

木犀草素对肝星状细胞活化和 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化的抑制作用及机制研究

刁莹,王仲娟,李敏

(苏州大学 生物医学研究院,江苏 苏州 215123)

摘要:[目的]该研究为探讨木犀草素对肝星状细胞活化和 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化的抑制作用及其可能的作用机制.[方法](1)体外利用 CCK-8 及划痕实验检测木犀草素对人肝星状细胞 LX-2 的增殖及迁移的影响;(2)qRT-PCR 及 Western blot 检测木犀草素对 Collagen I、 α -SMA、Smad2 和 p-Smad2 表达的影响;(3)体内利用 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化模型,天狼猩红染色观察小鼠肝组织纤维胶原表达的变化;(4)应用 label-free 蛋白定量技术分析蛋白质的差异表达情况.[结果](1)体外实验结果显示木犀草素对 LX-2 细胞增殖及迁移有显著抑制作用,并下调 Collagen I、 α -SMA、p-Smad2 的蛋白表达;(2)体内实验结果证明木犀草素可显著缓解 CCl₄ 诱导的肝纤维化的发病进程;(3)GO 分析结果显示木犀草素所调控的差异蛋白主要涉及线粒体电子传递、氧化磷酸化等调节过程,KEGG 通路分析显示差异蛋白主要参与 Metabolic、ECM-receptor interaction、PI3K-Akt 等信号通路.[结论]木犀草素通过下调 LX-2 细胞中 TGF- β 1/Smad2 信号通路抑制纤维化进程,并可能还存在其他多种机制,未来深入研究此类调控机制将为木犀草素的临床应用提供支持.

关键词:木犀草素;肝星状细胞;TGF- β 1/Smad2;质谱

中图分类号:R285

文献标志码:A

肝纤维化是肝脏组织周围过度沉积大量胶原蛋白和纤维粘连蛋白等细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)所致,多种细胞及分子均参与纤维化的进程^[1].其中,肝星状细胞(Hepatic Stellate Cell, HSC)的激活是肝纤维化发展中的一个重要过程^[2].肝损伤会诱导 HSC 活化,导致其基因表达的改变,引起细胞增殖和迁移,同时 HSC 可转化为表达大量 α -平滑肌肌动蛋白(Smooth Muscle- α , α -SMA)的肌成纤维细胞,产生大量的胶原蛋白和其他 ECM 分子,并分泌促炎细胞因子等加重后续免疫细胞浸润进而促进纤维化发生^[3-4].转化生长因子- β 1(Transforming Growth Factor- β 1, TGF- β 1)是转化生长因子家族的一员,这个家族的细胞因子对于细胞分化、增殖、凋亡和迁移有着广泛的影响,也是一种重要的促纤维化信号因子,参与包括肝脏在内的多种器官的纤维化形成的启动和维持.TGF- β 1 特异性细胞表面受体具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性,Smad 家族的转录因子是 TGF- β 1 受体激酶的直接底物,TGF- β 1 受体复合物被激活后,可诱导多个 Smads 蛋白的磷酸化^[5],因此寻找新的靶向 TGF- β 1/Smad 通路天然化合物是当前开发抗纤维化药物的有效途径之一.

木犀草素(Luteolin),全称 3,4,5,7-四羟基黄酮,是一种常见的黄酮类化合物,存在于多种植物中如药草、水果和蔬菜^[6].富含木犀草素的植物在中国传统医学记载中认为可用于治疗多种疾病,如炎症性疾病、癌症和高血压^[7].现有研究显示木犀草素除抗炎及抗癌活性外,也具有一定的抗氧化及自由基清除能力^[8-10].同时有临床应用研究也表明含有木犀草素和浓缩木犀草素提取液未发生显著不良反应^[11].目前有大量研究

收稿日期:2022-06-11;修回日期:2022-07-28.

基金项目:国家自然科学基金(82171813).

作者简介:刁莹(1987-),女,江苏泰兴人,苏州大学助理研究员,研究方向为分子与免疫,E-mail:ydiao@suda.edu.cn;

王仲娟(1986-),女,山东日照人,苏州大学助理研究员,研究方向为肿瘤与免疫,E-mail:wangzhongjuan@suda.edu.cn.

通信作者:李敏,E-mail:min_lzju@126.com.

表明木犀草素对多种纤维化疾病,如肾脏、肺脏及肝纤维化均有保护作用,但其深入的分子调控机制值得探讨.本实验体外采用 LX-2 细胞为研究对象,体内使用 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维化模型,进一步明确木犀草素对肝纤维化的保护作用,并探讨其对于 LX-2 中 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响并寻找其抗肝纤维化的其他可能调控机制,为木犀草素的临床应用提供部分科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料

LX-2 人肝星状细胞系,由本实验室保存.木犀草素购自上海源叶生物科技有限公司,蛋白定量试剂盒、SDS 凝胶试剂盒、细胞裂解液、购自弗德生物科技有限公司.蛋白酶抑制剂购自罗氏试剂生物有限公司, TGF- β 购自 Peprotech.体积分数 4% 多聚甲醛、DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶消化液和青链霉素购自美国 HyClone, Collagen I、 α -SMA、Smad2、p-Smad2、 β -Actin 和 GAPDH 相关抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司.

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 增殖与细胞划痕实验

将 LX-2 细胞以每孔 2×10^4 个接种于 96 孔板中,或以每孔 4×10^5 个接种于 6 孔板中,同时将细胞分为 4 组,分别为对照组、TGF- β 1(10 $\mu\text{g/L}$)刺激组,TGF- β 1(10 $\mu\text{g/L}$)与木犀草素处理组(12.5、25 $\mu\text{mol/L}$),待细胞密度达 80% 左右,加入这些药物处理 48 h 后以每孔 20 μL CCK-8 试剂加入 96 孔板,检测 OD450 值;或用 200 μL 无菌枪头在药物处理之前于 6 孔板中均匀画横线,48 h 后,对划痕进行显微镜拍照.

1.2.2 逆转录、荧光定量 PCR 与 Western blot 检测

将 LX-2 细胞以每孔 4×10^5 个接种于 6 孔板中,同时将细胞分为 4 组,分别为对照组、TGF- β 1(10 $\mu\text{g/L}$)刺激组,TGF- β 1(10 $\mu\text{g/L}$)与木犀草素处理组(12.5、25 $\mu\text{mol/L}$),待细胞密度达 80% 左右,加入这些药物处理 24 h. Trizol 法提取总 RNA,按照逆转录试剂盒对总 RNA 进行逆转录处理.逆转录程序为:1)37 $^\circ\text{C}$, 15 min;2)85 $^\circ\text{C}$, 5 s.按荧光定量 PCR 试剂盒进行操作.荧光定量 PCR 反应条件为:1)95 $^\circ\text{C}$, 2 min;2)95 $^\circ\text{C}$, 5s;3)60 $^\circ\text{C}$, 34s;40 个循环.引物序列如下, Collagen I: Forward 5'-ATTTTCTGDCGACACCCGAT-3', Reverse 5'-TCCCAGGTGTAGACCAA-3'; α -SMA: Forward 5'-ATTTTGTCCCGATACCCGAT-3', Reverse 5'-TGACCGTCATAGACCAA-3'; β -Actin: Forward 5'-ATTTTGTACACACAATGC-3', Reverse 5'-TGACCGGTGTCCCTGACGAT-3'.

将 LX-2 细胞以每孔 4×10^5 个接种于 6 孔板中,分组同前,药物处理 24 h 后加入 RIPA 裂解液(含有体积分数 1% 蛋白酶抑制剂)冰上裂解 30 min,高速离心机 4 $^\circ\text{C}$, 12 000 r/min 离心 15 min 后吸取上层蛋白.蛋白定量完成后加上样缓冲液,沸水煮 10 min.电泳结束后进行转膜,随后用脱脂牛奶进行封闭, PBST 清洗,均为 1:1 000 体积稀释一抗(collgenI、 α -SMA、Smad2、P-Smad2、 β -Actin、GAPDH),4 $^\circ\text{C}$ 过夜.第 2 天用冷 PBS 清洗条带 3 次,二抗孵育 1 h,化学发光仪发光拍照.

1.2.3 CCl_4 小鼠肝纤维化模型与天狼猩红染色

C57 小鼠分组,分为 PBS 组和木犀草素治疗组,每组 6 只. CCl_4 和橄榄油(2:3)按比例混匀,每周 2 次腹腔注射,每只小鼠注射 100 μL ,注射剂量 3 mL/kg,连续注射 6 周. CCl_4 注射 4 周后,木犀草素组灌胃给药 100 mg/kg,每周 3 次给药,连续给药 2 周.2 周后处死所有小鼠,取小鼠肝脏并固定在体积分数 4% 多聚甲醛中.

中性甲醛液固定组织,石蜡切片,常规脱蜡至水.天狼猩红染色 50 min.蒸馏水洗 3 次.梯度乙醇脱水.二甲苯透明,中性树胶封固.染色的结果胶原呈红色.

1.2.4 质谱样本处理与检测

将 LX-2 细胞以每孔 4×10^5 个接种于 6 孔板中,分为 TGF- β 1(10 $\mu\text{g/L}$)刺激组,TGF- β 1(10 $\mu\text{g/L}$)与木犀草素(25 $\mu\text{mol/L}$)处理组,给药处理 24 h,将处理好的 LX-2 细胞进行收集,用预冷的 PBS 洗涤 2 遍.细胞中加入含 8 mol/L 尿素、1% 蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液进行超声裂解,离心取上清.向蛋白质溶液中加入终

浓度为 5 mmol/L 的 DTT, 60 °C 条件下孵育 30 min 进行还原. 加入 15 mmol/L 的 IAA 烷基化. 然后向上述体系中加入 25 mmol/L 的 NH₄HCO₃ 溶液置换出尿素. 将胰蛋白酶和蛋白按 1 : 50 的质量比加入胰酶, 37 °C 酶切过夜. 将 10% TFA 加入消化后的样本中终止消化, BCA 测蛋白浓度. 将该样品溶液过 C18 除盐小柱后收集滤液, 在离心浓缩仪中常温旋干.

除盐纯化后的多肽样品通过 Orbitrap Fusion Lumos 三合一质谱仪进行检测. 设置质谱检测分析条件: 阳离子采集模式; 一级质谱扫描分辨率为 60 000; 高能碰撞解离(HCD)设置为 15; 二级质谱碰撞能量为 30%. 自动采集各多肽信息, 获得其二级谱图.

1.2.5 数据分析

将 UniProt 人源蛋白质数据库导入 Proteome Discoverer 2.2(Thermo Fisher)软件中, 将 MS/MS 图谱数据输入数据库进行检索, 检索方法参考文献[13], 基于 Label Free 定量(LFQ)在软件中表示为肽量化蛋白质丰度, 将木犀草素组与对照组均值之比 ≤ 0.5 且 $P < 0.05$ 定义为蛋白表达量下调. 所有数据均经 Graph-Pad Prism 9 软件统计分析, 组间比较用 t 检验.

2 结果

2.1 木犀草素显著抑制 LX-2 细胞的增殖

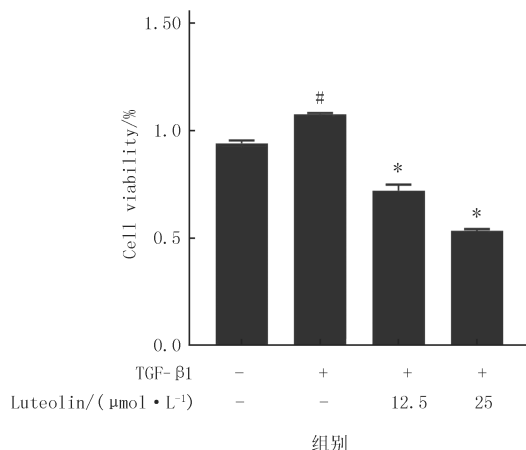
为了验证木犀草素是否能影响肝星形细胞的增殖, 选择人肝星形细胞系 LX-2 作为研究对象, 其具有肝星状细胞的典型特点. CCK8 实验结果显示(图 1): 与未处理的对照组相比, 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1 处理可促进 LX-2 细胞增殖($P < 0.05$); 而木犀草素可显著抑制 LX-2 的增殖($P < 0.05$), 且这种抑制作用具有剂量依赖性.

2.2 木犀草素可明显抑制 LX-2 细胞迁移

图 2 所示, 木犀草素处理可显著抑制 LX-2 的迁移, 这提示木犀草素可通过影响 LX-2 迁移修复能力从而抑制纤维化进程.

2.3 木犀草素可明显抑制 α -SMA、Collagen I 的 mRNA 水平表达

LX-2 细胞活化后会明显增加 α -SMA 及胶原的生成量, 从而促进纤维化. 为研究木犀草素对 LX-2 的活化有无影响, 在 TGF- β 1 刺激条件下给予木犀草素处理 LX-2 细胞, 提取细胞 RNA, 逆转录及荧光定量 PCR 检测相关基因的表达. 结果如图 3 所示, 木犀草素处理可在 mRNA 水平下调 LX-2 细胞 Collagen I 和 α -SMA 表达.



与对照组比较, $^{\#}P < 0.05$, 与TGF- β 1刺激组比较, $^*P < 0.05$.

图1 木犀草素对TGF- β 1激活的LX-2细胞的作用

Fig.1 Effect of luteolin on LX-2 cell stimulated by TGF- β 1

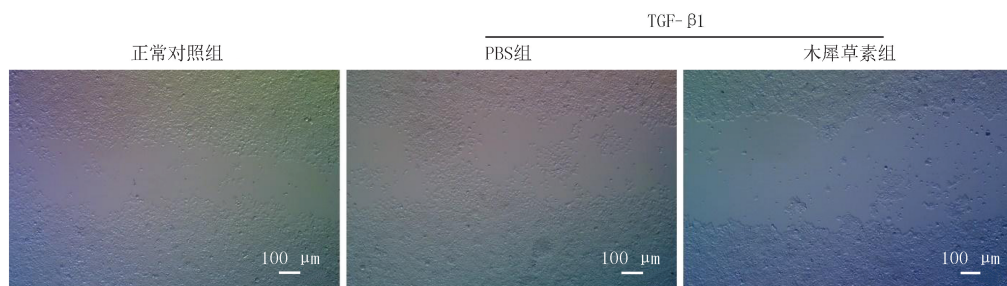


图2 木犀草素对LX-2细胞迁移的影响

Fig.2 Effect of luteolin on LX-2 cell migration

2.4 木犀草素可抑制 LX-2 细胞 N-cadherin、Collagen I、 α -SMA 蛋白表达及 Smad2 磷酸化

接下来为了进一步明确木犀草素对 LX-2 细胞转分化以及释放 ECM 等的影响,在蛋白水平上验证了其 对相关指标的影响.如图 4(a,b)所示,与 mRNA 结果变化一致,木犀草素可明显抑制 Collagen I 和 α -SMA 的蛋白表达,且具有剂量依赖性.考虑到 Smads 的磷酸化是 TGF- β 1下游激活的重要标志,我们检测了木犀草素对 Smads 磷酸化的影响.结果如图 4(c,d)所示,木犀草素显著抑制了 Smad2 Ser-465/467 位点的磷酸化水平,这表明木犀草素很有可能是通过抑制 TGF- β 1/Smads 信号通路来抑制 LX-2 的活化.此外,验证了木犀草素对上皮转分化的重要标志物 N-cadherin 的表达影响,结果如图 5 所示,木犀草素可明显抑制 N-cadherin 的表达,这提示木犀草素也可通过抑制上皮转分化来抑制细胞侵袭等来影响纤维化.

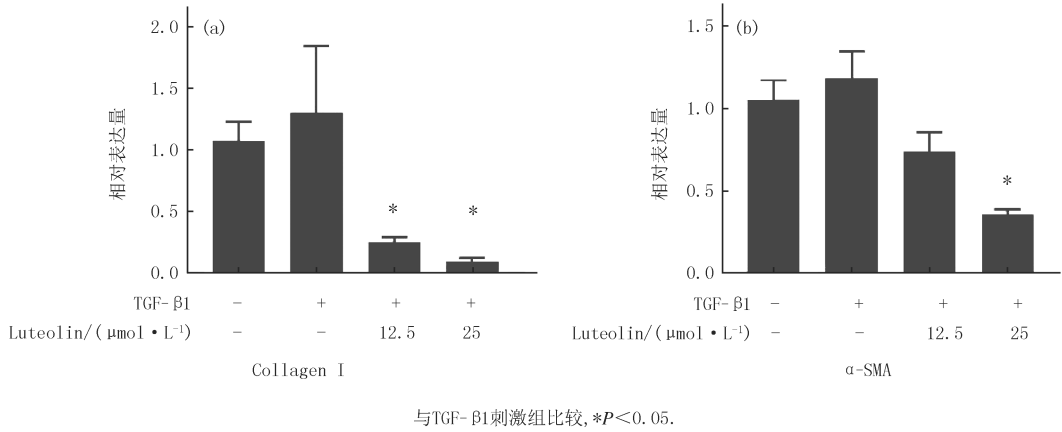


图3 木犀草素抑制LX-2细胞中Collagen I和 α -SMA mRNA表达

Fig.3 Effects of Luteolin on Collagen I and α -SMA mRNA expression in LX-2 cells stimulated by TGF- β 1

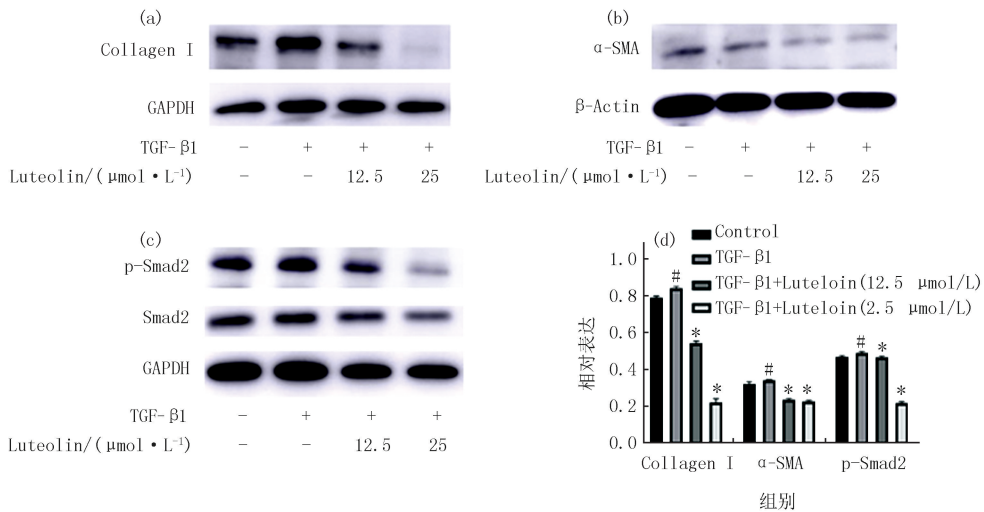
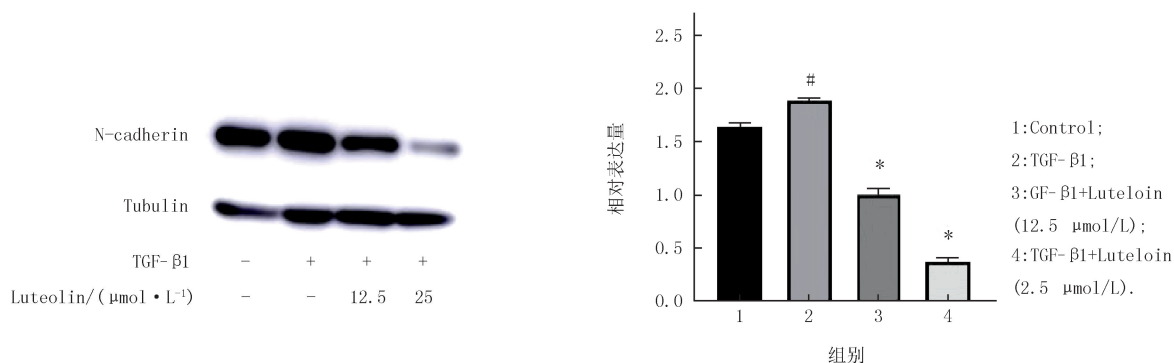


图4 木犀草素对TGF- β 1刺激状态下LX-2细胞中相关纤维蛋白以及smad2磷酸化的影响

Fig.4 Effects of Luteolin on related fibrin and Smad2 phosphorylation in LX-2 cells stimulated by TGF- β 1

2.5 木犀草素可明显延缓 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维肝组织的进程

使用 CCl₄ 诱导小鼠肝纤维化模型,进一步在体内明确木犀草素对肝纤维化的保护作用.如图 6 所示,天狼猩红染色显示正常组小鼠的肝小叶结构正常,仅在汇管区和中央静脉有少量胶原纤维;CCl₄ 建模组小鼠的肝组织中胶原纤维沉积,形成一个连续的网状结构,浸润肝实质,失去正常的小叶结构,可见明显染色成红色的纤维间隔;在 CCl₄ 建模 4 周后,给予木犀草素处理 2 周,明显减少了小鼠肝组织的胶原纤维沉积,维持肝小叶结构完整,提示木犀草素显著延缓了 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化进程.



与对照组比较, # $P < 0.05$, 与TGF-β1刺激组比较, * $P < 0.05$.

图5 木犀草素对TGF-β1刺激状态下LX-2细胞中N-cadherin蛋白的影响

Fig.5 Effects of Luteolin on related N-cadherin in LX-2 cells stimulated by TGF-β1

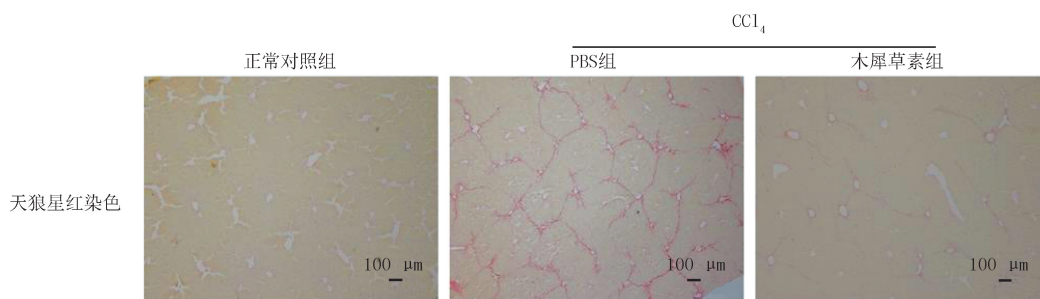


图6 木犀草素可延缓小鼠肝纤维化进程

Fig.6 Luteolin improves liver injury in mice

2.6 木犀草素对下调差异表达蛋白的 GO 注释分析及 KEGG 通路分析

用 Orbitrap Fusion Lumos 三合一超高分辨质谱仪分析了木犀草素处理组与 PBS 处理组 LX-2 细胞所表达的蛋白差异,结果显示两组细胞中共鉴定出 3 511 个蛋白,其中有 81 个蛋白表达下调.GO 分析结果显示,下调差异蛋白主要参与线粒体电子传递、氧化磷酸化、受体介导的内吞作用的调节、血管生成和形态发生、ATP 代谢过程、细胞骨架组织的调节等生物学过程;差异蛋白主要定位在基膜、线粒体膜间隙、高尔基体、胞质囊腔和细胞外基质等细胞器上;在分子功能方面,差异蛋白主要涉及氧化还原驱动活性跨膜转运蛋白活性、电子转移激活、细胞外基质结构成分、激活结构分子等活性(附图 I)。

通过 KEGG 数据库对下调差异表达蛋白进行通路富集分析,发现木犀草素处理组的差异蛋白主要涉及其中 66 条信号通路,包含 Metabolic、ECM-receptor interaction、PI3K-Akt、Oxidative phosphorylation、AGE-RAGE、mTOR 等信号通路(附图 II)。

3 讨论

肝纤维化是由病毒、酒精、自身免疫等多种原因引起肝细胞发生炎症坏死,从而导致肝星状细胞激活转化、细胞外基质的合成增加与降解减少而大量沉积在细胞间质中形成的.有研究证明肝纤维化及肝硬化早期是可逆转的,但后期进展为肝硬化终末期则不可逆转,甚至可能发展为肝癌^[14].肝纤维化是慢性肝病的重要环节,严重威胁人类的健康,因而不断寻找有效阻断甚至逆转肝纤维化的治疗方法迫在眉睫.肝纤维化发病机制的相关研究显示肝星状细胞的激活与转化在肝脏纤维化中起着关键作用.而转化生长因子 TGF-β1,在肝脏纤维化形成的过程中起着非常重要的作用,其中 TGF-β1/Smad 信号通路则被认为是刺激 HSC 活化、增殖的关键信号通路^[15].因此,抑制 TGF-β1 信号通路是一种很有前景的抗纤维化方法。

木犀草素具有较强的抗氧化能力,自由基清除能力,抗炎作用和抗癌活性,但其抗纤维化作用及机制还

未明确阐明^[12,16],但本研究认为木犀草素作为一个天然化合物,很可能还存在影响其他通路的分子机制.本研究表明木犀草素可以有效抑制 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞的活化及 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化.实验结果显示木犀草素可以抑制 TGF- β 1 诱导后 LX-2 细胞的增殖,并抑制 TGF- β 1 诱导后 EMC 成分 Collagen I 及 α -SMA 的 mRNA 和蛋白水平的表达,通过 western blot 显示木犀草素抑制 Smad2 的 ser465/467 磷酸化位点的表达.天狼猩红染色结果显示木犀草素可以显著改善 CCl₄ 诱导的肝组织学变化,说明木犀草素可以抑制 TGF- β 1 诱导的 LX-2 的 TGF- β 1/Smad 信号通路,从而抑制其纤维化水平.为进一步探讨木犀草素参与肝纤维化的机制,本研究采用 Orbitrap Fusion Lumos 三合一超高分辨质谱仪对两组细胞蛋白进行了分析,共鉴定出 3 511 个蛋白,其中有 81 个蛋白表达下调.差异表达的蛋白对抑制细胞纤维化无疑起到重要的作用.GO 注释和 KEGG 信号富集分析在生物信息学应用中有重要的作用^[17].GO 注释表明下调差异蛋白主要参与线粒体电子传递、氧化磷酸化、受体介导的内吞作用的调节、血管生成和形态发生、ATP 代谢过程、细胞骨架组织的调节等生物学过程.KEGG 通路分析下调差异蛋白主要参与了代谢途径、多种神经疾病、ECM 与细胞的相互作用、氧化磷酸化、内吞作用、PI3K-Akt、mTOR 等信号通路.

综上所述,本研究进一步明确了木犀草素对小鼠肝纤维化的保护作用,验证了其可能通过木犀草素 TGF- β 1/smad2 信号通路从而影响肝星形细胞活化释放 ECM 以及抑制迁移、转分化等几个方面来肝纤维化.此外,通过质谱组学分析提示木犀草素很可能还通过影响代谢等多种通路调节肝纤维化,而阐明其中可能的机制对木犀草素的临床应用具有重要的指导意义.

作者贡献:刁莹和王仲娟为共同第一作者.

附 录

附图 I、II 见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.05.016).

参 考 文 献

- [1] HERNANDEZ-GEA V, FRIEDMAN S L. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annual Review of Pathology, 2011, 6: 425-456.
- [2] 李天阳, 涂正坤, 苏立山. 自然杀伤细胞对肝星状细胞的调控及其在肝纤维化中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(3): 558-562.
LI T Y, TU Z K, SU L S. Regulatory effect of natural killer cells on hepatic stellate cells and their role in liver fibrosis[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2017, 33(3): 558-562.
- [3] LEE U E, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2011, 25(2): 195-206.
- [4] 王曼, 鄢丹, 孟波, 等. 基于非标记定量技术的肝细胞癌血浆蛋白质组学研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2022, 50(1): 115-122.
WANG M, YAN D, MENG B, et al. Plasma proteomic analysis of hepatocellular carcinoma based on label-free quantitative technology[J]. Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition), 2022, 50(1): 115-122.
- [5] SHI Y F, ZHANG Q, CHEUNG P Y, et al. Effects of rhDecorin on TGF-beta1 induced human hepatic stellate cells LX-2 activation[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1760(11): 1587-1595.
- [6] LÓPEZ-LÁZARO M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin[J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2009, 9(1): 31-59.
- [7] HARBORNE J B, WILLIAMS C A. Advances in flavonoid research since 1992[J]. Phytochemistry, 2000, 55(6): 481-504.
- [8] SEELINGER G, MERFORT I, SCHEMPP C M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin[J]. Planta Medica, 2008, 74(14): 1667-1677.
- [9] LI Z Y, ZHOU Y M, ZHANG N, et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models[J]. Planta Medica, 2007, 73(3): 221-226.
- [10] UEDA H, YAMAZAKI C, YAMAZAKI M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of Perilla frutescens[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(9): 1197-1202.
- [11] TALIOU A, ZINTZARAS E, LYKOURAS L, et al. An open-label pilot study of a formulation containing the anti-inflammatory flavonoid luteolin and its effects on behavior in children with autism spectrum disorders[J]. Clinical Therapeutics, 2013, 35(5): 592-602.
- [12] LI J, LI X X, XU W H, et al. Antifibrotic effects of luteolin on hepatic stellate cells and liver fibrosis by targeting AKT/mTOR/p70S6K and TGF β /Smad signalling pathways[J]. Liver International, 2015, 35(4): 1222-1233.
- [13] 吴昱杰, 王智博, 李瑛, 等. 慢性心力衰竭气虚血瘀证及复方人参补气颗粒干预机制的蛋白质组学研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(19): 5052-5063.

- WU Y J, WANG Z B, LI Y, et al. Chronic heart failure due to Qi deficiency and blood stasis and intervention mechanism of Compound Renshen Buqi Granules: a proteomics-based study[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2021, 46(19): 5052-5063.
- [14] SOHRABPOUR A A, MOHAMADNEJAD M, MALEKZADEH R. Review article: the reversibility of cirrhosis[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2012, 36(9): 824-832.
- [15] INAGAKI Y, OKAZAKI I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis[J]. *Gut*, 2007, 56(2): 284-292.
- [16] 李星霞, 李婕, 王绍展, 等. 木犀草素对肝纤维化进程中肝细胞上皮间质转化的抑制作用[J]. *中国药房*, 2014, 25(19): 1729-1732.
LI X X, LI J, WANG S Z, et al. Inhibitory effect of luteolin on epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes in hepatic fibrosis process [J]. *China Pharmacy*, 2014, 25(19): 1729-1732.
- [17] CHEN L, ZHANG Y H, LU G H, et al. Analysis of cancer-related lncRNAs using gene ontology and KEGG pathways[J]. *Artificial Intelligence in Medicine*, 2017, 76: 27-36.

Study on the mechanism of luteolin effect on the inhibition of hepatic stellate cell activation and CCl₄-induced liver fibrosis in mice

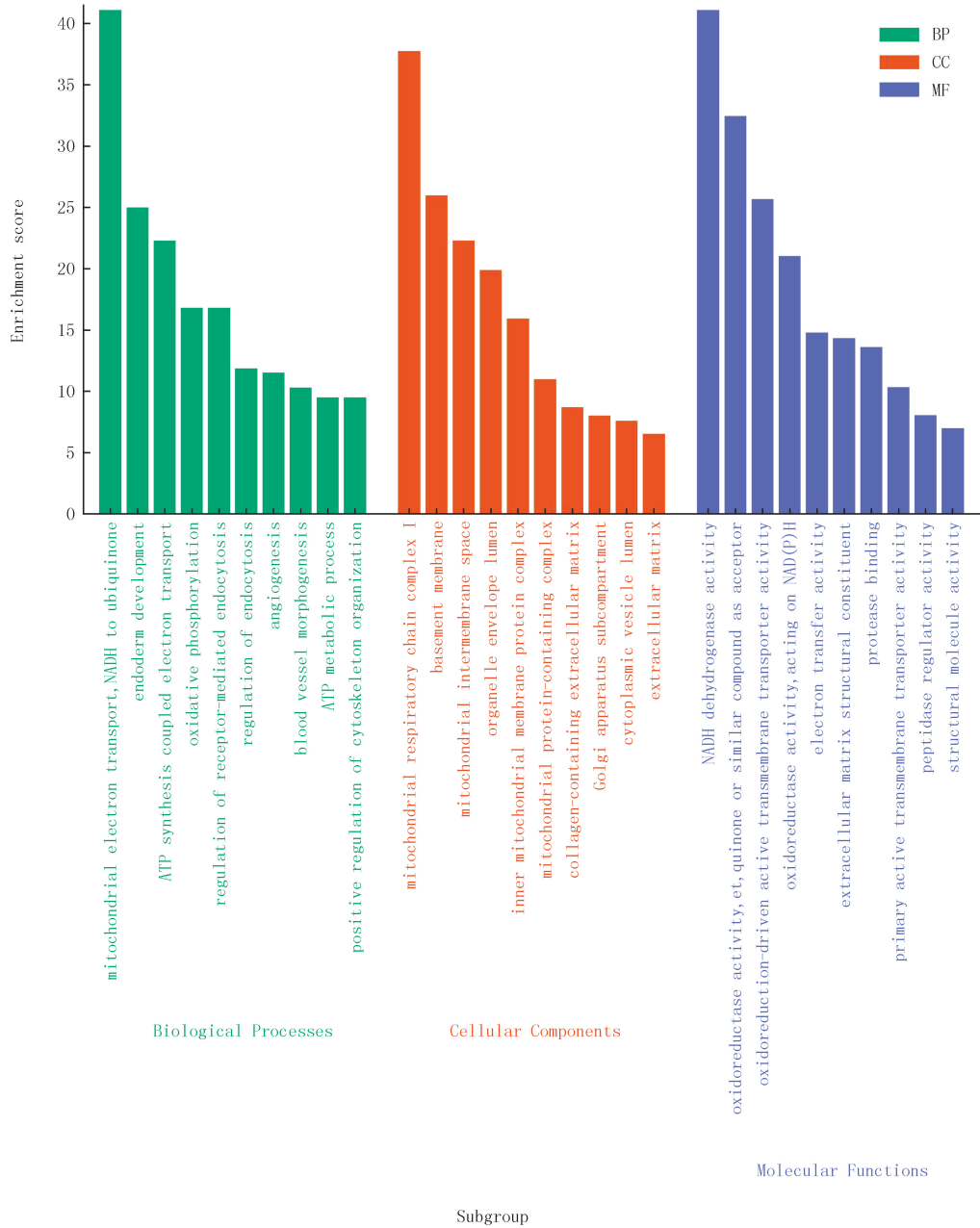
Diao Ying, Wang Zhongjuan, Li Min

(Institutes of Biology and Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: [Objective] In order to investigate the effect and mechanism of luteolin on liver fibrosis in vitro and in vivo. [Methods] (1) CCK-8 and scratch experiment was used to detect the activity of LX-2 cells under normal conditions and TGF- β 1 activation; (2) qRT-PCR and western blot detected the effects of luteolin on Collagen I, α -SMA, Smad2 and p-Smad2 expression; (3) CCl₄-induced liver fibrosis in mice. Masson staining was used to observe the changes of fibrous collagen expression in mice before and after administration. (4) Label-free protein quantification was used to analyze differential expression of proteins. [Results] (1) The vitro experiments showed that luteolin inhibited LX-2 proliferation, and significantly inhibited the expression of Collagen I, α -SMA, Smad2, p-Smad2. (2) Animal experiments showed that luteolin could effectively improve CCl₄-induced liver injury and liver function damage. (3) GO analysis indicated down-regulated differential proteins mainly involved in mitochondrial electron transfer, oxidative phosphorylation regulation, KEGG pathway analysis showed that the differential proteins were mainly involved in Metabolic, ECM-receptor interaction, PI3K-Akt and other signaling pathways. [Conclusion] The result shows that luteolin can inhibit fibrosis of human hepatic stellate cells by inhibiting the TGF- β / smad2 signaling pathway.

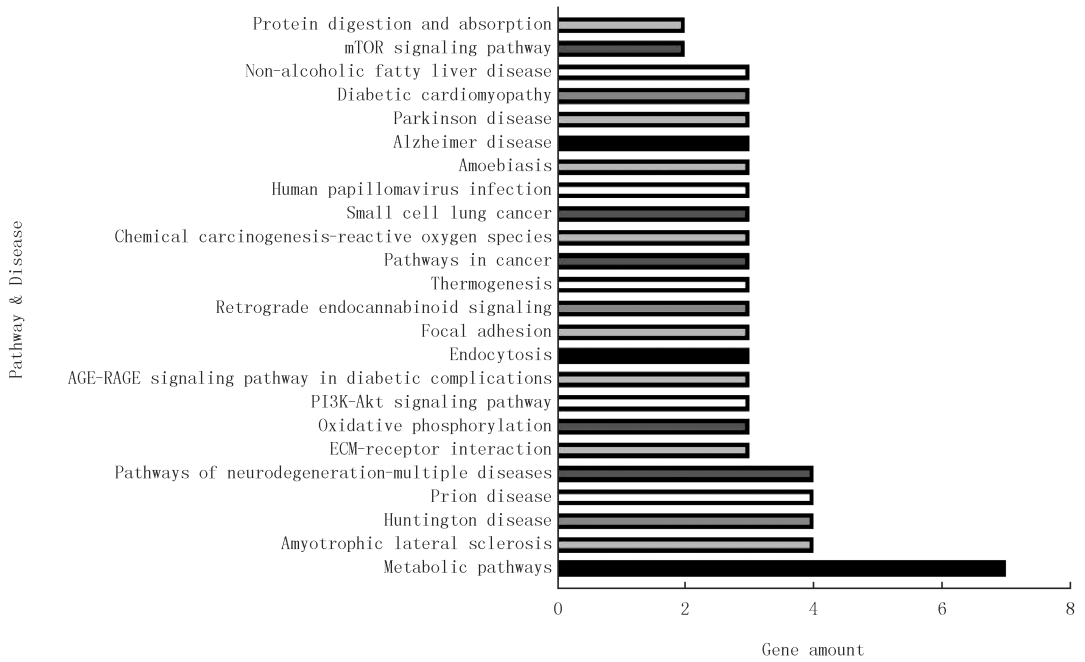
Keywords: luteolin; Liver fibrosis; TGF- β 1/Smad2; mass spectrum

[责任编辑 刘洋 杨浦]



附图 I 差异蛋白在细胞成分、分子功能及生物学过程的基因本体分析

Attached fig. I Gene ontology enrichment of up-regulated and down-regulated proteins involved in cell component, molecular function and biological process



附图II KEGG通路分析
Attached fig. II KEGG pathways