

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.15.006

阿魏酸联合脂肪间充质干细胞调节 TGF- β /Smad 信号转导通路对肝星状细胞凋亡的影响研究*

许希燕¹,王巧稚¹,罗茂²,余鸿¹,刘广益^{1 Δ}

(西南医科大学:1.基础医学院;2.药物研究中心,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨阿魏酸(FA)联用大鼠脂肪间充质干细胞(ADMSCs)调节 TGF- β /Smad 信号转导通路对肝星状细胞(HSCs)凋亡的影响。**方法** 实验将 HSCs 分为 4 组:空白组、FA 组、ADMSCs 组、FA+ADMSCs 组。流式细胞术检测各组 HSCs 的凋亡率;qRT-PCR 检测 HSCs 中 TGF- β 1、Smad2、Smad3 和 Smad7 mRNA 的表达水平;Western blot 检测 HSCs 中 TGF- β 1 和 Smad7 蛋白、Smad2/3 磷酸化(p-Smad2/3)表达变化。**结果** 与其他 3 组比较,FA+ADMSCs 中 HSCs 凋亡率明显升高($P<0.05$);TGF- β 1、Smad2、Smad3 mRNA 表达明显下降,Smad7 mRNA 表达明显升高($P<0.05$);TGF- β 1 蛋白、p-Smad2/3 表达明显降低,而 Smad7 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。**结论** FA 能增强 ADMSCs 对 HSCs 中 TGF- β 1 表达的下调作用,进而导致下游 p-Smad2/3 活性下降及 Smad7 表达升高,从而参与促进细胞凋亡。

[关键词] 阿魏酸;脂肪间充质干细胞;肝星状细胞;细胞凋亡;TGF- β /Smad 信号转导通路

[中图法分类号] R575 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)15-1997-04

Study on effects of ferulic acid combined with adipose derived mesenchymal stem cells on apoptosis of hepatic stellate cells by regulating TGF- β /Smad signaling transduction pathway*

XU Xiyang¹, WANG Qiaozhi¹, LUO Mao², YU Hong¹, LIU Guangyi^{1 Δ}

(1. College of Basic Medicine; 2. Drug Research Center, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of ferulic acid (FA) and adipose-derived mesenchymal stem cells(ADMSCs)on rat hepatic stellate cells (HSCs) by regulating TGF- β /smad signal transduction pathway. **Methods** HSCs were divided into 4 groups: blank control group, FA control group, ADMSCs control group and FA+ADMSCs group. The apoptosis rate of HSCs in each group was detected by flow cytometry. The expression levels of TGF- β 1, Smad2, Smad3 and Smad7 mRNA in HSCs were detected by qRT-PCR. The TGF- β 1 and Smad7 protein levels, and phosphorylated-Smad2/3 (p-Smad2/3) expression were detected by Western blot. **Results** Compared with the other 3 groups, the apoptosis rate of HSCs in the FA+ADMSCs group was significantly increased($P<0.05$), while the expression levels of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 mRNA were significantly decreased, and the Smad7 mRNA expression was increased; moreover, the expression levels of TGF- β 1 protein and p-Smad2/3 were significantly decreased, while the Smad7 protein expression was significantly increased($P<0.05$). **Conclusion** FA can enhance the effect of ADMSCs for down-regulating the TGF- β 1 expression in HSCs, and then leads to the decrease of downstream p-Smad2/3 activity and Smad7 expression increase, thus participates in promoting cellular apoptosis.

[Key words] ferulic acid; adipose-derived mesenchymal stem cells; hepatic stellate cells; apoptosis; TGF- β /Smad signaling transduction pathway

肝纤维化是指由各种致病因子所致肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉淀的一个病理过程,是肝脏对各种慢性损伤产生的一种修复反应,是多种肝病的必经阶段。肝纤维化的核心机制是肝星状细胞(hepatic satellite cells, HSCs)的活化^[1-2],所以治疗肝纤维化的关键是抑制 HSCs 增殖或促进

其凋亡,从而抑制其分泌 ECM 或促进 ECM 降解。而在 HSCs 活化众多路径中,转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)是促肝脏纤维发生的最强有力细胞因子。TGF- β 1 主要通过 TGF- β /Smad 信号通路在体内进行表达,Smad 蛋白介导了 TGF- β 1 的胞内信号转导^[3]。

* 基金项目:四川省科技厅市校联合资助项目(2014TSX-0119)。

作者简介:许希燕(1986—),讲师,本科,主要从事干细胞应用研究。

 Δ 通信作者, E-mail: 314250834@qq.com。

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 移植是治疗肝纤维化的新方法,除了通过分化为肝细胞对肝脏进行直接修复外,还可经旁分泌途径诱导 HSC 凋亡。脂肪间充质干细胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells, ADMSCs) 为间充质干细胞的一种,具有和 BMSCs 相似的分化倾向和功能^[4-6]。阿魏酸 (Ferulic acid, FA) 属酚酸类化合物,是中药川芎、当归等的主要成分之一,具有抗血小板聚集、抑制炎症反应、抗氧化等作用。有研究证实,FA 可有效降低肝硬化患者门静脉压力,改善肝纤维化指标^[7-9]。本研究探讨大鼠 ADMSCs 和 FA 通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路对 HSCs 凋亡的影响,以期为肝纤维化治疗提供实验依据和新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞系 (HSC-T6, 江苏凯基生物技术股份有限公司); SD 大鼠 ADMSCs [赛业 (广州) 生物科技有限公司]; 阿魏酸钠 (标准品, 大连美仑生物技术有限公司); DMEM/F-12 培养基 (上海 Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州天杭生物科技股份有限公司); MTT 粉剂 (北京 Solarbio 公司); DMSO (美国 Sigma 公司); 6 孔 Transwell 培养板 (美国 Corning 公司); Annexin-V/PI 凋亡染色试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司); 总 RNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司]; RNA 逆转录试剂盒 (北京 TOYOBO 公司); 荧光定量 PCR 反应试剂盒 (德国 QIAGEN 公司); 兔抗大鼠 TGF- β 1、Smad2/3、Smad7、p-Smad2/3 抗体 (美国 Santa Cruz 公司); ELISA 试剂盒 (北京诚林生物公司); PCR 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 HSCs、ADMSCs 复苏后,接种于 10% FBS 含双抗的 DMEM/F-12 培养基,置于 37 °C、5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中常规培养。

1.2.2 实验分组 取对数生长期的 ADMSCs 和 HSCs,以 1:5 的比例分别接种于 0.4 μ m Tanswell 半透膜、6 孔板中,用 10% FBS DMEM/F-12 培养,待两种细胞密度达到约 70% 后均换为无血清培养基。将 HSCs 分为 4 组:空白组, HSCs 单独培养,不加 FA 和 ADMSCs; FA 组,加 FA 处理 HSCs; ADMSCs 组加入 ADMSCs,用 Tanswell 建立上下双层细胞共培养体系; FA+ADMSCs 组,在 ADMSCs 与 HSCs 共培养体系中加入 FA 共同作用 (实验前期用 MTT 法检测得 FA 的最适药物处理浓度为 200 μ g/mL); 以上 4 组均用无血清 DMEM/F-12 培养 24 h。

1.2.3 流式细胞仪检测 HSCs 的凋亡率 收集细胞后用预冷的 PBS 漂洗 2 次,加入 500 μ L Binding Buffer 重悬,用 5 μ L FITC Annexin V 和 5 μ L PI 进行染色,室温、避光反应 15 min 后用流式细胞仪检测各组凋亡率,重复 3 次。凋亡率 = 早期凋亡 + 晚期

凋亡。

1.2.4 RT-PCR 检测 HSCs 的 TGF- β 1、Smad2、Smad3 和 Smad7 mRNA 表达 收集细胞,用 Trizol 提取各组细胞总 RNA,核酸蛋白仪测定总 RNA 的浓度及纯度。按反转录试剂盒说明书操作,逆转录反应合成 cDNA。以反应所得 cDNA 在 Myi Q 实时定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。每个标本设 3 复孔,并重复实验 3 次,根据 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算相对表达量并进行统计,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列 (5'~3')	长度 (bp)
TGF- β 1 (#66)	F:GCAACACGTAGAACTTACCAGAA	24
	R:CAGCCACTCAGGCGTATCA	19
Smad2 (#64)	F:CAAGGGTAACAATCCACACTCA	22
	R:CGGAAGAGGAAGGAACAAA	20
Smad3 (#10)	F:GGTGGTCGCTAGTTTCTCCA	20
	R:ACCCAGAGCAATATCCAG	20
Smad7 (#63)	F:AAATCCATCGGGTATCTGGA	20
	R:ACCCCATCACCTTAGTCG	19

1.2.5 Western blot 检测 HSCs 的 TGF- β 1、Smad7 蛋白及 p-Smad2/3 表达 各组细胞培养结束后用 PBS 清洗 3 遍,收集细胞提取蛋白。加入细胞裂解液裂解细胞,取总蛋白 5 μ g 行 SDS-PAGE 凝胶电泳,经 PVDF 膜转移,加入一抗 4 °C 中孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后再加入二抗孵育 1 h。显影拍照,用凝胶图像处理系统对目标带进行分析。内参采用 β -actin 进行目的蛋白 TGF- β 1、p-Smad2/3 和 Smad7 的表达分析。

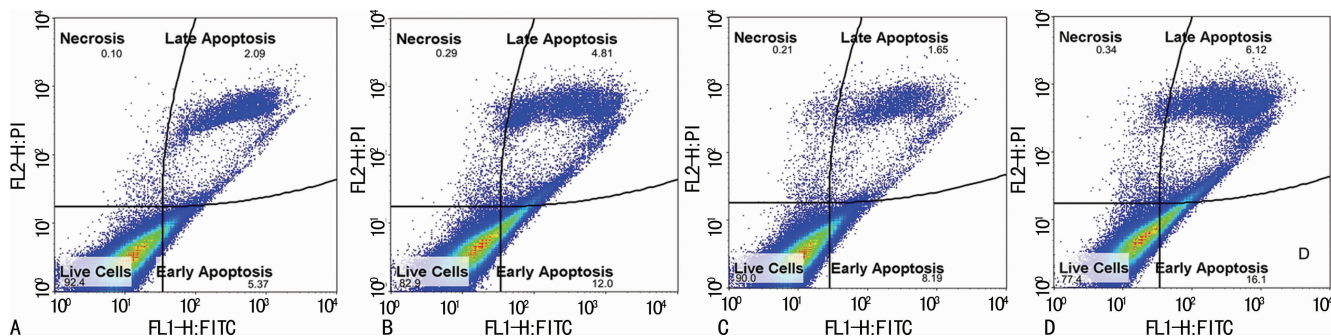
1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HSCs 凋亡率 与空白组 (7.46 \pm 1.26)% 比较,ADMSCs 组中 HSCs 凋亡率 (9.84 \pm 1.64)% 变化不明显 ($P > 0.05$),FA 组、FA+ADMSCs 中 HSCs 的凋亡率 [(16.81 \pm 1.57)、(22.22 \pm 2.31)%] 均明显升高 ($P < 0.05$)。与 FA 组、ADMSCs 组比较,FA+ADMSCs 组中 HSCs 的凋亡率均明显升高 ($P < 0.05$),见图 1。

2.2 各组 HSCs 的 TGF- β 1、Smad2、Smad3 和 Smad7 mRNA 表达 与其他 3 组比较,FA+ADMSCs 组 HSCs 的 TGF- β 1、Smad2、Smad3 mRNA 表达明显下调,Smad7 mRNA 表达明显上调 ($P < 0.05$),见图 2。

2.3 各组 HSCs 的 TGF- β 1、Smad7 蛋白及 p-Smad2/3 表达 Western blot 结果显示,与其他 3 组比较,FA+ADMSCs 组 HSCs 的 TGF- β 1 蛋白表达、



A: 空白组; B: FA 组; C: ADMSCs 组; D: FA+ADMSCs 组

图 1 各组 HSCs 流式细胞仪凋亡散点图

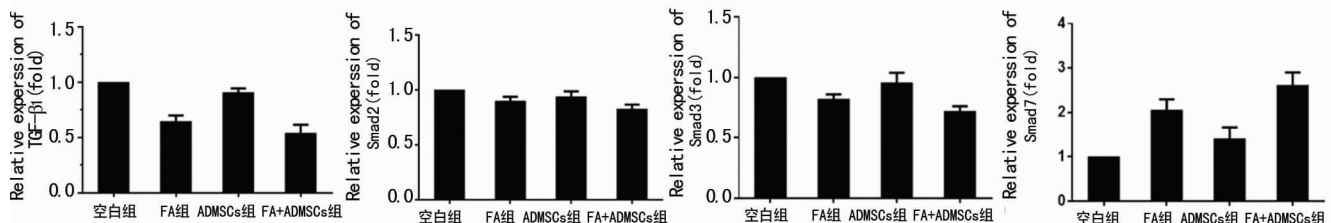


图 2 各组 HSCs 的 TGF-β1、Smad2、Smad3 和 Smad7 mRNA 表达

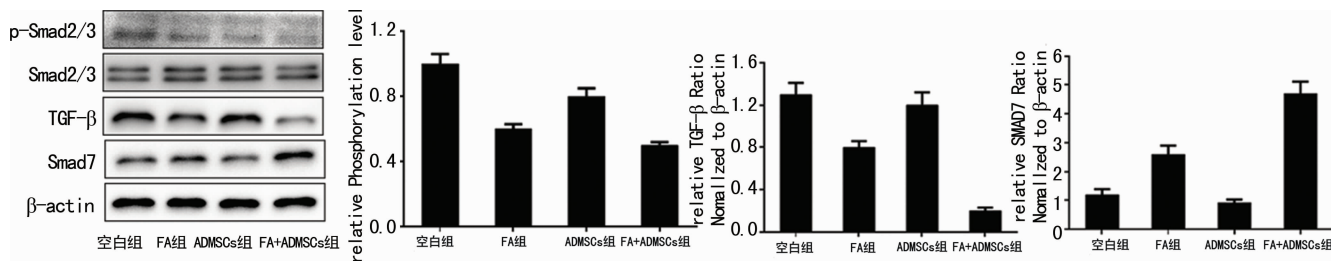


图 3 各组 HSCs 的 TGF-β1、Smad7 蛋白及 p-Smad2/3 表达

p-Smad2/3 表达明显下降, Smad7 蛋白表达呈明显升高趋势 ($P < 0.05$), 见图 3。

3 讨论

HSCs 的激活与凋亡在肝纤维化的发生与逆转中起关键作用^[1-3]。TGF-β1 主要来源于 HSCs, 在抑制肝细胞再生的同时激活更多的 HSCs, 参与和促进肝纤维化的发生、发展进程, 其主要通过 TGF-β/smad 信号转导通路对肝纤维化进行调控^[10]。TGF-β1 与胞膜表面特异受体结合后, 可激活下游的 Smads 蛋白信号通路, 其中被激活的 p-Smad2/3 与胞浆的 Smad4 结合形成复合体, 转入胞核调节 HSCs 的基因表达^[11-13]。

FA 在肾脏和心脏疾病中具有抗纤维化作用, 通过减少活性氧(ROS)和抑制脂质过氧化而具有有效的抗氧化活性, 能减轻四氯化碳造成的肝纤维化损伤^[14], 但是对 HSC 是否具有促其凋亡的作用, 且通过什么路径调控仍有待探讨。本研究显示, 在无血清条件下, FA 能促进 HSCs 的凋亡及在一定程度上降低 TGF-β1 的表达水平, 且明显抑制 HSCs 内 Smad3 mRNA、p-Smad2/3 的表达, Smad7 表达水平明显升高。提示 FA 促 HSCs 凋亡、抗肝纤维化的机制在于下调 TGF-β1 及下游 p-Smad2/3 表达的同时, Smad7

的表达可能以负反馈的方式上调, 从而拮抗由 Smad3 介导 TGF-β1 信号转导路径。

间充质干细胞分泌的多种细胞因子、生长因子可以参与调节细胞的凋亡、增殖、炎症反应等生理过程, 这些活性因子可能通过旁分泌效应抑制 HSCs 的增殖或诱导其凋亡^[6]。已有研究发现, 人来源的间充质干细胞通过 TGF-β1/Smad2 抑制上皮间质转换, 减轻纤维沉积, 从而缓解肝纤维化^[15]。也有学者报道, BMSCs 与 HSCs 共培养, 能明显降低 HSCs 的 TGF-β1 基因及蛋白表达, 上调 Smad7 基因及蛋白水平^[16]。在本实验中, ADMSCs 与 HSCs 以 1:5 的比例共培养 24 h, HSCs 的凋亡率、TGF-β1 及各种 Smad 表达无明显改变, 可能原因在于 ADMSCs 的细胞数量较少或培养时间较短, 不足以抑制 TGF-β1/Smad 信号转导通路。但当在共培养组中同时加入 FA 联合作用时, HSCs 的 p-Smad2/3、Smad3 mRNA 表达均下调, Smad7 表达上调。

有研究证明, FA 可通过激活细胞外信号调节激酶 1 和 2(ERK1/2) 的表达来抑制 HSCs 的活化^[17], ERK1/2 激活可促进间充质干细胞的增殖^[18-19]。这可以解释将 FA 加入 ADMSCs 与 HSCs 的共培养体系后, HSCs 各指标变化明显。FA 或能通过激活

ERK1/2 而促进 ADMSCs 增殖,甚至促进 AMDSCs 的旁分泌作用,进一步增强 HSCs 内 Smad7 mRNA 的负反馈性表达增加并抑制下游 p-Smad2/3 的表达,从而增强了 AMDSCs 对 HSCs 的促凋亡作用。这与本研究项目中的前期动物实验,脂肪干细胞联合 FA 移植治疗肝硬化较单一治疗效果更好的结果相一致^[20]。至于 FA 是通过影响 AMDSCs 的何种旁分泌途径来抑制 TGF- β 1/Smad 信号转导通路促进对 HSCs 凋亡的,还需在今后的实验中进一步探讨。本实验已证实,FA 联合 AMDSCs 对 HSCs 凋亡有协同促进作用,提示二者联合使用可能为临床上控制或逆转肝硬化提供新的治疗方向。

参考文献

- [1] 陶然,黄加权.肝星状细胞活化的关键路径[J].中西医结合肝病杂志,2013,23(6):375-378.
- [2] ZHANG C Y, YUAN W G, HE P, et al. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(48):10512-10522.
- [3] YOSHIDA K, MURATA M, YAMAGUCHI T A. TGF- β /Smad signaling during hepatic fibro-carcinogenesis[J]. Int J Oncol, 2014, 45(4):1363-1371.
- [4] WINKLER S, HEMPEL M, BRUECKNER S, et al. Mouse white adipose tissue-derived mesenchymal stem cells gain pericentral and periportal hepatocyte features after differentiation in vitro, which are preserved in vivo after hepatic transplantation[J]. Acta Physiol(Oxf), 2015, 215(2):89-104.
- [5] LIU W H, SONG F Q, REN L N, et al. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(3):511-520.
- [6] JANG Y O, JUN B G, BAIK S K, et al. Inhibition of hepatic stellate cells by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in hepatic fibrosis[J]. Clin Mol Hepatol, 2015, 21(2):141-149.
- [7] 杨娟,徐胜南,王敏,等.阿魏酸钠对大鼠肝纤维化的作用[J].世界华人消化杂志,2014,22(12):1676-1681.
- [8] LIU J Q, PENG L P, YANG J, et al. Sodium ferulate reduces portal pressure through inhibition of RhoA/Rho-Kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase in cirrhotic rats[J]. Dig Dis Sci, 2015, 60(7):2019-2029.
- [9] WEI L, YANG J, WANG M, et al. Sodium ferulate lowers portal pressure in rats with secondary biliary cirrhosis through the RhoA/Rho-kinase signaling pathway: A preliminary study[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(5):1257-1267.
- [10] 颜小明,张立婷,李敏,等. TGF- β 1/Smad 信号通路在肝纤维化中的研究进展[J].现代生物医学进展,2016,16(9):1778-1781.
- [11] MAO Y Q, ZHANG S R, YU F J, et al. Ghrelin attenuates liver fibrosis through regulation of TGF- β 1 expression and autophagy[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9):21911-21930.
- [12] JEE M H, HONG K Y, PARK J H, et al. New mechanism of hepatic fibrogenesis: hepatitis C virus infection induces transforming growth factor beta 1 production through glucose-regulated protein 94[J]. J Virol, 2016, 90(6):3044-3055.
- [13] PARK J H, PARK B, PARK K K. Suppression of hepatic epithelial-to-mesenchymal transition by melittin via blocking of TGF β /Smad and MAPK-JNK signaling pathways[J]. Toxins (Basel), 2017, 9(4):138.
- [14] KIM H Y, PARK J, LEE K H, et al. Ferulic acid protects against Carbon tetrachloride-induced liver injury in mice[J]. Toxicology, 2011, 282(3):104-111.
- [15] 彭雪彬.体外共培养人脐带间充质干细胞对肝星状细胞增殖的影响[D].兰州:兰州大学,2013.
- [16] ZHANG L T, FANG X Q, CHEN Q F, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit the proliferation of hepatic stellate cells by inhibiting the transforming growth factor β pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5):7227-7232.
- [17] XU T, PAN Z, DONG M, et al. Ferulic acid suppresses activation of hepatic stellate cells through ERK1/2 and Smad signaling pathways in vitro[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 93(1):49-58.
- [18] 袁琳,宋关斌,罗庆,等. ERK 信号分子介导周期机械拉伸诱导的骨髓间充质干细胞增殖[J].医用生物力学,2011,26(3):217-224.
- [19] 周浩,杨俊杰,辛婷,等. Exendin-4 通过 JNK 和 ERK 信号通路增强大鼠脂肪来源干细胞的增殖[J].现代生物医学进展,2014,14(30):5801-5805.
- [20] 岳冒易,刘广益,邹礼乐,等.阿魏酸钠对肝硬化大鼠脂肪干细胞移植存活率及治疗作用的影响[J].山东医药,2016,56(10):10-12.

(收稿日期:2017-11-04 修回日期:2018-01-12)