

网络出版时间: 2016-1-20 10:32:26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160120.1032.010.html>

荔枝核总黄酮抑制人肝星状细胞增殖作用机制的研究

李彩¹, 林丽馨², 肖绪华¹, 刘燕秀¹, 成秋宸¹, 董勇¹, 覃桂金¹, 霍群³, 卢青¹, 赵永忠¹

摘要 目的 研究荔枝核总黄酮(TFL)对转化生长因子- β 1(TGF- β 1)诱导的人肝星状细胞(HSC-LX2)增殖与核因子- κ B(NF- κ B)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的影响。方法 体外培养HSC-LX2, TGF- β 1刺激24 h后给予不同浓度的TFL(80、160、320、640、800 μ g/ml)干预; 给药后24、48、72 h, 用MTT法分别检测TFL对HSC-LX2增殖的影响; 采用半定量PCR检测各组NF- κ B、 α -SMA mRNA的表达; Western blot检测NF- κ B、 α -SMA蛋白的表达情况。结果 MTT检测结果显示TFL呈时间依赖性抑制TGF- β 1诱导HSC-LX2增殖, 以作用48 h最为明显, 其半数抑制浓度(IC₅₀)为302 μ g/ml。TFL各剂量组作用48 h后, HSC-LX2细胞中NF- κ B和 α -SMA基因和蛋白的表达水平都降低, 尤以300 μ g/ml和600 μ g/ml药物浓度组较明显, 与对照组比较, 有显著性差异($P < 0.05$)。结论 TFL在体外对TGF- β 1诱导的HSC-LX2的增殖有抑制作用, 其作用机制可能是通过抑制细胞中NF- κ B的表达, 从而起到抗肝纤维化的作用。

关键词 荔枝核总黄酮; 人肝星状细胞; 细胞增殖; NF- κ B

中图分类号 R 575

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0171-05

2015-11-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81360659); 广西自然科学基金(编号: 2012GXNSFAA053105)

作者单位: ¹ 桂林医学院附属医院消化内科; ² 桂林医学院生物技术学院, 桂林 541001³ 广西壮族自治区南溪山医院药剂科, 桂林 541002

作者简介: 李彩, 女, 硕士研究生;

赵永忠, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 13607736670@163.com

肝纤维化是指以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝脏内过度沉积, 是多种慢性肝病共有的、渐进性的病理阶段^[1]。核转录因子- κ B(nuclear factor B, NF- κ B)是一种有多向调节功能的蛋白质因子, 有转录激活功能; 在肝纤维化的发生发展中, NF- κ B不仅可以促进肝脏的炎症反应, 还能够促进肝星状细胞的活化, 对肝纤维化的发生发展起着重要的调控作用^[2-3]。广西盛产荔枝, 荔枝核作为传统中药, 在体外能够显著抑制HepG2细胞、Colo320DM细胞和SW480细胞的增殖^[4-5]。荔枝核总黄酮(total flavone of semen litchi, TFL)对大鼠肝纤维化有较好的疗效^[6-7], 该实验旨在探讨TFL在不同剂量和不同作用时间下对人肝星状细胞(human hepatic stellate cell, HSC-LX2)的增殖抑制作用, 以及对NF- κ B、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)基因和蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器 HSC-LX2购自中美合资博慧斯生物医药科技有限公司; TFL购自南京泽朗医药科技有限公司, 纯度80%; 培养基DMEM购自美国Gibco公司; 胎牛血清(FBS)购自美国Gemini公司; 胰蛋白酶、青链霉素、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自中国Solarbio公司; TGF- β 1购自美国PeproTech公司; 总RNA提取试剂盒购自北京天根公司; 逆转录试剂盒、2 \times PCR Master Mix购自日本TaKaRa公司;

derived endothelial progenitor cells (EPCs). **Methods** First, EPCs were stimulated by T β 4 with different concentration gradients, then processed by T β 4 with the same concentration for gradient time. The capacities of proliferation, migration and adhesion were determined by CCK-8 assay, Transwell migration assay and adhesion assay respectively. **Results** We found T β 4 could significantly enhance the proliferative, migratory and adhesive capacities of EPCs, the effects of experiment group were significant with the concentration of 1 000 ng/ml when compared with the control group ($P < 0.05$). As time went by, the proliferative capacity of experiment group was better than the control group at each time point ($P < 0.05$); the adhesive capacity was the most significant at the time point of 48 h when compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggest that T β 4 can increase the proliferative, migratory and adhesive capacities of EPCs, preprocessing with T β 4 (1 000 ng/ml) for 48 h can obtain the optimal effect.

Key words endothelial progenitor cells; thymosin β 4; proliferation; migration; adhesion

引物由上海生工生物工程公司合成;总蛋白提取试剂盒购自北京博奥森公司;BCA蛋白定量试剂盒购自北京碧云天公司;抗NF- κ B单克隆抗体购自美国BD公司;抗 α -SMA单克隆抗体购自英国ABcam公司;抗GAPDH单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗及山羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Western blot化学发光试剂盒购自美国Thermo公司;梯度PCR仪购自德国Sigma公司;倒置相差显微镜购自日本奥林巴斯;酶标仪购自美国伯乐公司;电泳仪购自北京六一仪器厂;凝胶成像分析仪购自上海培清公司。

1.2 方法

1.2.1 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、TFL母液的配制 10 μ g TGF- β 1溶解于50 μ l浓度为10 mM的柠檬酸(pH 3.0)配成0.2 mg/ml的TGF- β 1母液。TFL用5 ml/L的DMSO溶解,配成800 μ g/ml的TFL母液,0.22 μ m微孔滤器过滤除菌备用,然后根据需要再稀释成所需要的浓度。

1.2.2 细胞培养 培养HSC-LX2,用含有10% FBS、100 U/ml的青霉素和链霉素的DMEM高糖培养基,在5% CO₂、37 $^{\circ}$ C恒温箱内培养,待细胞长至80%~90%时按1:2~1:4的密度传代,每隔2~3 d传代1次,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.3 细胞分组及处理 共分为5组:空白对照组(第1组)、实验对照组(第2组)、低浓度TFL组(第3组)、中浓度TFL组(第4组)、高浓度TFL组(第5组)。第1组:在DMEM培养基中加入终浓度为5 ng/ml^[8]的人重组TGF- β 1;第2、3、4、5组:在第1组的基础上加入5%的DMSO,再分别加入TFL,使其终浓度为0、150、300、600 μ g/ml。

1.2.4 MTT法检测TFL对细胞增殖的影响 将对数生长期的细胞按 2×10^3 个/孔,接种于96孔细胞培养板,每孔加入培养基150 μ l,置5% CO₂、37 $^{\circ}$ C恒温箱培养24 h。待细胞贴壁后换液加药,将不同浓度的TFL(终浓度为80、160、320、640、800 μ g/ml)分5个组作用于细胞,并设立空白对照组和实验对照组(对照组),每组设8个复孔,置于5% CO₂、37 $^{\circ}$ C恒温箱再培养24、48、72 h后吸去上清液。每孔加入培养基100 μ l及浓度为5 mg/ml的MTT 20 μ l,置5% CO₂、37 $^{\circ}$ C恒温箱培养4 h,弃去各孔中的液体;每孔加入DMSO 150 μ l,在37 $^{\circ}$ C恒温振荡器上震荡10 min,于酶标仪单波长为490 nm条件下测其吸光度(absorbance value, A)值。抑制率(inhibi-

tion rate, IR) (%) = (1 - 药物组/实验对照组) \times 100%。根据IR计算TFL对细胞增殖的半数抑制浓度(50% inhibition concentration, IC₅₀)。

1.2.5 半定量PCR检测HSC-LX2中NF- κ B、 α -SMA mRNA的表达 ①将对数生长期的细胞以 3.5×10^5 个/皿种于10 cm的细胞培养皿,24 h贴壁后,分为:空白对照组、实验对照组、低浓度TFL组、中浓度TFL组、高浓度TFL组,继续培养48 h。②用试剂盒提取细胞的总RNA,通过分光光度计来检测RNA的浓度和纯度, A₂₆₀/A₂₈₀均在1.8~2.0,用1%琼脂糖凝胶电泳来检测RNA的完整性。③各取总RNA 1 μ g,将其逆转录成cDNA。④引物设计,以 β -actin为内参,引物序列NF- κ B: F: 5'-AACAGAGAGGATTTTCGTTTCCG-3', R: 5'-TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT-3',产物长度为104 bp; α -SMA: F: 5'-CTATGAGGGCTATGCCTTGCC-3', R: 5'-GCTCAGCAGTAGTAACGAAGGA-3',产物长度为122 bp; β -actin: F: 5'-AAAGACCTGTACGCCAACAC-3', R: 5'-GTCATACTCCTGCTTGCTGAT-3',产物长度为219 bp。⑤PCR扩增反应条件: β -actin 94 $^{\circ}$ C预变性2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s,共反应30个循环,72 $^{\circ}$ C延伸2 min; α -SMA 94 $^{\circ}$ C预变性2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s,共反应35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸2 min; NF- κ B 94 $^{\circ}$ C预变性2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s,共反应35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸2 min。⑥产物以2%的琼脂糖凝胶电泳检测,用培清JS-780全自动凝胶成像分析系统进行分析,以待测样品与内参的比值做半定量分析。

1.2.6 Western blot检测HSC-LX2中NF- κ B、 α -SMA蛋白的表达 细胞培养及分组同上1.2.5①,每组样品用预冷的PBS洗涤3次,加入WIP裂解液,裂解30 min后,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心20 min,取上清提取总蛋白,BCA法进行蛋白定量,SDS-PAGE凝胶电泳,湿转法转膜,BSA封闭1 h,一抗(GAPDH、NF- κ B和 α -SMA)4 $^{\circ}$ C孵育摇床过夜, TBST洗涤三遍后加相应的二抗,室温孵育1.5 h,洗涤,ECL显影,Bio-Rad ChemiDoc XRS+化学发光成像系统曝光,以内参为标准,计算出每组蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用SPSS 18.0统计软件进行分析,实验数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间实验数据进行单因素方差分析,组间多重比较采用LSD- t 检验。

2 结果

2.1 TFL 对 TGF-β1 活化的 HSC-LX2 增殖的影响 TFL 对 TGF-β1 活化的 HSC-LX2 的增殖有抑制作用, 药物作用 24 h, 抑制作用不明显, IR 为 0.9% ~ 16.8%。此时低浓度的药物甚至还有促进作用, 药效还没发挥出来; 药物作用 48 h, IR 为 5.0% ~ 85.5%。此时有明显的抑制作用, 并且和实验对照组相比, 药物浓度 ≥ 160 μg/ml, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 药物作用 72 h, IR 为 40.8% ~ 88.9%。浓度 ≥ 80 μg/ml, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

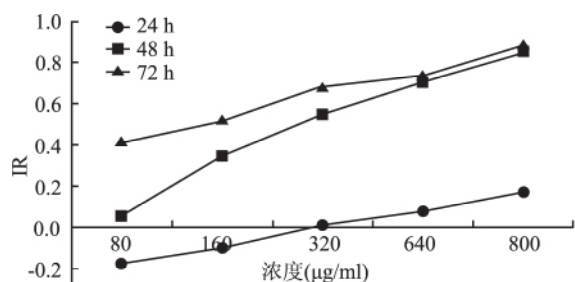


图 1 不同时间和浓度 TFL 对 HSC-LX2 的抑制曲线

2.2 TFL 抑制 TGF-β1 活化的 HSC-LX2 中 α-SMA 和 NF-κB mRNA 表达 TGF-β1 活化的 HSC-LX2 中, α-SMA 和 NF-κB mRNA 在各组中均有表达, 其中空白对照组和实验对照组表达较多, 条带较宽较亮, 两组差异无统计学意义, 低浓度 TFL 组的表达量略低于实验对照组。中浓度 TFL 组和高浓度 TFL 组表达明显低于实验对照组, 表达量较少, 条带较暗, α-SMA/β-actin 比值差异有统计学意义 ($F = 137.258, P < 0.05$), NF-κB/β-actin 比值差异有统计学意义 ($F = 58.301, P < 0.05$)。见图 2、3。

2.3 TFL 抑制 TGF-β1 活化的 HSC-LX2 中 α-SMA 和 NF-κB 蛋白表达 TGF-β1 活化的各组 HSC-LX2 中, 空白对照组和实验对照组中 α-SMA 和

NF-κB 蛋白表达量最多, 两组差异无统计学意义; 与实验对照组相比, 低浓度 TFL 组的表达量略低, 而中浓度 TFL 组和高浓度 TFL 组的表达量明显减少,

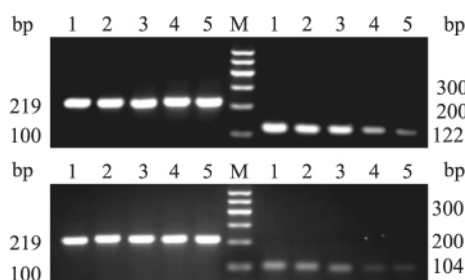


图 2 逆转录 PCR 检测 HSC-LX2 中 α-SMA、NF-κB mRNA 的表达
M: DNA Marker; 1: 空白对照组; 2: 实验对照组; 3: 低浓度 TFL 组; 4: 中浓度 TFL 组; 5: 高浓度 TFL 组

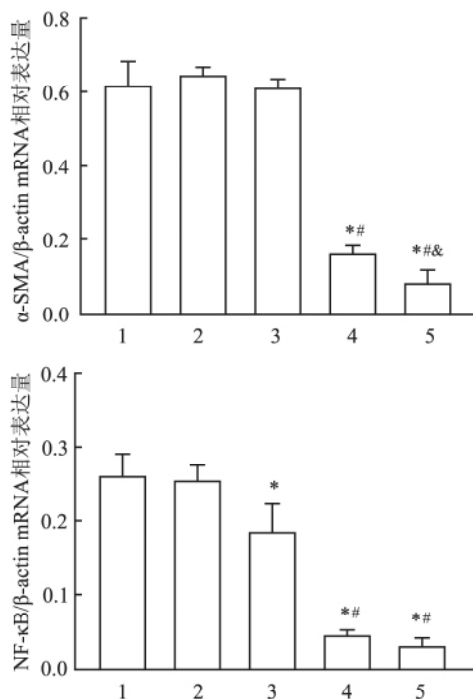


图 3 各组 HSC-LX2 中 α-SMA 和 NF-κB mRNA 的表达
1: 空白对照组; 2: 实验对照组; 3: 低浓度 TFL 组; 4: 中浓度 TFL 组; 5: 高浓度 TFL 组; 与实验对照组比较: * $P < 0.05$; 与低浓度 TFL 组比较: # $P < 0.05$; 与中浓度 TFL 组比较: & $P < 0.05$

表 1 TFL 对 TGF-β1 活化的 HSC-LX2 的抑制作用 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h		48 h		72 h	
	A 值	IR (%)	A 值	IR (%)	A 值	IR (%)
空白对照	0.55 ± 0.05	-	0.74 ± 0.06	-	0.86 ± 0.06	-
实验对照	0.54 ± 0.10	1.77	0.75 ± 0.07	-1.53	0.85 ± 0.04	0.81
80 μg/ml	0.64 ± 0.05*	-17.58	0.72 ± 0.04	5.07	0.51 ± 0.06*	40.78
160 μg/ml	0.60 ± 0.07	-10.75	0.50 ± 0.05*	34.20	0.41 ± 0.05*	52.06
320 μg/ml	0.54 ± 0.05	0.92	0.35 ± 0.05*	54.08	0.27 ± 0.05*	67.89
640 μg/ml	0.50 ± 0.05	7.57	0.22 ± 0.09*	70.22	0.23 ± 0.09*	73.34
800 μg/ml	0.45 ± 0.05*	16.77	0.11 ± 0.05*	85.53	0.09 ± 0.05*	88.90

与实验对照组比较: * $P < 0.05$

表2 各组 HSC-LX2 中 α -SMA 和 NF- κ B 蛋白的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

项目	空白对照组	实验对照组	低浓度 TFL 组	中浓度 TFL 组	高浓度 TFL 组
α -SMA/GAPDH	0.611 \pm 0.166	0.581 \pm 0.154	0.474 \pm 0.119	0.338 \pm 0.087*	0.224 \pm 0.065* #
NF- κ B/GAPDH	0.783 \pm 0.041	0.884 \pm 0.059	0.642 \pm 0.033*	0.459 \pm 0.083* #	0.427 \pm 0.115* #

与实验对照组比较: * $P < 0.05$; 与低浓度 TFL 组比较: # $P < 0.05$

α -SMA/GAPDH 和 NF- κ B/GAPDH 比值差异均有统计学意义 ($F = 5.199, 22.494, P < 0.05$)。见表 2、图 4。

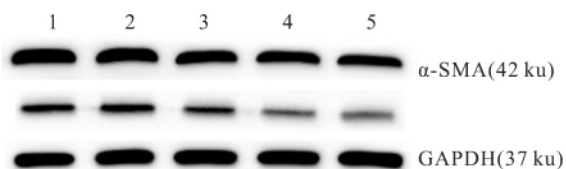


图4 Western blot 检测 HSC-LX2 中 α -SMA、NF- κ B 蛋白的表达
1: 空白对照组; 2: 实验对照组; 3: 低浓度 TFL 组; 4: 中浓度 TFL 组; 5: 高浓度 TFL 组

3 讨论

TGF- β 1 是目前已发现的最强的致纤维化的细胞因子之一,研究^[9]表明 TGF- β 1 在一定浓度范围内显著增强 α 2(I) 胶原基因启动子活性,并且有剂量依赖性。肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化转变必经的中间环节,其本质是 ECM 合成与降解失衡,导致 ECM 在肝脏中大量沉积。HSC 是过量 ECM 的主要来源,其活化和增殖是肝纤维化形成与发展的关键环节。当受到外界刺激时,HSC 发生表型转化而被激活,活化的 HSC 增殖,转变为表达 α -SMA 的肌成纤维样细胞。现普遍认为 α -SMA 是肝星状细胞活化的标志物^[10]。目前抗肝纤维化治疗的策略有两种,一是逆转活化的 HSC,二是抑制活化的 HSC 增殖。但是将活化的 HSC 逆转为静止的,几乎是不可能的^[11],因此,抑制活化的 HSC 增殖,减少 HSC 的数量,减少 ECM 的沉积已成为肝纤维化治疗的主要策略。

研究^[12]表明,NF- κ B 在胆汁淤积性肝纤维化大鼠模型中表达显著增强,而在正常组织的表达量却很少。NF- κ B 是介导炎症反应的关键介质,活化的 HSC 可以诱导 NF- κ B 表达增加,激活的 NF- κ B 可以使 HSC 中多种炎症因子的表达增加,如细胞因子 TNF- α 、IL-6、ICAM-1、TGF- β 等,从而引起更多的 HSC 活化,产生过量的 ECM,而这些因子的增加又可以反过来激活 NF- κ B,如此形成一个正反馈调节^[13],加重肝纤维化。NF- κ B 不仅对炎症因子的表达起着中枢性的调控作用,而且对 HSC 的活化增殖

也起着重要作用。NF- κ B 通过调控炎症因子的转录参与 HSC 的激活^[14],并且由于 NF- κ B 还有抗凋亡作用^[15],能够维持 HSC 保持持续激活的状态。这在一定程度上促进了肝纤维化的发生发展。因此,可以通过抑制 NF- κ B 的活性,从而来逆转肝纤维化。

本实验用 5 ng/ml TGF- β 1 活化 HSC-LX2,所有实验分组在 TGF- β 1 一致性的基础上展开。MTT 实验表明 TFL 作用 24 h,抑制作用不明显;作用 48 h 和 72 h,IR 分别为 5.0% ~ 85.5% 和 40.8% ~ 88.9%,由此来看,TFL 作用 48 h 和 72 h 都有抑制作用,但是延长药物作用时间,最大 IR 并没有显著增加,由此见 IR 并不是随作用时间的延长而呈线性增加的;当达约 85% ~ 89% 时,基本已到平台期。并且作用 48 h 和 72 h,药物的 IC₅₀ 分别是 302 μ g/ml 和 280 μ g/ml,在药物浓度方面也并没有很大差异。从时间和药物浓度两个方面来看,48 h 为药物作用的最佳时间,故后续实验的药物作用时间设定为 48 h,药物浓度设定为中浓度 TFL 为 300 μ g/ml,低浓度 TFL 为 150 μ g/ml,高浓度 TFL 为 600 μ g/ml。

本实验结果表明中、高浓度的 TFL 有明显的抑制活化 HSC 的增殖作用,和实验对照组相比,中、高浓度 TFL 组的 NF- κ B 的基因和蛋白的表达水平显著降低。同时也检测到中、高浓度 TFL 组的 α -SMA 的表达水平较实验对照组也显著降低,正好验证了活化 HSC 的数量减少。低浓度 TFL 对 NF- κ B 的表达是有影响的,不管是从基因还是蛋白水平,和实验对照组比较,差异有统计学意义。低浓度 TFL 对 α -SMA 表达的影响很微弱,因为 α -SMA 是肝星状细胞活化的标志物,低浓度 TFL 只是抑制了活化肝星状细胞的增殖,但是活化了的肝星状细胞并没有凋亡,所以表达的 α -SMA 还是很高的。中浓度和高浓度的 TFL,不仅可以抑制细胞的增殖,可能还起到了促进其凋亡的作用。TFL 从基因和蛋白水平降低 HSC-LX2 中 NF- κ B 的表达,可能是 TFL 抗肝纤维化的作用机制之一;但是对于 TFL 是否通过 NF- κ B 通路来抗肝纤维化,尚未完全阐明,尤其是 NF- κ B 通路与其他信号转导通路之间的相互关系,亟需更进

一步的动物实验来探索和研究。

参考文献

- [1] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Gastroenterology* 2008, 134(6): 1655–69.
- [2] Friedman S L. Evolving challenges in hepatic fibrosis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010, 7(8): 425–36.
- [3] Elsharkawy A M, Mann D A. Nuclear factor- κ B and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis [J]. *Hepatology* 2007, 46(2): 590–7.
- [4] 熊爱华, 沈文娟, 肖柳英, 等. 荔枝核含药血清对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中药材* 2008, 31(10): 1533–6.
- [5] Hsu C P, Lin C C, Huang C C, et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal carcinoma by Litchi seed extract [J]. *J Biomed Biotechnol* 2012, 2012: 341479.
- [6] 董勇, 赵永忠, 肖绪华, 等. 荔枝核总黄酮对活化大鼠肝星状细胞的增殖抑制作用及 TLR4 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2015, 50(4): 432–6.
- [7] 成秋宸, 赵永忠, 肖绪华, 等. 荔枝核总黄酮改善胆总管结扎大鼠胆汁淤积症状的研究 [J]. *天津医药* 2014, 42(3): 224–7.
- [8] Zhang Z, Garron T M, Li X J, et al. Recombinant human decorin inhibits TGF- β 1-induced contraction of collagen lattice by hyper-trophic scar fibroblasts [J]. *Burns* 2009, 35(4): 527–37.
- [9] Kanamaru Y, Nakao A, Tanaka Y, et al. Involvement of p300 in TGF- β /Smad-pathway-mediated α 2(I) collagen expression in mouse mesangial cells [J]. *Nephron Exp Nephrol* 2003, 95(1): e36–42.
- [10] Venugopal S K, Jiang J, Kim T H, et al. Liver fibrosis causes down-regulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010, 298(1): G101–6.
- [11] Friedman S L, Rockey D C, Bissell D M. Hepatic fibrosis 2006: report of the Third AASLD Single Topic Conference [J]. *Hepatology* 2007, 45(1): 242–9.
- [12] 赵永忠, 成秋宸, 卢青, 等. 荔枝核总黄酮治疗胆汁淤积性肝纤维化大鼠的实验研究 [J]. *中华肝脏病杂志* 2015, 23(2): 137–9.
- [13] Kulms D, Schwarz T. NF- κ B and cytokines [J]. *Vitam Horm* 2006, 74: 283–300.
- [14] Hellerbrand C, Jobin C, Jimuro Y, et al. Inhibition of NF- κ B in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IkappaB super-repressor [J]. *Hepatology* 1998, 27(5): 1285–95.
- [15] Wang C Y, Mayo M W, Baldwin A S Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B [J]. *Science* 1996, 274(5288): 784–7.

Mechanism for total flavone of semen litchi inhibiting human hepatic stellate cell proliferation

Li Cai¹, Lin Lixin², Xiao Xuhua¹, et al

(¹Dept of Digestive Medicine, The Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001;

²Dept of Pharmacy, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002)

Abstract Objective To study the effects of total flavone of semen litchi (TFL) on transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) induced human hepatic stellate cell proliferation and the expressions of nuclear factor- κ B (NF- κ B), α -smooth muscle actin (α -SMA). **Methods** HSC-LX2 cells were cultured *in vitro* using TGF- β 1 stimulating 24 h, then gave different concentrations of TFL for different hours. MTT method was used to detect the effects of TFL on HSC-LX2 cell proliferation. RT-PCR was used to detect the expression levels of NF- κ B and α -SMA mRNA. The levels of NF- κ B and α -SMA proteins were detected by Western blot assay. **Results** MTT method showed that TFL could inhibit TGF- β 1 induced HSC-LX2 cell proliferation in a time-dependent manner. The effect of 48 h was the most obvious and its IC₅₀ was 302 μ g/ml. The expression levels of NF- κ B, α -SMA mRNA and proteins were both decreased among the TFL group. Compared with Control group, the expression levels of NF- κ B, α -SMA were significantly lower in 300 μ g/ml and 600 μ g/ml drug concentration group ($P < 0.05$). **Conclusion** *In vitro*, TFL may inhibit the proliferation of TGF- β 1-induced HSC-LX2, so as to prevent the formation of hepatic fibrosis, which may be related with decreasing the expression of NF- κ B.

Key words total flavone of semen litchi; human-hepatic stellate cell; proliferation inhibition; NF- κ B