



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目： 山奈酚通过线粒体凋亡途径诱导肝星状细胞凋亡作用机制研究
作者： 王佳慧，郑洋，黄露葵，汪磊，杨仕权，刘浩，肖华业
收稿日期： 2026-03-24
网络首发日期： 2026-04-26
引用格式： 王佳慧，郑洋，黄露葵，汪磊，杨仕权，刘浩，肖华业. 山奈酚通过线粒体凋亡途径诱导肝星状细胞凋亡作用机制研究[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260424.1729.003>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

山奈酚通过线粒体凋亡途径诱导肝星状细胞凋亡作用机制研究

王佳慧, 郑洋, 黄露葵, 汪磊, 杨仕权, 刘浩, 肖华业

(广西中医药大学赛恩斯新医药学院医学系, 南宁 530222)

摘要 **目的** 探究山奈酚诱导肝星状细胞 (HSC) 凋亡的分子机制。**方法** 将 HSC 分为 5 组, 空白对照组、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) (10 ng/mL) 组、山奈酚不同浓度 (8、16、32 μ mol/L) 组。细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 检测山奈酚对 HSC 增殖的影响; Transwell 检测山奈酚对 HSC 迁移的影响; 借助细胞流式检测各组细胞凋亡和活性氧 (ROS) 表达以及线粒体通透性转换孔 (mPTP) 开放情况; 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基-咪唑碳花青碘化物 (JC-1) 检测线粒体膜电位, Western blot 检测线粒体凋亡相关蛋白及细胞外基质蛋白表达; 透射电镜检测线粒体结构改变; 分子对接及动力学模拟分析山奈酚与沉默信息调节因子 2 同源蛋白 3 (SIRT3) 的靶向关系。**结果** 山奈酚可以显著抑制 HSC 的增殖和迁移, 同时促使 HSC 凋亡, 山奈酚显著增加 HSC ROS 表达和 mPTP 开放; 同时可以降低 HSC 线粒体膜电位; 山奈酚可以增加 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax)、活化的半胱天冬酶 3 (Cleaved-Caspase3)、Cleaved-Caspase9 的表达, 同时减少 Bcl-2 和 SIRT3 的表达; 山奈酚可以促使 HSC 线粒体分裂; 分子对接及动力学模拟显示山奈酚与 SIRT3 具有较好的结合活性和稳定性。**结论** 山奈酚通过靶向 SIRT3 介导 ROS 调控线粒体凋亡途径, 诱导 HSC 凋亡从而减少细胞外基质沉积, 表明山奈酚具有潜在的抗肝纤维化作用。

关键词 山奈酚; 线粒体凋亡; 肝星状细胞; 肝纤维化; 沉默信息调节因子 2 同源蛋白 3; 活性氧

中图分类号 R 285

文献标志码 A

2026-03-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82204755); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院重点实验室 (编号: 02.中医药壮瑶医药防治慢性肝病的基础研究); 广西中医药大学面上项目 (编号: 2024MS019); 广西高校中青年教师基础能力提升项目 (编号: 2025KY1125); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院大学生创新创业训练计划项目 (编号: 202513643008)

作者简介: 王佳慧, 女, 讲师;

刘浩, 男, 讲师, 通信作者, E-mail: LHHL4358@163.com;

肖华业, 男, 副教授, 通信作者, E-mail: 1532035137@qq.com

Study on the mechanism of kaempferol-induced apoptosis in hepatic stellate cells via the mitochondrial apoptotic pathway

Wang Jiahui, Zheng Yang, Huang Lukui, Wang Lei, Yang Shiquan, Liu Hao, Xiao Huaye

(Faculty of Chinese Medicine Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222)

Abstract *Objective* To investigate the molecular mechanisms by which kaempferol induces apoptosis in hepatic stellate cells (HSC). *Methods* HSC were divided into five groups: blank control, transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) (10 ng/mL) group, and groups treated with different concentrations of kaempferol (8, 16, 32 μ mol/L). Cell counting kit-8(CCK-8) assay was used to evaluate chrysin's effect on HSC proliferation. Transwell assay was used to assess chrysin's impact on HSC migration. Flow cytometry was used to detect apoptosis, reactive oxygen species (ROS) expression, and mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening across groups. 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidacarbocyanine iodide(JC-1) assay was used to test mitochondrial membrane potential. Western blot was used to detect apoptosis-related mitochondrial proteins and extracellular matrix protein expression. Transmission electron microscopy was used to examine mitochondrial structural alterations. Molecular docking and kinetic simulations was used to analyze the targeted interaction between kaempferol and NAD-dependent deacetylase sirtuin-3 (SIRT3). *Results* Kaempferol significantly inhibited the proliferation and migration of HSC while promoting their apoptosis. It markedly increased ROS expression and opened the mPTP in these cells, concurrently reducing their mitochondrial membrane potential. It increased the expression of Bcl-2 associated X protein (Bax), Cleaved-Caspase3, and Cleaved-Caspase9 while decreasing the expression of B lymphocytoma-2 (Bcl2) and SIRT3. Kaempferol promoted mitochondrial fission in HSC. Molecular docking and kinetic simulations revealed that kaempferol exhibits favorable binding affinity and stability with SIRT3. *Conclusion* Kaempferol induces HSC apoptosis by targeting SIRT3 to mediate ROS regulation of the mitochondrial apoptosis pathway, thereby reducing extracellular matrix deposition. This demonstrates kaempferol's potential anti-fibrotic effects in liver.

Key words kaempferol; mitochondrial apoptosis; hepatic stellate cells; liver fibrosis; NAD-dependent deacetylase sirtuin-3; reactive oxygen species

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82204755); The Key Laboratory of Faculty of Chinese Medicine Science Guangxi University of Chinese Medicine (No.02.Basic Research of the Prevention and Treatment of Chronic Liver Diseases with Chinese Medicine and Zhuang-Yao Medicine); General Project of Guangxi University of Chinese Medicine (No. 2024MS019); Project for Enhancing Young and Middle-aged Teacher's Research Basis Ability in Colleges of Guangxi (No.2025KY1125); College Student Innovation and Entrepreneurship Training Project in Faculty of Chinese Medicine Science Guangxi University of Chinese Medicine (No.202513643008).

Corresponding authors Liu Hao, E-mail: LHHL4358@163.com; Xiao Huaye, E-mail: 1532035137@qq.com

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是慢性肝病向肝硬化甚至肝癌发展的关键病理过程, 目前尚无 FDA 批准的特效靶向药物^[1-3]。肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 的过度活化并分泌大量细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是 HF 发生的核心环节^[4]。因此, 靶向诱导活化 HSC 凋亡已成为当前国内外抗 HF 研究的重要策略。其中, 以 Bcl-2 相关 X 蛋白质 (Bcl-2-associated X protein, Bax) /B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白家族为核心的线粒体途径在调控 HSC 内源性凋亡中发挥着关键作用^[5]。山奈酚作为天然黄酮醇类化合物, 已被证实具确切的抗 HF 活性^[6]。现有研究已阐明其部分机制, 发现山奈酚能通过靶向激活素受体样激酶 5 影响 Smad2/3 磷酸化来抑制 HSC 活化与基质合成^[7]。然而, 山奈酚能否通过线粒体途径直接诱导 HSC 凋亡? 这一关键问题至今尚未阐明。基于此, 该研究拟聚焦线粒体凋亡途径, 探究山奈酚诱导 HSC 凋亡的具体作用及分子机制, 旨在完善山奈酚抗 HF 的药理学机制网络, 为慢性肝病的防治提供新的治疗靶点与实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要设备

低速离心机 (德国 Eppendorf 公司, 型号 5702R); 水平摇床 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司, 型号 TS-1); 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 型号 mullSKANMK3); 流式细胞仪 (美国 Beckman 公司, 型号 CytoFLEX); 凝胶成像分析仪 (美国 Carestream 公司, 型号 MM1000); 透射电镜 (日本 Hitachi 公司, 型号 HT7700-SS)。

1.2 细胞与试剂

大鼠肝星状细胞 (HSC-T6 细胞) (武汉普诺赛生命科技有限公司, 货号 CL-0116); 山奈酚、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒、 β -肌动蛋白 (β -actin) (北京索莱宝科技有限公司, 货号: SK8030、PC0020、K200058M); 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基-咪唑碳花青碘化物 (5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidacarbocyanine iodide, JC-1) 试剂盒 (上海碧云天生物科技有限公司, 批号: C0038、C2003S); 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β 1) (美国 Peprotech 公司, 货号: AF-100-21C-100); FITC Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 BD Biosciences 公司, 批号: 7312712; 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) (美国 Sigma 公司, 货号: D6883); 线粒体膜通透性转换孔检测试剂盒 (上海翌圣生物, 货号: 40756ES60); 沉默信息调节因子 2 同源蛋白 3 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-3, SIRT3)、Bcl2 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 82210-1-RR、68103-1-Ig); 半胱天冬酶 3 (Caspase3) (批号: A2156)、

半胱天冬酶 9 (Caspase9) (批号: A2636) 购于爱博泰克公司; Bax (美国 Affinity 公司, 批号: AF0120)。

1.3 方法

1.3.1 细胞分组培养

HSC-T6 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中。取状态良好的 HSC-T6 细胞传代到 6 孔板、24 孔板或 96 孔板中, 当细胞密度达到 70%~80% 时, 进行分组处理。空白对照组: 无需使用 TGF-β1 活化, 全程使用培养液培养; TGF-β1 组: 培养基中加入 10 ng/mL TGF-β1 处理 24 h, 再加入正常的培养液培养 48 h; 山奈酚低中高组: 先加入 10 ng/mL TGF-β1 处理 24 h, 换含山奈酚浓度 8、16、32 μmol/L 的培养液继续培养 48 h^[8]。

1.3.2 CCK8 检测细胞活力

将 HSC-T6 以每孔 1×10^5 个种于 96 孔板中, 根据 1.3.1 处理后, 每孔设 3 个复孔, 另设不含细胞的完全培养基为空白对照。24 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 °C、5% CO₂ 孵育 2 h。在酶标仪 450 nm 处测各孔吸光度 (absorbance, A), 增殖率 = (实验组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) × 100%, 计算细胞存活率。

1.3.3 Transwell 检测细胞迁移情况

将按 1.3.1 处理后的细胞以 2×10^4 个/孔接种于 Transwell 上层小室, 上室使用的是无血清培养基。下层小室加入 650 μL 含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 置于培养箱中培养 24 h。次日, 用镊子夹出上层小室, 吸净上层小室的培养液, 等渗盐水洗 3 次, 棉签轻拭上层小室。结晶紫染色 5~10 min, 等渗盐水洗 3 次。显微镜下随机选取视野进行拍照, 利用 ImageJ 软件计数各组细胞迁移数。

1.3.4 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

将 HSC-T6 细胞以每孔 1×10^6 个接种到 6 孔板中, 根据 1.3.1 处理后, 每组均设 3 个平行复孔, 培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 弃去培养 24 h 细胞的原培养液, 用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化并收集细胞。取 1 mL 细胞悬液, 经 1 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液, 加入 1 mL 预冷 PBS 重悬洗涤, 重复离心洗涤两次。最后将细胞重悬于 200 μL 结合缓冲液 (binding buffer), 依次加入 10 μL 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (annexin V fluorescein Isothiocyanate, Annexin V-FITC) 和 10 μL 碘化丙啉 (propidium iodide, PI), 轻轻混匀后避光室温反应 15 min, 1 h 内用流式细胞仪上机测定, 使用 Flow Jo 7.6 计算各组细胞凋亡率。

1.3.5 流式细胞术检测各组活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 表达

将 HSC-T6 细胞以每孔 5×10^5 /mL 接种到 6 孔培养板中, 根据 1.3.1 处理后, 将细胞悬液转入离心管, 用预冷的磷酸盐缓冲液清洗 2 次, 每孔加入 500 μ L DCFH-DA 探针, 37 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min 后, 弃去染料, 无血清培养基清洗 3 次, 使用流式细胞仪检测 ROS 含量。

1.3.6 流式细胞术检测各组 mPTP

将 HSC-T6 细胞以每孔 3×10^5 /mL 接种到 6 孔培养板中, 根据 1.3.1 处理后, 用 0.25% 胰酶消化已处理好的细胞, 终止消化后收集, 1 500 r/min, 5 min 离心, 去上清液, 加 PBS 重悬; 按照线粒体膜通透性转换孔检测试剂盒说明书进行操作。样本在 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min, 无钙 PBS 重悬至 500 μ L, 流式细胞仪上机检测。

1.3.7 JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位

将 HSC-T6 细胞以 1×10^4 /孔接种到 24 孔板中, 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下培养过夜, 超纯水稀释 JC-1 试剂后, 吸取 500 μ L JC-1 工作液加入细胞孔内, 避光标记细胞 20 min, 用 PBS 清洗 3 次后在荧光显微镜下观察并拍摄荧光图像。

1.3.8 Western blot 检测相关蛋白表达

根据 1.3.1 处理细胞后, 用 PBS 洗涤细胞, 然后加入 RIPA 裂解缓冲液, BCA 法进行蛋白定量。加等量的蛋白样品进行 SDS-PAGE 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 加入一抗, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天洗膜 3 次, 将膜与二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。显色、显影后, 凝胶成像仪收集信号, 应用 ImageJ 软件分析蛋白条带光密度值。

1.3.9 透射电镜观察细胞线粒体

根据 1.3.1 处理细胞后, 用 2.5% 戊二醛溶液进行固定, 用磷酸盐缓冲盐水进行洗涤, 在室温下放置 24 h。然后, 将细胞固定在 2% 四氧化二锇的 PBS 中, 在室温下放置 1 h。接下来, 用梯度系列乙醇溶液将样品脱水。随后, 将样品包埋在环氧树脂中, 切片成超薄切片 (60 nm)。最后, 用醋酸铀酰 (1%) 和柠檬酸铅 (0.1%) 浸泡超薄切片, 用透射电镜观察和拍照。

1.3.10 分子对接与分子动力学模拟

通过 Pubchem 网站下载小分子活性成分 SDF 文件; RCSB PDB 数据库下载 SIRT3 (PDB ID: 5D7N) 的 PDB 文件。利用 Discovery Studio 软件进行分子对接操作, 将对接结果以 PDB 格式导入 Gromacs 软件中进行时长 100ns 的分子动力学模拟。

1.4 统计学处理

应用 SPSS27.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据服从正态分布且方差齐, 采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 山奈酚对 HSC 增殖的影响

CCK-8 检测结果显示, 各组间的细胞活力和增殖率差异均有统计学意义 ($F=31.212$ 、 34.203 , 均 $P<0.001$), 与空白对照组 A (0.97 ± 0.08) 比较, TGF- β 1 组 A (1.89 ± 0.17) 表达明显升高 ($LSD-t=9.999$, $P<0.01$); 与 TGF- β 1 组比较, 山奈酚 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 组 A 值 [(1.51 ± 0.09) 、 (1.33 ± 0.07) 、 (1.09 ± 0.13)] 表达显著下降 ($LSD-t=4.094$ 、 6.086 、 8.659 , 均 $P<0.01$)。山奈酚 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 组增殖率较 TGF- β 1 组显著下降 ($LSD-t=4.296$ 、 6.386 、 9.086 , 均 $P<0.01$)。见图 1。

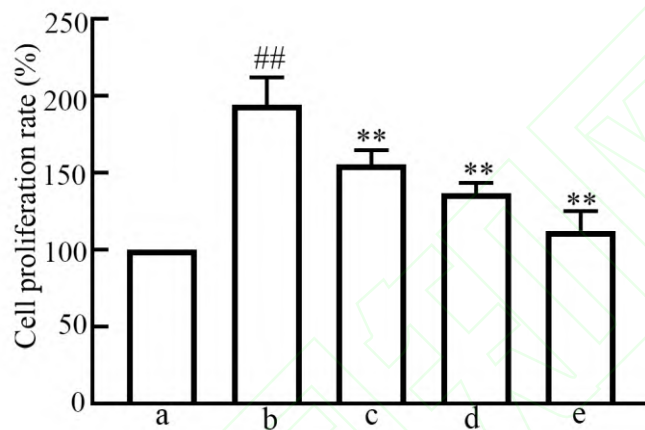


图 1 山奈酚抑制 HSC 增殖

Fig.1 Kaempferol inhibited the proliferation of HSC

注: a: blank control group; b: TGF- β 1 group; c: kaempferol 8 $\mu\text{mol/L}$ group; d: kaempferol 16 $\mu\text{mol/L}$ group; e: kaempferol 32 $\mu\text{mol/L}$ group; ## $P<0.01$ vs blank control group; ** $P<0.01$ vs TGF- β 1 group.

2.2 山奈酚对 HSC 迁移的影响

Transwell 实验结果显示各组间的细胞迁移差异均有统计学意义 ($F=73.904$, $P<0.001$), 与空白组相比, TGF- β 1 组 HSC 迁移数量显著增加 ($LSD-t=15.637$, $P<0.01$); 与 TGF- β 1 组相比, 山奈酚 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 组 HSC 迁移数量显著下降 ($LSD-t=5.862$ 、 8.896 、 12.692 , 均 $P<0.01$), 见图 2。

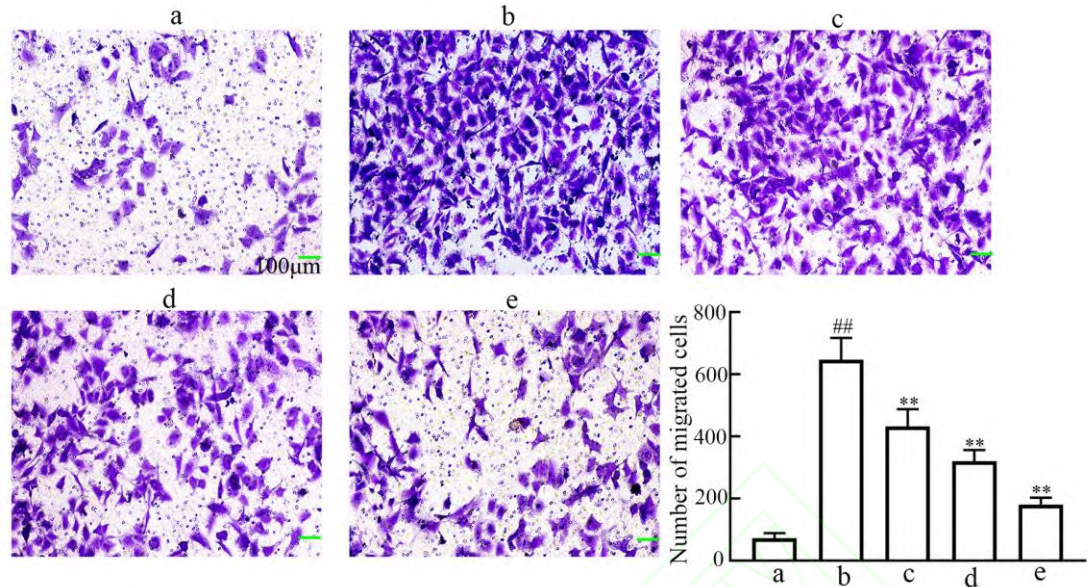


图 2 结晶紫染色观察山奈酚抑制 HSC 迁移 ×100

Fig.2 Observation of Kaempferol-inhibited HSC migration by crystal violet staining ×100

注: a: blank control group; b: TGF-β1 group; c: kaempferol 8 μmol/L group; d: kaempferol 16 μmol/L group; e: kaempferol 32 μmol/L group; ^{##} $P < 0.01$ vs blank control group; ^{**} $P < 0.01$ vs TGF-β1 group.

2.3 山奈酚对 HSC 凋亡的影响

Annexin V-APC/7-AAD 检测显示各组细胞凋亡情况差异有统计学意义 ($F=39.758$, $P < 0.001$), 与空白对照组比较, TGF-β1 组细胞凋亡率下降, 但差异无统计学意义 ($LSD-t=0.123$); 与 TGF-β1 组比较, 山奈酚 8、16、32 μmol/L 组细胞凋亡率显著增加 ($LSD-t=4.507$ 、6.869、10.380, 均 $P < 0.01$), 详细见图 3。

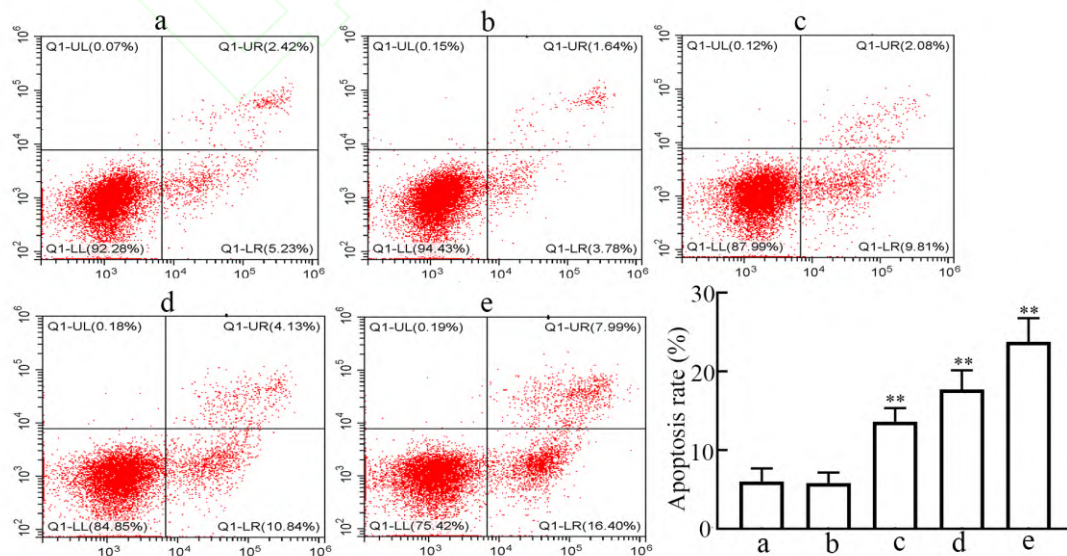


图 3 山奈酚诱导 HSC 凋亡

Fig. 3 Kaempferol induced the apoptosis of HSC

注: a: blank control group; b: TGF- β 1 group; c: kaempferol 8 μ mol/L group; d: kaempferol 16 μ mol/L group; e: kaempferol 32 μ mol/L group; ** P <0.01 vs TGF- β 1 group.

2.4 山奈酚对 HSC ROS 表达的影响

细胞流式检测显示各组细胞 ROS 表达差异有统计学意义 ($F=35.444$, $P<0.001$), 与空白对照组比较, TGF- β 1 组细胞 ROS 表达增多 (LSD- $t=2.634$, $P<0.05$); 与 TGF- β 1 组比较, 山奈酚 8、16、32 μ mol/L 组 ROS 表达显著增加 (LSD- $t=2.593$ 、5.692、7.816, 均 $P<0.05$), 详见图 4。

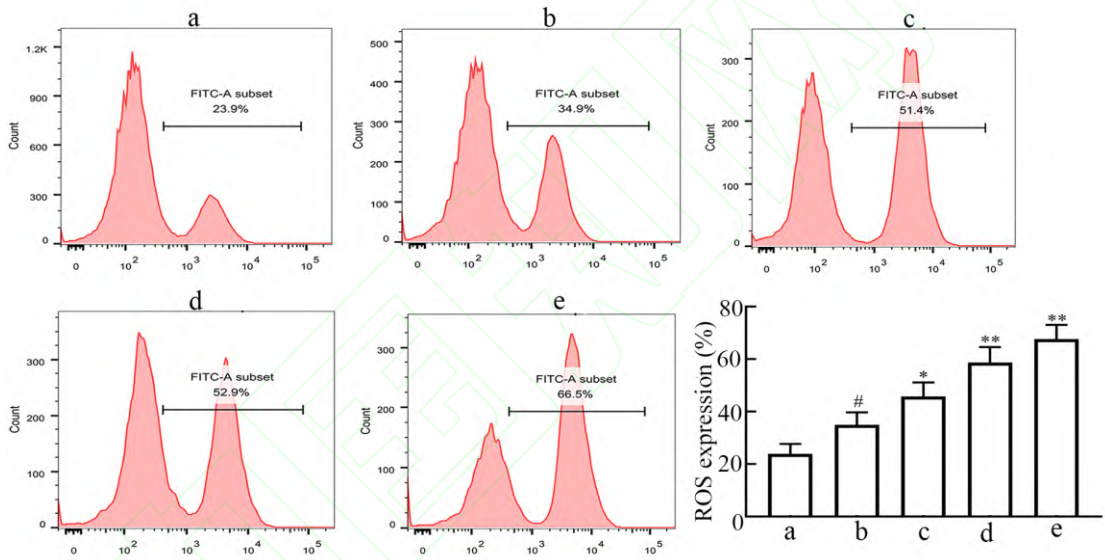


图 4 山奈酚诱导 HSC 表达 ROS

Fig.4 Kaempferol induced ROS expression in HSC

注: a: blank control group; b: TGF- β 1 group; c: kaempferol 8 μ mol/L group; d: kaempferol 16 μ mol/L group; e: kaempferol 32 μ mol/L group; # P <0.05 vs blank control group; * P <0.05, ** P <0.01 vs TGF- β 1 group.

2.5 山奈酚对 HSC 线粒体功能的影响

细胞流式检测显示各组间 mPTP 开放差异有统计学意义 ($F=61.581$, $P<0.001$), 与空白对照组比较, TGF- β 1 组 mPTP 开放增多 (LSD- $t=2.408$, $P<0.05$); 与 TGF- β 1 组比较, 山奈酚 8、16、32 μ mol/L 组 mPTP 开放进一步增加 (LSD- $t=3.431$ 、7.799、11.166, 均 $P<0.01$), 见图 5A; JC-1 试剂盒检测显示各组线粒体膜电位差异有统计学意义 ($F=49.383$, $P<0.001$), 与空白对照组比较, TGF- β 1 组线粒体膜电位增加 (LSD- $t=4.754$, $P<0.01$); 与 TGF- β 1 组

比较，山奈酚 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 组线粒体膜电位显著下降（LSD- $t=7.550$ 、10.591、12.619，均 $P<0.01$ ），见图 5B。

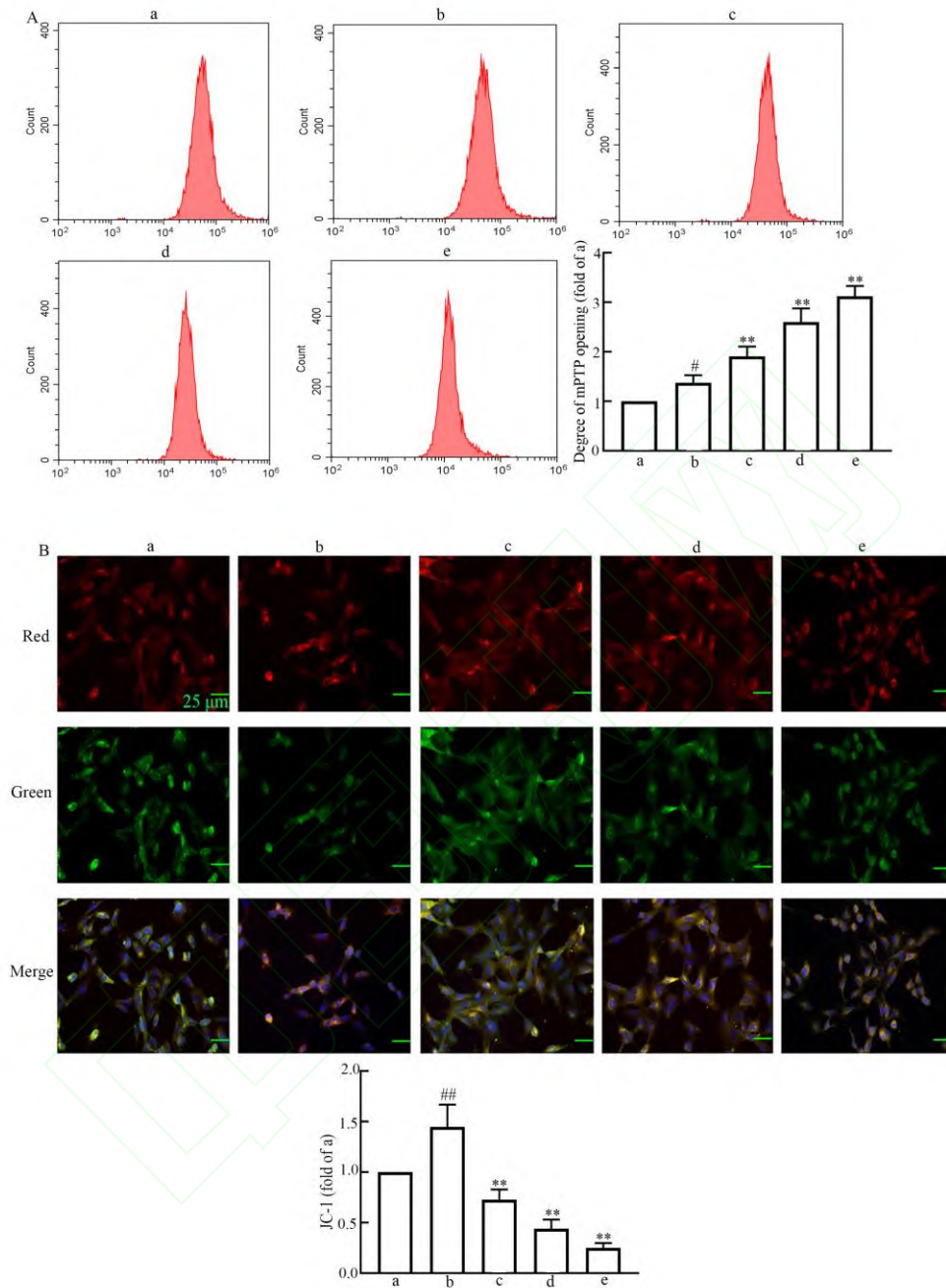


图 5 山奈酚对 HSC 线粒体功能的影响 $\times 400$

Fig. 5 The effects of kaempferol on mitochondrial function of HSC $\times 400$

注：A: Kaempferol induced mPTP opening; B: Kaempferol decreased mitochondrial membrane potential; a: blank control group; b: TGF- $\beta 1$ group; c: kaempferol 8 $\mu\text{mol/L}$ group; d: kaempferol 16 $\mu\text{mol/L}$ group; e: kaempferol 32 $\mu\text{mol/L}$ group; # $P<0.05$ vs blank control group; ** $P<0.01$ vs TGF- $\beta 1$ group.

2.6 山奈酚对线粒体凋亡途径相关蛋白表达的影响

免疫印迹检测显示 Cleaved-Caspase3、Cleaved-Caspase9、Bcl-2、SIRT3、Bax 蛋白表达各组间表达有统计学意义 ($F=70.746、66.433、64.257、73.503、59.658$, 均 $P<0.001$), 与空白对照组比较, TGF- β 1 组 Cleaved-Caspase3、Cleaved-Caspase9、Bcl-2 及 SIRT3 表达具有显著差异性 ($LSD-t=3.627、2.954、14.342、4.825$, $P<0.05$), 而 Bax 表达差异无统计学意义 ($LSD-t=0.398$); 与 TGF- β 1 组比较, 山奈酚 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 组 Cleaved-Caspase3、Cleaved-Caspase9、Bcl-2、SIRT3、Bax 表达差异有统计学意义 ($LSD-t=3.869、7.859、11.244$; $LSD-t=3.663、7.562、11.462$; $LSD-t=5.498、9.322、12.071$; $LSD-t=4.434、7.564、10.433$; $LSD-t=4.379、8.625、12.739$, 均 $P<0.01$)。见图 6。

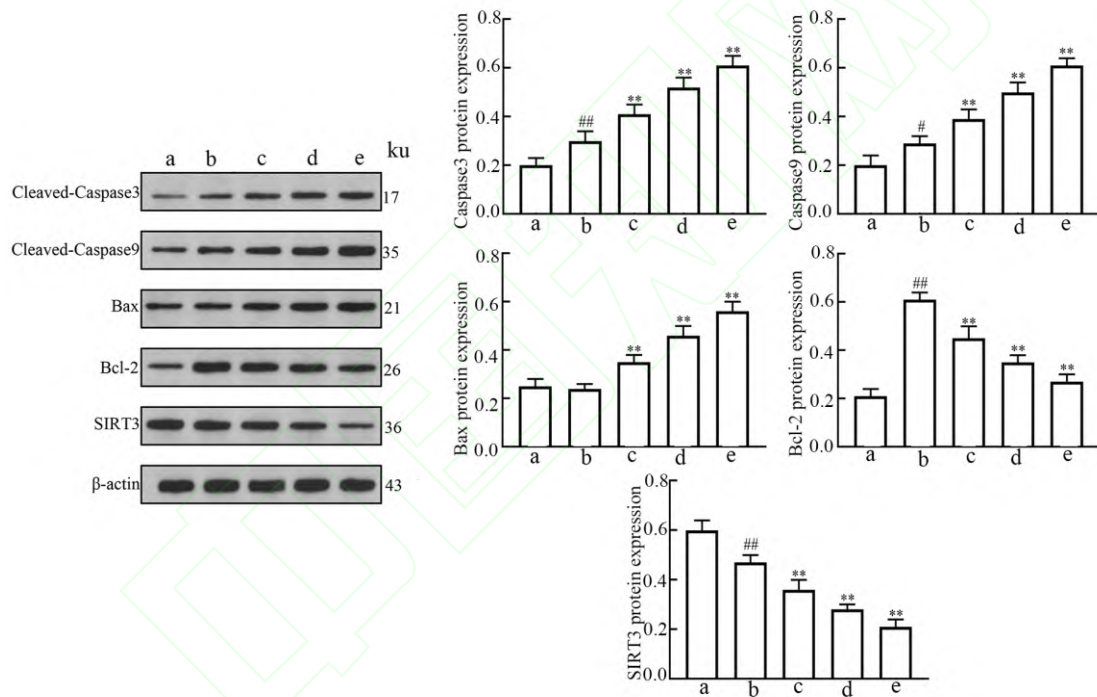


图 6 山奈酚对 HSC 线粒体凋亡途径相关蛋白表达的作用

Fig. 6 The effects of kaempferol on expression of proteins associated with mitochondrial apoptosis pathway in HSC

注: a: blank control group; b: TGF- β 1 group; c: kaempferol 8 $\mu\text{mol/L}$ group; d: kaempferol 16 $\mu\text{mol/L}$ group; e: kaempferol 32 $\mu\text{mol/L}$ group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs blank control group; ** $P<0.01$ vs TGF- β 1 group.

2.7 山奈酚对 HSC 线粒体结构的影响

透射电镜检测下，各组间线粒体数量长度差异有统计学意义（ $F=48.547$ 、 67.565 ，均 $P<0.001$ ），与空白对照组比较，TGF- β 1 组线粒体数量显著增加，线粒体长度减少，差异有统计学意义（LSD- $t=4.232$ 、 5.785 ，均 $P<0.05$ ）；与 TGF- β 1 组比较，山奈酚 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 组粒体数量进一步增加，线粒体长度进一步减少，差异有统计学意义（LSD- $t=2.573$ 、 6.066 、 9.742 ；LSD- $t=4.132$ 、 6.382 、 9.045 ，均 $P<0.05$ ）。见图 7。

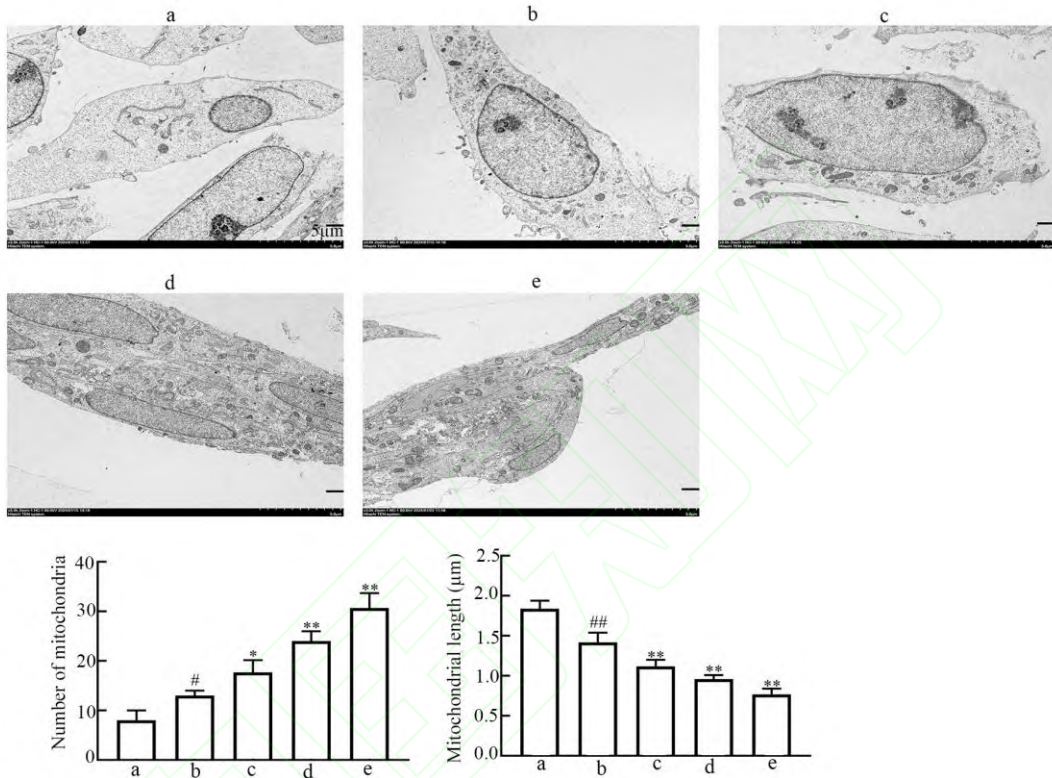


图 7 山奈酚诱导 HSC 线粒体分裂 $\times 3\ 000$

Fig. 7 Kaempferol induced mitochondrial division in HSC $\times 3\ 000$

注：a: blank control group; b: TGF- β 1 group; c: kaempferol 8 $\mu\text{mol/L}$ group; d: kaempferol 16 $\mu\text{mol/L}$ group; e: kaempferol 32 $\mu\text{mol/L}$ group; [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ vs blank control group; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ vs TGF- β 1 group.

2.8 分子对接与分子动力学模拟

借助 Discovery Studio 软件对山奈酚与 SIRT3 进行分子对接，结果表明范德华力和氢键是山奈酚与 SIRT3 结合的关键，与氨基酸残基 LEU322、GLU323、SER321、ASP231 形成氢键，与 GLY319、THR320、GLY145 等形成范德华力，对接打分为 108.89 表明其具有较好的对接活性，见图 8A；将上述对接产物进行时长 100 ns、步长 0.002 ns 的分子动力学模拟。结果表明 RMSD 曲线在 100ns 的运行时间表现出良好的稳定性，在 30 ns 后开始趋于稳

定；RMSF 分析表明山奈酚与 SIRT3 相互作用的残基较为稳定，波动小，见图 8B。

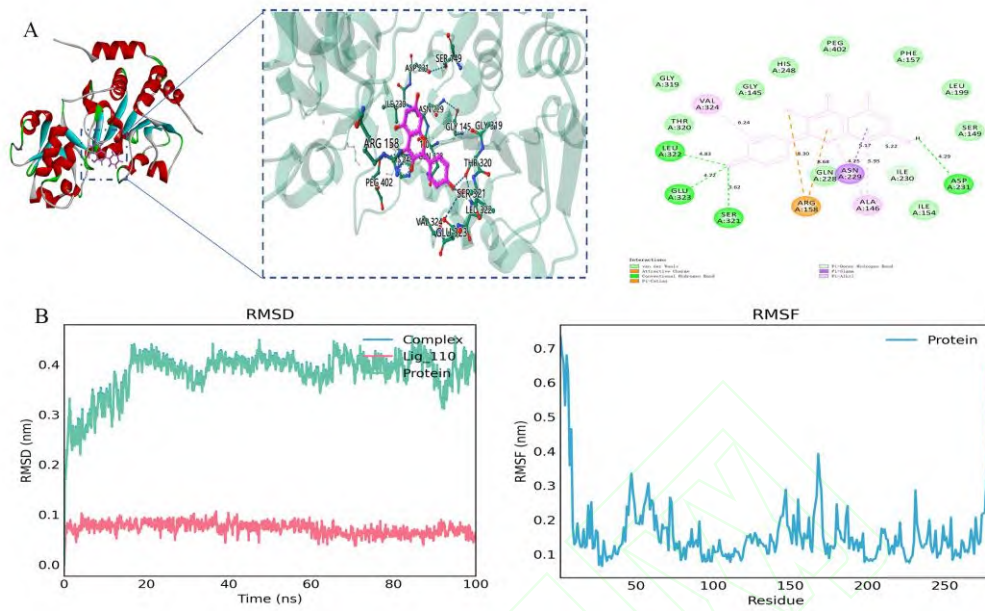


图 8.山奈酚与 SIRT3 靶向作用分析

Fig.8 Targeting Analysis of Kaempferol and SIRT3

注：A: Molecular docking analysis of kaempferol and SIRT3; B: Molecular dynamics simulation of kaempferol and SIRT3.

3 讨论

HF 是指肝脏受到各种慢性肝损伤因素的刺激，导致 HSC 激活引发细胞外基质生成与降解失衡，从而引起肝脏结构和功能破坏的病理事件。有研究^[9]表明 HF 是可以逆转的病理过程，因此及时逆转 HF 对于慢性肝病患者具有重要的临床意义。中医古籍中无明确的 HF 概念，根据症状和临床表现，HF 属于中医的“胁痛”“痞块”“积聚”“膨胀”等范畴。中药以其作用途径、层次、靶点上多样性的特点，在对病理复杂的疾病治疗上具有显著优势，目前临床尚无特效的西药用于治疗 HF，而中药复方、单味中药及其活性成分在面对 HF 这一复杂的病理过程时，具有更加明显的优势，可以很好地阻止 HF 的进展^[10]。

细胞凋亡是高等生物细胞程序性死亡的一种形式，执行关键凋亡事件主要集中在在线粒体。目前认为在凋亡信号的诱导下，线粒体外膜的破坏或者 mPTP 的异常开放，可使线粒体内内容物，如细胞色素 C、凋亡诱导因子等释放入胞质，从而引起半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 Caspase 的活化，进而引起细胞凋亡，这是线粒体凋亡途径的关键步骤^[11]。细胞色素 C 可以与蛋白酶活化因子结合形成多聚体结构，激活另一凋亡的启动分子 Caspase-9，Caspase-9 收到信号后便以自剪和接合的方式自我激活，Caspase-9 不具备降解细胞功能蛋白的能力，通

过 Caspase 级联反应激活下游无法自我激活的 Caspase-3，最终作为信号通路终端的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（poly ADP-ribose polymerase, PARP）也被剪切，这些分子是线粒体凋亡过程的关键执行者^[12]。促凋亡蛋白 Bax 作为 Bcl-2 家族蛋白的关键成员之一，直接调控 mPTP 的开放，Bax 高表达引起 mPTP 开放，而抗凋亡蛋白 Bcl-2 抑制其开放。ROS 是激活线粒体途径细胞凋亡的强效诱导剂，当线粒体受到高水平 ROS 的刺激时，mPTP 会异常开放，进而导致线粒体功能障碍，激活一系列细胞凋亡信号。Sirtuin 3（SIRT3）是线粒体中的一种重要的去乙酰化酶，可调控线粒体中许多代谢酶的表达。SIRT3 通过去乙酰化超氧化物歧化酶（superoxide dismutase 2, SOD2）增加其活性，将线粒体内产生的超氧阴离子转化为较为稳定的过氧化氢，减少 ROS 的生成^[13]。有研究^[14]发现诱导肝星状细胞凋亡是防治 HF 的关键策略。进一步表明靶向 SIRT3 调控 ROS 表达介导线粒体凋亡途径可以为抗 HF 提供新的思路。

本研究发现山奈酚可以抑制 HSC 增殖同时诱导肝星状细胞凋亡，Transwell 实验显示，山奈酚抑制 HSC 的迁移能力，DCFH-DA 探针检测表明山奈酚诱导 HSC ROS 表达，线粒体膜通透性转换孔试剂盒检测下，山奈酚可以促进 HSC mPTP 开放，Jc-1 试剂盒检测发现山奈酚可以减小线粒体膜电位，免疫印迹检测显示，山奈酚可以增加 Bax、Cleaved-Caspase3、Cleaved-Caspase9 的表达，同时减少 Bcl-2 和 SIRT3 的表达，透射电镜下，山奈酚可以促使 HSC 线粒体分裂，分子对接和动力学模拟表明山奈酚与 SIRT3 具有较好的对接活性和结合稳定性。然而本研究也存在一些局限点，没有开展体内实验以评估山奈酚的药效；没有针对 SIRT3 进行挽救实验；以及没有阐明线粒体分裂与凋亡通路的交互关系，后期课题组将开展体内实验，以评估山奈酚的疗效和安全性；同时通过化学试剂或基因干扰来明确山奈酚的作用靶点；进一步检测线粒体分裂蛋白的表达和使用线粒体分裂抑制剂明晰线粒体分裂与凋亡的关系。

参考文献

- [1] Bi Y, Liu S, Qin X, et al. FUNDC1 interacts with GPx4 to govern hepatic ferroptosis and fibrotic injury through a mitophagy-dependent manner[J]. J Adv Res, 2024, 55: 45-60. doi:10.1016/j.jare.2023.02.012.
- [2] Jangra A, Kothari A, Sarma P, et al. Recent advancements in antifibrotic therapies for regression of liver fibrosis[J]. Cells, 2022, 11(9): 1500. doi:10.3390/cells11091500.
- [3] Rucic Rubin V, Bojanic K, Smolic M, et al. An update on efficacy and safety of emerging hepatic antifibrotic agents[J]. J Clin Transl Hepatol, 2021, 9(1): 60-70.

doi:10.14218/JCTH.2020.00040.

[4] Higashi T, Friedman S L, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 27-42. doi:10.1016/j.addr.2017.05.007.

[5] Popgeorgiev N, Sa J D, Jabbour L, et al. Ancient and conserved functional interplay between Bcl-2 family proteins in the mitochondrial pathway of apoptosis[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(40): eabc4149. doi:10.1126/sciadv.abc4149.

[6] Ma Y, Li Y, Zhang H, et al. Malvidin induces hepatic stellate cell apoptosis *via* the endoplasmic reticulum stress pathway and mitochondrial pathway[J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(9): 5095-106. doi:10.1002/fsn3.1810.

[7] Xu T, Huang S, Huang Q, et al. Kaempferol attenuates liver fibrosis by inhibiting activin receptor-like kinase 5[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9): 6403-10. doi:10.1111/jcmm.14528.

[8] Cao R, Cao C, Hu X, et al. Kaempferol attenuates carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic fibrosis by promoting ASIC1a degradation and suppression of the ASIC1a-mediated ERS[J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155125. doi:10.1016/j.phymed.2023.155125.

[9] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-66. doi:10.1038/s41575-020-00372-7.

[10] Li H. Advances in anti hepatic fibrotic therapy with Traditional Chinese Medicine herbal formula[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251: 112442. doi:10.1016/j.jep.2019.112442.

[11] Green D R. The mitochondrial pathway of apoptosis part II: the BCL-2 protein family[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2022, 14(6): a041046. doi:10.1101/cshperspect.a041046.

[12] 司徒莹, 程婉秋, 沈志滨, 等. 滇乌碱通过线粒体凋亡途径致大鼠心肌损伤的研究[J]. *中国药房*, 2022, 33(23): 2864-8. doi: 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.23.09.

[12] Situ Y, Cheng W Q, Shen Z B, et al. Study on myocardial injury of rats induced by yunaconitine through mitochondrial apoptosis pathway[J]. *China Pharm*, 2022, 33(23): 2864-8. doi: 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.23.09.

[13] Wang X, Shen T, Lian J, et al. Resveratrol reduces ROS-induced ferroptosis by activating SIRT3 and compensating the GSH/GPX4 pathway[J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 137. doi:10.1186/s10020-023-00730-6.

[14] Zheng H, Wang X, Zhang Y, et al. Pien-Tze-Huang ameliorates hepatic fibrosis *via*

suppressing NF- κ B pathway and promoting HSC apoptosis[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 244: 111856. doi:10.1016/j.jep.2019.111856.

