基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1344-04

丹参素对肝星状细胞增殖、活化及 TGFβ/BMP 受体表达的影响

武鹏宇,戴立里,唐 静,冯琳琳
(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增殖、活化及 TGFβ,BMP 受体表达的影响,进一步探索丹参素抗肝纤维化的机制。方法:用不同浓度(0.25、0.125、0.062 5 mmol/L)的丹参素作用于经 TGFβ$_1$(5 ng/ml)处理人肝星状细胞 LX-2 48 h,CCK8 法检测其对细胞增殖的影响,免疫化学染色法观察 α 平滑肌动蛋白(α-SMA)的表达,RT-PCR 检测 TGFβ Ⅰ、Ⅱ型受体,BMPⅡ型受体 mRNA 的表达。结果:TGFβ$_1$ 5 ng/ml 处理 48 h 后,LX-2 细胞的增殖与细胞对照组无明显差异,高,中,低浓度丹参素处理组的细胞增殖受到浓度依赖性抑制(P<0.01)。TGFβ$_1$ 诱导的细胞活化也可被丹参素浓度依赖性抑制。丹参素可浓度依赖性减少 TβR Ⅰ、Ⅱ和增加 BMPRⅡ mRNA 表达(P<0.01)。结论:丹参素可通过抑制肝星状细胞增殖和 TGFβ$_1$ 诱导的肝星状细胞活化,负性调控肝纤维化过程,其机制可能为抑制 TGFβ 受体表达并拮抗 TGFβ 引起的 BMP 受体表达下调,进而影响下游 Smad 分子。

【关键词】肝纤维化;肝星状细胞;骨形态发生蛋白;丹参素
【中国图书分类法分类号】R575.2;R285.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-09

Effects of salvianic acid A (danshensu) on proliferation, activation and TGFβ/BMP receptors in hepatic stellate cells

WU Peng-yu, et al
(*Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of salvianic acid A (Danshensu) on proliferation, activation, expressions of TGFβ and BMP receptors in hepatic stellate cells, and the possible mechanism. *Methods*: LX-2 cells were cultured in vitro, and devided into 5 groups: normal control as group A, 5 ng/ml TGFβ$_1$ treatment as group B, and salvianic acid a groups with 0.25, 0.125, 0.0625 mmol/L of salvianic acid A and 5 ng/ml TGFβ$_1$ as groups C1-3. After 48h treatment, cell proliferation was measured by Cell Counting Kit-8. The expressions of α-smooth muscle actin (α-SMA) was detected by the immunocytochemical assay. Expressions of TGFβ receptor Ⅰ, Ⅱ (TβR Ⅰ, Ⅱ) and BMP receptor Ⅱ (BMPR Ⅱ) mRNAs, were detected by RT-PCR. *Results*: The proliferation of LX-2 treated by TGF-β$_1$ was not significant different from the control group, salvianic acid A suppressed the proliferation of TGF-β$_1$ treating LX-2 in a dose-dependent manner (P<0.01), and also the TGF-β$_1$ inducing activation. Expressions of TGFβ receptors decreased and expressions of BMP receptors increased dose-dependently (P<0.01) after treated by salvianic acid A for 48 h. *Conclusion*: salvianic acid A inhibits the proliferation and activation of HSCs possibly by down-regulating the TβR Ⅰ, Ⅱ expressions and antagonizing TGFβ induced down-regulating the BMPR Ⅱ expressions.

【Key words】Hepatic fobrosis; Hepatic stellate cells; BMP; Danshensu

肝纤维化是慢性肝病的共同病理表现,是肝损害病理过程中的一种损伤-修复模式,是多种因素引起的细胞外基质过度沉积形成纤维瘢痕造成的肝脏结构改变[1]。转化生长因子 β(Transforming growth factor β,TGFβ)对肝纤维化过程起重要的促进作用,可以通过促进肝星状细胞活化和分泌细胞外基质等机制加重肝纤维化。TGFβ$_1$ 与其穿膜受体结合后影响细胞内 Smad 基因表达,引起组织纤维化,同属 TGFβ 超家族的骨形态发生蛋白-7(Bone morphogenetic protein-7, BMP-7)可以有效拮抗 TGFβ 的促纤维化效应[2]。BMP 与 TGFβ 有相似的信号转导通路及穿膜受体,TGFβ 可造成 BMP 受体表达下调,被认为是组织纤维化的促进因素之一[3],HSC 上存在 BMP 受体[4]。前期研究已证实,丹参素可抑制HSC 增殖和活化,减少 TGFβ 诱导的 Smad2、3 表达和肝纤维化

作者介绍:武鹏宇(1984-),男,硕士,
研究方向:肝纤维化及其机制。
通讯作者:戴立里,男,教授,E-mail:dli@cqums.edu.cn。

进程中的 TGFβ 自分泌[5-7]。本实验通过观察丹参素对TGFβ处理的 HSC 增殖和活化,以及对 HSCTGFβ 受体及 BMP 受体表达的影响,进一步阐明丹参素拮抗肝纤维化的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

LX-2 细胞购于上海博惠斯生物公司;DMEM 干粉购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司;重组人 TGFβ1 购自美国 Peprotech 公司,丹参素购自成都曼斯特生物公司;CCK-8 购自江苏碧云天公司;兔抗人 α-SMA 单克隆抗体购自北京博奥森公司,SP 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司;RNA 提取试剂,RT 及 PCR 试剂盒,Marker 购自大连宝生物公司。PCR 引物由大连宝生物公司设计合成。

1.2 LX-2 细胞培养

LX-2 为人肝星状细胞转染 SV40 后经低浓度血清筛选得到的永生化细胞株[8]。用含 10%FBS 的 DMEM 在 37℃,5% CO_2,饱和湿度的培养箱内贴壁培养。待细胞生长至融合状态,铺满瓶壁 70%~80%以上时,用 0.05%胰蛋白酶溶液消化细胞,按 1:3~1:6 密度传代接种。取对数生长期细胞用于实验。

1.3 丹参素工作液配制

丹参素,分子式:$C_9H_{10}O_5$,分子量 198,为白色粉末。准确称取 0.8 mg 丹参素粉末溶于 2 ml DMEM 液中,配成 2 mmol/L 的丹参素原液,经 0.22 μm 滤膜抽滤除菌,4℃保存可于 1 周内使用。使用时按比例稀释为工作液。

1.4 实验分组

A 组(细胞对照组):仅加入 DMEM 培养基;B 组(TGFβ 处理组):DMEM 中加入终浓度为 5 ng/ml 的人重组 TGF-β_1;C 组(TGFβ + 丹参素联合处理组):参照郑磊等[6]采用的丹参素抑制 HSC 增殖有效作用浓度,在 DMEM 中加入终浓度为 5 ng/ml 的人重组 TGF-β_1,并按终浓度 0.25、0.125、0.062 5 mmol/L 分别加入丹参素工作液)分别记为 C1~3 组。

1.5 丹参素对肝星状细胞增殖的影响

将细胞按 1×10^5 个/ml 接种于 96 孔板,每孔 100 μl。待细胞生长至 60%~70%融合度时同步化处理 24 h,换用无血清培养基并分组加入处理因素分别作用 48 h,每组设 6 个复孔。用 CCK-8 法检测丹参素对 LX-2 增殖的影响。

1.6 丹参素对 TGFβ 刺激的肝星状细胞活化的影响

细胞接种于 24 孔板中爬片生长至 70%融合度时同步化处理 24 h,换用无血清培养基并分组加入处理因素作用 24 h,每组设 3 个复孔。用细胞免疫化学染色法检测各组 α-SMA 的表达。

1.7 丹参素对肝星状细胞 TGFβ/BMP 受体表达的影响

将细胞接种于 25 ml 培养瓶,分组处理后用 TAKARA RNAiso 提取细胞总 RNA,RT-PCR 法检测各组中 TβRⅠ,TβRⅡ,BMPRⅡ mRNA 的表达。按表 1 条件进行反应。

表 1 PCR 反应体系及条件

产物(bp)		引物序列	退火温度(℃)
TβRⅠ	F	5'-GGCTCTGCTTTGTCTCTGTCAC-3'	56.3
(336)	R	5'-GGTCCTCTTCATTTGGCACTC-3'	
TβRⅡ	F	5'-GAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAG-3'	54.1
(327)	R	5'-GCGGTAGCAGTAGAAGATGATG-3'	
BMPRⅡ	F	5'-CATAAGCGAGGTTGGCACTATC-3'	54.0
(272)	R	5'-CTGGGAACTTGGGTCTCTGTT-3'	
GAPDH	F	5'-GAGCCAAAAGGGTCATCATCTC-3'	57.0
(542)	R	5'-AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC-3	

循环条件:95℃变性 30 s,退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环。产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳,Gel Doc XR 系统检测吸光度,Quantity One 软件进行分析,以待测物与内参GAPDH 的吸光度比值做半定量分析。

1.8 统计学处理

数据以($\bar{x}\pm s$)表示。SPSS13.0 软件分析。组间数据比较运用成组设计的单因素方差分析,LSD-t 检验,$P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 丹参素对 TGFβ 刺激的肝星状细胞增殖的影响

细胞按分组条件培养 48 h 后,应用 CCK8 法检测吸光度 A 值如表 1 所示。5 ng/ml TGFβ1 处理 48 h 后,LX-2 细胞的增殖与细胞对照组比较无明显差别,丹参素(0.25、0.125、0.062 5 mmol/L)处理后,LX-2 的增殖受到抑制,计算其抑制率分别为 30.4%、23.4%、16.3%。

2.2 丹参素对 TGFβ 刺激的肝星状细胞活化的影响

贴壁生长的活化 LX-2 可表达较多的 α-SMA,胞浆染色呈棕黄色。经 TGFβ1 处理后,α-SMA 表达明显增强,胞浆染色加深,呈深棕黄色。丹参素可显著抑制 TGFβ1 诱导的 α-SMA 表达,图中可见随丹参素浓度增加,胞浆染色程度逐渐降低。同时,利用 ImagePro 软件进行平均光密度值分析,各组 IOD 值分别为:A 组:0.025 ± 0.009;B 组:0.146 ± 0.021;D1 组:0.062 ± 0.004;D2 组:0.076 ± 0.003;D3 组:0.085 ± 0.004。经 TGFβ1 处理后,IOD 值增加,而随着丹参素浓度的增加,IOD 值逐渐减小($P<0.01$)(图 1)。

2.3　丹参素对 TGFβ 刺激的肝星状细胞 TGFβ 受体及 BMP 受体表达的影响

以目的基因与内参 GAPDH 基因的吸光度比值作半定量比较。经 TGFβ 处理后，LX-2 细胞的 TβRⅠ、Ⅱ mRNA 表达增强，BMPRⅡ mRNA 表达减弱，丹参素呈剂量依赖性减少 TβRⅠ、Ⅱ mRNA 表达及增强 BMPRⅡ mRNA（表 2，图 2）。

表 2　丹参素对 HSC 增殖的影响（$\bar{x} \pm s$，n=6）

处理组	吸光度值	抑制率
A	0.645 ± 0.017	(-)
B	0.644 ± 0.012[c]	0.1%
C1	0.449 ± 0.007[adf]	30.4%
C2	0.494 ± 0.010[bd]	23.4%
C3	0.540 ± 0.026[adef]	16.3%

注：表中各组吸光度均为实测值减去调零值后的差值。A 组：细胞对照组；B 组：TGF-β_1 5 ng/ml 处理组；C1-3 组：TGF-β_1 5 ng/ml+ 丹参素 0.25 mmol/L，0.125 mmol/L，0.062 5 mmol/L 处理组。各组两两间比较采用 LSD-t 检验。a：与 A 组比较，P<0.01；b：与 A 组比较，P<0.05；c：与 A 组比较，P>0.05；d：与 B 组比较，P>0.05；e：与 C1 组比较，P<0.01；f：与 C2 组比较，P<0.05



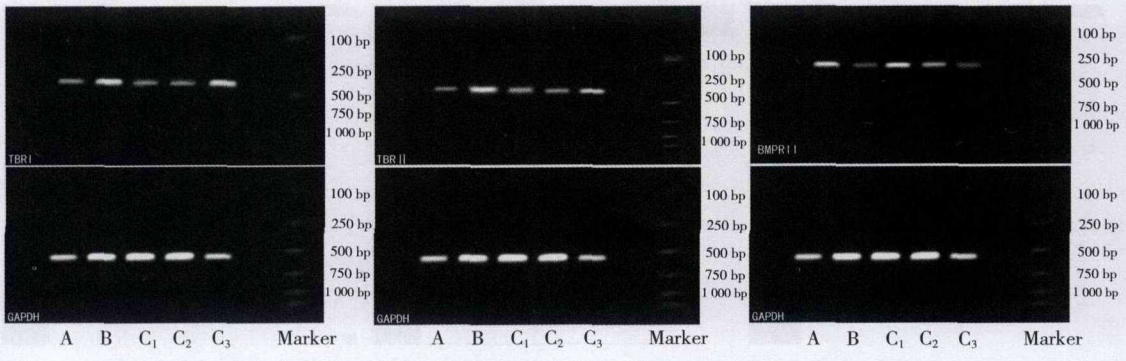
A 组. 细胞对照组；B 组. TGF-β_1 5 ng/ml 处理组；C1-3 组. TGF-β_1 5 ng/ml+ 丹参素 0.25 mmol/L，0.125 mmol/L，0.0625 mmol/L 处理组

图 1　LX-2 细胞 α-SMA 免疫化学染色（SP 法，400×）

表 3　丹参素对 TGF-β_1 诱导的 HSC TβR 及 BMPR mRNA 表达的影响（$\bar{x} \pm s$，n=3）

处理组	吸光度比值(待测值 /GAPDH)		
	TβRⅠ	TβRⅡ	BMPRⅡ
A	0.288 ± 0.013	0.209 ± 0.024	0.329 ± 0.010
B	0.604 ± 0.02[a]	0.438 ± 0.019[a]	0.194 ± 0.013[a]
C1	0.461 ± 0.010[ab]	0.323 ± 0.012[ab]	0.273 ± 0.007[ab]
C2	0.523 ± 0.016[abc]	0.365 ± 0.021[abc]	0.250 ± 0.003[abc]
C3	0.552 ± 0.012[abcd]	0.397 ± 0.009[abcd]	0.226 ± 0.012[abcd]

注：表中各组数值为实测值与内参 GAPDH 吸光度的比值。A 组：细胞对照组；B 组：TGF-β_1 5 ng/ml 处理组；C1-3 组：TGF-β 1 5 ng/ml+ 丹参素 0.25 mmol/L，0.125、0.062 5 mmol/L 处理组。各组两两间比较采用 LSD-t 检验，a：与 A 组比较，P<0.01；b：与 B 组比较，P<0.01；c：与 C1 组比较，P<0.01；d：与 C2 组比较，P<0.01



A 组. 细胞对照组；B 组. TGF-β_1 5 ng/ml 处理组；C1-3 组. TGF-β 1 5 ng/ml+ 丹参素 0.25 mmol/L，0.125 mmol/L，0.062 5 mmol/L 处理组

图 2 LX-2 细胞 HSC TβRⅠ、TβRⅡ、BMPRⅡ mRNA 表达

3 讨 论

TGFβ 是最重要的促肝纤维化因子,可以通过促进 HSC 活化,增加 ECM 的合成和分泌,抑制降解等途径加速肝纤维化过程。TGFβ 与其穿膜受体 TβRⅡ结合后,再与其膜受体 TβRⅠ结合,引起下游 Smad 分子磷酸化,增加 ECM 的合成和分泌。如何阻断 TGFβ 诱导的 HSC 活化,成为抗肝纤维化治疗的重要研究方向之一。

本课题组前期研究发现,丹参素能有效的抑制 HSC 的增殖。刘成海等[9]的研究表明 TGFβ 对活化的 HSC 增殖无明显影响。本研究证实了此结论,单用 TGFβ 组中 LX-2 细胞的增殖较之细胞对照组无明显改变,加入丹参素处理后,LX-2 细胞的增殖受到了明显的抑制,Knittel 等[10]发现,TGFβ$_1$ 可能通过增加血小板源性生长因子(Platelet-derived growth factor,PDGF)的受体表达,增强 HSC 对外源性强有丝分裂原 PDGF 的反应性,促进细胞分裂增殖。在本实验中由于缺乏外源性 PDGF 诱导,这种促增殖效应表现不明显。TGFβ 的促肝纤维化作用主要表现在启动 HSC 的活化并维持和增加活化 HSC 的数量。HSC 活化后特征性表达 α-SMA。通过观察各处理组的 LX-2 表达 α-SMA 水平,发现丹参素可以浓度依赖性抑制由 TGFβ 诱导的 HSC 活化。TGFβ 与 HSC 上的 TβR 结合引起下游 Smad 分子磷酸化发挥促 HSC 活化的生物学效应,有研究表明在活化的 HSC 中,TβRⅠ和 TβRⅡ的表达都明显增强[11],从而促进了下游 Smad 分子的磷酸化和转位。因此在 TβR 水平进行调控可影响肝纤维化进程。林寿宁等[12]的研究提示,抑制 TGFβ 受体的表达能够减少 TGFβ 通过 Smad 造成的促纤维化作用。本实验结果在前期基础上进一步表明,丹参素在受体水平影响 TGFβ/Smad 通路,通过抑制 TGFβ 受体表达减少 Smad2、3 磷酸化从而负性调节 HSC 的活化。

有研究发现,组织中 BMP 受体表达与纤维化进展有关。糖尿病肾病所致的肾间质纤维化中,BMP 受体表达的下调程度随着纤维化加重而逐渐加重[13]。Wang 等[3]发现 TGFβ 可以造成 BMP 受体的表达下调。周剑锋等[14]发现 BMP 受体的下调可能是肾纤维化的促进因素之一,药物治疗后 BMP 受体上调与抑制 TGFβ 的促纤维化作用相关。与 TGFβ 受体的信号转导相似,BMP 受体分为两型。BMP 首先与 BMPⅡ型受体结合,再与Ⅰ型受体结合影响下游分子表达。本实验通过比较各处理组细胞的 BMPⅡ型受体表达,了解丹参素对 BMP 受体转导第一步的影响。实验结果表明各处理因素对 BMP 受体的影响与对 TGFβ 受体的影响完全不同,TGFβ$_1$ 处理组细胞 BMPRⅡ表达较之细胞对照组有较大幅度的下降,提示 BMP 受体的下调可能与肝纤维化有关。丹参素可拮抗这种由 TGFβ$_1$ 引起的 BMPRⅡ表达下调。在肝纤维化过程中,外源性 BMP-7 可减少 HSC 中的 Smad2、3 表达,抑制胶原分泌[15]。推测丹参素抑制 BMP 受体表达下调可能通过增加 BMP 信号转导抑制肝纤维化。

HSC 的活化是肝纤维化的关键过程,如何抑制 HSC 的活化是肝纤维化治疗的重要研究方向。本研究表明丹参素可以有效拮抗肝纤维化过程中最重要的促进因子 TGFβ$_1$,其机制为减少 TGFβ 受体表达和增加 BMP 受体表达进而影响 TGFβ/Smad 信号通路中的 Smad 分子表达和磷酸化。肝纤维化的机制相当复杂,TGFβ 在其主要信号转导通路 TGFβ/Smad 通路之外,还与 ERK,p38MAPK 激酶通路存在关联,并可通过活化 NF-κB 等影响肝纤维化进程[16]。对丹参素抑制TGFβ作用的机理尚需进一步研究,以明确其抗肝纤维化的真正机制。

参 考 文 献

[1] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115: 209-218.

[2] Weiskirchen R, Meurer S K, Gressner O A, et al. BMP-7 as antagonist of organ fibrosis[J]. Front Biosci, 2009, 14: 4992-5012.

[3] Wang S N, Hirschberg R. BMP antagonizes TGF-beta-dependent fibrogenesis in mesangial cells[J]. Am J Phy RenPhy, 2003, 284(5): 1006.

[4] Scherner O, Vreden W, Gressner A M, et al. The BMP-7 pathway in hepatic stellate cells and hepatocytes and its antagonistic effect on the TGF-beta1 signaling pathway[J]. Journal of Hepatology, 2008, 48(s2): 186.

[5] 郑元义,戴立里,王文兵,等.丹参素治疗肝纤维化及其作用机制研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(5): 288-290.

[6] 郑 磊,戴立里. 丹参素对转化生长因子 β$_1$ 刺激肝星状细胞信号转导的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(2): 182-185.

[7] 李 欣,彭小东,张文利,等.四种中药单体的抗肝纤维化作用及其机制[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(3): 193-197.

[8] Xu L, Hui A, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut, 2006, 54: 142-151.

[9] 刘成海, 宣红萍. 转化生长因子 β1 对不同化状态肝星状细胞增殖和Ⅰ型胶原表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(12): 731-734.

[10] Knittel T, Mehde M, Kobold D, et al. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver, regulation by TNF-alpha and TGF-beta[J]. J Hepatol, 1999, 30: 48-60.

[11] Roberts A B, Russo A, Felici A, et al. Smad3 a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta[J]. Am N Y Acad Sci, 2003, 995: 1-10.

[12] 林寿宁,王振常,梁 尧,等. 壮肝逐瘀煎对肝纤维化大鼠 TGFβ$_1$ 及 TβRⅠ/Ⅱ mRNA 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(5): 357-358, 370.

[13] Bottiglio C, Maeshima Y, Kalluri R. Osteogenic protein-1 reduces glomerulonephritis and tubulointerstitial fibrosis associated with a mouse model for lupus nephritis[J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(3): 524.

[14] 周剑锋,李 娜,袁发焕.依那普利对大鼠肾间质损害中骨成形蛋白-7 及其受体表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(14): 1693-1696, 1700.

[15] 杨 丽,杨长青,袁 敏,等. 肝纤维化时骨形态发生蛋白 7 对肝细胞及肝星状细胞产生胶原的影响[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(6): 419-422

[16] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF-beta family signalling[J]. Nature, 2003, 425: 577-584.

(责任编辑:冉明会)