基础研究 文章编号：0253-3626(2009)02-0182-04

丹参素对转化生长因子 β1 刺激肝星状细胞信号传导的影响

郑 磊，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：探讨丹参素对转化生长因子 β1（Transformation growth factor，TGFβ1）刺激大鼠肝星状细胞（Hepatic stellate cell，HSC）信号传导通路的影响。方法：体外分离、培养大鼠肝 HSC，检测丹参素（0.062 5～0.250 0 mmol/L）对 TGFβ1 促进 HSC 活化、HSC 表达 α-SMA 和 HSC 表达 Smad2、Smad3、Smad7 mRNA 的影响。结果：丹参素（0.062 5～0.250 0 mmol/L）对 TGFβ1 引起的 HSC 增殖具有明显的抑制作用，并呈剂量依赖性（$P<0.05$）。0.25 mmol/L 丹参素对 HSC 作用 48 小时能下调 α-SMA 的表达（$P<0.05$），也能下调 TGFβ1 诱导的 HSC α-SMA 表达（$P<0.05$），从而抑制 HSC 活化。TGFβ1 促进 HSC 中 Smad2、3、7 mRNA 的表达；丹参素能下调 TGFβ1 诱导的 HSC 中 Smad2、Smad3 mRNA 的表达并能上调 Smad7 mRNA 表达（$P<0.05$）。结论：丹参素能上调 HSC 中 Smad7 mRNA 表达，并下调 Smad2、Smad3 mRNA 表达，恢复正常的 TGFβ1 跨膜信号转导，抑制 HSC 活化和 TGFβ1 促进 HSC 活化的作用。

【关键词】丹参素；肝星状细胞；转化生长因子-β1；Smads；信号转导
【中国图书分类法分类号】R285.5；R575.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-24

Effects of Danshensu on TGF β 1 stimulated hepatic stellate cell signal transduction

ZHENG Lei, et al
(*Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of Danshensu on TGF β 1 stimulated signal transduction in rat hepatic stellate cells (HSCs). *Methods*: The mice HSCs were isolated and cultured for the following study. HSC were treated with different concentration Danshensu (0.062 5 ~ 0.250 0 mmol/L) and TGF β 1 to detect the proliferation, α-SMA protein expression and the chang of Smad2, Smad3, Smad7 mRNA. *Results*: (1) Danshensu in the concentration of 0.062 5 ~ 0.250 0 mmol/L could prevent the proliferation of HSC induced by TGF β 1 in a dose-dependent manner ($P<0.05$). (2) The concentration of 0.250 0 mmol/L Danshensu could downregulate α-SMA protein expression at 48th hour in HSC, with or without stimulation of TGF β 1 ($P<0.01$), and the activation of HSC was inhibited also. (3) TGF β 1 increased the mRNA level of Smad2, 3, 7 in HSC; Danshensu could downregulate the mRNA level of Smad2, 3 and upregulate the mRNA level of Smad7 in HSC induced by TGF β 1 ($P<0.01$). *Conclusion*: Danshensu could restore the normal transmembrane signal of TGF β 1 through upregulation of Smad7 mRNA expression and downregulation of Smad2, Smad3 mRNA expression in HSC.

【Key words】Danshensu; Transforming growth factor β 1; Signal transduction

目前认为肝星状细胞（Hepatic stellate cell，HSC）的激活是肝纤维化形成的中心环节[1]。HSC 活化启动后发生一系列表型改变，其中 HSC 通过自分泌细胞因子包括转化生长因子β1（Transforming grouth factorβ1，TGF-β1）、血小板衍生生长因子（Platelet-derived growth factor，PDGF）等对 HSC 活化的持久延续起重要作用。这些因子反馈作用 HSC，通过 HSC 表面的受体引起细胞内信号传导，并不断刺激自身的分裂增殖并大量合成和分泌胶原等各种细胞外基质（Extracellular matrix，ECM），结果使 ECM 成分在肝内异常沉积，最终导致肝纤维化[1]。业已证实 TGF-β1 是刺激 HSC 激活和分泌 ECM 作用最强的细胞因子，它在肝纤维化的发生发展中起关键作用[2]。目前研究发现，TGFβ1 主要通过细胞内 Smads 蛋白的信号转导，调控胶原基因表达[1]。丹参素是中药丹参水溶性成分中的主要药效成分之一，能有效改善肝脏炎症、减轻细胞外基质沉积和胶原蛋白表达，具有较好的抗肝纤维化作用[3]。本研究旨在观察丹参素对 TGFβ1 刺激的 HSC 影响，以及此过程中 TGFβ1 下游 Smads 信号分子表达的变化。

作者介绍：郑 磊（1981-），男，硕士，
研究方向：肝纤维化防治。
通讯作者：戴立里，男，主任医师，E-mail:dailili@cqums.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 Wistar 雄性大鼠 350~450 g，购自重庆腾鑫生物技术公司。饲养于重庆医科大学实验动物中心的无特定病原体(SPF)环境中，所用饲料、饮水及垫料均经高压灭菌处理。

1.1.2 主要试剂及仪器 链蛋白酶 E、Ⅳ型胶原酶、DMEM 高糖型培养基购自美国 Gibco 公司；Nycodenze 购自挪威 Axis-Shield 公司；TGFβ1 购自美国 PeproTech 公司；抗 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin，α-SMA)单克隆抗体、抗结蛋白(desmin)抗体、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司；丹参素单体购自四川省药品检验所；RNA 抽提试纯化试剂盒、二步法逆转录聚合酶链反应(RT—PCR)试剂盒购自大连宝生物公司。实验设备由重庆医科大学附属第二医院超声研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 HSC 分离和培养 参照王文兵等[4]改良大鼠 HSC 分离法。腹腔内注射水合氯醛麻醉大鼠，门静脉插管，以 D-HanK's 液、灌注液次序灌流。分离肝组织，分散液消化、过滤，反复混悬离心清洗，弃上清，18% Nycodenz 梯度离心，于梯度界面获取 HSC，以含 20%胎牛血清(Fetal bovine serum，FBS)的 DMEM 培养基(FBS/DMEM)调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml，接种于塑料培养瓶中，置 37℃、5%CO_2 培养箱培养，24 h 后更换培养基为 10%FBS/DMEM，2~3 d 换液 1 次，细胞将融合时，用胰蛋白酶消化传代。实验用细胞为第 3 代 HSC。以台盼蓝染色法鉴定细胞活力。细胞性质采用 SABC 免疫细胞化学染色法检测细胞 α-SMA。新分离 HSC 活力达 96%~98%，传 1 代培养 7 d 的 HSC 抗 α-SMA 单克隆抗体阳性染色均达 99%以上。

1.2.2 MTT 法测丹参素对 TGFβ1 刺激的 HSC 增殖影响 实验分正常对照组、TGFβ1 组(加入 5 ng/ml TGFβ1)和联合处理组(加入 5 ng/ml TGFβ1 和不同浓度丹参素)。将传代的 HSC 接种于无菌的 96 孔培养板中，生长至 80%以上融合度时，全部换含 0.4%FBS/DMEM 同步化处理 24 h 后，TGFβ1 组换含 5 ng/ml TGFβ1 的培养液；联合处理组用 5 ng/ml TGFβ1 预处理 30 min 后[5]，再加入丹参素至终浓度 0.062 5、0.125、0.25 mmol/l(浓度筛选根据预实验中细胞半数抑制浓度 1/3~2/3 范围时的丹参素浓度得出)；正常对照组培养液为 2% FBS/DMEM，每组 6 复孔(最终各组含 FBS 的浓度为 2%)；作用 44 h 后，向每孔加入 MTT 溶液，继续孵育 4 h，然后加入二甲基亚砜裂解细胞，酶标测试仪测定 A 值，测定波长为 490 nm，参考波长为 630 nm，酶标仪所示 A 值为 A490 减去 A630，以消除非特异性光吸收效应。

1.2.3 免疫细胞化学染色法检测 α-SMA 的表达 实验分正常对照组(1 组)；丹参素组(2 组)：加入丹参素(终浓度 0.25 mmol/L)；TGFβ1 组(3 组)：加入 5 ng/mLTGFβ1；联合处理组 (4 组)：在 3 组基础上加入丹参素 (终浓度 0.25 mmol/L)。最终各组含 FBS 的浓度为 2%。取培养于 24 孔板的细胞，待细胞培养至对数生长期接近 80%融合时，用无血清 DMEM 洗涤细胞 2 次，再用含 0.4%FBS/DMEM 同步化处理 24 h，按以上分组作用 48 h，采用 SABC 免疫细胞化学染色法进行 α-SMA 染色，DAB 显色。北航 CMIAS2000-B 型病理真彩色图像分析系统对阳性染色程度进行定量分析，以灰度强弱表示蛋白表达情况，灰度值愈大表达愈强。

1.2.4 RT-PCR 检测 Smad2、3、7 mRNA 表达 按"免疫细胞化学染色法检测 α-SMA 表达"中进行分组并培养细胞 48 h。用 RNA 抽提纯化试剂盒提取细胞总 RNA 进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 引物如下：β-肌动蛋白(β-actin)上游：GACCCAGATCATGTTTGAGACC，下游：GCAGTAATCTCCTTC TGCATCC，退火条件：57℃，1 min，共循环 30 次，扩增片段大小 600 bp；Smad2 上游：AAGCCATCAC CACTCAGAATTG，下游：CACTGATCTACCGTATTTGCTGT，退火条件：53 ℃，1 min，共循环 30 次，扩增片段大小 100 bp；Smad3：上游：GGTGTGCGGCTCTACTACATT，下游：CTGGTCACTGTCTGTCTCCTGT，退火条件：55℃，1 min，共循环 30 次，扩增片段大小 296 bp；Smad7 上游：GGTGCTCAAGAAACTCAAGGAG，下游：AGTAAGGAGGAGGGGGAGACT，退火条件：57℃，1 min，共循环 30 次，扩增片段大小 338 bp。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳，Quantity One 4.5.0 软件进行分析，以各目的基因与 β-actin 的吸光度比值表示 mRNA 水平。

1.2.5 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，数据处理用 SPSS 13.0 软件包，采用 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 丹参素对 HSC 增殖的影响

5 ng/ml 的 TGFβ1 对 HSC 的增殖具有明显的促进作用($P<0.01$，表 1)；而丹参素则对 5 ng/ml TGFβ1 引起 HSC 的增殖具有明显的抑制作用，且随着丹参素浓度的增加细胞增殖下降，并呈剂量依赖性($P<0.01$，表 1)；据此选择 0.25 mmol/L 丹参素作为后续实验最佳作用浓度。

2.2 丹参素对 TGFβ1 刺激的大鼠 HSCα-SMA 表达的影响

免疫细胞化学染色显示，培养 48 h 的 HSC 经过 0.25 mmol/L 的丹参素作用 48 h 后，α-SMA 表达与正常对照相比，该组细胞浆染色程度变浅，平均光密度值降低($P<0.05$，表 2)，TGFβ1 组与正常对照相比，该组细胞胞浆呈明显棕色，平均光密度值明显增加($P<0.01$，表 2)，经过 TGFβ1 刺激后的 HSC，予以 0.25 mmol/L 的丹参素作用 48 h 后，与单纯 TGFβ1 刺激组相比细胞胞浆的染色程度变浅，平均光密度值降低($P<0.01$，表 2)。

2.2 RT-PCR 法检测 Smad2、3、7mRNA 表达

由表 3 和图 1 可见：与正常对照组相比，在 TGFβ1 刺激组可明显促进 HSC 中 Smad2、Smad3 、Smad7 mRNA 表达($P<0.01$)，而丹参素组则可下调 HSC 中

表 1　丹参素对 TGFβ1 刺激的大鼠 HSC 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	丹参素(mmol/L)	TGFβ1(ng/mL)	A 值
正常对照组	–	0	0.765 ± 0.16
TGFβ1 组	–	5	1.466 ± 0.2▲
联合处理组	0.062 5	5	1.408 ± 0.12★
	0.125	5	1.352 ± 0.17★
	0.25	5	1.276 ± 0.15◆

注：▲与对照组相比 $P<0.05$，★与 TGFβ1 组相比 $P<0.05$，◆与 TGFβ1 组相比 $P<0.05$

表 2　丹参素对 TGFβ1 刺激的 HSC 中 α-SMA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	平均光密度值
1 组(正常对照组)	0.021 ± 0.0035
2 组(丹参素组)	0.012 ± 0.0030▲
3 组(TGFβ1 组)	0.102 ± 0.0025★
4 组(联合处理组)	0.076 ± 0.0021◆

注：▲与对照组相比 $P<0.05$，★与 TGFβ1 组相比 $P<0.05$，◆与 TGFβ1 组相比 $P<0.05$

Smad2、Smad3 mRNA 表达并上调 Smad7 mRNA 表达($P<0.01$)；与 TGFβ1 刺激组相比，联合处理组可抑制 TGFβ1 刺激所致 HSC 中 Smad2、Smad3 mRNA 表达的上调($P<0.05$)并可进一步上调 Smad7 mRNA 表达($P<0.05$)。

3　讨　论

目前认为 HSC 的激活是肝纤维化形成的中心环节[1]。HSC 活化后，增殖旺盛，合成胶原等 ECM 的能力增强，降解基质蛋白的能力减弱，结果使 ECM 成分在肝内异常沉积，最终导致肝纤维化[1]。

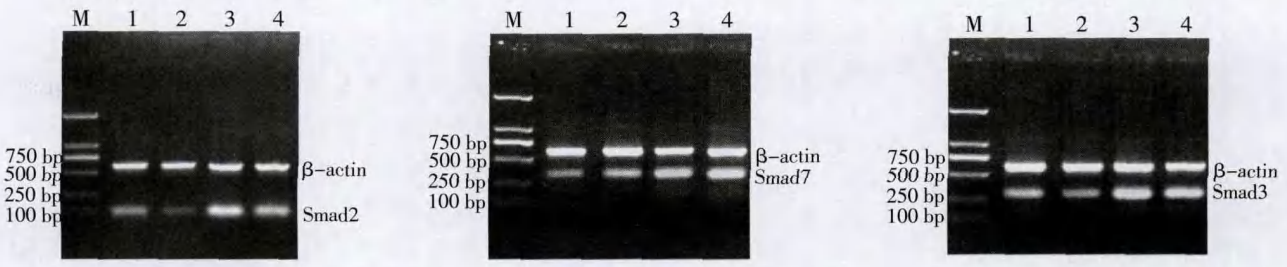
业已证实 TGF-β1 是刺激 HSC 激活和分泌 ECM 作用最强的细胞因子，它在肝纤维化的发生发展中起关键作用[2]。TGFβ1 主要通过 HSC 内的 TGFβ1/TβR/Smads 信号途径，发挥其促进 HSC 合成 α-SMA 和 ECM 的生物学效应[6]。SMAD 蛋白是唯一的 TGFβ1 受体后信使分子，介导 TGFβ1 信号从细胞膜传入细胞核[6]，根据其在 TGFβ1 信号转导中作用，SMAD 蛋白可分为三类：受体调控型 Smad，可被活化的 TβR-I 识别，是 TGFβ1 受体复合物下游作用的靶分子，参与 TGFβ1 信号传导的是 Smad2 和 Smad3；通用性 Smads，主要同受体调控型 Smad 结合，是 TGFβ1 信号转导必需的中转分子，主要包括Smad4；抑制性 Smads，如 Smad7，通过干扰受体调控型 Smad 的活化来阻断 TGFβ1 的生物效应。

德国学者 Breitkopf K 等[7]认为，通过阻断 TGFβ 信号转导（如阻断 TGFβ 受体后作用，即通过干预

表 3　各组肝星状细胞中 Smad 2、3、7 mRNA 的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	Smad2	Smad3	Smad7
1 组(正常对照组)	0.411 ± 0.014	0.616 ± 0.020	0.526 ± 0.021
2 组(丹参素组)	0.172 ± 0.033▲	0.401 ± 0.017▲	0.766 ± 0.033▲
3 组(TGFβ1 组)	0.913 ± 0.015▲	0.943 ± 0.025▲	0.818 ± 0.016▲
4 组(联合处理组)	0.796 ± 0.014★	0.866 ± 0.018★	0.938 ± 0.014★

注：▲与正常对照组相比 $P<0.01$，★与 TGFβ1 组相比 $P<0.05$



注：图标中所用字数代表分组数，第 1 组：正常对照组；第 2 组：丹参素组；第 3 组：TGFβ1 组；第 4 组：联合处理组

图 1　逆转录聚聚合酶链反应法检测 Smad2、3、7 mRNA 的表达

SMAD 来抑制 TGFβ 作用),可以阻止并逆转肝纤维化。目前许多中药研究也开始关注对 TGFβ-Smad 信号传导通路的干预作用,试图从分子水平探索中药抗肝纤维化的机制,如周朝晖等[8]研究发现,中药甘草酸能抑制四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠肝组织 smad2 的表达,从而使 TGFβ 的信号转导受到抑制。宋仕玲等[9]则观察到复方金三莪能促进肝纤维化大鼠肝组织 Smad 7 表达、抑制 Smad 3 表达的作用。这些研究表明,调节关键的 Smad 分子表达水平是行之有效的抗纤维化措施,也是有用的疗效判定指标。

丹参素是丹参水溶性成分中的主要药效成分之一,本课题组的前期研究发现,丹参素能下调肝组织中 TGFβ1 表达、显著抑制 HSC 的Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白表达,明显改善实验动物肝纤维化的程度[3]。本研究发现,丹参素能抑制 HSC 增殖及其活化标志物 α-SMA 表达,也能抑制 TGFβ1 诱导的 HSC 增殖及 α-SMA 表达,提示 HSC 的增殖、活化被抑制。由于肝损伤因子清除后肝纤维化继续进展,其中 1 个重要原因是活化的 HSC 分泌 TGFβ1,作用于周边静止期 HSC,诱导和加速其活化、增殖[10];本研究发现,丹参素能抑制 HSC 活化和 TGFβ1 促其活化的作用,而丹参素可能通过 TGFβ1/Smads 信号通路干扰 TGFβ1 的生物效应发挥这一作用。Smads 蛋白是 HSC 内 TGFβ 跨膜信号转导的主要信号分子,HSC 活化时,这一信号通路发生质与量的变化,顺应 HSC 活化与功能变化的要求[10,11]。张国等[12]研究发现在基因转录水平,Smad3 mRNA 的表达升高伴随肝纤维化发生、发展的全过程,而 Smad7 这一 HSC 内唯一的负反馈调节因子其 mRNA 水平在肝纤维化的早期阶段升高,到肝纤维化发展阶段,呈下降趋势。Dooley 等[11]研究发现,当 HSC 转化为肌成纤维样细胞后则出现 Smad2 持续磷酸化,抑制性 Smad7 表达低下,不能阻断 Smad2 介导的肝纤维化信号,这也许是肝纤维化持续进展的分子生物学基础之一。本研究发现,培养 48 h 的 HSC 对 TGFβ1 刺激信号仍是敏感的,给予 TGFβ1 作用后 Smad7 和 Smad2、3 mRNA 水平均明显上升,尽管 Smad7 的负反馈调节仍存在,但是不足以抑制 TGFβ1 对 HSC 的活化导致的 Smad2、3 mRNA 增加;丹参素则通过某种机制进一步上调 Smad7 mRNA 表达并抑制 Smad2、3 mRNA 的表达,抑制 HSC 活化,这一作用也可以从 Dooley 等[13]所见使 Smad7 基因和蛋白过度表达可以阻断 HSC 的激活、α-SMA 的表达和肝纤维化的进展中得到支持。

体内 TGFβ1 往往以潜活形式存在,其完整信号传导过程包括细胞外活化、跨膜与胞内传导过程等方面。本实验虽已了解丹参素干预 HSC 内 TGFβ1 信号传导的部分重要作用,但对于药物是否影响 TGFβ1 的胞外激活与 HSC 信号跨膜,是否影响 HSC 内其他信号分子的作用等,尚需进一步研究,以期明确丹参素干预 HSC 中 TGFβ1 信号转导,达到抗纤维化作用的关键机制。

参 考 文 献

[1] Marra F.Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation [J]. J Hepatol,1999,31:1120-1130.

[2] De Bleser P J,Niki T,Rogiers V,et al. Transforming growth factor-beta gene experssion in normal and fibrotic rat liver[J]. J Hepatol, 1997,26(4):886-893.

[3] 李 欣,戴立里,张文利. 四种中药单体的抗肝纤维化作用及机制研究[J].中华肝脏病志,2008,16(3):193-197.

[4] 王文兵,戴立里,郑元义.改良大鼠 HSC 分离及性质鉴定[J].中华肝脏病志,2005,14(3):239-242.

[5] Runyan C E,Schnaper H W,Poncelet A C. The role of internalization in transforming growth factor betal-induced Smad2 association with Smad anchor for receptor activation (SARA) and Smad2-dependent signaling in human mesangial cells[J]. J Biol Chem,2005,280:8300-8308.

[6] Heldin C H,Miyazono K,Dijke P T,et al. TGF-β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. Nature,1997,390 (6659):465-471.

[7] Breitkopf K,Haas S,Wiercinska E,et al. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2005,29(11):121s-13ls.

[8] 周朝晖,蔡 瑜,沈锡中,等.甘草酸对四氯化碳肝纤维化大鼠肝组织 smad2 免疫组织化学表达的影响[J]. 肝脏,2006,11(1):35-36.

[9] 宋仕玲,龚作州,张全荣. 金三莪对肝纤维化大鼠 TGFβ1 及其Ⅰ、Ⅱ型受体 mRNA 与 Smad 3、Smad 7 表达的影响[J]. 中医药学刊, 2004,22:1044-1047.

[10] Shek F W,Benyon R C. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2004,16:123-126.

[11] Dooley S,Delvoux B,Streckert M,et al. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation,a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts TGF-beta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells[J]. FEBS Lett,2001,502:4-10.

[12] 张 国,王天才,唐望先,等. Smad3、Smad7 基因表达与肝纤维化发病关系研究[J]. Chin J Dig,2002,11:647-650.

[13] Dooley S,Hamzavi J,Breitkopf K,et al. Smad 7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats[J]. Gastroenterology, 2003,125(1):178-191.

(责任编辑:冉明会)