

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00590

· 论 著 ·

## 熊果酸对活化型肝星状细胞 NADPH 氧化酶亚基 p47<sup>Phox</sup> 表达及 ERK1/2 信号通路活化的影响

张新华, 何文华, 朱 莹\*, 李弼民, 张焜和, 陈 璐, 施 凤

南昌大学第一附属医院消化内科, 南昌 330006

**[摘要]** **目的** 研究熊果酸(ursolic acid, UA)对瘦素诱导的大鼠肝星状细胞(HSC-T6)NADPH氧化酶(NOX)亚基 p47<sup>Phox</sup>表达及 ERK1/2 信号通路活化的影响,并观察 I 型胶原合成及细胞增殖情况。**方法** 将培养激活的 HSC-T6 细胞株分为 6 组:正常对照组,不加任何药物;瘦素组,给予重组大鼠瘦素(100 ng/ml)刺激细胞;各干预组分别给予 UA (50  $\mu$ mol/L)、JAK 抑制剂 AG490 (50  $\mu$ mol/L)、NOX 抑制剂 DPI (20  $\mu$ mol/L)、ERK 抑制剂 PD98059 (30  $\mu$ mol/L)预处理 30 min,再加入瘦素刺激不同时间。采用蛋白质印迹分析检测细胞膜移位的 p47<sup>Phox</sup>蛋白、细胞总 p47<sup>Phox</sup>蛋白和磷酸化的 ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白表达;采用 RT-PCR 法检测 I 型胶原 mRNA 的表达;采用 MTT 法检测细胞增殖。**结果** 瘦素刺激 HSC-T6 细胞 30 min 后细胞膜 p47<sup>Phox</sup>蛋白表达较正常对照组增高( $P < 0.01$ ),细胞内 p-ERK1/2 蛋白表达也随之增高( $P < 0.05$ );UA、AG490、DPI、PD98059 干预后抑制了 p47<sup>Phox</sup>蛋白向细胞膜移位以及细胞内 ERK1/2 蛋白磷酸化。瘦素刺激 HSC-T6 细胞 12 h 后 I 型胶原的 mRNA 表达较正常对照组升高( $P < 0.01$ ),UA、AG490、DPI 及 PD98059 干预组 I 型胶原 mRNA 的表达均低于瘦素组( $P$  均  $< 0.01$ )。瘦素刺激 HSC-T6 细胞 12、24、48 h 后细胞增殖率高于正常对照组( $P$  均  $< 0.01$ );UA、AG490、DPI 及 PD98059 干预不同时间点的细胞增殖率均低于瘦素组( $P$  均  $< 0.01$ ),UA 的抑制细胞增殖作用弱于 DPI( $P < 0.01$ )。**结论** UA能抑制瘦素诱导的 HSC-T6 细胞增殖及 I 型胶原表达,机制可能与抑制 NOX 亚基 p47<sup>Phox</sup>向细胞膜移位及下游信号通路 ERK1/2 的激活有关。

**[关键词]** 熊果酸;肝星状细胞;NADPH 氧化酶;细胞外信号调节激酶类;细胞增殖

**[中图分类号]** R 575.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)06-0590-05

### Effects of ursolic acid on NADPH oxidase subunit p47<sup>Phox</sup> expression and ERK1/2 pathway activation in rat hepatic stellate cells

ZHANG Xin-hua, HE Wen-hua, ZHU Xuan\*, LI Bi-min, ZHANG Kun-he, CHEN Lu, SHI Feng

Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of ursolic acid (UA) on leptin-induced NADPH oxidase (NOX) subunits p47<sup>Phox</sup> expression and ERK1/2 pathway activation of rat hepatic stellate cells (HSC-T6), and to observe the cells proliferation and collagen I synthesis. **Methods** Culture-activated HSC-T6 cells were divided into six groups: normal control group received no treatment; leptin group received recombinant rat leptin (100 ng/ml); the four intervention groups were pretreated with UA(50  $\mu$ mol/L), JAK inhibitor AG490 (50  $\mu$ mol/L), NOX inhibitor DPI(20  $\mu$ mol/L), and ERK inhibitor PD98059 (30  $\mu$ mol/L) for 30 min, and then stimulated with leptin for different time periods. Western blotting analysis was used to examine the expression of p47<sup>Phox</sup> protein translocation to the cell membrane, total cellular p47<sup>Phox</sup> protein and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) protein. Collagen I mRNA expression was detected by RT-PCR and cell proliferation was examined by MTT assay. **Results** Expression of p47<sup>Phox</sup> membrane protein was significantly increased compared with the normal control 30 min after leptin stimulation ( $P < 0.01$ ), and p-ERK1/2 protein expression was also significantly increased correspondingly ( $P < 0.05$ ). UA, AG490, DPI and PD98059 inhibited the p47<sup>Phox</sup> protein translocation to membrane and ERK1/2 protein phosphorylation in HSC-T6 cells. Compared with normal control group, leptin stimulation for 12 h significantly up-regulated collagen I mRNA expression in HSC-T6 cells ( $P < 0.01$ ); UA, AG490, DPI and PD98059 treatment inhibited collagen I mRNA expression in HSC-T6 cells compared with the leptin group ( $P < 0.01$ ). Proliferation rates of HSC-T6 cells were

**[收稿日期]** 2012-03-25 **[接受日期]** 2012-05-24

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81160061),江西省自然科学基金(2010GZY0327). Supported by National Natural Science Foundation of China (81160061) and Natural Science Foundation of Jiangxi Province (2010GZY0327).

**[作者简介]** 张新华,硕士. E-mail: dwchen1979@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0791-8692505, E-mail: jyyfyzx@163.com

significantly higher at 12, 24 and 48 h after leptin stimulation compared with the control group (all  $P < 0.01$ ); UA, AG490, DPI and PD98059 treatment inhibited leptin-induced cell proliferation at different time points (all  $P < 0.01$ ), with the inhibitory effect of UA being significantly weaker than that of DPI ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** UA can inhibit leptin-induced proliferation of HSC-T6 cells and collagen I expression, which might be associated with the inhibition of NOX subunit p47<sup>Phox</sup> translocation to the cell membrane and the ERK1/2 pathway activation.

[Key words] ursolic acid; hepatic stellate cells; NADPH oxidase; extracellular signal-regulated kinases; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6): 590-594]

近年来研究发现, NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)在肝纤维化发病中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>,它通过产生活性氧(ROS)介导肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)内的信号转导,成为抗肝纤维化的新靶点<sup>[3-4]</sup>。熊果酸(ursolic acid, UA)是一种中药植物中提取的单体成分,具有抗肿瘤、抗氧化、护肝等药理学作用<sup>[5]</sup>。本课题组前期研究发现 UA 能选择性诱导活化型 HSC 凋亡、抑制其增殖,同时不会诱导肝细胞凋亡<sup>[6]</sup>。体内实验显示 UA 能阻断氧化应激和脂质过氧化、抑制 HSC 的激活、减轻肝细胞坏死和纤维组织增生,抗肝纤维化效果优于秋水仙碱<sup>[7-8]</sup>。进一步研究发现 UA 能抑制瘦素诱导 HSC 的 NOX 活性及 ROS 产生,推测 NOX 可能是 UA 抗肝纤维化的作用靶点<sup>[9]</sup>。本实验在前期研究的基础上,探索 UA 对 NOX 亚基 p47<sup>Phox</sup> 蛋白膜移位及下游信号通路 ERK1/2 激活的影响,以进一步阐明 UA 抗肝纤维化的作用靶点及分子机制。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂 大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)由上海中医药大学肝病研究所提供。重组大鼠瘦素购自美国 PeproTech 公司,UA、JAK 抑制剂 AG490、NOX 抑制剂 DPI 及蛋白酶抑制剂均购自 Sigma-Aldrich 公司,ERK 抑制剂 PD98059 购自美国 Promega 公司,DMEM 培养液(高糖)购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,p-ERK1/2 购自美国 Cell Signaling 公司,p47<sup>Phox</sup> 购自美国 Bioworld 公司, $\beta$ -actin 抗体及辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,膜蛋白提取试剂盒及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,超敏发光液购自 Thermo 公司,M-MLV 反转录酶购自美国 Promega 公司,TRIzol、dNTP、Oligo(dT)<sub>15</sub>、Taq PCR MasterMix 等试剂购自北京天根生化科技有限公司。I 型胶原引物及  $\beta$ -actin 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 溶液配制 瘦素用超纯水溶解,UA、AG490、DPI 及 PD98059 用二甲亚砜溶解,贮存液均

于 -20℃ 保存,使用前加入含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释,其浓度分别为瘦素 100 ng/ml、UA 50  $\mu$ mol/L、AG490 50  $\mu$ mol/L、DPI 20  $\mu$ mol/L、PD98059 30  $\mu$ mol/L,用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌,临用前配制并于 4℃ 保存,1 周内使用。

1.3 细胞培养与分组 HSC-T6 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下的培养箱中进行培养,待细胞铺满培养瓶底部 70%,吸弃原培养液,分别加入含不同浓度的药物溶液孵育细胞。实验分 6 组:正常对照组,仅加入含 2% 胎牛血清的 DMEM;瘦素组,给予重组大鼠瘦素刺激;UA 干预组、AG490 干预组、DPI 干预组和 PD98059 干预组分别给予 UA、AG490、DPI、PD98059 预处理 30 min,再分别加入瘦素刺激不同时间。

1.4 蛋白质印迹分析检测细胞膜 p47<sup>Phox</sup> 蛋白、细胞总 p47<sup>Phox</sup> 蛋白及 p-ERK1/2 蛋白的表达 药物作用 HSC-T6 细胞 30 min 后按膜蛋白提取试剂盒说明书提取 p47<sup>Phox</sup> 蛋白,细胞总 p47<sup>Phox</sup> 蛋白使用 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂)提取,BCA 法进行蛋白含量测定。配制 10% 的分离胶和 5% 积层胶。蛋白样品加入 SDS 上样缓冲液,100℃ 变性 5 min。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后将蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上,用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h,NC 膜与稀释成 1:1 000 的一抗(p47<sup>Phox</sup>、p-ERK1/2 或  $\beta$ -actin)4℃ 孵育过夜;洗膜后将 NC 膜置入 1:10 000 的二抗中孵育 4~5 h;洗膜后,采用化学发光液显影,使用凝胶图像成像系统和 Quality One 软件进行扫描分析,以目的蛋白 p47<sup>Phox</sup>、p-ERK1/2 与相应的  $\beta$ -actin 蛋白灰度值比作为蛋白的相对表达量。实验重复 6 次取均值。

1.5 RT-PCR 检测 I 型胶原 mRNA 的表达 培养瓶中的各组细胞进行不同的药物处理 12 h 后,按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA,并反转录成 cDNA。大鼠 I 型胶原和  $\beta$ -actin 引物序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计,并由上海捷瑞生物工程有限公司合成。I 型胶原引物序列:正义 5'-GGG GCA AGA CAG TCA TCG AA-3',反义 5'-GGA

TGG AGG GAG TTT ACA CGA A-3';目的基因长度 144 bp。 $\beta$ -actin 引物序列:正义 5'-TCA GGT CAT CAC TAT CGG CAA T-3',反义 5'-AAA GAA AGG GTG TAA AAC GCA-3';目的基因长度 432 bp。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s;I 型胶原 55℃和  $\beta$ -actin 54℃各退火 30 s;72℃延伸 1 min;72℃终末延伸 7 min;4℃保存 10 min。将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,用凝胶图像分析系统进行摄像和灰度值扫描并作相对量分析,以每组所测的I型胶原 mRNA 灰度值与相对应的  $\beta$ -actin mRNA 灰度值的比值作为 mRNA 相对表达量。实验重复 6 次。

1.6 MTT 法检测细胞增殖 待 HSC-T6 细胞生长融合成单层后,用 0.25%胰蛋白酶消化。计数细胞并接种至 96 孔板内,细胞密度约为每孔 5 000 个,培养至细胞生长约占 60%左右。按分组加药,每组另设 6 个复孔,分别培养 12、24、48 h;每孔加入无菌 MTT (5 mg/ml)溶液 20  $\mu$ l,继续放入培养箱中孵育 4 h 后终止培养,每孔加入 150  $\mu$ l 的二甲亚砷振荡 10 min;在美国 Bio-rad 550 型酶标仪上选择 490 nm 波长检测各孔的光密度(D)值,计算细胞增殖率。细胞增殖率(%)=实验组 D 值/正常对照组 D 值 $\times$ 100%。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,总体若服从正态性分布,采用方差齐性行单因素方差分析和 SNK-q 检验;总体若不服从正态性分布或方差不齐,采用秩和检验(包括 Kruskal-Wallis H 和 Nemenyi 法)。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 UA 对瘦素诱导的 HSC-T6 细胞 NOX 亚基 p47<sup>Phox</sup> 蛋白膜移位的影响 蛋白质印迹分析检测结果(图 1)显示,瘦素刺激 HSC-T6 细胞 30 min,细胞膜 p47<sup>Phox</sup> 蛋白表达较正常对照组升高( $P < 0.01$ );UA 干预后的细胞膜 p47<sup>Phox</sup> 蛋白表达低于瘦素组( $P < 0.01$ ),而与正常对照组相比差异无统计学意义;AG490 干预组、DPI 干预组、PD98059 干预组的细胞膜 p47<sup>Phox</sup> 蛋白表达均低于瘦素组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。各组细胞总 p47<sup>Phox</sup> 蛋白表达差异无统计学意义。结果表明,瘦素可能通过 JAK 信号通路使 NOX 亚基 p47<sup>Phox</sup> 蛋白活化并向细胞膜移位,UA 干预能抑制瘦素诱导的 p47<sup>Phox</sup> 膜移位,从而抑制 NOX 激活。

2.2 UA 对瘦素诱导的 HSC-T6 细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化的影响 蛋白质印迹分析结果(图 2)显示,瘦

素刺激 HSC-T6 细胞 30 min 后,细胞内 p-ERK1/2 的表达较正常对照组升高( $P < 0.05$ );UA 干预后 p-ERK1/2 的表达低于瘦素组( $P < 0.01$ ),与正常对照组相比差异无统计学意义;AG490、DPI 及 PD98059 干预组 p-ERK1/2 的表达均低于瘦素组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),UA 与其他干预组间比较差异无统计学意义。结果表明,瘦素可能通过 JAK-NOX 促进 ERK 的磷酸化,UA 能抑制瘦素介导的 ERK1/2 的磷酸化。

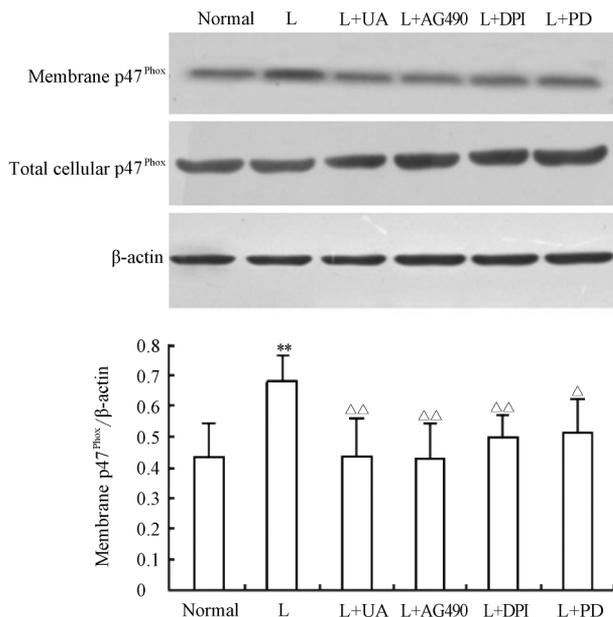


图 1 各组 HSC-T6 细胞膜 p47<sup>Phox</sup> 蛋白和细胞总 p47<sup>Phox</sup> 蛋白的表达

Fig 1 Expression of p47<sup>Phox</sup> membrane protein and total cellular p47<sup>Phox</sup> protein in HSC-T6 cells in different groups

L: Leptin; UA: Ursolic acid; PD: PD98059. \*\*  $P < 0.01$  vs normal group;  $\Delta$   $P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P < 0.01$  vs leptin group;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 UA 对瘦素诱导的 HSC-T6 细胞 I 型胶原 mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果(图 3)显示,瘦素刺激 HSC-T6 细胞 12 h 后 I 型胶原 mRNA 表达较正常对照组升高( $P < 0.01$ );UA 干预后 I 型胶原 mRNA 表达低于瘦素组( $P < 0.01$ ),与正常对照组相比差异无统计学意义。AG490、DPI 及 PD98059 干预后 I 型胶原 mRNA 表达均低于瘦素组( $P < 0.01$ )。结果表明,瘦素诱导 HSC-T6 细胞 I 型胶原 mRNA 表达,UA 能抑制瘦素诱导的 HSC-T6 细胞 I 型胶原 mRNA 的表达。

2.4 UA 对瘦素诱导的 HSC-T6 细胞增殖的影响 MTT 实验结果(图 4)显示,瘦素刺激 HSC-T6 细胞 12、24、48 h 后细胞增殖率较正常对照组升高( $P$  均  $< 0.01$ ),UA 干预后相应时间点的细胞增殖率均低于瘦素组( $P$  均  $< 0.01$ );AG490、DPI 及

PD98059 干预组相应时间点的细胞增殖率也低于瘦素组 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 其中 DPI 抑制细胞增殖的作用强于 UA ( $P < 0.01$ )。

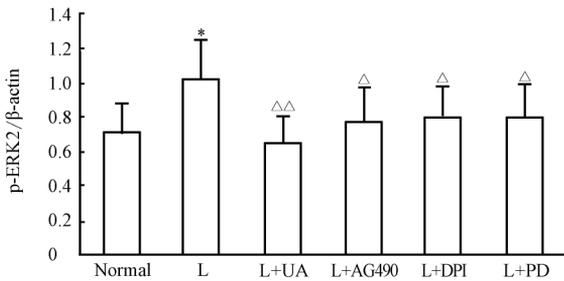
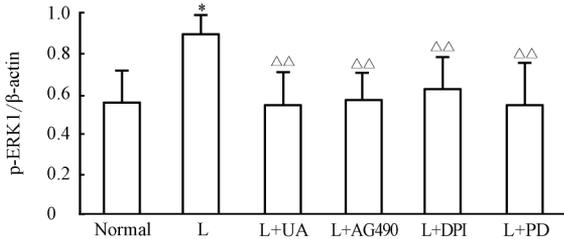
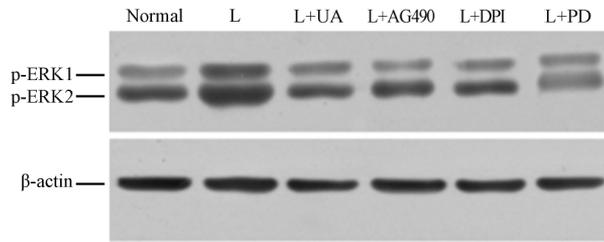


图 2 各组 HSC-T6 细胞 p-ERK1/2 蛋白的表达

Fig 2 Expression of p-ERK1/2 protein in HSC-T6 cells in different groups

L: Leptin; UA: Ursolic acid; PD: PD98059. \*  $P < 0.05$  vs normal group;  $\triangle P < 0.05$ ,  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs leptin group;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

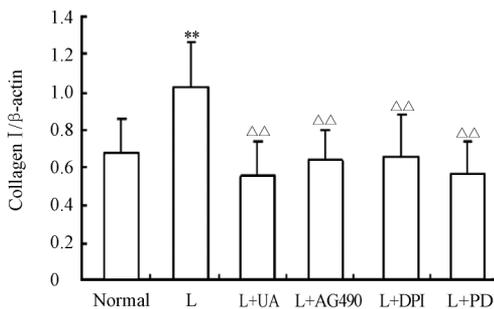
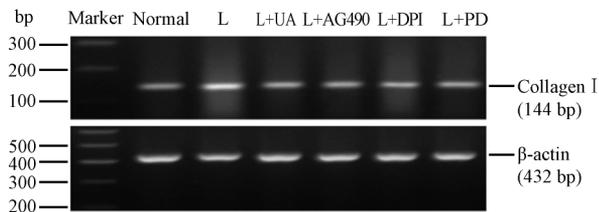


图 3 各组 HSC-T6 细胞 I 型胶原 mRNA 的表达

Fig 3 Expression of collagen I in HSC-T6 cells in different groups

L: Leptin; UA: Ursolic acid; PD: PD98059. \*\*  $P < 0.01$  vs normal group;  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs leptin group;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

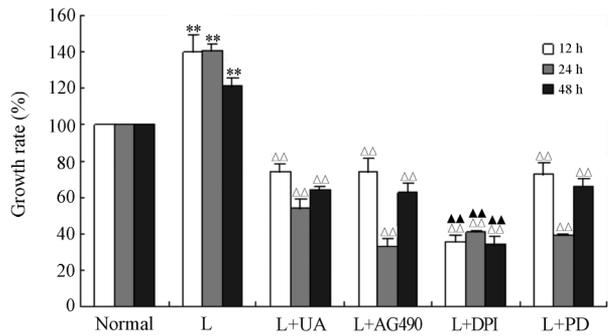


图 4 各组瘦素诱导的 HSC-T6 细胞增殖率的变化

Fig 4 Change of proliferation rate of leptin-induced HSC-T6 cells in different groups

L: Leptin; UA: Ursolic acid; PD: PD98059. \*  $P < 0.01$  vs normal group;  $\triangle\triangle P < 0.01$  vs leptin group;  $\blacktriangle P < 0.01$  vs UA (L+UA) group;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

NOX 是由 6 个亚基构成的多蛋白复合体, 经典的 NOX 由细胞膜上的 NOX2 (又称为 gp91<sup>Phox</sup>)、p22<sup>Phox</sup> 和位于细胞质的 p47<sup>Phox</sup>、p40<sup>Phox</sup>、p67<sup>Phox</sup>、小 G 蛋白 Rac 组成, 在受到刺激活化时, p47<sup>Phox</sup> 和其他胞质的亚基向细胞膜移位, 与催化亚基 NOX2 和调节亚基 p22<sup>phox</sup> 相互作用, 结果将 NADPH 的两个电子连续传递给氧分子而产生超氧化物<sup>[10]</sup>。近年来研究表明, NOX 以“信号通路放大器”的角色参与细胞增殖、血管生成和纤维化<sup>[11]</sup>, 在各种组织器官纤维化发病中起关键作用, 被认为是防治纤维化疾病的重要新靶点<sup>[4]</sup>。NOX 在肝纤维化发病中也起关键作用, De Minicis 等<sup>[12]</sup> 研究发现瘦素通过 JAK 激活 NOX 产生 ROS, 以氧化还原方式活化 AKT、ERK1/2 等下游信号通路, 引起 HSC 增殖、纤维生成及炎症反应。本课题组前期研究发现, UA 能抑制瘦素诱导 HSC-T6 细胞的 NOX 活性上调和 ROS 的产生, 推测 UA 下调 NOX 亚基 Rac1、p22<sup>Phox</sup> 的表达可能是它抑制 HSC 的 NOX 活性机制之一<sup>[9]</sup>。NOX 活性除受 NOX 亚基表达影响外, 还受蛋白磷酸化、NOX 亚基聚集及膜移位的调节<sup>[13]</sup>。UA 是否直接抑制 NOX 亚基的活化及膜移位仍不清楚。

本实验发现, 瘦素刺激 HSC-T6 细胞后细胞膜上 p47<sup>Phox</sup> 蛋白的表达增加, 提示瘦素诱导了 HSC-T6 细胞 NOX 的激活。JAK 的抑制剂 AG490 完全抑制了瘦素引起的细胞膜 p47<sup>Phox</sup> 蛋白表达, 说明瘦素通过 JAK 信号通路引起 p47<sup>Phox</sup> 蛋白膜移位及 NOX 激活。我们发现 UA 干预后细胞膜 p47<sup>Phox</sup> 蛋白的表达降低, 与 NOX 抑制剂 DPI 作用差异无统计学意义。DPI 抑制 NOX 活化的作用机制是抑制细

胞内 NOX 亚基的移位,提示 UA 抑制 NOX 激活的机制与减少 p47<sup>Phox</sup> 蛋白向细胞膜移位有关。结合前期研究结果<sup>[9]</sup>,推测 UA 抑制 HSC-T6 细胞 NOX 活性及 ROS 产生的机制一方面与下调 NOX 亚基表达有关,另一方面还与抑制 p47<sup>Phox</sup> 蛋白向细胞膜移位从而阻止 NOX 活化有关。

NOX 激活后以氧化还原方式活化 ERK1/2 等下游信号通路,本实验观察到瘦素作为促肝纤维化因子刺激 HSC-T6 细胞后 p-ERK1/2 蛋白表达增加,说明 NOX 参与调控 ERK1/2 的激活,与 De Minicis 等<sup>[12]</sup> 研究结果一致。在给予 UA 干预后细胞内 p-ERK1/2 表达下调,与 ERK 抑制剂 PD98059 的作用差异无统计学意义,说明 UA 抑制了 ERK1/2 信号通路的激活。

ERK1/2 信号通路是 MAPK 家族成员,它与细胞增殖、分化密切相关。Saxena 等<sup>[14]</sup> 报道瘦素与 Ob 受体结合后通过 ERK 和 AKT 信号通路促进 HSC 增殖并抑制其凋亡。Cao 等<sup>[15]</sup> 研究发现,瘦素能通过 JAK 介导产生 ROS 来激活 MAPK 信号通路,从而促进 I 型胶原的基因表达。本课题组前期等研究显示 UA 能抑制体外培养的 HSC-T6 细胞增殖<sup>[6]</sup>,但 UA 对促进肝纤维化因子作用引起 HSC-T6 细胞增殖是否有抑制作用尚不清楚。本实验结果显示,UA 干预能抑制瘦素诱导的 HSC-T6 细胞增殖及 I 型胶原 mRNA 的表达,进一步在体外证明 UA 具有抗肝纤维化作用。DPI 和 PD98059 均能抑制 HSC-T6 细胞增殖和 I 型胶原合成,提示 UA 抑制 HSC-T6 细胞增殖、I 型胶原 mRNA 表达的机制可能与它阻断 NOX-ERK1/2 信号通路的激活有关。

综上所述,瘦素通过 JAK 信号通路使 HSC-T6 细胞的 NOX 亚基 p47<sup>Phox</sup> 蛋白向细胞膜移位而激活 NOX,从而引起 ERK1/2 的磷酸化;UA 一方面通过下调 NOX 亚基表达<sup>[9]</sup>,另一方面通过抑制 p47<sup>Phox</sup> 蛋白膜移位而阻止 NOX 活化产生 ROS,从而抑制 NOX 调控的下游信号通路 ERK1/2 的磷酸化,抑制细胞增殖和 I 型胶原的合成。我们前期体外研究发现 UA 能诱导 HSC 凋亡,体内能抑制 HSC 激活、减轻肝细胞坏死和纤维组织增生<sup>[6-8]</sup>,最近日本学者也证实 UA 能诱导 HSC 凋亡和改善肝纤维化<sup>[16]</sup>,这充分说明 UA 有潜力成为抗肝纤维化药物。但它对 NOX 调控的其他信号网络的作用,以及体内 HSC 的 NOX 和肝细胞 NOX 的影响尚待进一步的研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Friedman S L. Evolving challenges in hepatic fibrosis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*,2010,7:425-436.
- [2] De Minicis S,Brenner D A. Nox in liver fibrosis[J]. *Arch Biochem Biophys*,2007,462:266-272.
- [3] 何文华,朱 萱. NADPH 氧化酶产生的活性氧簇对肝星状细胞内信号转导的调控[J]. *世界华人消化杂志*,2008,16:1897-1903.
- [4] Lambeth J D,Krause K H,Clark R A. Nox enzymes as novel targets for drug development[J]. *Semin Immunopathol*,2008,30:339-363.
- [5] 张新华,朱 萱. 熊果酸药理学的最新研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*,2011,31:1285-1289.
- [6] 申月明,朱 萱,张昆和,谢 勇,陈 江,戴 颖,等. 熊果酸对肝星状细胞增殖与凋亡的影响[J]. *中华肝脏病杂志*,2008,16:298-301.
- [7] 欧阳灿晖,朱 萱,张焜和,戴 颖,陈 江,何文华,等. 熊果酸对肝纤维化大鼠肝组织 TGF-β1 和 α-SMA 表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*,2009,17:2237-2243.
- [8] 戴 颖,朱 萱. 熊果酸抗实验性大鼠肝纤维化作用机制的研究[J]. *江西医药*,2008,43:414-417.
- [9] 何文华,朱 萱,李弼民,刘志坚,张焜和,张新华,等. 熊果酸对肝星状细胞还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶的影响[J]. *中华消化杂志*,2011,31:484-486.
- [10] Bedard K,Krause K H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*,2007,87:245-313.
- [11] Chan E C,Jiang F,Peshavariya H M,Dusting G J. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering[J]. *Pharmacol Ther*,2009,122:97-108.
- [12] De Minicis S,Seki E,Oesterreicher C,Schnabl B,Schwabe R F,Brenner D A. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase mediates fibrotic and inflammatory effects of leptin on hepatic stellate cells[J]. *Hepatology*,2008,48:2016-2026.
- [13] Yang K L,Chang W T,Chuang C C,Hung K C,Li E I. Antagonizing TGF-beta induced liver fibrosis by a retinoic acid derivative through regulation of ROS and calcium influx[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2008,365:484-489.
- [14] Saxena N K, Titus M A, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman S V, et al. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation[J]. *FASEB J*,2004,18:1612-1614.
- [15] Cao Q,Mak K M,Lieber C S. Leptin enhances alpha1(I) collagen gene expression in LX-2 human hepatic stellate cells through JAK-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent MAPK pathways[J]. *J Cell Biochem*,2006,97:188-197.
- [16] Wang X,Ikejima K,Kon K,Arai K,Aoyama T,Okumura K, et al. Ursolic acid ameliorates hepatic fibrosis in the rat by specific induction of apoptosis in hepatic stellate cells[J]. *J Hepatol*,2011,5:379-387.

[本文编辑] 商素芳