

白花丹醌对 TGF- β_1 刺激人肝星状细胞 α -SMA 表达的影响

杨成芳, 李勇文, 钟毓娟, 李丽*, 熊美丽
(桂林医学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的:研究白花丹醌(plumbagin)对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)刺激的体外培养人肝星状细胞 HSC-LX2 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)mRNA 和蛋白表达的影响。方法:体外培养 HSC-LX2,随机设立空白组,TGF- β_1 刺激的模型组,TGF- β_1 + 白花丹醌 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高剂量组,TGF- β_1 + 白花丹醌 1.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 中剂量组和 TGF- β_1 + 白花丹醌 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 低剂量组,各药物与细胞孵育 72 h 后,采用 RT-PCR 检测各组 HSC-LX2 α -SMA mRNA 的表达,采用免疫细胞化学方法(ICC)检测 HSC-LX2 中 α -SMA 蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组 α -SMA mRNA 及蛋白表达明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,白花丹醌作用 72 h 后,高、中剂量组 HSC-LX2 细胞中 α -SMA mRNA 的表达明显降低($P < 0.01$);免疫细胞化学结果显示白花丹醌高、中剂量组对 HSC-LX2 细胞 α -SMA 蛋白的表达有显著地抑制作用($P < 0.05$),尤以高剂量组更明显($P < 0.01$)。结论:白花丹醌能抑制 HSC-LX2 的活化和增殖,其机制之一可能是从 mRNA 水平和蛋白水平抑制 α -SMA 的表达,从而发挥其抗肝纤维化作用。

[关键词] 白花丹醌; 转化生长因子- β_1 ; 肝星状细胞系-LX2; α -平滑肌肌动蛋白; 抗肝纤维化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0114-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130114

Effect of Plumbagin on α -SMA Expressions in Human Hepatic Stellate Cells Stimulated by TGF- β_1

YANG Cheng-fang, LI Yong-wen, ZHONG Yu-juan, LI Li*, XIONG Mei-li (Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of plumbagin on the mRNA and protein expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) in human hepatic stellate cell (HSC)-LX2 cells stimulated by transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) *in vitro*. **Method:** HSC-LX2 cells were cultured *in vitro* and divided into the blank group, the model group, the high-, medium-and low-dose plumbagin groups (2.0, 1.5, 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). After being incubated with each drug for 72 hours, the mRNA expression of α -SMA was assayed by RT-PCR and the protein expression of α -SMA was assayed by immunocytochemistry. **Result:** Compared with blank group, the mRNA and protein expressions of α -SMA in HSC-LX2 cells increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with model group, the mRNA and protein expressions of α -SMA were inhibited in the high-and medium-dose plumbagin groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Meanwhile, there were better results in the high-dose plumbagin group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Plumbagin could inhibit the activation and proliferation of HSC-LX2 cells and have certain anti-hepatic fibrosis effect. The mechanism may be related to restraining the mRNA and protein expressions of α -SMA.

[Key words] plumbagin; transforming growth factor- β_1 ; HSC-LX2; α -smooth muscle actin; anti-hepatic fibrosis

氧化应激在肝细胞的损伤与纤维化进程中发挥着重要作用,使用抗氧化剂能延缓实验性肝纤维化的进展^[1-3]。Ikeda R 等研究^[3-5]显示,NADPH 氧化

酶 4 (NADPH oxidase 4, NOX4) 通过活化活性氧 (reactive oxygen species, ROS),介导细胞内多种信号转导参与肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)

[收稿日期] 20140903(022)

[基金项目] 广西高校科学技术研究项目(KY2015LX280);桂林医学院高层次人才科研启动基金项目(KY2012087)

[第一作者] 杨成芳, 硕士, 实验师, 从事药理学实验教学工作, Tel:13977309637, E-mail:308823789@qq.com

[通讯作者] *李丽, 硕士, 高级实验师, 从事生理学实验教学工作, Tel:13737731606, E-mail:31910753@qq.com

的活化与增殖,促进肝纤维化的形成。国外研究^[6]表明,白花丹醌是 NOX4 的特异抑制剂,这可能与其萜醌结构有关。白花丹 *Plumbago zeylanica* 是蓝雪科蓝雪属植物,又名白雪花、一见消,是我国以及许多东南亚国家的传统药材,主要含萜醌类、香豆素类、有机酸类和甾醇类等多种化学成分。白花丹醌是白花丹萜醌类化合物中的一种,是分离得到最多的化学成分,其主要骨架类型是 1,4-萜醌,是白花丹药理作用的主要活性成分^[7]。韦燕飞等^[8-10]已证实白花丹醌具有体外抑制 HSCs 活化和增殖作用。本研究以转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 刺激体外培养的 HSC-LX2 细胞,建立 α -SMA 过表达的 HSC-LX2 细胞模型,旨在探讨白花丹醌对人肝星状细胞 α -SMA 表达的影响,明确其抗肝纤维化分子机制。

1 材料

1.1 细胞来源 人肝星状细胞株 (HSC-LX2),人胚肝细胞 (LO2),博慧斯生物医药科技有限公司。

1.2 药物及试剂 白花丹醌(美国 Sigma 公司,批号 1001468662), TGF- β_1 (美国 Novoprotein, 批号 PO1137), RNApure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物公司,批号 130127), TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒(北京天根生化公司,批号 RT120420), 鼠抗人 α -SMA 单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 30235), HRP 标记山羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 AB50301A), SP 染色试剂盒(福州迈新生物技术有限公司,批号 KIT9709)。

1.3 仪器 Model 311 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司), 5804R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), PTC-220 型多通道 PCR 仪(美国 MJ 公司), PPSQ-31A 型核酸蛋白测定仪(日本岛津公司), CFM-500 型倒置相差显微镜(德国蔡司产品), DYY-6D 型凝胶电泳仪/电泳槽(北京赛因坦科技有限公司), JS-780 型全自动凝胶成像分析系统(上海培清科技公司), HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文分析系统(上海培清科技公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人肝星状细胞系 HSC-LX2,置于含 10% 胎牛血清, 100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 nmol·L⁻¹ 链霉素的高糖 DMEM 培养液, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养,隔天换液,待细胞长至 80% 密度时,用 0.25% EDTA 胰蛋白酶消化,每 2~3 d 传代 1 次,每次实验均取呈指数生长的细胞进行。

2.2 细胞分组及处理 根据 MTT 结果确定用药浓

度,空白组加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液;模型组加入含 TGF- β_1 终质量浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[11] 的 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养液;白花丹醌高、中、低剂量组在加入终质量浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 刺激 24 h 基础上加入白花丹醌,终浓度分别为 2.0, 1.5, 1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 MTT 检测不同浓度白花丹醌对 LO2 毒性和 TGF- β_1 刺激的 HSC-LX2 增殖的影响 MTT 操作步骤参照文献^[10]方法进行。

2.4 RT-PCR 检测 HSC-LX2 细胞 α -SMA mRNA 的表达 ①将细胞以密度为 5 × 10⁶ 个/L 接种于直径为 10 cm 的培养皿中,除空白组外,其余各组均加入总质量浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TGF- β_1 刺激,24 h 细胞贴壁良好后换为含各浓度药液的培养液,继续培养 72 h。②采用 Trizol 法抽提细胞中总 RNA。用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量和纯度。③取总 RNA 5 μg ,采用 M-MuLV 逆转录酶将其逆转录成 cDNA。④根据 GenBank 查找基因序列并自行设计引物,以 β -actin 为内参,引物序列 β -actin: 上游引物 5'-CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC-3', 下游引物 5'-CGTACAGGTCTTTGCGGATGTC-3', 产物长度为 105 bp; α -SMA: 上游引物 5'-CTGTTCCAGCCATCC TTCAT-3', 下游引物 5'-CCGTGATCTCCTT-CTGCATT-3', 产物长度为 175 bp; ⑤反应条件: 94 °C 预变性, 3 min; 94 °C 变性, 30 s; 55 °C 退火, 30 s; 72 °C 延伸, 1 min; 共反应 35 个循环,再以 72 °C, 5 min, 充分延伸结束。⑥反应结束后取 8 μL RT-PCR 产物及 8 μL DNA marker 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果经培清全自动凝胶成像分析系统进行分析,样本 α -SMA mRNA PCR 产物条带的吸光度与内参 β -actin mRNA PCR 产物条带的积分吸光度 IA 比值作半定量分析,取平均值进行统计学分析,实验重复 3 次。

2.5 免疫细胞化学检测 HSC-LX2 细胞 α -SMA 蛋白的表达 将呈指数生长的 HSC-LX2 细胞以 5 × 10³ 个/孔的密度接种于放有盖玻片的 24 孔板,分组、加药干预同前。药物与细胞共孵育 72 h 后,4% 多聚甲醛固定 20 min, TritonX-100 透化细胞,3% 过氧化氢灭活,抗原修复,血清封闭,滴加 α -SMA 一抗 4 °C 过夜,孵育辣根过氧化物酶标记的二抗,室温 60 min, DAB 显示液显示,苏木素复染,封片,镜下观察。阳性判定结果:阳性信号为棕色或棕褐色,位于胞质和胞膜上。采用高清晰度彩色病理图文分析系统细胞测定程序,对各组阳性细胞进行显微图像分

析;每组设 3 个复孔,各孔分别随机选取 5 个视野,每个视野选取 20 个细胞,记录其灰度值,取平均值进行统计学分析。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 F 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 LO2 毒性和 TGF- β_1 刺激的 HSC-LX2 增殖的影响 白花丹醞作用 72 h 后,对 HSC-LX2 细胞的增殖有明显抑制作用,且呈剂量依赖性,浓度为 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对细胞的抑制率达到 100%, IC_{50} 为 $1.72 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;而对 LO2 细胞,浓度在 $0.25 \sim 2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对细胞几乎无抑制作用,浓度在 $1 \sim 2.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 有促进细胞生长作用。见图 1。

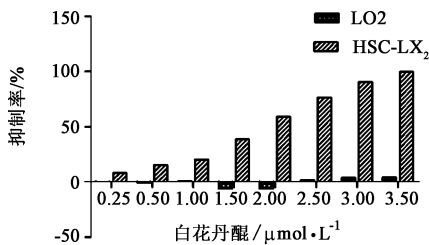


图 1 白花丹醞对 LO2 和 HSC-LX2 增殖的影响

Fig.1 Effects of plumbagin on proliferation of LO2 and HSC-LX2 cells

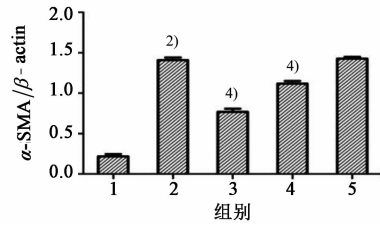
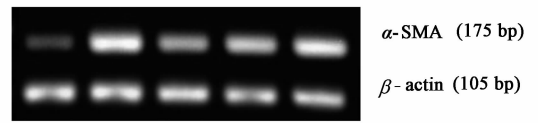
3.2 对 HSC-LX2 细胞 α -SMA mRNA 表达的影响

与空白组比较,模型组 HSC-LX2 细胞中 α -SMA mRNA 强表达($P < 0.01$);与模型组比较,白花丹醞作用 72 h 后,高、中剂量组中活化的 HSC-LX2 细胞 α -SMA mRNA 的表达明显降低($P < 0.01$)。见图 2。

3.3 对 HSC-LX2 细胞 α -SMA 蛋白表达的影响 α -SMA 蛋白阳性反应产物为细胞质和胞膜上有棕黄色或棕褐色颗粒状染色。免疫组化结果显示,空白组细胞 α -SMA 蛋白有少量阳性表达;经 TGF- β_1 刺激后,模型组细胞中 α -SMA 蛋白阳性表达明显增强;白花丹醞作用 72 h 后,高、中剂量组能抑制 HSC-LX2 细胞 α -SMA 蛋白的阳性表达,颜色由棕褐色变为浅棕色,与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$),尤以高剂量组明显($P < 0.01$)。各组 HSC-LX2 细胞中 α -SMA 蛋白的阳性表达灰度值见表 1,免疫细胞化学染色见图 3。

4 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段,为可逆性病变。目前多数学者认为 HSCs 的



1. 空白组;2. 模型组;3. 白花丹醞 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;4. 白花丹醞 $1.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;5. 白花丹醞 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$

图 2 白花丹醞对 HSC-LX2 细胞 α -SMA mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.2 Effect of plumbagin on α -SMA mRNA expression of HSC-LX2 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 1 白花丹醞对 HSC-LX2 细胞 α -SMA 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

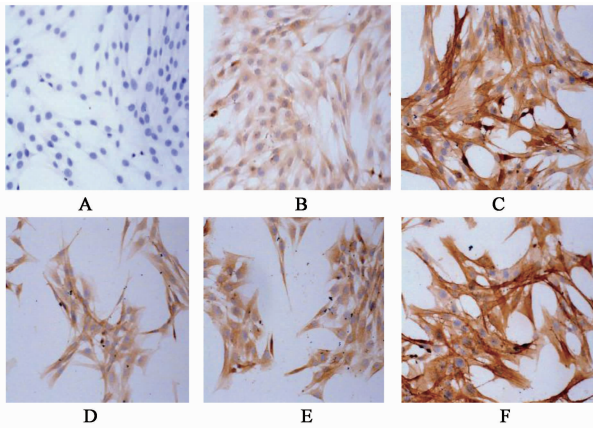
Table 1 Effects of plumbagin on α -SMA protein expression of HSC-LX2 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	α -SMA
空白	-	223.85 \pm 7.61
模型	-	191.23 \pm 3.45 ²⁾
白花丹醞	2.0	205.00 \pm 4.08 ⁴⁾
	1.5	195.87 \pm 2.19 ³⁾
	1.0	191.30 \pm 6.09

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

活化在肝纤维化的形成中起着关键性的作用^[12]。TGF- β_1 是肝纤维化形成中最关键的细胞因子,对 HSCs 的增殖和活化有明显促进作用^[13]。在致病因子作用下,HSCs 活化为具有高度增殖活性和高表达 α -SMA 的肌成纤维细胞,合成大量细胞外基质,最终导致肝纤维化。而在 α -SMA 介导下进一步诱导 HSC 的增殖、活化,胞体增大,ViTA 脂滴消失,表达更多具有收缩功能的 α -SMA,故 α -SMA 的表达被认为是 HSC 激活的显著特征之一^[14]。本文的创新之处在于运用 TGF- β_1 刺激 HSC-LX2 建立 α -SMA 过表达的细胞模型。

MTT 结果显示,白花丹醞呈剂量依赖性抑制 HSC-LX2 的增殖, IC_{50} 为 $1.72 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;而对人胚肝 LO2 细胞,在 $1 \sim 2.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 有促进细胞生长作用,故确定用药浓度为 $2.0, 1.5, 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个剂量。



A. 阴性对照; B. 空白组; C. 模型组; D. 白花丹醌 $2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. 白花丹醌 $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; F. 白花丹醌 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 3 白花丹醌对 HSC-LX2 细胞 α -SMA 蛋白表达的影响(免疫细胞化学, $\times 200$)

Fig. 3 Effects of plumbagin on α -SMA protein expression of HSC-LX2 cell (Immunocytochemistry, $\times 200$)

本实验免疫细胞化学结果显示,白花丹醌高、中剂量组作用于 HSC-LX2 细胞 72 h 后, α -SMA 蛋白阳性产物灰度值明显增大,而图片阳性区域的强弱与灰度值呈负相关^[15],表明其蛋白表达明显减少,与 RT-PCR 结果相一致。

本研究结果表明,白花丹醌对体外培养的 HSC-LX2 细胞的增殖具有明显的抑制作用;RT-PCR 和 ICC 结果表明,白花丹醌干预 HSC-LX2 细胞 72 h 后, α -SMA mRNA 和蛋白的表达均明显降低,提示白花丹醌体外抗肝纤维化的途径可能与其抑制 HSC-LX2 细胞的增殖活化及功能有关:一方面直接抑制 HSC 的增殖,降低其活性;另一方面,抑制 HSC 的功能,降低 α -SMA 的表达,抑制活化 HSC 收缩迁移,因而减缓肝纤维化的程度。然而,白花丹醌在体内的抗肝纤维化作用及机制尚待进一步的研究。

[参考文献]

[1] Urtasun R, Conde dela Rosa L, Nieto N. Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response[J]. Clin Liver Dis, 2008,12(4):769-790.
[2] Aram G, Potter J J, Liu X, et al. Deficiency of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase enhances hepatocellular injury but attenuates fibrosis after chronic carbon tetrachloride

administration[J]. Hepatology, 2009,49(3):911-919.
[3] De Minicis S, Brenner D A. NOX in liver fibrosis[J]. Arch Biochem Biophys, 2007,462(2):266-272.
[4] Ikeda R, Ishii K, Hoshikawa Y, et al. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 induced by transforming growth factor β_1 are the therapeutic targets of polyenylphosphatidylcholine in the suppression of human hepatic stellate cell activation[J]. Inflamm Res, 2011, 60(6):597-604.
[5] Sancho P, Mainez J, Crosas-Molist E, et al. NADPH oxidase NOX4 mediates stellate cell activation and hepatocyte cell death during liver fibrosis development [J]. PLoS One, 2012,7(9):e45285.
[6] Paulina K, Aleksandra P, Beata S, et al. The NADPH oxidase family and its inhibitors [J]. Arch Immunol, 2012,60:277-294.
[7] 刘圆,邓放,刘超,等. RP-HPLC 测定民族药材白花丹不同药用部位中白花丹醌的含量[J]. 中国中药杂志,2006,31(20):1684-1686.
[8] 韦燕飞,刘雪梅,唐爱存,等. 白花丹醌对瘦素刺激人肝星状细胞转化生长因子- β_1 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(6):710-713.
[9] 韦燕飞,李景强,张志伟,等. 白花丹醌对瘦素刺激的人肝星状细胞周期及其相关蛋白表达的影响[J]. 中草药,2012,43(9):1776-1780.
[10] 刘雪梅,韦燕飞,彭岳,等. 白花丹醌对瘦素诱导人肝星状细胞增殖与 α -SMA 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(9):1154-1157.
[11] 宋伟. TGF- β_1 对肝星状细胞的活化作用及机制[D]. 遵义:遵义医学院,2012.
[12] Shu J C, He Y J, Lv X, et al. Curcumin prevents liver fibrosis by inducing apoptosis and suppressing activation of hepatic stellate cells[J]. J Nat Med, 2009,63(4):415-420.
[13] Fu M Y, He Y J, Lv X, et al. Transforming growth factor β_1 reduces apoptosis via autophagy activation in hepatic stellate cells[J]. Mole Cular Medicine Reports, 2014,10(3):1282-1288.
[14] Reeves H L, Friedman S L. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liverfibrosis [J]. Front Biosci, 2002,7:808-826.
[15] 郑伟,汪宝军,叶立民. 灰度值、光学密度值与免疫组化片阳性表达强弱的关系[J]. 临床与实验病理学杂志,2003,19(3):566-567.

[责任编辑 周冰冰]