

# 甲基阿魏酸对 TGF- $\beta_1$ 激活人肝星状细胞增殖与 $\alpha$ -SMA 表达的影响

程钰<sup>1</sup>, 陈洪振<sup>2\*</sup>

(1. 安康市中心医院病理科, 陕西 安康 725000;

2. 安康市人民医院泌尿外科, 陕西 安康 725000)

**[摘要]** **目的:** 研究甲基阿魏酸(MFA)对转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )刺激的人肝星状细胞(HSC-LX<sub>2</sub>)增殖与 $\alpha$ -平滑肌激动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达的影响。**方法:** 将 $5 \times 10^7$ 个/L HSC-LX<sub>2</sub>进行体外培养,以不同剂量MFA(终质量浓度为5, 10, 20 mg·L<sup>-1</sup>)干预TGF- $\beta_1$ 刺激的HSC-LX<sub>2</sub> 48 h,用MTT法检测MFA对TGF- $\beta_1$ 刺激的HSC-LX<sub>2</sub>细胞增殖的影响;应用RT-PCR方法及Western blotting技术检测对HSC-LX<sub>2</sub>的 $\alpha$ -SMA表达的影响。**结果:** MFA可抑制TGF- $\beta_1$ 诱导的HSC-LX<sub>2</sub>的增殖,以5 mg·L<sup>-1</sup>时抑制作用最为明显,与TGF- $\beta_1$ 诱导的模型组比较有显著性差异( $P < 0.05$ );与模型组比较,MFA各剂量组作用于HSC-LX<sub>2</sub> 48 h后,HSC-LX<sub>2</sub>细胞中 $\alpha$ -SMA mRNA与蛋白表达的水平降低,且5 mg·L<sup>-1</sup>时作用最明显( $P < 0.05$ )。**结论:** MFA预处理人肝星状细胞可下调 $\alpha$ -SMA的mRNA及蛋白水平,从而推断MFA可以抑制HSC增殖及活化,抑制肝纤维化的发生和发展。

**[关键词]** 甲基阿魏酸; 转化生长因子- $\beta_1$ ; 人肝星状细胞; 肝纤维化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0164-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200164

## Influence of Meth-ferulic Acid on Proliferation and Expression of $\alpha$ -smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) in TGF- $\beta_1$ -induced Human Hepatic Stellate Cells

CHENG Yu<sup>1</sup>, CHEN Hong-zhen<sup>2\*</sup>

(1. Ankang Municipality Central Hospital Department of Pathology, Ankang 725000, China;

2. Ankang Municipality People's Hospital Urology, Ankang 725000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate influence of meth-ferulic acid (MFA) on the proliferation and expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta_1$ )-induced human hepatic stellate cells (HSC-LX<sub>2</sub>). **Method:** TGF- $\beta_1$   $5 \times 10^7$ /L induced human hepatic stellate cell line (HSC-LX<sub>2</sub>) *in vitro* were cultured with different dose of MFA (the final concentration being 5, 10, 20 mg·L<sup>-1</sup>). MTT method was used to detect the proliferation of TGF- $\beta_1$ -induced HSC-LX<sub>2</sub>. Western blotting and RT-PCR were used to detect the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) of HSC-LX<sub>2</sub>. **Result:** MFA could inhibit the proliferation of TGF- $\beta_1$ -induced HSC-LX<sub>2</sub> with a dose dependent, the inhibitory effect by 5 mg·L<sup>-1</sup> concentration was more obvious, compared with the TGF- $\beta_1$ -induced the model group ( $P < 0.05$ ); and compared with TGF- $\beta_1$ -induced the model group, the expression of  $\alpha$ -SMA mRNA and protein by 5 mg·L<sup>-1</sup> concentration was more obvious. **Conclusion:** MFA pretreatment on human hepatic stellate cells can reduce  $\alpha$ -SMA mRNA and protein levels.

**[Key words]** meth-ferulic acids; transforming growth factor- $\beta_1$ ; hepatic fibrosis; human hepatic stellate cells

肝星状细胞是肝纤维化的形成过程中细胞外基质沉积的重要细胞来源。肝脏在正常状态时,肝星

**[收稿日期]** 20140220(013)

**[第一作者]** 程钰, 硕士研究生, 从事肝纤维化的基础研究, Tel: 18729152270, E-mail: 308566948@qq.com

**[通讯作者]** \* 陈洪振, 本科, 从事肝纤维化的基础研究, Tel: 15591490606, E-mail: 446285532@qq.com

状细胞处于静息状态,它能贮存和代谢维生素 A,同时也可能与维持正常的基底膜有关<sup>[1]</sup>。当外界刺激因子引起肝脏损伤时,肝星状细胞由静息状态变为活化状态,被激活成为具有增殖、产生胶原纤维和收缩等活性的肌成纤维细胞,并大量表达  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actins,  $\alpha$ -SMA)。目前普遍认为,  $\alpha$ -SMA 是肝星状细胞活化的重要标志<sup>[2-4]</sup>。甲基阿魏酸(MFA)是从蝉翼藤的根茎中分离得到的单体,笔者发现 MFA 具有较强的抗菌消炎、抗癌、抗病毒、抗 HIV、免疫增强等多种活性<sup>[5-8]</sup>,为了进一步研究其保肝作用,本实验在建立体外转化生长因子(TGF- $\beta_1$ )致人源性肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC-LX<sub>2</sub>)细胞系氧化应激的基础上,用 MTT 法检测 MFA 对 HSC-LX<sub>2</sub> 增殖的影响;以  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)作为测定 HSC 活化的指标,采用 RT-PCR 检测 MFA 对 HSC-LX<sub>2</sub>  $\alpha$ -SMA 基因的表达和 Western blotting 方法检测 HSC-LX<sub>2</sub>  $\alpha$ -SMA 蛋白表达情况,探讨 MFA 抗肝纤维化的可能机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人源性肝星状细胞系 HSC-LX<sub>2</sub>,购于中美合资博慧斯生物医药科技有限公司。

**1.2 药物及试剂** 甲基阿魏酸(MFA,是从广西特色中草药蝉翼藤茎皮中提取、分离、纯化得到一种单体,纯度 98% 以上,由本课题组自行制备),TGF- $\beta_1$  (novoprotein 公司,批号 PO1137),MTT(美国 Sigma 公司,批号 M2128),ECL 发光试剂盒,RIPA 裂解液,BCA 蛋白测定试剂盒(碧云天生物技术研究,南通),鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体(北京中杉金桥,货号 TA08),鼠抗人  $\alpha$ -SMA 单克隆抗体(湖南远泰生物技术有限公司,批号 30235),HRP 标记山羊抗鼠二抗(北京中杉金桥,批号 ZB-2305),TRIzol(北京艾德莱生物科技有限公司),qRT-PCR 试剂盒(invitrogen),高糖 DMEM 培养基、胎牛血清(Hyclone)。

**1.3 仪器** Model 311 型 CO<sub>2</sub> 养箱(美国 Thermo),5804R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf),Model 450 型酶标仪(美国 Thermo),PTC-220 型多通道 PCR 仪(美国 MJ 公司),核酸蛋白测定仪(日本岛津),倒置相差显微镜(德国蔡司产品),电泳仪、半干转膜仪(美国 Bio-rad 产品)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 用含 10% 胎牛血清、质量浓度均为 100 mg·L<sup>-1</sup> 的青霉素和链霉素的高糖 DMEM 培养液培养人肝星状细胞株(HSC-LX<sub>2</sub>),置于 37 °C,

5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养,隔天换 1 次液。当细胞生长呈单层致密状态时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,离心后将细胞轻轻吹打成细胞悬液,按 1:2 进行传代,每 2~3 d 传代 1 次。

**2.2 细胞分组及处理** 空白对照组:加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液;模型组:在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中加入 TGF- $\beta_1$ ,终浓度为 5  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>;药物组:在 TGF- $\beta_1$  刺激的模型组基础上加入相应浓度 MFA,低、中、高剂量组终浓度分别为 5,10,20 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3 MFA 对细胞增殖的影响** 调整传代 HSC-LX<sub>2</sub> 的浓度,将细胞以 1 × 10<sup>4</sup>/孔接种于 96 孔板,每孔 180  $\mu$ L。分为空白对照组、TGF- $\beta_1$  刺激的模型组、低、中、高剂量 MFA 组(TGF- $\beta_1$  + MFA 5,10,20 mg·L<sup>-1</sup>),每组设 6 个复孔。细胞贴壁生长良好后,换含各组含相应药物的培养液,继续培养 48 h 后,各孔加入 MTT 20  $\mu$ L,继续培养 4 h,吸出上清,每孔加入 200  $\mu$ L DMSO,置于摇床上低速振荡 5 min,于酶标仪单波长(490 nm)测吸光度(A),评价 MFA 对 HSC-LX<sub>2</sub> 增殖的抑制作用。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{给药孔}}) / A_{\text{对照孔}} \times 100\%$$

**2.4 检测 LX-2 中  $\alpha$ -SMA mRNA 的表达** ①将细胞以 5 × 10<sup>7</sup> 个/L 接种于 10 cm 培养皿中,细胞贴壁生长良好后,换含各组含相应药物的培养液,继续培养 48 h,收集细胞提取细胞总 RNA。②按照艾德莱总 RNA 提取说明书,采用 TRIzol 法抽提细胞中总 RNA。用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 均在 1.8~2.0。③取 cDNA 5  $\mu$ g,采用 M-MuLV 逆转录酶将其逆转录成 cDNA。根据 GenBank 查找基因序列并自行设计引物,以  $\beta$ -actin 为内参,引物序列  $\alpha$ -SMA: FP: 5'-CTGTTCCAGCCATCCTTCAT-3', RP: 5'-CCGTGATCTCCTTCGATT-3',产物长度为 175 bp;  $\beta$ -actin: FP: 5'-CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC-3', RP: 5'-CGTACAGGCTTTGCGGATGTC-3',产物长度为 105 bp。④反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s;55 °C 退火,30 s;72 °C 延伸 30 s。共反应 35 个循环。⑤反应结束后分析取 5  $\mu$ L RT-PCR 产物及 5  $\mu$ L DNA marker 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, Gel Doc XR 系统检测吸光度, Quantity One 软件进行分析,以待测 mRNA 与内参  $\beta$ -actin mRNA 的吸光度(A)比值作半定量分析。

**2.5 测定  $\alpha$ -SMA 蛋白表达** 分组培养 48 h 后,收集细胞,冰 PBS 液漂洗 3 次,加入 RIPA 裂解缓冲液

裂解,收集细胞裂解物。于 4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心。离心后取上清液。BCA 法测定上清液总蛋白含量,取 80 μg 总蛋白的上清液煮沸 5 min 后进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后将凝胶上的蛋白质经 PVDF 膜转移到膜上(PVDF 膜使用前用甲醇浸泡),质量分数为 5% 的含 TBST 脱脂奶粉室温封闭 1 h。然后加入 α-SMA 一抗孵育,4 °C 摇床过夜,再与辣根过氧化物酶标记的二抗作用 1 h,最后发光显色。β-actin 为内参。

**2.6 统计学处理** 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,抑制率以百分率表示,利用 SPSS ANOVA,以  $P < 0.05$  具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 TGF-β<sub>1</sub> 激活人肝星状细胞增殖的影响**  
MTT 法检测显示,与空白对照组相比,经 TGF-β<sub>1</sub> (5 μg·L<sup>-1</sup>) 刺激后,肝星状细胞的增殖活性明显增强 ( $P < 0.05$ );与 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的模型组相比,MFA 在 5 ~ 20 mg·L<sup>-1</sup> 内,可以抑制 LX-2 细胞的增殖,以 5 mg·L<sup>-1</sup> 时抑制作用最为明显 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 MFA 对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导活化的 LX-2 增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

分组	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	细胞活力 /A	抑制率 /%
空白对照	-	0.700 ± 0.008	-
模型	-	1.087 ± 0.016 <sup>1)</sup>	-
MFA	20	0.470 ± 0.022 <sup>2)</sup>	32.8
	10	0.468 ± 0.013 <sup>2)</sup>	33.1
	5	0.320 ± 0.011 <sup>2)</sup>	54.3

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 对肝星状细胞 α-SMA mRNA 表达的影响**  
5 μg·L<sup>-1</sup> TGF-β<sub>1</sub> 处理 48 h 后,LX-2 细胞的 α-SMA 的 mRNA 表达明显增强 ( $P < 0.01$ )。各浓度 MFA 组与 TGF-β<sub>1</sub> 处理组比较,α-SMA mRNA 表达均明显降低,且以 5 mg·L<sup>-1</sup> MFA 组的 α-SMA mRNA 水平降低最明显,具有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2,图 1。

**3.3 对肝星状细胞 α-SMA 蛋白表达水平的影响**  
与空白对照组比较,模型组的 α-SMA 蛋白表达水平显著增高 ( $P < 0.01$ );在 5 ~ 20 mg·L<sup>-1</sup> 内,MFA 用药组 α-SMA 的蛋白表达较模型组显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图 2,表 2。

### 4 讨论

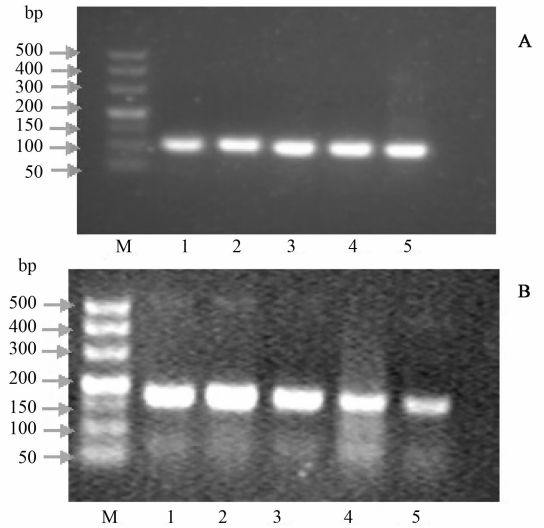
HSC 是肝纤维化的主要细胞,HSC 的持续激活是肝纤维化发生发展过程中的关键环节。当肝脏受到炎症或机械刺激等损伤时,肝星状细胞被激活,其

表 2 MFA 对 TGF-β<sub>1</sub> 刺激

HSC-LX<sub>2</sub> α-SMA mRNA α-SMA 蛋白相对的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

分组	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	α-SMA/β-actin	α-SMA/β-actin
空白对照	-	1.430 ± 0.012	1.123 ± 0.025
模型	-	1.758 ± 0.020 <sup>1)</sup>	1.277 ± 0.012 <sup>1)</sup>
MFA	20	0.894 ± 0.054 <sup>2)</sup>	0.928 ± 0.011 <sup>2)</sup>
	10	0.834 ± 0.022 <sup>2)</sup>	0.753 ± 0.021 <sup>2)</sup>
	5	0.490 ± 0.127 <sup>2)</sup>	0.580 ± 0.037 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 3 同)。



A. β-actin; B. α-SMA;

M. marker; 1. 空白对照组; 2. TGF-β<sub>1</sub> 刺激的模型组;  
3 ~ 5 分别为在模型组的基础上  
加入 MFA 20, 10, 5 mg·L<sup>-1</sup> 组(图 2 同)

图 1 MFA 对肝星状细胞 α-SMA mRNA 表达的影响 (RT-PCR 凝胶) 电泳

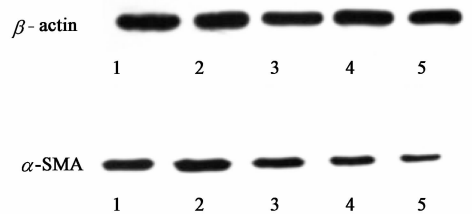


图 2 MFA 对肝星状细胞 HSC-LX<sub>2</sub> α-SMA 蛋白表达水平的影响

表型由静止型转变为激活型. 激活的 HSC 为活化的肌纤维母细胞,一方面通过增生和分泌细胞外基质参与肝纤维化的形成和肝内结构的重建,另一方面通过细胞收缩使肝窦内压升高,表达大量的 α-SMA,肝脏内胶原纤维不断沉积,最终导致肝纤维化的形成<sup>[9]</sup>. α-SMA 作为 HSC 活化的主要标志物,与 HSC 活化的程度及数量呈正比。只要抑制和减少 HSC 中 α-SMA 的表达,就可以抑制 HSC 的激活,从而抑

制肝纤维化的发展。因此,肝星状细胞是肝纤维化的发病机制和药物治疗研究的重要靶点。LX-2 具有活化的肝星状细胞的特征,是一种活化的人肝星状细胞株,可用于研究和探索肝纤维化的发病机制及其防治方法,是当前具有实际应用价值的一种研究工具<sup>[10]</sup>。

TGF- $\beta_1$  是介导肝脏损伤及纤维化的最关键的细胞因子。TGF- $\beta_1$  属 TGF  $\beta$  超家族。TGF  $\beta$  超家族包括 3 种亚型 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$ 、TGF- $\beta_3$ ,虽然它们在活体外有相同的功能,但在活体内的生物学功能却各不相同,TGF- $\beta_1$  在组织器官的创伤愈合及纤维病变中有着重要的作用<sup>[11-12]</sup>,目前被认为是最强的促 HSC 纤维化的细胞因子。蝉翼藤为广西特色民族中草药,其活性成分 MFA 具有抗菌消炎,抗病毒,免疫调节等作用,具有较好的研究价值和广阔的开发前景<sup>[5-8]</sup>。本课题组在药物筛选试验中发现 MFA 对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)所致小鼠急性肝损伤具有保护作用,对 CCl<sub>4</sub> 所致的大鼠肝纤维化有较好的抑制减轻作用以及对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖及胶原合成具有明显的抑制作用<sup>[13-14]</sup>。

本实验结果表明,甲基阿魏酸在 5 ~ 20 mg·L<sup>-1</sup> 的浓度范围内,不仅对 TGF- $\beta_1$  诱导人肝星状细胞的增殖有抑制作用,对  $\alpha$ -SMA mRNA 及蛋白表达有明显的抑制作用,且在 5 mg·L<sup>-1</sup> 时作用最明显,可能是由于高浓度的 MFA 对细胞造成了损伤,反而会抑制它自身的药物活性。这说明该药在适宜的浓度范围内可明显抑制 TGF- $\beta_1$  诱导 HSC-LX<sub>2</sub> 中  $\alpha$ -SMA 基因和蛋白的表达,提示甲基阿魏酸抗肝纤维化的作用可能与其抑制 HSC 的活化及功能有关:一方面,直接抑制 HSC 的增殖,降低其活力;另一方面,通过抑制 HSC 的功能,降低  $\alpha$ -SMA 的分泌量及表达水平,从而降低肝脏的纤维化程度及其诱导 HSC 增殖活化的能力。因此,根据以上结果甲基阿魏酸体内抗肝纤维化作用的研究结果,说明 MFA 抗肝纤维化作用机制之一是从 mRNA 水平和蛋白水平抑制  $\alpha$ -SMA 表达,发挥抗肝纤维化作用。

#### [参考文献]

- [1] Lee U E, Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(2):195.
- [2] Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, et al. The value

of  $\alpha$ -SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study [J]. Histopathology, 2005, 47:276.

- [3] Sugimoto R, Enjoji M, Kohjima M, et al. High glucose stimulates hepatic stellate cells to proliferate and to produce collagen through free radical production and activation of mitogen-activated protein kinase [J]. Liver Int, 2005(25):1018.
- [4] Robert K, Nehmé J, Bourdon E, et al. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver [J]. Gastroenterology, 2005, 128:1405.
- [5] 李勇文,李丽,张士军. 含蝉翼藤大鼠血清的免疫调节作用 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(6):452.
- [6] 李勇文,李丽,李梅,等. 蝉翼藤对小鼠脾细胞体外增殖和淋巴因子分泌水平的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(5):42.
- [7] 李勇文,李丽,李植飞. 五味藤抗炎作用及其机制初探 [J]. 中国中医急症, 2006, 15(8):898.
- [8] 李丽,李勇文,唐爱存. 蝉翼藤氯仿提取物的抗炎和免疫增强作用 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(4):62.
- [9] 王晓丽,张英博,李雪岩,等. 大黄素对大鼠肝纤维化的影响及机理研究 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4):56.
- [10] Xu L, Hui A Y, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis [J]. Gut, 2005, 54(5):142.
- [11] Wynn T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. J Pathol, 2008, 214:199.
- [12] Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis [J]. Gut, 2007, 56:284.
- [13] Huang Q, Li Y, Zhang S, et al. Effect and mechanism of methyl helicterate isolated from helicteres angustifolia (Sterculiaceae) on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143(3):889.
- [14] Li R, Xu L, Liang T, Li Y, et al. Puerarin mediates hepatoprotection against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis rats through attenuation of inflammation response and amelioration of metabolic function [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 52:69.

[责任编辑 聂淑琴]