基础研究 文章编号:0253-3626(2011)09-1037-03

维拉帕米对肝星状细胞凋亡和 Bcl-2/Bax 表达的影响

任美萍[1],李万平[2],刘明华[2],李 蓉[1],肖顺汉[2]
(泸州医学院 1. 药物与功能性食品研究中心;2. 药理学教研室,泸州 646000)

【摘 要】目的:研究维拉帕米对人肝星状细胞(Hepatic stellate cells,HSCs)凋亡的影响以及凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 表达的变化。方法:CCK-8 法检测不同浓度的维拉帕米处理 48 h 对 HSCs 细胞增殖的抑制作用;流式细胞仪 AnnexinV/PI 双染法检测 HSCs 细胞的凋亡率;免疫组化 SABC 法检测 Bcl-2/Bax 表达的变化。结果:一定浓度范围的维拉帕米对 HSCs 细胞的增殖有抑制作用,随浓度增加,抑制作用增强,其 IC_{50} 值为(0.15±0.01) mol/L;AnnexinV/PI 双染法检测显示,不同浓度的维拉帕米均可诱导 HSCs 细胞凋亡,与阴性对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);免疫组化检测显示,与对照组比较,维拉帕米组 Bcl-2 表达减少,而 Bax 表达增强,与阴性对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:维拉帕米可抑制 HSCs 细胞的增殖,诱导其凋亡,作用机制可能与抑制 Bcl-2、增强 Bax 的表达有关。

【关键词】维拉帕米;肝星状细胞;凋亡;Bcl-2;Bax
【中国图书分类法分类号】R965.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-11

Effects of verapamil on apoptosis and the Bcl-2/Bax expression of hepatic stellate cells

REN Mei-ping[1], LI Wan-ping[2], LIU Ming-hua[2], LI Rong[1], XIAO Shun-han[2]
(*1.Research Center for Drug and Functional Food; 2.Department of Pharmacology, Luzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of Verapamil on apoptosis and the expression of Bcl-2/Bax of human hepatic stellate cells (HSCs). *Methods*: HSCs were treated with different concentrations of Verapamil for 48 h.The inhibitory rate of Verapamil on HSCs was determined by CCK-8 assay; the rate of apoptosis was detected by flow cytometry with Annexin-V/PI staining; and the expression of Bcl-2/Bax was tested by SABC of immunohistochemical method. *Results*: Different concentrations of Verapamil had certain inhibitory efffct on HSCs cell proliferation in a dose-dependent manner, and the IC_{50} value was(0.15±0.01) mol/L.The apoptosis of HSCs was induced by different concentrations of Verapamil, which was statistically different from the negative control group ($P<0.05$).The expression of Bcl-2 of HSCs cells was decreased and the expression of Bax was increased after treatment of Verapamil, which was statistically different from the negative control group($P<0.05$). *Conclusion*: Verapamil can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of HSCs cells, and its mechanism might be related to decreasing the expression of Bcl-2 and increasing the expression of Bax.

【Key words】verapamil; hepatic stellate cells; apoptosis; Bcl-2; Bax

肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化发展的组织学基础。肝星状细胞激活并转化为肌纤维母细胞并分泌以胶原蛋白为主要成分的细胞外基质(Extracellular matrix,ECM)是肝纤维化发生、发展的核心环节。如果 ECM 生成过量大于降解并沉积,则引起肝纤维化[1,2]。抑制肝星状细胞(Hepatic stellate cells,HSCs)的活化增殖、诱导其凋亡是治疗肝纤维化,防治肝纤维化向肝硬化、肝癌发展的重要策略之一。已有研究显示维拉帕米可抑制肝星状细胞的增殖[3],为深入了解其抗纤维化机制,本研究初步观察了维拉帕米对体外培养的 HSCs 凋亡以及相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响。

作者介绍:任美萍(1978-),女,讲师,硕士,研究方向:抗肿瘤药物研究。
通信作者:肖顺汉,男,教授,Email: xiaoshunhan@sina.com。
基金项目:泸州医学院青年基金资助项目(编号:256)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HSCs 细胞株由泸州医学院附属医院传染与免疫实验室提供,采用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基 pH 7.2~7.4 的完全培养基,在 37℃、5%CO_2 条件下常规培养,每 2~3 d 更换培养液,细胞长满瓶底约 80%时传代。

1.1.2 药品与试剂 盐酸维拉帕米片：规格：每片 40 mg，天津市中央药业有限公司，批号：090101；DMEM 高糖培养基：赛默飞世尔生物化学制品（北京）有限公司，批号：NUB0146；胎牛血清：天津灏洋生物制品科技责任有限公司；CCK-8（Cell Counting Kit-8）试剂盒：碧云天生物技术研究所；AnnexinV-FITC 试剂盒：BECKMAN COULTER 公司；4%多聚甲醛固定液、SABC 试剂盒购自博士德生物工程有限公司。

1.1.3 仪器 酶标分析仪：北京普朗新技术有限公司，型号：DNM-9602；流式细胞仪：BECKMAN COULTER 公司；倒置相差显微镜：日本 Olympus 公司，型号：CKX41；CO_2 培养箱：日本 Sanyo 公司，型号：MCO-15A。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 检测维拉帕米对 HSCs 增殖的抑制作用 取对数生长期的 HSCs 细胞，调整为适当浓度后接种于 96 孔培养板，每孔 90 μl，37℃、5% CO_2 培养箱常规培养 24 h 贴壁后，加入 DMEM 培养液稀释的不同浓度无菌维拉帕米 10 μl（终浓度分别为 0.08、0.10、0.12、0.14、0.16 mol/L），每个浓度均设 4 个复孔，阴性对照为等体积培养基，继续培养 48 h，每孔加入 CCK8 10 μl 培养 1 h，酶标仪 450 nm 波长下检测各孔吸光度 A 值，按下列公式计算抑制率，细胞增殖抑制率=[1-($A_{给药组}-A_{空白孔}$)/($A_{阴性对照组}-A_{空白孔}$)]×100%。LOGIT 法计算半数抑制浓度（IC_{50}）。实验重复 4 次。

1.3 流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染法检测

1.3.1 细胞凋亡率 将终浓度分别为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mol/L 的维拉帕米作用 48 h 后的 HSCs 细胞消化离心，经预冷的 PBS 洗涤 1 次后将细胞悬浮于 100 μl 的 4℃ PBS 中，每管加 Annexin V-FITC 5 μl、PI 2.5 μl，轻轻震荡混匀，置冰上避光染色 10 min，每管加 400 μl 1×Buffer，流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.2 免疫组化 SABC 法检测 Bcl-2/Bax 表达的影响 取对数生长期的 HSCs 细胞制成密度为 5×10^7 个/L 的细胞悬液，每孔 450 μl 加入预先铺有盖玻片的 24 孔板，37℃、5%CO_2 培养 24 h 待其贴壁伸展后每孔加药 50 μl，维拉帕米终浓度分别为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mol/L，阴性组加等体积培养基，继续培养 48 h，4%多聚甲醛固定后，采用 SABC 法行免疫组化染色，中性树胶封片，晾干。显微镜下观察，每组随机采取 5 个视野拍照，结果用 Image-Pro plus6.0 图像分析软件进行分析，检测其阳性物质的平均光密度。

1.4 统计学分析

实验数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，SPSS13.0 统计软件完全随机方差分析之后行 *DUNNETT-t* 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 维拉帕米对 HSCs 增殖的抑制作用

维拉帕米可抑制 HSCs 的增殖，且有明显的剂量相关性，其 IC_{50} 值为（0.15 ± 0.01）mol/L。浓度-抑制率曲线，见图 1。

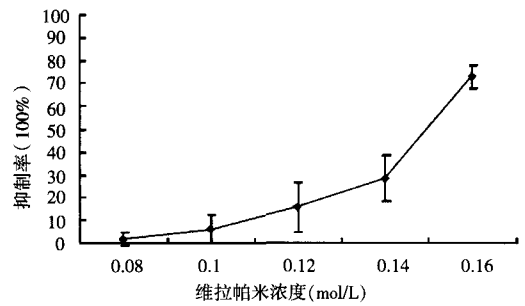


图 1 维拉帕米对 HSCs 增殖的浓度抑制率曲线（n=4）

2.2 流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

（0.02~0.10）mol/L 的维拉帕米均可诱导 HSCs 细胞的凋亡，凋亡率分别为（7.41±0.95）%、（10.06±0.62）%、（13.38±0.61）%、（17.98±0.65）%、（25.11%±1.33）%，呈现出一定的剂量依赖关系，与阴性对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$），结果见表 1。

表 1 维拉帕米诱导 HSCs 细胞的凋亡率（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	浓度（mol/L）	凋亡率（%）
阴性对照	-	1.26 ± 0.49
维拉帕米	0.02	7.41 ± 0.95*
维拉帕米	0.04	10.06 ± 0.62*
维拉帕米	0.06	13.38 ± 0.61*
维拉帕米	0.08	17.98 ± 0.65*
维拉帕米	0.10	25.11 ± 1.33*

注：与阴性对照组比较，*，$P<0.05$

2.3 免疫组化 SABC 法检测 Bcl-2/Bax 表达的影响

不同浓度的维拉帕米作用 48 h 后 HSCs 细胞 Bcl-2 的表达有不同程度的降低，而 Bax 的表达不同程度增强，平均光密度值增加，与阴性对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$），结果见表 2，代表性照片见图 2。

表 2 HSCs 细胞 Bcl-2/Bax 表达免疫组化染色平均光密度（$\bar{x}\pm s$，n=5）

组别	浓度（mol/L）	平均光密度	
		Bcl-2	Bax
阴性对照	-	0.267 5 ± 0.015 6	0.168 3 ± 0.007 3
维拉帕米	0.02	0.225 0 ± 0.004 2*	0.194 9 ± 0.004 6*
维拉帕米	0.04	0.211 6 ± 0.004 9*	0.203 7 ± 0.003 6*
维拉帕米	0.06	0.199 0 ± 0.004 6*	0.212 9 ± 0.005 2*
维拉帕米	0.08	0.183 9 ± 0.005 5*	0.230 9 ± 0.007 7*
维拉帕米	0.10	0.168 9 ± 0.002 6*	0.260 4 ± 0.015 0*

注：与阴性对照组比较，*，$P<0.05$

3 讨 论

肝纤维化是慢性肝病的病理特征，也是进一步向肝硬化发展的主要环节[4]。致病因素诱发肝细胞损伤，导致肝 Kupffer 细胞、肝窦状内皮细胞、肝成纤维细胞等其他类型肝细胞以及迁移的炎性细胞活化并释放大量的细胞因子和可溶因子，与此同时这些因子导致 HSCs 或肝成纤维细胞（Myofibrob-