基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1679-04

丹参素对肝星状细胞 ERK1/2 信号转导通路的影响

李 智,戴立里

(重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察丹参素对血小板衍生生长因子-BB(Platelet derived growth factor-BB,PDGF-BB)刺激大鼠肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)增殖、Ⅰ型胶原合成、磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2, P-ERK1/2)表达的影响,探讨丹参素抗肝纤维化的分子机制。方法:四甲基偶氮唑盐法检测大鼠 HSC 增殖活性;免疫细胞化学染色法测定大鼠 HSC Ⅰ型胶原合成的表达;Western blot 测定大鼠肝星状细胞 P-ERK1/2 的表达。结果:丹参素有抑制 PDGF-BB 刺激大鼠 HSC 增殖,Ⅰ型胶原表达,P- ERK1/2 表达的作用。结论:丹参素可抑制 PDGF-BB 刺激的大鼠 HSC 增殖,Ⅰ型胶原合成,其机制可能与抑制 ERK1/2 信号转导通路有关。

【关键词】丹参素;肝星状细胞;血小板衍生生长因子-BB;细胞外信号转导激酶 1/2

【中国图书分类法分类号】R285.5;R575.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-08

Effect of Danshengsu on ERK1/2 signal transduction pathway in hepatic stellate cell

LI Zhi, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the inhibitory effect of Danshengsu on proliferation, collagen type Ⅰ synthesis and Phosphorylated extracellular signal- regulated kinase 1/2 (P-ERK1/2)expression in rat hepatic stellate cell (HSC) stimulated by platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB), and to elucidate the molecular mechanism of Danshensu against hepatic fibrosis: *Methods*: Cell proliferation was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-y1)-2,5-Diphennyltetrazolium bromide(MTT)colorimetric assay.Collagen type Ⅰ synthesis was detected by Immunocytochemical stain.Phosphorylated extracellular signal- regulated kinase 1/2 (P-ERK1/2) expression was detected by Western blot. *Results*: Danshensu could inhibit proliferation, collagen type Ⅰ synthesis and P-ERK1/2 expression of HSC stimulated by PDGF-BB. *Conclusion*: Danshensu can inhibit proliferation and Collagen type Ⅰ synthesis of HSC stimulated by PDGF-BB, the mechanism of which may be Danshensu, s inhibitory effect on ERK1/2 signal transduction pathway.

【Key words】 Danshensu; Hepatic stellate cell (HSC); Pdatelet derivde gnowth factor-BB (PDGF-BB); Extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK1/2)

丹参素是丹参水溶性成份的基本结构成份,现在的研究证明丹参素能够有效抑制肝星状细胞(Hepatic sellate cell,HSC)的活化增殖、胶原的表达,改善试验动物的纤维化程度,同时对肝细胞有保护作用[1,2],但丹参素对 HSC 抑制作用的分子机制鲜有报道。血小板衍生生长因子(Platelet derived growth factor-BB,PDGF-BB)是目前已知促 HSC 增殖最强的丝裂原,可通过激活 HSC 内的细胞外信号调节的酶 1/2(Extracellular signal-regulated kinase 1/2,ERK 1/2)通路促进 HSC 增殖、胶原表达[3],但除实验用的特异性抑制剂外,能有效抑制 PDGF-BB 激活 HSC 内 ERK1/2 通路的药物鲜有报道。探讨丹参素对 PDGF-BB 刺激的原代大鼠肝星状细胞 ERK1/2 信号转导通路的影响,可深入了解丹参素抗肝纤维化的分子机制,为药物的应用提供理论依据。

作者介绍:李 智(1981-),男,硕士,
研究方向:肝纤维化防治。

通讯作者:戴立里,男,教授,E-mail: dailili@cqums.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Wistar 大鼠 350~450 g(重庆腾鑫生物技术公司);链蛋白酶 E,Ⅳ型胶原酶,DMEM 高糖型培养基(美国 Gibco 公司);DNA 酶Ⅰ(美国 Sigma 公司);Nycodenze(挪威 Axis-Shield 公司);抗磷酸化 ERK1/2 抗体(美国 Santa Cruz 公司);PDGF-BB

(美国 PeproTech 公司);抗 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin α-SMA)抗体,抗Ⅰ型胶原抗体,SABC 免疫组化试剂盒,DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程公司);丹参素单体(四川省药品检验所)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 HSC 的分离、培养、鉴定 参照王文兵等的方法[1],大鼠麻醉、消毒,前腔静脉、门静脉插管,用 D-Hanks 液灌流肝脏至无肉眼可见血液后,改用酶消化液循环灌流,直至肝脏变软,取下肝脏用酶分散液消化,18%Nycodenze 密度梯度离心取液面层细胞,DMEM 洗 2 次,台盼蓝鉴定 HSC 活力;20%胎牛血清的 DEME 培养基重悬培养,24 h 后 10%胎牛血清的 DEME 培养基换液,以后每 2~3 d 换液 1 次,每 5~7d 传代 1 次。用抗 α-SMA 抗体 SABC 法做免疫细胞化学染色进行鉴定。

1.2.2 实验药物浓度的选择、分组及预处理 用传 3 代的 HSC 进行实验,根据预实验丹参素作用于肝星状细胞 24 h,抑制肝星状细胞的 IC_{50} 为 0.39 mmo/L,实验选取不大于 2/3 IC_{50} 浓度的丹参素即 0.062、0.125、0.250 mmol/L 浓度,在此浓度下丹参素不具有细胞毒性。分为 1 组,空白对照组(不施加任何药物干预);2 组,PDGF-BB 10 ng/ml 刺激组(仅加入 PDGF-BB 刺激);3 组,PDGF-BB 10 ng/ml + 丹参素 0.062 mmol/L 组;4 组,PDGF-BB 10 ng/ml + 丹参素 0.125 mmol/L 组;5 组,PDGF-BB 10 ng/ml + 丹参素 0.25 mmol/L 组。实验前各组细胞均通过血清饥饿 24 h 进行同步化,各组均选用同一大鼠的肝星状细胞。

1.2.3 MIT 比色法测定丹参素对 PDGF-BB 刺激的大鼠肝星状细胞增殖的影响 HSC 以 5×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板,每组设 9 复孔,培养 24 h 后同步化处理各组细胞,同步化处理后丹参素干预组细胞先以不同浓度丹参素处理 30 min,再用 PDGF-BB 刺激,作用 24 h;空白对照组不施加任何药物处理;PDGF-BB 组仅用 PDGF-BB 刺激,作用 24 h 后去上清,换无血清 DMEM 180 μl 及四甲基偶氮唑盐 20 μl 继续培养 4 h,吸出培养液加入 DMSO 150 μl,全自动酶标仪 490 nm 波长测定 OD 值。

1.2.4 免疫细胞化学染色法测定丹参素对 PDGF-BB 刺激的大鼠肝星状细胞Ⅰ型胶原合成的影响 将 HSC 接种于预置玻片的 24 孔板爬片,每组 3 复孔,同步化处理后丹参素干预组细胞先以不同浓度丹参素处理 30 min,再用 PDGF-BB 刺激,作用 24 h;空白对照组不施加任何药物处理;PDGF-BB 组仅用 PDGF-BB 刺激,作用 24 h。固定、灭活、穿透、封闭、一抗孵化、二抗孵化、试剂 SABC 孵化、DAB 显色、封片,具体步骤参照试剂盒说明书。每张染色片取 3 个区域拍照,北航 CMIAS2000-B 型真彩色医学图像分析系统处理,棕色颗粒为阳性,以平均光密度值进行统计分析。

1.2.5 Western blot 测定丹参素对 PDGF-BB 刺激的大鼠肝星状细胞 P-ERK1/2 表达的影响 同步化后,各丹参处理组细胞分别先以不同浓度丹参素处理 30 min,再用 PDGF-BB 刺激,作用 15 min;空白对照组不施加任何药物处理;PDGF-BB 组仅以 PDGF-BB 刺激,作用 15 min,立刻提取细胞蛋白进行 Western blot 检测。细胞总蛋白的提取采用 Satus Cruzs 公司方案。细胞裂解液裂解细胞,BCA 法检测蛋白浓度,-80℃冻存。每泳道以 60 μg 待测物上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转至硝酸纤维膜,抗 P-ERK1/2 一抗(1:500 稀释)4℃孵育过夜,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000 稀释)37℃1 h,采用 ECL 显色剂显色,胶片曝光,显影,定影。

1.2.6 统计学处理 所有数据均采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析,数据以平均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示,用方差分析和 SNK-q 检验分析结果。$P\leq0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞提取及鉴定

提取的 HSC 经台盼蓝染色,细胞存活率在 98%左右。传代培养的 HSC 其 α-SMA 表达阳性率在 99%以上,见图 1。

2.2 MTT 比色法测定丹参素对 PDGF-BB 刺激的大鼠肝星状细胞增殖的影响

PDGF-BB 刺激组与空白组比较 HSC 的增殖明显增加;不同浓度的丹参素作用组与 PDGF-BB 刺激组比较均能抑制 PDGF-BB 诱导的 HSC 增殖,随丹参素作用浓度增加抑制作用增强,见表 1。

2.3 SABC 免疫细胞化学染色法测定丹参素对 PDGF-BB 刺激的大鼠肝星状细胞Ⅰ型胶原合成的影响

与空白组比较 PDGF-BB 刺激后 HSCⅠ型胶原合成明显增强,丹参素+PDGF-BB 组与 PDGF-BB 组比较Ⅰ型胶原合成受到抑制,随丹参素浓度的增加抑制作用增强,见表 2,图 2。

2.4 Western blot 测定丹参素对 PDGF-BB 刺激的大鼠肝星状细胞磷酸化 ERK1/2 表达的影响

同步化处理后空白对照组未见 P-ERK1/2 表达,与空白组比较 PDGF-BB 刺激组 P-ERK1/2 明显表达,文献报道相符[4]。丹参素组可明显抑制 PDGF-BB 诱导的 P-ERK1/2 表达,随丹参素浓度的增加抑制作用增强。

3 讨 论

在肝纤维化发生发展过程中以肝星状细胞的活化增殖,分泌细胞外基质为纤维化过程的中心环

表 1 不同浓度丹参素对 PDGF-BB 刺激的大鼠 HSC 增殖的影响($\bar{x}\pm s$, n=9)

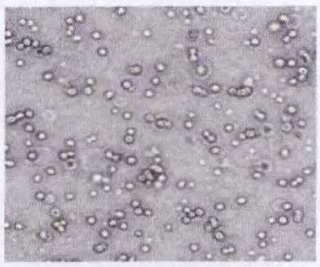
分组	OD 值
空白对照组	0.673 ± 0.053#
PDGF-BB 10 ng/ml 组	1.701 ± 0.066▲
PDGF-BB 10 ng/ml+ 丹参素 0.062 mmol/L 组	1.634 ± 0.062△
PDGF-BB 10 ng/ml+ 丹参素 0.125 mmol/L 组	1.486 ± 0.061★
PDGF-BB 10 ng/ml+ 丹参素 0.250 mmol/L 组	1.389 ± 0.079★

F=360.625, P<0.01;各组间两两比较用 SNK-q 检验:▲与 # 比较 P<0.01, △与▲比较 P<0.05, ★与▲比较 P<0.01, △与★比较 P<0.01, ★之间比较 P<0.01

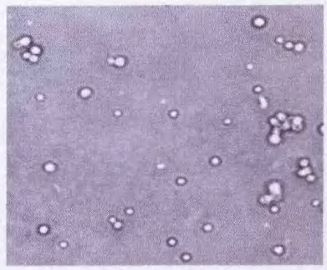
表 2 不同浓度药物对 PDGF-BB 刺激的大鼠 HSC Ⅰ型胶原合成的影响($\bar{x}\pm s$, n=9)

分组	平均光密度值
空白对照组	0.031 ± 0.009#
PDGF-BB 10 ng/ml 组	0.128 ± 0.006▲
PDGF-BB 10 ng/ml+ 丹参素 0.625 mmol/L 组	0.119 ± 0.006
PDGF-BB 10 ng/ml+ 丹参素 0.125 mmol/L 组	0.109 ± 0.007★
PDGF-BB 10 ng/ml+ 丹参素 0.250 mmol/L 组	0.097 ± 0.008★

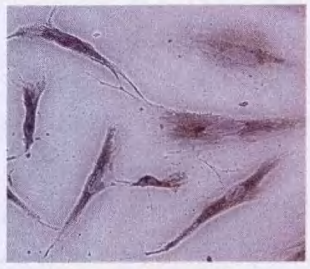
F=219.541, P<0.01;各组间两两比较用 SNK-q 检验:各组间两两比较用 SNK-q 检验:▲与 # 比较 P<0.01, △与▲比较 P<0.05, ★与▲比较 P<0.01, △与★比较 P<0.01, ★之间比较 P<0.01



A. 新分离的 HSC 细胞(SP × 100)



B. HSC 细胞台盼蓝染色(SP × 100)

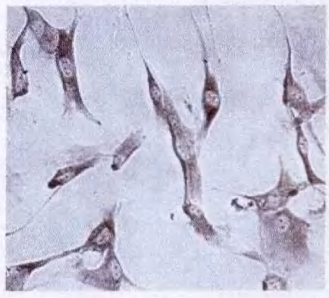


C. HSC 细胞 α-SMA 染色鉴定图(SP × 200)

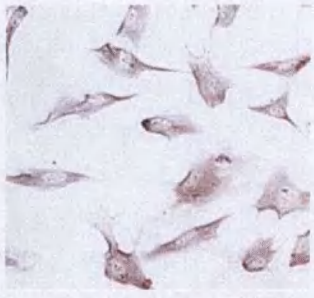
图 1 HSC 提取、鉴定结果



A. 空白对照组(SP × 200)



B. HSC 细胞台盼蓝染色(SP × 100)



C. HSC 细胞 α-SMA 染色鉴定图(SP × 200)

图 2 丹参素对 PDGF-BB 刺激的大鼠 HSC Ⅰ型胶原合成的影响

节,抑制肝星状细胞的上述特性是治疗肝纤维化的关键问题。

ERK1/2 是相对分子量为 44 kD 和 42 kD 的蛋白,与其上游的 RAF-A/B/1、MAPK/ERK 激酶 1/2 构成 ERK1/2 信号转导通路,ERK1/2 磷酸化活化后可以磷酸化一系列转录因子包括:Elk-1、c-Jun、c-FOS、AP-1 等进而调控细胞基因的转录和表达,并最终启动和调控细胞的增殖周期运行、分化、运动等生物学活动[5]。目前的大量研究发现 ERK1/2 通路在肝纤维过程中占据重要的位置。ERK1/2 通路参与了肝星状细胞的增殖、胶原的表达,该通路被抑制后肝星状细胞的增殖、胶原的表达明显减弱[6-8]。

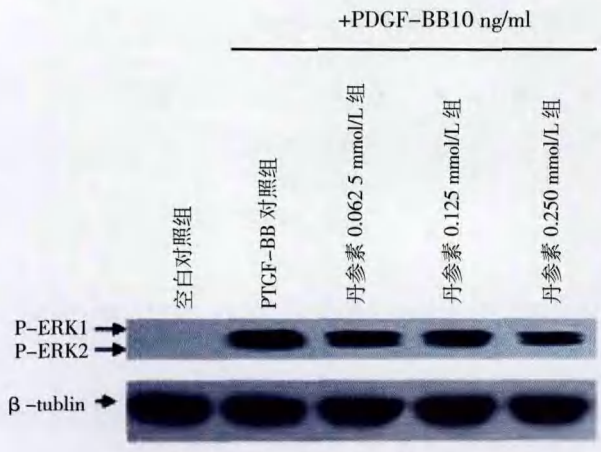


图 3　不同浓度丹参素对 PDGF-BB 刺激的大鼠肝星状细胞 P-ERK1/2 的影响

激活 ERK1/2 还可诱导 HSC 分泌 VEGF、TGF-β1 等多种重要的促纤维化细胞因子[9]。在纤维化大鼠模型中也发现，ERK1/2 的表达随纤维化程度的增强明显增加，并与 α-SMA 的表达和分布正相关[10]。因此抑制 HSC 内 ERK 通路就成为肝纤维化治疗的一个重要方向。

PDGF-BB 是促进 HSC 增殖最强的细胞因子之一，已有研究发现 PDGF-BB 作用于 HSC 后 15 min 可使 ERK1/2 达到最强激活状态并持续 30 min，之后自动去磷酸化[4]，ERK1/2 的特异性抑制剂能有效抑制 PDGF-BB 诱导的 ERK1/2 活化，但特异性抑制剂对人体有害不能用于临床，因此发现一种能有效抑制 PDGF-BB 刺激 ERK1/2 活化而又能用于临床的药物就具有重要的意义，目前在此方面鲜有报道。

中药丹参已被证明有明显的抗肝纤维化作用。丹参素是丹参水溶性成份的基本结构成份。丹参素以其多靶点效应在肝纤维化的防治中有重要的应用前景。既往的实验证明丹参素能有效抑制正常培养 HSC 的增殖，Ⅰ、Ⅲ型的胶原表达，肝纤维化状态时肝脏 PDGF-BB、TGF-β_1 等细胞因子水平增高促进纤维化的发展，动物实验证明丹参素可改善大鼠肝脏纤维化程度[2]，但是丹参素对抗细胞因子的作用，及作用的分子机制未见报道。本实验首先观察了丹参素对 PDGF-BB 刺激条件下 HSC 增殖和Ⅰ型胶原合成的影响，结果发现丹参素可有效抑制 PDGF-BB 诱导的 HSC 增殖和Ⅰ型胶原合成，随丹参素浓度的增加作用增强。ERK1/2 通路在 HSC 增殖和胶原表达方面有重要作用，由此我们进一步研究了丹参素对 HSC 内 P-ERK1/2 表达的影响，结果发现丹参素可抑制 PDGF-BB 诱导的肝星状细胞 HSC 内 P-ERK1/2 的表达。提示丹参素对 PDGF-BB 刺激的大鼠肝星状细胞增殖、Ⅰ型胶原合成的影响可能与抑制 ERK1/2 通路有关。通过本实验我们初步了解丹参素抗肝纤维化的分子机制，为药物的临床应用提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] 王文兵，戴立里，郑元义. 改良原位循环灌流法大鼠肝星状细胞分离培养及鉴定[J]. 中华肝脏病杂志，2004，10(12)：629-630.

[2] 李　欣，戴立里，彭小东，等. 4 种中药单体的抗肝纤维化作用及机制研究[J]. 中华肝脏病杂志，2008，16(3)：193-197.

[3] Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells[J]. Front Biosci，2002，7：1720-1726.

[4] Maria F，Arrilena M C，Fazi M，et al.Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factors actions in hepatic stellate cells，and is induced by in vivo liver injury in the rat [J]. Hepatology，1999，30(4)：951-958.

[5] Yang S H，Sharrocks A D，Alan J.Whitmarsh.Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades[J].Gene，2003，320(27)：3-21.

[6] Svegliati B G，Saccomanno S，van G H，et al. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells [J]. Liver，2001，21(1)：1-12.

[7] Qiang H，Lin Y，Zhong X，et al.Differential expression genes analyzed by cDNA array in the regulation of rat hepatic fibrogenesis[J]. Liver Int，2006，26(9)：1126-1137.

[8] 李　冬，戴立里，余斌斌.丹参素对大鼠肝星状细胞增殖、凋亡及 VF-κB 活性的影响[J].第三军医大学学报，2009，31(8)：724-728.

[9] Tsukadas，Parsons C，Rippe R，et al. Mechanisms of liver fibrosis [J]. Clin Chim Acta，2006，364(5)：33-60.

[10] Zhang X L，Liu J M，Yang C C，et al .Dynamic expression of extracel lular signal-regulated kinase in rat liver tissue during hepatic fibrogenesis [J]. World J Gastroenterol，2006，12(39)：6376-6381.

（责任编辑：冉明会）