

文章编号 1006-8147(2014)04-0257-03

论 著

青蒿琥酯对人源肝星状细胞 LX-2 增殖、胶原产生以及 KLF6 表达的影响

张晓燕, 马淑晶, 徐亚洁, 方步武

(天津医科大学药理学教研室, 天津 300070)

摘要 目的:探讨青蒿琥酯(Ar)对人源肝星状细胞(HSCs)LX-2 增殖的影响以及其抗肝纤维化的作用机制。方法:将肝星状细胞 LX-2 分为对照组和实验组,对照组为细胞培养液,实验组为不同浓度的青蒿琥酯。应用 MTT 法检测青蒿琥酯对细胞增殖的影响,比色法检测细胞培养上清中乳酸脱氢酶(LDH)活性,酶消化法测定羟脯氨酸(Hyp)含量,Western blotting 法测定青蒿琥酯对 HSCs 内 KLF-6 蛋白表达的影响。结果:与对照组相比,青蒿琥酯能抑制肝星状细胞 LX-2 的增殖($P<0.01$),且呈剂量-效应和时间-效应关系;青蒿琥酯各浓度组 LDH 活性与对照组比较,无显著性差异($P>0.05$);青蒿琥酯能降低肝星状细胞 LX-2 中 Hyp 含量($P<0.01$),且呈剂量-效应关系,并能降低 KLF6 蛋白的表达($P<0.01$)。结论:青蒿琥酯对人源肝星状细胞 LX-2 有明显的抑制作用,其作用机制是降低胶原的生成以及 KLF6 蛋白的表达减少,进而抑制肝纤维化的发生。

关键词 青蒿琥酯;肝星状细胞;Kruppel 样因子 6;肝纤维化

中图分类号 R96

文献标志码 A

Effects of artesunate on cell proliferation, collagen generating and KLF6 expression in hepatic stellate cells

ZHANG Xiao-yan, MA Shu-jing, XU Ya-jie, FANG Bu-wu

(Department of Pharmacology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To explore the effect of artesunate on the proliferation of LX-2 cell and to understand the initiatory anti-fibrogenic mechanisms of artesunate. **Methods:** Hepatic stellate cells (HSCs) LX-2 were divided into control group and artesunate groups with different concentrations. The inhibition of cell proliferation was determined by MTT colorimetric assay. The content of LDH was determined by using colorimetric method while the content of hydroxyproline (Hyp) was determined by colorimetric method. The Western blotting was used for the detection of the expression of KLF-6 protein in HSCs LX-2. **Results:** The artesunate had an inhibition effect on cell proliferation ($P<0.01$) with dose and time-effect relationships; the activity of LDH in supernatant had no statistical significance compared with control group ($P>0.05$). The content of Hyp was gradually decreased compared with control group ($P<0.01$) with dose-effect relationship. The expression of KLF6 protein was decreased ($P<0.01$) in dose-dependent manner. **Conclusion:** Artesunate could markedly inhibit the proliferation of HSCs LX-2; The mechanism may be associated with suppressing the expression of collagen and thus decreasing the expression of KLF6 protein.

Key words artesunate; hepatic stellate cells; KLF6; hepatic fibrosis

肝纤维化是由于多种致病因素导致的细胞外基质在肝组织间质中过度增生与异常沉积,它是一种可逆性病理改变^[1-2],亦是多种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段。细胞外基质主要来源于肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs),HSCs 的激活、增殖是肝纤维化发生的中心环节^[3-4],因此抑制肝星状细胞的活化是抑制肝纤维化的关键环节。Kruppel 样因子 6(kruppel-like factor 6, KLF6)为近年发现的锌指转录因子^[5],是转录因子 Kruppel 家族成员之一。KLF6 可通过调节细胞因子 TGF β 1 及其受体的表达,促进胶原等形成,在早期肝纤维化过程中起着重要作用^[6]。青蒿琥酯是青蒿素的衍生物之一,其抗

疟作用强,并具有抗肿瘤、抗病毒、调节免疫等广泛的药理作用。本课题组以往研究发现,青蒿琥酯能有效抑制四氯化碳复合因素所致大鼠肝纤维化和牛血清白蛋白免疫性肝纤维化的形成等^[7-9],但作用机制尚不明确。本研究是在前期工作的基础上,进一步探究青蒿琥酯对体外培养的人源肝星状细胞 LX-2 是否有作用,并初步探讨其抗肝纤维化的机制,从胶原蛋白的产生、分泌及 KLF6 蛋白表达等方面进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 肝星状细胞株 LX-2 由北京市地坛医院提供。

1.1.2 药品与试剂 青蒿琥酯原料药($C_{19}H_{28}O_8$, Mr: 384.42, 批号 040216)由广西桂林南药股份有限公

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30772856)

作者简介 张晓燕(1987-),女,硕士在读,研究方向:中药药理学;通信作者:方步武, E-mail:fangdch@aliyun.com。

司提供;DMEM(批号 NVL0341)、胎牛血清(批号 NVA0227)均购自美国 Hy-Clone 公司;羟脯氨酸(Hyp)测试盒(消化法)(批号 20130119)购自南京建成生物技术研究;乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒(批号 20131224)购自碧云天生物技术研究;兔抗 KLF6(批号 sc-7158)购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;Tubulin 抗体(批号 AT819)购自碧云天生物技术研究。

1.1.3 主要仪器设备 酶标仪,美国 BIO-RAD 公司;VIS-7220 紫外可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;Universal 型电泳仪、Mini 垂直电泳槽,美国 BIO-RAD 公司;DYCZ-40D 型转膜仪,北京六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 复苏后的细胞置于含 10%胎牛血清 DMEM 培养液中,5% CO₂,37℃培养箱中常规培养。待细胞贴壁 80%后,用 0.25%胰酶消化,2 mL 细胞培养液终止消化,按 1:3 或 1:4 进行细胞传代。

1.2.2 MTT 法检测青蒿琥酯对 HSCs LX-2 增殖的影响 将肝星状细胞接种于 96 孔培养板中,密度为 2×10^4 个/孔,每孔 100 μ L,待细胞生长至对数期后,用 0.4% FBS 的 DMEM 培养液对细胞进行同步化处理,24 h 后给药。分为实验组和对照组,实验组为青蒿琥酯各浓度组(终浓度分别为 100、200、300、400、500 μ mol/L),对照组为含 10% FBS 的 DMEM 培养液的细胞,每组 6 个复孔。置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 10 μ L,继续孵育 4 h,将培养基倒尽、吸干,每孔加入二甲基亚砷 200 μ L,混匀后置酶标仪中 570 nm 测定各孔吸光度值(A 值)。按以下公式计算细胞抑制率(inhibition rate, IR), $IR = (\text{对照组 A 值} - \text{实验组 A 值}) / \text{对照组 A 值} \times 100\%$ 。

1.2.3 细胞培养上清液中 LDH 活性的检测 取对数期生长的 HSCs LX-2,以 2×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板中,分别设空白对照组,给药组(浓度分别为 250、350、450 μ mol/L)。培养 24 h 后,收集各孔上清液,按照碧云天 LDH 细胞毒性检测试剂盒说明操作,490、630 nm 处双波长测定吸光度(A 值),细胞培养上清中 LDH 活性=(样品孔吸光度-背景空白对照孔吸光度)/(标准管吸光度-样品对照孔吸光度) \times 标准空白管浓度(mU/mL)。

1.2.4 细胞培养上清液中 Hyp 含量的检测 分组及给药同 1.2.3。培养 24 h 后收集细胞上清于 550 nm 处,测定各孔吸光度值(A 值),按以下公式计算: Hyp 量(μ g/mL)=[(测定管 A 值-空白管 A 值)/(标准

管 A 值-空白管 A 值)] \times 标准管浓度(μ g/mL)。

1.2.5 Western blotting 检测 KLF6 蛋白的表达 将 HSCs LX-2 以密度为 5×10^4 个/mL 接种于 6 孔板,按 1.2.3 分组及给药。给药 24 h 后,裂解蛋白,BCA 法进行蛋白定量。取总蛋白 40 μ g,经 30%聚丙烯酰胺凝胶(5%的浓缩胶,12%分离胶)电泳后转移到硝酸纤维素膜上,转膜 1.5 h,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,加入一抗,4℃过夜,洗膜后再与二抗结合,加入 ECL 发光液,曝光。曝光胶片扫描后,用 Quantity One 软件测定其灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验。组间差异采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 青蒿琥酯对 HSCs 增殖的影响 不同浓度的青蒿琥酯作用于 HSCs LX-2 24、48、72 h 后,与对照组比较,各实验组青蒿琥酯对 HSCs LX-2 的抑制率随着浓度的增大而逐渐增加,具有显著性差异(*P* < 0.01)。表明青蒿琥酯抑制 HSCs LX-2 增殖作用呈现浓度依赖性,并且随着时间的延长,抑制率也随之增加,48 h 与 24 h 以及 72 h 与 48 h 比较,各浓度组的细胞抑制率显著增高,结果均有显著性差异(*P* < 0.01)。其中,500 μ mol/L 给药组,48 h 比 24 h 抑制率增加了 7.08%,72 h 比 48 h 细胞抑制率增加了 25.80%,说明青蒿琥酯抑制肝星状细胞增殖作用具有时间依赖性(表 1)。

表 1 青蒿琥酯对肝星状细胞的抑制率(% , $\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

Tab 1 Inhibition rate on HSCs caused by Art(% , $\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

组别	药物浓度/(μ mol/L)	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
实验组	100	5.41 \pm 0.38*	13.62 \pm 3.12* [△]	29.24 \pm 2.40**
	200	13.60 \pm 3.12*	31.60 \pm 5.88* [△]	43.20 \pm 5.40**
	300	25.18 \pm 2.17*	35.55 \pm 1.92* [△]	58.51 \pm 6.40**
	400	32.64 \pm 8.69*	43.57 \pm 1.01* [△]	65.81 \pm 4.23**
	500	37.86 \pm 3.88*	45.94 \pm 0.71* [△]	71.74 \pm 3.99**

与对照组比较,**P* < 0.01;与 24 h 比较,[△]*P* < 0.01;与 48 h 比较,***P* < 0.01

2.2 HSCs LX-2 培养上清液中 LDH 活性的变化 青蒿琥酯作用 24 h 后,各浓度组细胞上清中 LDH 活性无明显变化,与对照组比较,无显著性差异(*P* > 0.05)(表 2)。

2.3 HSCs LX-2 培养上清液中 Hyp 含量的变化 青蒿琥酯作用 HSCs LX-2 24 h 后,能有效地降低培养活化的 HSCs 上清液中 Hyp 含量,与对照组比较,差异具有统计学意义(*P* < 0.01)(表 3)。

表2 青蒿琥酯对 HSCs 上清中 LDH 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Tab 2 Effect on LDH secretion of HSCs caused by Art($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	药物浓度/ $(\mu\text{mol/L})$	LDH 活性/ (mU/mL)
对照组	0	0.0817 \pm 0.032
实验组	250	0.0858 \pm 0.005*
	350	0.109 \pm 0.022*
	450	0.120 \pm 0.029*

与对照组比较, * $P>0.05$ 表3 青蒿琥酯对 HSCs LX-2 分泌 Hyp 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)Tab 3 Effect on Hyp secretion of HSCs caused by Art($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	药物浓度/ $(\mu\text{mol/L})$	Hyp 含量/ $(\mu\text{g/mL})$	Hyp 含量下降百分比/%
对照组	0	2.833 \pm 0.024	0
实验组	250	0.810 \pm 0.014*	71.41
	350	0.730 \pm 0.021*	72.24
	450	0.623 \pm 0.049*	78.01

与对照组比较, * $P<0.01$

2.4 KLF6 蛋白表达水平的变化 Western blotting 检测结果显示, 不同浓度青蒿琥酯分别作用 HSCs LX-2 24 h 后, 与对照组比较, KLF6 蛋白的表达均有降低, 分别下降了 40.08%、63.94%、74.20%。随着青蒿琥酯浓度的增加, KLF6 蛋白的表达量逐渐降低($P<0.01$)(图 1、表 4)。

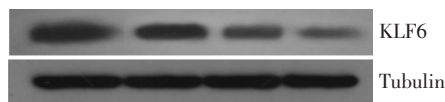


图1 肝星状细胞 LX-2 中 KLF6 的表达

Fig 1 KLF6 expression on HSCs LX-2

表4 内参和目的蛋白积分光密度比值

Tab 4 The Integral optical density value of tubulin and KLF6

组别	药物浓度/ $(\mu\text{mol/L})$	KLF6/ Tubulin	蛋白表达量 下降百分比/%
对照组	0	0.943 \pm 0.058	0
实验组	250	0.565 \pm 0.045*	40.08
	350	0.340 \pm 0.031*	63.94
	450	0.245 \pm 0.036*	74.20

与对照组比较, * $P<0.01$

3 讨论

肝星状细胞位于肝窦 Disse 间隙, 约占肝脏细胞总数的 8%~13%, 与肝脏及肝窦内皮细胞直接接触。HSCs 主要功能是参与维生素 A 的代谢和储存脂肪^[10]。肝脏的损伤引起肝星状细胞激活、HSCs 活化及其转化为肌成纤维细胞, 从而合成各种细胞外基质沉积于肝脏, 最终导致肝纤维化, 故认为 HSCs 激活是导致肝纤维化的中心环节^[11]。因此, 抑制 HSC 的增殖是抗肝纤维化的关键。本研究发现青蒿琥酯能够抑制肝星状细胞的增殖, 且呈浓度和时间依赖性。

LDH 是一种极为稳定的胞质酶, 细胞膜损伤后释放出的 LDH 存在于培养上清中, 通过检测从质膜破裂的细胞中释放到培养液中的 LDH 的活性, 可以对细胞毒性进行定量分析。LDH 释放被看做细胞膜完整性的重要指标, 进而反映药物的细胞毒性。青蒿琥酯各浓度 (250、350、450 $\mu\text{mol/L}$) 组 LDH 活性虽略有升高, 但分别与细胞对照组比较差异皆无统计学意义 ($P>0.05$), 说明大部分细胞质膜完整, 青蒿琥酯对 HSCs 的抑制作用不是非特异性细胞毒性所致。

肝纤维化的细胞外基质成分主要为胶原纤维, 由胶原蛋白构成, 而羟脯氨酸在胶原蛋白的含量约为 14%, 在非胶原蛋白中的含量很低, 甚至缺乏, 所以羟脯氨酸常被认为是胶原蛋白特有成分。因此, 测定肝组织羟脯氨酸含量可间接反映肝纤维化的程度, 是肝纤维化检测的另一个重要指标^[12]。本研究发现, 青蒿琥酯可以降低细胞内的羟脯氨酸含量, 提示其能够降低肝星状细胞内胶原蛋白的产生/分泌, 可有效抑制肝纤维化的发生。

有研究认为 KLF6 的增加是 HSCs 激活的一个重要标志。与静息状态的 HSCs 相比, KLF6 的表达与合成在体内激活的 HSCs 中明显升高, 并且可以反式激活 TGF β 1 基因, 促进 TGF β 1 及其受体基因表达, 而 TGF β 1 是目前已知的最重要的致纤维化因子。王晓敏等^[13]探讨了非酒精性脂肪性肝纤维化形成过程中肝脏 KLF6 的表达变化及其作用, 建立高利用脂饮食脂肪性肝纤维化模型, 用 RT-PCR 与免疫组织化学法观察肝组织中 KLF6 表达变化, 发现 KLF6 表达与肝纤维化分级评分之间呈显著正相关。Ratzu 等^[14-15]为了探讨体内 KLF6 表达增加的机制, 通过代谢标记比较了静息与活化状态的 HSCs 中 KLF6 的生物合成, 结果显示在体内 HSCs 被激活时 KLF6 表达明显增加, 与静息 HSCs 相比高达 3~4 倍。这些研究表明, KLF6 的表达增多是 HSCs 激活的一个标志。本次的研究结果和前期的研究具有一致性。本研究发现, 青蒿琥酯可以抑制 HSCs 的增殖, 使 KLF6 蛋白表达下降, 并呈浓度依赖性。研究表明青蒿琥酯抑制肝纤维化的机制之一可能是降低了 KLF6 蛋白的表达。其他有关抗肝纤维化的作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Wynn T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis[J]. J Pathol, 2008, 214(2):199
- [2] Bansal R, Prakash J, Ruiter M D, et al. Interferon gamma peptide mimetic targeted to hepatic stellate cells ameliorates acute and chronic liver fibrosis in vivo[J]. J Control Release, 2014, 179(10):18

(下转第 263 页)

酸的含量,而 Imi 可增加羟脯氨酸含量。说明神经酰胺含量升高可减少 HSCs 合成胶原蛋白含量,提示神经酰胺可能是通过减少胶原蛋白的合成来发挥抗肝纤维化作用。

综上所述,神经酰胺代谢酶抑制剂可显著影响细胞内神经酰胺含量,且神经酰胺具有抗肝纤维化作用,其机制可能是抑制 HSCs 的增殖,减少胶原蛋白的合成。这一研究发现对肝纤维化的治疗有着积极的意义。

参考文献:

- [1] Majumder S, Dey R, Bhattacharjee S, et al. Leishmania-induced biphasic ceramide Generation in macrophages is crucial for uptake and survival of the parasite[J]. *J Infect Dis*, 2012,205(10):1607
- [2] Zhu W, Wang X, Zhou Y, et al. C2-ceramide induces cell death and protective autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2014,15(2):3336
- [3] Mencarelli C, Martinez-Martinez P. Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013,70(2):181
- [4] Mohammadtaghvaei N, Taheripak G, Taghikhani M, et al. Palmitate-induced PTP1B expression is mediated by ceramide-JNK and nuclear factor κ B (NF- κ B) activation[J]. *Cell Signal*, 2012,24(10):1964
- [5] Glaros E N, Kim W S, Garner B. Myricetin-mediated up-regulation of hepatocyte apoA-I synthesis is associated with ERK inhibition[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010,118(12):727
- [6] Liangpunsakul S, Rahmini Y, Ross R A, et al. Imipramine blocks ethanol-induced ASMase activation, ceramide Generation, and PP2A activation, and ameliorates hepatic steatosis in ethanol-fed mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012,302(5):G515
- [7] 姜婷婷,李英娟,方步武,等.测定生物样本中神经酰胺含量的 HPLC-FLD 法[J]. *药物分析杂志*, 2012,32(10):1807
- [8] Shea B S, Tager A M. Sphingolipid regulation of tissue fibrosis[J]. *Open Rheumatol J*, 2012,6(Suppl 1:M8):123
- [9] Artetxe I, Sergelius C, Kurita M, et al. Effects of sphingomyelin headgroup size on interactions with ceramide[J]. *Biophys J*, 2013,104(3):604
- [10] Woodhoo A, Iruarizaga-Lejarreta M, Beraza N, et al. Human anti-gen R contributes to hepatic stellate cell activation and liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2012,56(5):1870
- [11] Lakner A M, Steuerwald N M, Walling T L, et al. Inhibitory effects of microRNA 19b in hepatic stellate cell-mediated fibrogenesis[J]. *Hepatology*, 2012,56(1):300
- [12] Longxi P, Buwu F, Yuan W, et al. Expression of p53 in the effects of artesunate on induction of apoptosis and inhibition of proliferation in rat primary hepatic stellate cells[J]. *PLoS One*, 2011,6(10):e26500
- [13] Qian H, Shi J, Fan T T, et al. Sophocarpine attenuates liver fibrosis by inhibiting the TLR4 signaling pathway in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2014,20(7):1822
- [14] Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2013,6(1):19
- [15] Liu L, Yannam G R, Nishikawa T, et al. The microenvironment in hepatocyte regeneration and function in rats with advanced cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2012,55(5):1529

(2014-02-21 收稿)

.....

(上接第 259 页)

- [3] Dechene A, Sowa J P, Gieseler R K, et al. Acute liver failure is associated with elevated liver stiffness and hepatic stellate cell activation[J]. *Hepatology*, 2010,52(3):1008
- [4] Iredale J P, Thompson A, Henderson N C. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013,1832(7):876
- [5] Ghiassi-Nejad Z, Hernandez-Gea V, Woodrell C, et al. Reduced hepatic stellate cell expression of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor isoforms amplifies fibrosis during acute and chronic rodent liver injury[J]. *Hepatology*, 2013,57(2):786
- [6] Dionysiou M G, Salma J, Bevyuk M, et al. Kruppel-like factor 6 (KLF6) promotes cell proliferation in skeletal myoblasts in response to TGF β /Smad3 signaling[J]. *Skelet Muscle*, 2013,3(1):7
- [7] 方步武,来丽娜,林雅军,等.青蒿琥酯抗四氯化碳致大鼠肝纤维化的作用[J]. *中国药理学通报*, 2005,21(6):762
- [8] 来丽娜,方步武.青蒿琥酯抗牛血清白蛋白免疫性大鼠肝纤维化作用的研究[J]. *中药药理与临床*, 2006,22(3):35
- [9] 王媛,方步武,彭龙希.青蒿琥酯对大鼠原代肝星状细胞产生与分泌转化生长因子 β 1 的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2012,20(4):294
- [10] Peng L X, Fang B W, Wang Y, et al. Expression of p53 in the effects of artesunate on induction of apoptosis and inhibition of proliferation in rat proliferation in rat primary hepatic stellate cells[J]. *PLoS One*, 2011,6(10):1
- [11] Geerts A. On the origin of stellate cells: mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal[J]. *J Hepatol*, 2004,40(2):331
- [12] 汪美凤,平键,成扬.肝星状细胞主要信号转导通路与肝纤维化的关系[J]. *实用肝脏病杂志*, 2010,13(6):466
- [13] 王晓敏,陈东风.核转录因子 KLF6 在非酒精性脂肪性肝纤维化形成中的作用[J]. *消化外科*, 2006,5(5):355
- [14] Oh W Y, Pyo S, Lee K R, et al. Effect of holotrichia diomphalialarvae on liver fibrosis and hepatotoxicity in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 87(2/3):175
- [15] Ratzliff V, Lalazar A, Wong L, et al. Zf9, a kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998,95(16):9500

(2014-02-21 收稿)