

[药 理]

湿生扁蓿总黄酮通过调控 TGF-β/Smad 和自噬相关通路对 NCM460 细胞上皮间质转化的影响

柳 娜， 刘越敏， 薄双琴， 陈 晖， 张尚智， 景 明*
(甘肃中医药大学，甘肃 兰州 730000)

摘要：目的 探讨湿生扁蓿总黄酮介导 TGF-β/Smad 和自噬相关通路对 NCM460 细胞上皮间质转化（EMT）的影响。
方法 采用 2.5 μg/mL 脂多糖（LPS）持续干预细胞 14 d 建立 EMT 模型，CCK-8 法筛选最佳湿生扁蓿总黄酮给药剂量。设计空白组、模型组、吡菲尼酮组（200 μg/mL）和湿生扁蓿总黄酮低、中、高剂量组（50、100、200 μg/mL），采用 Western blot 法检测细胞 ZO-1、α-SMA、Beclin-1、P62、Bcl-2、LC3B 蛋白表达，RT-qPCR 法检测细胞 ZO-1、α-SMA、TGF-β1、Smad2、Smad3、Snail1 mRNA 表达，免疫荧光观察细胞中 α-SMA 表达，TUNEL 染色观察细胞凋亡情况，MDC 染色和透射电镜分别观察细胞中自噬囊泡和自噬小体数目。**结果** 湿生扁蓿总黄酮质量浓度小于 200 μg/mL 时对细胞活率无明显影响（*P*>0.05），故选择 50、100、200 μg/mL 为低、中、高剂量组。与空白组比较，模型组细胞 ZO-1、Beclin-1、Bcl-2、LC3- II/LC3- I 蛋白和 ZO-1 mRNA 表达降低（*P*<0.01），α-SMA、TGF-β1、Smad2、Smad3、Snail1 mRNA 和 α-SMA、P62 蛋白表达升高（*P*<0.01）；与模型组比较，湿生扁蓿总黄酮组均能改善以上指标（*P*<0.05，*P*<0.01）。**结论** 湿生扁蓿总黄酮能抑制 NCM460 细胞 EMT 发生进程，其机制可能与抑制 TGF-β/Smad 通路和增强细胞自噬有关。

关键词：湿生扁蓿总黄酮；上皮间质转化；自噬；TGF-β/Smad 信号通路
中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2023)08-2509-10
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.08.010

Effects of Xanthenes from *Gentianopsis paludos* on epithelial-mesenchymal transition of NCM460 cells via TGF-β/Smad and autophagy-related pathways

LIU Na, LIU Yue-min, BO Shuang-qin, CHEN Hui, ZHANG Shang-zhi, JING Ming*
(Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of TGF-β/Smad and autophagy-related pathway mediated by xanthenes from *Gentianopsis paludos* on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of NCM460 cells. **METHODS** The EMT models were established by 14 days consecutive use of 2.5 μg/mL lipopolysaccharide (LPS) in the NCM460 cells, and the most optimal dosage of *G. paludos* xanthenes was determined by CCK-8 method. NCM460 cells assigned into the blank group, the model group, the pirfenidone group (200 μg/mL) and *G. paludos* xanthenes groups (50 μg/mL in low-dose group, 100 μg/mL in medium-dose group, and 200 μg/mL in high-dose group) had their protein expressions of ZO-1, α-SMA, Beclin-1, P62, Bcl-2, and LC3B detected by Western blot; their mRNA expressions of ZO-1, α-SMA, TGF-β1, Smad2, Smad3, and Snail1 detected by RT-qPCR; their α-SMA expressions observed by immunofluorescence; their apoptosis observed by TUNEL staining; and their number of autophagy vesicles and autophagy bodies observed by MDC staining and transmission electron microscopy respectively. **RESULTS** *G. paludos* xanthenes at concentrations lower than 200 μg/mL made no obvious impact on the cell viability (*P*>0.05), therefore 50, 100 and 200 μg/mL were selected as the low, medium and high

收稿日期: 2022-10-27
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860788, 82160854); 兰州市人才创新创业项目 (2019-RC-1017)
作者简介: 柳 娜 (1994—), 女, 博士生, 研究方向为中药制剂工艺。Tel: 18794855896, E-mail: 1204178785@qq.com
*通信作者: 景 明 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中藏药资源的开发与利用研究。Tel: 13919026589, E-mail: 1339512509@qq.com

dosages. Compared with the blank group, the model group displayed decreased expressions of ZO-1, Beclin-1, Bcl-2, LC3-II/LC3-I proteins and ZO-1 mRNA ($P<0.01$); increased expressions of α -SMA, TGF- β 1, Smad2, Smad3 and Snail1 mRNA and α -SMA and P62 proteins ($P<0.01$); increased cell apoptosis ($P<0.01$), and decreased number of autophagic vesicles and autophagosomes ($P<0.01$). Compared with the model group, *G. paludos* xanthones groups shared improvement in terms of all aforementioned indices levels ($P<0.05$, $P<0.01$).
CONCLUSION *G. paludos* Xanthones can inhibit the EMT progression in NCM460 cells, and its mechanism may lie in its inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway and enhancement of autophagy.

KEY WORDS: Xanthones from *Gentianopsis paludosa*; epithelial-mesenchymal transition; autophagy; TGF- β /Smad signaling pathway

肠纤维化是慢性肠炎引起的肠道内肌成纤维细胞增加和胶原沉积的过程，长此以往会引起肠腔狭窄，肠壁增厚，从而导致结肠动力异常、肠梗阻等^[1]。近年来，临床上在治疗肠炎方面取得了可观的进展，但在治疗肠纤维化方面却见效甚微。在肠纤维化的始发期，上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）发挥了关键作用，具体指肠上皮细胞经 EMT 转化而来的肌成纤维细胞可产生大量富含胶原蛋白的细胞外基质（extracellular matrix, ECM）可促进纤维化形成^[2]，从而导致肠纤维化发生。TGF- β 1 是一种可调节细胞过程和 ECM 的多功能细胞因子，研究发现，在肝纤维化、肾纤维化、心肌纤维化等多种纤维化病理模型中，抑制 TGF- β 1 或其下游信号通路可抑制纤维化进程^[3-6]。自噬是细胞在感受外界刺激的一种自我应激保护，有研究称细胞自噬调节异常与肠炎的易感性密切相关，且部分肠炎的治疗药物参与了自噬调节^[7-8]。湿生扁蕾 *Gentianopsis paludosa* Ma 为龙胆科扁蕾属植物，具有清热利湿、健脾止泻等作用^[9]。吡酮是存在于多种药用植物中的一种酚类化合物，具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种生物活性^[10-12]。课题组前期研究发现，湿生扁蕾吡酮部位对 TNBS 诱导的大鼠溃疡性结肠炎模型具有良好药效^[13-16]。基于前期研究，本研究将深入探讨湿生扁蕾总吡酮部位对肠上皮细胞 EMT 模型的影响和作用机制，以期为临床治疗肠纤维化提供新思路。

1 材料

1.1 细胞 人正常结肠上皮细胞 NCM460 细胞株购于北京北纳创联生物技术研究院。
1.2 药物与试剂 湿生扁蕾药材于 2021 年 8 月采自甘肃省定西市漳县大草滩，经甘肃中医药大学定西校区张尚智教授鉴定为龙胆科扁蕾属一年生草本植物湿生扁蕾 *Gentianopsis paludosa* (Hook. f.) Ma,

湿生扁蕾总吡酮由本实验室自制^[17]，纯度 $\geq 51\%$ 。吡菲尼酮（货号 S290702，美国 Selleck 公司）；脂多糖（lipopolysaccharides, LPS）、二甲基亚砜（DMSO）（货号 408Z033、520C031，北京索莱宝科技有限公司）；胰蛋白酶、胎牛血清（FBS）、TRIeasy™总 RNA 提取试剂、Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix [货号 T9021630、504050519、10606ES60、11123ES60、11203ES08，翌圣生物科技（上海）股份有限公司]；RPMI-1640 培养基（货号 AF32246309，美国 HyClone 公司）；anti-Beclin-1 抗体、anti-GAPDH 抗体（货号 AB207612、AB37168，英国 Abcam 公司）；anti-p62 抗体（货号 55274-1-AP，美国 Proteintech 公司）；anti-LC3B 抗体（货号 BM4827，武汉博士德生物工程有限公司）。

1.3 仪器 RX50 生物显微镜 [舜宇光学（北京）仪器有限公司]；DYCZ-40G 转膜仪、DYCZ-25D 电泳仪、DYY-6D 电源（北京六一生物科技有限公司）；Stepone Plus 实时定量 PCR 仪、细胞培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；TDZ4-WS 低速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；GR60DR 全自动高压灭菌锅（美国 ZEALWAY 公司）。

2 方法

2.1 药物制备 湿生扁蕾总吡酮：称取粉碎过筛的湿生扁蕾药材约 500 g，加 8 倍量 95% 乙醇浸泡过夜，加热回流提取 2 h，放冷后过滤，取滤渣再次加 8 倍量 95% 乙醇加热回流提取 2 h，放冷后过滤，合并 2 次滤液，减压回收乙醇后浓缩为生药量 1.5 g/mL 的浸膏。浸膏加入适量去离子水制成混悬液，分别用乙酸乙酯萃取，回收溶剂，制成浸膏后采用 DM130 大孔树脂纯化，得到湿生扁蕾吡酮粉末，密封，低温保存，备用。称取 100 mg 吡酮

粉末，加入 0.25 mL DMSO 溶解，用无菌滤器过滤，取 10 μ L DMSO 含药溶液，用完全培养基稀释成 0.4 mg/mL，分装，低温保存备用。

吡菲尼酮：吡菲尼酮是一种具有广谱抗纤维化的吡啶酮类化合物，目前已被多个国家纳入抗纤维化疾病的一线药物范畴^[18]，故本研究将其作为阳性对照药物。精密称取吡菲尼酮粉末 15 mg，溶于 0.05 mL DMSO 中，吸取 10 μ L 用完全培养基稀释至 0.3 mg/mL，用无菌滤器过滤后低温保存备用。

2.2 细胞培养 NCM460 细胞使用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基，于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 加湿培养箱中培养，待细胞生长至对数生长期且融合度达 90% 时，用 PBS 清洗后加入适量 0.25% 胰蛋白酶消化细胞 1 min，加入适量完全培养基终止消化，转移至 15 mL 离心管中，1 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，加入完全培养基，轻轻吹打细胞至均匀后，以 1 : 3 比例传代至新的培养瓶即可。

2.3 细胞 EMT 模型建立及给药 取对数生长期 NCM460 细胞，调整密度为 1×10^5 /mL，每孔 200 μ L 接种于 96 孔板中，培养 24 h 后弃上清液，设置空白组、模型组、吡菲尼酮组（200 μ g/mL）和湿生扁蕾总皂酮低、中、高剂量组（50、100、200 μ g/mL），每组设 6 个复孔。模型组和各给药组以 2.5 μ g/mL LPS 持续处理 14 d 以诱导 EMT 进程，造模成功后分别给予相应剂量阳性药物吡菲尼酮以及不同质量浓度湿生扁蕾总皂酮干预 48 h。通过免疫荧光技术观察细胞间质标志物 α -SMA 的荧光表达以及通过观察细胞的形态判断 EMT 模型是否成功。

2.4 细胞生长曲线 待细胞贴壁达 80% 左右，用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液，并调整细胞密度至 1×10^5 /mL，分别接种于 7 个培养瓶中，于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养，每隔 48 h 换液 1 次，分别于接种后第 1、2、3、4、5、6、7 天同一时间消化制成单细胞悬液，用细胞计数仪进行细胞计数，绘制细胞生长曲线。

2.5 CCK-8 法检测细胞活力 取对数生长期 NCM460 细胞，调整密度为 5×10^4 /mL，每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中，于培养箱中培养至细胞贴壁完全后，各孔分别加入 100 μ L 终质量浓度为 25、50、100、200、300、400 μ g/mL 的湿生扁蕾总皂酮，每组设 6 个复孔，继续培养 48 h，更换新培养基，每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂，使用酶标仪在 450 nm 波长处检测各组细胞的光密度（OD）值。

2.6 免疫荧光法检测细胞 EMT 标志物 α -SMA 表达 取对数生长期 NCM460 细胞，调整密度为 1×10^4 /mL，接种于 15 mm 激光共聚焦小皿中，于培养箱中培养 12 h 后，按照“2.3”项下方法分组、造模及给药处理，每组设 3 个复孔。药物干预结束后，用封闭液室温封闭 2 h，洗涤液静置洗涤，一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，洗涤液静置洗涤，二抗室温孵育 1 h，洗涤液静置洗涤，封片剂封片，激光共聚焦显微镜检测 EMT 标志物 α -SMA 的荧光表达。

2.7 Western blot 法检测细胞各目的蛋白表达 取对数生长期 NCM460 细胞，调整密度为 5×10^5 /mL，接种于 6 孔板，按照“2.3”项下方法分组、造模及给药，干预 48 h 后收集细胞，RIPA 裂解液提取总蛋白，BCA 法对蛋白进行定量。配制十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺（SDS-PAGE）凝胶，每孔上样量 50 μ g，分别进行电泳、转膜、封闭操作。加入 ZO-1、 α -SMA、Beclin-1、P62、Bcl-2、LC3-II/LC3-I 一抗（1 : 1 000），4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，洗膜后加入二抗（1 : 500），室温孵育 2 h，洗膜后加入曝光液进行曝光，运用凝胶成像系统对免疫印迹进行成像，采用 Image J 软件分析条带的灰度值，以目的蛋白/内参蛋白比值计算蛋白相对表达量。

2.8 RT-qPCR 法检测细胞各目的基因 mRNA 表达 取对数生长期 NCM460 细胞，调整密度为 5×10^5 /mL，接种于 6 孔板，按照“2.3”项下方法分组、造模及给药，干预 48 h 后收集细胞，使用 TRIzol 试剂提取总 RNA，并鉴定 RNA 纯度。使用 Hifair II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒，按照说明书操作步骤，将 RNA 逆转录成 cDNA，而后进行 qPCR 扩增反应，反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min；95 $^{\circ}$ C 变性 15 s，60 $^{\circ}$ C 退火 60 s，60 $^{\circ}$ C 延伸 15 s，共 40 个循环。以 GAPDH 为内参， $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。引物由北京博迈德生物技术有限公司设计合成，序列见表 1。

2.9 TUNEL 染色法检测凋亡细胞比例 取对数生长期 NCM460 细胞，调整密度为 1×10^6 /mL，接种于 6 孔板，按照“2.3”项下方法分组、造模及给药，干预 48 h 后收集细胞悬液，调整密度为 1×10^5 /mL，取 200 μ L 细胞悬液进行爬片，待细胞爬满后，用 4% 多聚甲醛固定，PBS 洗涤 2 次，加入含 0.3% TritonX-100 的 PBS 室温孵育 10 min，PBS 洗涤 2 次，加入 50 μ L TUNEL 试剂避光孵育 1 h，吸弃多余染液，加入抗淬灭液封片，于显微镜下拍照，采用 Image J 软件分析相对荧光强度。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列
ZO-1	正向 5'-AGGCGTAGTAGTCGGGTTT-3' 反向 5'-CCAGAGATCACACTTCAGGAAC-3'
α-SMA	正向 5'-TACTGTTCCGCTCCCAGAAG-3' 反向 5'-TCATCGCCATAGCAAACCG-3'
Smad2	正向 5'-GTCCATCTTGCCATTACGC-3' 反向 5'-CCATCAAGAGACCTTGGTATGGTA-3'
Smad3	正向 5'-CTTCTGCTGCCACTTGGAGT-3' 反向 5'-CTGCCCCGTCTTCTTGAGTT-3'
Snail1	正向 5'-CGAGTGTTCTTTCGCGTA-3' 反向 5'-GGGCTGCTGGAAGGTAAACT-3'
TGF-β1	正向 5'-ACGGATCTCTCTCCGACCTG-3' 反向 5'-GGGGGTGTCTCACTATCCCA -3'
GAPDH	正向 5'-GTCAACGGATTGTGTCGTATTG-3' 反向 5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3'

2.10 单丹磺酰尸胺（MDC）染色观察细胞自噬囊泡 取对数生长期 NCM460 细胞，调整密度为 $4\times10^4/\text{mL}$ ，接种于 96 孔板中，于培养箱中培养至细胞贴壁后，按照“2.3”项下方法分组、造模及给药，干预 48 h， $1\times\text{Wash buffer}$ 洗涤 2 次，按照说明书要求配制 MDC 工作液，染色 30 min，用 $1\times\text{Wash buffer}$ 洗涤 3 次，荧光显微镜下观察并拍照（激发滤光片波长 355 nm，阻断滤光片波长 512 nm）。

2.11 透射电镜观察细胞自噬溶酶体 取对数生长期 NCM460 细胞，调整密度为 $1\times10^5/\text{mL}$ ，接种于 6 孔板，按照“2.3”项下方法分组、造模及给药，

干预 48 h 后收集细胞，加入适量 2.5% 戊二醛固定液固定 2 h 以上，用 1% 锇酸固定液固定 1~2 h，PBS 漂洗 30 min 后脱水、包埋，在 60 ℃ 烘箱中干燥 72 h，形成包埋块，将包埋块切片、染色，使用透射电镜观察细胞自噬溶酶体数目。

2.12 统计学分析 通过 SPSS Statistics 21.0 软件进行处理，数据以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 NCM460 细胞 EMT 模型评价 参考课题组前期预实验结果，采用 $2.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ LPS 持续诱导 NCM460 细胞 14 d，可成功建立 EMT 模型。显微镜下（图 1）观察发现，正常 NCM460 细胞呈不规则形状，形态均匀；LPS 诱导细胞发生上皮间质转化后，边界清晰，呈纺锤形生长。通过免疫荧光技术观察细胞表面间质标志物 α-SMA 表达（图 2）发现，与空白组比较，LPS 诱导的 NCM460 细胞表面 α-SMA 亮绿色荧光表达增强（ $P<0.01$ ）。

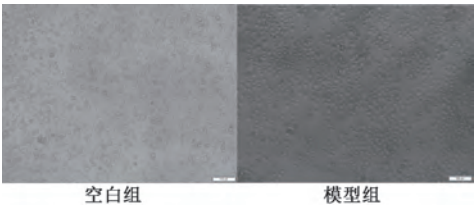
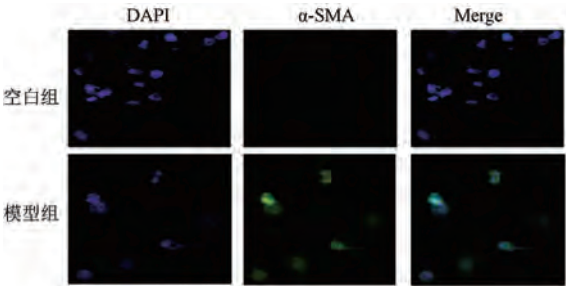


图 1 NCM460 细胞 EMT 前后细胞形态变化
Fig. 1 Morphological changes of NCM460 cells before and after EMT



注：与空白组比较， $^{##}P<0.01$ 。

图 2 NCM460 细胞 EMT 前后 α-SMA 荧光表达变化 $(\bar{x}\pm s, n=3)$

Fig. 2 Changes of α-SMA fluorescence expression in NCM460 cells before and after EMT $(\bar{x}\pm s, n=3)$

3.2 细胞生长曲线 如图 3 所示，第 1、2 天细胞增殖较慢，第 3 天开始进入对数生长期，第 5 天开始进入生长平台期，第 6、7 天细胞基本保持在平台期。

3.3 湿生扁蓿总吡酮对细胞存活率的影响 如图

4 所示，与对照组（ $0\text{ }\mu\text{g/mL}$ ）比较，当湿生扁蓿总吡酮质量浓度低于 $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，各组细胞存活率均无明显差异（ $P>0.05$ ）；当湿生扁蓿总吡酮质量浓度高于 $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时，细胞存活率降低（ $P<0.01$ ）。因此，选择 50、100、 $200\text{ }\mu\text{g/mL}$ 作为

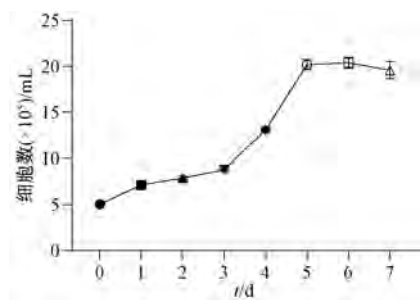
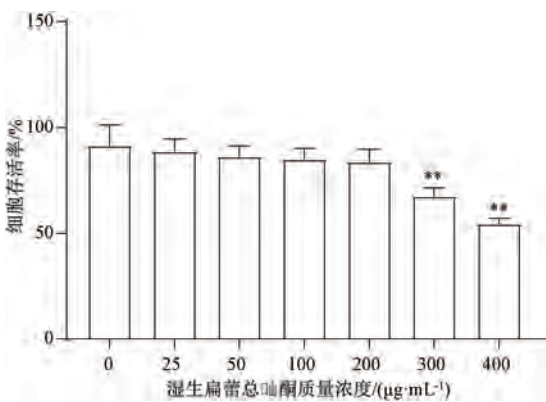


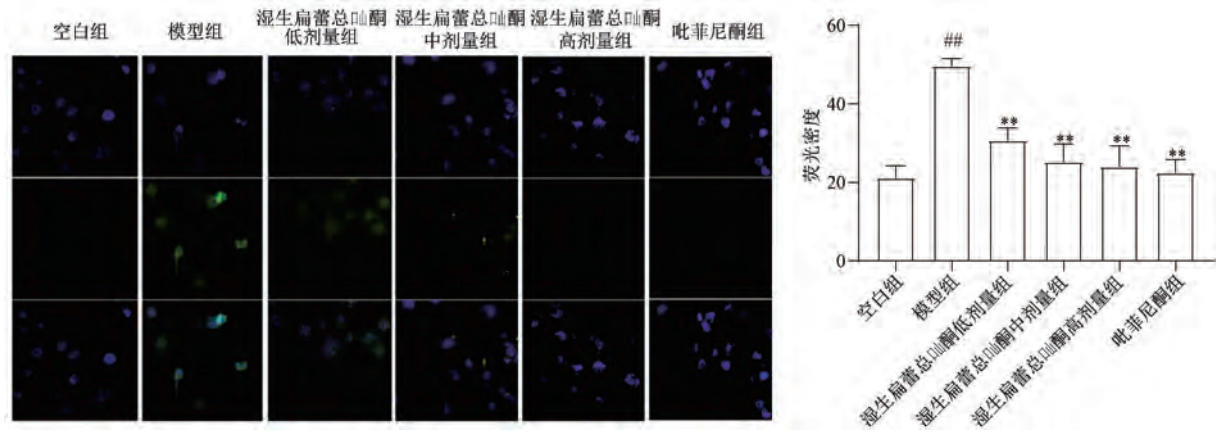
图 3 细胞生长曲线
Fig. 3 Cell growth curve



注：与对照组（0 μg/mL）比较，** $P < 0.01$ 。
图 4 不同剂量湿生扁蓿总黄酮对细胞存活率的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Fig. 4 Effects of different doses of Xanthones from *G. paludos* on cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

低、中、高剂量组开展后续研究。
3.4 湿生扁蓿总黄酮对 NCM460 细胞上皮间质转化的影响
3.4.1 NCM460 细胞表面 α -SMA 荧光表达 如图 5 所示，与模型组比较，湿生扁蓿总黄酮各剂量组和吡菲尼酮组细胞 α -SMA 荧光强度减弱 ($P < 0.05$,

$P < 0.01$)，其中高剂量效果优于低、中剂量。



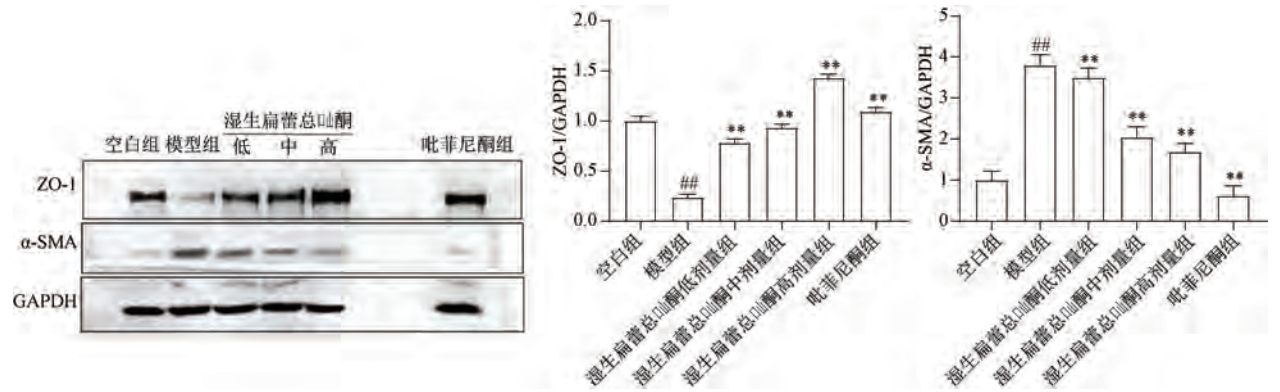
注：与空白组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。
图 5 湿生扁蓿总黄酮对 NCM460 细胞表面 α -SMA 荧光表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Effects of Xanthones from *G. paludos* on the fluorescence expression of α -SMA on NCM460 cell surface ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.4.2 NCM460 细胞 EMT 标志物的表达 如图 6 所示，与空白组比较，模型组细胞上皮细胞标志 ZO-1 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)，间质细胞标志物 α -SMA 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，湿生扁蓿总黄酮各剂量组和吡菲尼酮组 ZO-1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)， α -SMA 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)，其中高剂量效果优于低、中剂量，表明湿生扁蓿总黄酮能抑制 LPS 体外诱导 NCM460 细胞的 EMT。如图 7 所示，与空白组比较，模型组细胞 ZO-1 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)， α -SMA mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，湿生扁蓿总黄酮各剂量组和吡菲尼酮组 ZO-1 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)， α -SMA mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)，且呈剂量依赖性，与 Western blot 结果

一致。
3.4.3 NCM460 细胞 TGF- β /Smad 信号通路相关因子 mRNA 表达 如图 8 所示，与空白组比较，模型组细胞 TGF- β 1、Smad2、Smad3、Snail1 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，湿生扁蓿总黄酮各剂量组及吡菲尼酮组细胞 TGF- β 1、Smad2、Smad3、Snail1 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，其中高剂量效果优于低、中剂量，表明湿生扁蓿总黄酮可以抑制该信号通路调节因子 mRNA 表达而抑制细胞信号传导，最终导致 EMT 被抑制。

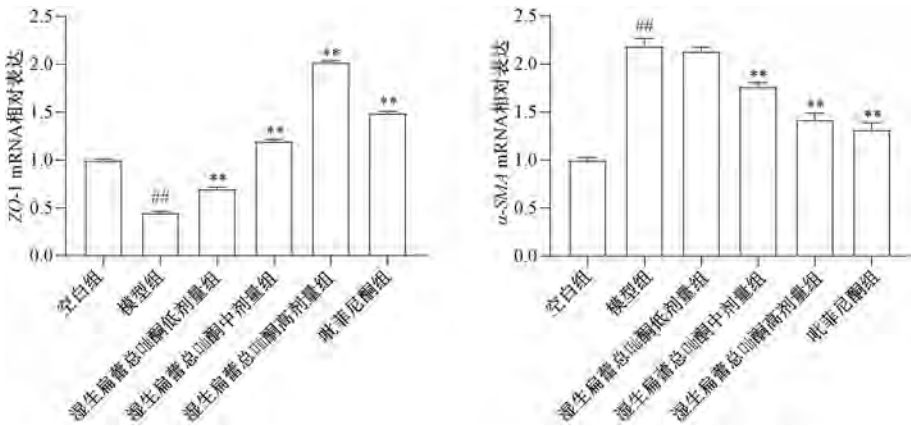
3.5 湿生扁蓿总黄酮对 NCM460 细胞凋亡的影响 如图 9 所示，与空白组比较，模型组细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，湿生扁蓿总



注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

图 6 湿生扁蓿总皂酮对 NCM460 细胞 ZO-1、α-SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

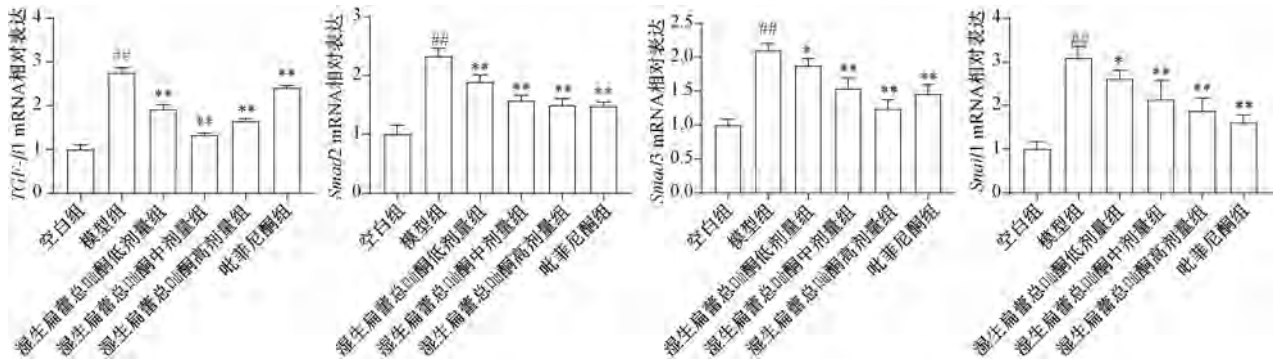
Fig. 6 Effects of Xanthenes from *G. paludos* on the protein expressions of ZO-1 and α-SMA in NCM460 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$ 。

图 7 湿生扁蓿总皂酮对 NCM460 细胞 ZO-1、α-SMA mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 7 Effects of Xanthenes from *G. paludos* on the mRNA expressions of ZO-1 and α-SMA in NCM460 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

图 8 湿生扁蓿总皂酮对 NCM460 细胞 TGF-β/Smad 信号通路相关因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

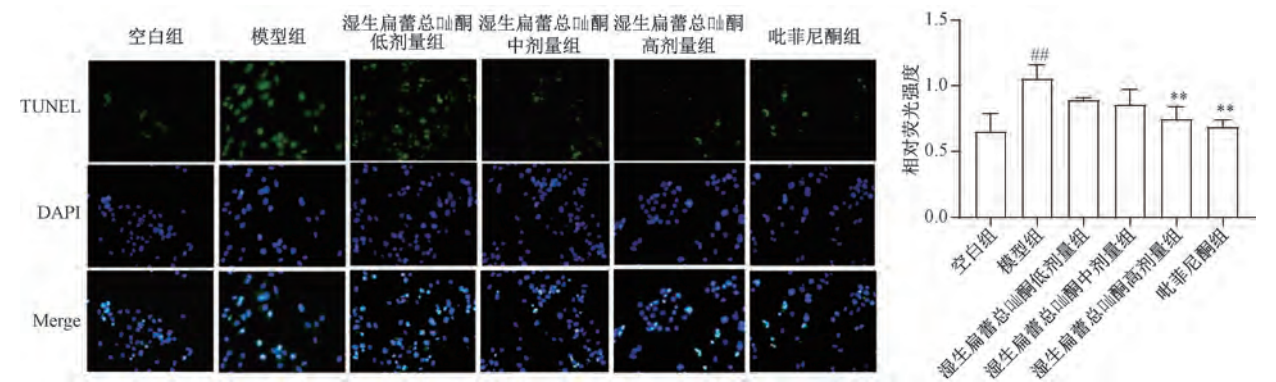
Fig. 8 Effects of Xanthenes from *G. paludos* on mRNA expressions of targets related to TGF-β/Smad signaling pathway in NCM460 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

皂酮高剂量组和吡菲尼酮组细胞凋亡率降低 ($P<0.01$)。

3.6 湿生扁蓿总皂酮对 NCM460 细胞自噬的影响

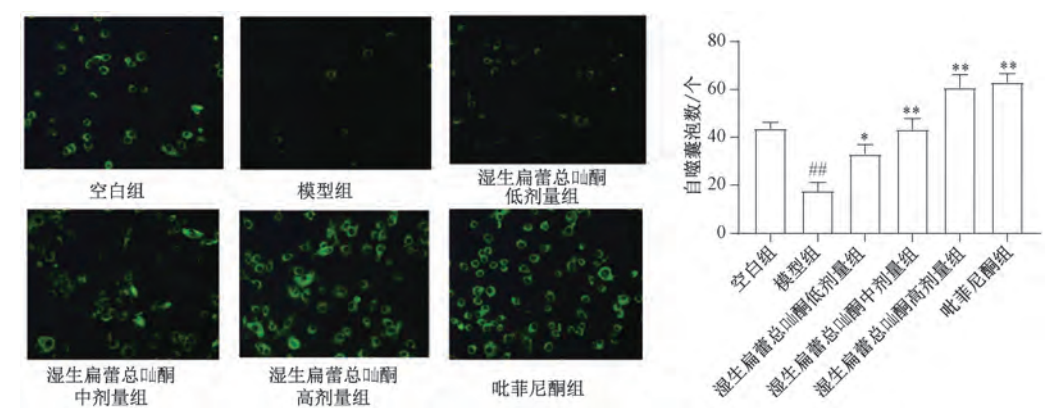
3.6.1 MDC 染色法观察自噬囊泡数 MDC 进入细胞后可与自噬囊泡特异性结合，在显微镜下观察

发现，与空白组比较，模型组细胞内自噬囊泡数减少 ($P<0.05$)；与模型组比较，湿生扁蓿总皂酮各剂量组和吡菲尼酮组细胞内自噬囊泡增多 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 10，提示湿生扁蓿总皂酮能够上调细胞自噬水平。



注：与空白组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{**}*P*<0.01。
图 9 湿生扁蓿总黄酮对 NCM460 细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

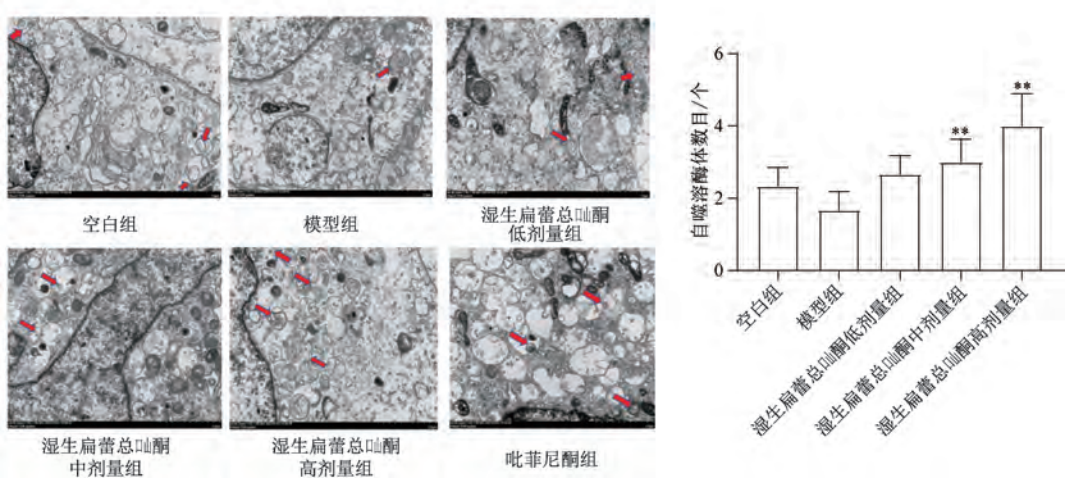
Fig. 9 Effects of Xanthones from *G. paludos* on the apoptosis of NCM460 cells ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)



注：与空白组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。
图 10 湿生扁蓿总黄酮对 NCM460 细胞自噬囊泡数的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

Fig. 10 Effects of Xanthones from *G. paludos* on the number of autophagic vesicles in NCM460 cells ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

3. 6. 2 透射电镜观察自噬溶酶体 透射电镜观察 NCM460 细胞的超微结构，如图 11 所示，空白组细胞内可明显观察到自噬溶酶体；而 LPS 诱导后自噬溶酶体数量减少；当湿生扁蓿总黄酮和吡菲尼酮干预之后溶酶体数较模型组增加 (*P*<0.01)。

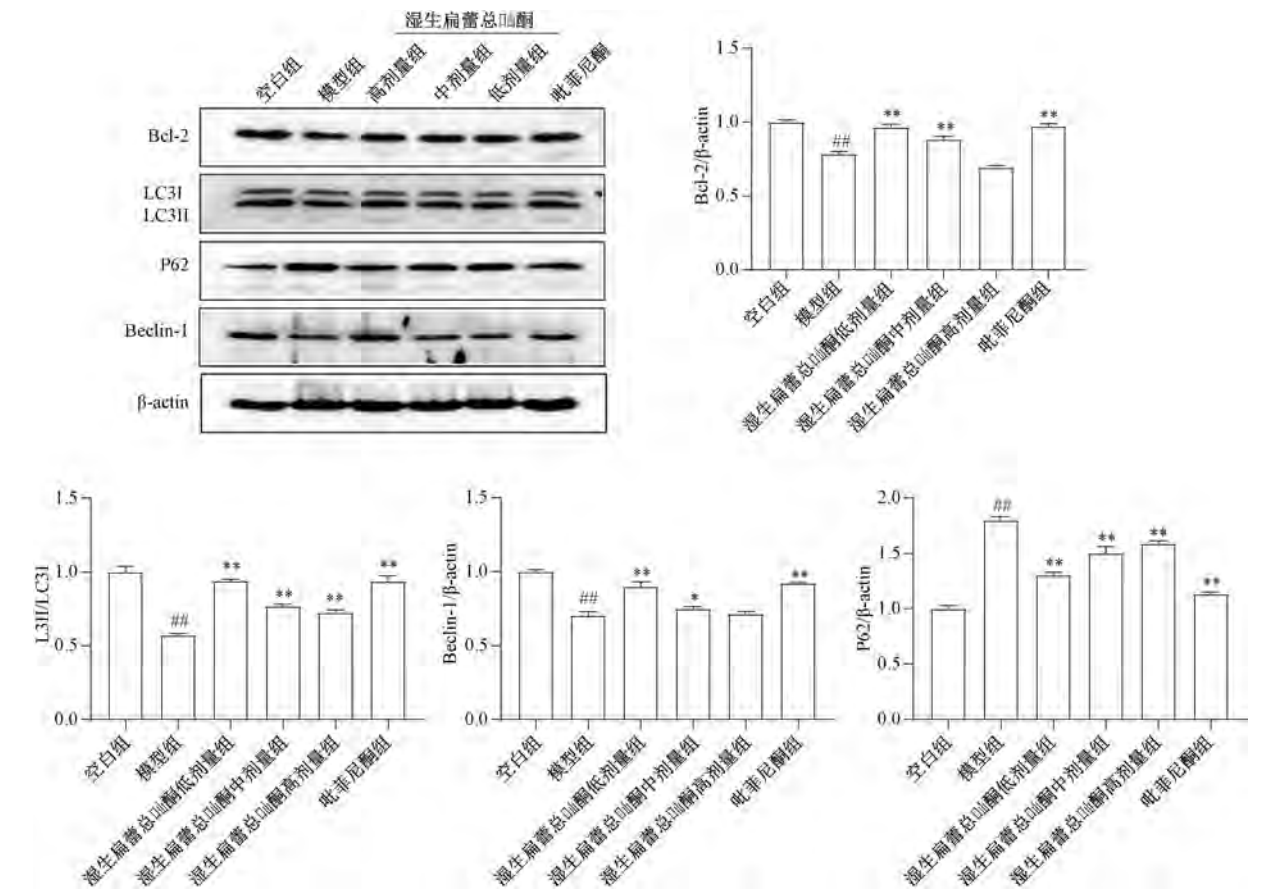


注：与模型组比较，^{**}*P*<0.01。
图 11 湿生扁蓿总黄酮对 NCM460 细胞自噬溶酶体数的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

Fig. 11 Effects of Xanthones from *G. paludos* on autophagosome number of NCM460 cells ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

3.6.3 自噬相关蛋白表达 如图 12 所示，与空白组比较，模型组细胞 Bcl-2、LC3-II/LC3-I、Beclin-1 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，P62 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，湿生扁蕾总皂酮各剂

量组 和 吡 菲 尼 酮 组 细 胞 Bcl-2、LC3-II/LC3-I、Beclin-1 蛋白表达升高 ($P<0.05$)，P62 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，表明湿生扁蕾总皂酮可升高 NCM460 细胞 EMT 模型的自噬水平。



注：与空白组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 12 湿生扁蕾总皂酮对 NCM460 细胞自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 12 Effects of Xanthones from *G. paludos* on autophagy-related protein expression in NCM460 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

肠纤维化是肠壁中瘢痕组织过度积累的结果，其特征为细胞外基质（ECM）的过度沉积，随着肠纤维化进展，可导致肠壁硬化、肠管腔狭窄和严重的梗阻，严重影响患者的生活质量^[19]。EMT 是上皮细胞的表型转化，伴随是细胞失去其上皮特征并获得间充质特性的过程，其特点是获得成纤维细胞样形态拉长、细胞极性丧失。目前普遍认为，EMT 可通过诱导 ECM 产生促进肠纤维化形成^[20]。Zeng 等^[21]研究发现，Resolvin D1 能够减少肠上皮细胞 EMT，并通过破坏上皮-成纤维细胞串扰来改善肠纤维化。卢曦等^[22]研究发现，对羟基苯甲醛可抑制 IEC-6 细胞 EMT 进程从而减轻肠纤维化，可见抑制 EMT 进程在抑制肠纤维化方面发挥关键作用。本研究通过 LPS 诱导 NCM460 细胞 EMT，伴随上皮细胞标志物 ZO-1 蛋白丧失和间充质特征蛋白 α-SMA 增加，而湿生扁蕾总皂酮能够明显改善细胞 EMT 进程，降低细胞间充质特征蛋白表达。TGF-β1 作为调控纤维化疾病重要的“开关性”因子，主要通过调控其下游 Smads 通路发挥作用，具有强促纤维化作用，可促进胶原合成及 ECM 沉积，被认为是 EMT 最佳表征启动子，是结肠纤维化形成的关键因素^[22-25]。本研究发现，湿生扁蕾总皂酮能够降低 NCM460 细胞 EMT 模型中 TGF-β1、Smad2、Smad3 和 Snail1 mRNA 表达，表明其能够通过调节 TGF-β1/Smad 抑制结肠纤维化。

自噬是一种溶酶体介导的降解折叠错误蛋白质和受损细胞器的细胞途径，该途径可在降解大分子物质后重新吸收利用，在维持细胞内稳态和能量代谢中发挥了重要作用^[26]。自噬过程需要多个

自噬蛋白的参与，Beclin-1 基因是酵母 ATG6 的同系物，可以诱导其他自噬相关蛋白质定位于自噬泡，是自噬体形成过程中的重要分子。LC3 是自噬体膜蛋白质，参与自噬形成的各个阶段，可作为检测自噬活动的标志物，当发生自噬后，LC3-I 经泛素化修饰形成 LC3-II，从而启动自噬。有报道显示，岩白菜素通过抑制 TGF-β1/Smad 信号通路抑制肌成纤维细胞的活化，促进肌成纤维细胞的自噬和凋亡，从而减轻 BLM 诱导的小鼠肺纤维^[27]。左旋四氢巴马汀通过调节过氧化物酶体增殖激活受体 γ（PPARγ）/核因子 κB（NF-κB）和 TGF-β1/Smad 通路抑制 ECM 沉积，提高肝星状细胞的自噬水平，从而减轻肝脏纤维化^[28]。Zeng 等^[21]研究发现在 DSS 诱导的炎症性肠病纤维化模型以及 EMT 模型中，刺激自噬可减少小鼠肠道胶原蛋白沉积，从而改善肠纤维化化症状。Cosin-Roger^[29]报道称自噬抑制会加重纤维化，这一变化可能与成纤维细胞的胶原蛋白降解有关。本研究发现，湿生扁蕾总皂酮能够刺激细胞自噬，降低细胞凋亡，抑制细胞 EMT 进程。

综上所述，本研究发现湿生扁蕾总皂酮能抑制细胞 EMT 进程，其机制可能与调节细胞自噬水平和调控 TGF-β1/Smad 通路有关，为阐明藏药湿生扁蕾治疗结肠纤维化提供了理论依据。

参考文献:

[1] Gordon I O, Agrawal N, Goldblum J R, *et al.* Fibrosis in ulcerative colitis: mechanisms, features, and consequences of a neglected problem[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(11): 2198-2206.

[2] Kang N, Xie X, Zhou X, *et al.* Identification and validation of EMT-immune-related prognostic biomarkers CDKN2A, CMTM8 and ILK in colon cancer[J]. *BMC Gastroenterol*, 2022, 22(1): 190.

[3] Du H, Gu J, Peng Q, *et al.* Berberine suppresses EMT in liver and gastric carcinoma cells through combination with TGFβR regulating TGF-β/Smad pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 2337818.

[4] Liu W R, Lu H T, Zhao T T, *et al.* Fu-Fang-Jin-Qian-Cao herbal granules protect against the calcium oxalate-induced renal EMT by inhibiting the TGF-β/Smad pathway[J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 1115-1122.

[5] 何裕智, 李俊. 消痔灵注射液介导 TGF-β1/Smad 信号治疗放射性直肠炎出血的分子机制研究[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2021, 26(2): 222-226.

[6] 戚潇禹, 刘璐佳, 杨阳, 等. 基于 TGF-β₁/Smads 信号通路中医药抗纤维化研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*,

2021, 23(1): 58-62.

[7] 游宇, 刘玉晖, 李林, 等. 参苓白术散通过调节肠上皮细胞自噬治疗葡聚糖硫酸钠所致小鼠炎症性肠病[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(5): 43-49.

[8] 曹颖. 自噬与炎症性肠病关系的研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2022, 27(3): 345-352.

[9] 刘越敏, 薄双琴, 景明. 藏药湿生扁蕾的配伍研究进展[J]. *药学研究*, 2021, 40(4): 244-246; 271.

[10] Aye A, Song Y J, Jeon Y D, *et al.* Xanthone suppresses allergic contact dermatitis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106061.

[11] Remali J, Sahidin I, Aizat W M. Xanthone biosynthetic pathway in plants: A review[J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 809497.

[12] Bolda Mariano L N, Boeing T, Da Silva R C M V A F, *et al.* 1, 3, 5, 6-Tetrahydroxyxanthone, a natural xanthone, induces diuresis and saluresis in normotensive and hypertensive rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 311: 108778.

[13] 王雅莉, 刘雪枫, 张艳霞, 等. 湿生扁蕾对溃疡性结肠炎肠纤维化大鼠结构及转化生长因子 β 表达的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(8): 972-974.

[14] 张旭东, 柳娜, 景明, 等. 湿生扁蕾总皂酮对溃疡性结肠炎肠纤维化大鼠肠上皮细胞 ATG16L1、LC3 表达的影响[J]. *中药材*, 2018, 41(3): 720-724.

[15] 卢年华, 赵慧巧, 刘雪枫, 等. 基于 qRT-RNA 技术筛选藏药湿生扁蕾抗溃疡性结肠炎肠纤维化活性成分的研究[J]. *药学研究*, 2016, 35(11): 628-631; 662.

[16] 卢年华, 陈正君, 刘雪枫, 等. 基于药效学指标筛选藏药湿生扁蕾抗溃疡性结肠炎的活性成分[J]. *实验动物科学*, 2016, 33(5): 16-20.

[17] 寇亮, 刘越敏, 柳娜, 等. 大孔吸附树脂分离纯化湿生扁蕾总皂酮[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(4): 522-530.

[18] 陈钰清, 闫永吉, 仇美华, 等. 吡非尼酮抗纤维化作用的研究进展[J]. *临床药物治疗杂志*, 2016, 14(5): 1-7.

[19] Pulakazhi Venu V K, Alston L, Iftinca M, *et al.* Nr4A1 modulates inflammation-associated intestinal fibrosis and dampens fibrogenic signaling in myofibroblasts [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2021, 321(3): G280-G297.

[20] Loboda A, Nebozhyn M V, Watters J W, *et al.* EMT is the dominant program in human colon cancer [J]. *BMC Med Genomics*, 2011, 4: 9.

[21] Zeng C, Liu X, Xiong D, *et al.* Resolvin D1 prevents epithelial-to-mesenchymal transition and reduces collagen deposition by stimulating autophagy in intestinal fibrosis [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(10): 4749-4759.

[22] 卢曦, 马怡晗, 覃兵, 等. 对羟基苯甲醛对实验性肠纤维化的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(4): 685-692.

[23] Jin Y, Chen W, Yang H, *et al.* *Scutellaria barbata* D. Don inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells *via* suppression of PI3K/AKT and TGF-β/Smad signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6): 5527-5534.

[24] 归闪华, 罗昊翔. 总黄酮类化合物基于 TGF-β/Smad 信号通路抗肝纤维化的研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2022, 44(3): 449-452.

[25] 苑致维, 张尔馨, 郑沁薇, 等. 青黛对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 TGF-β/Smad 信号通路相关因子表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(2): 63-67.

[26] 刘巧玲. 基于 AMPK/mTOR 信号通路调控自噬探讨养阴生肌散抑制克罗恩病肠道纤维化的机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.

[27] Li X, Wang Y, Liang J, *et al.* Bergenin attenuates bleomycin-

induced pulmonary fibrosis in mice *via* inhibiting TGF-β1 signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2021, 35 (10): 5808-5822.

[28] Yu Q, Cheng P, Wu J, *et al.* PPARγ/NF-κB and TGF-β1/Smad pathway are involved in the anti-fibrotic effects of levotetrahypalmatine on liver fibrosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3): 1645-1660.

[30] Cosin-Roger J, Canet F, Macias-Ceja D C, *et al.* Autophagy stimulation as a potential strategy against intestinal fibrosis[J]. *Cells*, 2019, 8(9): 1078.

补肾活血方对脊髓损伤大鼠脊髓的修复作用及其机制研究

翁家贤^{1,2}, 梁超伦^{2,3,4}, 肖方骏², 杨海梅², 曾秀云^{3,4}, 梁家畅^{3,4}, 王 凯^{2,3,4}, 邓健平², 文雅倩², 王 文², 罗 丹^{3,4}, 李 兴^{3,4*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510000; 3. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510120; 4. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120)

摘要：**目的** 探讨补肾活血方对脊髓损伤大鼠脊髓的修复作用及其机制。**方法** 将大鼠随机分为假手术组、模型组和补肾活血方低、高剂量组（6、18 g/kg）。采用 Allen’s 法制备脊髓损伤大鼠，造模第 2 天给药组灌胃给予相应剂量药液，假手术组和模型组灌胃给予纯水，连续 28 d。于术后不同时间点观察大鼠后肢运动功能并进行 BBB 评分，并在术后第 14、28 天进行大鼠足印实验；术后第 14 天使用相应试剂盒检测脊髓组织 SOD 活性与 MDA 水平，Western blot 法检测脊髓组织 Nrf2、NQO-1、HO-1、Bcl-2、Bax 蛋白表达；术后第 28 天采用 HE 染色和 Nissl 染色观察脊髓组织的变化，采用免疫荧光染色检测 NeuN、GFAP 的表达。**结果** 与模型组比较，补肾活血方高剂量组大鼠后肢功能、脊髓组织形态学均有改善（*P*<0.05），脊髓组织 SOD 活性、NeuN 荧光强度和 Bcl-2、NQO1、HO-1、Nrf2 蛋白表达升高（*P*<0.05），MDA 水平、GFAP 荧光强度和 Bax 蛋白表达降低（*P*<0.05）。**结论** 补肾活血方可以有效减轻脊髓损伤大鼠早期的脊髓损伤，其机制一方面可能是通过抑制 Nrf2/HO-1/NQO1 信号通路抑制脊髓组织氧化应激反应，减少神经细胞凋亡；另一方面通过抑制星形胶质细胞的活性，解除胶质瘢痕引发的屏障，提高神经再生能力，使脊髓组织的修复能力增加。

关键词：补肾活血方；脊髓损伤；氧化应激；凋亡；Nrf-2/HO-1/NQO1 信号通路

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2023)08-2518-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.08.011

Repair effectiveness and mechanism of Bushen Huoxue Formula on spinal cord of rats with spinal cord injury

WENG Jia-xian^{1,2}, LIANG Chao-lun^{2,3,4}, XIAO Fang-jun², YANG Hai-mei², ZENG Xiu-yun^{3,4}, LIANG Jia-chang^{3,4}, WANG Kai^{2,3,4}, DENG Jian-ping², WEN Ya-qian², WANG Wen², LUO Dan^{3,4}, LI Xing^{3,4*}

收稿日期：2023-03-02

基金项目：国家自然科学基金青年项目（82004384）；广东省中医院拔尖人才科研专项资助（BJ2022KY07）；广东省中医药管理局（2021KT1461）；广州市科技计划项目基础研究计划（202102010203）

作者简介：翁家贤（1995—），女，博士生，研究方向为中药药理与新药研发。Tel: 15902083056, E-mail: wjxianyy@163.com

*** 通信作者：**李 兴（1988—），男，博士，副研究员，研究方向为骨科基础与临床研究。Tel: 15902089871, E-mail: liqixi723@126.com