

· 经典名方 ·

当归芍药散含药血清对 ET-1 诱导的 HSC-T6 细胞内 p-MLC II, MLC II 蛋白表达的影响

蒋沙沙, 潘永福, 杨沫, 王运来, 尹丹丹, 许钒*

(安徽中医药大学药学院, 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230012)

[摘要] **目的:**探究内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 内磷酸化肌球蛋白轻链 II (phosphorylated myosin light chain II, p-MLC II), 肌球蛋白轻链 II (myosin light chain II, MLC II) 蛋白表达的影响及当归芍药散 (Danggui Shaoyao San) 含药血清对其的干预作用。**方法:**将 HSC-T6 细胞种板后, 各组每孔加入 DMEM 和终体积分数分别为 2.5%, 5%, 10%, 15%, 20% 的空白大鼠血清, 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法测定 HSC-T6 细胞的活力, 筛选出适合的大鼠血清浓度范围; 将细胞分为空白血清组 (5%, 10%, 15%) 和当归芍药散含药血清组 (5%, 10%, 15%), 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测基础状态下细胞培养上清液中 ET-1 的含量; 细胞分为空白血清组 (10%), 当归芍药散含药血清低、中、高剂量组 (5%, 10%, 15%), 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测基础状态下细胞培养上清液中 ET-1 mRNA 的水平; 将细胞分为空白血清组 (10%), 模型组 (10%), 当归芍药散含药血清低、中、高剂量组 (5%, 10%, 15%), Y-27632 抑制剂组 (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 除空白血清组外, 其余各组均加入 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ET-1 诱导 HSC-T6 细胞, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 ET-1 诱导的 HSC-T6 细胞中 p-MLC II, MLC II 蛋白表达。**结果:**选用血清浓度为 5%, 10%, 15% 作为含药血清浓度。与空白血清组比较, 当归芍药散含药血清组明显降低基础状态下 ET-1 含量, ET-1 mRNA 相对含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白血清组比较, 模型组细胞内 p-MLC II, MLC II 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 当归芍药散含药血清各剂量组及 Y-27632 抑制剂组均可明显下调 p-MLC II, MLC II 蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**当归芍药散含药血清可能通过下调 ET-1 的含量, 抑制 ET-1 的自分泌, 从而下调 p-MLC II, MLC II 蛋白表达。

[关键词] 当归芍药散; 含药血清; HSC-T6 细胞; 内皮素-1 (ET-1); 磷酸化肌球蛋白轻链 II (p-MLC II)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0014-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190226

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181031.0718.007.html>

[网络出版时间] 2018-11-02 09:51

Effect of Danggui Shaoyao San Drug-containing Serum on Expression of p-MLC II and MLC II Protein in HSC-T6 Cells Induced by ET-1

JIANG Sha-sha, PAN Yong-fu, YANG Mo, WANG Yun-lai, YIN Dan-dan, XU Fan*

(School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Chinese Medicine Formula of Anhui Province, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of endothelin-1 (ET-1) on the expression of phosphorylated myosin light chain II (p-MLC II) and myosin light chain II (MLC II) protein in rat hepatic stellate cells HSC-T6 and explore the intervention effect of Danggui Shaoyao San (DSS) drug-containing serum. **Method:** After HSC-T6 cells were seeded, DMEM and blank rat serum with final concentrations of 2.5%, 5%, 10%, 15% and 20% were added to each well. The viability of HSC-T6 cells was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay to screen the suitable serum concentration range. The cells were divided into blank serum

[收稿日期] 20180626(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573720)

[第一作者] 蒋沙沙, 在读硕士, 从事中药复方药理作用机制研究, E-mail: 516613528@qq.com

[通信作者] *许钒, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药复方药理作用机制研究, Tel: 0551-68129295, E-mail: 845570851@qq.com

control group (5%, 10%, 15%) and DSS drug-containing serum group (5%, 10%, 15%). ELISA was used to detect the content of ET-1 in cell culture supernatant under basic state. The cells were divided into blank serum control group (10%), DSS drug-containing serum low (5%), medium (10%) and high dose (15%) groups. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the level of ET-1 mRNA in cell culture supernatant under basic state. The cells were divided into blank serum control group (10%), model group (10%), DSS drug-containing serum low (5%), medium (10%), high dose (15%) groups and Y-27632 inhibitor group ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Except the blank serum control group, the other groups all received $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ET-1 to induce HSC-T6 cells. Western blot was used to detect the expression of p-MLC II and MLC II in HSC-T6 cells induced by ET-1. **Result:** Serum concentrations of 5%, 10% and 15% were used as drug-containing serum concentrations. As compared with the blank serum control group, the DSS drug-containing serum group significantly reduced the relative content of ET-1 and ET-1 mRNA in the basic state ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with the blank serum control group, the expression of p-MLC II and MLC II protein in the model group was significantly increased ($P < 0.01$); DSS drug-containing serum groups and Y-27632 inhibitor group can significantly down-regulate p-MLC II and MLC II protein expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** DSS drug-containing serum may down-regulate the expression of p-MLC II and MLC II by down-regulating the content of ET-1 and inhibiting the autocrine of ET-1.

[Key words] Danggui Shaoyao San; drug-containing serum; HSC-T6 cells; endothelin-1 (ET-1); p-myosin light chain (MLC) II

肝硬化腹水是肝硬化失代偿期最突出的临床表现,严重影响患者的健康状况,甚至威胁生命^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是一种肝窦间质细胞,受到致病因子刺激后而活化的 HSCs 发生形态和功能上的复杂变化。在内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 的刺激下促使 HSCs 表达平滑肌样蛋白,通过收缩使肝窦管径变小,导致肝内血管阻力增加,门脉压力升高^[2-4]。近些年大量研究证实,肝门静脉高压在肝硬化腹水的形成过程中起着关键作用^[5-6]。因此,ET-1 诱导 HSCs 的生物学作用对研究肝硬化腹水的病理生理改变具有重要意义。研究表明,Rho/ROCK 信号传导途径所介导的 HSCs 收缩在肝硬化和门静脉高压的发病机制中起重要作用^[7-8]。而磷酸化肌球蛋白轻链 (phosphorylated myosin light chain, p-MLC) 作为 Rho/ROCK 通路下游的一个磷酸化产物,它可以促进肌动蛋白微丝骨架的聚合,引起细胞的收缩、黏附、增殖、凋亡、迁移等生物学行为,促进肝硬化腹水的发生^[9-10]。故本实验旨在研究 p-MLC 在肝硬化腹水分子机制中的作用。

当归芍药散出自《金匮要略》,方药组成为当归、白芍、川芎、白术、茯苓、泽泻,具有活血利水、调肝理脾之功效^[11]。当归芍药散配伍特点与肝硬化腹水“气滞、血瘀、水停互结于腹中”的病机相符。课题组前期研究已证实当归芍药散可明显改善肝硬

化腹水大鼠的肝功能,同时减少腹水的生成,延缓肝病进程^[12-13]。但当归芍药散在 HSCs 收缩的分子机制尚未见报道。本文拟通过体外实验探究当归芍药散含药血清对 ET-1 诱导的 HSC-T6 细胞内 p-MLC II, MLC II 蛋白表达的影响,以期为肝硬化腹水的临床治疗提供新的理论依据。

1 材料

1.1 细胞株及动物 大鼠肝星状细胞 HSC-T6 细胞株(江苏凯基生物技术股份有限公司)。该细胞株系 SV40 转染 SD 大鼠肝星状细胞而成,表型为活化的肝星状细胞。健康雄性 SD 大鼠,体质量 220 ~ 250 g,购自安徽医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(皖)2015-0002,由安徽中医药大学实验动物伦理委员会审核通过。

1.2 药材 当归、白芍、川芎、白术、茯苓、泽泻药材购自安徽协和成药业饮片有限公司,并经安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》项下标准。参照原方比例(当归-白芍-川芎-白术-茯苓-泽泻 3:16::8:4:4:8)称取药材,10 倍量 75% 乙醇水浴回流 1.5 h,收集滤液;后加 8 倍量 75% 乙醇水浴回流 1.5 h,收集滤液。合并 2 次滤液,水浴浓缩至生药质量浓度为 $1.72 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的当归芍药散药液。

1.3 试剂 胎牛血清,胰酶消化液(碧云天生物技术公司,批号分别为 C0251, C0201);高糖 DMEM

培养基(美国 Hyclone 公司,批号 AC10254368);噻唑蓝(MTT,美国 Amersco 公司,批号 CT0025);大鼠 ET-1 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司,批号 E02E0040);逆转录试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,批号 00287813); β -肌动蛋白(β -actin,北京中杉生物技术有限公司,批号 TA-09);MLC II 兔单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab92721);p-MLC II 鼠单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 3675S);兔抗山羊免疫球蛋白(Ig)G,山羊抗小鼠 IgG(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为 SA00001-1,SA00001-16);trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 101002);Y-27632(上海前尘生物科技有限公司,批号 IAD1015-0001MG)。

1.4 仪器 YM-B 型立式压力蒸汽灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司);371 型 CO₂ 细胞培养箱,1500 型全波长酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司);YJ-1450 型超净工作台(苏净集团安泰公司);BX60 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Mx3000P 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 Agilent 公司);AF-10 型自动制冰机(意大利 Scotsman 公司);VE-186 型转膜仪,VE-180 型电泳槽,EPs 300 型电泳仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 HSC-T6 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,隔日换液。当观察到细胞密度至培养瓶底部的 80%~90% 时进行传代。每 2~3 d 传代 1 次。

2.2 当归芍药散含药血清的制备 SD 大鼠 20 只,适应性饲养 7 d 后随机分为空白组和给药组,每组各 10 只。给药组给予当归芍药散药液,空白组给予等剂量的生理盐水。早晚各 1 次,连续 3 d。末次灌药(灌药前禁食不禁水 12 h)1 h 后,3.5% 水合氯醛麻醉,腹主动脉采血,于 37 °C 静置 1 h 后,3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min 后收集血清,同组血清混合置于离心管中,于 56 °C 水浴灭活 30 min,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,-80 °C 分装保存备用。

2.3 MTT 比色法测定细胞增殖情况 将 HSC-T6 细胞种板后,各组每孔加入 DMEM 和终体积分数分别为 2.5%,5%,10%,15%,20% 的空白大鼠血清,培养 24 h 后检测各组细胞吸光度 A,筛选出合适的血清浓度。

2.4 ELISA 检测当归芍药散含药血清干预基础状态 ET-1 水平 实验分为 2 组,分别为空白血清组,

加入无血清 DMEM 培养基 + 空白大鼠血清(5%,10%,15%);当归芍药散含药血清组加入无血清 DMEM 培养基 + 当归芍药散含药血清(5%,10%,15%)。待 HSC-T6 细胞生长至对数期,按 1 × 10⁵ 个/mL 密度将细胞接种于 6 孔板中。先用正常 DMEM 培养基培养细胞至 80% 融合时,换用无血清的 DMEM 培养基培养 24 h,使细胞基本同步后吸弃培养基。按上述分组加入不同药物干预,继续培养 24 h。收集各组细胞的上清液,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清并标记,-20 °C 分装保存备用。按照大鼠 ET-1 ELISA 试剂盒使用说明书操作步骤检测 ET-1 含量。

2.5 Real-time PCR 检测当归芍药散含药血清干预基础状态 ET-1 mRNA 表达 实验分为 4 组,分别为空白血清组、当归芍药散含药血清低、中、高剂量组;空白血清组加入无血清 DMEM 培养基 + 空白大鼠血清(10%);当归芍药散含药血清低剂量组加入无血清 DMEM 培养基 + 当归芍药散含药血清(5%);当归芍药散含药血清中剂量组加入无血清 DMEM 培养基 + 当归芍药散含药血清(10%);当归芍药散含药血清高剂量组加入无血清 DMEM 培养基 + 当归芍药散含药血清(15%)。用 trizol 总 RNA 提取试剂分别提取 HSC-T6 细胞中总 RNA。PCR 反应条件 95 °C 2 min,95 °C 5 s,60 °C 10 s,72 °C 30 s。在紫外检测仪上检测所提取 RNA 样品的 260 和 280 nm 处 A,根据其值确定 RNA 的纯度和浓度。即 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0 表示 RNA 较纯,可用于逆转录;RNA 浓度可根据公式计算获得;RNA 浓度 = 40 × A₂₆₀ × 稀释倍数/1 000。按逆转录试剂盒说明书进行逆转录,获得的 cDNA 于 -20 °C 保存。ET-1 基因引物序列见表 1,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称	序列	长度/bp
ET-1	上游 5'-CGTCCCCTATGGACTAGGAA-3'	87
	下游 5'-CTGTTCCTTGGTCTGTGGT-3'	
β -actin	上游 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	150
	下游 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-MLC II,MLC II 蛋白表达 按 1 × 10⁵ 个/mL 的密度将细胞接种于 6 孔培养板中,置培养箱中培养至 80% 融合时,换不含血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h,

使细胞基本同步。实验分为 6 组,分别为空白血清组,模型组,当归芍药散含药血清低、中、高剂量组, Y-27632 抑制剂组,空白血清组加入无血清 DMEM 培养基 + 空白大鼠血清(终浓度为 10%) ;模型组加入无血清 DMEM 培养基 + 空白大鼠血清(终体积分数为 10%) + ET-1(终浓度为 10 nmol·L⁻¹) ;当归芍药散含药血清低剂量组加入无血清 DMEM 培养基 + 当归芍药散含药血清(终体积分数为 5%) + ET-1(终浓度为 10 nmol·L⁻¹) ;当归芍药散含药血清中剂量组加入无血清 DMEM 培养基 + 当归芍药散含药血清(终体积分数为 10%) + ET-1(终浓度为 10 nmol·L⁻¹) ;当归芍药散含药血清高剂量组加入无血清 DMEM 培养基 + 当归芍药散含药血清(终体积分数为 15%) + ET-1(终浓度为 10 nmol·L⁻¹) ; Y-27632 抑制剂组加入无血清 DMEM 培养基 + Y-27632(终浓度为 100 μmol·L⁻¹) + ET-1(终浓度为 10 nmol·L⁻¹)。按上述分组分别加入裂解液约 400 μL,充分裂解后 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清。加入上样缓冲液。SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜。5% 脱脂奶粉封闭 4 h,加稀释好的一抗(1:1 000), 4 ℃ 过夜。洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗稀释液(1:5 万),孵育 2 h。化学发光、显影、定影, Bio-Rad 凝胶图像处理系统分析,计算相对灰度值。

2.7 统计学方法 数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,两组间独立数据比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度大鼠血清对 HSC-T6 细胞增殖的影响 空白大鼠血清体积分数在 15% 以下随浓度增高, *A* 增高,当其体积分数达到 20% 时, *A* 下降。即在 5% ~ 15% 内,细胞增殖及活力较强且与空白大鼠血清体积分数呈正相关($P < 0.01$)。因此,在后期实验中,选用血清体积分数为 5%, 10%, 15% 作为含药血清体积分数。见表 2。

3.2 当归芍药散含药血清对基础状态 HSC-T6 细胞上清液中 ET-1 含量的影响 含药血清组细胞培养上清液中的 ET-1 含量较空白组明显降低,当归芍药散含药血清 5%, 10%, 15% 时与同体积分数空白组相比具有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

3.3 当归芍药散含药血清对基础状态 HSC-T6 细胞 ET-1 mRNA 表达的影响 与空白组比较,当归芍药散含药血清组的 ET-1 mRNA 表达量显著下降($P < 0.01$)。见表 4。

表 2 不同浓度当归芍药散血清对 HSC-T6 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of different concentrations of Danggui Shaoyao San (DSS) serum on proliferation of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积分数/%	A
空白	0	0.42 ± 0.03
当归芍药散	2.5	0.49 ± 0.07 ¹⁾
	5	0.68 ± 0.13 ²⁾
	10	0.71 ± 0.13 ²⁾
	15	0.74 ± 0.20 ²⁾
	20	0.68 ± 0.11 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

表 3 当归芍药散含药血清对 HSC-T6 细胞上清液中 ET-1 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of DGSYS drug-containing serum on ET-1 content in supernatant of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积分数/%	ET-1/μg·L ⁻¹
空白	5	74.70 ± 3.89
	10	78.20 ± 6.30
	15	75.24 ± 5.93
当归芍药散含药血清	5	64.87 ± 3.09 ¹⁾
	10	51.52 ± 2.43 ²⁾
	15	43.60 ± 2.41 ²⁾

注:与同体积分数空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

表 4 当归芍药散含药血清对 HSC-T6 细胞 ET-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of DSS drug-containing serum on expression of ET-1 mRNA in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

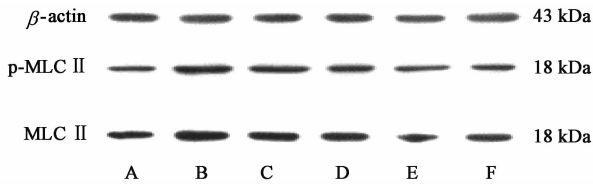
组别	体积分数/%	ET-1
空白	10	1.00
当归芍药散含药血清	5	0.71 ± 0.08 ¹⁾
	10	0.40 ± 0.09 ¹⁾
	15	0.22 ± 0.08 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 当归芍药散含药血清对 ET-1 诱导的 HSC-T6 细胞内 p-MLC II, MLC II 蛋白的影响 与空白组比较,模型组细胞内 p-MLC II, MLC II 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$) ;与模型组比较,当归芍药散含药血清高、中、低剂量组及 Y-27632 抑制剂组均可显著下调 p-MLC II, MLC II 蛋白表达($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1, 表 5。

4 讨论

HSCs 活化是肝硬化腹水的细胞学基础。肝硬化腹水时处于静息状态的 HSCs 被活化,使细胞获



A. 空白组; B. 模型组; C. 当归芍药散含药血清低剂量组; D. 当归芍药散含药血清中剂量组; E. 当归芍药散含药血清高剂量组; F. Y-27632 抑制剂组

图 1 各组 HSC-T6 细胞 p-MLC II, MLC II 蛋白的表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of expression of p-MLC II and MLC II proteins in HSC-T6 cells of each group

表 5 当归芍药散含药血清对 ET-1 诱导的 HSC-T6 细胞 p-MLC II, MLC II 蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of DSS drug-containing serum on p-MLC II and MLC II proteins content induced by ET-1 in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数 / %	p-MLC II / β -actin	MLC II / β -actin
空白	10	0.56 \pm 0.09	0.76 \pm 0.07
模型	10	1.67 \pm 0.08 ¹⁾	1.82 \pm 0.10 ¹⁾
当归芍药散含药血清	5	1.24 \pm 0.11 ²⁾	1.39 \pm 0.09 ²⁾
	10	0.88 \pm 0.11 ³⁾	1.10 \pm 0.13 ³⁾
	15	0.78 \pm 0.10 ³⁾	0.81 \pm 0.09 ³⁾
抑制剂	-	0.82 \pm 0.07 ³⁾	0.84 \pm 0.12 ³⁾

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

得显著的收缩能力。多项研究表明,活化的 HSCs 收缩能力增强,对血管紧张素 (angiotensin- II, Ang II), ET-1 等血管活性物质可产生收缩反应,参与了门静脉高压的形成^[14-15]。其中, ET-1 是最强的促 HSCs 收缩的细胞因子,且 ET-1 对 HSCs 的作用主要是通过其自分泌和旁分泌途径所产生的^[16-19]。肝脏作为 ET-1 产生和作用的主要场所之一,在病理情况下会产生与生理状态不同的变化,文献表明患有肝硬化的患者血浆 ET-1 水平增高,并且 ET-1 水平增高的程度与肝硬化的严重程度、腹水的出现明显相关^[20]。ET-1 的受体在损伤的肝脏尤其是 HSCs 上显著增加,ET-1 受体 mRNA 量与门静脉高压程度直接相关^[21-22]。故本实验以 ET-1 为当归芍药散含药血清的调控对象。本实验研究发现 HSC-T6 细胞可表达 ET-1 mRNA,同时可释放 ET-1,说明活化的 HSCs 能自分泌 ET-1;当给予当归芍药散含药血清后,细胞中 ET-1 的 mRNA 表达水平明显降低,同时细胞培养上清液中 ET-1 的蛋白表达也得到明显

抑制。实验结果提示当归芍药散含药血清可抑制 HSC-T6 细胞合成和自分泌 ET-1。

Rho 的效应分子 ROCK 是肌球蛋白磷酸化的一个重要调节因子。活化的 Rho 将信号传递给 ROCK,使其分子中的多个氨基酸磷酸化而被激活。激活的 ROCK 使肌球蛋白磷酸酶 (myosin phosphatase, MLCP) 磷酸化而失活,失活的 MLCP 不能将 MLC 脱磷酸化,使得胞浆 p-MLC 水平增加,或直接使 MLC 磷酸化^[23-25]。p-MLC 与 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 结合,导致肌球蛋白 ATP 酶被肌动蛋白激活,从而触发肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用,引起细胞的收缩和迁移,诱发门静脉高压^[26]。ROCK 抑制剂 (Y-27632) 是一类人工合成的吡啶类复合物,是近年来研究较为广泛的 ROCK 抑制剂之一,能够有效抑制 ROCK 介导的多种生物效应^[27]。特异性的 Y-27632 可抑制下游 p-MLC 的表达,本实验结果与文献报道相一致^[28]。实验结果提示,ET-1 能够显著上调 HSC-T6 细胞内 p-MLC II, MLC II 蛋白的表达,但这种现象可被当归芍药散含药血清以及 ROCK 抑制剂有效抑制,表明 p-MLC 作为 Rho/Rock 信号通路的信号分子之一参与了肝硬化腹水的进程。

综上所述,当归芍药散含药血清可以抑制 HSCs 中 ET-1 的合成和自分泌;以不同浓度的当归芍药散含药血清和 Y-27632 抑制剂干预 ET-1 诱导的 HSC-T6 细胞,均可下调 p-MLC II, MLC II 蛋白的表达。提示当归芍药散含药血清可能通过下调 ET-1 的含量,抑制 ET-1 的自分泌,从而下调 p-MLC II, MLC II 蛋白表达,使肝门静脉压力降低,延缓肝硬化进程。

[参考文献]

[1] 李文静, 兴桂华, 刘军, 等. 狼毒大戟配伍大枣对诱导肝硬化大鼠的抵抗作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21): 117-123.

[2] Schepis F, Turco L, Bianchini M, et al. Prevention and management of bleeding risk related to invasive procedures in cirrhosis[J]. Semin Liver Dis, 2018, 38(3): 215-229.

[3] Khimji A K, Rokey D C. Endothelin and hepatic wound healing[J]. Pharmacol Res, 2011, 63(6): 512-518.

[4] Rodríguez-Pascual F, Busnadiego O, González-Santamaría J. The profibrotic role of endothelin-1: is the door still open for the treatment of fibrotic diseases[J]. Life Sci, 2014, 118(2): 156-164.

[5] 熊莎, 高建蓉, 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.
- [6] 甘霞, 赵新芳, 林红, 等. 加味赤石脂禹余粮汤对脾肾阳虚证肝硬化腹水患者的影响及疗效分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(6): 172-176.
- [7] JI H, MENG Y, ZHANG X, et al. Aldosterone induction of hepatic stellate cell contraction through activation of RhoA/ROCK-2 signaling pathway [J]. Regul Pept, 2011, 169(1/3): 13-20.
- [8] SHI M, WEI J, MENG W Y, et al. Effects of phased joint intervention on Rho/ROCK expression levels in patients with portal hypertension [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3): 1618-1624.
- [9] 路燕, 宋育林, 季巍巍, 等. 磷酸化肌球蛋白轻链在大鼠非酒精性脂肪性肝纤维化中的表达[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(4): 370-374.
- [10] ZHANG C G, ZHANG B, DENG W S, et al. Role of estrogen receptor β selective agonist in ameliorating portal hypertension in rats with CCl₄-induced liver cirrhosis [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(18): 4484-4500.
- [11] 许钊, 宋欣, 陶春蕾, 等. 当归芍药散对慢性应激抑郁模型大鼠行为及中枢单胺类神经递质的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1824-1826.
- [12] 王成业, 许钊, 王满媛, 等. 当归芍药散对肝硬化腹水大鼠的干预作用研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 871-874.
- [13] 潘永福, 许钊, 王成业, 等. 基于水通道蛋白研究当归芍药散对肝硬化腹水大鼠的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(8): 111-115.
- [14] Sakamoto Y, Sakai M, Watari T. Hepatic and plasma endothelin-1 in dogs with chronic hepatitis [J]. J Vet Intern Med, 2017, 31(3): 764-769.
- [15] Klein S, Rick J, Lehmann J, et al. Janus-kinase-2 relates directly to portal hypertension and to complications in rodent and human cirrhosis [J]. Gut, 2017, 66(1): 145-155.
- [16] 吴惠春, 张斌. 肝星状细胞与抗肝纤维化治疗的研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 15(2): 172-173.
- [17] Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension [J]. J Hepatol, 2010, 53(5): 976-980.
- [18] Kisseleva T, Brenner D A. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(3): S84-S87.
- [19] Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide [J]. Hepatology, 1997, 25(1): 2-5.
- [20] FAN M, SU C, LU L, et al. Ultrasonic diagnosis and vasoactive substances examination in patients with cirrhosis [J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(4): 329-332.
- [21] 张军, 张忠涛. 内皮素对肝星状细胞作用的研究进展(文献综述) [J]. 国外医学: 外科学分册, 2004, 31(2): 100-102.
- [22] Rockey D C, Fouassier L, Chung J J, et al. Cellular localization of endothelin-1 and increased production in liver injury in the rat: potential for autocrine and paracrine effects on stellate cells [J]. Hepatology, 1998, 27(2): 472-480.
- [23] Sward K, Dreja K, Susnjar M, et al. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca²⁺ sensitization of myosin phosphorylation and force. in guinea pig ileum [J]. J Physiol, 2000, 522(1): 33-49.
- [24] Bi D, Nishimura J, Niuro N, et al. Contractile properties of the cultured vascular smooth muscle cells: the crucial role played by rhoA in the regulation of contractility [J]. Circ Res, 2005, 96(8): 890-897.
- [25] Hersch E, HUANG J, Grider J R, et al. Gq/G13 signaling by ET-1 in Smooth muscle: MYPT1 phosphorylation via ETA and CPI-17 dephosphorylation via ETB [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(5): C1209-C1218.
- [26] SONG J, LU Y P, LUO G H, et al. Effects of mycophenolate mofetil on chronic allograft nephropathy by affecting RHO/ROCK signal pathways [J]. Transplant Proc, 2008, 40(8): 2790-2794.
- [27] 毛萧萧, 周正翔, 夏珂, 等. Y-27632 通过抑制 ROCK 通路降低内皮细胞中基质金属蛋白酶 2 和 9 表达 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2016, 41(6): 566-570.
- [28] LIU C, ZUO J, Janssen L J. Regulation of airway smooth muscle Rho/ROCK activities by cholinergic and bronchodilator stimuli [J]. Eur Respir J, 2006, 10(28): 703-711.

[责任编辑 周冰冰]