基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0168-03

丹参素对肝星状细胞 RhoA/Rock Ⅰ信号通路的影响

姜中华,戴立里,余冰冰,李 冬

(江苏省盐城市第一人民医院消化内科,224001;重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察丹参素对肝星状细胞(Hepatic stellate cells,HSC)RhoA/Rock Ⅰ信号通路的影响。方法:体外分离、培养大鼠肝 HSC,以 Rock Ⅰ特异性抑制剂 Y-27632 30 μmol/L、0.062 5 ~ 0.25 mmol/L 丹参素分别与纤维连接蛋白(Fibronectin,FN)刺激的 HSC 共同孵育。四甲基偶氮唑盐法测定 HSC 增殖,酶联免疫吸附试验测定Ⅰ型胶原分泌,Western blot 测定 RhoA,p-Mlc(Thr18/Ser19),p-FAK(Tyr397)蛋白表达。结果:FN 作用 24 h 能刺激 HSC 增殖,Ⅰ型胶原分泌,且上调了 RhoA、p-Mlc(Thr18/Ser19)蛋白,p-FAK(Tyr397)蛋白的表达;丹参素和 Rock Ⅰ特异性抑制剂 Y-27632 均能明显抑制上述效应。结论:FN 刺激活化了 HSC 的 RhoA/Rock Ⅰ信号通路、整合素信号通路;丹参素抑制 HSC 增殖,胶原分泌的作用与阻断 RhoA/Rock Ⅰ信号通路有关;RhoA/Rock Ⅰ信号通路阻断后对整合素信号通路关键酶 FAK 下调效应为丹参素经 RhoA/Rock Ⅰ信号通路抗纤维化的分子机制之一。

【关键词】丹参素;肝星状细胞;黏附斑激酶;肌球蛋白轻链

【中国图书分类法分类号】R575.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2008-12-08

The effect of Tanshinol on RhoA/Rock Ⅰ signaling parthway in hepatic stellate cells

JIANG Zhong-hua, et al

(*Department of Gastroenterology, the Second Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of Tanshinol on RhoA/Rock Ⅰ signaling parthway in Hepatic Stellate Cells. *Methods*: The mice of HSCs were isolated. After stimulation of FN, HCSs were cultured in vitro with Tanshinol (0.062 5 ~ 0.25 mmol/L) or Y-27632 (30 μmol/L), a specific Rock Ⅰ inibitor. The cell proliferation was assessed by MTT assay; the secretion of collagen Ⅰ were examined by methods of Enzyme Linked Immunosorbent Assay; the protein levels of RhoA, p-Mlc (Thr18/Ser19), and p-FAK (Tyr397) were analyzed by Western Blot. *Results*: FN promoted the proliferation of HSC significantly and provoked the secretion of collagen Ⅰ markedly, meanwhile the protein levels of RhoA, p-Mlc (Thr18/Ser19), and p-FAK (Tyr397) also increased. The interventions of Y-27632 and Tanshinol could inhibits the above effects in HSC distinctly. *Conclusion*: FN activates the RhoA/Rock Ⅰ signal parthway and the intergin signal parthway in HSC; Interventing the RhoA/Rock Ⅰ signal parthway might be involved with the effect of Tanshinol that inhibits the HSC proliferation and decreases the secretion of collagen Ⅰ. The down regulation of FAK by Rock Ⅰ is one of the anti-fibrosis mechanisms of Tanshinol.

【Key words】tanshinol; hepatic stellate cells; myosin light chains; focal adhesion kinase

RhoA 是小 G 蛋白 Rho 家族(Rho,Rac,Cdc42)的成员,目前一种 Rho 相关丝氨酸/苏氨酸激酶的同工酶 p160Rock(Rock Ⅰ)被认为是新一类 RhoA 效应底物,可调节肌球蛋白轻链(Myosin light chain,MLC)磷酸化与脱磷酸化反应,磷酸化肌球蛋白(p-Mlc)升高,促进肌动蛋白微丝骨架的聚合,启动应力纤维和粘附斑的组装,通过调节细胞骨架的结构影响细胞功能[1]。近期研究发现 RhoA/Rock Ⅰ信号通路与肝、肾、肺的慢性纤维化有关,本研究旨在探讨丹参素对纤维连接蛋白(Fibronectin,FN)刺激的肝星状细胞(Hepatic stellate cells,HSC)增殖,Ⅰ型胶原分泌等生物学活性的影响;同时以 Rock Ⅰ特异性抑制剂 Y-27632 作阳性对照,探讨丹参素经 RhoA/Rock Ⅰ信号通路抗纤维化的分子机制。

作者介绍:姜中华(1982-),男,硕士,
研究方向:肝纤维化的机制研究。

通信作者:戴立里,男,教授,Email:dailili@cqums.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 主要材料

雄性 Wista 大鼠(350 ~ 400 g)购自重庆腾鑫生物技术公

司，丹参素购自四川省药品研究所，Y-27632 购自 Sigma 公司；Ⅳ型胶原酶、链蛋白酶 E、DNA 酶Ⅰ、DMEM 高糖培养基为 Gibco 公司产品，优等胎牛血清购自杭州四季清公司，Ⅰ型胶原 ELISA 试剂盒为 Adlitteram Diagnostic Laboratories 产品，FN 购自 BD 公司；兔抗 RhoA 多克隆抗体、山羊抗 p-Mlc (Thr18/Ser19) 多克隆抗体、兔抗 p-FAK (Tyr397) 为 Santa Cruz 公司产品。

1.2 HCSs 分离及分组

HSCs 分离、鉴定、培养参照文献[2]。实验用细胞为传第 3 代 HSC，以无血清培养 24 h 使其趋于 G_0 期再行分组：(1)空白对照组；(2)FN 10 μg/ml 组；(3)FN 10 μg/ml+ 丹参素 0.062 5 mmol/L 组；(4) FN 10 μg/ml + 丹参素 0.125 mmol/L 组；(5) FN 10 μg/ml 组 + 丹参素 0.25 mmol/L 组；(6) FN 10 μg/ml 组 +Y-27632 30 μmol/L[3]组。每组设 6 个复孔。FN 按说明书要求以无 Ca^{2+}，Mg^{2+} 离子的 PBS 配成浓度 10 μg/ml，各组的 FN 均以 10 μg/ml FN 包被培养板，4℃过夜吸净，丹参素、Y-27632 均以 DMEN 培养液为溶解介质，配成相应的浓度加入各实验组。

1.3 HSC 增殖，Ⅰ型胶原分泌，RhoA、p-Mlc(Thr18/Ser19)、p-FAK(Tyr397)蛋白的检测

按照上述分组，96 孔培养板接种细胞，按细胞数 6×10^3 个/孔处理 24 h 后，MTT 法检测细胞的增殖，ELISA 定量检测Ⅰ型胶原的分泌；6 孔培养板接种细胞，按细胞数 1×10^3 个/孔处理 24 h，收集细胞，Western 印迹实验测 RhoA、p-Mlc (Thr18/Ser19)、p-FAK(Tyr397)蛋白的表达。

1.4 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 统计，多组之间的比较采用完全随机设计方差分析，各实验组之间的比较经方差齐性分析后采用成组设计的 t 检验。

表 1 各处理因素对 HSC 增殖影响($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	吸光度
空白对照(A 组)	0.515 8 ± 0.005 9
FN 刺激(B 组)	0.673 1 ± 0.007 2▲
Y-27632(30 μmol/L)(C 组)	0.567 2 ± 0.005 5△
FN+ 丹参(0.062 5 mmol/L)(D 组)	0.625 2 ± 0.006 7△
FN+ 丹参(0.125 mmol/L)(E 组)	0.565 7 ± 0.005 3△○
FN+ 丹参(0.25 mmol/L)(F 组)	0.525 5 ± 0.004 6△○★□

注：▲与 A 组比较 $P<0.05$；△与 B 组比较 $P<0.05$；○与 D 组比较 $P<0.05$；★与 E 组比较 $P<0.05$；□与 C 组比较 $P<0.05$

2 结 果

2.1 MTT 检测 HSC 增殖

丹参素对 FN 刺激培养 HSC 的增殖有明显的抑制作用，在 0.062 5 ~ 0.25 mmol/L 浓度范围内，其抑制作用有剂量依赖性($P<0.05$)，Rock Ⅰ的特性性抑制剂 Y-27632 亦能明显抑制 FN 刺激的 HSC 增殖 ($P<0.05$)，但与丹参素 0.25 mmol/L 比较抑制强度低($P<0.05$)。(表 1)。

2.2 RhoA、p-Mlc(Thr18/Ser19)、p-FAK(Tyr397)蛋白表达

从杂交信号强度分析，FN 刺激组较空白对照组 RhoA 蛋白表达明显增强($P<0.05$)，但丹参素处理组、Y-27632 组较 FN 刺激组无明显变化($P>0.05$)；刺激组 p-Mlc(Thr18/Ser19)、p-FAK(Tyr397)蛋白表达也较空白对照组升高($P<0.05$)。与 FN 刺激组比较，丹参素在 0.062 5 ~ 0.25 mmol/L 范围内浓度依赖性的降低 HSC p-Mlc(Thr18/Ser19)、p-FAK(Tyr397)蛋白的表达($P<0.05$)，Y-27632 30 μmol/L 亦能降低 p-Mlc(Thr18 /Ser19)、p-FAK(Tyr397)蛋白的表达($P<0.05$)，与丹参素 0.25 mmol/L 比较无明显差异($P>0.05$)，(图 2、表 3)。

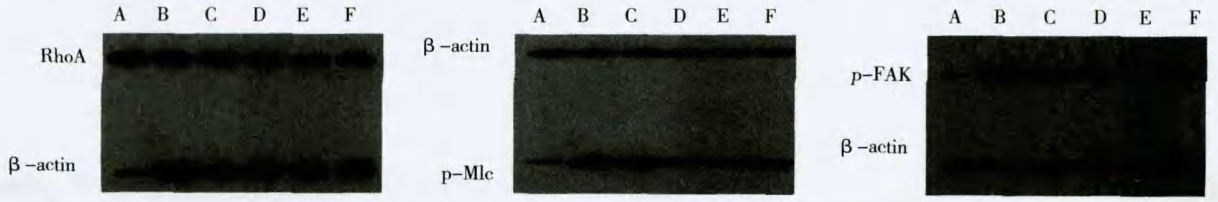
3 讨 论

细胞外间质(Extracellular matrix，ECM)在肝内沉积，为肝纤维化形成的主要机制。ECM 与 HSC 之间存在复杂的相互作用，ECM 不仅作为结构蛋白将 HSC 连接在一起，发挥黏附作用，而且对 HSC 的生物学行为具有重要影响，它们之间的相互作用主要经整合素(Intergrin)介导[4,5]，研究证实整合素触发的主要信号途径是酪氨酸级联反应，多种类型的细胞中，FAK 参与了此过程，其自身磷酸化后可调节一系列的下

表 2 HSC Ⅰ型胶原分泌量(ng/ml)的检测($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	Ⅰ型胶原浓度(ng/ml)
空白对照(A 组)	542.367 ± 18.007
FN 刺激(B 组)	819.504 ± 10.504▲
Y-27632(30 μmol/L)(C 组)	607.429 ± 12.667△
FN+ 丹参(0.062 5 mmol/L)(D 组)	650.652 ± 18.006△
FN+ 丹参(0.125 mmol/L)(E 组)	602.470 ± 16.943△○
FN+ 丹参(0.25 mmol/L)(F 组)	569.065 ± 11.078△○★□

注：▲与 A 组比较 $P<0.05$；△与 B 组比较 $P<0.05$；○与 D 组比较 $P<0.05$；★与 E 组比较 $P<0.05$；□与 C 组比较 $P<0.05$



A. 空白对照组；B. FN 刺激组；C. FN+ 丹参 0.062 5 mmol/L；D. FN+ 丹参 0.125 mmol/L；E. FN+ 丹参 0.25 mmol/L；F. FN+Y-27632 30 μmol/L

图 1 HSC 的 RhoA、p-Mlc(Thr18/Ser19)、p-FAK(Tyr397)蛋白的表达

表 3 HSC 的 RhoA,p-Mlc,p-FAK 蛋白表达($\bar{x} \pm s$,n=6)

组 别	RhoA	p-Mlc(Thr18/Ser19)	p-FAK(Tyr397)
空白对照(A 组)	0.547 ± 0.004	0.697 ± 0.039	0.495 ± 0.017
FN 刺激(B 组)	1.182 ± 0.003▲	1.415 ± 0.025▲	1.480 ± 0.033▲
FN+ 丹参 0.062 5 mmol/l(C 组)	1.179 ± 0.007△	1.242 ± 0.033△	1.190 ± 0.018△
FN+ 丹参 0.125 mmol/l(D 组)	1.174 ± 0.005△	1.072 ± 0.018△○	0.929 ± 0.027△○
FN+ 丹参 0.25 mmol/l(E 组)	1.180 ± 0.007△	0.835 ± 0.016△○★	0.703 ± 0.017△○★
FN+Y-27632 30 μmol/l(F 组)	1.173 ± 0.004△	0.818 ± 0.010△□	0.722 ± 0.030△□

注:RhoA:▲与 A 比较 $P<0.05$;△与 B 组比较 $P>0.05$;p-Mlc,p-FAK:▲与 A 组比较 $P<0.05$;△与 B 组比较 $P<0.05$,○与 C 组比较 $P<0.05$;★与 D 组比较 $P<0.05$;□与 E 组比较,$P>0.05$

游信号分子,因而被认为在整合素信号通路中起关键作用,它对多种细胞的生物学行为具有重要影响,如促进增殖,调控凋亡,增强黏附、迁移等[6]。纤维化肝脏中,ECM FN 合成增加,FN 也为整合素受体 α5β1 的特异性配基[7],本研究以FN 刺激培养 HSC,结果显示 FN 刺激后的 HSC,其 RhoA/Rock Ⅰ信号通路关键信号分子 RhoA,p-Mlc、整合素信号通路关键效应分子 p-FAK 蛋白的表达均增加,同时 FN 也能刺激 HSC增殖和Ⅰ型胶原分泌,提示 FN 刺激后,HSC 的 RhoA/Rock Ⅰ信号通路、整合素信号通路的活化增强,且可能为 HSC 生物学活性改变的机制之一。

本研究应用 Rock Ⅰ激酶特异性抑制剂 Y-27632、丹参素分别与 FN 刺激的 HSC 共同孵育,二者均能使 p-Mlc 蛋白表达下降,能对 HSC 的增殖、Ⅰ型胶原的分泌等生物学活性产生抑制作用,且丹参素呈剂量依赖性的抑制 p-Mlc 蛋白表达与拮抗 HSC 生物学活性的效应相平行。提示 Y-27632、丹参素均可阻断 RhoA/Rock Ⅰ信号通路下游传导,同时进一步证明 RhoA/Rock Ⅰ信号通路对 HSC 的增殖,Ⅰ型胶原分泌等生活学活性有调节作用。

本研究还发现 Y-27632、丹参素都能下调 p-FAK 蛋白表达。此结果与 Adriana S.Torsoni 等相似,他们发现在小鼠心室肌细胞中,RhoA 反义核苷酸、Y-27632 均能明显的减低机械应力刺激的 p-FAK 蛋白的表达[8]。Heidkamp MC 等研究发现在内皮素刺激培养的新生小鼠心室肌细胞,肌丝聚合抑制剂 - 细胞松弛素 D 能抑制内皮素所致的 FAK 的磷酸化[9],推测 FAK 磷酸化激活可能依赖由 RhoA/Rock Ⅰ信号通路调控的应力纤维的组装和重排。很多研究证实 FAK 在细胞增殖周期起着重要调节作用,FAK 活化推进 G1/S 细胞周期的进展,Oktay 等发现 FAK 抗体、显性负相 FAK 突变体均能阻断细胞周期于 G1/S 阶段[10],Zhao 等研究提示活化 FAK 对细胞周期的调控与其能上调细胞周期 D1 蛋白,下调细胞周期抑制因子 p27 有关[11]。另据报道 FAK、ERK 等激酶还可通过调节细胞增殖对 HSC 胶原分泌起着重要的影响[3]。以上提示在 HSC 中,丹参素阻断 RhoA/Rock Ⅰ信号通路从而下调整合素信号通路关键酶 p-FAK 可能为丹参素抗纤维化的机制之一。此外 Rock Ⅰ还可直接调节包括 c-fos、c-jun 等 AP1 家族的转录因子的表达,而不依赖 Rock Ⅰ介导的肌丝蛋白的聚合,它们对促进细胞增殖起着重要的作用[12]。值得一提的是,Y-27632 30 μmol/L 阳性对照组与丹参素 0.25 mmol/L 处理组比较对 p-Mlc、p-FAK 蛋白表达抑制效应无明显差异,但 0.25 mmol/L 丹参素组对 HSC 增殖、Ⅰ型胶原的分泌抑制强度均强于 Y-27632 30 μmol/L 组,提示丹参素抗纤维化的作用除 RhoA/Rock Ⅰ信号通路参与外还有其它分子机制。

综上所述,丹参素可抑制受 FN 刺激的 HSC 的 RhoA/Rock Ⅰ信号通路活化;RhoA/Rock Ⅰ信号通路阻断对整合素通路信号蛋白 FAK 下调效应为丹参素抑制 HSC 增殖、胶原分泌等生物活性的机制之一,但中药有着多靶点作用,其它分子机制需进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Kimura K,Ito M,Amano M,et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)[J]. Science,1996,273(5272):245-248.

[2] Maher J J,Lozier J S,Scott M K.Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant in culture and in vivo[J]. Am J Physiol,1998,275(4 pt 1):G847-853.

[3] Iwamoto H,Nakamuta M,Tada S,et al. A p160ROCK-specific inhibitor, Y-27632, attenuates rat hepatic stellate cell growth[J].J Hepatol,2000,32(5):762-770.

[4] Levine D,Rockey D C,Milner T A,et al. Expression of the integrin alpha8beta1 during pulmonary and hepatic fibrosis[J].Am J Pathol,2000,156(6):1927-1935.

[5] Giancotti F G,Ruoslahti E. Integrin signaling[J]. Science,1999,285(5430):1028-1032.

[6] Geiger B, Bershadsky A, Pankov R,et al. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk[J].Nat Rev Mol Cell Biol,2001,2(11):793-805.

[7] Mosher D F.Organization of the provisional fibronectin matrix:control by products of blood coagulation[J].Thromb Haemost,1995,74(1):529-533.

[8] Torsoni A S,Marin T M,Velloso L A,et al. RhoA/Rock signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardic myocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2005,289(4):H1488-1496.

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0171-03

普罗布考对D-半乳糖致衰老大鼠肾脏的保护作用研究

李 垚[1],冯 欣[2],王雪鹰[3]

(1. 辽宁医学院基础学院生理学教研室,锦州 121000;2. 辽宁医学院附属第一医院肾内科,锦州 121000;
3. 锦州市中心医院内分泌内科,锦州 121000)

【摘 要】目的:本实验主要研究抗氧化剂普罗布考对D-半乳糖致衰老大鼠肾脏的保护作用及可能机制。方法:将36只大鼠随机分为3组,正常对照组12只;衰老模型组12只;普罗布考治疗组12只。大鼠每日腹腔注射D-半乳糖,按每只小鼠100 mg/kg的剂量给药,连续42 d,形成亚急性衰老模型。做组织学检查,观察肾组织病理改变,测定肾组织超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase,GSH-Px)的活性及丙二醛(Malondialdehyde,MDA)含量。结果:组织学检查发现模型组出现了肾小球体积增大,分布稀疏,不同程度的局灶节段性肾小球硬化,肾小管的管腔扩大,灶状小管萎缩,间质纤维化,而给药组肾组织改变与模型组相比有所减轻。模型组肾组织SOD和GSH-Px的活性明显降低,给药组比模型组有所增高。模型组MDA的含量明显增高,给药组比模型组降低($P<0.05$)。结论:普罗布考能有效地抑制脂质过氧化产物MDA的产生,并提高抗氧化酶SOD、GSH-Px的活性,抑制氧化损伤过程,从而起到延缓肾脏衰老的作用。

【关键词】普罗布考;衰老;超氧化歧化酶;谷胱甘肽过氧化物酶;丙二醛

【中国图书分类法分类号】R692.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-06-03

Protective effect of probucol on the kidney of aging rats induced by D-galactose

LI Yao, et al

(*Department of Physiology, Basic College, Liaoning Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To evaluate protective effects and possible mechanism of probucol on the kidney of aging rats induced by D-galactose. *Methods*: 36 rats were divided randomly into 3 groups : negative control group(12 rats), aging group(12 rats), and probucol treatment group (12 rats). The sub-acute aging model rats were made by injecting D-gal into abdomen continuously (100 mg/kg, 42 d). The morphological changes were observed. The activities of superoxide dismutase (SOD) and GSH-Px and the concentration of malondialdehyde (MDA) in the kidney were examined. *Results*: There were obvious glomerular dilatation, focal glomeru-lonephritis, tubular dilatation, part of the tubular atrophy and tubulointerstitial fibrosis in model groups. These changes were remarkably relieved in probucol treatment group. The activities of SOD and GSH-Px in model group were decreased, and the concentration of MDA was increased. In comparison, the activities of SOD and GSH-Px in treatment group were significantly increased, and the concentration of MDA was decreased ($P<0.05$). *Conclusion*: Probucol can decrease the level of MDA and increase the activities of SOD and GSH-Px, and suppress oxidative stress injury, so it has anti-aging effects.

【Key words】probucol; aging; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; malondialdehyde

作者介绍:李 垚(1975-),男,讲师,博士,
研究方向:生理学。

[9] Heidkamp M C, Bayer A L, Scully B T, et al. Activation of focal adhesion kinase by protein kinase C epsilon in neonatal rat ventricular myocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(4): H1684-1696.

[10] Oktay M, Wary K K, Dans M, et al. Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH_2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle[J]. J Cell Biol, 1999, 145(7): 1461-1469.

[11] Zhao J H, Reiske H, Guan J L. Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase[J]. J Cell Biol, 1998, 143(7): 1997-2008.

[12] Hill C S, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPase RhoA, Rac1, and CDC42-Hs regulate transcriptional activation by SRF[J]. Cell, 1995, 81(7): 1159-1170.

(责任编辑:关蕴良)