重庆维普 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)09-1054-04

柳氮磺胺吡啶对 HSC-T6 和 L02 细胞增殖和凋亡的初步观察

朱慧利[1],沈 薇[1],陈忠勇[2]

(1. 重庆医科大学附属第二医院消化内科,重庆 400010;2. 凉山州第二人民医院肝胆外科,西昌 615000)

【摘 要】目的:探讨柳氮磺胺吡啶(Sulfasalazine,SASP)对正常肝细胞和肝星状细胞(Hepatic stellate cell,HSC)增殖和凋亡的影响。方法:以正常人肝细胞株(L02 细胞)和大鼠肝星状细胞株(HSC-T6 细胞)为研究靶细胞,用 CCK-8 比色法检测细胞增殖;流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染检测 HSC-T6 细胞凋亡率;AO/EB 染色法观察细胞凋亡形态。结果:同对照组比较,一定浓度范围的 SASP 对 HSC 的增殖具有显著的抑制作用,呈现时间和剂量效应。膜联蛋白(Annexin V)/碘化丙啶(PI)双染显示 SASP 诱导 HSC-T6 凋亡也呈现时间和剂量效应;AO/EB 染色出现凋亡细胞的特征性改变。而 SASP 干预 L02 后,与对照组相比,增殖和凋亡率均无统计学意义, AO/EB 染色后,未出现凋亡细胞。结论:同等干预浓度的 SASP 能够选择性的抑制 HSC 增殖,诱导其凋亡。

【关键词】HSC-T6;L02;增殖;凋亡;柳氮磺胺吡啶

【中国图书分类法分类号】R329.2+8 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-02

Preliminary observation on proliferation and apoptosis of HSC-T6 and L02 induced by sulfasalazine

ZHU Hui-li, et al

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

【*Abstract*】 *Objective*: *To* investigate the effect of sulfasalazine on proliferation and apoptosis of HSC-T6 and L02 in culture. *Methods*: HSC-T6 and L02 were incubated with different concentration of sulfasalazine. Cell proliferation was assessed by CCK-8 assay, cell apoptosis was analyzed by annexin V FITC/PI flow cytometry; and apoptotic morphology was examined by vital staining of acridine orange/ethidium bromide (AO/EB). *Results*: Compared with the control group, the proliferation of HSC-T6 was significantly inhibited by sulfasalazine in a time and dose-dependant manner, when the concentration of sulfasalazine in the medium reached a certain level range. The HSC-T6 apoptotic induced by sulfasalazine was confirmed by AO/EB and annexin V FITC/PI. compared with the control group, the proliferation and apoptosis rate of L02 treated by group had no statistical significance, and AO/EB staining showed no apoptosis. *Conclusion*: Sulfasazinea at the same concentration can specifically inhibit the proliferation of HSC and induce HSC apoptosis.

【Key words】 HSC-T6; L02; Proliferation; Apoptosis; Sulfasalazine(SASP)

HSC 凋亡是肝纤维化逆转的重要机制,而肝细胞凋亡是肝纤维化形成的重要促进因素,因此寻找特异性诱导 HSC 凋亡的治疗途径对于抗肝纤维化具有非常重要的意义。SASP 从 20 世纪 40 年代由 5-氨基水杨酸和磺胺吡啶通过偶氮键合成了 SASP,主要用于治疗溃疡性结肠炎和克隆病。已有研究表明,SASP 可选择性诱导多种细胞类型的凋亡[1-4],其机制尚不清楚。它对肝星状细胞和正常肝细胞的凋亡有无影响报道甚少。我们以 SASP 为诱导剂,观察SASP 在体外对正常人肝细胞株(L02)和大鼠肝星形细胞株(HSC-T6)增殖和凋亡的影响,试图探讨 SASP 是否能成为抗肝纤维化的有效药物。

作者介绍:朱慧利(1981-),女,硕士,
研究方向:肝纤维化机制。

通讯作者:沈 薇,女,教授,E-mail:shenwei315@163.com。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 购自北京肿瘤研究所;正常人肝细胞株 L02 购自中国科学院上海分院细胞所。SASP 美国 Sigma 公司产品,少量二甲基亚砜(DMSO)溶解,配成 0.1mol/L 的

重庆维普 http://www.cqvip.com

贮存溶液,-20℃保存。临用时以培养液稀释,DMSO 终浓度＜0.1%。Cell Counting Kit-8 Assay(CCK-8 试剂盒)为碧云天产品;Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒为南京凯基产品。其余试剂为国产(分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 Cell Counting Kit-8 Assay(CCK-8 试剂盒)检测 SASP 对 HSC-T6 增殖的影响 基本操作步骤:(1) 将制备好的 HSC-T6 的单细胞悬液,用 RPMI1640 培养基(含 10%胎牛血清)调整细胞浓度到 2×10^5 个 /ml,每孔 100μl,接种于 6 个 96 孔培养板内,分别培养 24h。(2)设 8 个浓度梯度(0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16mmol/L)和 1 个对照组和 0.1%DMSO 对照组。设立严格的药物对照孔,设 12 个平行孔,弃掉原培养基,向每孔加入含药培养基 100μl,置 37℃、5%CO_2 培养箱内分别培养 12、24、48h。(3)作用不同时间后,加入 10μl 的 CCK-8,在培养箱内培养 1h 后,在酶标仪 450nm 波长处测定吸光度(OD)值。抑制率 =(1- 药物组 OD 值 / 对照组 OD 值)×100%,实验重复 3 次。NOSA 2.30 软件 Bliss 法计算 IC_{50}。结果判定:取合适的干预时间的接近 1/3 ~ 2/3 的 IC_{50} 浓度用于后继实验。

1.2.2 CCK-8 法检测 SASP 对 L02 增殖的影响 根据筛选后的浓度分组,设立对照和 DMSO 对照组。方法同上。

1.2.3 Annexin-V/PI 双标记流式细胞术 收集细胞,PBS 漂洗 2 次,用 10μl Annexin-V 和 5μl PI 进行染色,避光作用 10 min 后,将细胞置激发光为 488 nm 波长的FACS Calibur 型流式细胞仪检测,上机测定时获取 2×10^5 个以上细胞,重复 2 次。用 ModFit LT 软件分析结果。染色后将细胞分为 3 个亚群:活细胞胞膜完整,磷酯酰丝氨酸(Phosphatidylserine,PS)无外化,为 Annexin-V^-/PI^- 亚群;早期凋亡细胞胞膜完整,PS 外化,为 Annexin-V^+/PI^- 亚群;晚期凋亡或坏死细胞胞膜不完整,PS 外化,为 Annexin-V^+/PI^+ 亚群。

1.2.4 细胞核荧光染色观察 取对数生长期细胞,加入不同浓度的药物,设立对照组和 0.1%DMSO 对照组,作用 12、24、48h,分别收集各组细胞。各取 1ml 浓度为 100μg/ml 的 AO、EB 等量混合,将各组细胞调整为 1×10^{10} 个 /L 细胞悬液,吸取 95μl 细胞悬液,加 5μl 的 AO/EB 混合液,吸 1 滴点于洁净的玻片上,直接用盖玻片封片,3min 内荧光显微镜下观察拍照,蓝光,510nm 激发波长。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 软件包进行方差分析。

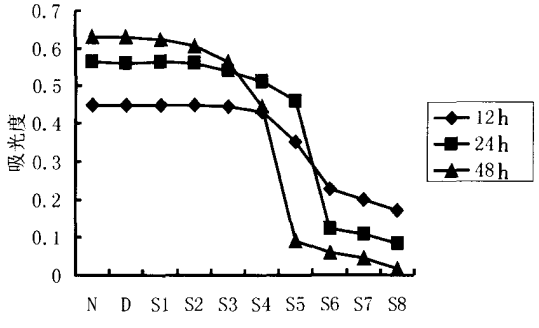
2 结 果

2.1 SASP对 HSC-T6 增殖和凋亡的影响

2.1.1 SASP 对 HSC-T6 的体外增殖的影响 CCK-8 法检测结果显示,SASP 在较低浓度时(0.125、0.25mmol/L),对 HSC-T6 细胞的增殖无明显影响,与对照组相比无统计学差异,SASP 05、1、2、4、8、16mmol/L6 个浓度组均抑制 HSC-T6 的增殖,培养时间越长、药物浓度越大,抑制作用越明显,呈时间、浓度依赖性。培养 12、24 和 48h,SASP 抑制 HSC-T6 细胞增殖的 50%抑制浓度(IC_{50})分别为 6.53、2.84、1.5mmol/L。结合文献,我们取接近 24h 的 1/3 ~ 2/3 的 IC_{50} 浓度(0.5、1、2mmol/L)进行后继实验(见图 1)。

2.1.2 SASP对 HSC-T6 凋亡的影响 不同浓度SASP(终浓度 0.5、1、2mmol/L)分别处理 HSC-T6 细胞12、24、48h 后,其凋亡率见表 1。其诱导凋亡作用随药物浓度增加和作用时间的延长而增强。且随浓度和作用时间的延长,晚期凋亡细胞增多(Annexin-V^+/PI^+)。

2.1.3 AO/EB 染色细胞凋亡形态学观察 高倍镜下(400 倍),正常的细胞饱满,胞膜光滑,发光均匀,具有完整、同形绿染的细胞核(图 2)。早期凋亡的细胞形状不规则,为固缩状或囊泡状绿色,也有完整的细胞核,晚期凋亡细胞呈完整或不完整的橙红色的细胞。如图 3 所示,2mmol/L 的 SASP 作用于 HSC-T6 24h 后,细胞即发生凋亡的形态学改变,以早期凋亡



注:N.对照组;D. 0.1DMSO 对照组;S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8 分别为 SASP 0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16mmol/L

图 1 SASP对 HSC-T6 增殖的影响

表 1 SASP对 HSC-T6 凋亡的影响

分组	凋亡率(%)					
	12h		24h		48h	
	早期	晚期	早期	晚期	早期	晚期
N	0.3	1.23	0.86	0.88	1.02	1.64
D	0.87	1.02	2.06	1.36	2.16	2.45
S3	1.04	1.03	3.53	3.43	5.4	9.14
S4	2.41	1.36	4.78	7.31	6.78	16.57
S5	3.81	2.34	6.37	10.35	10.31	21.46

注:N 为对照组;D 为 0.1%DMSO 对照组,S3、S4、S5 分别为 SASP0.5、1、2mmol/L。

重庆维普 http://www.cqvip.com

为主。作用 48h 后,晚期凋亡细胞增多(图 4)。

2.2 SASP 对 L02 增殖和凋亡的影响

2.2.1 SASP 对 L02 体外增殖的影响 CCK-8 法检测结果显示,SASP 对 L02 的增殖无明显影响,药物作用 12、24、48h 后,无明显的时间和剂量依赖性,处理组与对照组相比($P>0.05$)差异无统计学意义(表 2)。

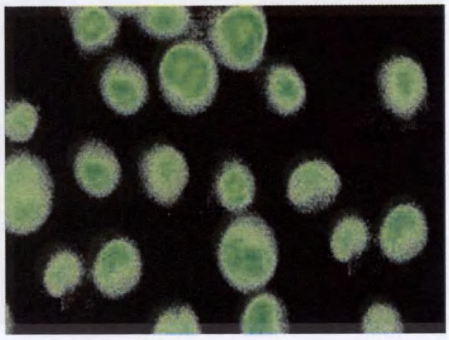


图 2 正常对照组 24hHSC-T6(AO/EB×400)

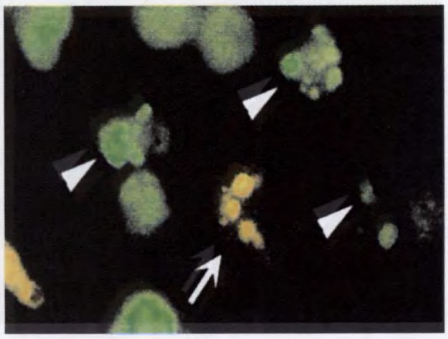
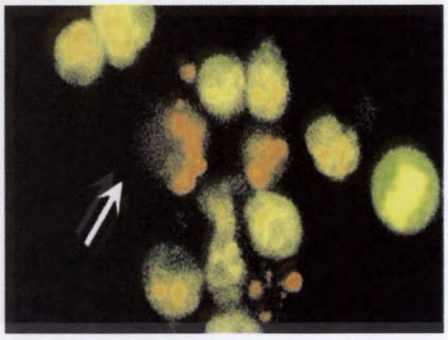


图 3 2mmol/LSASP 干预 24hHSC-T6(AO/EB×400)



注:→为晚期凋亡,箭头为早期凋亡

图 4 2mmol/LSASP 干预 48hHSC-T6(AO/EB×400)

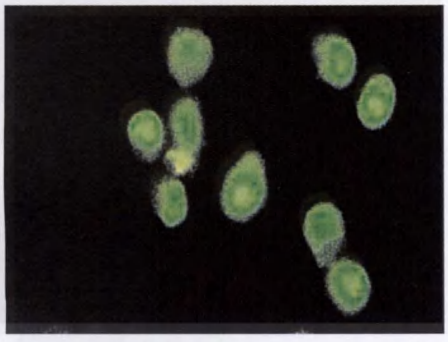


图 5 正常对照组 24hL02(AO/EB x400)

表 2 SASP 对 L02 增殖的影响($\bar{x}\pm s$, n =6)

分组	吸光度		
	12h	24h	48h
N	0.503 ± 0.078	0.544 ± 0.095	0.678 ± 0.036
D	0.434 ± 0.198	0.496 ± 0.232	0.66 ± 0.146
S3	0.513 ± 0.123	0.57 ± 0.061	0.693 ± 0.097
S4	0.546 ± 0.107	0.605 ± 0.207	0.735 ± 0.13
S5	0.598 ± 0.146	0.634 ± 0.1	0.786 ± 0.169

注:N 为对照组;D 为 0.1%DMSO 对照组,S3、S4、S5 分别为 SASP 0.5、1、2mmol/L

2.2.2 SASP 对 L02 凋亡的影响 SASP 不能诱导 L02 凋亡。不同浓度 SASP(终浓度 0.5、1、2mmol/L)分别处理 HSC-T6 细胞12、24、48h 后,其凋亡率见表3。随药物浓度增加和作用时间的延长,凋亡率无明显变化。

2.2.3 AO/EB 染色细胞凋亡形态学观察 2mmol/L 的 SASP 分别作用于 L02 24、48h 后,未见明显的SASP 分别作用于 L02 24、48h 后,未见明显的凋亡细胞(图 6、图 7)。

3 讨 论

SASP 作为治疗炎症性肠病的药物,口服吸收后,大约有 30%的药物以原形被吸收入血,70%在结肠中被细菌分解为 5- 氨基水杨酸和磺胺吡啶。具有抗

表 3 SASP 对 L02 的凋亡的影响

分组	凋亡率(%)					
	12h		24h		48h	
	早期	晚期	早期	晚期	早期	早期
N	1.31	1.63	2.28	2.69	2.32	2.84
D	2.17	1.72	3.3	2.35	3.46	2.75
S3	2.24	1.09	3.37	1.87	3.4	1.14
S4	2.54	1.26	3.67	2.01	3.78	2.57
S5	2.81	1.34	2.26	3.41	2.31	2.46

注:N 为对照组;D 为 0.1%DMSO 对照组,S3、S4、S5 分别为 SASP 0.5、1、2mmol/L

重庆维普 http://www.cqvip.com

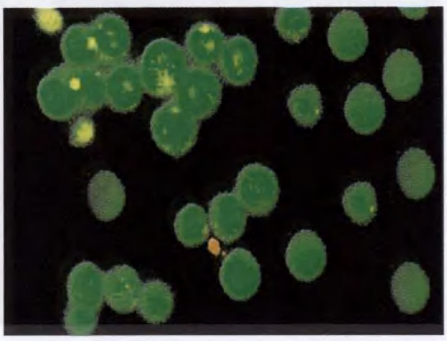


图 6 2mmol/LSASP 干预 24hL02（AO/EB×400）



图 7 2mmol/LSASP 干预 48hL02（AO/EB×400）

菌、抗炎、免疫抑制等作用。近来国外研究表明，SASP 可诱导结肠上皮细胞、T 淋巴细胞以及神经胶质细胞、大鼠巨噬细胞等多种细胞类型的凋亡[1~4]。但它并不能诱导 SW620 结肠癌细胞株以及人滑膜细胞株凋亡[1]，而对精原细胞以及胆汁酸诱导的肝细胞的凋亡具有拮抗 / 抑制作用[5,6]。因此 SASP 对细胞凋亡的影响似乎存在细胞选择性。肝细胞和 HSC 在肝脏损伤与修复中具有重要作用，HSC 凋亡是肝纤维化逆转的重要机制，而肝细胞凋亡是肝纤维化形成的重要促进因素，SASP 对肝细胞和 HSC 的诱导凋亡作用有无选择性呢？

本研究 CCK-8 实验证实，SASP 可抑制HSC-T6 细胞的增殖，且随着浓度的增高，时间的延长，其抑制作用增强，呈明显的剂量 - 效应及时间 - 效应关系。Annexin-V/PI 双标记流式细胞术进一步检测细胞凋亡发生的程度，低浓度 SASP 仅能抑制HSC 增殖，随着 SASP 作用浓度的增加，SASP 不仅抑制 HSC 增殖，同时诱导其凋亡；AO/EB 染色结果也提示，SASP干预 HSC-T6 后，细胞发生了典型的凋亡形态改变。研究结果表明 SASP 能抑制 HSC-T6增殖并诱导其凋亡，与国外有关研究结果相一致[7,8]。而同等干预浓度的 SASP 在抑制 HSC 增殖，诱导凋亡的同时，对正常肝细胞无影响。

综上，我们认为，SASP 通过选择性诱导 HSC 的凋亡可能成为逆转肝纤维化的有效药物。在我们下一步实验中，将对其可能的作用机制进行探讨，并进一步从体内观察它对肝纤维化的逆转作用。

参 考 文 献

[1] Liptay S, Fulda S, Schanbacher M, et al. Molecular mechanisms of sulfasalazine-induced T-cell apoptosis[J]. British Journal of Pharmacology, 2002; 137(5): 608-620.

[2] Doering J, Begue B, Lentze MJ, et al. Induction of T lymphocyte apoptosis by sulphasalazine in patients with Crohn's disease[J]. Gut, 2004; 53(10): 1632-1638.

[3] Salh B, Assi K, Huang S, et al. Dissociated ROS production and ceramide generation in sulfasalazine-induced cell death in Raw 264.7 cells[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2002; 72(10): 790-799.

[4] Hermissonl M, Weller M. NF-κB-independent actions of sulfasalazine dissociate the CD95L- and Apo2L/TRAIL-dependent death signaling pathways in human malignant glioma cells[J]. Cell Death and Differentiation, 2003; 10: 1078-1089.

[5] Virve P, Laura S, Krista E, et al. Nuclear Factor-_κB activation in human testicular apoptosis[J]. American Journal of Pathology, 2002; 160(1): 205-218.

[6] Rust C, Bauchmuller K, Bernt C, et al. Sulfasazine reduces bile acid induced apoptosis in human hepatoma cells and perfused rat livers[J].Gut, 2006; 55(11): 719-727.

[7] Oakley F, Meso M, Iredale JP, et al. Inhibition of IκB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerates recovery from liver fibrosis[J]. Gastroenterology, 2005; 128(1): 108-120.

[8] Habens F, Srinivasan N, Oakley F, et al. Novel sulfasalazine analogues with enhanced NF-kB inhibitory and apoptosis promoting activity[J].Apoptosis, 2005; 10(3): 481-491.

（责任编辑：冉明会）