

• 药理与临床 •

白花丹醌对瘦素刺激的人肝星状细胞周期及其相关蛋白表达的影响

韦燕飞¹, 李景强¹, 张志伟², 张 园¹, 王玖恒¹, 赵铁建^{1*}

1. 广西中医药大学基础医学院 生理教研室, 广西 南宁 530001

2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530001

摘要: **目的** 研究白花丹醌对瘦素刺激的体外培养人肝星状细胞(HSC-LX2)细胞周期及周期相关蛋白表达的影响,探讨白花丹醌抗肝纤维化的作用机制。**方法** ELISA法检测HSC-LX2细胞培养上清液中自分泌瘦素水平。将HSC-LX2细胞分成对照组,瘦素组,白花丹醌2、8 μmol/L组,秋水仙碱6.25 μg/mL阳性对照组。除对照组外,其余各组细胞用瘦素100 μg/mL刺激24 h,再与药物共同培养24 h后,流式细胞仪检测HSC-LX2细胞周期,Western blotting法检测细胞周期相关蛋白cyclin D1、cyclin E1、p21的表达。**结果** HSC-LX2细胞自分泌瘦素的浓度先随着培养时间的延长而递减,24 h达到低谷值,48 h后又升至6 h水平,每个时间点分泌的瘦素量无显著差异($P>0.05$)。与对照组相比,瘦素组HSC-LX2细胞增殖能力显著增强,S期和G₂/M期细胞比例显著增加;白花丹醌2、8 μmol/L干预HSC-LX2细胞后,G₀/G₁期细胞的比例明显提高,而S期和G₂/M期细胞比例明显降低,且呈明显的浓度相关性。与对照组比较,瘦素组HSC-LX2细胞经瘦素刺激后细胞周期相关蛋白cyclin D1、cyclin E1的量显著增加,p21蛋白的表达受到抑制;白花丹醌2、8 μmol/L和秋水仙碱明显降低cyclin D1、cyclin E1蛋白水平,增强p21蛋白表达。**结论** 白花丹醌可明显抑制瘦素诱导的HSC-LX2细胞增殖,该作用主要是通过抑制细胞由G₀/G₁期向S期转变而产生的,作用机制可能与其降低cyclin D1、cyclin E1蛋白水平,增加p21蛋白表达相关。

关键词: 白花丹醌; 瘦素; 人肝星状细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞周期相关蛋白

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)09-1776-05

Effects of plumbagin on cell cycle of human hepatic stellate cells stimulated by leptin and its related protein expression

WEI Yan-fei¹, LI Jing-qiang¹, ZHANG Zhi-wei², ZHANG Yuan¹, WANG Jiu-heng¹, ZHAO Tie-jian¹

1. Department of Physiology, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Ruikang Hospital, of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of plumbagin on cell cycle of human hepatic stellate cells (HSC-LX2) stimulated by leptin *in vitro* and its expression of related proteins, so as to explore the mechanism of anti-hepatic fibrosis of plumbagin. **Methods** The level of autocrine leptin in culture supernate of HSC-LX2 was measured by ELISA. HSC-LX2 were divided into control, model (leptin), plumbagin low- and high-dose (2 and 8 μmol/L), and colchicines (6.25 μg/mL) groups. In addition to the control group, the other groups were stimulated by leptin (100 μg/mL) for 24 h and treated with plumbagin at different concentration and colchicine for 24 h later. HSC-LX2 cell cycle was detected by flow cytometry (FCM) and the expression of cell cycle-related proteins of cyclin D1, cyclin E1, and p21 were tested by Western blotting. **Results** The concentration of autocrine leptin in HSC-LX2 decreased with cultural time prolonging, the minimum time was at 24 h and after 48 h the level recovered to original level of 6 h ($P<0.05$). There was no significant difference in concentration of autocrine leptin at each time point ($P>0.05$). FCM analysis showed that in model group HSC-LX2 cell proliferation and cell number ratio of S and G₂/M phases significantly increased compared with the control group. At 24 h after addition of plumbagin (2 and 8 μmol/L), the percentage of HSC-LX2 at G₀/G₁ phase was apparent increased, while the total

收稿日期: 2012-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30760321); 广西高等学校优秀人才资助项目(J11065); 广西教育厅科研项目(200103YB083)

作者简介: 韦燕飞(1976—),女,广西人,医学博士,副教授,主要从事中医药防治肝脏疾病基础研究和教学工作。

Tel: (0771)2214279 E-mail: weiyanyanfei@163.com

*通讯作者 赵铁建 Tel: (0771)2214279 E-mail: ztj-nanning@163.com

percentage of HSC-LX2 cells at S and G₂/M phases was apparent decreased in a dose-dependent manner. Compared with the control group, the stimulation by leptin significantly increased the contents of cyclin D1 and cyclin E1 in HSC-LX2, and inhibited the expression of p21 protein. However, plumbagin (2 and 8 $\mu\text{mol/L}$) and colchicine significantly decreased the level of cyclin D1 and cyclin E1 and increased the expression of p21 protein. **Conclusion** Plumbagin could significantly inhibit the proliferation of HSC-LX2 induced by leptin through blocking HSC-LX2 to enter S phase from G₀/G₁ phase. Its mechanism might be related to the decrease of the expressions of cyclin D1 and cyclin E1 and the increase of p21 protein expression.

Key words: plumbagin; leptin; hepatic stellate cells; cell proliferation; cell cycle; cell cycle-related proteins

肝纤维化是多种因素作用的结果,不同病因导致肝纤维化的共同通路是人肝星状细胞(HSCs)的活化与增殖^[1],因此抑制HSCs增殖成为抗肝纤维化的重要手段。白花丹醌(plumbagin)是白花丹*Plumbago zeylanica* L. 中的主要活性成分,属小分子萘醌类化合物,具有抗菌、抗炎、抗风湿、抗凝血等广泛的药理活性^[2]。前期研究显示,白花丹醌体外可明显抑制人肝星状细胞(HSC-T6)的增殖,抑制转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达,促进活化的HSC-LX2细胞凋亡^[3-5]。近年来诸多研究表明细胞周期调控在细胞的增殖和分化中起重要作用,如果细胞周期的某个环节受阻,细胞生长、增殖就会受到抑制。本实验研究白花丹醌对HSC-LX2细胞周期及其相关蛋白表达的影响,以探讨其抑制HSC-LX2细胞增殖和抗肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

白花丹醌(批号 20071028),Sigma 公司,质量分数 99%,用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配成 0.1 mol/L 储备液,于-20℃保存;秋水仙碱,0.5 mg/片,西双版纳药业公司,批号 070205。重组瘦素,Protech 公司,批号 8110060R;DMEM 培养基,Gibco 公司;胎牛血清,Hyclone 公司;碘化丙锭(PI),上海生工生物技术有限公司;蛋白质定量试剂盒(BCA 法),Pierce 公司;cyclin D1、cyclin E1、p21 单克隆抗体,Santa Cruz 公司;二抗辣根酶标记兔抗羊 IgG、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参抗体,北京中山生物公司。

1.2 仪器

Model 311 型 CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司;TGL-16G-A 高速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;Epics-XL11 型流式细胞仪,美国 Beckman-coulter 公司。

1.3 细胞

HSC-LX2 由湖南湘雅医学院医学实验中心提供。

2 方法

2.1 细胞培养

HSC-LX2 细胞置于含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中,37℃、5% CO₂ 条件下培养,隔天换液,当细胞长成单层致密状时,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,每 3~4 d 传代 1 次,按 1:2 传代,每次实验均取指数生长期的细胞。

2.2 ELISA 法检测细胞培养上清液中瘦素自分泌水平

传代的 HSC-LX2 细胞经胰蛋白酶消化后,用完全培养液将细胞浓度调至 $5 \times 10^4/\text{mL}$,细胞悬液接种于 96 孔培养板中,每孔 180 μL ,设 6 个复孔,置 CO₂ 孵箱中于 37℃、5% CO₂ 条件下培养,分别于 6、12、24、48 h 收集细胞上清液,用 ELISA 法测定细胞培养上清液中瘦素水平。

2.3 分组与给药

实验设对照组、瘦素组、白花丹醌低和高浓度组、秋水仙碱阳性对照组。对照组细胞加入含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液;瘦素组细胞加入含 10%胎牛血清、瘦素 1.0 mg/L 的高糖 DMEM 培养液,使瘦素终质量浓度为 100 $\mu\text{g/L}$,培养 24 h;白花丹醌低和高浓度组细胞用瘦素 1.0 mg/L 刺激 24 h 后,加入白花丹醌,使其终浓度分别为 2、8 $\mu\text{mol/L}$,培养 24 h;秋水仙碱组细胞用瘦素 1.0 mg/L 刺激 24 h 后,加入秋水仙碱(终质量浓度为 6.25 mg/L)培养 24 h;每组设 4 个复孔。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期

收集各组细胞,PBS 冲洗 2 次,用 70%乙醇 4℃固定过夜,PBS 洗涤,离心去上清,加入适量含 100 mg/L RNase 和 50 mg/L PI 的染液,调整细胞浓度至约 $1 \times 10^5/\text{mL}$,4℃避光染色 30 min,流式细胞仪检测,每份标本测定 10 000 个细胞,测定速率为每秒 50~60 个细胞。氩离子激光器激发波长为 488 nm,阻断滤片为 633 nm 长波通滤片,MultiCycle AV 软件进行细胞周期分析,计算各期细胞百分率。

2.5 Western blotting 检测细胞周期相关蛋白表达

各组细胞用 0.25% 胰酶消化, 离心 3 min, 弃上清, PBS 洗细胞 3 次, 做好标记, 并迅速移至 1 mL 细胞缓冲液中匀浆, 枪头反复吹打样品后转移至 1.5 mL 离心管离心, BCA 法测定上清液中总蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳: 将凝胶取出, 切去积层胶部分, 并作记号, 放入盛有转移缓冲液的平皿中, 用转移缓冲液浸泡 6 张滤纸 (3 张为上层, 3 张为下层) 凝胶, 甲醇浸泡, 并用转移缓冲液浸泡的硝酸纤维素薄膜做出三明治模型, 膜面为正极, 胶面为负极, 电流为 $1.0 \sim 2.0 \text{ mA/cm}^2$, 1.5 h, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液 4°C 封闭过夜, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液稀释抗体, cyclin D1、cyclin E1、p21 按 1:1 000 稀释, GAPDH 按 1:2 000 稀释。将膜和用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液稀释的二抗辣根酶标记兔抗羊 IgG (1:1 500) 一起室温孵育 2 h。将膜置于 supersignal west 反应液中室温孵育 5 min, 去除过量溶液, 将膜夹在两塑料薄膜之间, 压 X 光片, 暗室中曝光数分钟, X 光胶片显影、定影、曝光。Quantity One 4.62 软件分析。

2.6 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据比较采用方差分析, 两组间计量资料比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 细胞培养上清液中瘦素自分泌水平变化

结果显示, HSC-LX2 细胞自分泌瘦素的量先随培养时间的延长而递减, 24 h 达低谷值, 48 h 又升至 6 h 水平, 每个时间点分泌瘦素的量之间相比无显著差异 ($P > 0.05$), 说明 HSC-LX2 细胞自分泌瘦素水平的变化规律仍不明确。结果见图 1。

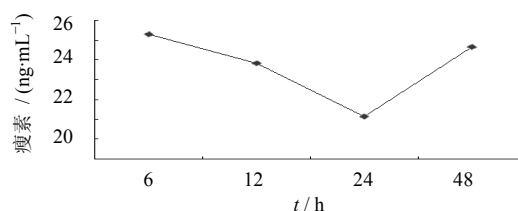


图1 HSC-LX2 培养上清液中瘦素自分泌水平的变化 ($n=6$)

Fig. 1 Changes of antocrine leptin level in supernatant of HSC-LX2 ($n=6$)

3.2 对 HSC-LX2 细胞周期的影响

流式细胞术分析显示, 与对照组相比, 瘦素组显著增强 HSC-LX2 细胞增殖能力, 增加 S 期和 G_2/M 期细胞的比例 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与瘦素组相比, 白花丹醌 2、 $8 \mu\text{mol/L}$ 作用 HSC-LX2 细胞 24 h 后, G_0/G_1 期细胞比例均明显增加 ($P < 0.01$), 而 S 期和 G_2/M 期细胞比例明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并呈浓度相关性。结果见图 2 和表 1。

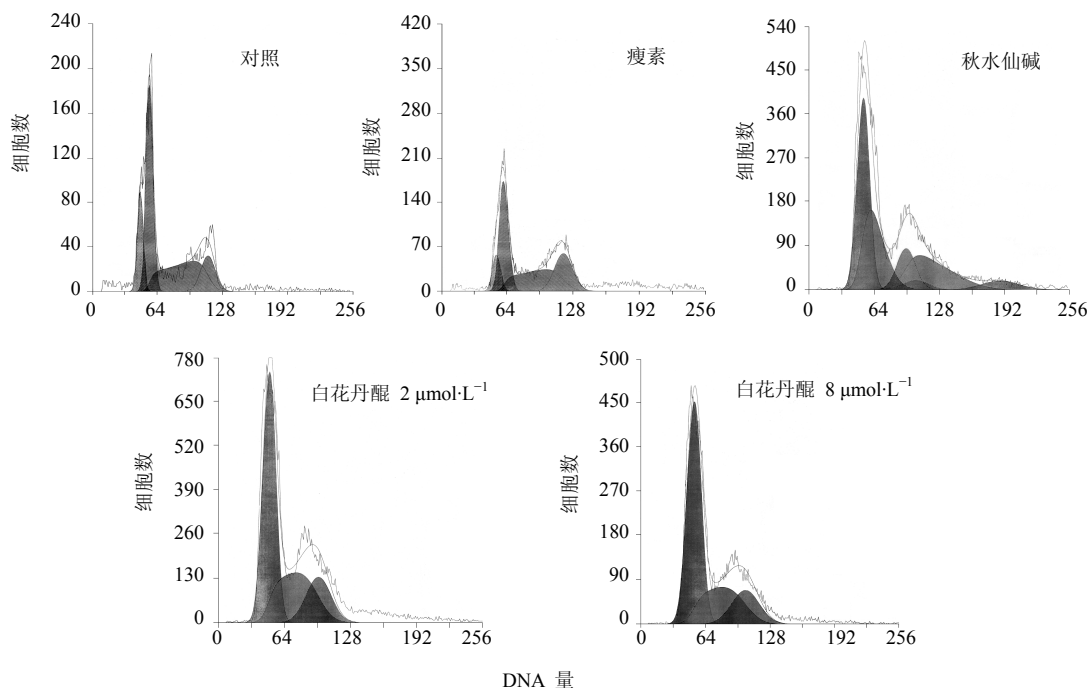


图2 白花丹醌对 HSC-LX2 细胞周期的影响

Fig. 2 Effect of plumbagin on cell cycle of HSC-LX2

表 1 白花丹醌对 HSC-LX2 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 1 Effect of plumbagin on cell cycle distribution of HSC-LX2 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组 别	周期分布		
	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
对照	53.2 ± 2.8	30.1 ± 1.7	16.7 ± 2.1
瘦素 (100 μg·L ⁻¹)	25.7 ± 1.9 ^{▲▲}	35.4 ± 3.2 [▲]	38.9 ± 1.8 ^{▲▲}
瘦素 (100 μg·L ⁻¹) + 白花丹醌 (2 μmol·L ⁻¹)	51.0 ± 3.1 ^{**}	31.1 ± 2.5	17.9 ± 1.1 ^{**}
瘦素 (100 μg·L ⁻¹) + 白花丹醌 (8 μmol·L ⁻¹)	56.2 ± 2.6 ^{**}	27.1 ± 2.2 [*]	16.7 ± 1.5 ^{**}
瘦素 (100 μg·L ⁻¹) + 秋水仙碱 (6.25 mg·L ⁻¹)	55.1 ± 2.2 ^{**}	29.6 ± 1.3 [*]	15.3 ± 1.4 ^{**}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$; 与瘦素组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同
[▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs leptin group, same as below

3.3 对 HSC-LX2 细胞周期相关蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示, 经瘦素刺激后显著增加了 HSC-LX2 细胞周期相关蛋白 cyclin D1、cyclin E1 的量, 降低了 p21 蛋白的表达; 而白花丹醌 2、8 μmol/L 和秋水仙碱给药后, 明显降低 cyclin D1、cyclin E1 蛋白水平, 增加 p21 蛋白表达, 与瘦素组比较差异显著 ($P < 0.01$)。结果见图 3 和表 2。

4 讨论

HSC 在肝纤维化乃至肝硬化发生、发展中的作用非常重要, 激活的 HSC 是肝纤维化时细胞外基质的主要来源, 是肝纤维化的中心环节^[6-7]。HSC 的

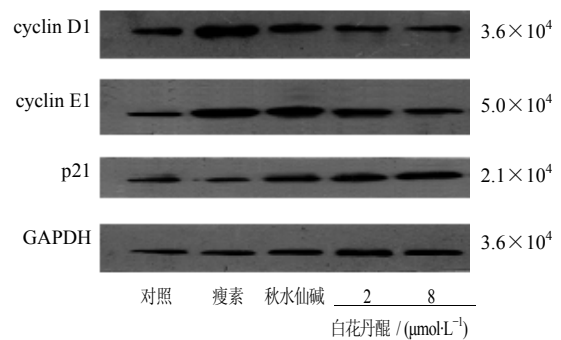


图 3 白花丹醌对 HSC-LX2 细胞周期相关蛋白表达的影响
Fig. 3 Effect of plumbagin on cell cycle-related protein expression of HSC-LX2

表 2 白花丹醌对 HSC-LX2 细胞周期相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 2 Effect of plumbagin on cell cycle-related protein expression of HSC-LX2 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组 别	cyclin D1/GAPDH	cyclin E1/GAPDH	p21/GAPDH
对照	1.141 ± 0.058	1.163 ± 0.028	1.292 ± 0.035
瘦素 (100 μg·L ⁻¹)	2.327 ± 0.127 ^{▲▲}	1.952 ± 0.102 ^{▲▲}	0.788 ± 0.012 [▲]
瘦素 (100 μg·L ⁻¹) + 白花丹醌 (2 μmol·L ⁻¹)	1.382 ± 0.049 [*]	1.828 ± 0.041	1.210 ± 0.047 [*]
瘦素 (100 μg·L ⁻¹) + 白花丹醌 (8 μmol·L ⁻¹)	0.853 ± 0.027 ^{**}	1.185 ± 0.036 ^{**}	1.224 ± 0.032 [*]
瘦素 (100 μg·L ⁻¹) + 秋水仙碱 (6.25 mg·L ⁻¹)	0.822 ± 0.036 ^{**}	1.083 ± 0.051 ^{**}	1.434 ± 0.051 ^{**}

数目是由肝纤维化不同时期 HSCs 的增殖与凋亡共同控制的^[8]。HSCs 凋亡是导致其数量减少的重要方法, 而许多药物可通过作用于细胞周期的某一环节, 阻滞细胞周期而诱导细胞凋亡^[9]。

白花丹醌具有抑制多种肿瘤细胞系增殖及诱导凋亡作用^[10-11]。本课题组前期体外实验亦证实其可明显抑制 HSC-T6 增殖, 促进其凋亡。本实验发现, HSC-LX2 自分泌瘦素的量随着培养时间的延长而递减, 24 h 达到最低, 48 h 又上升至 6 h 水平, 各时间点分泌瘦素的量相比无显著差异, 表明 HSC-LX2 自分泌瘦素量的变化规律仍不明确。外源性瘦

素显著增强 HSC-LX2 细胞的增殖能力及增加 S 期和 G₂/M 期细胞的比例; 白花丹醌作用 HSC-LX2 细胞 24 h 后, G₀/G₁ 期细胞比例均明显增多, 而 S 期和 G₂/M 期细胞比例明显降低, 且与其浓度呈相关性。由此推测白花丹醌抑制瘦素诱导的 HSC-LX2 细胞增殖, 可能是通过影响细胞周期实现的, 具体机制可能为: 阻断 HSC-LX2 细胞由 G₀/G₁ 期向 S 期、G₂/M 期转变, 进而抑制细胞的 DNA 合成和细胞分裂, 使细胞周期进程减缓, 阻止其增殖。

细胞周期的程序控制主要通过各种周期蛋白 (cyclins)、周期蛋白依赖性蛋白激酶 (CDKs) 有序

的磷酸化和去磷酸化及周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制因子实现的。参与 G_1 期调控的蛋白包括 cyclin D1/CDK4 激酶抑制因子 p21 和 p27, cyclin D1、cyclin E1 特异性地表达于细胞周期中最早合成的周期蛋白, 因此提高 cyclin D1、cyclin E1 的表达与促进细胞增殖相关^[12]。p21 主要抑制 cyclin D/CDK4 和 cyclin E/CDK2 等作用于 G_1 期的激酶复合物的活性, 阻滞细胞周期于 G_1 期^[12]。Jaiswal 等^[13]对小鼠胚胎纤维母细胞进行研究时发现, 白花丹醌通过诱导 p21 的产生, 使细胞周期阻滞于 S- G_2 /M 期。Western blotting 检测结果显示, 瘦素诱导 cyclin D1、cyclin E1 高表达, 降低 p21 的表达水平; 白花丹醌作用 HSC-LX2 细胞 24 h, 促进细胞增殖、分裂的 cyclin D1、cyclin E1 表达显著降低, 同时抑制细胞增殖、分裂的 p21 表达明显增加。综上所述, 白花丹醌通过阻止 HSC-LX2 细胞由 G_0 / G_1 期进入 S 期而抑制瘦素所致细胞增殖, 其作用机制可能与其降低 cyclin D1、cyclin E1 蛋白表达, 提高 p21 蛋白表达有关。

细胞周期调控的机制相当复杂, 白花丹醌抑制 HSC-LX2 细胞增殖和诱导其凋亡的确切机制尚未完全明了。深入研究白花丹醌对 HSC-LX2 细胞周期的影响, 有助于进一步了解白花丹醌调控 HSCs 增殖及凋亡的分子机制, 为抗肝纤维化治疗提供参考。

参考文献

- [1] Bruck R, Shirin H, Aeed H, *et al.* Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers [J]. *Hepatology*, 2001, 35(4): 457-464.
- [2] Krishnaswamy M, Purushothaman K K. Plumbagin: A study of its anticancer, antibacterial & antifungal properties [J]. *Indian J Exp Biol*, 1980, 18(8): 876-877.
- [3] 韦燕飞, 刘雪梅, 唐爱存, 等. 白花丹醌对瘦素刺激人肝星状细胞转化生长因子- $\beta 1$ 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6): 421-424.
- [4] 刘雪梅, 韦燕飞, 彭 岳, 等. 白花丹醌对瘦素诱导人肝星状细胞增殖与 α -SMA 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(9): 1154-1157.
- [5] 韦燕飞, 钟振国, 黄仁彬, 等. 白花丹醌对人肝星状细胞凋亡及相关蛋白表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(4): 349-354.
- [6] Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, *et al.* Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers [J]. *Hepatology*, 2002, 36(2): 200-209.
- [7] Friedman S L. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy [J]. *J Gastroenterol*, 1997, 32(3): 424-430.
- [8] Iredale J P, Benyon R C, Pickering J, *et al.* Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(3): 538-549.
- [9] 梁 薇. 细胞凋亡的中药调节机制 [J]. 四川中医, 2005, 23(11): 24-26.
- [10] 赵艳丽, 陆道培. 白花丹醌对人急性早幼粒细胞白血病细胞的体外效应 [J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(2): 208-211.
- [11] 朱 芳, 伍 钢, 何远桥, 等. 白花丹醌对肝癌细胞 HepG2 增殖及血管内皮生长因子表达的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 775-778.
- [12] Dash B C, El-Deiry W S. Phosphorylation of p²¹ in G_2 /M promotes cyclin B-Cdc2 kinase activity [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(8): 3364-3387.
- [13] Jaiswal A S, Bloom L B, Narayan S. Long-patch base excision repair of apurinic/apyrimidinic site DNA is decreased in mouse embryonic fibroblast cell lines treated with plumbagin: involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p²¹ Waf-1/Cip-1 [J]. *Oncogene*, 2002, 21(38): 5912-5922.