

· 基础研究 ·

上调 C/EBP α 对 PAR1 激活的 HSC-T6 细胞的影响*刘迎春¹, 顾小红^{1 Δ} , 张云东², 段绪伟¹

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所高干科, 重庆 400042;

2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经外科, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨上调 CCAAT 增强子结合蛋白 α (C/EBP α)对蛋白酶活化受体 1(PAR1)激活的肝星状细胞(HSC)活化、增殖和分泌胶原蛋白的影响。方法 瞬时转染法转染经 PAR1 激活的 HSC-T6, 根据转染质粒的加 PAR1 活性肽的情况将细胞分为正常组(未做任何处理)、SFLLR 组、SFLLR+C/EBP α 质粒组、SFLLR+空载体组。蛋白质印迹法(Western-blot)检测转染后 24、48 h HSC 内 α 平滑肌动蛋白(α -SMA)及 I 型前胶原的表达, MTT 检测细胞增殖度。结果 SFLLR+C/EBP α 质粒组细胞内 α -SMA 及 I 型前胶原蛋白的表达较其余各组明显减少, 细胞增殖度也明显下降, 均以转染后 48 h 明显改变($P < 0.01$)。结论 上调 C/EBP α 的表达在一定程度上可抑制 PAR1 对 HSC-T6 的活化、增殖和胶原蛋白的合成。

关键词: CCAAT 增强子结合蛋白 α ; 受体, RAP-1; 肝星状细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)36-4424-03

The effect of over-expression of C/EBP α on HSC-T6 cell activated by PAR1*Liu Yingchun¹, Gu Xiaohong^{1 Δ} , Zhang Yundong², Duan Xuwei¹

(1. Department of Geriatrics, Daping Hospital and Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Neurosurgery, Daping Hospital and Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To explore the over-expression of the CCAAT enhancer binding protein α (C/EBP α) in hepatic stellate cells (HSC-T6) which activated by protease-activated receptor 1 (PAR1), to explore its possible relationship with cell proliferation, cell activation and collagen secretion of HSC-T6 cell. **Methods** HSC-T6 cells were divided into 4 groups, control group, SFLLR group; vehicle plasmid+SFLLR group, C/EBP α plasmid+SFLLR group. The eukaryotic vector harboring the full length of C/EBP α cDNA was transfected into PAR1 activated HSC-T6 cell, then Western blot was applied to detect the expression of α -smooth muscle actin(α -SMA) and collagen I and evaluate the effect of transfection on proliferation of HSC-T6 by MTT. **Results** The expression of α -SMA and collagen I in C/EBP α plasmid+SFLLR group were dramatically decreased compared with other 3 groups, as well as proliferation after 48 h ($P < 0.05$). **Conclusion** Over-expression of C/EBP α gene by transfection had inhibitory influence on proliferation, activation and collagen secretion of HSC-T6 which were activated by PAR1.

Key words: CCAAT enhancer binding protein α ; receptor, RAP-1; hepatic stellate cells

肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)激活是肝纤维化的关键,抑制 HSC 激活对肝纤维化防治有重要作用^[1]。蛋白酶活化受体 1(Protease activated receptor1, PAR1)是凝血酶介导的肝纤维化自动放大循环过程中的主要炎症反应和纤维化受体,在肝纤维化形成中起正性调控作用,拮抗 PAR1 活性可以抑制 HSC 激活^[2],但至今在肝纤维化防治研究中尚未发现有效的选择性 PAR1 的抑制剂和方法。HSC 激活的显著变化是细胞内脂滴的减少甚至消失,脂滴的消失意味着去脂肪细胞分化, HSC 向脂肪细胞分化是维持其静止所必需的,去脂肪细胞分化在 HSC 激活中起着关键作用^[1]。CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding proteins α , C/EBP α) 基因表达是维持脂肪细胞分化的重要转录因子之一^[3]。那么,与脂肪细胞分化脂滴形成相关的 C/EBP α 能否维持 HSC 静止,引入 C/EBP α 维持脂肪细胞分化防止 HSC 激活机制对 PAR1 促肝

纤维化形成是否有负性调节作用? 作者为此作了以下研究,现报道如下。

1 材料与方

1.1 细胞 HSC-T6 细胞株购于中美合资博汇斯生物医药科技有限公司。

1.2 材料 质粒 pcDNA3.1(-)-C/EBP α 购自 Biovector science lab, Inc, 空载体 pcDNA3.1(-) 由第三军医大学大坪医院野战外科研究所一室提供。PAR1 活性肽(SFLLR)由西安美联生物科技有限公司合成; PolyJetTM 体外 DNA 转染试剂购自美国 SignaGen Laboratories; 兔抗 GAPDH 多克隆抗体及鼠抗兔二抗购自美国 Santa Cruz 公司; α -SMA 及 I 型前胶原自北京中杉金桥生物公司; 蛋白分子标记物购自 Gibco 公司。

1.3 方法

1.3.1 C/EBP α 质粒转染经 SFLLR 处理的 HSC-T6 细胞

* 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC:2010BB5165); 中国人民解放军第三军医大学中青年基金(XG200543)。 作者简介: 刘迎春(1985~), 硕士, 住院医师, 主要从事肝纤维化研究。 Δ 通讯作者, Tel: (023)68757891; E-mail: Guxiaohong@dpyytjzx.com。

收集培养的 HSC-T6 细胞,选取状态佳、存活率高的细胞进行试验。0.25%的胰蛋白酶进行消化,将获得的细胞调整密度为 1×10^5 /孔接种于 12 孔板,完全培养基培养至细胞融合后,换用无血清的培养基继续培养 24 h。转染相关质粒,根据转染情况进行细胞分组:SFLLR 组,SFLLR+C/EBP α 组,SFLLR+空载体组,正常组(细胞未做任何处理);向不同处理组细胞内分别加入 50 μ mol/L 的 SFLLR 继续培养 24 h,参照 PolyJet 质粒转染试剂的高级转染法进行细胞转染,24、48 h 后收集细胞进行相关指标的检测。

1.3.2 MTT 检测转染后 24、48 h 各组 HSC-T6 细胞增殖度 收集转染后 24、48 h 细胞,每孔加入 0.5 g/L 的 MTT 40 μ L 二甲亚砜反应 4 h,吸出培养液,加入 200 μ L DMSO 振荡 10 min。酶标仪测定各孔光吸收值,波长选择 490 nm,空白孔调零。

1.3.3 蛋白质印迹法(Western blot)检测转染后 24、48 h 各组 α -SMA 及 I 型前胶原的表达 分别收集转染后 24、48 h 的细胞,RIPA 细胞裂解液(RIPA lysis buffer)裂解细胞提取总蛋白,每条泳道上样 45 μ g 蛋白样品进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,抗体稀释度为 α -SMA 1:300, I 型前胶原 1:400,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参。同一样品重复 5 次,取 5 次测定结果的平均值进行统计分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,各组间比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 检测各组细胞增殖度结果 C/EBP α 基因转染经 SFLLR 刺激 HSC-T6 细胞 24 h 后,SFLLR+空载体组及 SFLLR 组细胞增殖度较正常组明显增加,而 SFLLR+C/EBP α 质粒组细胞增殖度与 SFLLR+空载体组及 SFLLR 组相

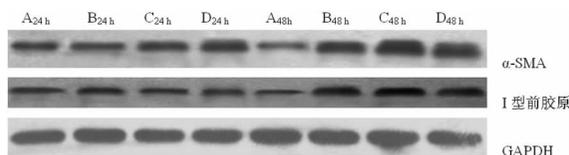
比明显下降,48 h 后 SFLLR+C/EBP α 转染组细胞增殖度较正常组亦明显下降($P < 0.01$),见表 1。

2.2 Western blot 检测转染后 24、48 h 各组 α -SMA 及 I 型前胶原蛋白表达 转染 24 h 后 SFLLR+C/EBP α 组与 SFLLR+空载体组及 SFLLR 组比较, I 型前胶原及 α -SMA 蛋白表达明显减少($P < 0.05$);SFLLR+空载体组及 SFLLR 组与正常组比较, I 型前胶原及 α -SMA 表达明显升高($P < 0.05$);48 h 后 SFLLR+C/EBP α 组 I 型前胶原及 α -SMA 蛋白表达较正常组亦明显减少($P < 0.01$);而 SFLLR+空载体组与 SFLLR 组比较, I 型前胶原及 α -SMA 蛋白表达差异无统计学意义,见图 1,表 2。

表 1 MTT 检测不同时间点各组 HSC-T6 增值($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h
正常组	0.316 \pm 0.048	0.800 \pm 0.045
SFLLR+空载体组	0.654 \pm 0.057 ^a	1.114 \pm 0.058 ^a
SFLLR 组	0.692 \pm 0.035 ^a	1.250 \pm 0.050 ^a
SFLLR+C/EBP α 组	0.352 \pm 0.055 ^{bc}	0.506 \pm 0.036 ^{abc}

^a: $P < 0.01$,与同时时间点正常组比较 1;^b: $P < 0.01$,与同时时间点 SFLLR+空载体组比较;^c: $P < 0.01$,与同时时间点 SFLLR 组比较。



A:SFLLR+C/EBP α 组;B:正常组;C:SFLLR 组;D:SFLLR+空载体组。

图 1 Western blot 检测 PAR1 各因素处理组 α -SMA 及 I 型前胶原蛋白表达

表 2 Western blot 检测 PAR1 各处理组 I 型前胶原及 α -SMA 相对表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	I 型前胶原		α -SMA	
	24 h	48 h	24 h	48 h
正常组	0.272 \pm 0.071	0.520 \pm 0.047	0.396 \pm 0.073	0.586 \pm 0.038
SFLLR+空载体组	0.326 \pm 0.057 ^a	0.714 \pm 0.036 ^a	0.532 \pm 0.035 ^a	0.804 \pm 0.062 ^a
SFLLR 组	0.344 \pm 0.046 ^a	0.658 \pm 0.042 ^a	0.492 \pm 0.067 ^a	0.746 \pm 0.037 ^a
SFLLR+C/EBP α 组	0.248 \pm 0.044 ^{bc}	0.198 \pm 0.049 ^{abc}	0.410 \pm 0.045 ^{bc}	0.204 \pm 0.038 ^{abc}

^a: $P < 0.05$,与同时时间点正常组比较;^b: $P < 0.05$,与同时时间点 SFLLR+空载体组比较;^c: $P < 0.05$,与同时时间点 SFLLR 组比较。

3 讨 论

近年来随着分子生物学技术的进展,对肝纤维化发生发展的分子机制有了深入理解,研究发现多种因子可参与肝纤维化的形成,包括致肝纤维化细胞因子,如转化生长因子(TGF)- β 、TGF- α 、肿瘤坏死因子(TNF)、蛋白酶活化受体家族(PARs)等;逆转肝纤维化调节因子,如 C/EBP α 、过氧化物酶增殖物激活受体(PPAR γ)等,均可作用于 HSC 进而影响肝纤维化发生、发展^[4-5]。PARs 属于 7 次跨膜 G-蛋白偶联受体大家族成员之一,人体内绝大多数细胞均有不同类型的 PARs 存在与表达。与其他 G-蛋白偶联受体激活机制不同,PARs 氨基末端被

细胞外蛋白酶裂解后形成新的氨基末端,暴露的新氨基末端又能够结合自身受体并导致自身受体激活,诱导细胞内信号传导,从而参与机体各种病理及生理过程,如炎症反应、止血、疼痛等^[6]。

研究表明 PARs 也可以通过促进细胞增殖及胶原蛋白产生来参与各种组织器官的纤维化,尤其是肾脏和肝脏^[7]。Luyendyk 等^[8]最先通过研究证实,受损肝脏 HSC 中 PAR1 表达含量增加,PAR1 激动剂可以促进 HSC 细胞增殖。Rullier 等^[9]通过敲除肝纤维化大鼠 PAR1 基因证明 PAR1 基因的缺失可以抑制 HSC 激活及胶原蛋白的产生。本研究前期体外实

验也证实, PAR1 不仅可促进肝纤维化的形成, 还可诱导炎症反应, 加重肝脏损伤过程, 是肝纤维化自动放大循环过程中的主要炎症反应和纤维化受体, 拮抗 PAR1 的作用, 可以抑制 HSC 激活, 限制肝脏炎症反应, 中断肝纤维化过程中 HSC 激活后的自动放大循环作用^[10-11], 但至今为止尚未发现有效的选择性 PARs 抑制剂和方法。

HSC 激活的显著变化是细胞内脂滴的消失, C/EBP α 与维持 HSC 静止密切相关, 在肝纤维化形成中起着负性调控作用。CCL4 诱导小鼠肝纤维化模型显示, 干预的最初 1~4 周和最后 9~12 周均可测得 C/EBP α 表达, 其表达可明显降低胶原蛋白合成^[12]。体外研究发现上调 C/EBP α 在 HSC 中表达可抑制 HSC 增殖及 α -SMA 的表达, 诱导脂滴的重新形成, 进而维持 HSC 静止^[13], 提示 C/EBP α 与抑制 HSC 活化维持其静止相关。

鉴于 PAR1 在肝纤维化形成和发展中的正性促进作用, 受到 C/EBP α 与维持脂肪细胞分化进而维持 HSC 静止的启发, 本研究将上调 C/EBP α 基因表达引入到 PAR1 激活的 HSC 中, 探讨二者在 HSC 激活中的关系。SFLLR 是人工合成的 PAR1 及 PAR2 的特异性多肽, 可直接与 PARs 细胞外氨基末端结合诱导其激活, 本研究选用外源性 SFLLR 刺激 HSC-T6 细胞来模拟 PAR1 对 HSC 的作用, 结果显示, 随着转染时间的延长, SFLLR+C/EBP2 组内 α -SMA 较其余各组明显下降。 α -SMA 是 HSC 激活的标志^[14], 提示随着 C/EBP α 基因表达增多, PAR1 激活的 HSC 活化数目减少。转染后 24 h SFLLR+C/EBP α 组内细胞增殖度较其余各组明显下降 ($P<0.05$), 48 h 后此现象更加明显 ($P<0.01$), 与文献报道的 C/EBP α 抑制细胞增殖作用一致。I 型胶原是纤维化肝脏中含量最大的胶原蛋白, 肝硬化时 I 型胶原占胶原含量的 90% 以上, I 型胶原可作为反映胶原代谢的主要参考指标, 而 I 型前胶原是合成 I 型胶原的重要前体, 其浓度反映 I 型胶原合成速率^[15], 故本研究选用 I 型前胶原作为胶原蛋白合成的检测指标; 结果显示 SFLLR+C/EBP α 组内 I 型前胶原 mRNA 及蛋白的表达含量较其余各组明显下降, 尤以转染后 48 h 明显, 提示: 上调 C/EBP α 表达可在一定程度上抑制 PAR1 激活的 HSC 胶原蛋白的产生, 进而减少了细胞外基质 (ECM) 在肝脏的沉积, 在一定程度上减轻了纤维化程度。

本实验表明, 上调 C/EBP α 表达可降低 PAR1 激活的 HSC-T6 细胞增殖, 并能抑制 HSC-T6 活化及胶原蛋白的合成, 提示 C/EBP α 可以抑制 PAR1 对 HSC 活化、增殖及分泌胶原的促进作用。

参考文献:

[1] Mann DA, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 2010, 52(6): 949-950
 [2] Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, et al. Structure,

function and pathophysiology of protease activated receptors[J]. Pharmacology Ther, 2011, 130(3): 248-282.

- [3] Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, et al. The CCAAT/enhancer(C/EBP) family of basic-leucine zipper(bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation[J]. Cytokine, 2011, 54(1): 6-19
 [4] Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7(8): 425-436.
 [5] Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(2): 195-206.
 [6] Ma L, Dorling A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation[J]. Semin Immunopathol, 2012, 34(1): 63-72.
 [7] Calvaruso V, Maimone S, Gatt A, et al. Coagulation and fibrosis in chronic liver disease[J]. Gut, 2008, 57(12): 1722-1727.
 [8] Luyendyk JP, Mackman N, Sullivan BP. Role of fibrinogen and protease-activated receptors in acute xenobiotic-induced cholestatic liver injury[J]. Toxicol Sci, 2011, 119(1) 233-243.
 [9] Rullier A, Gillibert-Duplantier J, Costet P, et al. Protease-activated receptor 1 knockout reduces experimentally induced liver fibrosis [J]. Am J Physiol-Gastrl, 2008, 294(1): G226-235.
 [10] 顾小红, 张云东, 刘迎春. PARs 调控大鼠 HSC 合成和分泌胶原蛋白的作用[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 39(7): 985-988.
 [11] 顾小红, 张云东. 蛋白酶活化受体 2 对大鼠肝星状细胞分泌 MCP21 的诱导作用[J]. 重庆医学, 2009, 38(3): 288-292.
 [12] Mei S, Wang X, Zhang J, et al. In vivo transfection of C/EBP-alpha gene could ameliorate CCL(4)-induced hepatic fibrosis in mice[J]. Hepatol Res, 2007, 37: 531-539.
 [13] Huang GC, Zhang JS, Tang QQ. Involvement of C/EBP-alpha gene in vitro activation of rat hepatic stellate cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(4): 1309-1318.
 [14] Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev, 2008, 88(1): 125-172.
 [15] Luft FC. CCAAT enhancer-binding proteins have long bony fingers[J]. J Mol Med, 2012, 90(1): 1-3.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-10-02)