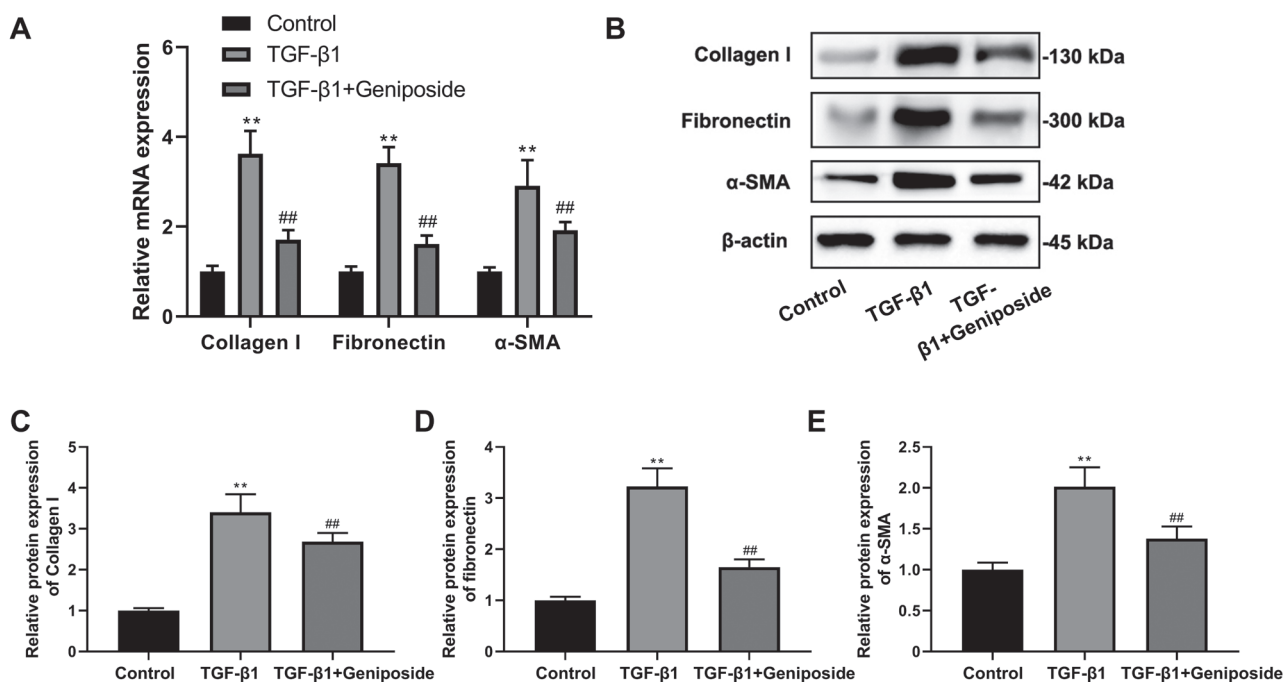


图 2. 槲子苷抑制TGF- β 1诱导的LX-2细胞纤维化基因的表达

Fig. 2. Geniposide inhibited the expression of fibrosis genes in LX-2 cells induced by TGF- β 1. LX-2 cells were treated with no reagent (control), 5 ng/mL TGF- β 1, or TGF- β 1+Geniposide (20 μ mol/L) for 48 h, and the mRNA (A) and protein (B–E) expressions of collagen I, fibronectin and α -SMA were detected by qPCR and Western blot, respectively. Mean \pm SD ($n = 3$). ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs TGF- β 1 group.

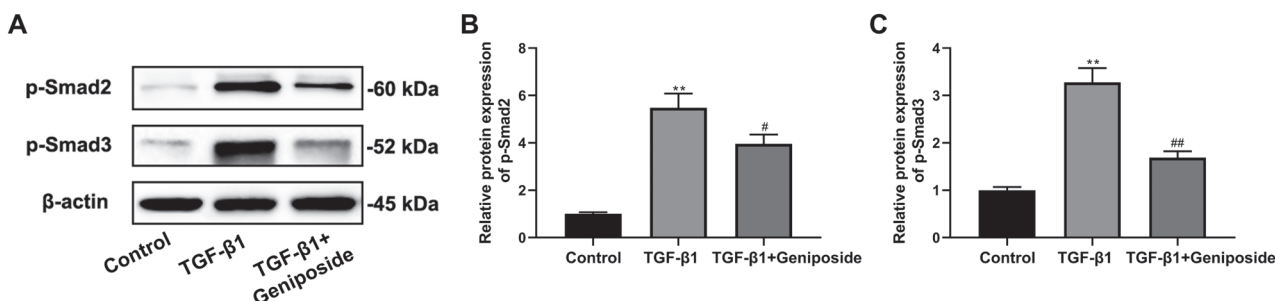


图 3. 槲子苷抑制活化LX-2细胞中TGF- β 1/Smad信号通路

Fig. 3. Geniposide inhibited activation of TGF- β 1/Smad signaling pathway in LX-2 cells. LX-2 cells were treated with no reagent (control), 5 ng/mL TGF- β 1, or TGF- β 1+Geniposide (20 μ mol/L) for 48 h, and the expressions of p-Smad2 and p-Smad3 were detected by Western blot (A) and quantified (B–C). Mean \pm SD, $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs TGF- β 1 group.

纤维化和肝细胞疏松，而栀子苷处理后组织炎性细胞浸润、细胞变性、坏死和纤维组织增生减少，肝

组织结构趋于正常(图4B~C)。Masson染色统计分析后发现，与对照组相比，CCl₄组小鼠肝脏胶原含

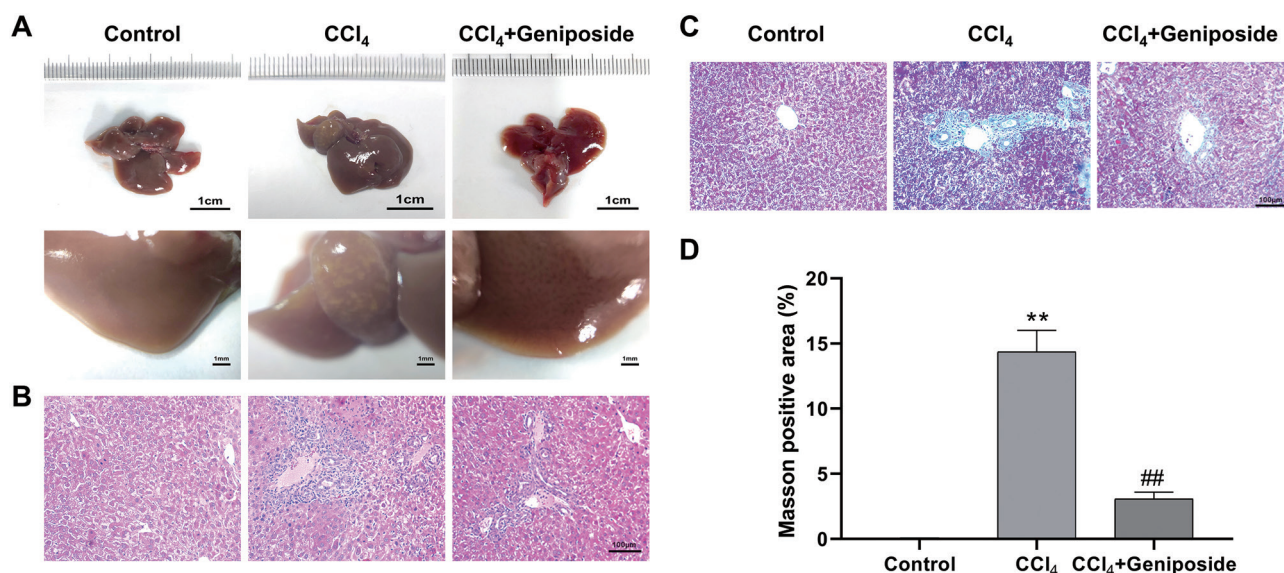


图 4. 肝脏外观及组织学观察比较

Fig. 4. Comparison of the general shape and histopathology of liver. BALB/c mice were induced to hepatic fibrosis by CCl₄ (25%, 1 mL/kg), and control group (equivalent olive oil), CCl₄ group and CCl₄+Geniposide group (40 mg/kg) were established. *A*: The general shape of liver. Scale bar, 1 cm (upper) or 1 mm (lower). *B*: Hematoxylin-eosin (HE) staining of liver tissue. Scale bar, 100 μ m. *C*-*D*: Masson staining of liver tissue and Masson positive area. Scale bar, 100 μ m. Mean \pm SD ($n = 3$). ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs CCl₄ group.

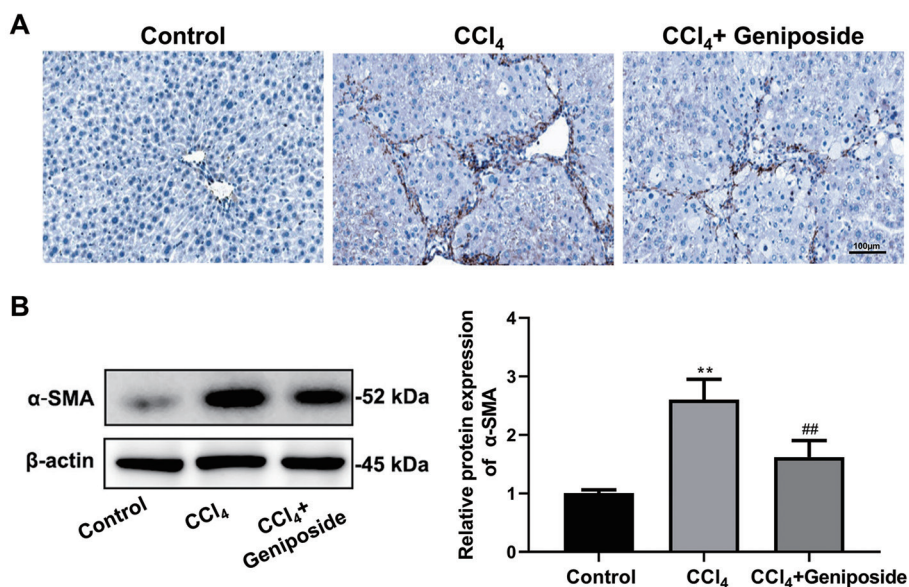


图 5. 栀子苷抑制CCl₄肝损伤小鼠肝星状细胞活化

Fig. 5. Geniposide inhibited the activation of hepatic stellate cells (HSC) in mice with CCl₄-induced liver injury. BALB/c mice were induced to hepatic fibrosis by CCl₄ (25%, 1 mL/kg), and control group (equivalent olive oil), CCl₄ group and CCl₄+Geniposide group (40 mg/kg) were established. *A*: The expression of α -SMA in liver tissues was detected by immunohistochemistry. Scale bar, 100 μ m. *B*: The protein expression of α -SMA was detected by Western blot. Mean \pm SD ($n = 3$). ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs CCl₄ group.

量显著升高；与 CCl₄ 组相比，CCl₄+ 栀子苷组小鼠肝组织胶原含量显著降低 ($P < 0.05$ ，图 4D)。

与 CCl₄ 组相比，栀子苷处理阻止纤维化间隔的 HSC 激活标记物 α -SMA 阳性细胞积聚 (图 5A)，Western blot 分析表明，用栀子苷处理的小鼠明显抑制了 CCl₄ 诱导的 α -SMA 蛋白水平上调 (图 5B)。

2.4 栀子苷抑制 CCl₄ 肝损伤小鼠肝功能和肝纤维化血清标志物升高

与对照组相比，CCl₄ 组小鼠血清 ALT、AST 和肝纤维化标志物 HYP 水平明显升高 ($P < 0.05$)。栀子苷显著降低 CCl₄ 升高的 ALT、AST 和 HYP 水平 ($P < 0.05$) (表 2)。与对照组相比，CCl₄ 组血清 HA、LN、PC-III 和 CIV 水平显著升高 ($P < 0.05$)，CCl₄+ 栀子苷组血清以上蛋白水平明显低于 CCl₄ 组 ($P < 0.05$) (表 3)。

2.5 栀子苷抑制 CCl₄ 肝损伤小鼠肝脏中 TGF- β 1/Smad 信号通路的激活

为了研究 TGF- β 1/Smad 信号是否参与了栀子苷的体内抗肝纤维化作用，我们用 Western blot 检测了小鼠肝脏中 TGF- β 1 和 p-Smad2/3 的蛋白表达。结果显示，CCl₄ 显著诱导小鼠肝脏高表达 TGF- β 1 和 p-Smad 2/3 ($P < 0.01$)，栀子苷治疗导致小鼠肝脏中 TGF- β 1 和 p-Smad2/3 的蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$) (图 6)。

3 讨论

中药具有毒性低、不良反应少、患者耐受性好

等特点。据报道，栀子苷具有保肝作用，能有效改善肝纤维化^[9]。然而，栀子苷对肝细胞损伤影响的相关研究还较少。本研究探讨了栀子苷在体外和体内抗肝纤维化作用的潜在机制。结果表明，栀子苷抑制肝纤维化和 HSC 活化，其可能机制是通过调节 TGF- β 1/Smad 信号通路。

HSC 是细胞外基质的主要来源，在肝纤维化的发病中起关键作用^[5, 11]。 α -SMA 被认为是 HSC 激活的标志^[10]。Collagen I 和 fibronectin 是细胞外基质的主要成分，其过度蓄积是肝纤维化的特征性病理改变^[12]。在本研究中，我们用 TGF- β 1 诱导 LX-2 细胞 48 h 建立了体外肝纤维化模型，栀子苷处理显著下调了 TGF- β 1 诱导的 α -SMA、collagen I 和 fibronectin 的蛋白和 mRNA 高表达。我们还用 CCl₄ 诱导建立小鼠肝纤维化模型，肝组织 HE 染色和 Masson 染色的组织病理学评价显示栀子苷能显著改善 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化病变。Ma 等^[13] 研究发现栀子苷可改善肝损伤血清标志物 (ALT 和 AST) 以及肝组织病理学。在临床上，HA、LN、PC-III 和 CIV 是反映肝纤维化程度的指标^[14, 15]。本研究结果表明，在 CCl₄ 诱导的肝损伤小鼠中，栀子苷显著下调肝纤维化指标并改善肝损伤指标，这与我们前期研究结果一致^[9]。总之，栀子苷在体内外均能改善肝纤维化和抑制 HSC 活化。

栀子苷的药理作用广泛，药理作用机制可能与抑制炎症信号通路有关，如栀子苷的抗哮喘、抗肺损伤和抗乳腺炎作用机制可能与 NF- κ B 信号通路有

表2. 血清ALT和AST水平及肝组织HYP水平的比较

Table 2. Comparison of serum ALT and AST levels and liver tissue HYP levels

Group	<i>n</i>	ALT (U/L)	AST (U/L)	HYP (μ g/g)
Control	6	22.05 \pm 6.23	52.33 \pm 22.56	93.25 \pm 23.61
CCl ₄	6	156.31 \pm 24.57**	261.12 \pm 33.89**	203.08 \pm 33.32**
CCl ₄ +Geniposide	6	96.72 \pm 8.36 ^{##}	178.34 \pm 25.14 ^{##}	119.54 \pm 22.15 ^{##}

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; HYP: hydroxyproline. Mean \pm SD. ** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs CCl₄ group.

表3. 血清肝纤维化参数HA、PC-III、CIV和LN的比较

Table 3. Comparison of serum hepatic fibrosis parameters HA, PC-III, CIV and LN

Group	<i>n</i>	HA (μ g/L)	LN (μ g/L)	PC-III (μ g/L)	CIV (μ g/L)
Control	6	45.04 \pm 7.35	49.79 \pm 13.48	27.53 \pm 15.36	17.22 \pm 3.25
CCl ₄	6	126.24 \pm 26.42**	137.64 \pm 35.12**	55.06 \pm 30.18**	45.68 \pm 4.11**
CCl ₄ +Geniposide	6	107.34 \pm 13.23 ^{##}	93.56 \pm 22.75 ^{##}	36.46 \pm 18.55 ^{##}	33.69 \pm 2.51 ^{##}

HA: hyaluronic acid; LN: laminin; PC-III: type III procollagen; CIV: type IV collagen. Mean \pm SD. ** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs CCl₄ group.

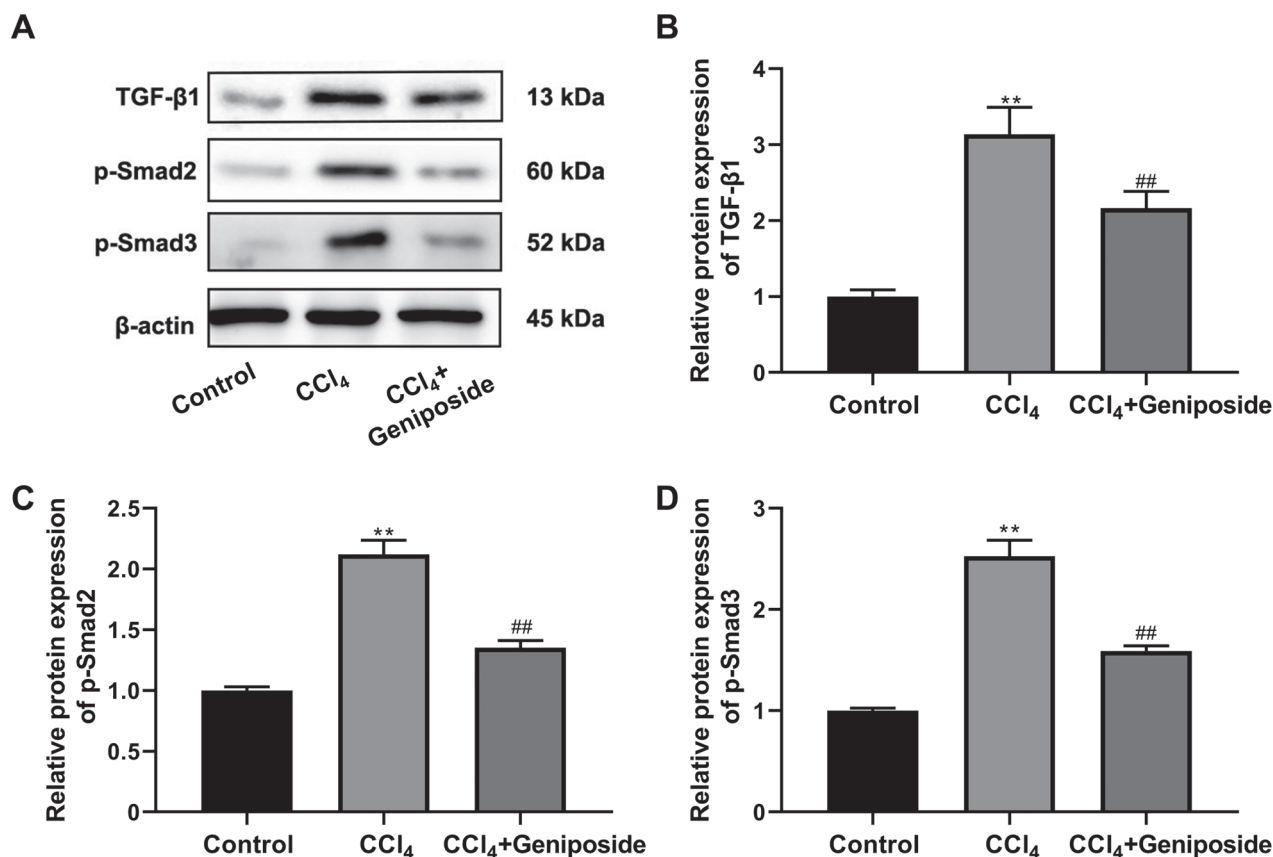


图 6. 栀子苷抑制CCl₄肝损伤小鼠肝脏中TGF- β 1/Smad信号通路的激活

Fig. 6. Geniposide inhibited the activation of TGF- β 1/Smad signaling pathway in the liver of mice with CCl₄-induced liver injury. Mice were induced to hepatic fibrosis by CCl₄ (25%, 1 mL/kg), and control group (equivalent olive oil), CCl₄ group and CCl₄+Geniposide group (40 mg/kg) were established. The protein expressions of TGF- β 1, p-Smad2 and p-Smad3 were detected by Western blot (A) and quantified (B-D). Mean \pm SD ($n = 3$). ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs CCl₄ group.

关^[16]。据报道，栀子苷具有抗肾间质纤维化作用，其机制可能是通过抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路^[17]。此外，栀子苷的保肝利胆作用和抗肝纤维化作用主要与抑制 TGF- β 1 和 α -SMA 及基质金属蛋白酶抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 蛋白表达有关^[16]。本研究进一步确定了栀子苷抑制肝纤维化中 HSC 活化的可能机制。TGF- β /Smad 信号通路通过激活 HSC 在肝纤维化形成中引起关注^[18]。TGF- β 1 导致 HSC 活化和增殖，活化的 HSC 进一步分泌 TGF- β 1，增加 collagen I 的产生，并促进肝纤维化的进展。Lang 等人研究发现，TGF- β 1 siRNA 能显著下调 TGF- β 1 的表达，抑制 HSC 的增殖，减少 collagen I 的产生，从而改善大鼠肝纤维化的发展^[19]。本研究证实 TGF- β 1 可上调 LX-2 细胞中 p-Smad2 和 p-Smad3 的表达。此外，在 CCl₄ 诱导的小鼠肝组织中，TGF- β 1、p-Smad2 和 p-Smad3 的

表达也明显上调。然而，栀子苷部分逆转了 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞和小鼠的 p-Smad2 和 p-Smad3 水平。以上结果提示，栀子苷可能通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路抑制 HSC 活化。

综上所述，栀子苷在体内外均能抑制肝纤维化和 HSC 活化，其机制可能是通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路实现的。本研究结果表明，栀子苷可能是一种有前途的肝纤维化治疗策略，但其抗肝纤维化的分子机制尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Hepatology Branch of Chinese Medical Association (中华医学会肝病学会). Consensus on the diagnosis and therapy of hepatic fibrosis in 2019. Chin J Hepatol (中华肝脏病杂志) 2019; 27(9): 657-667.
- 2 Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. Mol Aspects Med 2019;

- 65: 37–55.
- 3 Niu WX (牛伟晓), Chen MH, Zhang N, Ge MX, Bao YY, Si SY, Shao RG, He HW. Pepstatin Pr show anti-fibrosis effect related to YAP-TGF β -Smad pathway. *Acta Pharm Sin (药理学报)* 2019; 54(1): 89–94 (in Chinese).
 - 4 Zhao J (赵静), Cheng J. Research progress of signaling pathways in liver fibrosis. *Chin J Hepatol (中华肝脏病杂志)* 2019; 27(6): 403–406 (in Chinese).
 - 5 Higashi T, Friedman S, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2017; 121: 27–42.
 - 6 Dewidar B, Meyer C, Dooley S, Meindl-Beinker A. TGF- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis—updated 2019. *Cells* 2019; 8(11): 1419.
 - 7 Bu YH (卜妍红), Wu H, Sun MH, Zhang H, Deng R, Wang Y. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of Gardenia. *J Anhui Trad Chin Med Coll (安徽中医药大学学报)* 2020; 39(6): 89–93 (in Chinese).
 - 8 Hu X, Yu D, Zhuang L, Zhou M, Shi Z, Jin G, Zhang X. Geniposide improves hepatic inflammation in diabetic db/db mice. *Int Immunopharmacol* 2018; 59: 141–147.
 - 9 Fu NY (付南燕), Zhou LH, Xu J. Effect of geniposide on the levels of TGF- β 1 and TIMP-1 in rat with hepatic fibrosis. *J Yichun Univ (宜春学院学报)* 2018; 40(3): 42–46, 72 (in Chinese).
 - 10 Mu M, Zuo S, Wu R, Deng K, Lu S, Zhu J, Zou G, Yang J, Cheng M, Zhao X. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation via inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway. *Drug Des Devel Ther* 2018; 12: 4107–4115.
 - 11 Feng J, Wang C, Liu T, Li J, Wu L, Yu Q, Li S, Zhou Y, Zhang J, Chen J, Ji J, Chen K, Mao Y, Wang F, Dai W, Fan X, Wu J, Guo C. Procyanidin B2 inhibits the activation of hepatic stellate cells and angiogenesis via the Hedgehog pathway during liver fibrosis. *J Cell Mol Med* 2019; 23(9): 6479–6493.
 - 12 He ZY (何志勇), Lai JM, Zou M, Zhou LL, Zhang X. ROS and MAPK pathways regulate fibroblast differentiation and extracellular matrix secretion induced by TGF- β . *Proceedings of the 2015 Annual Conference of Zhejiang Neurology Academic Conference, 2015 (in Chinese).*
 - 13 Ma T, Huang C, Zong G, Zha D, Meng X, Li J, Tang W. Hepatoprotective effects of geniposide in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Pharm Pharmacol* 2011; 63(4): 587–593.
 - 14 Ma Y, Yuan H, Jin R, Bao X, Wu X. Flavonoid-rich *Scabiosa comosa* inflorescence extract attenuates CCl₄-induced hepatic fibrosis by modulating TGF- β -induced Smad3 phosphorylation. *Biomed Pharmacother* 2018; 106: 426–433.
 - 15 Stefano J, Guedes L, De Souza A, Vanni D, Alves V, Carrilho F, Largura A, Arrese M, Oliveira C. Usefulness of collagen type IV in the detection of significant liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2021; 20: 100253.
 - 16 Yuan YJ (袁源见), Wang XQ, Chen C, Zeng HT, He XQ, Cai MT, Yu JB. New progress in research on pharmacological effects of geniposide. *J Trad Chin Veter Med (中兽医医药杂志)* 2019; 38(6): 20–23 (in Chinese).
 - 17 Sun YB (孙源博), Li GQ, Sun LX, Wang YF, Guan LX. Protective effect of Geniposide on renal interstitial fibrosis in rats. *Chin J Mod Med (中国现代医学杂志)* 2019; 29(11): 8–13 (in Chinese).
 - 18 Cao T (曹涛), Zhu HH. Research progress on anti-liver fibrosis based on down-regulation of TGF- β 1/Smad pathway. *Cardiovasc Dis Electr J Integr Tradl Chin Western Med (中西医结合心血管病电子杂志)* 2020; 8(30): 93 (in Chinese).
 - 19 Lang Q, Liu Q, Xu N, Qian K, Qi J, Sun Y, Xiao L, Shi X. The antifibrotic effects of TGF- β 1 siRNA on hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 409(3): 448–453.