瘦素诱导 HSC 增殖的信号转导通路及保肝宁调控作用的实验研究[※]

● 侯丽颖^{1*} 季幸姝¹ 吕志平² 贺松其² 文彬³ 蔡红兵²

摘要 目的:观察中药复方保肝宁对外源性瘦素(leptin)诱导的肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)增殖功能的影响及其对 JAK-STAT 信号转导通路中相关信号因子磷酸化 JAK₂、STAT₃ 蛋白(P-JAK₂、P-STAT₃)的影响,试图进一步阐明保肝宁抗肝纤维化的可能机制。方法:用甲基噻唑基四唑(methyl thiazolylum, MTT)检测保肝宁对 leptin 刺激的 HSC-LX2 增殖的影响;应用蛋白印迹实验(Western blotting analysis)检测 P-JAK₂、P-STAT₃ 的表达水平。结果:与秋水仙碱组比较,保肝宁组能明显降低 P-JAK₂、P-STAT₃ 表达水平。结论:中药复方保肝宁有阻断 leptin 诱导 HSCs-LX2 增殖的作用,而降低磷酸化 JAK₂、STAT₃ 蛋白的表达,阻断 JAK₂-STAT₃ 通路,可能是其主要的机制之一。

关键词 保肝宁 瘦素 肝星状细胞 JAK₂-STAT₃ 信号转导通路

leptin 是新发现的促肝纤维化的细胞因子^[1],是由肥胖基因(Obese gene, ob)(位于人类染色体 7q31.3)编码的一种 167 个氨基酸组成的分泌型蛋白质。最近研究显示,leptin 具有诱导 HSC 活化和增殖作用,对脂肪肝、肝炎、肝纤维化、肝硬化等慢性肝病的发生、发展有一定作用。并且研究发现 leptin 需要与特异的瘦素受体结合,激活信号转导途径之一:JAK-STAT,才能发挥其生物学效应。目前,国内外对此鲜有研究,因此探明保肝宁与 leptin 及肝纤维化的关系,可能有望成为揭示保肝宁抗肝纤维化机制新的切入点,对肝纤维化防治具有重要的临床和理论价值。

1 材料与方 法

1.1 材料和仪器 leptin 购自 protech 公司; RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司;MTT 购自广州普博公

※基金项目 国家自然科学基金资助课题(No:30672769);广东省中医药局基金资助课题(No:1050128)

* 作者简介 侯丽颖,女,广州中医药大学博士后。主要从事肝病证的临床与实验研究。

• 作者单位 1. 广州中医药大学(510400);2. 南方医科大学中医药学院(510515);3. 解放军四五八医院(510602)

司;P-JAK₂、P-STAT₃ 多克隆抗体、HRP 标记的山羊抗兔抗体、actin 及化学发光试剂购自北京中山公司,酶联免疫检测仪为 sigma 公司生产。

1.2 细胞培养 HSC-LX₂ 由美国纽约西奈山医学中心 Scott. Friedman 教授馈赠。HSC-LX₂ 以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于含 5% CO₂、饱和湿度的 37℃ 环境中。

1.3 药物血清的制备 雌雄各半 wistar 大鼠 24 只,体重:200 ~ 230g,清洁级,购自南方医科大学实验中心。随机分为 4 组如下:正常血清组、保肝宁等剂量组(含保肝宁生药 1.77g/ml)、保肝宁二倍剂量组(含保肝宁生药 3.54g/ml)、秋水仙碱含药血清组(0.05g/ml)。除正常血清组给予相应剂量的生理盐水,其余各组每日按 1ml/100g 经胃灌药 1 次,连续 7 天。最后一次灌药(灌药前禁食不禁水 12h)1h 后,腹主动脉采血,离心分离血清,灭活、过滤, -20℃ 冷藏备用。

1.4 MTT 比色法 将复苏后处于对数生长期的 HSC-LX₂,经胰酶消化,以 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液均匀接种于 96 孔培养板中,每孔 0.5 × 10⁴ 个细胞,37℃、5% CO₂ 温箱中培养 24h 后,弃去培养液,分别加入含 100ng/ml leptin 的培养液,每孔 200ul,6 孔重复。继续培养 24h 后弃培养液,各孔加入 20ul 的 MTT 溶液(10ng/ml leptin)混匀,37℃ 培养 4h 后,小心

吸去上清,于每孔加入 200ul DMSO 混匀室温下,将平板置于微孔板振荡器上振荡 10min,用酶标仪测定 600nm 处光吸收值(OD)。

1.5 Western blotting analysis 按常规方法提取各组细胞蛋白,8% SDS-PAGE 电泳,用 Bio-rad 微型电转移系统于 4℃、60V 电转移 3h 至 PVDF 膜上,室温封闭 1h, P-JAK₂、P-STAT₃ 蛋白多克隆抗体(1:1000 稀释)室温孵育 1h, HRP 标记的山羊抗兔抗体(1:2500 稀释)在室温孵育 1h。应用化学发光试剂显色,曝光, X 胶片经显影、拍照记录。

1.6 统计学处理 用 SPSS10.0 统计学软件分析及作表, OD 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 中药复方保肝宁对 HSC-LX₂ 细胞生长的影响

采用 MTT 法,与正常血清组比较,保肝宁等剂量组、保肝宁二倍剂量组均能明显抑制 HSC-LX₂ 的增殖 ($P < 0.01$),秋水仙碱组亦能抑制 HSC-LX₂ 细胞的增殖 ($P < 0.01$);与秋水仙碱组比较,保肝宁等剂量组、保肝宁二倍剂量组明显抑制 HSC-LX₂ 的增殖 ($P < 0.01$),但保肝宁等剂量组与保肝宁二倍剂量组间未见显著性差异 ($P > 0.5$)。见表 1。

表 1 保肝宁对有 leptin 刺激的 HSC-LX₂ 生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD 值(600nm)
正常血清组	5	0.618 ± 0.004
保肝宁等剂量组	5	0.115 ± 0.003*▲
保肝宁二倍剂量组	5	0.109 ± 0.005*▲▲
秋水仙碱组	5	0.388 ± 0.004*

注: F = 22016.44, $P = 0.000$,与正常血清组比较, ★ $P < 0.01$;与秋水仙碱组比较, ▲▲ $P < 0.01$, ▲ $P < 0.01$ 。

2.2 中药复方保肝宁对 P-JAK₂、P-STAT₃ 表达的调控

2.2.1 保肝宁作用 HSC-LX₂ 6h 后 P-JAK₂ 表达水平已开始降低,12h 后达到最低水平,至 18、24h, P-JAK₂ 表达水平逐渐上升,但未恢复至原来正常血清组水平(见图 1);与正常血清组比较,保肝宁组与秋水仙碱组均能降低 P-JAK₂ 表达水平;与秋水仙碱组比较,保肝宁组更能明显降低 P-JAK₂ 表达水平(见图 2)。

2.2.2 保肝宁作用 HSC-LX₂ 6h 后, P-STAT₃ 表达水平开始降低,至 12h, P-STAT₃ 表达水平达到最低水平,与正常血清组水平比较有明显差异,18、24h P-STAT₃ 表达水平有所上升,但仍未恢复至原来水平(见图 3);与正常血清组比较,保肝宁组能明显降低

P-STAT₃ 表达水平,而秋水仙碱组差异未见显著性,可见保肝宁较秋水仙碱更有效抑制 P-STAT₃ 的表达(见图 4)。

图 1 保肝宁组对 HSC 中 P-JAK₂ 表达的影响

注: 1~5 分别表示:保肝宁组作用 HSC-LX₂ 0, 6, 12, 18, 24h 后 P-JAK₂ 的表达

图 2 各组在 12h 对 HSC 中 P-JAK₂ 的影响

注: 1~3 分别表示:保肝宁二倍剂量组,正常血清组,秋水仙碱组

图 3 保肝宁组对 HSC 中 P-STAT₃ 表达的影响

注: 1~5 分别表示:保肝宁组作用 HSC-LX₂ 0, 6, 12, 18, 24h 后 P-STAT₃ 的表达

图 4 各组在 24h 对 P-STAT₃ 的影响

注: 1~3 分别表示:保肝宁二倍剂量组,正常血清组,秋水仙碱组

3 讨论

肝纤维化是指不同病因引起的慢性肝病的共同病理过程。肝纤维化形成过程中的中心环节是活化的 HSC 在肝损伤部位移行、增殖,使肝脏炎症永久化,在纤维性疤痕的形成中发挥关键作用^[2]。故越来越多的抗纤维化药物研究选择 HSC 作为研究观察重点。

1998 年 Potter 在活化的 HSC 中发现 leptin 的
(下转第 40 页)

伤,在后世的本草书中可以找到类似的方法。

从马王堆医书可以看出,战国时期的中国医学处在一种相对质朴的状态,但已经开始了跟阴阳学说的结合,其中也可发现五行学说浸渍的痕迹。此前的中国医学应该更加质朴,而今人对它的了解几乎还是空白。但是,今人眼中的空白并不等于历史上真实的空白。当时的医学尽管一定是更加质朴的,却是绝对存在的,阴阳五行学说的影响是可能淡薄的,甚至是阙如的。那时的中国

医学可能经历了一个相当漫长的积累过程,更多的时候是在朦胧、迷惘、困惑与无奈中摸索前行,其发展的缓慢可能会超过我们今天的想象。经过人体实验乃至付出生命代价的治疗方法在长期积累中越来越丰富,来自直觉和感悟的医学知识在叠经传承后越来越深厚,这些点状出现的知识需要一种纽带将它们贯串起来而成为一个系统的结构,尽管一些怎么治疗也不见效果的疾病仍然会逼迫人们向神灵去求助,但中国的

医学终于走到了应该总结归纳和整理提高的阶段。有关阴阳和五行的思想经过邹衍的整理发挥,成为一种影响广泛的哲学学说,并向医学整体和加速渗透。中国医学在将阴阳五行学说作为哲学指导和说理方法之后,取得了日新月异的发展,出现了《黄帝内经》这样的著作。因此,战国是阴阳五行学说介入中国医学并使之步入快速发展轨道的关键时期。

参考文献(略)

(上接第62页)

mRNA 和蛋白质后,人们开始关注 leptin 与肝脏疾病的关系^[3]。目前国内外研究主要集中于 leptin 与活化 HSC 间的关系、leptin 对细胞因子分泌的调控机制等方面。Leptin 在肝脏中的主要信号传递途径为 JAK₂-STAT₃ 途径。JAK (janus kinase) 是一类酪氨酸激酶,当 leptin 与其受体结合后,激活 JAK 激酶,JAK 酪氨酸磷酸化后与磷酸化受体结合,进一步使下游胞浆蛋白 STAT 磷酸化。STAT 磷酸化后转入核内,识别并结合到启动子区 leptin 的活化序列或相关序列,调控 leptin 的基因转录,促进肝纤维化的形成^[4]。

因此,阻断 HSC 中 leptin 诱导的 JAK₂-STAT₃ 信号通路,可能有望成为肝纤维化新的切入点,而中药复方制剂具有无可厚非的综合药效学作用。保肝宁^[5-7]是由黄芪、桃仁、丹参、黄芩等组成的临床常用经验方,具有益气健脾、疏肝活血、清热利湿的功效,其用药结合肝脏体阴用阳、忌刚喜柔、纯用活血化瘀易伤藏血之脏的特点,并且用于临床治疗以肝郁脾虚血瘀为主要病机的慢性肝炎患者,疗效显著。然而通过本实验研究,结果发现保肝宁正有抑制 leptin 诱导的 HSC 的增殖,并对其引起的 JAK₂-STAT₃ 信号转导通路有阻断的功能,这就为进一步阐明保肝宁抗肝纤

维化的可能机制提供了实验依据,亦说明保肝宁可能具有多靶点、多途径而又相互关联的多功能网络效应,同时,也为临床治疗肝纤维化提供了新的思路。

参考文献

- [1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature, 1994, 372(6505): 425 - 432.
- [2] Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 2247 - 2250.
- [3] Potter JJ, Womack L, Mezey E, et al. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 244: 178 - 182.
- [4] Ahima RS, Flier JS. Leptin[J]. Annu Rev Physiol, 2000, 62(4): 413 - 437.
- [5] 赵进军, 吕志平, 刘永刚, 等. 保肝宁对过氧化氢损伤大鼠肝细胞的保护作用[J]. 广州中医药大学学报, 2002, 19(3): 211 - 213.
- [6] 张绪富, 吕志平, 周迎春, 等. 保肝宁对 HSC-T6 细胞增殖及 I 型胶原表达的影响[J]. 中医药学刊, 2003, 21(2): 207.
- [7] 刘晓燕, 吕志平, 张绪富, 等. 保肝宁对 HSC 中 NF- κ B 影响的实验研究[J]. 陕西中医, 2004, 25(6): 569.