

丹参酚酸 B和姜黄素抑制大鼠肝星状细胞细胞外信号调节激酶的磷酸化

成扬,平键,刘成,谭英姿,陈高峰(上海中医药大学附属曙光医院肝二科,上海 201203)

摘要:目的 研究丹参酚酸 B(SAB)和姜黄素(Cur)对大鼠肝星状细胞(HSC)增殖、活化和细胞外信号调节激酶(ERK)的作用。方法 培养大鼠 HSC-T6,使用 SAB和 Cur处理细胞,采用 MTT法检测药物对细胞增殖的影响。收集裂解细胞并抽提细胞总蛋白,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,采用 Western blot法检测药物对细胞表达 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I型胶原、ERK和磷酸化 ERK的影响。结果 Cur剂量依赖性地抑制大鼠 HSC的增殖和活化,SAB和 Cur显著降低 α -SMA的表达水平($P < 0.01$);SAB对 I型胶原的分泌无影响($P > 0.05$)而 Cur显著减少 I型胶原的分泌($P < 0.05$)。SAB和 Cur对 ERK表达水平都没有显著影响($P > 0.05$),但是显著降低了磷酸化 ERK的表达水平($P < 0.01$ vs. $P < 0.05$)。结论 SAB和 Cur能够抑制 HSC的增殖、活化和 ERK的磷酸化。

关键词:丹参酚酸 B;姜黄素;细胞外信号调节激酶;磷酸化

中图分类号:R965.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)02-0096-05

Salvianolic Acid B and Curcumin Inhibit the Phosphorylation of Extracellular Signal Regulated Kinase in Rat Hepatic Stellate Cells

CHENG Yang, PING Jian, LIU Cheng, TAN Ying-zi, CHEN Gao-feng (No. 2 Department of Liver Diseases, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of Salvianolic acid B (SAB) and Curcumin on the proliferation, activation and extracellular signal regulated kinase (ERK) in rat hepatic stellate cells. **METHODS** Rat hepatic stellate cells (HSC), T6, were cultured and treated with SAB or Curcumin according to the experimental protocol. The inhibition effect on cell proliferation was determined by 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide colorimetry. Cells were harvested and lysed to extract total cellular proteins. Proteins were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and the expression levels of α smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen, ERK and phosphorylated-ERK after drug treatments were determined by Western blot. **RESULTS** Curcumin inhibited HSC proliferation in a dose-dependent manner. Both SAB and Curcumin reduced the expression level of α -SMA significantly ($P < 0.01$). SAB had no effect on the expression of type I collagen ($P > 0.05$) while Curcumin reduced the

基金项目:国家自然科学基金项目(No.30300458);上海市教委重点学科建设项目(Y0302)

作者简介:成扬(1972-),男,硕士生导师,副研究员,博士,留法博士后。研究方向:中西医结合抗肝纤维化。Tel: 021-51328888-8112, E-mail: chengyang@smmail.cn

expression of type I collagen significantly ($P < 0.05$). Both of SAB and Curcumin had no significant effect on the ERK expression level ($P > 0.05$), but significantly reduced phosphorylated-ERK expression level ($P < 0.01$ vs. $P < 0.05$, respectively). **CONCLUSION**

SAB and Curcumin could significantly inhibit the proliferation, activation and ERK phosphorylation.

KEY WORDS: Salvianolic acid B; Curcumin; extracellular signal regulated kinase; phosphorylation

肝纤维化是各种慢性肝损伤后发生的修复过程,在此过程中肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 活化并转分化为肌成纤维样细胞,表现为细胞增殖增加、储存维生素 A 的能力下降、表达 α 平滑肌肌动蛋白 (α smooth muscle actin, α -SMA) 以及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 生成增多^[1]。目前治疗肝纤维化的药物或毒性较大或疗效欠佳,因此寻找有效的抗肝纤维化药物十分迫切。丹参 (*Salvia Miltiorrhiza* Bunge) 和姜黄 (*Curcuma Longa* Linn) 是应用历史悠久的活血化淤类药物,丹参水溶性成分主要是酚酸类化合物,丹参酚酸 B (salvianolic acid B, SAB) 是最主要的有效成分^[2];姜黄素 (curcumin, Cur) 是从姜黄中提取的植物多酚,是最重要的活性成分^[3-4]。本实验主要探讨 SAB 和 Cur 对 HSC 中丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 中细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 的影响,以探索抗肝纤维化的新途径并初步阐明其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大鼠肝星状细胞株 大鼠肝星状细胞株 HSC-T6,由美国加利福尼亚旧金山总医院肝病研究中心 Scott Friedman 教授馈赠,本所常规保存。该细胞系由 SV40 转染 SD 大鼠肝星状细胞建立而成,表型为活化的肝星状细胞^[5]。

1.1.2 主要试剂 Cur 相对分子质量为 368.39,购自美国 Sigma 公司。SAB 相对分子质量为 718,由中国科学院上海药物学研究所提供,含量以丹参酚酸 B 镁盐 ($C_{36}H_{28}MgO_{16}$) 计不低于 80%。四甲基偶氮唑盐 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT] 为 Serva 公司产品,DMEM 培养基干粉为 Gibco 公司产品,胎牛血清购自 Hyclone 公司。

蛋白酶抑制剂 (complete mini) 为 Roche 公司产品。预染蛋白标准品为 Fementas 公司产品。兔抗大鼠 I 型胶原多克隆抗体,德国 Merck 公司产品。小鼠抗大鼠 α -SMA 单克隆抗体,购自 Sigma 公司。兔抗大鼠 ERK1 多克隆抗体、小鼠抗大鼠磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的绵羊抗小鼠单克隆 II 抗和山羊抗兔多克隆 II 抗为 Santa Cruz 公司产品。小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体购自康成公司。DC 蛋白定量试剂盒, Bio-Rad 公司产品。ECL Western 印染发光试剂购自 PIRCE 公司。其余常用试剂为分析纯。

1.1.3 实验用品及仪器 培养皿、培养板,美国 Coming 公司产品。 CO_2 培养箱和 HEALFORCE 生物安全柜,德国 Heraeus 公司制造。Labsystems Multiskan MS Microplate Reader,芬兰制造。XDS-1B 倒置相差显微镜,重庆光电公司制造。

微量移液器,购自法国 Gilson 公司。Western blot 电泳设备,购自 Bio-Rad 公司。复日 FR-980 图像分析系统,上海复日科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 HSC-T6 的培养 复苏后的细胞以含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基均匀接种于培养皿, $37^\circ C$, 5% CO_2 培养箱培养,当细胞处于对数生长期时,胰酶消化,培养液悬浮细胞,96 孔培养板每孔 100 μL , 60 mm 培养皿每皿 2000 μL 培养液培养,细胞融合达 80% 时进行实验。

1.2.2 药物对细胞增殖的影响 细胞调整为 1×10^4 /L 密度接种于 96 孔培养板,24 h 后换低血清培养液培养 24 h。然后 Cur 使用二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 助溶并用 2% FBS + DMEM 培养液稀释,分别配成 10, 20, 30, 40 和 50 $\mu mol/L$ 处理细胞,每种浓度至少 2~3 孔,并设无药细胞对照。加药培养 24 h 后,倒置相差显微镜下观察细胞形态,台盼蓝染色观察细胞活力。倾去培养液,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 贮存液 10 μL ,继续孵育 4 h,吸弃上清,加酸性异丙醇振荡溶解,然后在酶标仪 570 nm 波长处测定 A 值。SAB 工作浓度的选择参见本所既往报道^[2]。

1.2.3 药物对 α -SMA、I 型胶原、ERK 和磷酸化 ERK 的影响

1.2.3.1 药物干预方法 细胞接种于 60 mm 培养皿,根据 MTT 结果并参照既往实验^[3-4],Cur 使用 DMSO 助溶,无血清培养液稀释至 30 $\mu mol/L$,SAB 以无血清培养液稀释至 1 $\mu mol/L$ ^[2],每培养皿加入含药培养液 2 mL,孵育 24 h。

1.2.3.2 细胞总蛋白的提取、含量测定 药物干预细胞后,弃培养上清,用预冷的 PBS 洗涤两次,加细胞裂解液及蛋白酶抑制剂。用细胞刮子将培养皿中的细胞刮下,收入 1.5 mL 离心管,混匀, $4^\circ C$ 静置 30 min;然后 $4^\circ C$, 12 000 r/min,离心 15 min,取上清即为细胞总蛋白, $-70^\circ C$ 保存待测。总蛋白含量使用 Bio-Rad 公司 DC Protein Assay Reagent 在酶标仪 690 nm 波长测定。

1.2.3.3 蛋白电泳、电转移与膜封闭 制备 10% 分离胶 10 mL 和 5% 积层胶 5 mL,将蛋白样品及标准蛋白与 1/4 倍的样品缓冲液混合后, $100^\circ C$ 加热 5 min 以使蛋白变性,离心冷却后上样;将胶放入电泳槽,加适量电泳液,样品蛋白上样后 80 V,电泳 2~3 h。将膜取出,上覆与凝胶大小相同的硝酸纤维素膜,两侧覆以滤纸和纤维垫,置于转膜槽中,加入适量转膜液, $4^\circ C$, 0.22 A 约 1.5 h,转膜结束后,去离子水洗 5 min,以 5% 脱脂奶粉封闭,室温、水平摇床振荡 1 h。

1.2.3.4 抗原抗体反应 封闭结束后弃封闭液,分别加入溶有 I 抗 [β -actin 抗体 (1:5 000)、 α -SMA 抗体 (1:5 000)、I 型胶原抗体 (1:200)、ERK1 多克隆抗体 (1:500) 和磷酸化 ERK1/2 抗体 (1:200)] 的 5% 脱脂奶粉 TTBS 液 (0.121%

Tris 0.9% NaCl 0.1% Tween-20 pH 7.5 4℃、摇床过夜。TTBS洗膜 3次除去未结合的 I 抗, 然后加入含辣根过氧化物酶标记 II 抗(根据 I 抗不同加入绵羊抗小鼠 II 抗或者山羊抗兔 II 抗, 1:2 000~5 000)的 5% 脱脂奶粉 TTBS液, 室温、水平摇床振荡 1 h 后, TTBS洗膜 3次约 30 min, 除去未结合的 II 抗。

1.2.3.5 ECL 显影、曝光 取等量的 ECL(A, B)试剂混匀, 将膜浸入 1 min 取出, 保鲜膜封好, 暗室里将膜与 X 线胶片置暗匣中, 曝光 2~5 min, 然后将 X 线胶片显影、定影各 1 min 水洗, 晾干。参照文献方法^[3]目标条带使用图像分析软件扫描测定灰度值并使用内参照 β -actin 进行校正分析。

2 数据统计与分析

各组测定值以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 10.0 软件包进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 Cur 剂量依赖性抑制 HSC 的增殖

MTT 检测发现, 10 20 30 40 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cur 对大鼠 HSC-T6 细胞增殖的抑制作用呈剂量依赖性增加, 倒置显微镜下形态学观察结合台盼蓝检测发现 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cur 对 HSC 没有明显毒性作用。分别选取 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 SAB^[2] 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cur 进行后续实验, 见图 1。

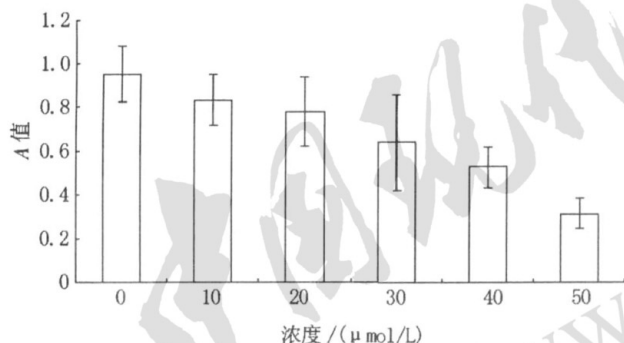


图 1 姜黄素对 HSC-T6 细胞增殖的影响 (MTT 比色法)

Fig 1 Effect of Curcumin on the proliferation of HSC-T6 (MTT colorimetry)

3.2 SAB 和 Cur 抑制 HSC 的活化

Western blot 结果发现 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 SAB 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cur 均能够显著降低 α -SMA 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$), 提示这两种药物可以抑制 HSC 的活化, 见图 2。

3.3 SAB 和 Cur 对 HSC 表达 ECM 成分的影响

Cur 显著降低 I 型胶原的表达 ($P < 0.05$), 提示 Cur 通过抑制 I 型胶原的生成来抑制 ECM 的生成。而 SAB 对 I 型胶原的表达影响不大 ($P > 0.05$), 推测 SAB 可能通过抑制 ECM 中其他成分而发挥作用 (见图 3)。

3.4 SAB 和 Cur 对 ERK 和磷酸化 ERK 的影响

SAB 和 Cur 对 ERK 蛋白表达水平并无影响 ($P > 0.05$), 但是降低了磷酸化 ERK 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$ vs $P < 0.05$), 提示药物能够抑制 ERK 的磷酸化 (见图 4)。

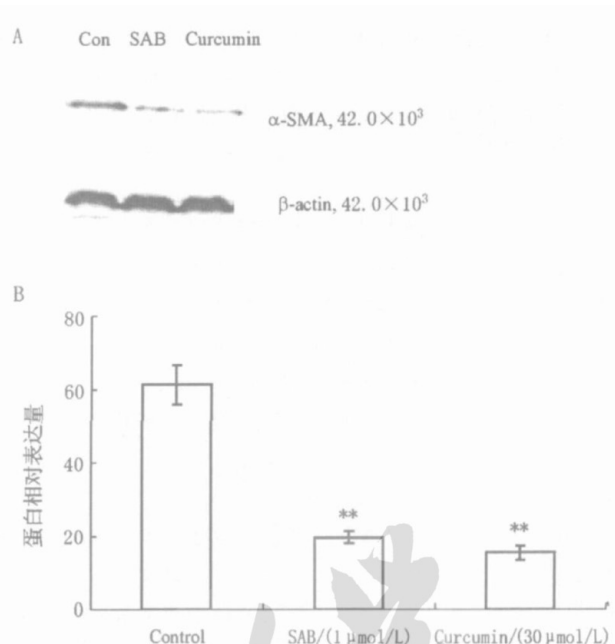


图 2 丹参酚酸 B 和姜黄素对 α -SMA 表达水平的影响

Fig 2 Effect of SAB and Curcumin on the protein expression level of α -SMA

(A) 上列为 α -SMA 的检测条带, 下列为作为内参照的 β -actin 条带; (B) 使用 β -actin 校正的 α -SMA 相对表达量。* $P < 0.01$ 与对照组相比较

(A) Top panel shows α -SMA, bottom panel shows β -actin, which was used as an internal control (B) Relative expression level of α -SMA were determined relative to β -actin * $P < 0.01$ vs Control

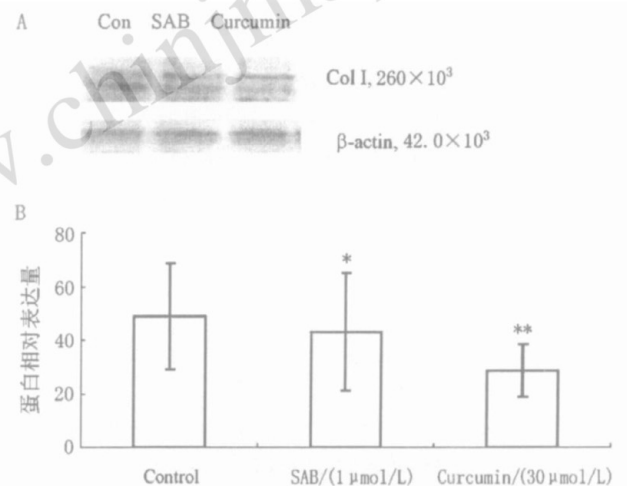


图 3 丹参酚酸 B 和姜黄素对 I 型胶原合成的影响

Fig 3 Effect of SAB and Curcumin on the protein expression level of Collagen I

(A) 上列为 I 型胶原检测条带, 下列为内参照 β -actin 条带; (B) 使用 β -actin 校正的 I 型胶原相对表达量。* $P > 0.05$ 与对照组相比较; ** $P < 0.05$ 与对照组相比较

(A) Top panel shows Collagen I bottom panel shows β -actin, which was used as an internal control (B) Relative expression level of Collagen I were determined relative to β -actin * $P > 0.05$ vs Control ** $P < 0.05$ vs Control

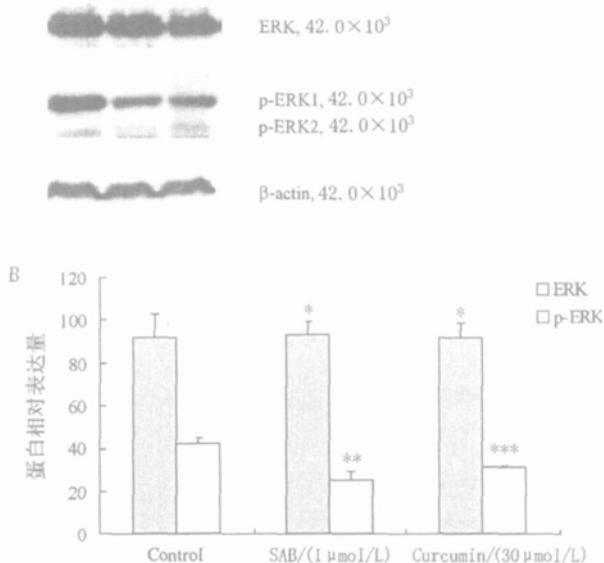


图4 丹参酚酸B和姜黄素对ERK和磷酸化ERK表达水平的影响

Fig 4 Effect of SAB and Curcumin on the protein expression level of ERK and phosphorylated-ERK

(A)上列为ERK条带,中列为磷酸化ERK条带,下列为内参照 β -actin条带;(B)使用 β -actin校正的ERK和磷酸化ERK相对表达量。* $P > 0.05$ 与对照组相比较,** $P < 0.01$ 与对照组相比较,*** $P = 0.043$ 与对照组相比较

(A) Top panel shows ERK, middle panel shows phosphorylated-ERK, bottom panel shows β -actin, which was used as an internal control; (B) Relative expression level of ERK and phosphorylated-ERK were determined relative to β -actin. * $P > 0.05$ vs. Control; ** $P < 0.01$ vs. Control; *** $P = 0.043$ vs. Control

4 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理学基础^[1-4],虽然致病机制不完全相同,但不同病因肝纤维化发生的共同途径是HSC活化。HSC是位于Disse间隙的一种间质细胞,正常情况下处于静息状态,活化后HSC具有收缩性的特点,因此 α -SMA的表达是HSC活化的最重要标志。胶原是ECM的主要成分,正常肝脏中III型胶原多于I型胶原,肝纤维化时胶原总量与种类均发生变化,I型胶原成为肝纤维化时纤维间隔的主要成分之一。抑制I型胶原的分泌不仅可以减少ECM成分的增加,还可以减少HSC的进一步活化^[1,3]。大鼠HSC-T6是通过将SV40转染大鼠HSC而建立的,表现型为活化的HSC,是较好的进行抗肝纤维化研究的细胞模型^[3,5]。丹参几乎是各种抗肝纤维化药物的必用之药^[2],而姜黄在抗肝纤维化中的作用也越来越引起重视^[3-4,6-7]。抑制HSC增殖及ECM生成是抗肝纤维化治疗的重要策略^[1,3],既往发现SAB具有一定的抗肝纤维化作用^[2]。Cur对四氯化碳、D-氨基半乳糖或者卡介苗加脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤有保护作用^[7],并能够激活过氧化物酶体增殖因子 γ 信号转导途径^[4],但是对MAPK信号通路中ERK的影响尚不清楚。

细胞外刺激引起的效应需要通过细胞内信号传导途径来实现,不同的信号传导途径引起不同的生物学效应^[4,8-9]。多数蛋白激酶不能穿透核膜,被激活的信号在细胞内传递并最终活化转录因子导致基因表达和效应蛋白质的生成,MAPK是多种信号交汇点或共同通路。ERK参与调控HSC的增殖、胶原合成及转化生长因子 β -1自分泌过程,是MAPK信号通路的主要和经典通路^[8-11],通过传递细胞丝裂原信号,对细胞的局部黏附、迁移、增殖、分化、凋亡以及细胞周期发挥重要影响。本研究发现SAB和Cur能够有效抑制HSC的增殖、活化以及合成ECM成分,提示两者均能在细胞水平发挥抗肝纤维化效应。两者对ERK本身没有作用,但能抑制ERK的磷酸化,初步推测两者的抗肝纤维化效应与抑制ERK磷酸化从而干扰其所介导的信号通路有关。但是由于HSC活化受到多种因素、多条信号传导途径的调节,ERK并非调控HSC表型改变的唯一通路^[4,6]。肝纤维化的发生机制极其复杂^[1,4],这也是目前单一药物治疗并不理想的原因,本研究发现SAB和Cur对检测指标影响程度并不完全一致也证实了这点。多途径、多靶点的药物或者药物组合,可能会比单一药物更加有效,或许能够改变目前抗肝纤维化药物治疗疗效欠佳的窘境。总之,SAB和Cur在肝纤维化的治疗中具有极大的应用潜力,值得进一步深入研究,对其作用机制也有待深入阐明。

参考文献

- [1] FRIEDMAN S L. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications [J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2004, 1 (2): 98-105.
- [2] XU L, LIU C. Effect of salvianolic acid B on the proliferation and production of extracellular matrix in passaged rat hepatic fatty-storing cells [J]. Chin J Hepatol (中华肝脏病杂志), 1996, 4 (2): 86-89.
- [3] CHENG Y, PING J, TAN Y, *et al.* Effect of Curcuma longa Linn extraction on the proliferation and activation of rat hepatic stellate cell [J]. World Journal of Infection (世界感染杂志), 2006, 6 (1): 19-21.
- [4] CHENG Y, PING J, XU L, *et al.* Curcumin inhibits the activation marker of hepatic stellate cells by up-regulating the peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. Chin J Pract Intern Med (中国实用内科杂志), 2006, 26 (24): 1937-1940.
- [5] VOGEL S, PIANTEDOSI R, FRANK J, *et al.* An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism *in vitro* [J]. J Lipid Res, 2000, 41 (6): 882-893.
- [6] CHENG Y, PING J. Salvianolic acid B and Curcumin reduce the phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 expression level in rat hepatic stellate cells [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21 (S2): A145.
- [7] LIU Y, CHEN H, JIANG Y. Protective effect of curcumin on experimental liver injury in mice [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2003, 28 (8): 756-758.

- [8] PINZANI M, MARRA F, CALIGIURI A, *et al.* Inhibition by pentoxifylline of extracellular signal-regulated kinase activation by platelet-derived growth factor in hepatic stellate cells[J]. Br J Pharmacol, 1996, 119(6): 1117-1124.
- [9] SAXENA N K, TITUS M A, DING X, *et al.* Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation[J]. FASEB J, 2004, 18(13): 1612-1614.
- [10] MARRA F, ARRIGHI M C, FAZIM, *et al.* Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat[J]. Hepatology, 1999, 30(4): 951-958.
- [11] MARRA F, DELOGU W, PETRAI I, *et al.* Differential requirement of members of the MAPK family for CCl₄ expression by hepatic stellate cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 287(1): G18-G26.

收稿日期: 2006-06-04