

· 实验研究 ·

柴胡疏肝散调节 Hedgehog 信号通路蛋白抑制肝星状细胞活化的研究[※]

郑琳¹ 何顺勇¹ 彭黄蕴茜² 姜玉婷² 张捷平^{2▲}

摘要 目的:探讨柴胡疏肝散通过调控 Hedgehog 信号通路抑制肝星状细胞活化的分子机制。**方法:**以 DMEM 完全培养基体外培养 LX-2 细胞,分为正常组、模型组和中药组。正常组予 10% 空白血清培养;模型组予 10 ng/mL TGF- β 联合 10% 空白血清处理;中药组予 10 ng/ml TGF- β 联合 10% 柴胡疏肝散含药血清处理。以 CCK-8 检测细胞相对增殖率,以划痕实验检测细胞的迁移能力,以流式细胞术分析细胞凋亡水平,以免疫印迹技术检测 α -SMA、SMO、Gli-1 及 BCL-2 的蛋白质表达量。**结果:**①与正常组比较,模型组处理 24 h、48 h、72 h 后,CCK-8 检测的细胞相对增殖率增加($P<0.05$);与模型组比较,中药组处理 72 h 后,细胞活力降低($P<0.05$)。②细胞划痕处理 12 h、24 h 后,与正常组比较,模型组划痕愈合率增加($P<0.05$);与模型组比较,中药组划痕愈合率降低($P<0.05$)。③与正常组比较,模型组细胞凋亡率明显减少($P<0.05$);与模型组比较,中药组的细胞凋亡率增加($P<0.05$)。④免疫印迹结果显示,与正常组比较,模型组 α -SMA、SMO、GLI-1 及 BCL-2 的蛋白质表达上调($P<0.05$);与模型组比较,中药组 α -SMA、SMO、GLI-1 及 BCL-2 的蛋白质表达下调($P<0.05$)。**结论:**柴胡疏肝散可抑制 TGF- β 诱导的 LX-2 细胞活化,其机制可能与下调 Hedgehog 信号通路关键分子 SMO、GLI-1 的表达及减少抗凋亡蛋白 BCL-2 的水平有关。

关键词 柴胡疏肝散;肝星状细胞;肝纤维化;Hedgehog 信号通路;SMO;GLI-1

肝纤维化是慢性肝病过程肝细胞对慢性损伤的修复反应,以细胞外基质成分过度增生与异常沉积为主要病理特征。肝纤维化持续发展,可形成肝硬化、肝癌。因此,适时阻断或逆转肝纤维化进展,对肝硬化的防治具有重要临床意义^[1-2]。肝纤维化、肝硬化属于中医学“癥积”“胁痛”“臌胀”等范畴^[3]。柴胡疏肝散出自《景岳全书》,是疏肝理气的经典方药,具有保护肝功能、抑制肝纤维化的作用^[4-5],但其药理机制仍不清楚。研究^[6-7]显示,肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)在肝纤维化过程中具有重要作用;Hedgehog 信号通路是机体调控胚胎发育、细胞分化和组织再生等过程的高度保守信号通路,对促进肝星状细胞活化增

殖过程有着重要影响。本研究基于体外细胞实验,通过转化生长因子- β (TGF- β)诱导人肝星状细胞株 LX-2 活化建立细胞纤维化模型,观察柴胡疏肝散含药血清对其活化、凋亡及 Hedgehog 信号通路的影响,以初步探讨其涉及的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 无特定病原体 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,体质量(200 \pm 20) g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号:2011000521084。动物按随机数字表法分为空白血清组和含药血清组,每组各 15 只,分别用于制备相应血清。实验过程饲养在福建中医药大学动物实验中心,5 只/笼,环境相对湿度 70%,温度 26 °C。除特殊要求以外,老鼠自由进食、饮水、活动。本研究严格遵循《实验动物福利伦理审查指南》要求,并获得福建中医药大学实验动物伦理委员会审批通过(审批号:FJTCMIACUC2023067)。

1.2 主要实验仪器与试剂 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司, HF212UV),细胞计数仪(美国 Thermo 公

※基金项目 福建省自然科学基金卫生联合-面上项目(No.2022J01845)

▲通信作者 张捷平,男,副教授,硕士研究生导师。研究方向:中药防治代谢相关疾病。E-mail:42492843@qq.com

•作者单位 1.福建中医药大学附属人民医院(福建福州 350004);2.福建中医药大学中西医结合学院/中西医结合研究院(福建福州 350122)

司, Countess II), 流式细胞分析仪(安捷伦科技公司, SYS-NC-3000-nan), 核酸蛋白分析仪(美国 BACKMAN 公司, DU730), Mini Protean 垂直电泳仪(美国伯乐公司, 165-8001), 化学发光显像系统(美国伯乐公司, Universal Hood II)。人肝星状细胞 LX-2 (购自厦门逸漠细胞公司, 2024061026), 柴胡疏肝散方药(由柴胡、陈皮、川芎、香附、枳壳、白芍、炙甘草组成, 购自福建中医药大学附属人民医院, 经福建中医药大学中药专业车苏容教授鉴定), CCK-8 检测试剂盒(上海李记生物科技有限公司, AC11L054), 凋亡检测试剂盒(美国 APEX BIO 公司, K2003), α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(美国 CST 公司, #19245), 平滑蛋白(smoothed, SMO)抗体(英国 Abcam 公司, ab235183), 胶质瘤相关癌基因同源物 1 (Glioma-associated oncogene homolog 1, GLI-1) 抗体(英国 Cohesion Biosciences 公司, CPA5382), B 细胞淋巴瘤 2 蛋白(B-cell lymphoma-2, BCL-2) 抗体(英国 Cohesion Biosciences 公司, CPA1095)。

1.3 细胞学实验及处理

1.3.1 柴胡疏肝散含药血清的制备 柴胡疏肝散(药物组成: 柴胡 6 g, 陈皮 6 g, 川芎 5 g, 香附 5 g, 枳壳 5 g, 白芍 5 g, 炙甘草 3 g), 以 10 倍体积去离子水浸泡 2 h, 武火煮沸后改用文火续煎 30 min, 共煎煮 2 次, 药液过滤浓缩至 0.7 g/mL 生药量。按柴胡疏肝散临床等效剂量(生药量 7 g/kg), 连续对含药血清组大鼠灌胃给药 14 d, 每天 1 次。末次灌胃后, 空腹 8 h, 以戊巴比妥钠麻醉后, 腹主动脉采全血, 1500 rpm 离心 5 min, 取上清液放置离心管中, 56 °C 水浴灭活, 分装放置 -80 °C 保存^[8]。空白血清组 SD 大鼠灌同体积生理盐水, 按照相同流程制备空白血清。

1.3.2 LX-2 细胞培养及分组处理 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱内, 以 DMEM 完全培养基(含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素)培养 LX-2 细胞, 细胞进入对数生长期开始实验。分设正常组、模型组和中药组。正常组予 10% 空白血清培养; 模型组予 10 ng/mL TGF- β 联合 10% 空白血清处理; 中药组予 10 ng/ml TGF- β 联合 10% 柴胡疏肝散含药血清处理。根据不同实验的时间处理需要, 进行指标检测。

1.4 指标检测及方法

1.4.1 CCK-8 法检测细胞相对增殖率 细胞接种于 96 孔培养板, 待细胞贴壁后分组进行处理, 每组设 6

个复孔, 另设无细胞空白调零孔。分别在 0 h、24 h、48 h、72 h 后, 加入 10 μ l CCK-8 试剂混合均匀, 置于 37 °C 培养箱内反应 3 h 后, 用酶标仪以波长 450 nm 光源测定各孔细胞的吸光度值。以 0 h 组为基准, 计算各时间点细胞相对增殖率以评估细胞活力。细胞相对增殖率 = $OD_{\text{给药组}t} / OD_{\text{实验组}0h} \times 100\%$ 。

1.4.2 划痕实验检测细胞迁移能力 先在 6 孔板底部画平行直线作标记, 再将各组细胞接种于 6 孔板中, 待细胞均匀生长并铺满培养孔 90% 时, 用 10 μ L 枪头在每个孔内与底部平行线做垂直划痕, 每组设 3 个复孔。分别于 0 h、6 h、12 h、24 h 取出培养板, 在镜下观察细胞生长情况并拍照, 以 Image J 软件测量划痕面积, 计算划痕愈合率以评估细胞迁移能力。划痕愈合率(%) = $(0 \text{ h 划痕面积} - X \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积} \times 100\%$ 。

1.4.3 流式细胞术分析细胞凋亡比率 各组细胞处理 48 h 后, 收集细胞, 调整细胞浓度为 10^6 , 用 70% 冷乙醇固定, 离心去上清, 加入碘化丙啶染液, 室温下进行 DNA 染色 20 min, 用流式细胞仪检测, 计算细胞凋亡比率。

1.4.4 免疫印迹检测细胞 α -SMA、SMO、GLI-1 及 BCL-2 蛋白质表达量 各组培养细胞处理 48 h 后, 以胎牛血清洗去培养液, 加入 1 mL 裂解液(含苯甲基磺酰氟)进行裂解细胞, 分离提取总蛋白, 以 BCA 法测定蛋白质含量。取 30 μ g 总蛋白, 经 10% SDS-PAGE 电泳后, 湿法电转印至 PVDF 膜。以 10% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 分别加入抗 α -SMA 抗体(1:1000)、抗 SMO 抗体(1:1000)、抗 Gli-1 抗体(1:1000)、抗 Bcl-2 抗体(1:1000)、抗 HSP90 抗体(1:1000), 4 °C 摇床孵育过夜, 洗膜后加入相应二抗, 室温摇床孵育 1 h, 采用 ECL 化学发光法显影, 使用 Image J 凝胶图像软件检测各条带的光密度值(IA)。以热休克蛋白 90(heat shock protein 90, HSP90)为内参, 目的蛋白的相对表达量计算公式为: 相对表达量 = $IA_{\text{目的蛋白质}} / IA_{\text{HSP90}}$ 。

1.5 统计学方法 计量资料的数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 用 SPSS 25.0 进行统计分析。采用 Shapiro Wilk 检验验证数据正态性; 满足正态分布时, 再用 Levene's 检验评估方差齐性。若数据符合正态分布和方差齐性条件, 多组样本均数比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 t 或 t' 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 柴胡疏肝散对 LX-2 细胞相对增殖率的影响 与

正常组比较,模型组在 24 h、48 h、72 h 时 CCK-8 检测的细胞相对增殖率增加 ($P < 0.05$);与模型组对比,中药组在 24 h 和 48 h 时的细胞相对增殖率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),至 72 h 则明显降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 柴胡疏肝散对 LX-2 细胞划痕愈合率的影响 细胞划痕处理 12 h、24 h 后,与正常组比较,模型组细胞划痕愈合率增加 ($P < 0.05$);与模型组对比,中药组细胞划痕愈合率降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

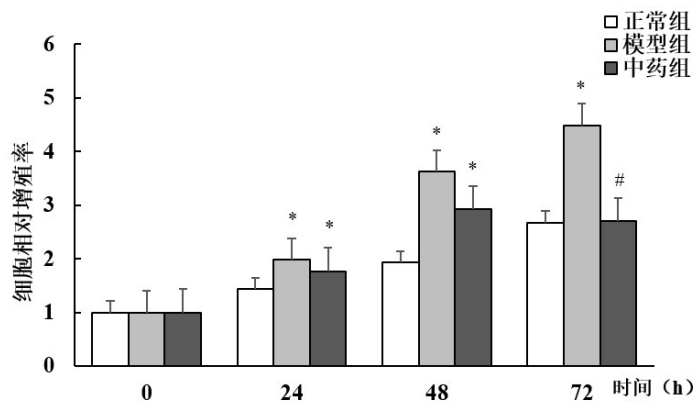
2.3 柴胡疏肝散对 LX-2 细胞凋亡的影响 与正常组比较,模型组的 LX-2 细胞凋亡率明显减少 ($P < 0.05$);与模型组比较,中药组细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 柴胡疏肝散对 LX-2 细胞 α -SMA、SMO、GLI-1 及 BCL-2 蛋白质表达量的影响 免疫印迹结果显示,与正常组比较,模型组 α -SMA、SMO、GLI-1 及 BCL-2 的蛋白质表达均上调 ($P < 0.05$);与模型组比较,中药组 α -SMA、SMO、GLI-1 及 BCL-2 的蛋白质表达均下调 ($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

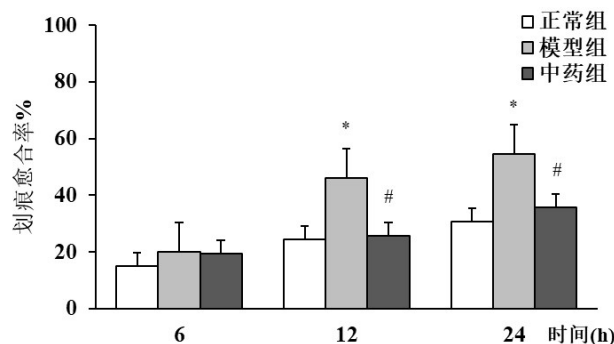
中医学认为,情志不遂、饮食不节、劳逸失调等诸多因素都可导致肝气郁结;湿、热、痰、瘀等病理产物亦可阻滞肝经气机,影响肝之疏泄功能,进而引发各类肝病。因此,肝气郁滞是临床肝病的重要病机,疏肝解郁、行气导滞是其基本治疗原则^[3]。柴胡疏肝散是临床治疗肝气郁结证的经典方药,具有疏肝解郁、行气活血和止痛的功效。研究表明,柴胡疏肝散加减能有效改善患者的肋肋疼痛、脘腹胀满、脉弦等肝气郁结的临床表征,还可逆转肝功能异常及抗肝纤维化^[9-10]。

HSCs 活化在肝纤维化发生、发展过程中起到重要作用。在多种细胞因子(如 TGF- β 、肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 13 等)诱导下,静息态 HSCs 被激活,移行离开肝血窦,增殖并转分化为肌成纤维细胞,分泌细胞外基质,促进肝损伤修复。但过多细胞外基质累积将导致肝纤维化,诱发肝硬化发生^[11]。其中 TGF- β 是公认的驱动肝纤维化进展的最强信号分子,能够直



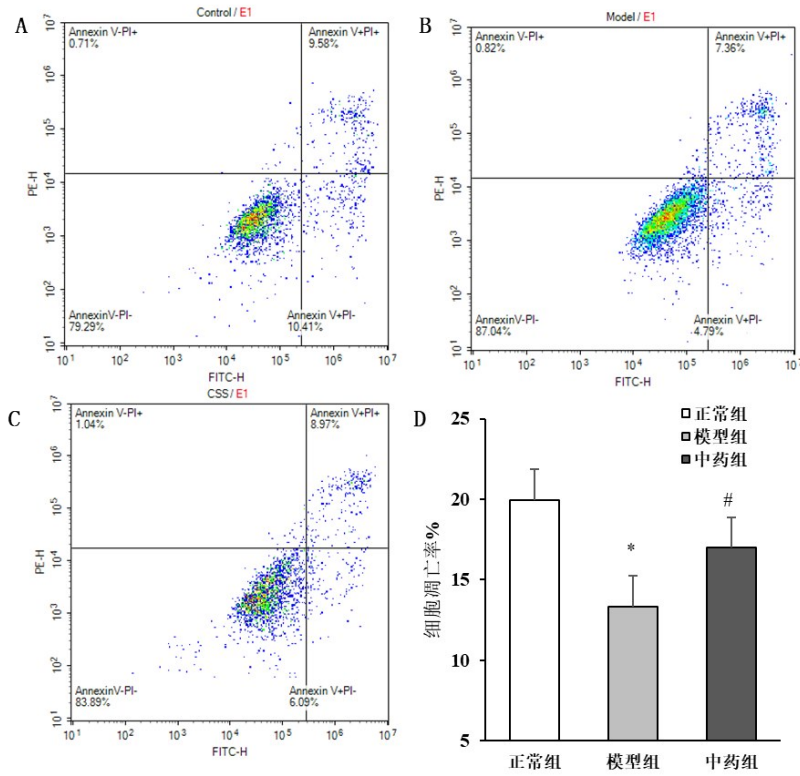
与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

图1 柴胡疏肝散对 LX-2 细胞相对增殖率的影响



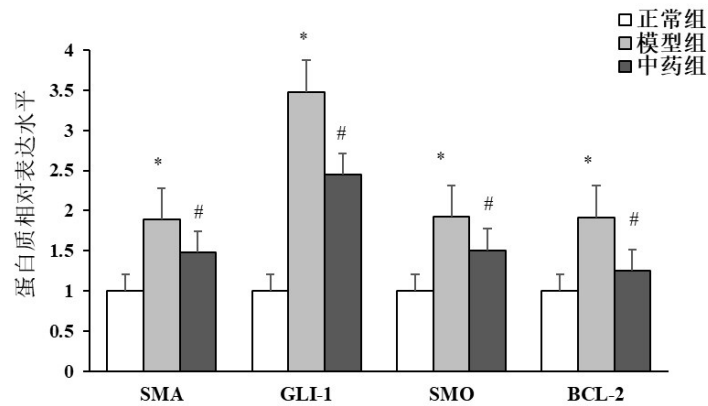
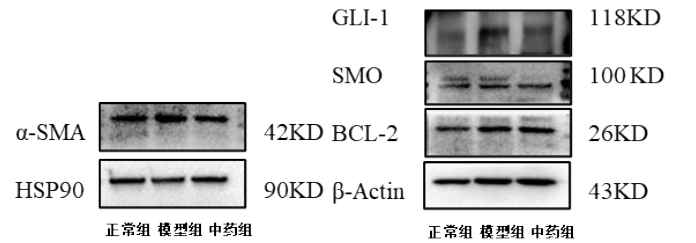
与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

图2 柴胡疏肝散对 LX-2 细胞划痕愈合率的影响



A为正常组流式图;B为模型组流式图;C为中药组流式图;D为各组凋亡率结果图。与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

图3 柴胡疏肝散对LX-2细胞凋亡的影响



与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

图4 柴胡疏肝散对LX-2细胞 α -SMA、SMO、GLI-1及BCL-2蛋白质表达量的影响

接促进HSCs活化^[12]。

本实验采用TGF- β 诱导体外培养的LX-2细胞24 h后,模型组 α -SMA蛋白质表达量较正常组增多($P<0.05$),提示TGF- β 诱导LX-2细胞进入活化状态,构建形成肝纤维化模型细胞;同时,细胞划痕实验结果提示,模型组LX-2细胞迁移能力较正常组增强($P<0.05$),也符合细胞活化的特征。经柴胡疏肝散含药血清治疗,中药组的 α -SMA蛋白质表达量较模型组明显减少,细胞迁移能力下降($P<0.05$)。上述结果表明,柴胡疏肝散具有抑制TGF- β 诱导LX-2细胞活化的药理作用。

Hedgehog信号通路是一个高度保守的信号系统,在发育与维持组织细胞的稳态中具有重要作用。目前研究提示,Hedgehog信号通路与TGF- β 信号存在广泛的网络联系,协同参与调控HSCs活化与增殖,促进肝纤维化进展^[13]。当Hedgehog信号系统激活,活化的SMO蛋白受体可促进GLI转录因子进入细胞核,促进Cyclin D和BCL-2等下游靶基因的表达,促进细胞增殖、存活和发育过程^[14]。其中,BCL-2是重要的抗凋亡因子,能够阻止线粒体的细胞色素c释放进入细胞质,进而抑制细胞凋亡过程^[15]。化学、生物等多种因素所致肝损伤均可诱导Hedgehog信号通路的异常激活,表现为IHH、PTCH、SMO、GLI-1、GLI-2、GLI-3 mRNA表达水平的改变,且IHH配体及通路激活标志分子PTCH、GLI-1等多指标存在显著的交互效应^[16]。

在本实验中,模型组LX-2细胞经TGF- β 诱导活化后,与正常组比较,细胞凋亡率减少($P<0.05$),细胞增殖明显增加($P<0.05$);Hedgehog信号通路SMO受体、核内转录因子GLI-1、下游靶基因抗凋亡因子BCL-2的蛋白质表达均上调($P<0.05$),提示在TGF- β 诱导下,LX-2细胞的Hedgehog信号通路被激活。与模型组比较,中药组细胞凋亡率增加,SMO受体、GLI-1、BCL-2的蛋白质表达均下调($P<0.05$)。上述结果提示,柴胡疏肝散可能通过下调Hedgehog信号通路的SMO、GLI-1的蛋白质表达,减少抗凋亡因子BCL-2的蛋白质含量,促进细胞凋亡,从而抑制TGF- β 诱导的活化过程。有学者结合网络药理学方法分析与验证发现,柴胡疏肝散可能通过多靶点调控纤维化相关信号通路,抑制TGF- β 诱导的肝星状细胞活化,从而发挥抗肝纤维化作用^[17]。

HSCs的活化与增殖是肝纤维化发展过程的核心环节。本研究从体外实验观察到TGF- β 诱导下的LX-2细胞活化以及Hedgehog信号通路的激活,证实

柴胡疏肝散含药血清可通过抑制Hedgehog信号通路激活,部分逆转TGF- β 诱导的LX-2细胞活化。这可为其临床转化与应用提供理论依据。

参考文献

- [1] CALIGIURI A, GENTILINI A, PASTORE M, et al. Cellular and molecular mechanisms underlying liver fibrosis regression [J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2759.
- [2] KISSELEVA T, GANGULY S, MURAD R, et al. Regulation of hepatic stellate cell phenotypes in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2025, 169(5): 797-812.
- [3] 安振涛, 魏兰福, 黄钰萍, 等. 肝纤维化中医证候规范化与客观化研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(2): 280-282.
- [4] 李满容, 杨沁. 柴胡疏肝散治疗慢性乙型肝炎肝郁气滞证型的临床观察[J]. *中医临床研究*, 2016, 8(24): 21-22.
- [5] 王伟杰, 席岳, 尚立芝, 等. 柴胡疏肝散对肝纤维化患者肝功能、肝纤维化标志物及肝脾超声指标的影响[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(5): 166-169.
- [6] HU Y, PENG L, ZHUO X, et al. Hedgehog signaling pathway in fibrosis and targeted therapies [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(12): 1485.
- [7] NAIR B, KAMATH A J, PRADEEP G, et al. Unveiling the role of the Hedgehog signaling pathway in chronic liver disease: therapeutic insights and strategies [J]. *Drug Discov Today*, 2024, 29(8): 104064.
- [8] 范思奇, 曾平, 农焦, 等. 通络生骨胶囊含药血清对破骨细胞及Toll样受体4/核因子 κ B信号通路的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(14): 2155-2160.
- [9] 谭莹莹, 施明慧, 阮楸婷, 等. 柴胡疏肝散临床应用研究进展[J]. *实用中医药杂志*, 2025, 41(1): 215-218.
- [10] 崔付超, 左璐. 柴胡疏肝散加减对肝郁脾虚型肝硬化代偿期肝功能及肝纤维化的影响[J]. *河南中医*, 2023, 43(9): 1380-1384.
- [11] ZHANG Y, REN L, TIAN Y, et al. Signaling pathways that activate hepatic stellate cells during liver fibrosis [J]. *Front Med*, 2024, 11: 1454980.
- [12] SULTANA M, ISLAM M A, KHAIRNAR R, et al. A guide to pathophysiology, signaling pathways, and preclinical models of liver fibrosis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2025, 598: 112448.
- [13] SOLHI R, LOTFI AS, LOTFINIA M, et al. Hepatic stellate cell activation by TGF β induces hedgehog signaling and endoplasmic reticulum stress simultaneously [J]. *Toxicol In Vitro*, 2022, 80: 105315.
- [14] ORTEGA-CARBALLO K J, VARGAS-POZADA E E, MURIEL P. Involvement of the hedgehog signaling pathway in liver diseases [J]. *Annals of Hepatology*, 2025, 30(2): 102148.
- [15] BYERLY C D, MITRA S, PATTERSON L L, et al. Ehrlichia SLiM ligand mimetic activates Hedgehog signaling to engage a BCL-2 anti-apoptotic cellular program [J]. *PLoS Pathog*, 2022, 18(5): e1010345.
- [16] 蔡毅东, 王丽, 郑浩轩, 等. 多模式肝损伤后Hedgehog信号通路的表达分析[J]. *中国中医药信息杂志*, 2013, 20(8): 48-51.
- [17] 王帅, 葛茂旭, 刘安昌. 柴胡疏肝散治疗肝纤维化核心靶基因筛选及对肝星状细胞活化的影响[J]. *山东医药*, 2025, 65(3): 1-6.

(收稿日期: 2025-11-19)

(本文编辑: 金冠羽)