基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1630-04

红景天甙对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞中 Wnt 信号通路的影响及其意义探讨

杨 斌,曾维政,蒋明德,刘巧凤,吴晓玲,荣 黎
(中国人民解放军成都军区总医院消化内科,成都 610083)

【摘 要】目的:通过观察经红景天甙、乙醛处理后的大鼠肝星状细胞(Hepatic stellate cells,HSCs)增殖速度的变化以及细胞内 Wnt 信号通路中主要下游分子及目的基因 mRNA 表达和蛋白水平的改变,探讨 Wnt 信号通路在 HSCs 中的作用,以及红景天甙对大鼠 HSCs Wnt 通路和细胞增殖的影响。方法:用红景天甙及乙醛处理体外培养传代的大鼠 HSCs[1],MTT 法绘制细胞生长曲线,采用 RT-PCR 和 Western blot 的方法分别观察 Wnt 信号通路中 β-catenin 和细胞周期蛋白 D1(Cell cycle protein D1,Cyclin D1)及相关指标的变化。结果:从各组细胞生长曲线的对比发现:红景天甙处理组细胞的增殖速度相对于单用乙醛组明显降低。单用乙醛刺激的大鼠 HSCs 中,Ⅰ型胶原(Collagen α 1)[2]、β-catenin 和 Cyclin D1 的 mRNA 表达和蛋白合成均明显增强($P<0.05$),红景天组中 Cyclin D1 和 β-catenin 的 mRNA 表达和蛋白合成均出现不同程度的下降($P<0.05$)。结论:Wnt 信号通路参与了乙醛刺激的大鼠 HSCs 活化,红景天甙可能是通过降低大鼠 HSCs 中 Wnt 信号通路的活性,从而抑制乙醛刺激的大鼠 HSCs 的增殖。

【关键词】肝星状细胞;Wnt 信号通路;红景天甙
【中国图书分类法分类号】R57 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-15

The influence of slidroside to wnt signaling pathway in rat hepatic stellate cells stimulated by acetaldehyde

YANG Bin, et al
(*Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Chengdu Military Command*)

【Abstract】*Objective*: To explore the role of wnt signaling pathway and the effect of salidroside on wnt pathway and cell proliferation in rat hepatic stellate cells, we detected the diversity of mRNA, protein expression of Wnt signaling pathway downstream molecules and the proliferation of rat hepatic stellate cells treated by acetaldehyde and salidroside. *Methods*: We treated the rat hepatic stellate cell with salidroside and acetaldehyde, drawn the cell growth curve using the method MTT, β-catenin, Collagen α 1 and Cyclin D1 were detected by reverse transcription PCR and Western blot. *Results*: By comparing the cell growth curve, we found clearly that proliferation rate of HSCs stimulated by acetaldehyde can be inhibited after salidroside treatment. We also found that mRNA and protein synthesis of Collagen α 1, Cyclin D1 and β-catenin were enhanced in rat hepatic stellate cell stimulated by acetaldehyde[1], however the mRNA expression and protein synthesis of Cyclin D1, β-catenin were declined in the cells treated by salidroside than cells stimulated by acetaldehyde only. *Conclusion*: The classical wnt signaling pathway may be involved in activation of hepatic stellate cells stimulated by acetaldehyde. The salidroside may reduce the proliferation of rat hepatic stellate cell stimulated by acetaldehyde through inhibiting the wnt signaling pathway.

【Key words】Hepatic stellate cells; Wnt signaling pathway; Salidroside

肝星状细胞(Hepatic stellate cells,HSCs)的活化是肝纤维化的核心环节,对 HSCs 的活化进行干预是临床治疗肝纤维化的发展方向。有研究表明 Wnt 信号通路与 HSCs 活化及肝纤维化发生相关[3]。Wnt 信号通路包括经典和非经典信号通路。β-catenin 蛋白为经典 Wnt 通路的主要下游分子。当 Wnt 经典通路激活,Wnt 与受体蛋白 Frizzled 结合并使未磷酸化的 β-catenin 在胞质中积累并转运到核中,从而激活转录因子,进一步激活 MYC 基因、细胞周期蛋白(Cell cycle protein D1,Cyclin D1)基因等,导致细胞增殖、永生化,去分化和转化等[4,5]。本实验小组在前期的实验研究中发现红景天甙可通过影响 TGF β-Smad 和 Rho-ROCK 信号通路的信号传导来抑制 HSCs 的活化。然而由于各条信号通路及信号分子之间形

作者介绍:杨 斌(1970-),男,主治医师,硕士,研究方向:肝纤维化和慢性肝病。
通讯作者:曾维政,男,教授,主任医师,E-mail:zengweizheng@163.com。
基金项目:全军"十五"医药卫生科研基金(编号:01MB037)。

成了一个复杂的蛋白质分子作用网络。因此对红景天甙影响 HSCs 的信号通路的具体分子机制还需要更深入的探讨。本实验通过乙醛刺激体外培养的大鼠 HSCs，并用红景天甙处理细胞。分别对经典 Wnt 信号通路的代表分子 β-catenin 和其目的基因 Cyclin D1 进行检测和比对。并通过 MTT 试验绘制细胞生长曲线，进一步探讨 Wnt 信号通路在大鼠 HSCs 活化中的作用机制和红景天甙对大鼠 HSCs 活化的抑制机理。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 大鼠 HSC-T6 细胞株，系中科院成都分院蒲蔷研究员惠赠。

1.1.2 实验药物 红景天甙粉剂（纯度：95%以上，批号：001102）购自昆明同持医药研究有限公司。40%乙醛购自成都市科龙化工试剂厂。

1.1.3 试剂及耗材 DMEM/F-12 1:1 培养基、小牛血清购自 HyClone(Thermo)。MTT（3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐）、RT-PCR 试剂盒购至 Takara 公司，trizol 购自 introvigen 公司，PCR 引物由上海生物工程公司合成，β-catenin 兔抗鼠单克隆抗体、Cyclin D1 兔抗鼠多克隆抗体、β-actin 兔抗鼠单克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司。Bio-Rad 蛋白定量试剂盒和蛋白印迹用的免疫印迹-多聚亚乙烯基氟化物膜（Immun-blot PVDF membrame）购自 Bio-Rad 公司。辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗购自 Santa Cruz 公司。3-3-2 氨基联苯胺（DAB）显色剂购自北京中杉金桥生物公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的复苏和培养 将大鼠 HSC-T6 细胞复苏。用 DMEM/F-12 1:1 完全培养基（20%小牛血清）培养，待细胞覆盖 90%瓶底时，备实验使用。

1.2.2 实验分组 大鼠 HSC-T6 细胞分为 3 组，为正常组、红景天组、乙醛组。每组 4 瓶细胞。分别用 75 ml 的培养瓶（做 RT-PCR）和 250 ml 的培养瓶（做 Western blot）培养细胞。正常组用 DMEM /F-12 1:1 完全培养基（20%小牛血清）培养，红景天组用红景天甙（终浓度 1.0 mg/ml）和乙醛（终浓度为 120 μmol/ml）加入完全培养基培养，乙醛组单用乙醛（终浓度为 120 μmol/ml）加完全培养基培养。培养完成后，收集以上各组细胞供下一步实验。

1.2.3 显微镜观察各组细胞形态变化并绘制生长曲线 用 96 孔板培养细胞，每孔加入 100 μl 细胞悬液，5% CO_2，37℃孵育，以 30 孔为 1 组，共 3 组，按分组方案加入药物（红景天甙终浓度 1.0 mg/ml 乙醛终浓度为 120 μmol/ml）。在 5% CO_2，37℃条件下培养孵育，分别于第 1 d、第 2 d、第 3 d、第 4 d，每天 5 孔次加入 20 μl MTT 溶液、二甲基亚砜，以未接种细胞只加培养基孔为空白对照并调零，在酶联免疫检测仪 OD490 nm（570 nm）处测量各孔的吸光值，实验重复 3 次，取各组平均质，以培养时间为横轴，吸光度为纵轴，绘制细胞生长曲线分为 3 组并按分组方案加入红景天甙和乙醛。分别在培养 1、2、3、4 d 用 MTT 法检测细胞并绘制生长曲线。

1.2.4 RT-PCR 检测各组细胞 Collagen α 1、β-catenin、Cyclin D1、β-actin 的 mRNA 表达，β-actin 为内参照 将各组细胞用 trizol 裂解、收集，提取总 RNA，两步法行 RT-PCR，以天根 Taq 酶系按比例加入试剂，每反应体系 20 μl，放入 PCR 仪，预实验确定各检测指标的最适反应条件如下表：

表 1 各检测指标 PCR 最佳反应条件

指标	最佳反应条件
Collagen α 1	退火 65℃，45 s 30 个循环，72℃反应 5 min
β-actin	退火 68℃，45 s，30 个循环，72℃反应 5 min
β-catenin	退火 58℃，45 s，30 个循环，72℃反应 5 min
Cyclin D1	退火 57.2℃，45 s，30 个循环，72℃反应 5 min

各检测指标引物序列如下（从 GenBank 查取基因序列，以 Primer5 软件设计，上海生物工程公司合成）：Collagen α 1，上游 5'-CCTGCCGATGTCGCTATCC-3'，下游 5'-CGTGCAGCCATCCACAAGC-3'；β-catenin，上游 5'-ATCCGAGGACTCAATACCAT-3'，下游 5'-CGAAAGCCGTTTCTTGTAG-3'；Cyclin D1 上游 5'-GCCACATACGGATGAGGACC-3'，下游 5'-CACTTGACGAAGCAGCACCA-3'；β-actin 上游 5'-CTGCCGCATCCTCTTCCTC-3'，下游 5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'。

反应完成后，将 PCR 产物进行 0.1%的琼脂糖电泳，凝胶成像仪成像。条带灰度分析用 Gel-Pro-Analyzer 专业分析软件读取电泳条带 OD 值，以 β-actin 作为内参指标。以目的基因的 OD 值/β-actin OD 值为各检测指标 mRNA 的表达水平，以 RI 值表示。

1.2.5 Western blot 检测各组细胞中 β-catenin、Cyclin D1、β-actin 蛋白的表达 各组细胞用蛋白裂解液提取总蛋白，用 Bio-Rad 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，进行 SDS-PAGE 电泳（恒压 80 V），电泳后转移到 PVDF 上，用 5%脱脂奶粉（TBST 配制）封闭于 37℃ 1 h，分别加入 β-actin(1:1 000)、Cyclin D1(1:200)、β-catenin(1:200)一抗孵育 4℃过夜，清洗后加入辣根过氧化酶标记的二抗，DAB 显色。进行半定量分析。

1.2.6 统计学处理 各检测指标的 RI 值和 A 值，以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，SPSS 13.0 软件分析，多组间比较用方差分析，均为方差齐性，两组间比较用 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞生长情况及 MTT 曲线

正常组细胞形态为星形贴壁生长，中央可见细胞核，细胞内脂滴少，红景天甙组未见细胞形态有明显变化，乙醛组细胞数量增多，增殖快，细胞内脂滴增多，细胞间联系紧密。（见图 1、2）。

MTT 法每天检测细胞吸光度列表如下：（细胞吸光度 OD 值，平均值，n=10）（见表 2）。

根据平均值绘制细胞生长曲线（见图 3）。从细胞生长曲线发现：经单用乙醛刺激后的大鼠 HSCs 生长速度相对于正常组和红景天组明显加快，红景天处理组的细胞生长速度相

对于乙醛组有明显降低。

2.2 RT-PCR 和 Western blot 检测结果

RT-PCR 实验结果经琼脂糖凝胶电泳电泳后，各检测指标条带清晰，各组目的基因 PCR 扩展后的片段长度和预想长度一致。见图 4～7。

结果用凝胶成像仪成像后。条带灰度分析用 Gel-Pro-Analyzer 专业分析软件读取电泳条带 OD 值，以 β-actin 作为内参指标。以目的基因的 OD 值/β-actin OD 值为各检测指标 mRNA 的表达水平，以 RI 值表示。

Western blot 检测各组细胞 β-catenin、Cyclin D1 的蛋白表达。3 个细胞组蛋白标本电泳均显示清晰的条带(见图 8～10)。

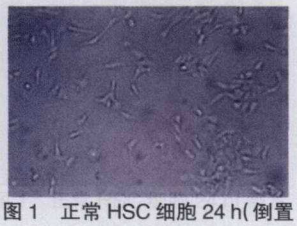


图 1 正常 HSC 细胞 24 h(倒置显微镜 X 200 倍)

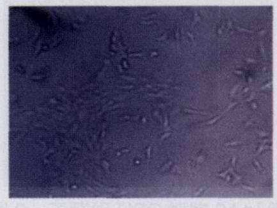


图 2 乙醛组 HSC 细胞 24 h(倒置显微镜 X 200 倍)

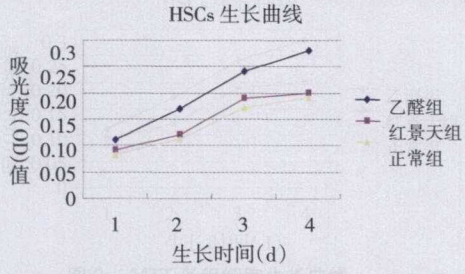


图 3 MTT 各组细胞生长曲线



图 5 各组细胞中 Collagen α1 mRNA 表达情况

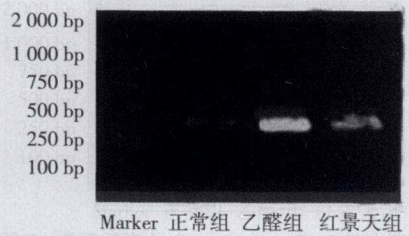


图 7 各组细胞中 β-catenin mRNA 表达情况

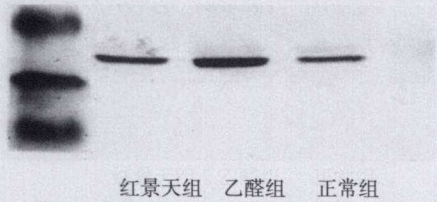


图 9 各组 Cyclin D1 蛋白表达情况

应用 Quantity one 软件对条带进行吸光度分析，以 β-actin 为内参照，将各检测指标蛋白条带 OD 值 β-actin 蛋白条带 OD 值对比，比值为各检测指标的表达相对值，以 A 值表示，计算出检测指标相对 A 值，列表 2。

Cyclin D1、β-catenin 蛋白表达统计直方图(见图 11、12)。

3 讨 论

Wnt 通路的目的基因包含 Cyclin D1，与细胞的生长周期密切相关，通路主要成分包括 wnt 蛋白家族、Firzzled/ 低密度脂蛋白受体相关蛋白(Fz/LRP)、胞质内的 Dsh (Dishevelled) 蛋白、β-链蛋白 (β-catenin)、糖原合成激酶 3β (Glycogen synthase kinase-3β，GSK-3β)、支架蛋白 axin/conductin、结肠腺瘤性息肉病基因蛋白(Adenomatous polyposis coli，APC) 和 T 细胞因子/淋巴增强因子 LEF/TCF(T cell factor/lymphoid

表 2 MTT 细胞吸光度平均值

组别	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d
正常组	0.081	0.113	0.164	0.182
乙醛组	0.113	0.172	0.240	0.273
红景天组	0.092	0.120	0.192	0.202

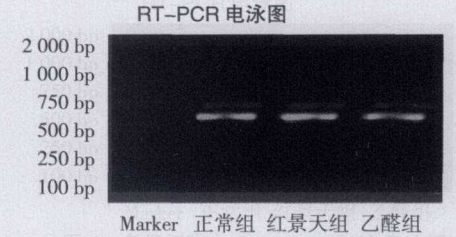


图 4 各组细胞中 β-actin mRNA 表达情况



图 6 各组细胞中 Cyclin-D1 mRNA 表达情况

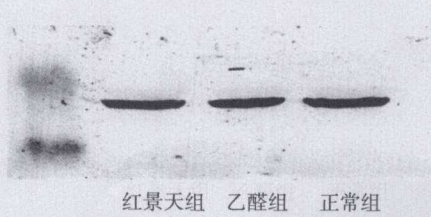


图 8 各组细胞中 β-actin 蛋白的表达情况

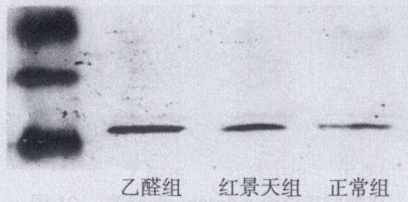


图 10 各组 β-catenin 蛋白表达情况

表 3 各实验组与对照组指标 RI 值变化情况列表($\bar{x}\pm s$,$n=4$)

组别	Collagen α 1(RI)	Cyclin D1(RI)	β -catenin(RI)
正常组	0.67 ± 0.08	0.34 ± 0.03	0.42 ± 0.05
乙醛组	1.21 ± 0.04*	0.63 ± 0.06*	0.89 ± 0.07*
红景天组	0.96 ± 0.09*▲	0.43 ± 0.04*▲	0.76 ± 0.08*▲

*$P<0.05$：与正常组比较，乙醛组和红景天组各指标 mRNA 表达均增加；▲$P<0.05$：红景天组与乙醛组比较，各检测指标表达均减少

表 4 各实验组与对照组指标 A 值变化情况 ($\bar{x}\pm s$,$n=4$)

分组	Cyclin D1 (A)	β -catenin (A)
正常组	0.28 ± 0.04	0.22 ± 0.03
乙醛组	0.69 ± 0.06*	0.49 ± 0.04*
红景天组	0.42 ± 0.06*▲	0.36 ± 0.04*▲

*$P<0.05$：与正常组比较，乙醛组和红景天组各指标蛋白表达均增加；▲$P<0.05$：红景天组与乙醛组比较 Cyclin D1、β -catenin 蛋白表达均减少

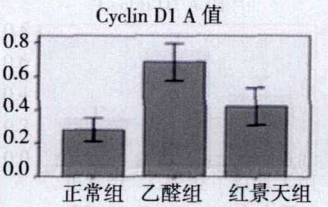


图 11 Cyclin D1 直方图

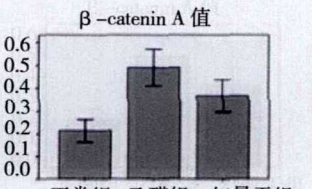


图 12 β -catenin 直方图

enhancer factor)转录因子家族[6]。经典 Wnt 通路(Canonical wnt pathway)的核心分子是胞内的 β -catenin[7]。

Zeng 等[8]通过基因芯片发现活化的 HSC 中有 Wnt 信号通路的下游分子基因表达。但由于细胞信号通路的相互交流的复杂性，关于经典 Wnt 信号通路在 HSCs 活化中的具体意义仍有待进一步的探索。前期的实验初步证实，红景天甙能够抑制 TGFβ -Smad 和 Rho-ROCK 信号通路中各种关键传导分子基因表达水平[9,10]。由于 Wnt 信号通路与细胞增殖的密切相关，因此研究 Wnt 通路在活化的 HSC 中的作用及红景天甙对 Wnt 通路的影响可以深入了解红景天甙抗肝纤维化的分子机制。

乙醛激活 HSCs 是酒精性肝病的主要原因，乙醛作用后的 HSCs 主要表现为细胞增殖速度加快，细胞外基质的表达增加。因此乙醛作为 HSCs 的激活剂已广泛运用于实验中[11]。

本实验通过乙醛刺激大鼠 HSCs，细胞中 Collagen α 1 的 mRNA 表达相对于正常组明显增强($P<0.05$)，表明 HSCs 被乙醛激活。通过在显微镜下观测并分析细胞生长曲线，乙醛组细胞增殖速度加快明显，红景天组细胞增殖速度与正常细胞增殖速度相比变化不大，说明红景天甙能抑制乙醛导致的大鼠 HSCs 的分裂增殖。用 RT-PCR 和 Western blot 检测 β -catenin、Cyclin D1 的 mRNA 和蛋白水平的变化[12,13]，β -catenin、Cyclin D1 在乙醛组和红景天组的 mRNA 和蛋白表达水平较正常组明显增强($P<0.05$)，而红景天组细胞中 β -catenin、Cyclin D1 的 mRNA 和蛋白表达水平较乙醛组明显降低($P<0.05$)，表明红景天甙可能通过干预 β -catenin 的表达，抑制 Wnt 通路，使 Wnt 通路的目的基因 Cyclin D1 的转录和蛋白表达减少，从而减缓细胞增殖。

综上所述，本实验认为红景天甙可通过抑制 Wnt 信号通路，减少 Cyclin D1 的 mRNA 和蛋白表达，使大鼠 HSCs 在乙醛刺激后的增殖和活化程度下降。

参 考 文 献

[1] Ha M H, Wei L, Rao H Y, et al.Effect of interferon-gamma on hepatic stellate cells stimulated by acetaldehyde [J].Hepatogastroenterology, 2008,55(84):1059-1065.

[2] Pérez-Carreón J I, Martínez-Pérez L, Loredo M L, et al. Inhibition of hepatic damage and liver fibrosis by brain natriuretic peptide[J].FEBS Lett,2009,583(12):2067-2070.

[3] Shin H W,Park S Y,Lee K B,et al.Down-regulation of Wnt signaling during apoptosis of human hepatic stellate cells[J].Hepatogastroenterology.2009,56(89):208-212.

[4] Röhrs S,Kutzner N,Vlad A,et al.Chronological expression of Wnt target genes Ccnd1,Myc,Cdkn1a,Tfrc,Plf1 and Ramp3[J].Cell Biol Int. 2009,33(4):501-508.

[5] Wang J,Wang X,Gong W,et al,Increased expression of beta-catenin,phosphorylated glycogen synthase kinase 3beta, cyclin D1, and c-myc in laterally spreading colorectal tumors[J].Histochem Cytochem. 2009,57(4):363-371.

[6] Gao H,Le Y,Wu X,et al.a novel lymphoid-enhancing factor/T-cell factor-associated transcription repressor, is a putative tumor suppressor, Cancer Res. 2010 ,70(1):202-211

[7] Krieghof E,Behrens J,Mayr B.Nucleo—cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention[J].Cell Sci,2006,119 (7):1453-1463.

[8] Zeng G,Awan F,Otruba W,et al. Wnt'er in liver: expression of Wnt and frizzled genes in mouse[J].Hepatology,2007,45 (1):195-204.

[9] 高秋娜. 红景天的药理与临床研究概述 [J]. 河南中医,2001,21(2):76-77.

[10] Zhang Y,Liu Y. Study on effects of salidroside on lipid peroxidation on oxidative stress in rat hepatic stellate cells[J].中药材,2005,28(9):794-796.

[11] Sonoyama T,Tamura N,Miyashita K,et al, Inhibition of hepatic damage and liver fibrosis by brain natriuretic peptide[J].FEBS Lett,2009, 583(12):2067-2070.

[12] 何 益,熊伍军,刘 菲. Wnt 信号传导通路与肝纤维化[J].国际消化病杂志,2008,28(2):57-59.

[13] Jiang F,Parsons C J, Stefanovic B. Gene expression profile of quiescent and activated rat hepatic stellate cells implicates Wnt signaling pathway in activation.[J] Hepatol,2006,45(3):401-405.

（责任编辑：张学颖）