

氧化苦参碱通过促进胰腺星状细胞株中 Gli2 表达发挥抗胰腺纤维化作用

李嫚华, 陈 凯, 张 青, 向晓辉, 许 威*, 夏时海*

武警后勤学院附属医院 消化二科/肝胆胰脾中心, 天津 300162

摘要: 目的 研究氧化苦参碱(OM)对接受 TGF- β 1 刺激的大鼠胰腺星状细胞(LTC-14)细胞和胰腺导管癌细胞(PANC-1)中 Gli2 表达的影响。方法 取 LTC-14 细胞和 PANC-1 细胞, 分别分为对照组、TGF- β 1 处理组、TGF- β 1+OM 处理组、OM 对照组, 作用 12 h 后提取蛋白, 通过 Western blotting 法检测相关蛋白表达。结果 与对照组相比, LTC-14 细胞接受 TGF- β 1 刺激后 Gli2 表达显著降低, 但是 α -SMA、FN 和 CoL-I 的蛋白表达显著上升; 与 TGF- β 1 处理组比较, OM 预处理后使接受 TGF- β 1 刺激的 LTC-14 细胞 Gli2 表达显著升高。与对照组相比, PANC-1 细胞接受 TGF- β 1 刺激后 Gli2 表达显著升高, α -SMA、FN 和 CoL-I 的蛋白表达也显著上升; 与 TGF- β 1 处理组比较, OM 预处理后使接受 TGF- β 1 刺激的 PANC-1 细胞 Gli2 表达显著下降。结论 OM 可能通过促进 LTC-14 细胞中 Gli2 表达而发挥抗胰腺纤维化作用。

关键词: 氧化苦参碱; 胰腺纤维化; LTC-14 细胞; PANC-1 细胞; Gli2 转录因子; TGF- β 1

中图分类号: R365 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)13-3069-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.017

Anti-pancreatic fibrosis of oxymatrine by promoting expression of transcription factors Gli2 in LTC-14 and PANC-1 pancreatic stellate cells

LI Man-hua, CHEN Kai, ZHANG Qing, XIANG Xiao-hui, XU Wei, XIA Shi-hai

Department of Hepatopancreatobiliary and Splenic Medicine, Affiliated Hospital, Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Abstract: Objective To investigate the effect of oxymatrine (OM) on the expression of Gli2 in LTC-14 cells and PANC-1 cells induced by TGF- β 1. **Methods** LTC-14 cells and PANC-1 cells were divided into four groups: control group, TGF- β 1 group, TGF- β 1 + OM group, and OM group. The protein was extracted after 12 h, and the expressions of related proteins were detected by Western blot. **Results** Compared with control group, the expression of Gli2 in LTC-14 cells was significantly decreased induced by TGF- β 1, while the expressions of α -SMA, FN, and CoL-I were significantly increased. The expressions of Gli2, FN, CoL-I, and α -SMA were increased significantly induced by TGF- β 1 when compared with those of control group in PANC-1 cells, and the expression of Gli2 was inhibited by OM pretreatment in TGF- β 1 + OM group compared with TGF- β 1 group. OM pretreatment can increase the expression of Gli2 before stimulating with TGF- β 1 in TGF- β 1 + OM group in comparison with TGF- β 1 group. **Conclusion** OM plays an protected role in pancreatic fibrosis through promoting the expression of Gli2 in LTC-14 cells.

Key words: oxymatrine; pancreatic fibrosis; LTC-14 cells; PANC-1 cells; Gli2 transcription factors; TGF- β 1

胰腺纤维化是包括慢性胰腺炎在内诸多胰腺疾病的后期病理生理过程。有效地控制胰腺纤维化对治疗慢性胰腺炎等胰腺疾病具有重要意义, 但其分子机制尚不清楚。转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 是目前已知的最强效的致纤维化细胞因子。Gli 锌指蛋白家族广泛参与胚胎发育、肿瘤发生、器官纤维

化等生物过程, 该家族由 3 种蛋白组成, 分别为 Gli1、Gli2 和 Gli3, 研究表明 Gli1 和 Gli2 广泛参与肾脏、肺脏、肝脏等多个器官的纤维化^[1-3], 本课题组前期验证了 Gli1 促进胰腺纤维化的发生^[4], 因此推测 Gli2 在胰腺纤维化过程中可能同样起到重要作用。本课题组前期实验证实氧化苦参碱(oxymatrine,

收稿日期: 2018-01-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81500489); 天津市自然科学基金联合资助青年项目(15JCQNJC45600); 武警后勤学院附属医院种子基金重点项目(FYZ201508)

作者简介: 李嫚华(1990—), 女, 河北保定人, 硕士。Tel: 15522994157 E-mail: lmh910924@163.com

*通信作者 夏时海 E-mail: xshhcx@sina.com

许 威 E-mail: xuwei83419@sina.com

OM)对胰腺纤维化过程存在干预作用^[5-6]。本实验以永生化的大鼠胰腺星状细胞株(LTC-14)和人胰腺导管癌细胞株(PANC-1)为研究对象,探索在胰腺纤维化过程中OM对TGF- β 1诱导的LTC-14和PANC-1细胞中Gli2表达的影响,为阐明OM抗胰腺纤维化的作用机制提供参考。

1 材料

LTC-14细胞株由德国Rostock大学医院的Robert Jaster教授惠赠;PANC-1购自中国科学院上海生科院细胞资源中心;DMEM、IMDM培养基购自HyClone公司;胎牛血清购自Gibco公司;青链霉素混合液购自Solarbio公司;TGF- β 1购自Peprotech公司;OM购自Sigma公司;胰酶消化液、二抗、BCA蛋白定量试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;Gli2、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、 β -actin单克隆抗体购自Proteintech公司;纤维连接蛋白(FN)、I型胶原蛋白(CoL-I)单克隆抗体、ECL显色试剂盒购自沈阳万类生物科技有限公司。

2 方法

2.1 OM对TGF- β 1诱导的体外细胞模型的影响

LTC-14细胞、PANC-1细胞分别由含10%胎牛血清的IMDM、DMEM高糖培养基、37℃、相对湿度为95%的5%CO₂的孵育箱常规培养。铺种到6孔板前,使用0.25%胰酶将细胞消化,十字摇匀,待细胞生长面积达70%~80%,细胞饥饿4h。将细胞分为对照组(细胞加培养基正常培养)、TGF- β 1处理组(培养中加入10 ng/mL TGF- β 1)、TGF- β 1+OM处理组(培养中加入10

μ g/mL OM, 0.5 h后加入10 ng/mL TGF- β 1)、OM对照组(培养基中加入10 μ g/mL OM),各组药物作用12 h。

2.2 Western blotting法测定Gli2、FN、CoL-I和 α -SMA蛋白表达

取6孔板LTC-14细胞和PANC-1细胞加适量预冷的蛋白裂解液RIPA,4℃离心,12 000 r/min离心15 min,上清转入新管,BCA法测定蛋白的量,用三蒸水调至等浓度,加6 $\times$ SDS上样缓冲液,沸水浴5 min备用。以 β -actin为内参,8%的SDS-PAGE电泳分离后,电转至PVDF膜上。PVDF膜经封闭液封闭3 h后,分别加入Gli2、FN、CoL-I和 α -SMA小鼠抗人单克隆抗体作为一抗,4℃过夜。用辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠作为二抗,室温结合3 h。TBST缓冲液洗涤后,加入化学发光剂,ECL发光法检测蛋白表达,采用Image J图像分析系统进行灰度分析。

2.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用GraphPad Prism 6统计学软件分析处理数据结果,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 TGF- β 1对LTC-14细胞中Gli2、FN、CoL-I和 α -SMA蛋白表达的影响

与对照组相比,TGF- β 1处理组LTC-14细胞中FN、CoL-I和 α -SMA蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),但Gli2的蛋白表达量显著下降($P < 0.05$)。结果提示,外源性TGF- β 1诱导LTC-14细胞后,纤维化发生,Gli2表达明显下降。结果见图1。

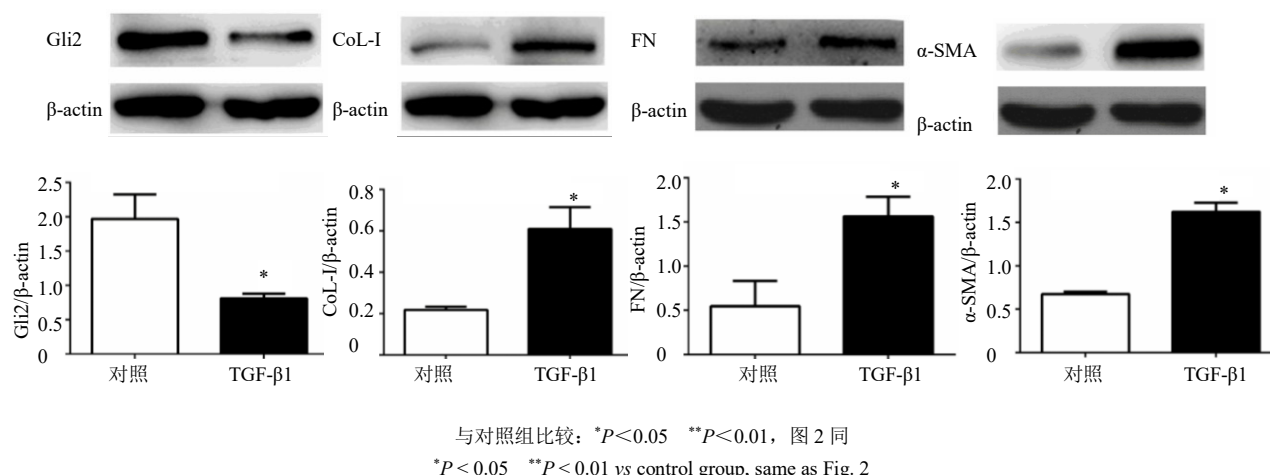


图 1 TGF- β 1对LTC-14细胞中Gli2、FN、CoL-I和 α -SMA蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of TGF- β 1 on protein expression of Gli2, FN, CoL-I, and α -SMA in LTC-14 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 TGF- β 1 对 PANC-1 细胞中 Gli2、FN、CoL-I 和 α -SMA 蛋白表达的影响

与对照组相比, TGF- β 1 处理组 PANC-1 细胞中 FN、CoL-I 和 α -SMA 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), Gli2 的蛋白表达量也显著升高 ($P < 0.05$)。以上结果提示, 外源性 TGF- β 1 诱导 PANC-1 细胞后, 纤维化发生, Gli2 表达明显上升。结果见图 2。

3.3 OM 对 TGF- β 1 诱导的 LTC-14 细胞中 Gli2 蛋白表达的影响

与对照组相比, TGF- β 1 诱导后 LTC-14 细胞中 Gli2 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$); 与 TGF- β 1

组相比, TGF- β 1+OM 处理组 LTC-14 细胞中 Gli2 蛋白表达量显著上升 ($P < 0.01$)。OM 对接受 TGF- β 1 刺激的 LTC-14 细胞中 Gli2 蛋白表达起到促进作用。结果见图 3。

3.4 OM 对 TGF- β 1 诱导的 PANC-1 细胞中 Gli2 蛋白表达的影响

与对照组相比, TGF- β 1 诱导 PANC-1 细胞中 Gli2 蛋白表达水平显著上升 ($P < 0.01$); 与 TGF- β 1 组相比, TGF- β 1+OM 处理组 PANC-1 细胞中 Gli2 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$)。OM 对接受 TGF- β 1 刺激的 LTC-14 细胞中 Gli2 蛋白表达起到抑制作用。结果见图 3。

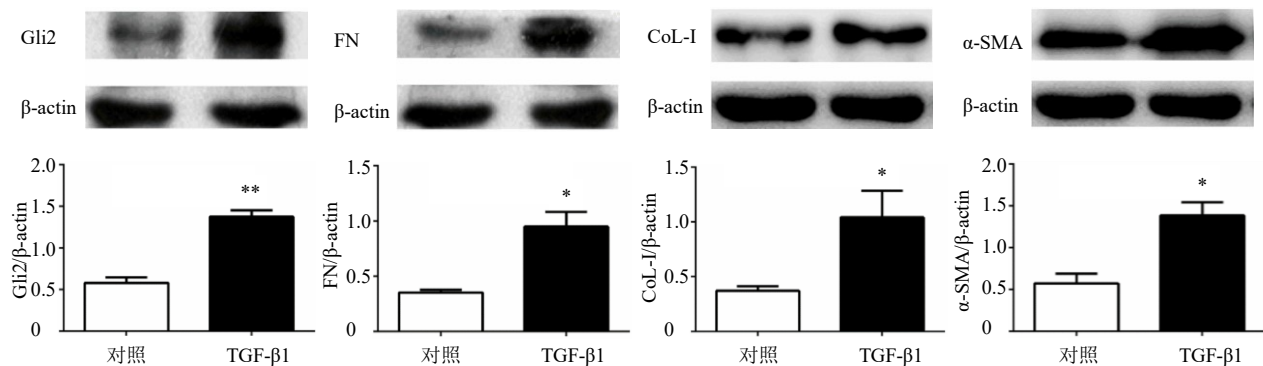
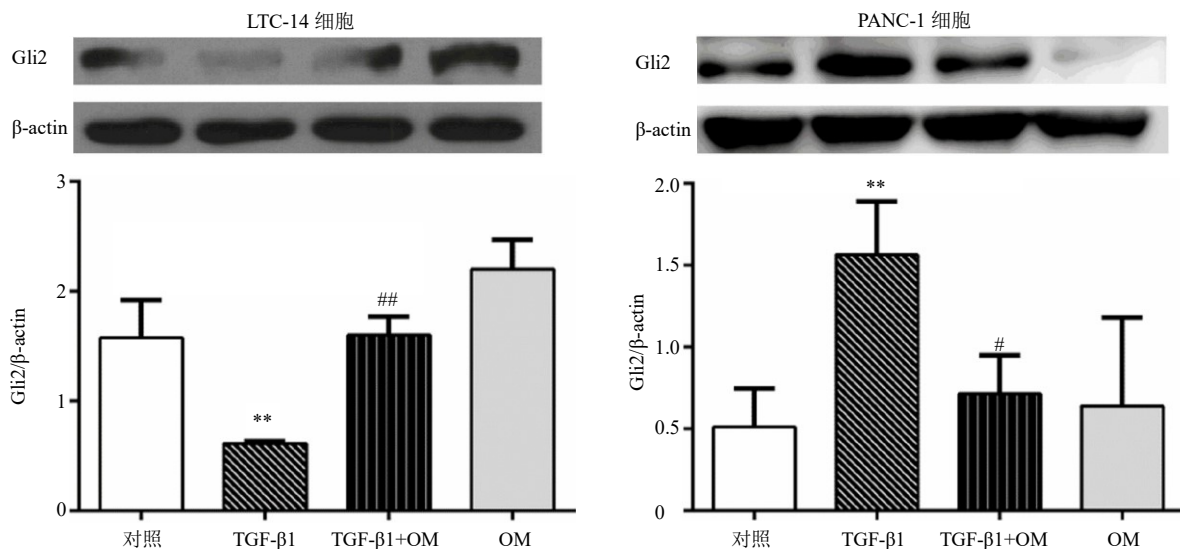


图 2 TGF- β 1 对 PANC-1 细胞中 Gli2、FN、CoL-I 和 α -SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of TGF- β 1 on protein expression of Gli2, FN, CoL-I, and α -SMA in PANC-1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 TGF- β 1 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs TGF- β 1 group

图 3 OM 对 TGF- β 1 刺激的 LTC-14 和 PANC-1 细胞中 Gli2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of OM on protein expression of Gli2 in LTC-14 and PANC-1 cells induced by TGF- β 1 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

胰腺纤维化是由多种原因引起的多种细胞因子和炎症因子参与的慢性胰腺炎的共同病理进展,其具有进行性和不可逆性的特点。胰腺纤维化出现胰腺内、外分泌功能障碍,进而引起一系列临床症状和疾病的发生。胰腺纤维化具有成纤维细胞增生和细胞外基质(ECM)沉积的特征。

胰腺形状细胞(PSCs)在胰腺纤维化中起到关键作用,其胰腺正常实质细胞中约占4%~7%,分布于胰腺小叶和相邻的胰腺腺泡周围,主要功能是表达细胞骨架蛋白以维持胰腺组织的正常结构^[7-8]。PSCs分为静止期和激活期2种状态。静止期的PSCs胞质内含脂滴, α -SMA染色阴性,不具备促纤维化作用。PSCs活化作为胰腺纤维化的关键步骤,在炎症反应等刺激因素的作用下,PSCs激活后发生一系列表现:细胞增生活跃,胞质内脂滴消失;细胞转化为成纤维细胞样形态,此时 α -SMA表达阳性;包括FN、CoL在内的ECM分泌增多^[9]。本实验中,使用外源性TGF- β 1诱导LTC-14细胞慢性胰腺炎模型, α -SMA、FN、CoL-I表达水平升高,说明LTC-14细胞激活并且发生纤维化。Gli2作为Hedgehog/Gli信号通路中转录因子参与到胚胎发育、毛发周期和多种肿瘤发生的过程中。Liang等^[10]通过外源性TGF- β 1诱导小鼠纤维化模型后将系统性硬化症小鼠皮肤与健康小鼠皮肤对比发现,Gli2表达显著升高;研究者进一步将培养的人皮肤成纤维细胞给予TGF- β 1和(或)Gli2特异性抑制剂GANT-61处理,检测发现TGF- β 1+GANT-61组与TGF- β 1组比较 α -SMA、CoL-I表达显著下降。但是,本实验中,使用外源性TGF- β 1诱导LTC-14细胞后,Gli2表达显著下降,提示Gli2可能通过LTC-14细胞对胰腺纤维化起到保护作用。PANC-1细胞具有胰腺纤维化标志物:FN和CoL-I。在本实验中,使用外源性TGF- β 1诱导LTC-14细胞发生纤维化后,Gli2表达下降;使用外源性TGF- β 1诱导PANC-1细胞发生纤维化后,Gli2表达显著升高。PSCs是胰腺纤维化的中心环节,由其形成复杂的信号通路介导纤维化的发生,其激活后由细胞旁分泌和自分泌产生瀑布样细胞连锁反应,进而促进纤维化的发生^[11]。本实验中,TGF- β 1诱导LTC-14细胞与PANC-1细胞对Gli2表达影响完全相反,由于LTC-14细胞在胰腺纤维化中发挥关键作用^[8,11-13],因此Gli2可能通过LTC-14细胞影响到胰腺整体进而在胰腺纤维化中

起到重要保护作用。

近年大量的实验和临床研究结果表明OM具有明显的抗器官纤维化作用,如抗肝纤维化、抗皮肤纤维化和抗肾间质纤维化等,其中以抗肝纤维化研究得较为深入^[14]。本课题组前期也发现OM在胰腺纤维化中发挥重要作用^[5-6,15]。OM有明确的抗肝纤维化作用,且在治疗慢性肝炎和肝纤维化等方面得到了广泛应用。动物实验显示OM能预防半乳糖及二甲基亚硝胺诱发的大鼠肝纤维化,减轻小鼠肝脏炎症及抗小鼠免疫性肝纤维化^[14,16];临床应用也发现OM有抗肝纤维化的作用,明显降低肝纤维化指标透明质酸(HA)、层黏连蛋白等^[17-18]。OM抗肝纤维的作用机制可能有以下几方面:(1)抑制或下调TGF- β 1的表达;(2)抑制肝星状细胞、贮脂细胞、成纤维细胞的增殖和ECM的合成;(3)抑制乙肝病毒复制、促进肝细胞生长、阻断肝细胞凋亡等;肝脏纤维化是多种慢性肝病发展为肝硬化的必然环节。肝星状细胞在肝脏纤维化过程中起到重要作用。胰腺纤维化与肝脏纤维化有诸多相似之处,同样的,PSCs与肝脏星状细胞也有诸多相似之处。本实验中,OM抑制TGF- β 1刺激的PANC-1细胞Gli2表达;但是OM能够逆转TGF- β 1对LTC-14细胞中Gli2的抑制作用。

综上,OM可能通过Gli2由PSCs影响到胰腺整体进而在胰腺纤维化中起到重要作用。

参考文献

- [1] Kramann R. Hedgehog Gli signalling in kidney fibrosis [J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2016, 31(12): 1989-1995.
- [2] Hyun J, Wang S, Kim J, et al. MicroRNA-378 limits activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis by suppressing Gli3 expression [J]. *Nat Commun*, 2016, doi: 10.1038/ncomms10993.
- [3] Kramann R, Fleig S V, Schneider R K, et al. Pharmacological GLI2 inhibition prevents myofibroblast cell-cycle progression and reduces kidney fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(8): 2935-2951.
- [4] 李嫚华, 许威, 张青, 等. 氧化苦参碱对TGF- β 1诱导的PANC-1细胞Smad3/Gli1通路相关因子表达的影响[J]. *中草药*, 2017, 48(24): 5200-5205.
- [5] 王昱良, 郑永青, 夏时海, 等. 氧化苦参碱对慢性胰腺炎胰腺组织中I型胶原及 α -SMA的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(13): 1331-1336.
- [6] 陈凯, 荣亚梅, 曹卫丽, 等. 氧化苦参碱对TGF- β 1刺激的胰腺星状细胞Smad通路相关因子表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(12): 1883-1889.

- [7] Apte M, Pirola R, Wilson J. The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(10): 2711-2722.
- [8] Apte M, Pirola R C, Wilson J S. Pancreatic stellate cell: physiologic role, role in fibrosis and cancer [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015, 31(5): 416-423.
- [9] Pang T C Y, Wilson J S, Apte M V. Pancreatic stellate cells: What's new [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2017, 33(5): 366-373.
- [10] Liang R F, Šumová B, Cordazzo C, *et al.* The transcription factor GLI2 as a downstream mediator of transforming growth factor- β -induced fibroblast activation in SSc [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(4): 756-764.
- [11] Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, *et al.* Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009, 7(11 Suppl): S48-S54.
- [12] Bachem M G, Schneider E, Gross H, *et al.* Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans [J]. *Gastroenterology*, 1998, 115(2): 421-432.
- [13] Apte M, Pirola R, Wilson J. New insights into alcoholic pancreatitis and pancreatic cancer [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(Suppl 3): S51- S56.
- [14] 梁建新, 屈杏芬, 曾文铤, 等. 氧化苦参碱在治疗慢性乙型肝炎中抗肝纤维化的作用机制 [J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(8): 1871-1873.
- [15] 苏丽婷, 夏时海, 郑永青. 转化生长因子 β 1 II 型受体在大鼠慢性胰腺炎中的表达及氧化苦参碱对其的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(2): 121-125.
- [16] 冀润利, 邸 瑶, 夏时海, 等. 氧化苦参碱对 SW1990 细胞 MMP-2 表达的抑制作用及对细胞侵袭力的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(1): 19-24.
- [17] Wu X L, Zeng W Z, Jiang M D, *et al.* Effect of oxymatrine on the TGF β -Smad signaling pathway in rats with CCl₄-induced hepatic fibrosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(13): 2100-2105.
- [18] Ding C B, Zhao Y, Zhang J P, *et al.* A zebrafish model for subgenomic hepatitis C virus replication [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(3): 791-797.