

文章编号 1006-8147(2014)04-0253-04

论著

青蒿琥酯通过上调神经酰胺抑制肝星状细胞增殖并诱导其凋亡

马淑晶, 张晓燕, 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:探讨神经酰胺与青蒿琥酯抗肝纤维化作用的关系。方法:将培养的肝星状细胞分为实验组和对照组,实验组为不同浓度的青蒿琥酯处理组及神经酰胺处理组。以四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测肝星状细胞(HSC)增殖率,Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡,Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡率,HPLC-FLD 法测定青蒿琥酯处理后 HSC 培养上清中的神经酰胺的含量,均数比较采用单因素方差分析,两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验。结果:不同浓度青蒿琥酯及神经酰胺对肝星状细胞均有明显抑制作用,且呈剂量-效应关系和时间-效应关系($P<0.01$),青蒿琥酯及神经酰胺均能诱导肝星状细胞的凋亡,青蒿琥酯能够上调细胞培养上清液中神经酰胺的含量。结论:青蒿琥酯可能通过上调神经酰胺抑制肝星状细胞的增殖并诱导其凋亡。

关键词 青蒿琥酯;神经酰胺;肝星状细胞;增殖;凋亡

中图分类号 R96

文献标志码 A

Artesunate inhibits the proliferation of hepatic stellate cells and induces apoptosis by upregulating ceramide

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

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

Abstract **Objective:** To investigate the relationship between ceramide and artesunate on antifibrotic effect. **Methods:** The cultured hepatic stellate cells were divided into experimental group and control group, with the former including different concentrations of artesunate-treated groups and ceramide-treated groups. Cell proliferation rate was measured using the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenylterazolium bromide (MTT), cell apoptosis was observed by Hoechst 33258 staining, and the cell apoptosis rate was detected by AnnexinV-FITC/PI double staining while the content of ceramide (C2) in HSCs treated with artesunate was evaluated by HPLC-FLD. The means were compared using ANOVA and the two samples were compared using independent sample *t* test. **Results:** Different concentrations of artesunate and ceramide on hepatic stellate cells were significantly reduced in a dose-response and time-effect relationship ($P<0.01$), artesunate and ceramide could induce apoptosis in hepatic stellate cells and artesunate could increase the content of ceramide in the cell culture supernatant. **Conclusion:** Artesunate could inhibit the proliferation and induce apoptosis of hepatic stellate cells through upregulating ceramide.

Key words artesunate; ceramides; hepatic stellate cells; proliferation; apoptosis

肝纤维化是肝脏对各种慢性损伤疾病的一种修复应答反应,具有可逆性^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的激活与增殖是肝纤维化发生和发展的关键环节。目前有两种途径来减少活化的 HSC 的数量:一是将活化的 HSC 逆转至静息状态,在体外实验中已成功将活化的 HSC 逆转为基质膜细胞^[2],但在体内未见有相关报道;二是通过凋亡实现 HSC 的清除^[3]。外界刺激,细胞因子和药物等多种因素均可能参与调控 HSC 凋亡和使其转变回静止态。其中,以药物调控 HSC 凋亡为主要的研究方向。青蒿琥酯(artesunate, Art)是具有 β -倍半萜内酯类青蒿素的衍生物,具有多种药理作用,如抗肿瘤、调

节免疫功能等^[4]。体内外实验均表明青蒿琥酯能够抑制 HSC 的增殖并诱导其凋亡^[5-6]。C2 神经酰胺(C2-ceramide, C2-cer)是具有膜渗透性的神经酰胺类似物。神经酰胺是神经鞘脂类的主要成员之一,作为细胞内脂质第二信使,在细胞增殖、分化、生长抑制和凋亡等多种细胞活动中发挥调节作用,特别是在诱导细胞凋亡的过程中起重要作用。本实验旨在研究神经酰胺与青蒿琥酯抗肝纤维化作用是否存在一定的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HSC LX-2 购自北京市地坛医院。

1.1.2 实验药物及主要试剂 青蒿琥酯由广西桂林南药股份有限公司赠予;DMEM 与胎牛血清购自美国 GIBICO 公司;神经酰胺(5 mg, Sigma);邻苯二

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30772856)

作者简介 马淑晶(1987-),女,硕士在读,研究方向:中药药理;通信

作者:方步武, E-mail: fangdch@aliyun.com。

甲醛(OPA, 色谱纯, Sigma-aldrich); β -巯基乙醇(色谱纯, Sigma); Hoechst 33258 (南京凯基生物科技发展有限公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术研究所有限公司)。

1.1.3 主要仪器 恒温 CO₂ 培养箱(美国 NAP-COseries5400); 净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 680 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司); 日本岛津高效液相色谱仪(LC-6A 泵, SCL-6B 系统控制箱; RF-535 荧光检测器; Anastar 色谱工作站); Ti-U 型荧光显微镜(日本 NIKON 公司); FACSVerse TM 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 LX-2 细胞株的培养 将 LX-2 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 5% CO₂, 37 °C 饱和湿度培养箱里培养。2 d 换液, 4 d 传代, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法检测青蒿琥酯及神经酰胺对 HSC 增殖的影响 取对数生长期细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 2×10^4 个/mL, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板, 培养 72 h, 进行无血清饥饿处理 12 h, 分别加入不同浓度的青蒿琥酯及神经酰胺, 青蒿琥酯组终浓度为 100、200、300、400、500 μ mol/L, 设正常对照组, 每组设 6 个复孔; 神经酰胺组终浓度为 30、45、60、75、90 μ mol/L, 设乙醇溶剂对照组, 每组设 6 个复孔。分别孵育 24、48、72 h, 双波长法(测定波长 570 nm, 参比波长 630 nm, 振动时间 600 s)测定 OD 值, 计算细胞生长抑制率: 抑制率(%)=[1-实验组 OD 值/对照组 OD 值]×100%。

1.2.3 Hoechst 33258 荧光染色观察细胞凋亡 HSC 以 2×10^4 /mL 密度接种于 24 孔培养板, 每孔 500 μ L 培养 72 h, 分别加入不同浓度的青蒿琥酯(250、350、450 μ mol/L)及神经酰胺 60 μ mol/L, 设乙醇溶剂对照组, 每组设 3 个复孔。作用 24 h 后, PBS 洗两遍, 每孔加 100 μ L 终浓度为 5 μ g/mL 的 Hoechst 荧光染料, 37 °C 避光孵育 15 min, 每孔随机取一个视野, 分别选取 3 个视野, 100 倍镜下从细胞形态学观察凋亡情况。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 HSC 以 4×10^4 /mL 密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养 72 h, 进行无血清饥饿处理 12 h。分别设有正常对照组, 乙醇溶剂对照组, 不同浓度青蒿琥酯组(250、350、450 μ mol/L), 神经酰胺 60 μ mol/L 组。药物作用 24 h 后, 收集细胞, 用 1 mL 预冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 5~10 万重悬细胞, 1 000 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细

胞。加入 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀。室温避光孵育 10 min。1 000 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 190 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 10 μ L PI 染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置。随即进行流式细胞仪检测, Annexin V-FITC 为绿色荧光, PI 为红色荧光。

1.2.5 HPLC-FLD 法测定细胞培养上清中 C2 神经酰胺的含量 HSC 以 2×10^4 /mL 密度接种于 24 孔培养板, 每孔 500 μ L 培养 72 h, 无血清 DMEM 饥饿处理 12 h, 分别加入不同浓度的青蒿琥酯(250、350、450 μ mol/L), 设空白对照组, 每组设 3 个复孔。收集青蒿琥酯作用 24 h 后的细胞培养液及对照组上清, 储存于 -20 °C, 待测。测定方法见参考文献[7](测定生物样本中神经酰胺含量的 HPLC-FLD 法)。

1.3 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。所有统计分析均使用 SPSS 16.0 软件计算分析。

2 结果

2.1 青蒿琥酯及神经酰胺对肝星状细胞增殖的影响 不同浓度青蒿琥酯分别作用于 HSC 24、48、72 h, 与对照组比较, 青蒿琥酯 100、200、300、400、500 μ mol/L 对 HSC 呈浓度-时间依赖性(表 1)。不同浓度神经酰胺分别作用于 HSC 24、48、72 h, 与对照组比较, 神经酰胺 30、45、60、75、90 μ mol/L 对 HSC 呈浓度-时间依赖性(表 2)。

表 1 青蒿琥酯对肝星状细胞的抑制率(%, $\bar{x} \pm s$, n=3)

Tab 1 Inhibition rate on HSC caused by Art (% , $\bar{x} \pm s$, n=3)

青蒿琥酯浓度/ (μ mol/L)	抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
100	2.52±0.04*	26.47±0.05**	33.51±0.04**
200	18.43±0.03*	29.63±0.08**	44.29±0.03**
300	26.55±0.07*	43.19±0.03**	55.06±0.04**
400	33.40±0.01*	52.37±0.02**	72.40±0.04**
500	45.89±0.02*	55.10±0.01**	74.35±0.03**

相同作用时间, 与对照组比较, *P<0.01; 相同浓度, 与作用 24 h 比较, **P<0.01

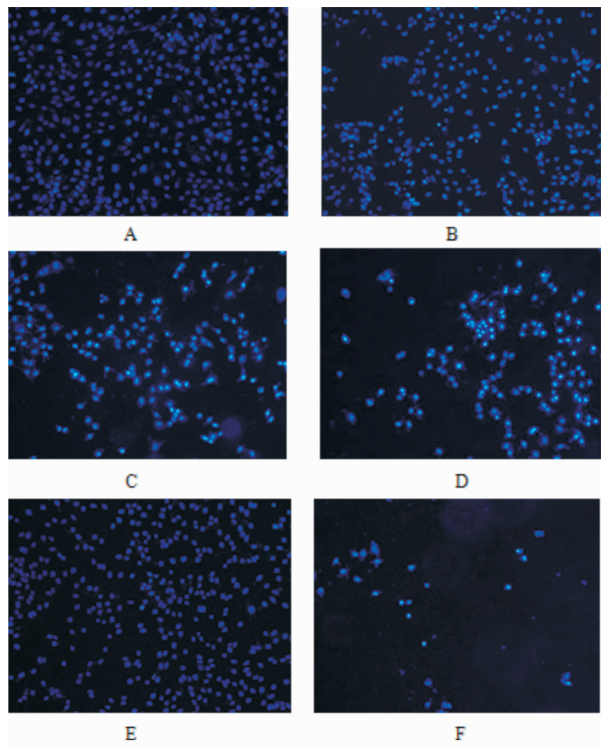
表 2 神经酰胺(C2)对肝星状细胞的抑制率(%, $\bar{x} \pm s$, n=3)

Tab 2 Inhibition rate on HSC caused by C2 (% , $\bar{x} \pm s$, n=3)

神经酰胺浓度/ (μ mol/L)	抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
30	9.29±7.19*	32.02±9.02**	41.00±5.99**
45	29.20±4.34*	40.01±5.25**	47.12±3.02**
60	52.52±3.55*	64.66±0.92**	80.15±3.65**
75	63.56±0.81*	68.23±2.25**	86.94±1.84**
90	74.51±3.86*	76.19±2.72**	90.24±2.28**

相同作用时间, 与对照组比较, *P<0.01; 相同浓度, 与作用 24 h 比较, **P<0.01

2.2 Hoechst 33258 荧光染色检测细胞凋亡 肝星状细胞的 DNA 在结合了 Hoechst 33258 后,紫外光激发时发射明显的蓝色荧光。青蒿琥酯组及神经酰胺组的细胞核均出现了典型的凋亡的形态学改变,部分染色质出现浓缩状态,细胞核的染色质高度凝聚、边缘化,严重时甚至裂解为碎块,产生凋亡小体,而正常对照组及溶剂对照组的胞核没有出现明显的形态学改变,胞核形态规则,发出均匀的荧光,偶见少量自发凋亡(图 1)。



A: 正常对照组;B:青蒿琥酯 250 $\mu\text{mol/L}$ 组;C:青蒿琥酯 350 $\mu\text{mol/L}$ 组;D:青蒿琥酯 450 $\mu\text{mol/L}$ 组;E:溶剂对照组;F:神经酰胺 60 $\mu\text{mol/L}$ 组

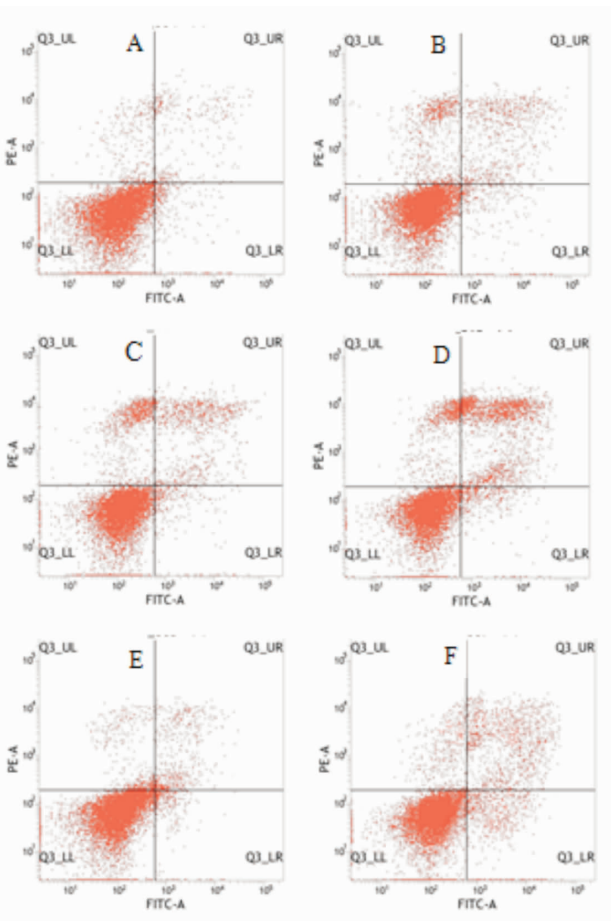
图 1 Hoechst 33258 荧光染色检测细胞凋亡
Fig 1 Hoechst 33258 staining to detect cell apoptosis

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 青蒿琥酯及神经酰胺均能诱导肝星状细胞的凋亡,且作用 24 h 后,凋亡主要发生在晚期。各给药组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)(图 2,表 3)。

在双变量流式散点图中,左上象限表示机械损伤细胞 (Annexin-FITC/ PI^+),左下象限表示正常活细胞(Annexin-FITC/ PI^-),右上象限表示凋亡中晚期细胞(Annexin-FITC/ PI^+),右下象限表示早期凋亡细胞(Annexin-FITC/ PI^-)。

2.4 青蒿琥酯作用后细胞培养上清中神经酰胺的含量测定 经青蒿琥酯处理 24 h 后,HSC 培养上清中 C2 的含量与对照组比较有统计学意义 ($P<0.01$),随青蒿琥酯浓度的升高而增加,呈现剂量依

赖性(表 4)。



A: 正常对照组;B:青蒿琥酯 250 $\mu\text{mol/L}$ 组;C:青蒿琥酯 350 $\mu\text{mol/L}$ 组;D:青蒿琥酯 450 $\mu\text{mol/L}$ 组;E:溶剂对照组;F:神经酰胺 60 $\mu\text{mol/L}$ 组

图 2 青蒿琥酯及神经酰胺对肝星状细胞凋亡率的影响
Fig 2 Effect of artesunate and ceramide on apoptosis rate of HSC

表 3 不同处理组对肝星状细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 3 Effect of different treatments on HSCs apoptosis rate ($\bar{x}\pm s, n=3$)	
组别	总凋亡率/%
正常对照组	5.98 \pm 0.64
Art 250 $\mu\text{mol/L}$	10.17 \pm 0.98*
Art 350 $\mu\text{mol/L}$	12.21 \pm 1.35*
Art 450 $\mu\text{mol/L}$	23.03 \pm 1.07*
溶剂对照组	7.76 \pm 0.87*
C2 60 $\mu\text{mol/L}$	18.03 \pm 1.02*

与正常组比较, $*P<0.01$;与溶剂对照组比较, $^{\#}P<0.01$

表 4 青蒿琥酯处理 24 h 后 HSC 上清中 C2 的含量($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab 4 C2 content of HSC supernatant treated with Art after 24 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)	
青蒿琥酯浓度/($\mu\text{mol/L}$)	C2 含量/($\mu\text{g/mL}$)
0	0.25 \pm 0.03
250	0.56 \pm 0.03*
350	0.71 \pm 0.04*
450	0.80 \pm 0.04*

与对照组比较, $*P<0.01$

3 讨论

肝星状细胞被广泛用于研究肝纤维化的体外模型^[8]。LX-1 细胞系和 LX-2 细胞系筛自转染了 pRSVTag 质粒的原代细胞自发无限增殖的细胞^[9]。经基因芯片检测, LX-1 和 LX-2 与原代肝星状细胞分别具有 98.4%和 98.7%的基因相似度。故这两种细胞被广泛用于研究肝星状细胞激活及抑制活化的细胞模型^[10]。

细胞凋亡或程序化细胞死亡 (programmed cell death, PCD)是多种细胞有机体为调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动死亡的过程。有研究发现,在肝纤维化进展过程中 HSC 有丝分裂及凋亡均增加,但以增殖为主。而在逆转阶段凋亡占优势,使 HSC 失去净增加。我们的研究发现,青蒿琥酯及神经酰胺在抑制 HSC 的增殖及诱导 HSC 的凋亡方面均表现出相同的趋势,说明青蒿琥酯及神经酰胺均能发挥抗肝纤维化的作用。

在神经酰胺家族中,只有 C2 和 C6 能够穿透细胞膜,目前尚无测定细胞内神经酰胺含量的有效方法,因此我们通过检测细胞培养上清中 C2 的含量推断细胞内神经酰胺的含量变化。高效液相测定结果表明,经青蒿琥酯作用后的 HSC 培养上清中 C2 的含量增加,说明青蒿琥酯抑制 HSC 的增殖并诱导其凋亡可能与上调 HSC 内神经酰胺的表达有关,这为我们进一步研究青蒿琥酯抗肝纤维化作用机制

提供了新的思路。我们将针对神经酰胺下游信号通路继续研究青蒿琥酯抗肝纤维化作用的机制。

参考文献:

- [1] 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): 1
- [2] Gaca M D, Zhou X, Issa R, et al. Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells[J]. Matrix Biol, 2003, 22(3): 229
- [3] 靳雅玲, 欧士钰. Bcl-2, Bax 与肝纤维化关系的研究进展[J]. 临床医学工程, 2013, 20(1): 124
- [4] Efferth T, Dunsan H, Sauerhrey A, et al. The anti-malarial artesunate is also active against cancer[J]. Int J Oncol, 2001, 18(4): 767
- [5] 杨冬娣, 刘金元. 青蒿琥酯对肝纤维化小鼠肝星状细胞凋亡及其相关蛋白的影响[J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(3): 323
- [6] 张洪, 詹慧, 沈瑶, 等. 青蒿琥酯对大鼠肝星状细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国药师, 2013, 16(3): 322
- [7] 娄婷婷, 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(10): 1807
- [8] Wallace K, Burt A D, Wright M C. Liver fibrosis[J]. Biochem J, 2008, 41(1): 1
- [9] Xu L, Hui A Y, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54(1): 142
- [10] 秦桢楠, 钟耀刚, 李铮. 人肝星状细胞激活和抑制及其相关分子机制的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(10): 1127

(2014-02-21 收稿)

《天津医科大学学报》编辑部网络采编办公系统开通运行通知

各位作者您好! 为提高稿件处理和办公效率,《天津医科大学学报》编辑部已从 2014 年 2 月开始使用网络采编办公系统。

作者投稿采用新的网络平台(<http://tjykdxxb.paperopen.com>),不再使用纸质投稿,特此公告,望作者们予以支持与合作。

在使用网络投稿系统中您有任何疑问、意见和建议,请您电话 022-83336719;022-83336803 或者发邮件到 xuebao@tjmu.edu.cn。

注意:投稿作者请详细阅读网站首页——左侧栏目——作者园地相关说明,谢谢!

(本刊编辑部)