

sp600125 对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及 Caspase-3 蛋白表达的影响

唐文, 蒋明德, 李小安

唐文, 蒋明德, 李小安, 第三军医大学成都临床学院 成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083

全军十五医药卫生科研基金项目, No. 01MB037

通讯作者: 蒋明德, 610083, 四川省成都市成都军区总医院消化内科.

jiangmd88@yahoo.com.cn

电话: 028-86570346 传真: 028-86570346

收稿日期: 2005-07-19 接受日期: 2005-08-05

Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats

Wen Tang, Ming-De Jiang, Xiao-An Li

Wen Tang, Ming-De Jiang, Xiao-An Li, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Supported by the Military Medicine Scientific Research Foundation during 10th Five-Year Plan Period, No. 01MB037

Correspondence to: Dr. Ming-De Jiang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. jiangmd88@yahoo.com.cn

Received: 2005-07-19 Accepted: 2005-08-05

Abstract

AIM: To explore the effect of sp600125, a special inhibitor of c-Jun terminal kinase (JNK), on the acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells-T6 (HSC-T6) and the expression of Caspase-3 protein in rats.

METHODS: The rat HSC-T6 induced by acetaldehyde was treated with different doses of sp600125. The proliferation of HSC-T6 was evaluated by MTT colorimetric assay, and the morphological changes of HSC-T6 were observed by Hoechst 33258 staining. The apoptotic rate of HSC-T6 was analyzed by flow cytometry (FCM), and the expression of Caspase-3 protein was examined by SABC method.

RESULTS: The proliferation of HSC-T6 was inhibited by different doses of sp600125 ($F = 102.53$, $P < 0.01$). The apoptotic rate of HSC-T6 ($F = 38.26$, $P < 0.01$) and the expression of Caspase-3 protein ($F = 38.26$, $P < 0.01$) were significantly increased with the increasing of the sp600125 doses.

CONCLUSION: sp600125 can inhibit the proliferation

and accelerate the apoptosis of HSC-T6, which may be related to the increased expression of Caspase-3 protein.

Key Words: Liver fibrosis; Hepatic stellate cells; sp600125; Caspase-3

Tang W, Jiang MD, Li XA. Effects of sp600125 on acetaldehyde-induced apoptosis of hepatic stellate cells and expression of Caspase-3 protein in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(18):2263-2265

摘要

目的: 探讨c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号传导通路特异阻断剂sp600125对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)凋亡以及Caspase-3蛋白表达的影响。

方法: 不同浓度sp600125对乙醛刺激的大鼠HSC-T6进行处理后, MTT比色法检测细胞增殖, 用Hoechst 33258染色来观察凋亡细胞的形态变化, FCM检测细胞凋亡率, SABC法检测Caspase-3蛋白表达。

结果: 不同浓度的sp600125能抑制HSC-T6增殖($F = 102.53$, $P < 0.01$), 诱导HSC-T6凋亡; 随着sp600125浓度增加, HSC-T6凋亡率逐渐增高($F = 38.26$, $P < 0.01$), HSC-T6细胞内Caspase-3蛋白阳性表达率也逐渐增高($F = 38.26$, $P < 0.01$)。

结论: 不同浓度sp600125能抑制HSC-T6增殖, 诱导HSC-T6凋亡, 这可能与促进Caspase-3蛋白表达有关。

关键词: 肝纤维化; 肝星状细胞; sp600125; Caspase-3

唐文, 蒋明德, 李小安. sp600125对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞凋亡及Caspase-3蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(18):2263-2265
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2263.asp>

0 引言

目前认为肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活、增殖是肝纤维化发生的关键环节. 乙醛刺激的HSC激活、增殖是导致酒精性肝纤维化发生的关键因素^[1,2]. 近年来研究表明^[3], MAPK (mitogen-activated protein kinase, 包括ERk、JNK、P38)是HSC激活、增殖并导致肝纤维化发生的主要信号传导通路之一, 其中, JNK信号传导通路参与了细胞增殖、分化以及凋亡的调控. 在我们既往对肝纤维化发病机制的研究中^[4],

已经用Western blot法证实, 乙醛刺激的HSC的p-JNK水平随sp600125 (JNK信号传导通路特异阻断剂) 浓度增加而减少, sp600125可以抑制HSC的增殖, 阻止肝纤维化的发生. 研究显示, JNK信号传导通路在细胞凋亡中起重要作用, HSC凋亡有利于阻止肝纤维化的发生, 但JNK信号传导通路在HSC凋亡过程中的作用机制尚不清楚, 我们拟用sp600125处理乙醛刺激的HSC-T6, 观察sp600125对HSC-T6凋亡以及Caspase-3蛋白表达的影响, 进一步探讨酒精性肝纤维化的发生机制.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠HSC-T6株(上海中医药大学肝病研究所); sp600125(美国Alexis公司); Caspase-3单克隆抗体、SABC试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); MTT(美国Amresco公司); Hoechst 33258试剂盒(碧云天生物技术公司); DAB试剂盒(北京中山生物技术有限公司); 小牛血清(成都哈里生物工程有限公司); DMEM培养基(美国Gibco公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含100 mL/L小牛血清的DMEM培养基, 另添加适量的HEPES、抗生素; 37°C、50 mL/L CO₂的孵箱中培养HSC-T6, 细胞换液时间为1-2 d, 传代时间为3-5 d, 传代前用2.5 g/L胰酶消化.

1.2.2 实验分组 空白对照组(A组): 加入含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液; 乙醛对照组(B组): 在含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液中加入乙醛200 μmol/L; 实验组: 在B组基础上加入sp600125, 终浓度分别为25、50、75、100 μmol/L, 分别称为C、D、E、F组.

1.2.3 MTT检测HSC-T6增殖 取大鼠HSC-T6, 调整浓度至 1×10^8 /L, 接种于96孔细胞培养板中, 每孔200 μL细胞悬液, 每组6复孔, 细胞生长至80%以上融合度时, 无血清培养基同步化处理24 h, 实验组经sp600125预处理1 h后, 加乙醛至200 μmol/L, CO₂培养箱中继续孵育24 h后(乙醛每12 h补充一次), 每孔加5 g/L的MTT 20 μL, 37°C反应4 h, 然后弃去培养液, 每孔加150 μL DMSO, 30 min后用酶标仪, 双波长测定A值, 测定波长为570 nm, 参考波长为630 nm, 酶标仪所示A值为 A_{570nm} 减去 A_{630nm} , A值反应细胞增殖水平.

1.2.4 Hoechst 33258检测HSC-T6凋亡 用6孔板制作HSC-T6细胞爬片(每孔 1×10^8 /L细胞悬液1 mL, 每组重复实验3次), 孵育24 h后再进行无血清DMEM液同步化处理24 h, 实验组经sp600125预处理1 h后, 加乙醛至200 μmol/L, CO₂培养箱中继续孵育24 h后(乙醛每12 h补充一次), 去培养液, PBS洗2遍, 每次3 min, 按Hoechst 33258试剂盒说明操作, 在荧光显微镜下观察HSC-T6细胞形态变化.

1.2.5 FCM测定HSC-T6细胞凋亡 每组重复实验3次, 收集培养的各组HSC-T6, 预冷PBS清洗, 700 mL/L冷乙

醇固定, 50 mg/L Rnase 37°C消化, 65 mg/L碘化丙啶(PI)4°C染色1 h. 上机检测, 计算细胞凋亡率.

1.2.6 SABC法测定HSC-T6中Caspase-3蛋白表达 制作HSC-T6细胞爬片, 每组重复实验3次, 再按SABC试剂盒说明进行操作, 显微镜下观察, 细胞中有棕黄色或棕褐色颗粒者为阳性结果, 计算Caspase-3蛋白表达阳性率.

统计学处理 运用SPSS10.0软件, 用One-way ANOVA分析, 并用LSD方法进行组间两两比较, 数据以mean ± SD表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 MTT检测HSC-T6增殖 培养的HSC-T6中加入乙醛后, 细胞增殖明显; 当分别加入不同浓度的sp600125后, HSC-T6增殖受到抑制($F = 102.53, P < 0.01$, 表1).

2.2 Hoechst 33258检测HSC-T6凋亡细胞的形态改变 在荧光显微镜下可观察到乙醛组HSC-T6的细胞核染色及大小较均一; 当加入不同浓度的sp600125后, HSC-T6凋亡细胞逐渐增多, 表现为细胞核浓缩、染色深, 细胞核大小不均、裂解、形成凋亡小体.

2.3 FCM测定细胞凋亡 A组HSC-T6凋亡率除了与C组无显著性差异外, 与其他组均有显著性差异($P < 0.01$); 乙醛组与其他组均有显著性差异($P < 0.01$). 随着sp600125浓度增加HSC-T6细胞凋亡率逐渐增加($F = 54.83, P < 0.01$, 表2).

2.4 SABC法测定HSC-T6中Caspase-3蛋白表达 A组HSC-T6中Caspase-3蛋白表达阳性率与B组、C组无显著性差异外, 与其他组均有显著性差异($P < 0.01$); 乙醛组与sp600125实验组均有显著性差异($P < 0.01$). 随着sp600125浓度增加HSC-T6细胞中Caspase-3蛋白表达阳性率逐渐增加($F = 38.26, P < 0.01$, 表3).

表1 sp600125对乙醛刺激的HSC-T6增殖的影响 (mean ± SD, $n = 6$)

组别	sp600125(μmol/L)+乙醛(μmol/L)	A值
A	0+0	0.0850 ± 0.0065 ^d
B	0+200	0.1410 ± 0.0029 ^b
C	25+200	0.1343 ± 0.0039 ^b
D	50+200	0.1297 ± 0.0033 ^{bd}
E	75+200	0.1138 ± 0.0082 ^{bd}
F	100+200	0.0877 ± 0.0077 ^d

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 乙醛组.

表2 sp600125对乙醛刺激的HSC-T6凋亡的影响 (mean ± SD, $n = 3$)

组别	sp600125(μmol/L)+乙醛(μmol/L)	凋亡率(%)
A	0+0	10.17 ± 0.64 ^d
B	0+200	8.57 ± 0.31 ^b
C	25+200	11.07 ± 0.25 ^d
D	50+200	11.83 ± 0.47 ^{bd}
E	75+200	13.47 ± 0.72 ^{bd}
F	100+200	16.13 ± 1.00 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 乙醛组.

表3 sp600125对乙醛刺激的HSC-T6 Caspase-3蛋白表达的影响
(mean ± SD, n = 3)

组别	sp600125(μmol/L)+乙醛(μmol/L)	阳性率(%)
A	0+0	18.34 ± 1.39
B	0+200	16.27 ± 0.47
C	25+200	18.81 ± 1.18 ^d
D	50+200	22.64 ± 1.48 ^{bd}
E	75+200	25.23 ± 1.11 ^{bd}
F	100+200	27.46 ± 1.41 ^{bd}

^bP < 0.01 vs 对照组; ^dP < 0.01 vs 乙醛组.

3 讨论

研究^[5,6]表明HSC的激活、增殖是肝纤维化发生、发展的中心环节,而HSC的凋亡有利于肝纤维化的逆转.因而,抑制激活的HSC增殖和诱导激活的HSC凋亡是治疗肝纤维化的一个重要研究方向.

MAPK信号传导通路(包括ERK、JNK、P38)是细胞外的各种信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要通路. JNK为MAPK家族重要成员, JNK的活化是通过其氨基酸残基磷酸化,细胞质中的JNK移位到细胞核,活化的JNK可以和转录因子ATF2及c-JNK的氨基末端区域结合,使转录因子的活性区域发生磷酸化,从而促进相应基因的表达^[7]. JNK信号传导通路的激活在肝纤维化发生中起重要作用: Marra *et al*^[8]研究表明, sp600125能抑制白细胞介素-1(IL-1)或肿瘤坏死因子(TNF)诱导的HSC CCL2(MCP-1)分泌和基因表达; Li *et al*^[9]研究表明酒精代谢产物亚麻酸乙酯(linolenic acid ethyl ester, LAEE)可通过ERK、JNK途径影响HSC AP-1活性及表达; Carriers *et al*^[10]研究表明,放线菌酮(Cycloheximide, CHX)与CD95L一起通过JNK途径诱导HSC凋亡; Anania *et al*^[11]研究表明阻断JNK活性后可抑制HSC内α(2)-1胶原的表达. 我们用sp600125阻断JNK活性后,能有效抑制HSC-T6增殖,随着sp600125剂量的增加,其抑制HSC-T6增殖的作用增强,说明阻断JNK信号传导通路可以抑制乙醛刺激的HSC增殖,从而阻止酒精性肝纤维化的发生.

细胞凋亡是基因控制的细胞程序化死亡,是一系列半胱氨酸蛋白酶Caspase级联反应的结果.在多种细胞和各种刺激因素的作用下, Caspase-3被认为是凋亡的关键执行者, Caspase-3处于该级联反应的下游,其通过降解细胞内相应底物(如细胞骨架蛋白、核蛋白等)使细胞凋亡.研究^[12,13]表明Superoxide、Tetrandrine等可通过Caspase-3诱导HSC凋亡.本实验用不同浓度sp600125

阻断JNK活性后,乙醛刺激的大鼠HSC-T6凋亡率逐渐增加,同时Caspase-3蛋白表达率也逐渐增加,说明sp600125阻断JNK信号传导通路后可以诱导HSC-T6凋亡,并且其作用机制可能在于上调Caspase-3基因表达.

HSC的凋亡不仅能够减少激活的HSC的数量,而且能够抑制HSC的激活,从而减少细胞外基质成分产生,达到阻止肝纤维化的发生、甚至逆转肝纤维化的目的.我们以sp600125阻断JNK信号传导通路为切入点,研究HSC凋亡,这对进一步阐明肝纤维化发生的分子机制和寻找一条治疗肝纤维化的可能途径均有重要意义.

4 参考文献

- Anania FA, Womack L, Jiang M, Saxena NK. Aldehydes potentiate alpha(2)(I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2001;30:846-857
- Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Saccomanno S, Bendia E, Benedetti A, Greenwel P. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001;33:1130-1140
- 王琼. 酪氨酸蛋白激酶及其抑制剂在肝星状细胞激活中的研究进展. *华西医学* 2002;17:147-148
- 钟显飞, 蒋明德, 马洪德, 曾维政, 李小安. JNK信号通路对乙醛刺激的大鼠肝星状细胞增殖的影响. *西南国防医药* 2004;14:350-353
- Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549
- Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001;161:1-151
- 陈良恩. JNK信号传导通路及其在应激中的作用. *国外医学. 生理病理科学与临床分册* 2001;21:169-171
- Marra F, Delogu W, Petrai I, Pastacaldi S, Bonacchi A, Efsen E, Aleffi S, Bertolani C, Pinzani M, Gentilini P. Differential requirement of members of the MAPK family for CCL2 expression by hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G18-G26
- Li J, Hu W, Baldassare JJ, Bora PS, Chen S, Poulos JE, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR. The ethanol metabolite, linolenic acid ethyl ester, stimulates mitogen-activated protein kinase and cyclin signaling in hepatic stellate cells. *Life Sci* 2003;73:1083-1096
- Carriers A, Reinehr R, Fischer R, Warskulat U, Haussinger D. c-Jun-N-terminal kinase dependent membrane targeting of CD95 in rat hepatic stellate cells. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:179-186
- Anania FA, Womack L, Jiang M, Saxena NK. Aldehydes potentiate alpha(2)(I) collagen gene activity by JNK in hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2001;30:846-857
- Thirunavukkarasu C, Watkins S, Harvey SA, Gandhi CR. Superoxide-induced apoptosis of activated rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2004;41:567-575
- Zhao YZ, Kim JY, Park EJ, Lee SH, Woo SW, Ko G, Sohn DH. Tetrandrine induces apoptosis in hepatic stellate cells. *Phytother Res* 2004;18:306-309