

补骨脂酚对 TGF- β 诱导人肝星状细胞损伤的保护作用

陈巧云, 杨柳, 王业秋, 李孟, 张建辉, 李建民*
(黑龙江中医药大学 佳木斯学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] **目的:**探讨补骨脂酚对转化生长因子- β (TGF- β)诱导人肝星状细胞损伤的保护作用及其机制。**方法:**通过噻唑蓝(MTT)比色法检测各组人肝星状细胞活性,筛选出补骨脂酚安全有效浓度;本实验分为空白组、模型组、补骨脂酚组($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)及雌二醇组($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),同样检测各组细胞的活性,除空白组外,其余各组均加入 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β 诱导人肝星状细胞损伤;分别采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组细胞中超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),丙二醛(MDA)的水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞中基质金属蛋白酶-1(MMP-1),胶原蛋白-I(Col-I)mRNA表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中MMP-1,Col-I蛋白的表达水平。**结果:**与模型组比较, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 补骨脂酚显著提高TGF- β 诱导人肝星状细胞及细胞中SOD,GSH-Px活性,显著降低细胞中MDA含量及Col-I,MMP-1 mRNA和蛋白的表达($P < 0.01$)。**结论:**补骨脂酚对TGF- α 诱导人肝星状细胞损伤的保护作用,主要是通过提高细胞中抗氧化酶的活性、降低细胞中MMP-1,Col-I mRNA和蛋白的含量。

[关键词] 补骨脂酚; 转化生长因子- β (TGF- β); 人肝星状细胞; 抗氧化酶; 基质金属蛋白酶-1 (MMP-1); 胶原蛋白-I (Col-I)

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)16-0131-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181624

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180523.1708.024.html>

[网络出版时间] 2018-05-25 8:53

Protective Effect of Bacuchiol on Hepatic Stellate Cells Induced by TGF- β

CHEN Qiao-yun, YANG Liu, WANG Ye-qiu, LI Meng, ZHANG Jian-hui, LI Jian-min*
(College of Jiamusi, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of bacuchiol on hepatic stellate cells induced by transform growth factor- β (TGF- β) and its mechanism. **Method:** The activity of each group of cells was detected by methye thiazolye telrazlium (MTT), in order to screen out the safe and effective concentration of bacuchiol. This experiment was divided into blank group, model group ($10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β), bacuchiol group ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), estradiol group ($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and their activities were detected. Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) of each group were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); Real-time quantitative-PCR (Real-time PCR) was used to detect the changes in matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and collagen- I (Col- I) mRNA expressions in hepatic stellate cells induced by TGF- β ; Western blot method was used to detect the changes of MMP-1 and Col- I protein content in hepatic stellate cells induced by TGF- β . **Result:** The $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ bacuchiol can effectively improve the activity of SOD and GSH-Px in hepatic stellate cells, and also reduce MDA content in cells and the expressions of Col- I and MMP-1 mRNA and protein ($P < 0.01$). **Conclusion:** Bacuchiol has a protective effect on hepatic stellate cells induced by TGF- β mainly by improving the activity of antioxidant enzymes in cells and

[收稿日期] 20180131(010)

[基金项目] 国家教育部春晖计划项目(Z2010023)

[第一作者] 陈巧云, 硕士, 讲师, 从事中药药效物质基础的研究, E-mail: changy0114@163.com

[通信作者] *李建民, 硕士, 主任药师, 从事中药药效物质基础研究工作, Tel: 13836132760, E-mail: ljm_1030@126.com

reducing the content of MMP-1, Col- I mRNA and protein expressions in cells.

[Key words] bacuchioll; transform growth factor- β (TGF- β); Hepatic Stellate cells; antioxidant enzymes; matrix metalloproteinase-1 (MMP-1); collagen- I (Col- I)

随着经济水平的发展,生活水平的提高,肝病的发生逐年增加,严重影响人们的健康,肝病的治疗也引起人们的高度重视。许多慢性肝病的组织学变化最终会导致肝纤维化^[1],是一种在破坏因子转化生长因子- β (TGF- β) 不断作用下逐渐变成的病理状态,反复持续的伤口愈合导致肝损伤^[2],而肝星状细胞的激活是肝纤维化的中心环节^[3-4]。其中肝纤维化的直接原因是因为细胞外基质成分合成和降解的失衡^[5],因此肝病的肝纤维化预防和治疗就显得极为必要。传统中药具有多种成分,多方面的作用,并且有低毒副作用,越来越受人们的关注^[6]。补骨脂酚为豆科植物补骨脂干燥成熟果实中活性成分,具有保护肝细胞、抗炎、抗菌、抗氧化以及雌激素样等药理作用^[7]。相关研究表明,补骨脂酚既可通过天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 依赖的通路诱导肝星状细胞/成肌纤维细胞的细胞凋亡,从而逆转肝纤维化和肝硬化的形成^[8]。前期的课题组研究发现,绿原酸通过调控 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) 的表达,诱导活化的肝星状细胞凋亡,清除活化的肝星形细胞,抗肝纤维化^[9]。

因此,本实验通过 TGF- β 诱导人肝星状细胞损伤模型,主要观察补骨脂酚预处理对 TGF- β 诱导人肝星状细胞损伤氧化应激水平以及基质金属蛋白酶、胶原的影响,为补骨脂酚的进一步研究与应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞系 人肝星状细胞(博慧斯生物医药科技有限公司,采购货号为 2320)。

1.2 药物及试剂 补骨脂酚对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-15012210); β -雌二醇(北京百灵威科技有限公司,批号 L750N46,纯度 98%);DMEM 培养液,胎牛血清(FBS)(美国 Hyclone 公司,批号分别为 NZM1301,NYB0614);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 021005);超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),丙二醛(MDA)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20151215,20151214,20151208);小鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体,小鼠抗人基质金属蛋白酶-1

(MMP-1)单克隆抗体,兔抗人胶原蛋白-I(Col- I)多克隆抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,HRP 标记羊抗小鼠 IgG(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 16A00205,16A00308,sc-73494,sc-72462,sc-78261)。

1.3 仪器 MK3 型酶标仪(上海热电仪器有限公司),SmartChemi500 型一体式微型化学发光成像仪(北京赛智创业有限公司),MS-500A 型半自动分析生化仪(四川美生科技有限公司),Trans-BlotSD Cell 型电泳仪及半干转膜仪(美国 Bio-Rad 公司),Smart chemi II 型一体式微型化学发光成像仪(北京赛智创业科技公司),ETR16-2 型高速冷冻离心机(北京现代北利离心机公司),TProfessional Standard 型 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司),M \times 3000P 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Agilent Stratagene 公司)。

2 方法

2.1 补骨脂酚安全有效浓度的筛选 取对数生长期的细胞,接种于 96 孔板(每孔 1×10^4 个),培养 24 h 后,分别加入 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 1×10^{-10} , 1×10^{-11} mol \cdot L⁻¹ 的补骨脂酚继续培养 24 h,加入 MTT 20 μ L 及 DMSO 150 μ L,于 492 nm 波长处酶标仪检测每组细胞的吸光度 A 。

$$\text{计算细胞增殖率} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.2 补骨脂酚对 TGF- α 诱导人肝星状细胞活性的影响 将 96 孔板中的细胞培养 24 h 后进行分组,参照文献[10],分别为空白组(加入培养液培养),TGF- β 组(加入 10 μ g \cdot L⁻¹ TGF- β 溶液培养),补骨脂酚组(加入补骨脂酚安全有效浓度培养),雌二醇组(加入雌二醇溶液培养),继续培养 24 h,加入 MTT 20 μ L 及 DMSO 150 μ L,于 492 nm 波长处酶标仪检测每组细胞的 A 。

$$\text{计算细胞增殖率} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.3 ELISA 检测肝星状细胞中 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量的变化 收集各组已培养好的细胞,按照 SOD, GSH-Px 及 MDA ELISA 试剂盒的操作说明检测各组抗氧化酶的水平。

2.4 Real-time PCR 检测肝星状细胞中 MMP-1, Col- I mRNA 含量变化 收集各组已培养好的细

胞,按照 RNA 提取试剂盒的操作说明,加入 trizol 试剂、四氯化碳、异丙醇和 75% 乙醇提取 RNA,分光光度计检测 RNA 纯度和浓度,再按照反转录试剂盒将 RNA 转换为 cDNA,然后以 cDNA 为模板,按照 95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火/延伸 60 s,

30 个循环反应条件,进行 Real-time PCR。最后以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,按照 $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{内参基因}})_{\text{处理组}} - (C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$,对 MMP-1,Col- I mRNA 表达进行分析。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

引物名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	片段长度/bp
GAPDH	CCTGCACCACCAACTGCTTAG	CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGA	111
MMP-1	GAGGGTCAAGCAGACATCA	GTCCACCTTTTCATCTTCATCA	152
Col- I	AGAGGAAGGAAAGCGAGGAG	GGACCAGCAACACCATCTG	120

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝星状细胞中 MMP-1,Col- I 蛋白含量变化 收集各组已培养好的细胞,加入蛋白裂解液(RIPA)及蛋白酶抑制剂(PMSF)混合液进行细胞裂解,30 min 后放于 1.5 mL 离心管中,离心,吸出上清液。将一小部分用于蛋白浓度的检测,剩下的样品与上样缓冲液按照 4:1 的比例进行稀释,沸水加热使其变性。取制备好的胶板放于电泳槽中,倒入电泳缓冲液,将梳子拔出,赶走气泡,将样品和 Marker 加入到胶板中,电泳 100 min,转膜 30 min,封闭液封闭 2 h,分别加入目的蛋白及内参蛋白的一抗(1:300)孵育过夜,次日,加入二抗(1:1 万)孵育 2 h,TBST 进行洗涤 4 次。最后加入发光液(A:B=1:1),放于发光成像仪中,曝光并采用 Image J 软件图像分析。

表 2 补骨脂酚对肝星状细胞增殖率的影响

Table 2 Effect of bacuchiol on proliferation rates of hepatic stellate cells

组别	浓度/mol·L ⁻¹	A($\bar{x} \pm s, n=6$)	细胞增殖率/%
空白	-	0.501 ± 0.036	100.00
补骨脂酚	1 × 10 ⁻¹¹	0.596 ± 0.035 ²⁾	118.96
	1 × 10 ⁻¹⁰	0.581 ± 0.062 ²⁾	115.96
	1 × 10 ⁻⁹	0.585 ± 0.031 ²⁾	116.77
	1 × 10 ⁻⁸	0.573 ± 0.064 ²⁾	114.37
	1 × 10 ⁻⁷	0.556 ± 0.060 ²⁾	110.98
	1 × 10 ⁻⁶	0.536 ± 0.006 ¹⁾	106.99 ¹⁾
	1 × 10 ⁻⁵	0.506 ± 0.031	100.99
	1 × 10 ⁻⁴	0.367 ± 0.043 ²⁾	73.25
	1 × 10 ⁻³	0.260 ± 0.069 ²⁾	51.89

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计学分析软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和数据进行组间两两两两比较进行具体分析(LSD 法),以 P<0.05 为差异有统计学意义。

表 3 补骨脂酚对 TGF-β 诱导人肝星状细胞活性的影响

Table 3 Effect of bacuchiol on TGF-β induced hepatic stellate cell activity

组别	浓度/mol·L ⁻¹	A($\bar{x} \pm s, n=6$)	细胞增殖率/%
空白	-	0.532 ± 0.017	100.00
TGF-β	-	0.304 ± 0.037 ¹⁾	57.14
补骨脂酚	1 × 10 ⁻⁵	0.409 ± 0.074 ²⁾	76.87
雌二醇	1 × 10 ⁻⁶	0.413 ± 0.045 ²⁾	77.63

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与 TGF-β 组比较²⁾P<0.01(表 4~6 同)。

3 结果

3.1 MTT 法筛选补骨脂酚的安全有效浓度 与空白组比较,1 × 10⁻¹¹,1 × 10⁻¹⁰,1 × 10⁻⁹,1 × 10⁻⁸,1 × 10⁻⁷,1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 补骨脂酚组细胞增殖率显著上升(P<0.01),1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 补骨脂酚组细胞增殖率无明显变化,差异无统计学意义。1 × 10⁻⁴,1 × 10⁻³ mol·L⁻¹ 的补骨脂酚组细胞增殖率明显降低(P<0.05,P<0.01)。见表 2。

3.3 对肝星状细胞中 SOD,GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响 与空白组比较,TGF-β 组 SOD,GSH-Px 活性显著降低,MDA 含量显著升高(P<0.01);与 TGF-β 组比较,雌二醇组、补骨脂酚组 SOD,GSH-Px 活性均显著升高,MDA 含量显著降低(P<0.01)。

3.2 对 TGF-β 诱导人肝星状细胞活性的影响 与空白组比较,TGF-β 组细胞活性显著降低(P<0.01);与 TGF-β 组比较,雌二醇组、补骨脂酚组活性均明显升高(P<0.01)。见表 3。

见表 4。

表 4 补骨脂酚对肝星状细胞中 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of bacuchiol on SOD, GSH-Px activity and MDA content in hepatic stellate cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度 /mol·L ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	GSH /U·mL ⁻¹	MDA /μmol·L ⁻¹
空白	-	14.156 ± 0.590	4.212 ± 0.910	1.958 ± 0.767
TGF-β	-	5.687 ± 0.920 ¹⁾	2.678 ± 0.610 ¹⁾	5.687 ± 0.980 ¹⁾
补骨脂酚	1 × 10 ⁻⁵	10.343 ± 1.091 ²⁾	2.983 ± 1.091 ²⁾	3.356 ± 1.002 ²⁾
雌二醇	1 × 10 ⁻⁶	11.634 ± 0.840 ³⁾	3.361 ± 0.804 ³⁾	3.065 ± 0.904 ²⁾

3.4 对肝星状细胞中 MMP-1, Col- I mRNA 含量的影响 与空白组比较, TGF-β 组 MMP-1, Col- I mRNA 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与 TGF-β 组比较, 雌二醇组、补骨脂酚组 MMP-1, Col- I mRNA 含量均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 补骨脂酚对肝星状细胞中 MMP-1, Col- I mRNA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of bacuchiol on MMP-1, Col- I mRNA content in hepatic stellate cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/mol·L ⁻¹	MMP-1	Col- I
空白	-	1.000	1.000
TGF-β	-	2.429 ± 0.072 ¹⁾	3.021 ± 0.069 ¹⁾
补骨脂酚	1 × 10 ⁻⁵	1.501 ± 0.089 ²⁾	2.018 ± 0.099 ²⁾
雌二醇	1 × 10 ⁻⁶	1.269 ± 0.091 ²⁾	1.896 ± 0.035 ²⁾

3.5 对肝星状细胞中 MMP-1, Col- I 蛋白含量的影响 与空白组比较, TGF-β 组 MMP-1, Col-I 蛋白含量显著升高 ($P < 0.01$); 与 TGF-β 组比较, 雌二醇组、补骨脂酚组 MMP-1, Col-I 蛋白含量均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 6, 图 1。

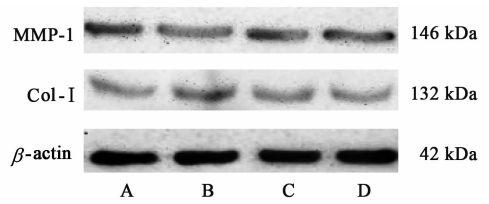
表 6 补骨脂酚对肝星状细胞中 MMP-1, Col- I 蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of bacuchiol on MMP-1, Col- I protein content in hepatic stellate cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 /mol·L ⁻¹	MMP-1 /β-actin	Col- I /β-actin
空白	-	0.509 ± 0.053	0.367 ± 0.049
TGF-β	-	0.361 ± 0.069 ¹⁾	0.519 ± 0.074 ¹⁾
补骨脂酚	1 × 10 ⁻⁵	0.452 ± 0.072 ²⁾	0.412 ± 0.035 ²⁾
雌二醇	1 × 10 ⁻⁶	0.424 ± 0.027 ²⁾	0.408 ± 0.091 ²⁾

4 讨论

肝星状细胞是肝纤维化中起主要作用的细胞,



A. 空白组; B. TGF-β 组; C. 补骨脂酚组; D. 雌二醇组

图 1 各组肝星状细胞中 MMP-1, Col- I 蛋白的表达

Fig. 1 Expression of MMP-1, Col- I protein in each group

细胞外基质也是通过其产生的^[11]。当肝细胞损伤时, 肝实质细胞会发生坏死, 肝星状细胞会到达肝损伤部位, 增殖, 合成大量细胞外基质^[12]。基质金属蛋白酶 (MMPs) 能够降解细胞外基质, 分解纤维化基质, 而肝纤维化进程中, MMPs 下调^[13]。TGF-β 是已知的最强的促纤维化因子, TGF-β 能激活肝星状细胞合成并分泌 Col- I, 使更多的细胞外基质沉积, 抑制 MMPs 活性, 加重肝纤维化^[14]。近年来氧化应激在肝星状细胞激活过程中发挥重要的作用, 活性氧 (ROS) 破坏了体内氧化-抗氧化的平衡, 使机体失去正常的调节功能, 对正常细胞及组织造成损伤, 从而促进肝脏炎症及肝纤维化的发展^[15]。本实验结果表明, 补骨脂酚能够有效的提高 TGF-β 诱导肝星状细胞中 SOD, GSH-Px 活性以及降低 MDA 含量, 同时, 也能提高 TGF-β 诱导肝星状细胞中 MMPs 活性, 降低 Col- I 含量。

综上所述, 补骨脂酚可以通过抗氧化应激, 提高 MMPs 活性, 降低 Col- I 含量起保护作用。

[参考文献]

- [1] MENG F, WANG K, Aoyama T, et al. IL-17 signaling in inflammatory cells, Kupffer cells and Hepatic Stellate cells exacerbates liver fibrosis [J]. Gastroenterology, 2012, 143 (3): 765-775.
- [2] Urtasun R, Lopategi A, George J, et al. Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-I via integrin α(V)β(3) engagement and PI3K/p-Akt/NF-κB signaling [J]. Hepatology, 2012, 55 (2): 594-608.
- [3] 夏海珊, 陈少茹, 钟月春, 等. 肝纤维化的发病机制和药物治疗现状 [J]. 中国医药导报, 2014, 11 (18): 162-165.
- [4] 赵建建. α-酮戊二酸二甲酯对肝星状细胞活化及肝纤维化的影响及机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [5] CHANG J, LAN T, LI C, et al. Activation of Slit2-Robo1 signaling promotes liver fibrosis [J]. J Hepatol,

2015,63(6):1413-1420.

- [6] 谢君,谢晓芳,代良萍,等. 肝苏颗粒对四氯化碳致肝纤维化大鼠肝功能和病理损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(8):117-123.
- [7] 江芳,周昕睿,王旗,等. 补骨脂酚及其与补骨脂素合用对 HK-2 细胞的毒性及其机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2010,24(1):50-58.
- [8] 于悦,王亚静,皮佳鑫,等. 补骨脂酚研究进展[J]. 山东中医药大学学报,2013,37(2):174-176.
- [9] 王业秋,张丽宏,陈巧云. 绿原酸对 TGF- β_1 刺激人肝星形细胞凋亡的影响[J]. 中药材,2016,39(11):2629-2632.
- [10] 孙琪,朴成玉,陈丹丹,等. 补骨脂酚对 UVB 诱导 HaCaT 细胞凋亡因子 p53 和 Caspase-3 表达的影响[J]. 中国美容医学,2017,26(7):37-40.
- [11] 韦燕飞,彭岳,谢海源,等. 基于肝星形细胞分子机制的抗肝纤维化研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(17):1745-1748.
- [12] 欧意桃. 黄连素对肝纤维化的防治作用及其机制研究[D]. 广州:广东药科大学,2017.
- [13] Pellicoro A, Aucott R L, Ramachandran P, et al. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis [J]. Hepatology, 2012, 55 (6):1965-1975.
- [14] HONG F, CHOU H, Fiel M I, et al. Antifibrotic activity of sorafenib in experimental hepatic fibrosis: refinement of inhibitory targets, dosing, and window of efficacy *in vivo* [J]. Dig Dis Sci, 2013, 58 (1):257-264.
- [15] 熊莎,高建荣,胡祖良,等. 鳖甲提取物对抑制 TGF- β 诱导的大鼠肝星状细胞活化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(19):155-159.

[责任编辑 周冰冰]