基础研究 文章编号：0253-3626（2011）09-1054-03

SB203580对大鼠肝星状细胞凋亡及bcl-2蛋白表达影响

卓 强[1]，郑仁源[1]，叶 平[1]，唐 文[1]，梅浙川[2]，蒋明德[1]
（1. 中国人民解放军成都军区总医院消化内科，成都 610083；2. 重庆医科大学附属第二医院消化内科，重庆 400016）

【摘 要】目的：通过观察 P38MAPK 信号传导通路特异抑制剂 SB203580 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞（Hepatic stellate cells，HSCs）凋亡和 bcl-2 蛋白表达的影响，探讨 P38MAPK 信号传导通路与 bcl-2 蛋白在 HSCs 中的作用，为肝纤维化的治疗提供理论依据。方法：不同浓度 SB203580 处理乙醛刺激的 HSC-T6，利用 MTT 法检测 SB203580 对细胞的抑制作用，ELISA 酶联法检测细胞凋亡情况，Western blot 法观察 bcl-2 蛋白表达水平。结果：SB203580 抑制乙醛刺激的 HSC-T6 存活和诱导其凋亡，呈剂量依赖性（F=13.388 和 F=155.351，P<0.01）；随着 SB203580 浓度增加，bcl-2 蛋白表达逐渐降低（F=691.470，P<0.01）。结论：不同浓度 SB203580 能诱导乙醛刺激的 HSC-T6 凋亡，其作用机制可能与下调 bcl-2 蛋白表达有关。

【关键词】SB203580；乙醛；肝星状细胞；bcl-2；凋亡
【中国图书分类法分类号】R575.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-05

Effect of SB203580 on apoptosis and expression of bcl-2 protein in rat hepatic stellate cells

ZHUO Qiang[1], ZHENG Ren-yuan[1], YE Ping[1], TANG Wen[1], MEI Zhe-chuan[2], JIANG Ming-de[1]
(1. Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Region; 2. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationship of the apoptosis of rat hepatic stellate cells induced by SB203580 and expression of bcl-2 protein. *Methods*: HSC-T6 stimulated by acetaldehyde was exposed to SB203580 at different concentrations. The inhibitory effect of SB203580 on cells was detected by MTT. The apoptosis of HSC-T6 was detected by ELISA; the positive expression rate of bcl-2 protein was observed by Western blot. *Results*: SB203580 induced the apoptosis of HSC-T6 stimulated by acetaldehyde, and all showed the does-dependent trend (F=16.388 and F=155.351, P<0.01). With the concentration of SB203580 increasing, the positive expression rate of bcl-2 protein decreased gradually. (F=382.834, P<0.01). *Conclusion*: The apoptosis of HSC-T6 stimulated by acetaldehyde is obviously enhanced by SB203580, which maybe result from the down-regulated expression of bcl-2.

【Key words】SB203580; acetaldehyde; hepatic stellate cells; bcl-2; apoptosis

肝星状细胞（Hepatic stellate cells，HSCs）与肝纤维化的发生有着紧密联系[1]，活化的 HSCs 增殖加快，合成胶原等细胞外基质（Extracellular matrix，ECM）在肝脏过度沉积导致肝纤维化[2]。乙醇的代谢产物乙醛是刺激 HSCs 导致肝纤维化发生的关键因子[3,4]。P38MAPK 是丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-activated protein kinases，MAPK）家族重要成员之一，参与细胞应激、生长、凋亡等过程[5]。经前期实验发现，乙醛刺激的 HSCs 中 P38MAPK 磷酸化水平随 P38MAPK 信号通路特异抑制剂 SB203580 的增加而降低。本文通过观察 SB203580 诱导 HSC-T6 凋亡与 bcl-2 蛋白表达的关系，进一步探讨肝纤维化的发生机制。

作者介绍：卓 强（1980-），男，主治医师，硕士，研究方向：肝脏纤维化。
通信作者：蒋明德，男，教授，Email:jiangmd88@yahoo.com.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠 HSC-T6 细胞株（成都医学院实验室），SB203580、BAC 蛋白浓度试剂盒（碧云天生物技术研究所），GAPDH、DMEM 培养基（美国 sigma 公司），bcl-2 单克隆抗体、免疫组化试剂盒 SABC，SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司），DAB 试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司），小牛血清（成都哈里公司），ELISA 试剂盒（德国宝灵曼公司）

1.2 细胞培养

用含 10%小牛血清的 DMEM 培养基，另添加 100 U/ml 青霉素和链霉素；37℃、5%CO_2 培养箱中培养 HSC-T6，细胞换液时间 2~3 d，细胞传代时间 3~5 d，传代前用胰酶消化。

1.3 实验分组

对照组（A）：含 10%小牛血清的 DMEM 培养液；乙醛组（B）：在对照组基础上加入乙醛，使其终浓度为 200 μmol/L。

Kupffer所发现的星状细胞原来是同一类型的细胞，并指出上述细胞既不同于肝窦内皮细胞，也不是肝内的巨噬细胞，这种细胞富含 VitaminA 和脂质小滴，其中脂质小滴发出的自体荧光，以及这种细胞能被氯化金染色的特性都与VitaminA的存在有关，1995 年，国际上正式将其命名为HSCs。

肝纤维化发生的中心环节是 HSCs 的激活[6]，目前[7]认为活化的 HSCs 有 2 个去向：(1)由激活态转变回静止态；(2)发生凋亡而死亡。且大多数研究表明，活化的 HSC 主要通过凋亡途径消除，是肝纤维化消退的主要机制。MAPK 信号通路是细胞质和细胞核之间的信号枢纽，是细胞外界信号传递到细胞核内、调节基因表达的重要通路。主要成员包括细胞外信号调节激酶(Extracellular signal-regulated kinases，ERK)、C-jun氨基末端激酶(C-Jun-Nterminal kinase，JNK)和P38MAPK，其中 P38MAPK 参与细胞增殖、调亡、细胞周期等多种病理生理过程。有报道，P38MPAK 对多种细胞具有抗凋亡作用。Keuling[8]研究发现，阻断 P38MAPK 通路可增强 ABT-737 诱导的黑色素瘤细胞死亡。Tsukad[9]研究发现，阻断 P38MPAK 通路可降低培养活化的和 TGFp 诱导活化的 HSCα1(Ⅰ)胶原基因的表达。

细胞凋亡的重要特征之一是 Ca^{2+}/Mg^{2+}依赖性核酸内切酶的激活导致染色质 DNA 在核小体连接部位断裂，形成 180~200 bp 的单体或寡聚体片段。ELISA 采用夹心酶联免疫原理，分别针对 DNA 片段和组蛋白成分的小鼠单克隆抗体可特性测定细胞凋亡过程中的裂解的单核小体或寡聚合小体[10]，从而反映细胞凋亡水平。刘立鹏等[11]用 ELISA 酶联法研究 miR-143 对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的影响；程向东等[12]用上述方法研究证实苦参碱可诱导 HepG2 细胞凋亡并随剂量增加而增加。

bcl-2 蛋白是 Bcl-2 家族成员之一，可抑制细胞凋亡[13]。bcl-2 抑制细胞凋亡机制包括：(1)保护线粒体膜的完整性，防止膜间隙蛋白溢出；(2)阻断细胞内心磷脂的降解和溶酶体酶的破坏等凋亡环节；(3)抵制钙依赖型的细胞损伤；(4)bcl-2 还能直接与凋亡蛋白活性因子-1(apaf-1)结合，形成 bcl-2/apaf-1/caspase-9 复合物，抑制 caspase-9 对 caspase-3 的激活作用。bcl-2 抑制凋亡可通过位于连接 BH3 和 BH4 区的非结构连环中的丝氨酸及苏氨酸残基磷酸化调节，P38 为调节其磷酸化过程的激酶之一，P38MAPK 激活时可观察到 bcl-2 磷酸化[14]。生长因子如白介素-3 诱导 bcl-2 磷酸化后，其抑制凋亡的作用增强[15]。我们的数据显示，bcl-2 表达随 SB203580 浓度的增加而降低，说明 SB203580 调节 bcl-2 表达，即 P38MAPK 参与对 bcl-2 调节，其调节机制需进一步研究。

本实验结果表明 SB203580 对乙醛刺激 HSC-T6 细胞抑制增殖及促进凋亡作用，且伴有 bcl-2 蛋白表达的降低。MTT 结果显示，乙醛明显刺 HSC-T6 细胞增殖，SB203580 能抑制乙醛诱导的 HSC-T6 细胞增殖，且效应随抑制剂浓度的增加而加强；ELISA 酶联法通过测定 HSC-T6 凋亡细胞中断裂单体 DNA 片段的富集程度而判断 HSC-T6 凋亡水平。本实验结果提示，乙醛组富集值(D 值)明显较对照组低，加入不同浓度的 SB203580 后，D 值随抑制剂浓度增高而升高，说明 SB203580 促进乙醛刺激的 HSC-T6 凋亡，且呈剂量依赖关系；Western blot 法显示，对照组细胞内 bcl-2 蛋白低表达，加入乙醛后表达明显增加，实验组 bcl-2 蛋白表达较对照组高，但比乙醛组低，且随 SB203580 浓度的增加而逐渐降低，说明 SB203580 下调乙醛诱导的 HSC-T6 内 bcl-2 蛋白表达。结合前期研究，故推测 SB203580 诱导乙醛刺激的 HSC-T6 凋亡与 SB203580 阻断 P38MAPK 信号通路并下调 bcl-2 蛋白表达有关。

综上所述，抑制 HSCs 激活或诱导其凋亡可逆转肝纤维化，本试验用 SB203580 阻断 P38MAPK 信号通路研究 HSC-T6 凋亡，这对进一步阐明肝纤维的机制及探讨肝纤维的可能治疗途径均有重要意义。

参 考 文 献

[1] Marra F，Parola M.Cells in the liver-functions in health and disease[J].Chronic Liver Failure，2011，1(1)：3-32.

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

[3] Anania F，Womack L，Jiang M，et al.Aldehydes potentiate α2(Ⅰ) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells[J].Free Radic BioMed，2001，30(8)：846-857.

[4] Huang Y W，Yang S S，Kao J H.Pathogenesis and management of alcoholic liver cirrhosis：a review[J].Hepatic Medicine：Evidence and Research，2011，3(1)：1-11.

[5] Brown M D，Sacks D B.Compartmentalised MAPK pathways[J].Handb Exp Pharmacol，2008，186(2)：205-235.

[6] Wang Z R，Wang J H，Hu C L，et al.The effect of down-regulation of Smad3 by RNAi on hepatic stellate cells and a carbon tetrachloride-induced rat model of hepatic fibrosis[J].Braz J Med Biol Res，2011，44(2)：91-99.

[7] 李春霞，戴立里.肝星状细胞与肝纤维化研究进展[J].国际消化病杂志，2007，27(2)：108-111.

[8] Keuling A M，Andrew S E，Tron V A.Inhibition of p38 MAPK enhances ABT-737-induced cell death in melanoma cell lines：novel regulation of PUMA[J].Pigment Cell Melanoma Res，2010，23(3)：430-440.

[9] Tsukada S，Westwick J K，Ikejima S N，et al.SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate α1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells[J].J Biol Chem，2005，280(11)：10055-10064.

[10] 彭黎明，江 虹.细胞凋亡检测方法的研究进展[J].中华病理学杂志，2001，30(2)：85-86.

[11] 刘立鹏，于潇华，王晓春，等.miR-143 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响以及对 Bcl-2 表达的调节[J].中国药理学通报，2011，27(2)：265-269.

[12] 程向东，杜义安，黄 灵，等.苦参碱在调节 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达诱导 HepG2 细胞凋亡中的作用[J].中国肿瘤临床，2008，35(12)：711-713.

[13] 古晓娜，刘占旗，战景明. MAPKs 在 Bcl-2 家族调控细胞凋亡中的作用[J].国外医学卫生学分册，2008，35(2)：65-68.

[14] Chiara G D，Marcocci M E，Torcia M，et al.Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK identification of target sites and biologic consequences [J].J Biol Chem，2006，281(30)：21353-21361.

[15] Ito T，Deng X，Carr B，et al.Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function[J].J Biol Chem，1997，272(18)：11671-11673.

（责任编辑：关蕴良）