

研究简讯

丹参酚酸 B 盐对人肝星状细胞内肌细胞增强因子 2 的影响*

张文炜¹ 毛子旭² 徐列明^{1**}

1. 上海中医药大学曙光医院. 肝病研究所, 上海 201203;

2. Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30322-3090, USA

摘要 以分离和培养的人肝星状细胞(H-HSC)为研究对象, 观察 H-HSC 是否表达肌细胞增强因子 2(MEF2)且与转化生长因子 β 1(TGF- β 1)之间的关系, 进一步探讨丹参酚酸 B 盐(SA-B)抗肝纤维化的作用机制, 分离 H-HSC 后, 用 TGF- β 1 刺激培养的 H-HSC, 通过免疫印迹分析及分别转染含有 MEF2 启动子和 I 型胶原启动子的 luciferase 报道基因质粒入 H-HSC, 检测荧光素酶活性, 观察经 SA-B 干预后 MEF2, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)及 I 型胶原表达的变化. 结果显示 H-HSC 能够表达 MEF2, 且随 H-HSC 的活化而增加; 经 TGF- β 1 刺激的 H-HSC 内 α -SMA 的表达、I 型胶原启动子的活性和 I 型胶原蛋白的生成均明显增强, 同时 MEF2 启动子的活性和 MEF2A 和 MEF2C 的蛋白表达也明显增强; SA-B 对以上这些物质的表达均有明显的抑制作用. 上述结果说明 MEF2 参与了肝纤维化的形成, SA-B 抑制 H-HSC 活化的作用与其抑制 TGF- β 1 在 H-HSC 内的信号传导与抑制转录因子 MEF2A 和 MEF2C 的表达有关.

关键词 丹参酚酸 B 盐 肝纤维化 人肝星状细胞 MEF2 TGF- β 1

肝星状细胞(HSC)在肝纤维化形成中具有关键性作用. HSC 由正常静止状态被激活, 转变成肌成纤维细胞样细胞(MFB), 是肝纤维化发生、发展的中心环节. 当肝脏受到各种病因刺激时, HSC 的表型和功能均可发生变化, 如细胞增殖^[1], 胞内 Vit. A 脂滴丢失^[2], 表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)^[3], 细胞形态向 MFB 转化并收缩^[4,5], 大量合成细胞外基质(ECM), 尤其是 I 和 III 型胶原等^[6-8]. 转化生长因子- β 1(TGF- β 1)是最强的促 HSC 活化的细胞因子, 在肝纤维化中起着核心作用^[9], 它不但参与 HSC 转化为 MFB 的调节, 而且

刺激活化的 HSC 合成、分泌大量的 ECM 及 ECM 降解蛋白酶抑制剂, 抑制 ECM 降解蛋白酶的表达, 增加 ECM 的沉积. 因此, 研究阻断 TGF- β 1 对于 HSC 的激活和抗肝纤维化具有重要意义. 肌细胞增强因子 2(MEF2)是一种来源于骨骼的肌管核蛋白, 属于 MADS 家族. 在脊椎动物中有 4 种类型: MEF2A, MEF2B, MEF2C 和 MEF2D. 其主要功能是对多种细胞的存活与分化进行调节. 早期对 MEF2 的研究多局限于肌肉及神经系统, 1995 年, Bedossa 等报道了大鼠肝脏中 MEF2D 的表达^[10]. 后又有实验证实, MEF2 可调节大鼠 HSC 的活化, 促

2007-10-30 收稿, 2007-12-17 收修稿稿

* 国家自然科学基金(批准号: 30271657)、上海市教委重点学科建设项目(批准号: 04CA02)和上海市重点学科建设项目(批准号: Y0302)资助

** 通信作者, E-mail: xulieming@chinatcm.net

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进 HSC 的增殖和周期进程^[11] 并促进 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达. MEF2 有可能是肝纤维化过程中的重要转录因子. 活血化瘀药丹参的有效成分丹参酚酸 B(SA-B)在临床治疗中有明显的抗肝纤维化作用. 为探讨其作用机理, 观察了人 HSC (H-HSC)中 MEF2 的表达及其与 TGF- β 1 活化刺激的相关性, 并观察了由此产生的靶效应, 即 H-HSC 合成 I 型胶原的变化, 以及 H-HSC 内平滑肌肌动蛋白的表达.

1 材料与方 法

SA-B 由中国科学院上海药物研究所从上海市崇明县人工栽培的丹参中分离、提取、鉴定, 纯度为 80%^[12], 水溶性较好, 分子量为 718, 分子式为 C₃₆H₃₀O₁₆. 人肝脏组织从肝移植手术弃肝中相对正常部分(重约 50—100 g)获得. 由上海市第一人民医院、仁济医院(东部)、中山医院消化外科、瑞金医院肝脏移植中心提供. 肝组织用器官保存液保存, 放置于 0℃冰水中.

1.1 人肝星状细胞的培养和鉴定

以链霉蛋白酶(德国 Roche 公司产品)溶液和胶原酶(德国 Serva 公司产品)溶液灌注消化肝脏组织, 通过 Nycodenz(挪威 AXIS-SHIELD 公司产品)密度梯度离心的方法^[13] 进行分离. 具体方法是以含 20%胎牛血清(FCS)的 M199 培养液悬浮细胞, 并将细胞以适宜的浓度接种于直径为 100 或 60 mm 培养皿中, 置于 37℃, 5% CO₂, 95% 潮湿空气的 CO₂ 培养箱中培养. 24 h 后培养液更换为含有 10% FCS 的 M199 培养液, 培养 7 d, 中间换液一次. 7 d 后用胰酶消化, 传代细胞. 以含 10% FCS M199 培养液悬浮并接种细胞, 每 3—5 d 更换一次. 通常从每 50 g 的肝脏组织中分离得到的 H-HSC 得率约为 1×10⁷ 个, 80—100 g 的肝脏组织中 H-HSC 得率约为 2×10⁷ 个. 以 0.4% 台盼蓝染色, 细胞存活率在 98% 以上, 细胞纯度约 80%. 在相差倒置显微镜下对分离出的 H-HSC 进行形态学观察, 并采用细胞免疫荧光染色法, 检测 H-HSC 内骨骼蛋白(desmin), 胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)及 α -SMA 的表达, 对 H-HSC 进行鉴定^[13].

1.2 TGF- β 1 刺激 H-HSC 表达 MEF2

吸弃培养 6 d 的 H-HSC 培养液, 以无血清

M199 洗涤两次, 分空白对照组、TGF- β 1(15 min)组、TGF- β 1(30 min)组、TGF- β 1(1 h)组、TGF- β 1(2 h)组和 TGF- β 1(24 h)组. TGF- β 1 分别于 15 min, 30 min, 1 h, 2 h 和 24 h 各不同时间点加入培养细胞中.

1.3 SA-B 对 MEF2 的作用

吸弃培养 5 d 的 H-HSC 培养液, 以无血清 M199 洗涤两次, 分为对照组、SA-B(10⁻⁵ mol/L)组、(10⁻⁶ mol/L)组和(10⁻⁷ mol/L)组. 分别加入不同浓度的 SA-B, CO₂ 培养箱中温育 48 h.

1.4 SA-B 对 TGF- β 1 刺激的 H-HSC 内 MEF2 和 Col I 启动子的影响

用无血清、无抗生素的 M199 原代培养第 5 天的 HSC. 分为空白对照组、TGF- β 1(美国 R&D systems 公司产品)组、SA-B+TGF- β 1(SA-B+T)组和 SA-B 组. 转染 24 h 后, SA-B+T 组和 SA-B 组分别加入 10⁻⁶ mol/L 的 SA-B, 培养箱中温育 24 h. TGF- β 1 于最后 8 h 加入.

1.5 SA-B 对 TGF- β 1 刺激的 H-HSC 内 MEF2, α -SMA 和 Col I 蛋白的影响

吸弃培养 5 d 的 H-HSC 培养液, 以无血清 M199 洗涤两次, 分为空白对照组、TGF- β 1 组、SA-B+T 组、SA-B 组. 对照组和 TGF- β 1 组分别加入无血清 M199 培养液, SA-B 组和 SA+T 组分别加入 10⁻⁶ mol/L 的 SA-B, 培养箱中温育 48 h, TGF- β 1 于最后 15 min 加入.

1.6 细胞总蛋白和核蛋白的提取、测定

用预冷的 PBS 洗涤 H-HSC 两次, 将细胞收集至 1.5 mL 离心管, 4℃静置, 30 min 后离心, 其上清为细胞总蛋白. 细胞核蛋白提取按照 Sigma 公司 nuclei EZ prep nuclei isolation kit 说明书进行操作. 取上清 5 μ L 与 225 μ L DC Protein Assay Reagent (BIO-RAD 公司产品)混合, 在酶标仪上以 690 nm 波长测定细胞总蛋白和核蛋白含量.

1.7 Western blot 分析细胞 MEF2 蛋白、 α -SMA 和 Col I 蛋白的表达

取 10—20 μ g 细胞蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳, 转移至硝酸纤维素膜上, 分别与兔抗大鼠

MEF2(C-21)抗体(1 : 200, 对 MEF2A 敏感, 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司产品)、兔抗大鼠 MEF2C 抗体(1 : 1500, 美国 Cell Signaling Technology 公司产品)、小鼠抗大鼠 MEF2D 抗体(1 : 1000, 美国 BD Biosciences 公司产品)、小鼠抗大鼠 α -SMA 抗体(美国 Sigma 公司产品)和 Col I 抗体(美国 Sigma 公司产品)孵育, 4 °C 过夜, 洗涤后再加入二抗, 经 ECL 底物化学发光自显影。

1.8 荧光素酶报道基因测定法检测 MEF2 报道基因和 Col I 启动子的活性

MEF2 Luciferase 报道基因质粒 [wt MEF2 结合位点(划线处) TCGACGGGCTATTTT TAG GCC), (mt: 5-TCGACG-GGCGATTTTTCG GGCCG-3), (质粒: 2Xluc)], collagen I(Col I)启动子, 由美国布朗大学肝脏研究中心赠送。

用 MEF2 和 I 型胶原 Luciferase 报道基因质粒转染 H-HSC, 转染 48 h 后, 按照 lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司产品)说明书进行光反应定量检测。

1.9 统计方法

采用 SPSS 11.0 软件, 单因素方差分析, *q* 检验。以上每项实验均重复 3 次。

2 结果

2.1 H-HSC 培养过程中 MEF2 的表达

贴壁培养的 H-HSC 随培养时间的增加逐渐活化, MEF2 蛋白表达也逐渐增强。刚分离出的 H-HSC(0 d, 未贴壁细胞)内 MEF2 表达较弱, 经原代培养 4 d 后, MEF2 的表达明显上调, 到 7 d 时达到高峰。传代后 3 d 和 7 d, 仍维持高水平表达(图 1)。原代培养 7 d 的 H-HSC 为 MEF2 表达的最高峰时间。

2.2 不同浓度 SA-B 对 MEF2 表达的影响

不同浓度的 SA-B (10^{-5} mol/L, 10^{-6} mol/L, 10^{-7} mol/L)对原代培养 7 d 的 H-HSC 内 MEF2A 和 MEF2C 蛋白表达均有明显的抑制作用(图 2)。参照以往实验结果, 选择 10^{-6} mol/L 的 SA-B 作为抑制 MEF2 表达的最佳作用浓度。

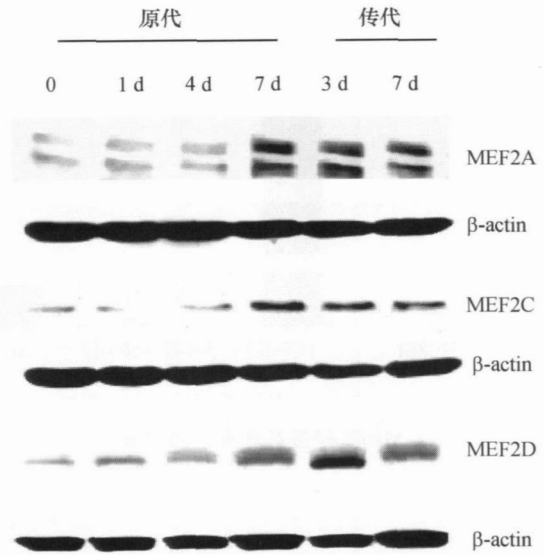


图 1 不同培养时间 H-HSC 内 MEF2 的表达

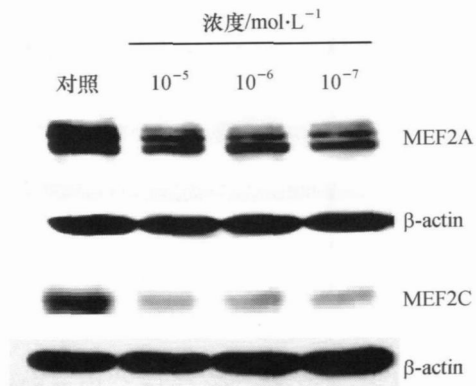


图 2 在不同浓度 SA-B 作用下 H-HSC 内 MEF2 的表达

2.3 SA-B 对 TGF- β 1 刺激的 H-HSC 内 MEF2 表达的影响

用 wt MEF2 报道基因质粒转染原代培养 5 d 的 H-HSC, 48 h 后检测荧光素酶活性。观察到: TGF- β 1 能明显诱导 MEF2 荧光素酶的表达, 与未经刺激的野生对照组相比, MEF2 荧光素酶的表达显著增加; SA-B 对 H-HSC 经 TGF- β 1 刺激后的 MEF2 荧光素酶的表达有明显抑制作用(图 3)。与正常培养的 H-HSC 相比, TGF- β 1 能明显刺激 H-HSC 中 MEF2A 和 MEF2C 的表达, SA-B 对原代培养 7 d 的 H-HSC 和经 TGF- β 1 刺激后的 H-HSC 内 MEF2A 和 MEF2C 的蛋白表达均有明显的抑制作用(图 4)。

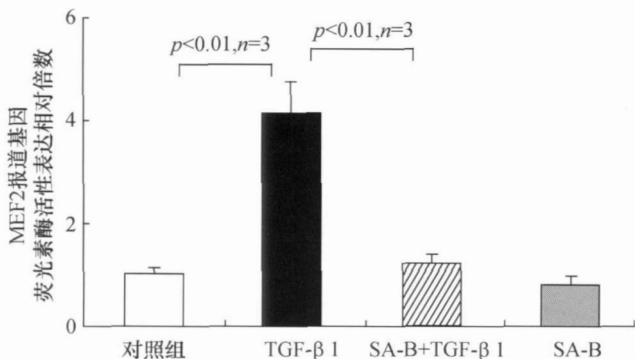


图 3 SA-B 对 TGF-β1 刺激的 H-HSC 内 MEF2 报道基因表达的影响

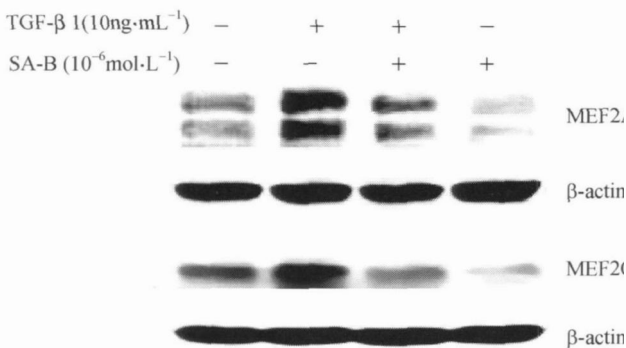


图 4 SA-B 对 TGF-β1 刺激的 H-HSC 内 MEF2 蛋白表达的影响

2.4 SA-B 对 TGF-β1 刺激的 H-HSC 内 α-SMA 蛋白表达的影响

与正常培养的 H-HSC 相比, TGF-β1 能明显刺激 H-HSC 表达 α-SMA, SA-B 对正常培养的 H-HSC 表达 α-SMA 无明显影响, 但能明显抑制经 TGF-β1 刺激后的 H-HSC 内 α-SMA 的表达(图 5)。

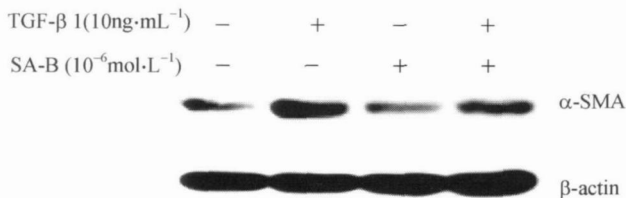


图 5 各组 H-HSC 中 α-SMA 的表达

2.5 SA-B 对 TGF-β1 刺激的 H-HSC 内 Col I 表达的影响

用 Col I 报道基因质粒转染原代培养 5 d 的 H-HSC, 48 h 后检测荧光素酶活性. 结果显示: TGF-β1 能明显诱导 Col I 荧光素酶的表达. 与正常组相比, Col I 荧光素酶的表达增加 3 倍以上; SA-B 显著抑制了经 TGF-β1 刺激后 Col I 荧光素酶的表达, 使之恢复到正常水平(图 6). 经 TGF-β1 刺激后, H-HSC 合成 Col I 的能力增强, 蛋白表达上调. SA-B 对正常培养的 H-HSC 和经 TGF-β1 刺激的 H-HSC 内 Col I 蛋白的合成都有明显抑制作用(图 7)。

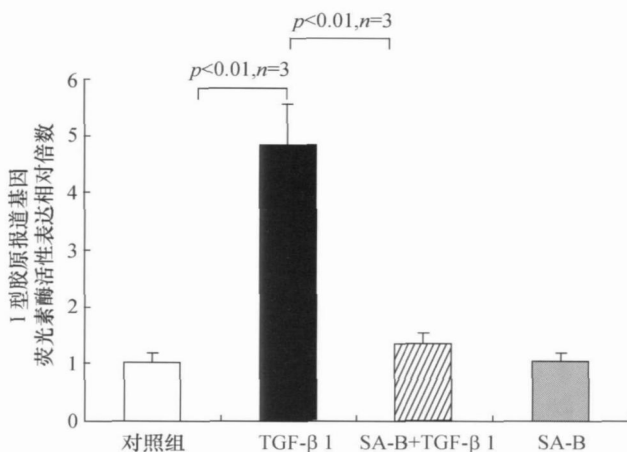


图 6 SA-B 对 TGF-β1 刺激的 H-HSC 内 Col I 报道基因表达的影响

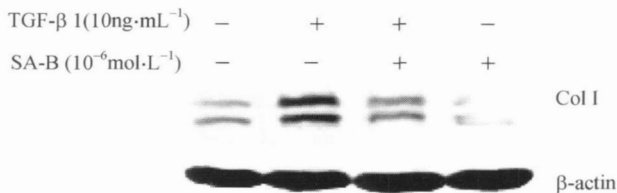


图 7 SA-B 对 TGF-β1 刺激的 H-HSC 内 Col I 蛋白表达的影响

3 讨论

研究发现 MEF2 的蛋白表达随着 H-HSC 的活化而逐步升高. 在肝硬化患者的肝脏中存在着大量已活化和正在活化的 HSC, 这些细胞较多表达 MEF2, 提示 MEF2 很可能参与了人肝纤维化的形

成, 并且与 H-HSC 的活化有关. TGF- β 1 是促肝纤维化形成关键细胞——HSC 活化的最强刺激因子. 实验证实, TGF- β 1 可增强胞核内 MEF2A 和 MEF2C 的蛋白表达, TGF- β 1 刺激 15 min 时, MEF2A 表达最强. 结合文献报道 MEF2 有调节大鼠 HSC 的活化, 促进增殖等作用^[11], 由此认为, MEF2 参与了 TGF- β 1 的信号传导, 是 TGF- β 1 胞内信号传导后在细胞核内的终端因子.

前期研究已表明, SA-B 具有良好的抑制大鼠 HSC 增殖活化和抗肝纤维化的作用. SA-B 能够抑制大鼠 HSC 中周期蛋白的表达及其增殖活化, 减少大鼠 HSC 胶原蛋白的生成^[14]; 抑制活化的大鼠 HSC 自分泌 TGF- β 1^[13]; 抑制大鼠 HSC 中 Smads 通路信号传导^[16]; 抑制正常原代培养活化的大鼠 HSC 和经 TGF- β 1 刺激的大鼠 HSC 内 ERK 信号传导通路; 抑制大鼠 HSC 上 PDGF 受体的表达而抑制 PDGF 在大鼠 HSC 内的信号传导^[17]. 以上述实验结果为基础, 对 SA-B 与 MEF2 之间的相关性进行了研究. 选择原代培养 7 d 的 H-HSC 为 MEF2 最佳表达时点, 10^{-6} mol/L 为 SA-B 的最佳工作浓度, 15 min 为 TGF- β 1 的最佳作用时间, 观察 SA-B 对 TGF- β 1 诱导的 H-HSC 内 MEF2 表达的影响. 结果显示, SA-B 不但能明显抑制正常原代培养 7 d 的 H-HSC 表达 MEF2A 和 MEF2C 核蛋白, 也能抑制经 TGF- β 1 刺激的 H-HSC 内 MEF2A 和 MEF2C 核蛋白的表达. 在正常培养的 H-HSC 内, SA-B 抑制 MEF2A 和 MEF2C 的蛋白表达, 但对 MEF2 启动子依赖的荧光素酶报道基因表达的抑制作用并不显著, 提示 SA-B 抑制正常培养的 H-HSC 表达 MEF2 不是在基因转录水平. 与对正常 H-HSC 的抑制作用不同的是, SA-B 对 TGF- β 1 刺激的 H-HSC 内 MEF2 表达的抑制不仅作用于蛋白水平, 还作用于基因转录水平, 其能明显下调经 TGF- β 1 刺激的 H-HSC 内 MEF2 报道基因的表达(图 3, 4).

HSC 经 TGF- β 1 刺激活化后最明显的靶效应之一是诱导 HSC 大量合成 I 型胶原蛋白. TGF- β 1 能激活 Smads 和 p38 MAPK 信号传导通路, 影响 I 型胶原在神经、骨骼肌和心肌中的表达, p38 MAPK 信号传导通路可对 MEF2 的转录进行调控^[18-20]. 当 p38 发生磷酸化时, 可增强 MEF2 的转录活性. 实验结果表明, 培养 7 d 的 H-HSC 已经

活化, 在基因表达和蛋白表达 2 个水平上都显示能合成 I 型胶原. TGF- β 1 可促进 H-HSC 进一步合成 I 型胶原. 与正常培养的 H-HSC 相比, I 型胶原报道基因的表达和合成的蛋白量均明显增加 2 至 3 倍. SA-B 能明显抑制正常培养的 H-HSC 和经 TGF- β 1 刺激的 H-HSC 内 I 型胶原蛋白的表达, 并能够明显抑制 TGF- β 1 诱导的 H-HSC 内 I 型胶原报道基因的表达. 虽然我们不能证明这些结果都是因为 MEF2 被抑制后才出现的, 但是从 SA-B 能明显抑制 MEF2 的实验结果推断, 实验中 I 型胶原合成的被抑制与 MEF2 的表达受抑制相关.

SA-B 抑制 TGF- β 1 刺激 H-HSC 产生的细胞效应与 SA-B 抑制 MEF2 信号转录有关的支持证据是, SA-B 抑制了 H-HSC 的 α -SMA 的表达. α -SMA 是 HSC 活化的标志之一. 实验结果显示, 培养 7 d 的 H-HSC 细胞蛋白中含有 α -SMA, 经 TGF- β 1 刺激后, H-HSC 中 α -SMA 蛋白量明显增加. SA-B 虽不能抑制正常培养的 H-HSC 表达 α -SMA, 但是其抑制 TGF- β 1 刺激 H-HSC 大量产生 α -SMA 的作用比较显著. 已有报道 MEF2 可显著促进 α -SMA 在大鼠 HSC 的表达, 阻断内源性 MEF2 的表达, α -SMA 的含量可随之显著下降^[11]. 因此 SA-B 抑制 TGF- β 1 刺激的 H-HSC 表达 α -SMA 很可能与 SA-B 抑制 TGF- β 1 刺激的 H-HSC 表达 MEF2 有关. MEF2 参与了肝纤维化的形成, SA-B 抑制 H-HSC 活化的作用与其抑制 TGF- β 1 在 H-HSC 内的信号传导与抑制转录因子 MEF2A 和 MEF2C 的表达有关.

致谢 感谢上海市第一人民医院彭志海、上海市仁济医院东院肝脏移植中心夏强对本课题的大力支持.

参 考 文 献

- 1 Geerts A, Lazou JM, De Bleser P, et al. Tissue distribution, quantitation and proliferation kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride injured rat liver. *Hepatology*, 1991, 13: 1193-1202
- 2 Mak KM, Leo MA, Lieber CS. Alcoholic liver injury in baboons: Transformation of lipocytes to transitional cells. *Gastroenterology*, 1984, 87: 188-200
- 3 Ramadori G, Viet T, Schwogler S, et al. Expression of the gene

- of α -smooth muscle actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1990, 59: 349—357
- 4 Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblast: A key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int*, 1996, 49: 539—545
 - 5 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis: an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*, 2000, 275: 2247—2250
 - 6 Takahama T, Kojima T, Miyabayashi C, et al. Collagen production in fat-storing cells after carbon tetrachloride intoxication in the rat. Immunoelectron microscopic observation of type I, type III collagens and prolyl hydroxylase. *Lab Invest*, 1988, 59: 509—521
 - 7 Maher JJ, Bissell DM, Friedman SL, et al. Collagen measured in primary culture of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer. *J Clin Invest*, 1988, 82: 450—459
 - 8 Maher JJ, McGuire RF. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocyte and endothelial cells during hepatic fibrosis *in vivo*. *J Clin Invest*, 1990, 86: 1641—1648
 - 9 Bedossa P, Paradis V. Transforming growth factor- β (TGF- β): A key role in liver fibrogenesis. *J Hepatol*, 1995, 22: 37—42
 - 10 Ikeshima H, Imai S, Shimoda K, et al. Expression of a MADS box gene, MEF2D, in neurons of the mouse central nervous system: Implication of its binary function in myogenic and neurogenic cell lineages. *Neuroscience Letters*, 1995, 200: 117—120
 - 11 Wang X, Tang X, Gong X, et al. Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2. *Gastroenterology*, 2004, 127: 1174—1188
 - 12 王逸平, 宣利江. 中药现代化的示范性成果——丹参多酚酸盐及其注射用丹参多酚酸盐的研究与开发. *中国科学院院刊*, 2005, 20(5): 377—380
 - 13 张文炜, 徐列明. 人肝星状细胞的分离和培养方法. *中华肝脏病杂志*, 2007, 15(4): 309—311
 - 14 徐列明, 刘成, 刘平. 丹参酚酸B对大鼠传代肝贮脂细胞增殖、形态和合成细胞外基质的影响. *中华肝脏病杂志*, 1996, 4(2): 86—89
 - 15 王海南, 胡义扬, 洪嘉禾, 等. 丹参酚酸B盐对肝星状细胞增殖与TGF- β 1信号转导的影响. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10(5): 382—383
 - 16 刘成海, 刘平, 胡义扬, 等. 丹参酚酸B盐对转化生长因子- β 1刺激肝星状细胞活化与胞内信号转导的作用. *中华医学杂志*, 2002, 82: 1267—1272
 - 17 薛冬英, 洪嘉禾, 徐列明. 丹参酚酸B对大鼠肝星状细胞中丝裂原激活的蛋白激酶通路的抑制作用. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12: 471—474
 - 18 Illi b, Scopece A, Nanni S, et al. Epigenetic histone modification and cardiovascular lineage programming in mouse embryonic stem cells exposed to laminar shear stress. *Circ Res*, 2005, 96: 501—508
 - 19 Ju JS, Smith JL, Oppelt PJ, et al. Creatine feeding increases GLUT4 expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288: E347—352
 - 20 Phiel CJ, Gabbeta V, Parsons LM, et al. Differential binding of an SRF/NK-2/MEF2 transcription factor complex in normal versus neoplastic smooth muscle tissues. *J Biol Chem*, 2001, 276: 34637—34650