文章编号:1000-5404(2010)20-2197-04

论著

p38MAPK信号通路对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响

叶 平[1,2],杨 波[1],唐 文[1],卓 强[3],郑人源[3],蒋明德[1] (610083 成都,成都军区总医院消化内科[1];400038 重庆,第三军医大学研究生管理大队[2];610083 成都,成都医学院门诊部[3])

【摘要】 目的 观察用特异性p38丝裂原活化蛋白激酶抑制剂SB203580阻断p38MAPK信号通路对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)增殖、凋亡及细胞周期的影响。**方法** 体外培养大鼠HSC株,用SB203580(浓度为5、10、20 μmol/L)对乙醛(浓度200 μmol/L)刺激的大鼠HSC进行干预,分别以酶标仪及流式细胞仪检测HSC增殖、凋亡及周期的变化。**结果** 不同浓度SB203580对HSC增殖有抑制作用,增殖抑制率分别为21.6%、27.0%、31.5%,与乙醛对照组有显著差异($P<0.05$),且呈剂量效应关系;对HSC凋亡有促进作用,凋亡率分别为(13.7±0.3)%、(14.9±0.2)%、(16.1±0.2)%,凋亡率逐渐增加,与乙醛对照组有显著差异($P<0.05$),且呈剂量效应关系;可以明显阻滞乙醛刺激的HSC由G_1期进入S期,G_1/G_0期细胞比例逐渐增高[(29.1±1.9)%、(35.5±3.4)%、(46.0±2.6)%],S期细胞比例逐渐降低[(53.4±2.6)%、(48.4±3.6)%、(43.8±1.1)%],与乙醛对照组有显著差异($P<0.05$),呈剂量效应关系。**结论** SB203580特异性阻断p38MAPK信号通路后,乙醛刺激的HSC增殖受到抑制,凋亡得到促进,细胞周期由G_1期进入S期受到阻滞。

【关键词】 p38MAPK;肝星状细胞;乙醛;细胞增殖;细胞凋亡;细胞周期
【中图法分类号】 R322.47;R329.28;R363.13 **【文献标志码】** A

p38MAPK signal pathway modulates proliferation, apoptosis and cell cycle of rat hepatic stellate cells stimulated by acetaldehyde

Ye Ping[1,2], Yang Bo[1], Tang Wen[1], Zhuo Qiang[3], Zheng Renyuan[3], Jiang Mingde[1] ([1]Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command, ChengDu, Sichuan Province, 610083; [3] Department of Outpatients, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of blocking p38MAPK by its specific blocker, SB203580, on the proliferation, apoptosis and cell cycle of rat hepatic stellate cells (HSCs). Methods Rat HSCs stimulated by acetaldehyde (200 μmol/L) were incubated with SB203580 at concentrations of 5, 10 and 20 μmol/L respectively. Cellular proliferation inhibition rate (CPIR) were analyzed by MTT assay, and the changes of apoptotic rate and cell cycle were analyzed by flow cytometry. Results Compared with acetaldehyde control group, SB203580 at different concentrations inhibited the proliferation of HSC significantly and the CPIR was 21.6%, 27.0% and 31.5% respectively ($P<0.05$). SB203580 also promoted the apoptosis of HSC significantly with the apoptotic rate of (13.7±0.3)%, (14.9±0.2)%, and (16.1±0.2)% respectively ($P<0.05$). And the cell percentage of G_1/G_0 was significantly increased by (29.1±1.9)%, (35.5±3.4)% and (46.0±2.6)% respectively ($P<0.05$), while, cell percentage of S was significantly decreased by (53.4±2.6)%, (48.4±3.6)% and (43.8±1.1)% ($P<0.05$). Conclusion After p38MAPK is blocked by SB203580 specifically in HSC stimulated by acetaldehyde, cell proliferation is inhibited but apoptosis promoted, and the cell cycle from G_1 to S is arrested.

【Key words】 p38MAPK; hepatic stellate cells; acetaldehyde; cell proliferation; apoptosis; cell cycle

Supported by the Project of Department of Health of Sichuan Province (06006). Corresponding author: Jiang Mingde, Tel: 86-28-86570346, E-mail: jiangmd88@yahoo.com.cn

【基金项目】 四川省卫生厅课题(06006)
【通信作者】 蒋明德,电话:(028)86570346,E-mail:jiangmd88@yahoo.com.cn

酒精性肝病(alcoholic liver disease,ALD)是长期过量饮酒导致的一类肝脏疾病。有调查显示其发病率为4.34%,且有16%演变为酒精性肝硬化(alcoholic cirrhosis,AC),表现为肝脏炎症及进行性肝组织纤维化,是长期酗酒患者死亡的主要原因[1]。而目前的研究结果认为:肝星形细胞(hepatic stellate cell,HSC)在肝纤维化形成过程中居核心地位[2,3],它的激活、增殖并合成、分泌细胞外基质等多种物质,使细胞外基质(extracellular matrix,ECM)合成与降解失衡,在肝内过度沉积,肝脏结构改变,从而导致肝纤维化[4,5]。近年来,肝纤维化中HSC信号转导一直是研究热点,其中丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)级联是细胞内重要的信号转导系统之一,将细胞外刺激信号传递到细胞核引起一系列细胞生物学反应[6],主要包括:细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase,ERK)通路、p38MAPK通路、c-jun氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase,JNK)通路等。p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPK)通路是MAPK介导信号通路的重要分支,参与炎症、增殖、凋亡等多种生理过程[7],本实验以SB20380特异性阻断p38MAPK信号通路,观察其对乙醛刺激的HSC增殖、凋亡及细胞周期的影响,以期为酒精性肝病的防治寻找新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠HSC株(美国Greenwel教授建立,其表型为活化的肝星状细胞,四川大学生物治疗国家重点实验室杨金亮教授惠赠),标准型细胞培养用小牛血清(上海纬群生物技术有限公司),乙醛(成都化学试剂公司),DMEM培养基(Gibco公司),D-Hanks溶液(BoMei公司),胰蛋白酶(Amresco公司),DMSO(Amresco公司),HEPES(Amresco公司),SB203580(NEB公司),Thermo multiskan MK3型酶标仪,美国Beckman-Coulter XL4型流式细胞仪,美国Beckman-Coulter DLX型高速离心机。

1.2 方法

1.2.1 HSC培养及实验分组 培养箱设定为37 ℃,含50 ml/L CO_2的混合气体,培养基选用含150 ml/L小牛血清的DMEM/IMDM(1∶1)培养基,培养基中添加适量的HEPES和抗生素(1×10^5 U/L青霉素和200 mg/L链霉素)。每2~3天为细胞换液1次,4~5 d传代,传代前用2.5 g/L胰酶消化。实验分为空白对照组(A组):加无血清的DMEM/IMDM(1∶1)培养液;乙醛对照组(B组):无血清培养液中加乙醛20 μl(浓度为200 μmol/L);实验C、D、E组:在B组基础上培养液中加入SB203580(终浓度分别为5、10、20 μmol/L)。

1.2.2 MTT实验检测细胞增殖 在无菌96孔细胞培养板中接种传代的HSC,每组4复孔,调整细胞浓度为1×10^5/ml,每孔加入200 μl细胞悬液。当HSC生长至80%以上融合度时,用0.04%血清培养基同步化处理24 h。实验组经SB203580(5、10、20 μmol/L)预处理1 h后加20 μl乙醛(浓度200 μmol/L),然后在CO_2培养箱中继续孵育24 h后,期间每隔12 h补充乙醛1次。在实验组每孔均加入5 mg/ml的MTT 20 μl,反应4 h后用快速翻板法弃除培养液,并加200 μl DMSO,反应30 min后用Thermo multiskan MK3型酶标仪测定570 nm波长处光密度值[D(570)],设定参考波长为630 nm,以便消除非特异性光吸收效应。酶标仪所示光密度值为D(570)-D(630),细胞增殖抑制率(IR)换算公式为IR=(1-T/C)×100%,其中T为SB203580处理孔光密度值,C为乙醛对照孔光密度值。

1.2.3 流式细胞仪分析细胞凋亡率及细胞周期 采用PI染色法流式细胞仪分析细胞凋亡率及检测细胞周期。将传代的肝星状细胞(HSC)接种于无菌6孔培养板中,每组4复孔。在细胞生长至80%以上的融合度后,弃去原培养基,换含有0.04%血清的培养液同步化处理24 h。然后按照实验分组加入乙醛和SB203580,加样后的各组细胞继续在CO_2培养箱中培养24 h后开始取样,期间每隔12 h补充乙醛1次。取样方法:先用250 mg/L的胰酶和0.02%的EDTA消化细胞,持续吹打使其分散,然后用PBS离心(1 000 r/min离心5 min)洗涤2次,调节每个样品细胞数大约为2×10^6/L,然后用微量移液器通过350目尼龙网注入700 ml/L冷乙醇中,在4 ℃条件的冰箱中固定12 h。测定前离心弃去乙醇,并用PBS洗涤2遍,加入RNase A至终浓度为50 mg/ml,37 ℃水浴1 h,冰浴终止消化。加入PI染色液1 ml,4 ℃避光染色30 min,打开美国BECKMAN-COULTER XL4流式细胞仪,进入DOS采集界面,打开仪器内设PI-DNA采集软件,开始测定。

1.3 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件进行统计学分析。数据用$\bar{x}\pm s$表示。5组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验。

2 结果

2.1 SB203580对乙醛刺激的HSC增殖的影响

如表1所示,培养的肝星状细胞(HSC)加入乙醛干预后,细胞较空白对照组明显增殖($P<0.05$);当加入5、10、20 μmol/L的SB203580特异性阻断p38MAPK信号通路后,细胞增殖受到明显抑制,且呈剂量效应关系,说明SB203580特异性阻断p38MAPK信号通路可以抑制HSC增殖。实验E组肝HSC的增殖仍高于空白对照组,提示20 μmol/L的SB203580特异性阻断p38MAPK信号通路仍然不能够完全抑制乙醛刺激引起的HSC增殖。

表1 SB203580对乙醛刺激的HSC增殖的影响($n=4,\bar{x}\pm s$)

组别	SB203580 (μmol/L)	光密度值	增殖抑制率(%)
空白对照组		0.73±0.02	
乙醛对照组		1.11±0.02[a]	
实验C组	5	0.87±0.03[ab]	21.6
实验D组	10	0.81±0.03[ab]	27.0
实验E组	20	0.76±0.01[ab]	31.5

a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与乙醛对照组比较

2.2 SB203580 对乙醛刺激的 HSC 凋亡的影响

如表 2 所示，乙醛对照组经乙醛活化后，凋亡细胞比例为 11.6%，较空白对照组明显增高（$P<0.05$）。经 SB203580（浓度为 5、10、20 μmol/L）处理后，凋亡率较乙醛对照组有明显增高（$P<0.05$），且随着 SB203580 浓度的增加，凋亡率逐渐增加。说明 SB203580 特异性阻断 p38MAPK 信号通路可以促进肝星状细胞（HSC）的凋亡。

表 2 SB203580 对乙醛刺激的 HSC 凋亡的影响 [$n=4$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	SB203580（μmol/L）	凋亡率
空白对照组		5.7±0.3
乙醛对照组		11.6±0.4[a]
实验 C 组	5	13.7±0.3[ab]
实验 D 组	10	14.9±0.2[abc]
实验 E 组	20	16.1±0.2[abcd]

a：$P<0.05$，与空白组比较；b：$P<0.05$，与乙醛对照组比较；c：$P<0.05$，与实验 C 组比较；d：$P<0.05$，与实验 D 组比较

2.3 SB203580 对乙醛刺激的 HSC 周期的影响

如表 3 所示，乙醛对照组经乙醛活化后，与空白对照组比较，G_1/G_0期细胞比例显著减少，S 期、G_2/M 期细胞比例显著增加（$P<0.05$）。SB203580 特异性阻断 p38MAPK 信号通路后，随着 SB203580 剂量的增大，G_1/G_0期细胞比例逐渐增高，S 期细胞比例逐渐降低，与乙醛对照组有显著差异（$P<0.05$）；G_2/M期细胞比例，实验 E 组与乙醛对照组有显著差异（$P<0.05$），实验 C 组、D 组与乙醛对照组无显著差异（$P>0.05$）。提示 SB203580 特异性阻断 p38MAPK 信号通路后可以明显阻滞乙醛刺激的 HSC 由 G_1 期进入 S 期，且呈剂量效应关系；而对 G_2/M 期细胞比例的影响无统计学意义（$P>0.05$）。

表 3 SB203580 对乙醛刺激的 HSC 细胞周期的影响 [$n=4$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	SB203580（μmol/L）	G_0/G_1	S	G_2/M
空白对照组		53.0±4.4	33.7±3.5	13.4±1.1
乙醛对照组		22.8±1.8[a]	58.4±2.1[a]	18.9±0.8[a]
实验 C 组	5	29.1±1.9[ab]	53.4±2.6[ab]	17.5±0.6[a]
实验 D 组	10	35.5±3.4[ab]	48.4±3.6[ab]	16.2±0.5[a]
实验 E 组	20	46.0±2.6[ab]	43.8±1.1[ab]	10.4±3.5[ab]

a：$P<0.05$，与空白对照组比较；b：$P<0.05$，与乙醛对照组比较

3 讨论

目前认为 HSC 是肝纤维化的主要效应细胞[8]，肝纤维化发生的中心事件是由于各种慢性肝损伤引起 HSC 的激活并转化为肌成纤维细胞，从而使得大量合成的各种 ECM 沉积于肝脏[9]，当损伤因素去除后，以 ECM 大量堆积和 HSC 广泛激活并大量增生为特征的肝纤维化可以逆转至正常，表现为激活的 HSC 数量明显减少，纤维胶原降解，肝组织结构恢复正常[10]。鉴于 HSC 在肝纤维化发病机制中的主导作用，抗纤维化研究通常以 HSC 为靶标，通过抑制炎症反应，对抗氧化应激，调节相关细胞因子的活性，干扰细胞信号通路等途径干预 HSC，抑制其增殖，诱导凋亡，以期达到促使肝纤维化逆转的目的。在信号通路研究中，MAPK 是近年研究的热点，主要包括了细胞外信号调节激酶（ERK）通路、p38MAPK 信号通路、c-jun 氨基末端激酶通路等。蒋明德等[11,12]研究表明 ERK、JNK 通路的活化对乙醛刺激的 HSC 活化、增殖及胶原的分泌有明显的促进作用，特异性阻断后可以诱导 HSC 凋亡增加。

在 p38MAPK 信号通路干预 HSC 的增殖、凋亡研究方面，Schnabl 等[13]利用从 SD 大鼠分离的 HSC 分别用表达 TAK1 的腺病毒载体、JNK 的特异性阻断剂 SP600125 阻断 JNK 通路，p38MAPK 的特异性阻断剂 SB203580 阻断 p38MAPK 信号通路，发现阻断 p38MAPK 可减少 α1（Ⅰ）型胶原 mRNA 的表达，但促进 HSC 的增殖。本实验中，仅使用 p38MAPK 的特异性阻断剂 SB203580 阻断 p38MAPK 信号通路，MTT 实验结果提示特异性阻断 p38MAPK 信号通路可以抑制乙醛刺激的 HSC 增殖，且随着 SB203580 剂量的增大，增殖抑制率不断升高，存在剂量效应关系；流式细胞术检测 HSC 凋亡率也发现，特异性阻断 p38MAPK 信号通路可以促进乙醛刺激的 HSC 凋亡率不断升高，存在剂量效应关系。

在 p38MAPK 信号通路影响细胞周期的研究方面，最早发现 p38MAPK 可能参与细胞周期的调控是在酵母中观察到 p38α 的高表达可以显著抑制酵母的增殖[14]。细胞周期中存在的两个重要的调控点和 G_1/S 期和 G_2/M 期两个期调控点。近年来对细胞周期的研究结果表明真核细胞周期调控基本都是在各期的控制点上进行的。多种细胞株内 p38MAPKs 均可以阻滞细胞通过 G_1/S 检验点，继而抑制细胞增殖[15]。本结果提示，乙醛刺激后，S 期细胞比例明显增高，G_1/G_0期细胞比例明显降低，且有显著差异（$P<0.05$）。使用特异性阻断剂 SB203580 阻断 p38MAPK 信号通路可以明显阻滞乙醛刺激的 HSC 由 G_1期进入 S 期，且随着剂量的增大，G_1/G_0期细胞比例逐渐增高，S 期细胞比例逐渐降低，存在明显的剂量效应关系，提示特异性阻断 p38MAPK 信号通路影响细胞周期主要作用于 HSC 由 G_1向 S 期过渡的调控点，使 G_1期细胞进入 S 期发生阻滞，抑制细胞增殖，但其具体分子作用机制尚需进一步研究。

值得关注的是，本研究结果提示阻断 p38MAPK 信号通路取得了与阻断 ERK、JNK 通路类似的实验结果，可以明显抑制乙醛刺激的 HSC 增殖，促进其凋亡，且与阻断程度呈正相关，与 Schnabl 等[13]研究结果有出入，推测主要原因可能如下：MAPK 介导信号通路有 ERK 通路、p38MAPK 信号通路、c-Jun 氨基末端激酶通路等分支，Schnabl 等[13]同时运用 JNK 的特异性阻断剂 SP600125 阻断 JNK 通路，p38MAPK 的特异性阻断

剂SB203580阻断p38MAPK信号通路，而本实验仅用SB203580阻断p38MAPK信号通路，是否由于是MAPK信号通路各分支间存在协同或干扰效应，p38MAPK信号通路可能与细胞内其他的信号通路产生交叉，从而使作用机制更趋复杂[16]。其具体机制尚需进一步研究。

参考文献：

[1] 孙云凡，王皓晨，秦成坤，等. 酒精性肝硬化的研究进展[J]. 中国现代普通外科进展，2009，12(10)：884－885.

[2] Gressner A M，Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med，2006，10(1)：76－99.

[3] Sato M，Suzuki S，Senoo H. Hepatic stellate cells：unique characteristics in cell biology and phenotype[J]. Cell Struct Funct，2003，28(2)：105－112.

[4] Wells R G. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis[J]. Clin Liver Dis，2008，12：759－768，viii.

[5] Tsukada S，Parsons C J，Rippe R A. Mechanisms of liver fibrosis[J]. Clin Chim Acta，2006，364(1/2)：33－60.

[6] Wen J，Watanabe K，Ma M，*et al*. Edaravone inhibits JNK-c-Jun pathway and restores anti-oxidative defense after ischemia-reperfusion injury in aged rats[J]. Biol Pharm Bull，2006，29(4)：713－718.

[7] 王国军，刘亚伟，李玉花，等. p38丝裂原活化蛋白激酶抑制剂研究进展[J]. 生物技术通讯，2009，20(3)：399－403.

[8] Friedman S L. Hepatic fibrosis—overview[J]. Toxicology，2008，254(3)：120－129.

[9] 余静，姚立. 肝星状细胞(HSC)凋亡机制研究进展[J]. 亚太传统医药，2009，5(10)：138－141.

[10] 蒋明德. 肝纤维化发生中的MAPK信号传导通路[J]. 第四军医大学学报，2005，26(8)：766－767.

[11] 蒋明德，钟显飞，马洪德，等. JNK信号通路在乙醛刺激的肝星状细胞凋亡中的作用[J]. 第四军医大学学报，2005，26(10)：915－918.

[12] 蒋明德，马洪德，钟显飞，等. 细胞外信号调节激酶信号通路对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞周期的影响[J]. 中华肝脏病杂志，2003，11(11)：650－653.

[13] Schnabl B，Bradham C A，Bennett B L，*et al*. TAK1/JNK and p38 have opposite effects on rat hepatic stellate cells[J]. Hepatology，2001，34(5)：953－963.

[14] 陈奕，缪泽鸿，丁健. p38 MAPKs在细胞周期调控中的作用[J]. 生理科学进展，2004，35(4)：315－320.

[15] 崔云华，王晓玲，刘晴，等. 丹参酸乙的抗氧化作用对大鼠肝星状细胞增生的影响[J]. 世界华人消化杂志，2002，10(3)：317－319.

[16] 马超，马红. p38丝裂原活化蛋白激酶信号通路与肝星状细胞[J]. 世界华人消化志，2009，17(1)：68－73.

(收稿：2010-06-01 修回：2010-06-11)

(编辑　汪勤俭)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2010)20-2200-01

类似间质性肺病的肺硬化性血管瘤1例

彭　丽[1]，郭述良[1]，王　璞[1]，葛明建[2]，杨　丹[1]　(400016 重庆，重庆医科大学附属第一医院：呼吸科[1]，胸外科[2])

【关键词】 硬化性血管瘤；间质性肺病；诊断

【中图法分类号】 R734.2　【文献标志码】 B

肺硬化性血管瘤(pulmonary sclerosing haemangiomas，PSH)是一种至今不能肯定其组织来源的少见肿瘤，发病率低，国内外尚无大样本研究报道。国内报道病例均以肺部结节影就诊，本例以罕见的双肺弥漫性间质改变为表现，现报告如下。

1　临床资料

患者，男性，53岁，因“喘累1年，加重伴间断发热1个月”于2009年12月30日入院。既往体健，吸烟史30年，20支/d，否认家族遗传病史。患者1年前因受凉后出现咳嗽，喘累，活动后明显，曾给予抗感染治疗，病情稍有好转，但病情反复发生。8个月前，行胸部CT检查以及纤维支气管镜检查，考虑“间质性肺病”，服用强的松4个月，症状无明显缓解而停药。1个月前，喘累明显加重，伴盗汗，发热，胸部CT检查示“左肺上叶后段以及双肺下叶渗出、增殖、纤维化病灶”。当地医院血常规检查：WBC 19.2×10^9/L，给予抗感染治疗但效果不佳。行纤维支气管镜检查见支气管黏膜充血明显，抗酸杆菌和癌细胞检查均为阴性。后转入本科。入院诊断考虑：间质性肺病？肺结核？肺部感染。入院时查体：温度36.8 ℃，心率102/min，呼吸22/min，血压106/64 mmHg，正力体型，呼吸稍促；全身浅表淋巴结未扪及肿大，全身皮肤未见皮疹，皮下未触及结节；双下肺闻及较多爆裂音，心界正常大小，心率齐，未闻及病理性杂音，腹软，肝脾肋下未触及，全身各关节无肿胀压痛，双下肢无水肿。2010年1月5日胸部CT示：双肺血管支气管束增多、增粗，双肺可见条索影，尤以下叶内后基底段显著，内夹杂小圆形透光区，考虑双肺间质性肺炎。血气分析：pH值7.481，$p(CO_2)$ 39.2 mmHg，$p(O_2)$ 69 mmHg，BE 6 mmol/L，HCO_3^- 29.2 mmol/L，SaO_2 95%，提示低氧血症。血常规：WBC 32.41×10^9/L，RBC 3.38×10^{12}/L，Hb 126 g/L，PLT 511×10^9/L，Neu% 93.6%，Lym% 4.20%。肝功能ALB 28 g/L，酶谱未见异常；肾功能：尿素氮为8.9 mmol/L，肌酐为58 mmol/L。肿瘤相关抗原：神经元特异性烯醇化酶(NSE) 20.2 ng/ml，略升高，余正常。二便常规

(下转2210页)

【基金项目】 重庆市卫生局科学技术研究基金重点项目(2008-1-1)

【通信作者】 郭述良，E-mail：GUOSL999@sina.com