

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

董 勇, 赵永忠, 肖绪华, 刘燕秀, 李 彩, 成秋宸

摘要 目的 研究荔枝核总黄酮(TFL)在体外对活化的大鼠肝星状细胞(HSC-T6)的增殖抑制作用及 Toll 样受体 4 (TLR4)表达的影响。方法 使用转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (5 ng/ml) 激活 HSC-T6, 显微镜下观察 HSC-T6 和激活的 HSC-T6 形态变化; CCK8 试剂盒 (CCK8) 法观察 TFL 作用 24、48、72 h 后活化的 HSC-T6 的增殖情况; 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 HSC-T6 中 TLR4 的表达; 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡。结果 显微镜下观察 HSC-T6 和激活的 HSC-T6 形态有明显变化; CCK8 结果显示 TFL 可以抑制 HSC-T6 的增殖 ($P < 0.05$), 并且随着 TFL 浓度和作用时间增加, HSC-T6 增殖明显下降, 呈浓度依赖性; RT-PCR 结果显示随着 TFL 浓度增加, HSC-T6 中 TLR4 表达下降, 与实验对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 流式细胞仪检测结果表明 TFL 阻滞细胞于 S 期, G0/G1 期细胞减少 ($P < 0.05$), S 期细胞增加 ($P < 0.05$), 促进细胞的凋亡 ($P < 0.05$), 呈浓度依赖性。结论 TFL 可以抑制 HSC-T6 的增殖, 其作用机制可能是通过降低 TLR4 在 HSC-T6 中的表达, 阻滞其细胞增殖和诱导细胞凋亡, 达到抗肝纤维化效果。

关键词 荔枝核总黄酮; 肝星状细胞; TLR4; 细胞凋亡; 流式细胞术

中图分类号 R 575

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0432-05

肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 是细胞外基质的主要来源, 在肝纤维化形成中起关键性作用, HSCs 通过分泌多种细胞因子影响并加速肝纤维化的进程^[1]。近年来国内外围绕以促进 HSCs 凋亡和胶原降解为靶标的抗肝纤维化研究成为热点, 为肝纤维化的防治寻找突破口。研究^[2]表明 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors4, TLR4)/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路为肝损伤时重要的肝细胞凋亡途径之一。该实验探讨荔枝核总黄酮 (total flavone of litchi chinensis sonn, TFL) 在

体外对活化的大鼠肝星状细胞 (HSC-T6) 的增殖抑制作用及其机制, 进一步探讨肝纤维化的发生机制, 同时为 TFL 应用于临床治疗肝纤维化提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器 HSC-T6 (中国科学院昆明动物研究细胞库); TFL 浓度为 60% (南京泽郎生物有限公司); 高糖型的 DMEM 液体培养基; 含有 EDTA 的胰蛋白酶和无 EDTA 的胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Hyclone 公司); 转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) (美国 Peprotech 公司); CCK8 (cell counting Kit-8) 购自中国碧云天生物技术研究; 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 反应体系: 总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒及扩增试剂盒 (中国天根生物有限公司); Markers (北京康为生物科技有限公司); 流式凋亡试剂盒 (北京四正柏生物科技有限公司); 流式周期试剂盒 (碘化吡啶、RNA 酶); 梯度 PCR 仪 (德国 Sigma 公司); 倒置相差显微镜 (德国蔡司) 酶标仪; MLDEL680 (美国伯乐公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司产品); TLR4 及 β -actin 引物由美国 Invitrogen 公司设计合成。

1.2 实验分组 2 μ g TGF- $\beta 1$ 溶解于 10 μ l pH = 3.0 浓度为 10 mmol/L 的柠檬酸, 配成 0.2 mg/ml 的 TGF- $\beta 1$ 母液; 称取 60 mg TFL 溶解于 1 ml (100 μ l DMSO + 900 μ l 10% FBS 的培养基) 溶液中, 配成 1 ml 的 80 mg/ml 的 TFL 母液, 然后稀释成实验需要的不同浓度的药物样品的培养基, 将细胞分为 7 组: ① 空白对照组: 10% FBS 的 DMEM 培养基; ② 实验对照组: 10% FBS 的 DMEM 培养基 + 5 ng/ml TGF- $\beta 1$; ③ TFL80 组: 10% FBS 的 DMEM 培养基 + 5 ng/ml TGF- $\beta 1$ + 80 μ g/ml TFL; ④ TFL160 组: 10% FBS 的 DMEM 培养基 + 5 ng/ml TGF- $\beta 1$ + 160 μ g/ml TFL; ⑤ TFL320 组: 10% FBS 的 DMEM 培养基 + 5 ng/ml TGF- $\beta 1$ + 320 μ g/ml TFL; ⑥ TFL640 组: 10% FBS 的 DMEM 培养基 + 5 ng/ml TGF- $\beta 1$ + 640 μ g/

2015-01-12 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: 桂林医学院附属医院消化内科 桂林 541001

作者简介: 董 勇, 男, 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

ml TFL;⑦ TFL800 组:10% FBS 的 DMEM 培养基 + 5 ng/ml TGF-β1 + 800 μg/ml TFL。

1.3 细胞培养 HSC-T6 在 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养,常规贴壁细胞培养,用体积分数为 10% 的 FBS、质量浓度均为 100 μg/ml 的青霉素、链霉素的高糖培养基 2 d 传代 1 次。

1.4 CCK-8 法检测 TFL 对活化的 HSC-T6 增殖抑制率 将处于对数生长期的 HSC-T6 消化传代,计数并调整细胞数为 2.5 × 10⁴/ml 密度接种于 3 块 96 孔板,每孔 100 μl。细胞贴壁后换无血清培养基培养 24 h 后换成含有不同浓度 TFL 的培养基继续培养,每个浓度 5 个复孔,分别培养 24、48、72 h 后每孔加 10 μl 的 CCK-8 溶液。恒温箱培养 45 min,酶标仪于 450 nm 处检测吸光度(absorbance, A),计算细胞相对增殖抑制率,分析不同时间不同浓度的 TFL 对细胞增殖的影响程度。

1.5 RT-PCR 检测 HSC-T6 中 TLR4 的表达 按照前述方法不同浓度样品干预培养细胞分组,培养细胞 48 h。TLR4(上游引物:5'-TGCCTGAGACCAG-GAAGCTT-3',下游引物:5'-CTTAAGATCTTCAGG-GGTTG-3') 扩增片段长度为 152 bp;β-actin(上游引物:5'-AGGTGACAGCAGTCCGGTTG-3',下游引物:5'-CGAAGGCTCATCATTCAAAA-3'),扩增片段长度为 300 bp。TLR4 及 β-actin 引物的退火温度均为 55 °C,34 个循环。总 RNA 的提取、逆转录、PCR 均按说明书操作。取 5 μl 的 PCR 产物,1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳钝化分离,凝胶成像分析仪下观察拍照,并应用 SensiAnsys 凝胶图像分析系统进行分析。

1.6 AnneXin V-7AAD/PE 双染色法检测细胞凋亡 按照前述方法不同浓度样品干预培养细胞分组,培养细胞 48 h,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,1 500 r/min 离心 10 min,收集细胞,弃上清液;PBS 冲洗 1 次,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 200 μl 的缓冲液重选细胞;避光加入 10 μl 的 AnneXin V-7AAD,室温避光孵育 15 min,上机前加 5 μl 的 PE,补加 300 μl 的 PBS 缓冲液,混匀,流式细胞仪检测,MAfit LT3.3 分析软件分析细胞凋亡率。

1.7 流式细胞仪检测细胞周期 细胞药物处理方法如上,用 0.02% 的胰酶消化细胞,制备细胞悬液,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,PBS 冲洗 2 次,弃上清液,加 1 ml PBS 悬浮细胞,在振荡器上缓慢加入 3 ml 的冰无水乙醇 4 °C 冰箱过夜保存固定细胞。次日 2 000 r/min 离心 10 min,PBS 冲洗 1 次,

每个样本加入 500 μl 体积分数为 50 μg/ml 的 PI,100 μg/ml RNase,重悬细胞,37 °C 避光孵育 30 min,上机检测分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本间比较用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD *t* 检验,检验水准以 α = 0.05。

2 结果

2.1 HSC-T6 与其形态学变化 正常 HSC-T6 与被 TGF-β1 诱导后活化的 HSC-T6 常规培养,显微镜下观察,形态有明显差异。HSC-T6 分散生长,而被 TGF-β1 激活的 HSC-T6 岛状聚簇生长。见图 1。

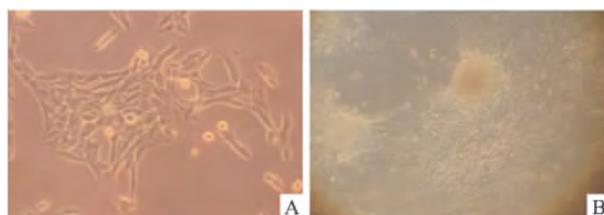


图 1 显微镜下形态 ×100
A:正常 HSC-T6 ;B:被 TGF-β1 诱导后活化的 HSC-T6

2.2 TFL 抑制 HSC-T6 的增殖 随着 TFL 浓度和作用时间增加,HSC-T6 增殖明显下降且具有量效关系。TFL 组 A 值与实验对照组比较差异有统计学意义(P < 0.05),见表 1。

表 1 各组 HSC-T6 的 A 值($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	F2 值
空白对照	0.884 ± 0.062	0.863 ± 0.014	0.849 ± 0.082	0.345
实验对照	0.973 ± 0.078	0.985 ± 0.013	1.074 ± 0.166*	1.099
TFL80	0.829 ± 0.054	0.847 ± 0.037#	0.770 ± 0.086#	1.712
TFL160	0.812 ± 0.030#	0.828 ± 0.026#	0.726 ± 0.090#	3.665
TFL320	0.777 ± 0.063#	0.723 ± 0.083#	0.716 ± 0.031#	1.284
TFL640	0.716 ± 0.063* #	0.649 ± 0.088* #Δ&	0.611 ± 0.041* #	2.967
TFL800	0.711 ± 0.078* #	0.643 ± 0.080* #Δ&	0.609 ± 0.070* #	2.057
F1 值 P 值	8.374, <0.05	18.861, <0.05	15.757, <0.05	

F1:同一时间点组间 A 值比较;F2:组内不同时间点 A 值比较;与空白对照组比较:
* P < 0.05;与实验对照组比较:# P < 0.05;与 TFL80 组比较:Δ P < 0.05;与 TFL160 组比较:& P < 0.05

2.3 TFL 抑制 HSC-T6 中 TLR4 的表达 RT-PCR 检测结果显示与实验对照组相比,空白对照组中 TLR4 的表达有明显差别,TLR4/β-actin 比值差异有统计学意义(P = 0.000);TFL 组随着培养液中 TFL 浓度增加,HSC-T6 中 TLR4 的表达有明显趋势,

TLR4/ β -actin 比值差异有统计学意义 ($F = 146.081, P = 0.000$)。见图 2、3。

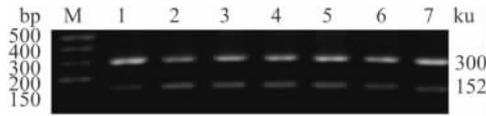


图 2 不同浓度 TFL 培养的 HSC-T6 中 TLR4 的表达

M: Marker; 1: 空白对照; 2: 实验对照; 3: TFL80; 4: TFL160; 5: TFL320; 6: TFL640; 7: TFL800

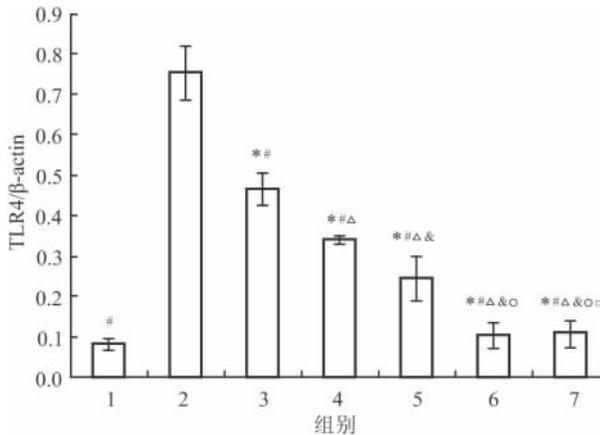


图 3 不同浓度 TFL 培养的 HSC-T6 中 TLR4/ β -actin 值

1: 空白对照组; 2: 实验对照组; 3: TFL80 组; 4: TFL160 组; 5: TFL320 组; 6: TFL640 组; 7: TFL800 组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与实验对照组比较: # $P < 0.05$; 与 TFL80 组比较: $\Delta P < 0.05$; 与 TFL160 组比较: $\& P < 0.05$; 与 TFL320 组比较: $\circ P < 0.05$; 与 TFL640 组比较: $\square P < 0.05$

2.4 TFL 对 HSC-T6 凋亡和周期的影响 流式细

胞仪检测结果显示 TFL 阻滞细胞于 S 期, G_0/G_1 期细胞减少 ($P < 0.05$), S 期细胞增加 ($P < 0.05$), 促进细胞的凋亡 ($P < 0.05$), 具有浓度依赖性。见表 2、3 图 4、5。

表 2 各组细胞的凋亡率 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率	细胞总凋亡率
空白对照	4.13 \pm 0.31	4.17 \pm 0.40	8.30 \pm 0.70
实验对照	1.47 \pm 0.35	3.80 \pm 0.40	5.27 \pm 0.75
TFL80	9.30 \pm 0.35* #	5.50 \pm 0.50	14.80 \pm 0.61* #
TFL160	14.80 \pm 0.26* # Δ	12.97 \pm 0.15* # Δ	27.77 \pm 0.31* # Δ
TFL320	19.73 \pm 1.17* # Δ &	11.17 \pm 0.76* # Δ	30.90 \pm 1.01* # Δ
TFL640	32.10 \pm 2.46* # Δ & \circ	19.83 \pm 1.46* # Δ & \circ	51.93 \pm 3.26* # Δ & \circ
TFL800	36.23 \pm 1.62* # Δ & \circ \square	23.17 \pm 1.04* # Δ & \circ \square	59.40 \pm 2.65* # Δ & \circ \square
F 值 P 值	360.318, <0.05	284.748, <0.05	457.936, <0.05

F: 同一时间点组间细胞总凋亡率比较; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与实验对照组比较: # $P < 0.05$; 与 TFL80 组比较: $\Delta P < 0.05$; 与 TFL160 组比较: $\& P < 0.05$; 与 TFL320 组比较: $\circ P < 0.05$; 与 TFL640 组比较: $\square P < 0.05$

表 3 各组细胞的周期百分比 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	G_1 期	S 期	G_2 期
空白对照组	74.54 \pm 3.55	18.03 \pm 3.93	7.43 \pm 0.56
实验对照组	75.82 \pm 3.62	15.06 \pm 3.89	9.12 \pm 0.69
TFL80 组	63.90 \pm 1.39* #	27.53 \pm 2.01* #	8.57 \pm 1.47
TFL160 组	57.37 \pm 1.57* # Δ	32.68 \pm 2.34* #	9.95 \pm 1.54
TFL320 组	54.84 \pm 0.95* # Δ	36.06 \pm 0.80* # Δ	9.10 \pm 1.61
TFL640 组	46.15 \pm 0.41* # Δ & \circ	47.18 \pm 2.73* # Δ & \circ	6.68 \pm 3.11
TFL800 组	44.83 \pm 1.59* # Δ & \circ	49.92 \pm 1.72* # Δ & \circ	5.25 \pm 1.32 $\&$
F 值 P 值	128.920, <0.05	3.919, <0.05	97.532, <0.05

F: 同一时间点组间细胞作用时期比较; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与实验对照组比较: # $P < 0.05$; 与 TFL80 组比较: $\Delta P < 0.05$; 与 TFL160 组比较: $\& P < 0.05$; 与 TFL320 组比较: $\circ P < 0.05$

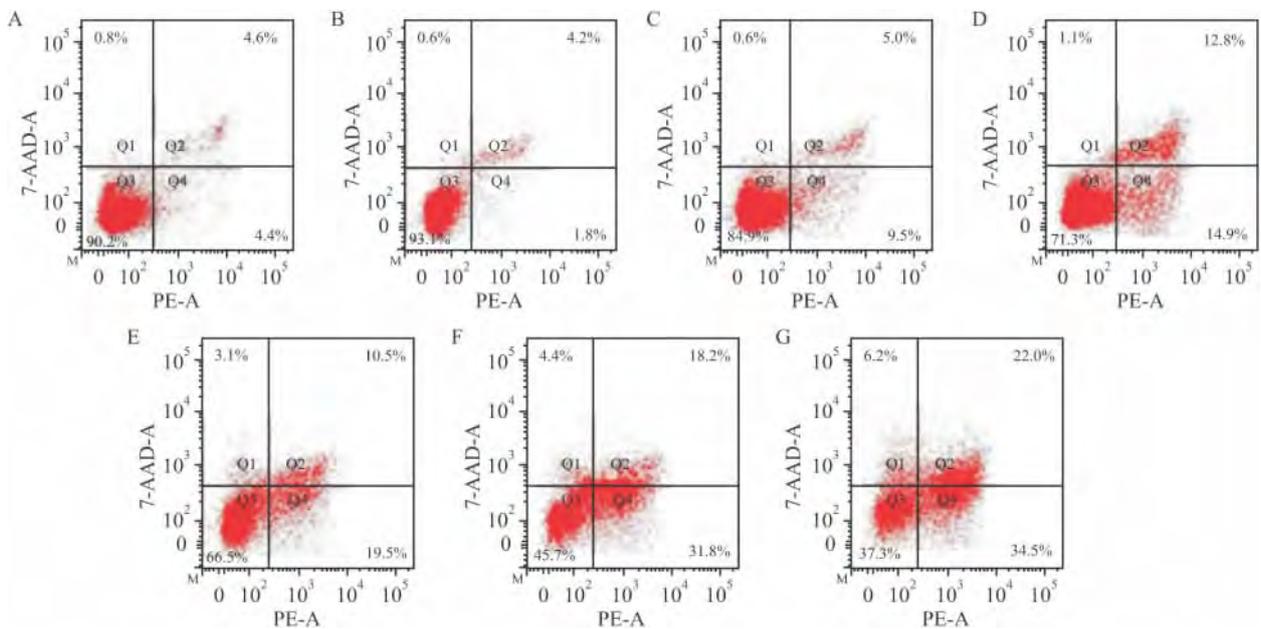


图 4 各组细胞凋亡情况

A: 空白对照组; B: 实验对照组; C: TFL80 组; D: TFL160 组; E: TFL320 组; F: TFL640 组; G: TFL800 组

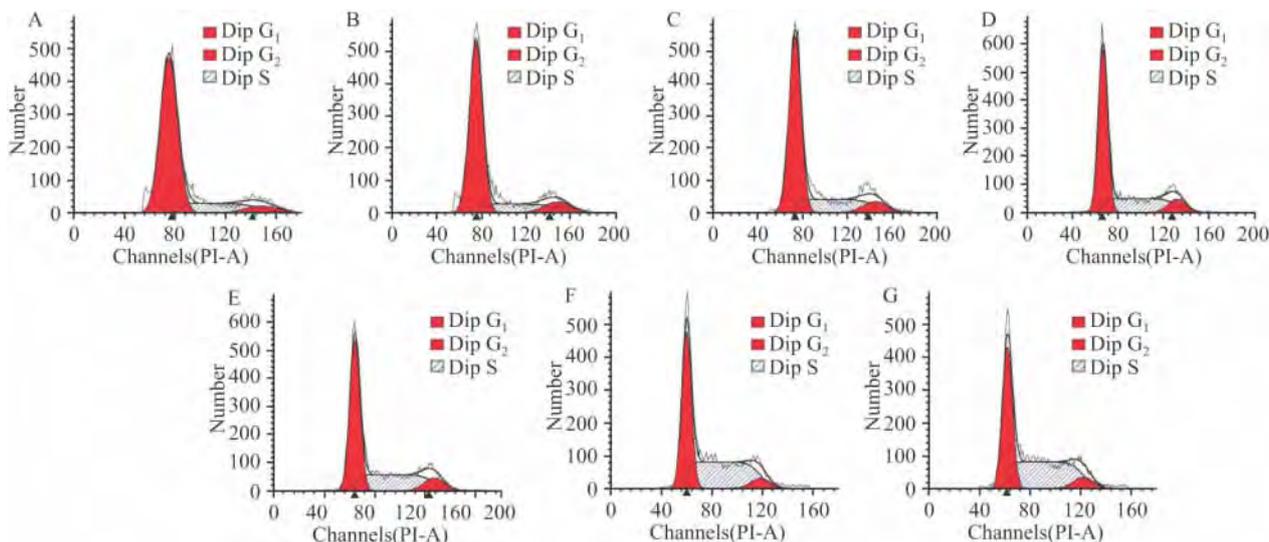


图5 各组细胞周期阻滞情况

A:空白对照组;B:实验对照组;C:TFL80组;D:TFL160组;E:TFL320组;F:TFL640组;G:TFL800组

3 讨论

肝纤维化的形成是一个极为复杂的生理病理过程,牵涉到致病机体反应、细胞因子、反应靶细胞、细胞产物过量表达、抑制因素、降解酶等多种因素的作用。目前的研究^[3-4]证实 HSCs 的激活,转化为肌成纤维细胞并分泌细胞外基质是肝纤维化发生、发展的核心环节。而研究^[5]表明 HSCs 的激活与内毒素有关,脂多糖可能直接激活 HSCs,与其表面的 TLR4 结合并进而激活 NF- κ B 和 JNK 信号通路,诱导炎症细胞因子和黏附分子的表达,从而促使了纤维化的形成^[6]。Paik et al^[7]发现活化的 HSCs 表达 TLR4 和其辅助受体髓样分化蛋白 2 和 CD14。研究^[8-9]显示,TLR4 可上调各类趋化因子(单核趋化蛋白 1、巨噬细胞炎症蛋白 1 α 、库普弗细胞、巨噬细胞炎症蛋白 1 β 、调节正常 T 细胞表达和分泌因子、巨噬细胞炎症蛋白 2、干扰素诱导蛋白 10)和 TLR2 的表达,而通过接头蛋白髓样细胞分化因子途径和 NF- κ B 途径下调静止的 HSCs 的 TGF- β 仿真受体 Bambi (BMP and the activin membrane-bound inhibitor) 来增加 TGF- β 介导的 HSC 活化及其胶原的产生,促进肝纤维化。研究^[10-11]证明 TLR4 和 NF- κ B 可以在胆管阻塞型大鼠肝组织内高表达,大剂量 TFL 可以通过抑制大鼠组织 TLR4 和 NF- κ B 的表达,改善胆管阻塞型肝大鼠纤维化程度。HSC-T6 是否高表达 TLR4 以及 TLR4 对 HSC-T6 的生物学活性有什么影响尚需进一步研究。

研究^[7]证明来活化的 HSCs 中 TLR4 表达水平

很低,不表达髓样分化蛋白 2 和 CD14;活化的 HSCs 中 TLR4、髓样分化蛋白 2 和 CD14 表达明显增加。本实验将活化的 HSC-T6 作为靶点,采用不同时间不同浓度的 TFL 作用于 HSC-T6。RT-PCR 结果显示 HSC-T6 在 mRNA 水平上可以表达 TLR4,随着药物浓度增加,TLR4 的表达降低,呈浓度依赖性。进一步观察 TLR4 与 HSC-T6 增殖和凋亡的关系,CCK8 及流式细胞术检测显示 TFL 阻滞细胞于 S 期即 DNA 合成期,促进细胞的凋亡,降低 TLR4 的表达可以促进 HSC-T6 的凋亡^[12-13]。实验证明 TFL 通过降低 TLR4 在 HSC-T6 中的表达,阻滞细胞增殖和诱导细胞凋亡,达到抗肝纤维化效果。

从白桦树中提取的 BA 通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路,有显著的抗纤维化作用^[14]。MyD88 抑制剂 ST2825 治疗肝纤维化也有较好的疗效^[15]。随着对 TLR4 更深入的研究,其通路将成为抗纤维化治疗的新的突破点。TFL 作为此信号传导药物研究的一个热点,其抗肝纤维化具有显著疗效^[10-11,16-18]。但是其对人类 HSCs 的增殖是否有抑制作用及具有抗纤维化效果,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Pinzani M. Unraveling the spider web of hepatic stellate cell apoptosis [J]. *Gastroenterology* 2009, 136(7):2061-3.
- [2] Sahin H, Borkham-Kamphorst E, do ON T, et al. Proapoptotic effects of the chemokine CXCL10 are mediated by the noncognate receptor TLR4 in hepatocytes [J]. *Hepatology* 2013, 57(2):797-805.

- [3] Sato M ,Suzuki S ,Senoo H. Hepatic stellate cells:unique characteristics in cell biology and phenotype [J]. *Cell Struct Funct* 2003 , 28 (2):105 - 12.
- [4] Hegazy S K ,El-Bedewy M ,Yagi A. Antifibrotic effect of aloe vera in viral infection-induced hepatic periportal fibrosis [J]. *World J Gastroenterol* 2012 ,18(17):2026 - 34.
- [5] Spruss A ,Kanuri G ,Wagnerberger S ,et al. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice [J]. *Hepatology* 2009 50(4):1094 - 104.
- [6] Connolly M K ,Bedrosian A S ,Mallen-St Clair J ,et al. In liver fibrosis ,dendritic cells govern hepatic inflammation in mice *via* TNF-alpha [J]. *J Clin Invest* 2009 ,119(11):3213 - 25.
- [7] Paik Y H ,Schwabe R F ,Bataller R ,et al. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells [J]. *Hepatology* 2003 ,37(5):1043 - 55.
- [8] Seki E ,De Minicis S ,Osterreicher C H ,et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis [J]. *Nat Med* 2007 ,13(11):1324 - 32.
- [9] Teratani T ,Tomita K ,Suzuki T ,et al. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice *via* accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells [J]. *Gastroenterology* 2012 ,142(1):152 - 64.
- [10] 何志国 ,赵永忠 ,卢青等. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝组织 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响 [J]. *医药导报* ,2014 ,33(3):286 - 90.
- [11] 何志国 ,赵永忠 ,卢青等. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝组织 Toll 样受体 2,4 表达的影响 [J]. *广东医学杂志* 2013 ,34(19):2926 - 30.
- [12] 白婷 ,杨勇 ,吴艳玲等. 百里香酮通过抑制 TLR4 信号通路介导的炎症反应抗肝纤维化作用研究(英文) [J]. *中华中医药杂志* 2013 28(5):1541 - 7.
- [13] 朱晓静 ,张峰 ,孔德松等. 脂多糖/Toll 样受体 4 信号转导与肝纤维化的研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志* 2013 27(1):106 - 9.
- [14] Wan Y ,Wu Y L ,Lian L H ,et al. The anti-fibrotic effect of betulinic acid is mediated through the inhibition of NF- κ B nuclear protein translocation [J]. *Chem Biol Interact* 2012 ,195(3):215 - 23.
- [15] Loiarro M ,Capolunghi F ,Fantò N ,et al. Pivotal advance: inhibition of MyD88 dimerization and recruitment of IRAK1 and IRAK4 by a novel peptidomimetic compound [J]. *J Leukoc Biol* 2007 82(4):801 - 10.
- [16] 赵永忠 ,漆志平 ,徐庆等. 荔枝核总黄酮抗胆管结扎大鼠肝纤维化的作用及机制 [J]. *世界华人消化杂志* 2010 ,18(20):2084 - 9.
- [17] 孙旭锐 ,覃浩 ,罗伟生等. 荔枝核总黄酮对大鼠肝星状细胞增殖的抑制作用 [J]. *广东医学* 2012 33(15):2215 - 7.
- [18] 罗伟生 ,靳雅玲 ,欧士钰等. 荔枝核总黄酮对肝纤维化大鼠肝细胞 Bel-2/Bax 表达的影响 [J]. *世界华人消化杂志* 2012 20(18):1602 - 8.

The total flavone of litchi chinensis sonn inhibits the proliferation of activated hepatic stellate cells *via* the TLR4 pathway in rats

Dong Yong , Zhao Yongzhong , Xiao Xuhua , et al

(The Affiliated Hospital of Guilin Medical University , Guilin 541001)

Abstract Objective To investigate the anti-proliferative effect of total flavone of litchi chinensis sonn (TFL) on the activated hepatic stellate cells (HSC-T6) *in vitro* and the influence on Toll-like receptors 4 (TLR4). **Methods** HSC-T6 were activated with TGF- β (5 ng/ml) and then divided into the following groups: blank control , experimental control , five experimental groups. Different morphological changes of HSC-T6 and HSC-T6 were observed under the microscope. CCK8 was used to observe the proliferation of three kinds of the activated HSC-T6 which had been respectively affected by TFL for 24 , 48 and 72 h. The expressions of TLR4 were detected by RT-PCR (for mRNA). The cell cycle and cell apoptosis were detected by flow cytometry (FCM). **Results** There were obvious morphological changes of HSC-T6 and HSC-T6 under the microscope. The results of CCK8 showed that TFL could inhibit the proliferation of HSC-T6 ($P < 0.01$) , and HSC-T6 decreased significantly with the increase of the concentration and action time of TFL. It could be found in the results of RT-PCR that expressions of TLR4 of HSC-T6 declined with the increase of TFL concentration. There were visible differences compared with the experimental control ($P < 0.01$). The test of FCM showed that TFL retarded the cells during PeriA S , G0/G1 cells reduce ($P < 0.01$) and then promoted the apoptosis of cells ($P < 0.01$). So it depended on the concentration of TFL. **Conclusion** TFL can inhibit the proliferation of HSC-T6 , whose mechanism is to inhibit the proliferation of cells and induce the cell apoptosis by reducing the expressions of TLR4 in HSC-T6 , so as to have the effect of anti-liver fibrosis.

Key words total flavone of litchi chinensis sonn; hepatic stellate cells; Toll-like receptors 4; cell apoptosis; flow cytometry