

基于 Wnt 信号通路研究表没食子酸儿茶素没食子酸酯对肝星状细胞活化的作用及机制

石明亮, 王晓磊, 李江琳, 段文飞

河南大学第一附属医院 普外一科, 河南 开封 475000

摘要: 目的 基于 Wnt 信号通路探究表没食子酸儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 对人肝星状细胞 LX-2 活化的影响及其作用机制。方法 体外培养 LX-2 细胞, CCK-8 法筛选 EGCG 的实验浓度; 取对数生长期的 LX-2 细胞, 设置对照组 (正常培养)、模型组 [10 ng/mL 转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)]、EGCG 低剂量组 (12.5 μ mol/L EGCG + 10 ng/mL TGF- β 1)、EGCG 高剂量组 (25.0 μ mol/L EGCG + 10 ng/mL TGF- β 1)、EGCG + siRNA-NC 组 [小窝蛋白-1 (Caveolin-1, *Cav-1*) -siRNA 阴性对照 + 25.0 μ mol/L EGCG + TGF- β 1] 和 EGCG + *Cav-1*-siRNA 组 (*Cav-1*-siRNA + 25.0 μ mol/L EGCG + TGF- β 1), CCK-8 法检测各组细胞存活率; 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期分布情况; 吖啶橙/溴乙锭 (AO/EB) 染色法观察细胞凋亡形态; qRT-PCR 法检测细胞 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白 (*Collagen I*) 和基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 (tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1, *TIMP-1*) mRNA 表达情况; Western blotting 检测细胞 *Cav-1* 和 Wnt 信号通路相关蛋白表达情况。结果 EGCG 降低 LX-2 细胞存活率, 呈剂量相关性。与对照组相比, 模型组 LX-2 细胞存活率、S 期和 G₂/M 期的细胞比例、细胞 α -SMA、*Collagen I*、*TIMP-1* mRNA 表达和 Wnt1、Wnt5a、 β -连环蛋白 (β -catenin)、细胞周期蛋白 Cyclin D1、原癌基因 c-Myc 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率、G₀/G₁ 期的细胞比例、凋亡细胞比例、*Cav-1* 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, EGCG 低、高剂量组 LX-2 细胞存活率、S 期和 G₂/M 期的细胞比例、细胞 α -SMA、*Collagen I*、*TIMP-1* mRNA 表达和 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin、Cyclin D1、c-Myc 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率、G₀/G₁ 期的细胞比例、凋亡细胞比例、*Cav-1* 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 且在 EGCG 干预的基础上, 沉默 *Cav-1* 的表达可显著上调 Wnt1、Wnt5a 蛋白表达, 减弱 EGCG 对 Wnt 信号通路的抑制作用。结论 EGCG 可能通过上调 *Cav-1* 表达, 抑制 Wnt 信号通路激活, 进而抑制 LX-2 细胞活化。

关键词: 表没食子酸儿茶素没食子酸酯; 肝星状细胞; 凋亡; Wnt 信号通路; 小窝蛋白-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)03-0758-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.015

Effect and mechanism of epigallocatechin gallate on activation of hepatic stellate cells based on Wnt signaling pathway

SHI Ming-liang, WANG Xiao-lei, LI Jiang-lin, DUAN Wen-fei

Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of epigallocatechin gallate (EGCG) on the activation of hepatic stellate cells LX-2 based on Wnt pathway. **Methods** LX-2 cells were cultured *in vitro*, and the experimental concentration of EGCG was screened by CCK-8 method. LX-2 cells in the logarithmic growth phase were divided into control group (normally cultured), model group [10 ng/mL transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)], low-dose EGCG group (12.5 μ mol/L EGCG + 10 ng/mL TGF- β 1), high-dose EGCG group (25.0 μ mol/L EGCG + 10 ng/mL TGF- β 1), EGCG + siRNA-NC group [Caveolin-1 (*Cav-1*)-siRNA negative control + 25.0 μ mol/L EGCG + TGF- β 1] and EGCG + *Cav-1*-siRNA group (*Cav-1*-siRNA + 25.0 μ mol/L EGCG + TGF- β 1), CCK-8 method was used to detect cell survival rate of each group; Flow cytometry was used to detect cell apoptosis and cell cycle distribution; Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining method was used to observe the morphology of cell apoptosis; qRT-PCR was used to detect α -smooth muscle actin (α -SMA), *Collagen I* and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (*TIMP-1*) mRNA expressions of cells;

收稿日期: 2021-10-27

基金项目: 河南省 2017 年科技发展计划项目 (172102310284)

作者简介: 石明亮 (1987—), 男, 硕士, 主治医师, 从事肝胆胰腺疾病的基础研究。E-mail: shiml87@163.com

Western blotting was used to detect the expressions of Cav-1 and Wnt signaling pathway related proteins of cells. **Results** EGCG reduced survival rate of LX-2 cells in a concentration-dependent manner. Compared with control group, LX-2 cells survival rate, ratios of S phase and G₂/M phase cells, mRNA expressions of α -SMA, Collagen I and TIMP-1, and protein expressions of Wnt1, Wnt5a, β -catenin, Cyclin D1, c-Myc were significantly increased in model group ($P < 0.05$), apoptosis rate, ratio of G₀/G₁ phase cells, ratio of apoptotic cells, and Cav-1 protein expression were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with model group, LX-2 cells survival rate, ratios of S phase and G₂/M phase cells, mRNA expression of α -SMA, Collagen I, TIMP-1, and protein expressions of Wnt1, Wnt5a, β -catenin, Cyclin D1, c-Myc in low-, high-dose EGCG groups were significantly decreased ($P < 0.05$), apoptosis rate, ratio of G₀/G₁ phase cells, ratio of apoptotic cells, and Cav-1 protein expression were significantly increased ($P < 0.05$); On the basis of EGCG intervention, silencing the expression of Cav-1 significantly up-regulated Wnt1 and Wnt5a protein expressions, and weakened the inhibitory effect of EGCG on Wnt signaling pathway. **Conclusion** EGCG may inhibit the activation of Wnt signaling pathway by up-regulating the expression of Cav-1, thereby inhibiting the activation of LX-2 cells.

Key words: epigallocatechin gallate; hepatic stellate cells; apoptosis; Wnt signaling pathway; Caveolin-1

肝纤维化 (liver fibrosis, LF) 是肝损伤的组织学标志,其特征是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积,可发展为肝硬化、肝癌和 (或) 肝功能衰竭^[1]。肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 是 LF 的主要来源^[2]。在生理条件下, HSC 保持静止;当肝细胞受损时,受损的细胞和免疫细胞会释放出炎症细胞因子和趋化因子,包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1), TGF- β 1 激活 HSC, 导致大量 ECM 的合成和分泌,启动纤维化发生^[3-4]。目前治疗方法主要集中在抑制 HSC 活化和 (或) 促进 ECM 降解。许多药物治疗效果有限,并且可能加剧肝损伤^[5]。因此,迫切需要延迟或预防 LF 进展的新策略。

LF 属于中医“胁痛”“积聚”范畴,病因病机复杂,多因外感毒邪、痰瘀阻络、湿热蕴结所致。中医药因其辨证论治和多渠道、多层次、多靶点的综合药理作用,在治疗 LF 方面具有独特的优势。目前,中医药抗 LF 的机制主要包括抑制 HSC 的激活、抑制 ECM 合成、抗氧化、抑制炎症等。儿茶素是一类植物多酚,存在于食品和药用植物中,在体内内外均具有抗氧化、抗炎和抗增殖的作用,表没食子酸儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 是儿茶素的主要成分,具有广泛的生物学特性,包括抗纤维化活性^[6]。研究发现,EGCG 可抑制大鼠 HSC 中 I 型胶原 (Collagen I) 的生成和胶原酶的活性^[7],还可通过诱导细胞凋亡,抑制人 HSC 株 LX-2 细胞的增殖和活化^[8],表明 EGCG 可能具有治疗 LF 的潜力,但其作用机制尚不明确。

Wnt 途径是细胞生长和增殖的重要调节剂,对正常的肝脏发育非常重要。研究表明,该途径与

HSC 的活化和 LF 密切相关^[9]。小窝蛋白-1 (Caveolin-1, Cav-1) 是质膜小窝的主要成分,负调控许多细胞信号事件,包括经典的 Wnt 信号^[10]。Cav-1 在纤维化肝组织和激活的 HSC 中呈低表达,且在活化的 HSC 中,沉默 Cav-1 可上调纤维化基因如平滑肌肌动蛋白 α 2 (smooth muscle actin α 2, ACT α 2) 和 Collagen I 表达,并伴有抗纤维化基因基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 (tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1, TIMP-1) 的增加,表明 Cav-1 在 HSC 活化和胶原蛋白的产生中起着至关重要的作用^[11]。EGCG 能刺激 Cav-1 位移,用 Cav-1 特异性 siRNA 转染细胞沉默 Cav-1,可显著降低细胞对 EGCG 的摄取^[12];在 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞损伤中,Cav-1 的激活参与 EGCG 介导的心脏保护;表明 Cav-1 在 EGCG 的摄取和运输以及机制中发挥作用^[13]。EGCG 能否通过影响 Cav-1 的表达介导 HSC 活化还未可知,因此本研究初步探究 EGCG 对 LX-2 细胞活化的影响及其作用机制,以期为 LF 的诊断和治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

LX-2 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

EGCG (质量分数为 95%, 批号 200-659-6) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; Lipofectamine 3000 转染试剂 (批号 L3000-015) 购自美国 Invitrogen 公司;重组人 TGF- β 1 蛋白 (批号 TG1-H4212) 购自北京百普赛斯生物科技股份有限公司;胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司,批号分别为 10099141C、1676916、25300-054; Cav-1-siRNA 及其阴性对照 (siRNA-NC)、qRT-PCR 引物

均由上海 GenePharma 合成; CCK-8 试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、RIPA 裂解液和 BCA 试剂盒购自碧云天生物科技公司, 批号分别为 20200908、20201027、20201003、20201019; TRIzol 试剂、PrimeScript™ RT 试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒购自日本 Takara 公司, 批号分别为 AI80436A、AJ60593、AJ91432A; Cav-1 小鼠源抗体 (批号 GR435324-11)、Wnt1 兔源抗体 (批号 GR312453-6)、Wnt5a 兔源抗体 (批号 GR326874-5)、 β -连环蛋白 (β -catenin) 兔源抗体 (批号 GR415239-13)、细胞周期蛋白 Cyclin D1 兔源抗体 (批号 GR345242-4)、原癌基因 c-Myc 兔源抗体 (批号 GR298716-12)、 β -actin 兔源抗体 (批号 GR25827)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 GR31635)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 GR32354) 购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

细胞培养箱、NanoDrop 2000 分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ABI Prism® 7300 型 qRT-PCR 仪 (美国 ABI 公司); BD FACSCanto II 流式细胞仪 (美国 BD 公司); IX73 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); iMark680 型多功能酶标仪、蛋白转膜装置 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

LX-2 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 每 2 天换液 1 次, 3~4 d 传代 1 次, 待细胞处于对数生长期进行实验。

2.2 CCK-8 法筛选 EGCG 的实验浓度

取对数生长期的 LX-2 细胞, 胰蛋白酶消化后以 1×10^3 /孔接种到 96 孔板中。待细胞贴壁后, 弃去原培养基, 分别加入终浓度为 0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μ mol/L 的含 EGCG 的培养基, 于培养箱中培养 24 h, 然后再换成含 TGF- β 1 (终质量浓度为 10 ng/mL) 的 DMEM 培养基, 继续培养 48 h, 最后每孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 于培养箱中继续孵育 2 h, 测定 450 nm 处各孔吸光度 (A) 值, 以培养基为空白孔调零, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 实验分组和处理

取对数生长期的 LX-2 细胞, 胰蛋白酶消化后制成单细胞混悬液, 以 2×10^5 /孔接种到 24 孔板中,

设置对照组 (正常培养的 LX-2 细胞)、模型组 (TGF- β 1 诱导 LX-2 细胞)、EGCG 低剂量组 (LX-2 细胞用浓度为 12.5 μ mol/L 的 EGCG 处理 12 h 后再进行 TGF- β 1 诱导)、EGCG 高剂量组 (LX-2 细胞用浓度为 25.0 μ mol/L 的 EGCG 处理 12 h 后再进行 TGF- β 1 诱导) 及 EGCG+siRNA-NC 组 (Cav-1-siRNA 阴性对照转染 LX-2 细胞 48 h, 然后用浓度为 25.0 μ mol/L 的 EGCG 处理 12 h 后再进行 TGF- β 1 诱导) 和 EGCG+Cav-1-siRNA 组 (Cav-1-siRNA 转染 LX-2 细胞 48 h, 浓度为 25.0 μ mol/L 的 EGCG 处理 LX-2 细胞 12 h 后再进行 TGF- β 1 诱导)。TGF- β 1 诱导后继续培养 48 h, 然后收集细胞。

2.4 CCK-8 法检测各组细胞存活率

取对数生长期的 LX-2 细胞, 胰蛋白酶消化后制备成单细胞悬液, 以 1×10^3 /孔接种到 96 孔板中, 将细胞按照“2.3”项下方法进行分组及处理, 培养 48 h 后, 根据“2.2”项下方法测定各孔 A 值, 计算细胞存活率。

2.5 流式细胞术检测各组细胞凋亡

LX-2 细胞以 2×10^5 /孔接种至 6 孔板中, 按照“2.3”项下方法进行分组及处理, 培养 48 h 后, 将各组细胞用胰蛋白酶消化, PBS 溶液洗涤后将其悬浮在 400 μ L $1 \times$ Annexin 结合溶液中。取 100 μ L 细胞悬浮液, 将 5 μ L Annexin V-FITC 染色溶液添加到悬浮液中, 孵育 15 min; 加入 5 μ L 碘化丙啶 (PI), 于 4 °C 避光孵育 5 min, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

2.6 吖啶橙/溴乙锭 (AO/EB) 染色法观察细胞凋亡形态

取对数生长期的 LX-2 细胞, 按照“2.3”项下方法进行分组及处理, 培养 48 h 后, 弃去上清液, 用 PBS 溶液洗涤细胞 2 次, 胰蛋白酶消化并重悬细胞, 取 25 μ L 悬浮液至载玻片上, 将 AO (100 μ g/mL) 和 EB (100 μ g/mL) 按 1:1 预混合, 并将所得溶液添加到载玻片上, 避光放置 5 min, 于荧光显微镜下观察凋亡细胞形态并拍照, 使用 Image J 软件处理照片并计数。正常细胞的细胞核呈强绿色荧光, 圆形细胞核均匀分布于细胞中心; 早期凋亡细胞的细胞核呈黄绿色荧光, 集中分布于细胞一侧, 呈新月形或圆珠状; 晚期凋亡细胞的细胞核呈橙色荧光, 集中聚集, 偏向定位; 坏死细胞的体积增加, 呈不均匀的橙红色荧光, 轮廓不明显, 正在溶解或接近崩解。

2.7 流式细胞术检测各组细胞周期分布

按“2.3”项下方法进行分组并处理细胞,通过离心收集 TGF- β 1 处理后培养 48 h 的各组细胞,于 4 °C 用冷乙醇固定过夜,然后离心并洗涤;再将细胞在 37 °C 下于 500 μ L 冷 PBS 溶液(含 20 μ L RNase A)中悬浮 30 min,用 400 目网筛滤过后,将细胞重悬于 400 μ L PI 中,并于 4 °C 避光孵育 30 min,采用流式细胞仪分析细胞周期分布情况。

2.8 qRT-PCR 检测细胞中 α -SMA、Collagen I 和 TIMP-1 mRNA 的表达

按“2.3”项下方法进行分组并处理细胞,按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	产物大小/bp
α -SMA	F: ATCAAGGAGAACTGTGTTATGTAG	182
	R: GATGAAGGATGGCTGGAACAGGGTC	
Collagen I	F: TCTAGACATGTTTCAGCTTGTGGAC	149
	R: TCTGTACGCAGGTGATTGGTG	
TIMP-1	F: CTTCTGCAATTCGACCTCGT	142
	R: ACGCTGGTATAAGGTGGTCTG	
β -actin	F: GCCAACACAGTGCTGCTCTGG	145
	R: CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG	

2.9 Western blotting 检测细胞中 Cav-1 和 Wnt 信号通路相关蛋白的表达

按“2.3”项下方法进行分组并处理细胞,使用 RIPA 裂解液提取蛋白,用 BCA 试剂盒测定上清液中的总蛋白质量浓度。取等量蛋白样品与 SDS 样品缓冲液混合,加热至 95 °C 10 min 变性,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,于 5% 脱脂牛奶中封闭,分别加入 Cav-1、Wnt1、Wnt5a、 β -catenin、Cyclin D1、c-Myc 和 β -actin 抗体 (1:1000),于 4 °C 孵育过夜;洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体 (1:2000),室温孵育 2 h,加入 ECL 发光试剂显色,以 β -actin

为内参蛋白,分析结果。

2.10 统计学分析

以上所有实验均重复 3 次。使用 SPSS 22.0 和 Image-Pro Plus 软件对实验数据进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),组间有差异进一步两两比较采用 SNK- q 检验。

3 结果

3.1 EGCG 对 LX-2 细胞存活率的影响

为确定 EGCG 对 LX-2 细胞的细胞毒性,使用不同剂量的 EGCG 处理后,发现低浓度 (12.5、25.0 μ mol/L) 的 EGCG 对 LX-2 细胞存活率未出现明显影响,而当 EGCG 浓度 ≥ 50.0 μ mol/L 时可显著降低 LX-2 细胞存活率 ($P < 0.05$),其半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 值为 127.61 μ mol/L (表 2)。故选择浓度为 12.5、25.0 μ mol/L 的 EGCG 用于后续实验。

表 2 EGCG 对 LX-2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of EGCG on survival rate of LX-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(μ mol·L ⁻¹)	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 0.00
EGCG	12.5	95.49 $\pm$ 10.17
	25.0	86.82 $\pm$ 9.05
	50.0	65.45 $\pm$ 6.63*
	100.0	51.71 $\pm$ 7.58*
	200.0	40.21 $\pm$ 6.11*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3.2 各组 LX-2 细胞存活率与凋亡率

如图 1 和表 3 所示,与对照组相比,模型组 LX-2 细胞存活率显著升高,凋亡率显著降低 ($P < 0.05$);与模型组相比,EGCG 低、高剂量组细胞存活率显著降低,凋亡率显著升高 ($P < 0.05$);与 EGCG 高剂量组相比,EGCG + Cav-1-siRNA 组细胞存活率显著升高,凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。

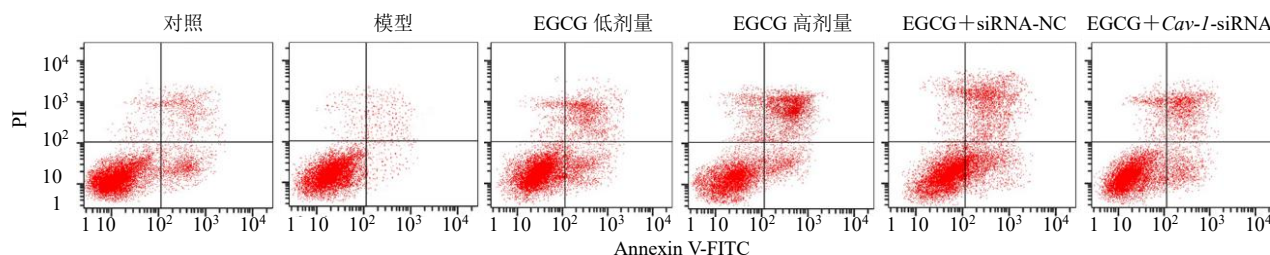


图 1 流式细胞术检测各组 LX-2 细胞凋亡情况

Fig. 1 Apoptosis rate of LX-2 cells in each group detected by flow cytometry

表 3 各组 LX-2 细胞存活率与凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Survival rate and apoptosis rate of LX-2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%	细胞凋亡率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 0.00	8.67 $\pm$ 1.05
模型	—	124.37 $\pm$ 14.56*	3.49 $\pm$ 0.41*
EGCG	12.5	92.65 $\pm$ 10.74 [#]	10.26 $\pm$ 1.68* [#]
	25.0	81.24 $\pm$ 9.86* [#]	14.50 $\pm$ 1.72* [#]
EGCG+siRNA-NC	25.0	83.07 $\pm$ 9.05* [#]	13.81 $\pm$ 1.56* [#]
EGCG+Cav-1-siRNA	25.0	105.43 $\pm$ 11.23 ^{#&}	9.46 $\pm$ 1.29 ^{#&}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 EGCG 高剂量组比较: [&] $P<0.05$ * $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [&] $P<0.05$ vs high-dose EGCG group

3.3 各组 LX-2 细胞周期分布

如图 2、3 所示,与对照组相比,模型组 LX-2 细胞在 G₀/G₁ 期的比例显著减少, S 期和 G₂/M 期的细胞比例显著增加 ($P<0.05$); 与模型组相比, EGCG 低、高剂量组细胞在 G₀/G₁ 期的比例显著增加, S 期和 G₂/M 期的细胞比例显著减少 ($P<0.05$); 与 EGCG 高剂量组相比, EGCG+Cav-1-siRNA 组细胞在 G₀/G₁ 期的比例显著减少, S 期的细胞比例显著增加 ($P<0.05$)。

3.4 各组 LX-2 细胞凋亡形态

如图 4、5 所示,与对照组相比,模型组 LX-2 细胞生长密度增加,未见明显呈黄绿色和橙色荧光的凋亡细胞,凋亡细胞比例显著降低 ($P<0.05$); 与模型组相比, EGCG 低、高剂量组细胞生长密度降低,呈黄绿色和橙色荧光的凋亡细胞增多,凋亡细胞比例显著增加 ($P<0.05$); 与 EGCG 高剂量组相比, EGCG+Cav-1-siRNA 组细胞生长密度增加,凋亡细胞比例显著降低 ($P<0.05$)。

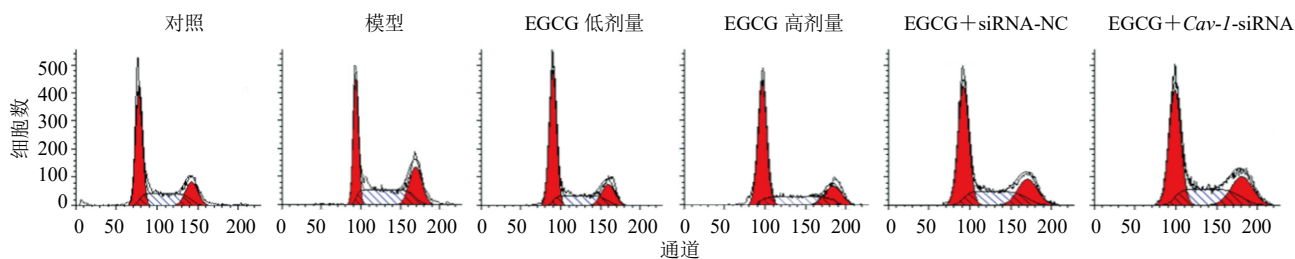
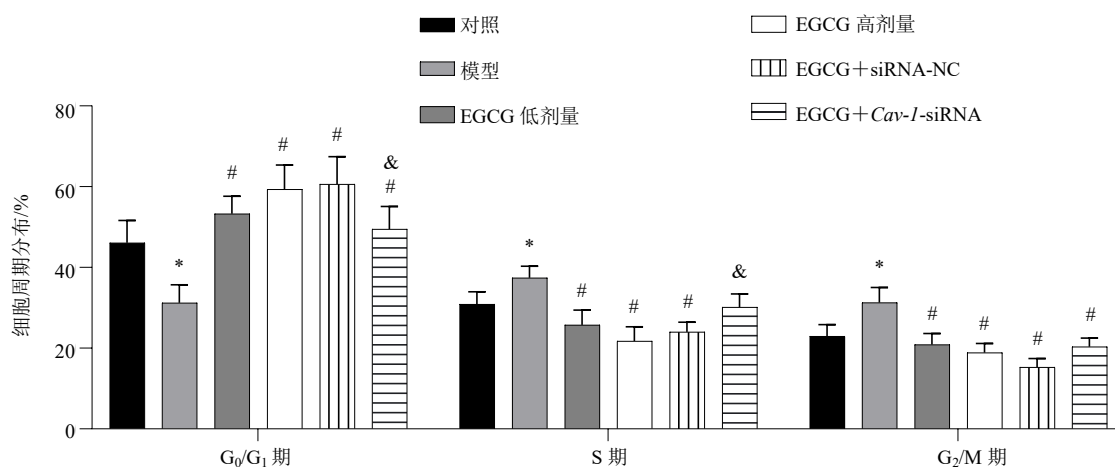


图 2 流式细胞术分析各组 LX-2 细胞周期分布情况

Fig. 2 Cell cycle distribution of LX-2 cells in each group analyzed by flow cytometry

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 EGCG 高剂量组比较: [&] $P<0.05$, 下同* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; [&] $P<0.05$ vs high-dose EGCG group, same as below figures图 3 各组 LX-2 细胞周期分布情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Cell cycle distribution of LX-2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

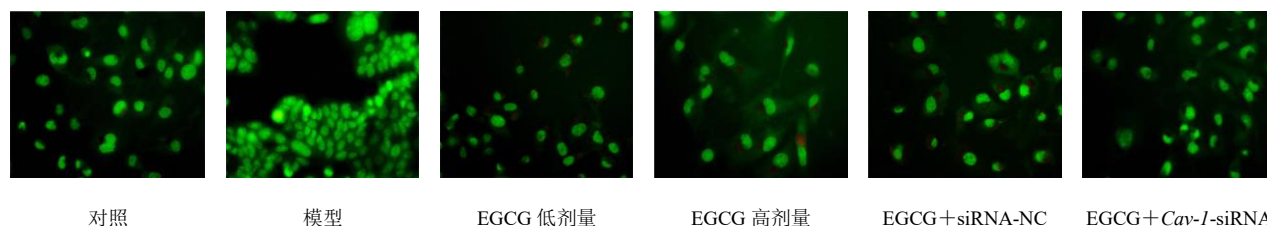


图 4 荧光显微镜下观察各组 LX-2 细胞 AO/EB 染色结果 (×200)

Fig. 4 Observation of AO/EB staining results of LX-2 cells in each group under fluorescence microscope (× 200)

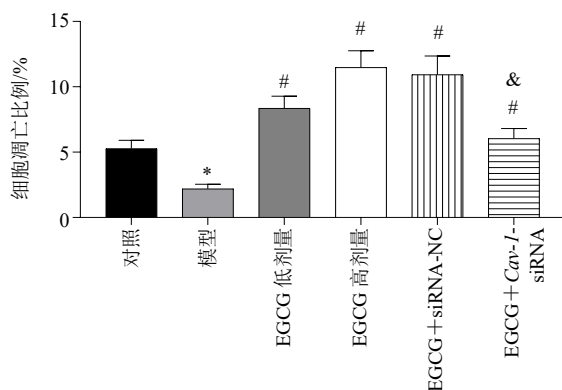


图 5 各组 LX-2 细胞凋亡比例 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Apoptosis proportion of LX-2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

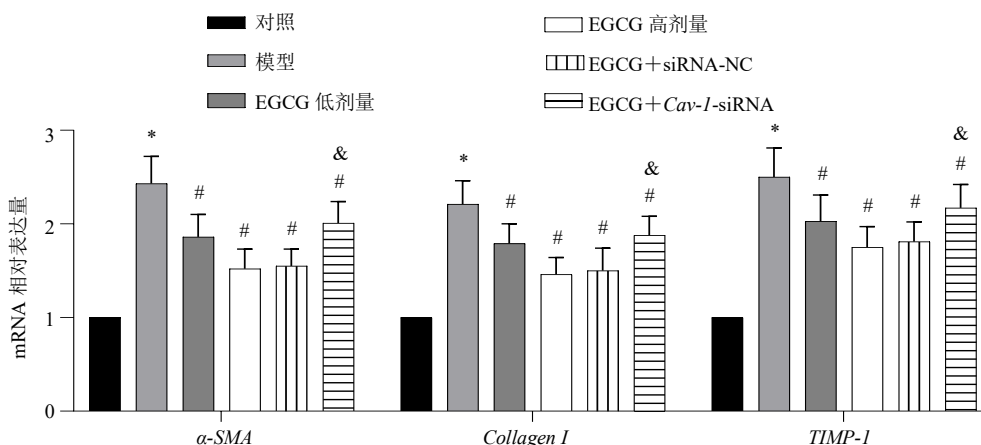


图 6 各组 LX-2 细胞 α -SMA、Collagen I 和 TIMP-1 mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 α -SMA, Collagen I and TIMP-1 mRNA expressions of LX-2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

胞 Cav-1 蛋白表达水平显著降低, Wnt1、Wnt5a、 β -catenin、Cyclin D1 和 c-Myc 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, EGCG 低、高剂量组细胞 Cav-1 蛋白表达水平显著升高, Wnt1、Wnt5a、 β -catenin、Cyclin D1 和 c-Myc 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与 EGCG 高剂量组相比, EGCG+Cav-1-siRNA 组细胞 Cav-1 蛋白表达水平显著降低, Wnt1、Wnt5a、 β -catenin、Cyclin D1、c-Myc 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

3.5 各组 LX-2 细胞 α -SMA、Collagen I 和 TIMP-1 mRNA 的表达

如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组 LX-2 细胞 α -SMA、Collagen I 和 TIMP-1 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, EGCG 低、高剂量组细胞 α -SMA、Collagen I 和 TIMP-1 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与 EGCG 高剂量组相比, EGCG+Cav-1-siRNA 组细胞 α -SMA、Collagen I 和 TIMP-1 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

3.6 各组 LX-2 细胞 Cav-1、Wnt1、Wnt5a、 β -catenin、Cyclin D1 和 c-Myc 蛋白表达

如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组 LX-2 细

4 讨论

HSC 是 LF 的主要靶标, HSC 可以通过病毒感染、非酒精性脂肪肝、酒精性脂肪性肝炎、药物毒素以及自身免疫性和胆道疾病等多种条件激活。活化后, 静止的 HSC 迁移至损伤部位, 分化为成肌纤维细胞, 并分泌大量的 ECM 以及促炎性细胞因子。TGF- β 1 是 LF 最关键的细胞因子, 其与 TGF- β 1 受体结合, 调节 Collagen I 的合成^[14]。Zhang 等^[15]发现 TGF- β 1 可诱导 LX-2 细胞活化, 并在 LX-2 细胞

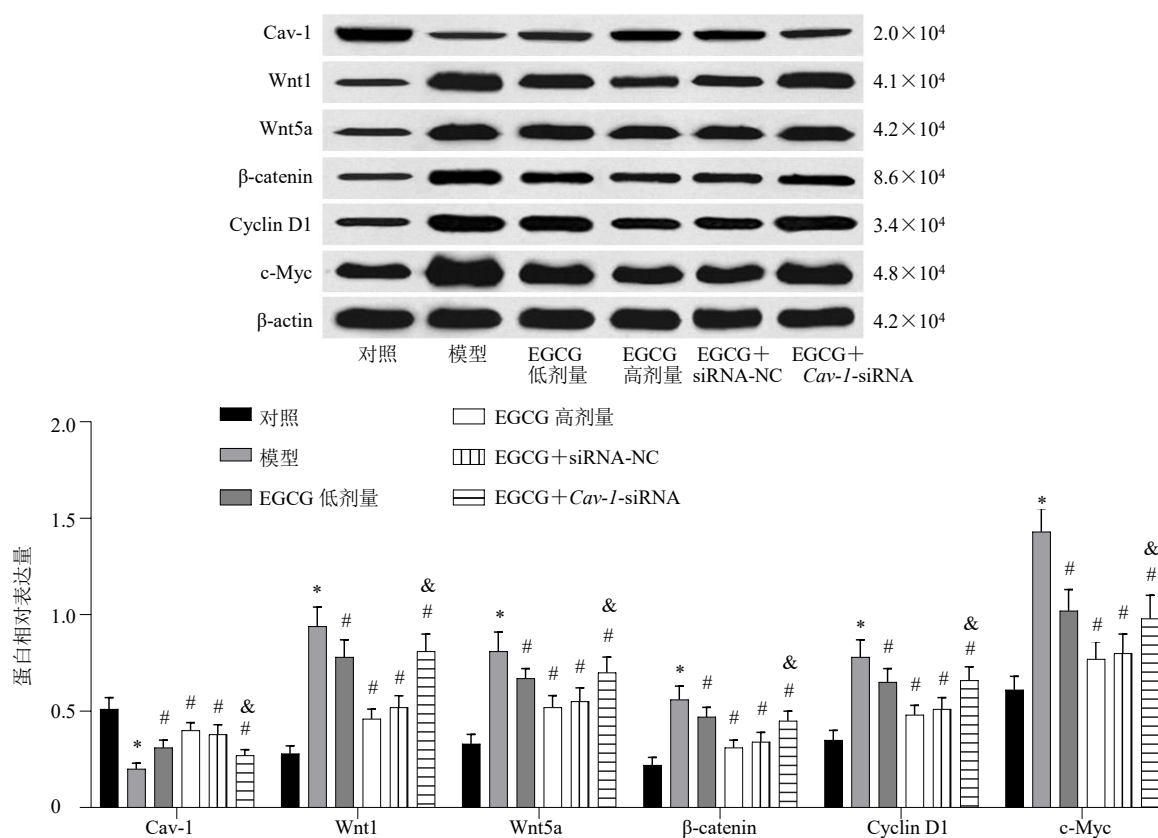


图7 各组 LX-2 细胞 Cav-1、Wnt1、Wnt5a、β-catenin、Cyclin D1 和 c-Myc 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Cav-1, Wnt1, Wnt5a, β-catenin, Cyclin D1 and c-Myc protein expressions in LX-2 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

中显著上调 Collagen I、纤连蛋白和 α-SMA 的表达。本研究结果显示, 用 TGF-β1 处理 LX-2 细胞 48 h 后, 细胞 α-SMA、Collagen I 和 TIMP-1 mRNA 表达水平显著升高, 与以往研究结果一致, 表明成功建立了体外 LF 模型。

EGCG 是绿茶中提取的主要活性成分, 已证明 EGCG 在疾病的治疗和预防中具有重要作用, 其作用主要归因于其抗氧化和抗炎活性^[6]。EGCG 对非酒精性脂肪肝^[16]、肝癌^[17]、化学药物诱发的肝损伤^[18]等各种肝脏相关疾病均具有显著的保护作用。此外, 已有多项研究发现 EGCG 可以抑制动物模型中的肝脏炎症和纤维化^[19]。Sojoodi 等^[20]发现 EGCG 可抑制 HSC 活化; 王琦等^[8]发现 EGCG 可诱导 LX-2 细胞凋亡, 并抑制其增殖和活化。但由于实验条件、环境、细胞来源等因素的不同, 不能将以往实验浓度直接用于本研究, 因此, 在进行正式实验前, 本研究在以往实验的基础上采用含不同浓度 EGCG (终浓度为 0、12.5、25、50、100、200 μmol/L) 的培养基处理 LX-2 细胞以筛选合适的浓度进行后续实验。结果显示, 当 EGCG 浓度为 12.5、25.0 μmol/L 时对 LX-2 细胞存活率未出现明显影响,

而当 EGCG 浓度 ≥ 50.0 μmol/L 时可显著抑制 LX-2 细胞存活率; 故选择 EGCG (12.5、25.0 μmol/L) 用于后续实验。转染后结果显示, TGF-β1 处理 LX-2 细胞 48 h 可增加 LX-2 细胞存活率, 降低细胞凋亡率, 而经 25.0 μmol/L EGCG 干预的 LX-2 细胞, 其存活率降低, 细胞凋亡率增加, 且细胞 α-SMA、Collagen I 和 TIMP-1 mRNA 表达水平降低; 细胞周期结果显示, EGCG 干预的 LX-2 细胞停滞在 G₀/G₁ 期, 而 S 期细胞比例减少; AO/EB 染色结果也显示, EGCG 干预后凋亡细胞比例增加。进一步说明 EGCG 具有显著抑制 LX-2 细胞活化和增殖的作用, 并促进其凋亡。

β-catenin 是经典 Wnt 信号途径的主要下游效应物, 在胞质中 Wnt 蛋白通过与细胞膜表面的跨膜受体结合, 使 β-catenin 降解减少, 导致 β-catenin 在胞质积累, 当胞质中达到一定浓度时可转入胞核, 与核内的转录因子相互作用, 可激活与增殖和分化相关的靶基因 (如 c-Myc、cyclin、survivin) 的表达^[21]。Rong 等^[22]发现抑制 Wnt/β-catenin 信号途径可抑制 HSC 活化, 降低 Cyclin D1、α-SMA 和 Collagen I 的表达, 减轻 LF。而 EGCG 可抑制 Wnt/β-catenin 的

激活^[23], 下调 CyclinD1、c-Myc 的表达, 抑制肝癌的发展^[24]。因此推测 EGCG 对 LX-2 细胞活化的抑制作用可能与 Wnt 途径有关。故在本研究中, 通过 Western blotting 检测了 LX-2 细胞 Wnt 途径相关蛋白的表达, 结果显示, EGCG 可显著降低 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 的表达, 抑制 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞中 Wnt 途径的激活, 证实 EGCG 可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 途径, 进而抑制 HSC 的活化, 参与 LF。

Cav-1 是胞膜上的一种整合膜蛋白, 在许多细胞内高表达, 对物质的转运、内皮的渗透和肿瘤的发生起重要的调节作用。Cav-1 是肝脏功能的调节剂, 可调节几种分子途径, 从而调节肝脂质蓄积、脂质和葡萄糖代谢、线粒体生物学和肝细胞增殖; 与胆汁淤积、肝炎、肝硬化和肝癌的发生有关^[25]。因此, Cav-1 在维持肝生理功能中起着至关重要的作用。研究发现, 在纤维化肝组织和激活的 HSC 中, Cav-1 呈低表达; 沉默 Cav-1 可上调 Collagen I 表达, 升高 TIMP-1 表达^[11]。此外, 有研究显示 Cav-1 可负调控经典的 Wnt 信号通路^[10]。而本研究也检测到, 在 TGF- β 1 诱导的 LX-2 细胞中 Cav-1 的表达降低, 并伴随着 Collagen I 和 TIMP-1 以及 Wnt1、Wnt5a、 β -catenin 表达的升高。由此, 猜测 EGCG 对 Wnt/ β -catenin 信号途径的调控机制可能与 Cav-1 有关。

研究表明, 在激活的 HSC 中 Wnt1 和 Wnt5a 的表达上调^[26]。Wnt1 是经典的依赖 β -catenin 的 Wnt 信号通路蛋白, 在纤维化肝组织和 TGF- β 1 刺激的 LX-2 细胞中 Wnt1、 β -catenin 的表达显著升高^[27-28]。而 Cav-1 可通过调节 β -catenin 的细胞内定位来调节 Wnt/ β -catenin 信号传导^[29]。Guan 等^[30]发现 Cav-1 可通过抑制 Wnt1/ β -catenin 信号通路改善慢性阻塞性肺疾病大鼠的肺损伤。本研究发现, 经 EGCG 干预的 LX-2 细胞中, Cav-1 的表达增加, 而 Wnt1、 β -catenin 的表达降低, 且 Wnt5a 的表达也下调, Wnt5a 是一种具有代表性的非经典 Wnt 蛋白, Li 等^[31]发现 Wnt5a 可增强 LX-2 细胞中 α -SMA 和 Collagen I 的蛋白和 mRNA 表达, 促进 HSC 活化。本研究在 EGCG 干预的基础上采用小分子干扰技术沉默 Cav-1 的表达, 发现 Wnt1、Wnt5a 的表达上调, 表明 EGCG 对 Wnt 信号通路的抑制作用被减弱。提示, Cav-1 不仅可负调控经典的 Wnt 信号通路, 还可负调控 Wnt5a 介导的非经典 Wnt 信号通路; EGCG 对 Wnt 信号通路的抑制作用可能与其上调 Cav-1 的表达有关。

综上所述, EGCG 可能通过上调 Cav-1, 抑制 Wnt 信号通路激活, 进而抑制 HSC 活化。本研究仅从细胞水平初步探究了 EGCG 对 HSC 活化的分子机制, 由于体内环境存在较大差异, EGCG 在体内能否发挥相同的调控作用, 进而影响 LF, 有待深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Roehlen N, Crouchet E, Baumert T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9(4): E875.
- [2] 龙翠珍, 舒远辉, 何萍, 等. 大麻素受体 2 激动剂 AM1241 对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 增殖、活化及凋亡的影响 [J]. *天津医药*, 2020, 48(7): 606-610.
- [3] Chen H X, Cai J Y, Wang J C, et al. Targeting Nestin⁺ hepatic stellate cells ameliorates liver fibrosis by facilitating T β RI degradation [J]. *J Hepatol*, 2021, 74(5): 1176-1187.
- [4] 李静, 郑雪, 丁新, 等. 骨髓间充质干细胞旁分泌 HGF 体外调控肝星状细胞 [J]. *天津医药*, 2019, 47(1): 1-5.
- [5] Lambrecht J, van Grunsven L A, Tacke F. Current and emerging pharmacotherapeutic interventions for the treatment of liver fibrosis [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21(13): 1637-1650.
- [6] Almatroodi S A, Almatroodi A, Khan A A, et al. Potential therapeutic targets of epigallocatechin gallate (EGCG), the most abundant catechin in green tea, and its role in the therapy of various types of cancer [J]. *Molecules*, 2020, 25(14): E3146.
- [7] Nakamuta M, Higashi N, Kohjima M, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea, suppresses both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16(4): 677-681.
- [8] 王琦, 赵佳, 陈大方, 等. EGCG 对人肝星状细胞的生长状态及活化表型的影响 [J]. *浙江医学*, 2019, 41(8): 747-750.
- [9] Chen Y, Chen X, Ji Y R, et al. PLK1 regulates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis through Wnt/ β -catenin signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7405-7416.
- [10] Mo S J, Wang L, Li Q, et al. Caveolin-1 regulates dorsoventral patterning through direct interaction with β -catenin in zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2010, 344(1): 210-223.
- [11] Yao Y, Xia Z, Cheng F, et al. Human placental

- mesenchymal stem cells ameliorate liver fibrosis in mice by upregulation of Caveolin1 in hepatic stellate cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 294.
- [12] Zheng Y Y, Morris A, Sunkara M, *et al*. Epigallocatechin-gallate stimulates NF-E2-related factor and heme oxygenase-1 via caveolin-1 displacement [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(2): 163-168.
- [13] Hsieh S R, Hsu C S, Lu C H, *et al*. Epigallocatechin-3-gallate-mediated cardioprotection by Akt/GSK-3 β /caveolin signalling in H9c2 rat cardiomyoblasts [J]. *J Biomed Sci*, 2013, 20: 86.
- [14] Chen Z J, Jain A, Liu H, *et al*. Targeted drug delivery to hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019, 370(3): 695-702.
- [15] Zhang J, Jiang N, Ping J, *et al*. TGF- β 1-induced autophagy activates hepatic stellate cells via the ERK and JNK signaling pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1): 256-266.
- [16] Naito Y, Ushiroda C, Mizushima K, *et al*. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates non-alcoholic fatty liver disease via modulating the interaction between gut microbiota and bile acids [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2020, 67(1): 2-9.
- [17] Tang Y P, Cao J, Cai Z M, *et al*. Epigallocatechin gallate induces chemopreventive effects on rats with diethylnitrosamine-induced liver cancer via inhibition of cell division cycle 25A [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(5): 3873-3885.
- [18] Inoue H, Arakawa K, Tanaka M, *et al*. Upregulation and stabilization of senescence marker protein-30 by epigallocatechin gallate against *tert*-butyl hydroperoxide-induced liver injury *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2021, 68(1): 51-57.
- [19] Al-Basher G I. Green tea activity and iron overload induced molecular fibrogenesis of rat liver [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(3): 531-540.
- [20] Sojoodi M, Wei L, Erstad D J, *et al*. Epigallocatechin gallate induces hepatic stellate cell senescence and attenuates development of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2020, 13(6): 497-508.
- [21] Mao X M, Li H, Zhang X Y, *et al*. Retinoic acid receptor α knockdown suppresses the tumorigenicity of esophageal carcinoma via Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(12): 3348-3358.
- [22] Rong X L, Liu J Z, Yao X, *et al*. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 98.
- [23] Zhu J Y, Jiang Y, Yang X, *et al*. Wnt/ β -catenin pathway mediates (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibition of lung cancer stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(1): 15-21.
- [24] Sur S, Pal D, Mandal S, *et al*. Tea polyphenols epigallocatechin gallate and theaflavin restrict mouse liver carcinogenesis through modulation of self-renewal Wnt and hedgehog pathways [J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 27: 32-42.
- [25] Fernandez-Rojo M A, Ramm G A. Caveolin-1 function in liver physiology and disease [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(10): 889-904.
- [26] Du J H, Niu X M, Wang Y, *et al*. MiR-146a-5p suppresses activation and proliferation of hepatic stellate cells in nonalcoholic fibrosing steatohepatitis through directly targeting Wnt1 and Wnt5a [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16163.
- [27] 李臻, 陆爽, 吴君. 丹防胶囊对免疫性肝纤维化大鼠肝组织 wnt1、 β -catenin、DKK1 表达的影响 [J]. *天津医药*, 2019, 47(8): 804-809.
- [28] Sierra R, Gómez Bustillo S, Kameneva P, *et al*. Contribution of neural crest and GLAST⁺ Wnt1⁺ bone marrow pericytes with liver fibrogenesis and/or regeneration [J]. *Liver Int*, 2020, 40(4): 977-987.
- [29] Galbiati F, Volonte D, Brown A M, *et al*. Caveolin-1 expression inhibits Wnt/ β -catenin/Lef-1 signaling by recruiting β -catenin to caveolae membrane domains [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 23368-23377.
- [30] Guan P, Cai W T, Jiang F, *et al*. Caveolin-1 improves lung injury in rats with chronic obstructive pulmonary disease partially through Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(2): 457-465.
- [31] Li W T, Yu X L, Zhu C L, *et al*. Notum attenuates HBV-related liver fibrosis through inhibiting Wnt 5a mediated non-canonical pathways [J]. *Biol Res*, 2019, 52(1): 10.

[责任编辑 李亚楠]