文章编号:1000-5404(2012)04-0303-04

论著

维生素C和E对瘦素诱导的肝星状细胞增殖与TIMP-1上调的抑制作用

李俊峰[1],赵正斌[1],岳 伟[1],张立婷[1],程小龙[2],陈 红[1] (730000 兰州,兰州大学第一医院感染科[1];730080 兰州,兰州窑街煤电集团有限公司总医院感染科[2])

[摘要] **目的** 观察维生素C和E对瘦素诱导肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)的增殖及组织抑制基质金属蛋白酶-1(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1,TIMP-1)上调的影响。**方法** 培养人HSC,按照分组加入瘦素和(或)不同浓度的维生素C和E。磺基罗丹明B法检测HSC增殖,活性氧(ROS)检测探针2,7-二氯二氢荧光素二乙酯检测ROS,酶联免疫吸附实验测定TIMP-1的浓度。**结果** 维生素C为100、200、400 μmol/L时抑制瘦素诱导的HSC增殖效果和瘦素组比较差异有统计学意义($P<0.05$),维生素E为80、160、320 μmol/L时与溶媒瘦素组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。最高浓度联合后,抑制瘦素诱导的HSC增殖效果更明显($P<0.05$)。同时上述浓度均能抑制瘦素诱导的ROS产生($P<0.05$),抑制瘦素诱导的TIMP-1产生($P<0.05$),最高浓度联合组抑制TIMP-1效果较单独用药时明显($P<0.05$)。**结论** 抗氧化剂维生素E和C可能通过抑制瘦素诱导的氧化应激,抑制HSC增殖以及TIMP-1的产生。

[关键词] 维生素C;维生素E;瘦素;肝星状细胞;细胞增殖;组织抑制基质金属蛋白酶-1
[中图法分类号] R322.47;R329.26;R977.2 [文献标志码] A

Vitamins C and E suppress leptin-induced proliferation and TIMP-1 upregulation in hepatic stellate cells

Li Junfeng[1], Zhao Zhengbin[1], Yue Wei[1], Zhang Liting[1], Cheng Xiaolong[2], Chen Hong[1] ([1]Department of Infectious Diseases, First Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [2]Department of Infectious Diseases, General Hospital of Lanzhou Yaojie Coal Group Co. Ltd., Lanzhou, Gansu Province, 730080, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of vitamins E and C on the proliferation and increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in hepatic stellate cells (HSCs) induced by leptin. Methods Human HSCs were cultured, and then treated in precent or absent of leptin and/or vitamin C and E at different concentrations. Sulforhodamine B assay was performed to test proliferation of HSCs, the detection probe of reactive oxygen species (ROS) 2, 7-dichlorfluorescein-diacetate was used to detect ROS, and enzyme-linked immunosorbent assay was to detect concentration of TIMP-1. Results Vitamin C at concentrations of 100, 200 and 400 μmol/L resulted in statistical inhibition of proliferation of HSC induced by leptin compared with leptin group ($P<0.05$), so did vitamin E at concentrations of 80, 160 and 320 μmol/L ($P<0.05$). Combined the 2 agents at the highest concentrations had more inhibitory effect on HSC proliferation induced by leptin than they used alone ($P<0.05$). At the same time, all the concentration groups resulted in significant inhibition in ROS and TIMP-1 productions induced by leptin ($P<0.05$). Compared with single group, the highest concentrations combined group had more inhibitory effect in ROS and TIMP-1 productions ($P<0.05$). Conclusion Anti-oxidant vitamins E and C may inhibit the proliferation and TIMP-1 production of HSCs by inhibiting oxidative stress induced by leptin.

[**Key words**] vitamin C; vitamin E; leptin; hepatic stellate cells; cell proliferation; tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1

Supported by the "Eleventh Five-year Plan" of National Key Technology Program (2008ZX10002-013). Corresponding author: Chen Hong, Tel: 86-931-8625200, E-mail: chenhong1956@126.com

肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)的活化是肝纤维化发生、发展的细胞学基础。激活的HSC大量增殖以及产生过多的组织抑制基质金属蛋白酶-1

[基金项目] "十一五"国家科技重大专项(2008ZX10002-013)
[通信作者] 陈 红,电话:(0931)8625200,E-mail:chenhong1956@126.com

(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1,TIMP-1),引起胶原的沉积与降解失衡,导致肝脏内瘢痕组织的形成[1-2]。瘦素在肝纤维化中可导致氧化应激,进而致使HSC增殖和TIMP-1产生增加[3-5],最终可促使肝纤维化发展。维生素E和C具有明显的抗氧化活性,本研究旨在观察两者对瘦素诱导的氧化应激导致HSC增殖和TIMP-1上调的影响以及可能的机制,进而为肝纤维化治疗寻找理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料及主要仪器

人HSC细胞株LX2由美国西奈山医学院Friedman教授惠赠。重组人瘦素(Peprotech公司),维生素E和C(Sigma公司),DMEM(Invitrogen公司),胎牛血清(民海生物工程有限公司),磺酰罗丹明B(sulforhodamine B,SRB)染料(Sigma公司),2,7-二氯二氢荧光素二乙酯(2,7-Dichlorofluorescein diacetate,DCFDA)(Sigma公司),荧光倒置显微镜(Olympus公司),TIMP-1酶联免疫试剂盒(RD公司),酶标仪(Bio-Rad公司)。

1.2 细胞培养及处理

用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养HSC-LX2。置于37 ℃、5% CO_2的细胞培养箱中,隔天换液。待细胞长满后用0.25%胰蛋白酶消化传代,试验用对数生长期细胞。维生素C分为空白对照组:单独DMEM处理;瘦素组:加入75 ng/ml瘦素[5]和DMEM共同处理;药物组:瘦素组基础上加入终浓度100、200、400 μmol/L维生素C处理。维生素E分为溶媒对照组:0.1%的无水乙醇和DMEM处理;溶媒瘦素组:0.1%无水乙醇、DMEM和75 ng/ml瘦素共同处理;药物组:溶媒瘦素组基础上加入终浓度80、160、320 μmol/L维生素E处理。维生素E 320 μmol/L+维生素C 400 μmol/L组:溶媒瘦素组基础上加入终浓度320 μmol/L维生素E和400 μmol/L维生素C。

1.3 SRB法检测HSC的增殖

将LX2细胞以每孔10^4个细胞接种至96孔板中。细胞贴壁后,用无血清DMEM培养20 h,按照实验分组加药,每组设6个平行孔。继续孵育24 h后,每孔加入10%三氯醋酸100 ml置4 ℃冰箱1 h,清洗干燥后每孔加入100 ml SRB染液染色30 min。1%醋酸洗涤后用10 mmol/L非缓冲Tris碱液150 ml溶解,用酶标仪测定各孔光吸收值[D(570)]。抑制率=(瘦素组-药物组)/瘦素组×100%。

1.4 DCFDA探针检测活性氧(ROS)

将LX2细胞接种至6孔板中。细胞贴壁后,按分组加入药物处理1 h。然后用D-Hanks液洗3次,避光条件下加入DCFDA(10 mmol/L)染色30 min。在荧光倒置显微镜下,用蓝光激发荧光,对结果进行拍照,每孔至少照5张照片,用Image图像分析软件统计荧光强度。

1.5 ELISA测定TIMP-1的浓度

对数生长期LX2细胞按照实验分组分别加药,孵育24 h,取细胞培养基以1 000×g离心20 min,按照试剂盒操作方法进行检测TIMP-1的浓度。

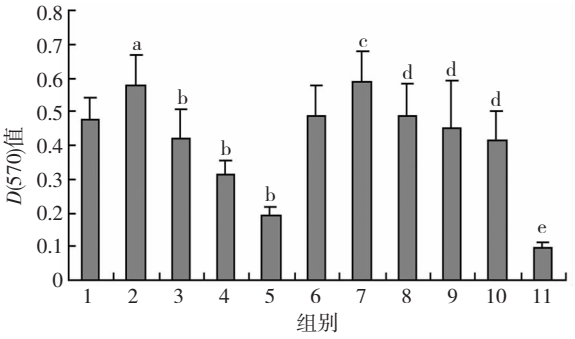
1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 维生素C和E对瘦素诱导的HSC增殖的影响

瘦素组与空白对照组之间、溶媒瘦素组和溶媒对照组之间吸光度值差异具有显著性($P<0.05$),瘦素能够诱导HSC增殖。维生素C浓度100、200、400 μmol/L组与瘦素组比较能抑制瘦素诱导的HSC增殖($P<0.05$),且抑制效果呈明显剂量依赖效应,各浓度组之间差异具有统计学意义($P<0.05$),抑制率分别达27.0%、45.1%、66.5%。维生素E浓度80、160、320 μmol/L组与溶媒瘦素组比较抑制效果差异具有统计学意义($P<0.05$)。各浓度组之间比较差异无统计学意义,抑制率分别为17.8%、23.2%、29.2%。而将抑制率最大的400 μmol/L维生素C和320 μmol/L维生素E联合后,与其单独用药组相比较,抑制瘦素诱导的HSC增殖效果更明显($P<0.05$),见图1。



1:空白对照组;2:瘦素组;3:维生素C 100 μmol/L组;4:维生素C 200 μmol/L组;5:维生素C 400 μmol/L组;6:溶媒对照组;7:溶媒瘦素组;8:维生素E 80 μmol/L组;9:维生素E 160 μmol/L组;10:维生素E 320 μmol/L组;11:维生素E 320 μmol/L+维生素C 400 μmol/L组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与瘦素组比较;c:$P<0.05$,与溶媒对照组比较;d:$P<0.05$,与溶媒瘦素组比较;e:$P<0.05$,与单独用药各组比较

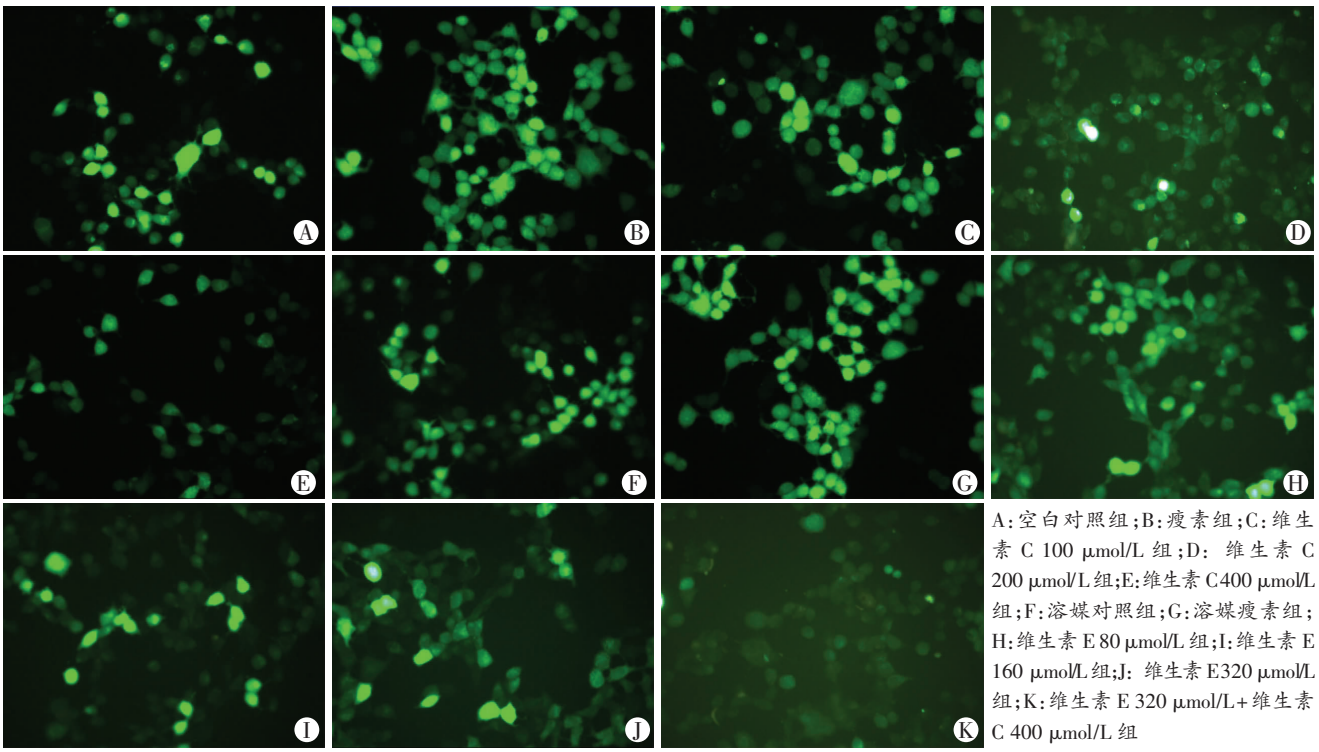
图1 维生素C和E对各组瘦素诱导HSC增殖的影响

2.2 维生素C和E对瘦素诱导HSC产生ROS的影响

与空白对照组、溶媒对照组分别比较,瘦素组以及溶媒瘦素组产生的ROS增加($P<0.05$),所以瘦素能够诱导HSC内ROS的产生。HSC在维生素E和C的作用下,维生素E各浓度组与溶媒瘦素组比较、维生素C各浓度组和瘦素组比较以及最高浓度联合后均能降低ROS的产生,差异具有统计学意义($P<0.05$),但各药物组之间统计学差异无显著性(图2、3)。

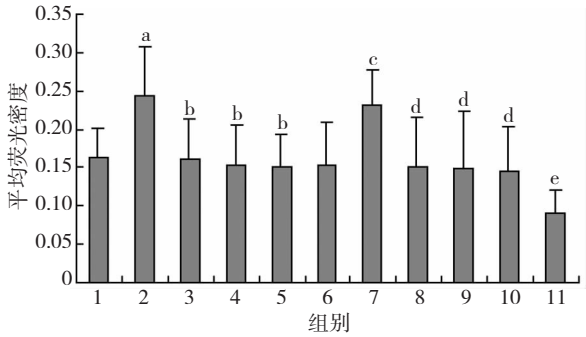
2.3 维生素C和E对瘦素诱导的HSC中TIMP-1浓度的影响

瘦素组与空白对照组比较、溶媒瘦素组与溶媒对照组比较,TIMP-1的浓度增加($P<0.05$),瘦素能够促进HSC产生TIMP-1。维生素E和C各浓度组分别与溶媒瘦素组和瘦素组比较,均能降低TIMP-1的浓度,差异具有统计学意义($P<0.05$),且维生素C和维生素E各浓度组之间降低TIMP-1浓度的差异具有显著性($P<0.05$),高浓度抑制效果最明显,呈现剂量依赖效应。两者最高浓度联合后,抑制瘦素诱导的TIMP-1的浓度效果较单独用药组明显($P<0.05$),见图4。



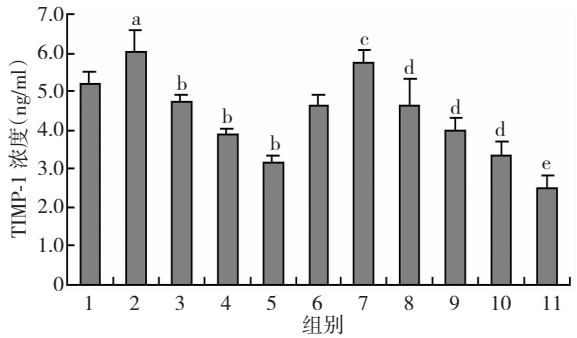
A:空白对照组;B:瘦素组;C:维生素 C 100 μmol/L 组;D: 维生素 C 200 μmol/L 组;E:维生素 C400 μmol/L 组;F:溶媒对照组;G:溶媒瘦素组;H:维生素 E 80 μmol/L 组;I:维生素 E 160 μmol/L 组;J: 维生素 E320 μmol/L 组;K:维生素 E 320 μmol/L+维生素 C 400 μmol/L 组

图 2　荧光倒置显微镜下观察各组 HSC 产生 ROS 的情况（×400）



1:空白对照组;2:瘦素组;3:维生素 C 100 μmol/L 组;4:维生素 C 200 μmol/ L 组;5:维生素 C 400 μmol/L 组;6:溶媒对照组;7:溶媒瘦素组;8:维生素 E 80 μmol/L 组;9:维生素 E 160 μmol/L 组;10:维生素 E 320 μmol/L 组;11:维生素 E 320 μmol/L + 维生素 C 400 μmol/L 组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与瘦素组比较;c:$P<0.05$,与溶媒对照组比较;d:$P<0.05$,与溶媒瘦素组比较;e:$P<0.05$,与单独用药各组比较

图 3　维生素 C 和 E 对瘦素诱导 HSC 产生 ROS 的影响



1:空白对照组;2:瘦素组;3:维生素 C 100 μmol/L 组;4:维生素 C 200 μmol/L 组;5:维生素 C 400 μmol/L 组;6:溶媒对照组;7:溶媒瘦素组;8:维生素 E 80 μmol/L 组;9:维生素 E 160 μmol/L 组;10:维生素 E 320 μmol/L 组;11:维生素 E 320 μmol/L + 维生素 C 400 μmol/L 组;a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与瘦素组比较;c:$P<0.05$,与溶媒对照组比较;d:$P<0.05$,与溶媒瘦素组比较;e:$P<0.05$,与单独用药各组比较

图 4　维生素 C 和 E 对瘦素诱导 HSC 分泌 TIMP-1 浓度的影响

3　讨论

HSC 在肝纤维化的发生、发展中起到关键作用。HSC 激活后,HSC 大量增殖,同时 TIMP-1 分泌过多,引起胶原沉积与降解失衡[2,6]。而瘦素是 HSC 的强力有丝分裂原,通过 ERK 和 AKT 信号通路可以抑制 HSC 凋亡和促进 HSC 增殖[4,7]。此外瘦素还可通过产生氧化应激导致 H_2O_2 介导的 p38 和 ERK1/2 信号通路激活,引起 TIMP-1 表达增加[5]。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶抑制剂可以降低瘦素诱导 HSC 中 ROS 的产生,抑制 ERK 和 AKT 的磷酸化,进而阻止瘦素诱导 HSC 增殖以及下调Ⅰ型胶原和 α 平滑肌肌动蛋白表达[3]。

临床研究[8]表明,在非酒精性脂肪肝的治疗中,维生素 E 的治疗效果优于安慰剂的治疗,联合维生素

E和C治疗非酒精性脂肪肝,可明显改善肝功能[9],这些提示维生素E和C在肝脏疾病的治疗中具有一定的作用,然而维生素E和C对瘦素诱导的肝纤维化的影响机制还不十分清楚。本研究中利用维生素E和C的抗氧化活性,观察在瘦素诱导的氧化应激导致的HSC增殖和TIMP-1上调过程中的影响。结果提示维生素E和C一定浓度范围内能够抑制瘦素诱导的HSC增殖,将二者最大抑制率的浓度联合后发现抑制效果更加明显,推测这可能与抗氧化过程中,维生素C作为维生素E的电子供体,维持维生素E还原状态,二者联合具有更强的抗氧化效应有关[10]。由于瘦素诱导HSC的增殖与ROS有直接关系[3],所以进一步观察维生素E和C在抑制瘦素诱导HSC增殖的浓度下是否能够同时抑制瘦素诱导的ROS产生,结果发现二者能够下调瘦素诱导的ROS水平,差异具有统计学意义($P<0.05$)。而之前的研究[11]中,维生素E能够抑制脂质过氧化,降低HSC中ROS的产生,下调花生四烯酸诱导Ⅰ型胶原的产生,由此推测维生素E和C可能通过抑制ROS的产生,降低氧化应激从而阻止瘦素诱导HSC的增殖。实验中维生素E和C能够下调瘦素诱导的HSC中ROS水平,而维生素E可以抑制NADPH氧化酶的组装,降低ROS的产生,干扰ROS依赖的信号转导,从而能阻止肝纤维化进程[12]。所以本研究又观察了在下调瘦素诱导ROS水平的药物浓度情况下,二者对瘦素诱导TIMP-1的上调的影响。初步结果显示,维生素E和C能够降低瘦素诱导HSC分泌TIMP-1的浓度,抑制效果之间存在统计学差异($P<0.05$),二者最大浓度联合后抑制效果强于单独抑制效果。这是由于瘦素产生氧化应激,引起TIMP-1的表达增加[5],而维生素E和C可能抑制TIMP-1信号转导分子ROS的产生,从而降低了HSC分泌TIMP-1的浓度,但其确切机制需要下一步深入探讨验证。

本研究结果提示瘦素诱导HSC增殖和TIMP-1的上调效应可以被维生素E和C所抑制,这皆可能与维生素E和C能够降低氧化应激反应的抗氧化活性有关,但其中复杂机制有赖于进一步研究。由于瘦素在肝纤维化中导致的氧化应激,进而激活促肝纤维化信号通路,所以寻找其中的作用靶点,可有望阻止和减缓肝纤维化发展[13],从而为临床治疗提供理想的治疗途径和理论支持。

志谢:感谢西北民族大学医学院黄双盛教授给予本研究实验技术指导

参考文献:

[1] Gieling R G, Burt A D, Mann D A. Fibrosis and cirrhosis reversibility-molecular mechanisms[J]. Clin Liver Dis, 2008, 12 (4): 915-937.

[2] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Gastroenterology, 2008, 134 (6): 1655-1669.

[3] De-Minicis S, Seki E, Oesterreicher C, *et al*. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase mediates fibrotic and inflammatory effects of leptin on hepatic stellate cells[J]. Hepatology, 2008, 48 (6): 2016-2026.

[4] Saxena N K, Titus M A, Ding X, *et al*. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation[J]. FASEB J, 2004, 18 (13): 1612-1614.

[5] Cao Q, Mak K M, Ren C, *et al*. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H_2O_2-dependant MAPK pathways[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (6): 4292-4304.

[6] 曾仲, 韩本立. 反义TIMP1基因转染Ito细胞后对其ECM代谢的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24 (6): 709-712.

[7] Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases[J]. Hepatology, 2009, 50 (3): 957-969.

[8] Sanyal A J, Chalasani N, Kowdley K V, *et al*. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis[J]. N Engl J Med, 2010, 362(18): 1675-1685.

[9] Patel K, Babich M. Efficacy of vitamin E and vitamin C in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Practical Gastroenterology, 2010, 34 (5): 20-27.

[10] Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, *et al*. Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats[J]. Nutrition Research, 2005, 25 (6): 625-630.

[11] Cubero F J, Nieto N. Ethanol and arachidonic acid synergize to activate Kupffer cells and modulate the fibrogenic response *via* tumor necrosis factor alpha, reduced glutathione, and transforming growth factor beta-dependent mechanisms[J]. Hepatology, 2008, 48 (6): 2027-2039.

[12] Zingg J M. Modulation of signal transduction by vitamin E[J]. Mol Aspects Med, 2007, 28 (5/6): 481-506.

[13] Friedman S L. Evolving challenges in hepatic fibrosis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7 (8): 425-436.

(**收稿**:2011-09-26;**修回**:2011-11-21)

(编辑 王 红)