

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.16.010

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190614.0916.020.html(2019-06-14)

乳酸堆积对肝星状细胞增殖、分化、凋亡的影响*

孙 辉¹, 马凌波¹, 董 飞¹, 胡光荣^{1△}, 何永捍², 邓 颖¹

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院急诊科 150081; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

[摘要] **目的** 探讨乳酸堆积对肝星状细胞(HSCs)增殖、分化、凋亡的影响。**方法** 体外培养人 HSCs, 在 HSCs 中加入终浓度分别为 0(对照组)、0.5、1.0、2.0 mmol/L 的乳酸, 共同培养 72 h, 留取样本。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定乳酸对 HSCs 增殖的影响; 流式细胞仪检测乳酸对 HSCs 凋亡和细胞周期的影响; real-time PCR 检测 α -SMA 和 mRNA 凋亡基因 FasL mRNA 的表达; 免疫荧光法检测 caspase-3 的活性。**结果** MTT 实验结果表明, 低浓度乳酸(0.5、1.0、2.0 mmol/L)对 HSCs 增殖具有明显促进作用($P < 0.05$), 之后随着乳酸浓度的增加, 乳酸对 HSCs 毒性增加, 对 HSCs 增殖具有明显的抑制作用($P < 0.05$)。流式细胞仪检测结果显示, 与对照组比较, 在乳酸浓度为 0.5、1.0、2.0 mmol/L 时 HSCs 凋亡减少($P < 0.05$); 低浓度乳酸作用 72 h 可调节细胞周期, G_0/G_1 期细胞减少($P < 0.05$), S 期细胞增加($P < 0.05$)。real-time PCR 检测结果显示, 与对照组比较, 低浓度乳酸(0.5、1.0、2.0 mmol/L)可明显提高 α -SMA mRNA 的表达($P < 0.05$), 减少 FasL mRNA 的表达($P < 0.05$); 免疫荧光法检测结果显示与对照组比较, 低浓度乳酸可降低 caspase-3 活性。**结论** 低浓度乳酸可促进 HSCs 增殖, 抑制 HSCs 凋亡, 促进细胞外基质合成, 使 HSCs 向成纤维细胞分化, 增加肝纤维化风险。

[关键词] 乳酸; 肝星状细胞; 细胞增殖; 细胞分化; 细胞凋亡**[中图分类号]** R575.2+9**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)16-2743-04**Effect of lactic acid accumulation on proliferation, differentiation and apoptosis of hepatic stellate cells***SUN Hui¹, MA Lingbo¹, DONG Fei¹, HU Guangrong^{1△}, HE Yonghan², DENG Ying¹

(1. Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150081, China; 2. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of lactic acid accumulation on the proliferation, differentiation and apoptosis of hepatic stellate cells (HSCs). **Methods** The HSCs was cultured in vitro. Lactic acid with the final concentration of 0 mmol/L (control group), 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L, and 2.0 mmol/L were cultured with HSCs for 72 h. The specimens were collected for the following tests, the effect of lactic acid on HSCs proliferation was determined by MTT assay; Flow cytometry was used to detect the effect of lactic acid on apoptosis rate and cell cycle in HSCs; Real-time PCR was used to detect the expression of α -SMA mRNA and FasL mRNA; The activity of caspase-3 was detected by immunofluorescence assay. **Results** MTT assay showed that low concentration of lactic acid (0.5, 1.0, 2.0 mmol/L) significantly promoted the proliferation of HSCs ($P < 0.05$). Then, with the increase of the concentration of lactic acid, the toxicity of lactic acid on HSCs increased, and it had obvious inhibitory effect on HSCs ($P < 0.05$). The results of flow cytometry showed that, compared with the control group, the apoptosis of HSCs was decreased when the lactic acid concentration was 0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L and 2.0 mmol/L respectively ($P < 0.05$); the cell cycle was regulated by low concentration of lactic acid, the cells in G_0/G_1 phase were decreased ($P < 0.05$), and the cells in S phase were increased ($P < 0.05$). The results of real-time PCR showed that low concentration of lactic acid (0.5 mmol/L, 1.0 mmol/L, 2.0 mmol/L) could significantly stimulate the expression of the α -SMA mRNA ($P < 0.05$), and reduce the expression of FasL mRNA ($P < 0.05$) when compared with control group. Immunofluorescence assay showed that low concentration of lactic acid (0.5, 1.0, 2.0 mmol/L) decreased the activity of caspase-3 when

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541437)。 作者简介: 孙辉(1977-), 副主任医师, 博士, 主要从事急诊急救研究。 △

compared with control group. **Conclusion** Low concentration of lactate can promote the proliferation of HSCs and the synthesis of extracellular matrix, inhibit the apoptosis of HSCs, differentiate HSCs into fibroblasts, and increase the risk of liver fibrosis.

[Key words] lactic acid; hepatic stellate cells; cell proliferation; cell differentiation; apoptosis

肝纤维化是慢性肝损伤所致的病理改变,表现为肝内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分过度沉积^[1-2],并影响肝脏的功能。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝内 ECM 主要来源的 HSCs,是肝纤维化形成的细胞学基础^[3-4]的增殖、分化是肝纤维化的中心环节。肝硬化是各种慢性肝病所致肝功能受损从而影响体内糖代谢的转化^[5],导致乳酸在体内的异常堆积,使细胞生存的微环境发生改变,刺激纤维结缔组织的大量增生所致。但乳酸堆积对 HSCs 的影响尚未见文献报道。本实验采用体外培养的 HSCs 制作乳酸堆积模型,探讨乳酸堆积对 HSCs 增殖、分化和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人 HSCs(上海坤肯生物化工有限公司),反转录试剂盒(ABI Applied Biosystems 公司,美国),L-乳酸、胎牛血清(Sigma 公司,美国),TRIzol,引物(Invitrogen 公司,美国),Annexin V/PI 双染色流式法细胞凋亡检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT,上海碧云天生物技术有限公司),CO₂ 培养箱、光学显微镜、流式细胞仪、Real-time PCR 仪(Thermo 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 HSCs 的培养 HSCs 细胞接种于 25 cm² 无菌培养瓶中,加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液 5 mL,置于 37 °C、含 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,当细胞生长融合至 80%~90% 时进行实验。

1.2.2 细胞分组 把传代好的 HSCs 分为 4 组,乳酸终浓度为 0 mmol/L(对照)、0.5 mmol/L(HSCs+0.5 mmol/L 乳酸组)、1.0 mmol/L(HSCs+1.0 mmol/L 乳酸组)、2.0 mmol/L(HSCs+2.0 mmol/L 乳酸组),分别培养 72 h,其中以含 0 mmol/L 乳酸的 HSCs 为对照组。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 取生长状态良好的 HSCs,用 0.25% 胰酶消化,加入等量培养液中和胰酶并离心,弃上清液后加入 PBS,再离心后加入不同乳酸浓度的培养液制成含细胞数为 5×10^7 /L 的细胞悬液,接种于 96 孔板上,每孔 200 μ L,每组设 6 个复孔,同时设只加培养基而无细胞的空白对照孔。将各组细胞放置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养 72 h 后,加入 20 μ L MTT(5 g/L)后再培养 4 h,离心

弃上清液后加入 200 μ L 二甲基亚砜(DMSO),振荡 15 min,使用全自动酶标仪检测 490 nm 处的吸光度(A)值。HSCs 增殖抑制率(%)=(1-各实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。

1.2.4 流式细胞仪测定 HSCs 凋亡和细胞周期
HSCs 凋亡检测:把生长良好的各组细胞经消化、离心后分别调整为含细胞数为 5×10^6 /mL 的细胞悬液,各组分别取 1 mL 于离心管中,经反复离心洗涤混匀后,各组分别取 250 μ L,加入 5 μ L PI 和 10 μ L Annexin V-FITC,充分混合均匀后室温下避光孵育 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率,实验每组重复 3 次。
细胞周期检测:各组细胞培养 72 h 后用 0.25% 胰酶消化收集细胞,PBS 洗 2 遍,弃上清液,加入 1 mL 70% 预冷乙醇,吹打均匀,4 °C 过夜固定(12 h 以上)。PBS 洗涤去乙醇,1 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗 2 遍。0.5 mL PBS 重悬细胞,加入 PI 和 RNase A 至终浓度 50 μ g/mL,37 °C 温浴 30 min。用流式细胞仪测定细胞周期,实验每组重复 3 次。

1.2.5 real-time PCR 法检测 α -SMA 和 FasL mRNA

1.2.5.1 提取总 RNA 各组细胞培养 72 h 后,弃培养液,向 24 孔板中每孔加入 0.2 mL TRIzol 反复吹打后刮取裂解液分别移至灭菌的 1.5 mL EP 管中,室温下静置 5 min。每组 EP 管中加 0.2 mL 氯仿,经震荡(15 s)-静置(2 min)-离心(4 °C,13 500 × g,15 min)-上清液移管后,加入 0.5 mL 的异丙醇,再经震荡-静置(10 min)-离心(4 °C,13 500 × g,10 min)-弃上清液后,加入 1 mL 75% 乙醇,最后轻洗沉淀-离心(4 °C,10 600 × g,5 min)-弃上清-室温晾干后,加入 DEPC 水溶解并保存于冰上,待检。

1.2.5.2 逆转录合成 cDNA 先测定总 RNA 浓度。按试剂盒操作说明书操作,将 0.5 μ g 的样本 RNA、0.5 μ L RTase、0.4 μ L dNTP、1.0 μ L 10 × RT buffer、1.0 μ L 引物、7.5 μ L 双蒸水配成 10 μ L 反转录体系,上机。

1.2.5.3 real-time PCR 分析 首先在 real-time PCR 仪中进行 40 个循环(95 °C 15 s,60 °C 1 min),紧接着在 95 °C 条件下用 SYBR Green PCR Master Mix 进行变性 10 min;利用 ABI Prism® 快速 7500 型荧光定量 PCR 仪对 cDNA 进行扩增。结果用实验组目的基因相对于对照组基因变化的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。各基因 real-time PCR 引物序列见表 1。

1.2.6 caspase-3 活性检测 各组细胞培养经胰蛋白酶消化、PBS 洗涤后制备成细胞数为 1×10^6 /mL 的单细胞悬液,取 1 mL 于离心管中经离心(1 000 r/min、5 min)后弃上清液,加入 50 μ L 预冷的细胞裂解液,冰浴 10 min,再以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液后加入 5 μ L caspase-3 底物(DEVD-FC)和 50 μ L $2 \times$ 反应缓冲液/二硫苏糖醇(DTT)混合液,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴 1 h,上机待检。caspase-3 相对活性 = 实验组荧光强度/对照组荧光强度。

表 1 real-time PCR 引物序列

基因	方向	引物(5'-3')	产物大小(bp)
GAPDH	正向	CATGACCACAGTCCATGCCATC	450
	反向	CACCTGTGTGCTGTAGCCATATTC	
α -SMA	正向	AAGAGGAAGACAGCACAGCTC	101
	反向	GATGGATGGGAAAACAGCC	
FasL	正向	CCAGCCCTTCAATTACCCATATCC	68
	反向	ATCTTCCCCTCCATCATCACCAG	

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS19.0 软件进行处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 乳酸对 HSCs 增殖的影响 不同浓度乳酸培养 HSCs 72 h 后用 MTT 法检测 HSCs 的增殖能力发现,低浓度(≤ 2 mmol/L)乳酸对 HSCs 增殖具有明显促进作用($P < 0.05$),之后随着乳酸浓度的增加,乳酸对 HSCs 毒性增加,对 HSCs 生长有明显的抑制作用($P < 0.05$),见表 2。

2.2 乳酸对 HSCs 的凋亡和细胞周期的影响 不同浓度乳酸培养 HSCs 72 h 后采用流式细胞仪检测 HSCs 凋亡和细胞周期发现,在乳酸浓度为 0、0.5、1.0、2.0 mmol/L 时 HSCs 的凋亡率与对照组比较,逐渐减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);低浓度乳酸

作用 72 h 可调节细胞周期, G_0/G_1 期细胞减少,S 期细胞增加,与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

2.3 乳酸对 HSCs 的凋亡基因 FasL mRNA 的表达和 caspase-3 活性的影响 各低浓度乳酸组与对照组比较,凋亡基因 FasL mRNA 的表达明显减少($P < 0.05$),caspase-3 活性明显降低($P < 0.05$),并且其变化趋势与乳酸浓度呈剂量效应,见图 1A、B。

2.4 乳酸对 HSCs ECM 中 α -SMA mRNA 的影响 real-time PCR 检测结果显示,与对照组比较,低浓度乳酸可明显刺激细胞外基质 α -SMA mRNA 的表达($P < 0.05$),见图 1C。

表 2 乳酸对 HSCs 的抑制率($\bar{x} \pm s, n=6$)

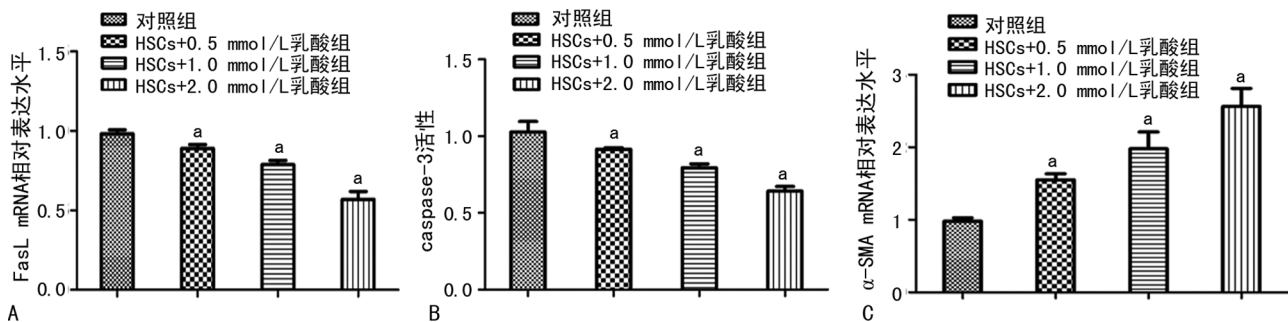
乳酸浓度(mmol/L)	A 值	增殖抑制率(%)
0(对照组)	0.90 \pm 0.21	—
0.5	0.93 \pm 0.14 ^a	-2.1
1.0	0.95 \pm 0.17 ^a	-4.4
2.0	0.96 \pm 0.31 ^a	-5.5
4.0	0.84 \pm 0.27 ^a	7.7
8.0	0.71 \pm 0.35 ^a	21.9
12.0	0.62 \pm 0.28 ^a	31.9
16.0	0.49 \pm 0.51 ^a	46.2
20.0	0.40 \pm 0.43 ^a	56.1

—:此项无数据;^a: $P < 0.05$,与对照组比较

表 3 乳酸对 HSCs 凋亡和细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

乳酸浓度(mmol/L)	凋亡率	G_0/G_1	S
0(对照组)	11.2 \pm 0.57	65.3 \pm 1.5	33.1 \pm 0.5
0.5	8.1 \pm 0.31 ^a	60.6 \pm 0.9 ^a	37.6 \pm 1.1 ^a
1.0	5.8 \pm 0.29 ^a	53.3 \pm 1.2 ^a	44.3 \pm 0.8 ^a
2.0	4.3 \pm 0.31 ^a	45.3 \pm 0.8 ^a	50.9 \pm 1.5 ^a

^a: $P < 0.05$,与对照组比较



A: FasL; B: caspase-3; C: α -SMA; ^a: $P < 0.05$,与对照组比较

图 1 乳酸对 HSCs FasL、caspase-3、 α -SMA mRNA 表达的影响

3 讨 论

各种致病因子可导致肝内基质异常地沉积、结缔组织异常增生,肝损伤在修复愈合的过程中伴有肝纤维化发生,长期的纤维化过程则会发展成肝硬化。目前对肝纤维化的研究主要集中在 HSCs 的激活、肝内基质合成和降解失衡、有关的细胞因子(如 TNF- α 、PDGF、TGF- β 等)、天然免疫和获得性免疫系统^[6-7] 等方面。而 HSCs 的激活则是肝纤维化形成的中心环节^[8-9],损伤的肝细胞释放细胞因子如 PDGF、TGF- β 等,导致 HSCs 被激活,活化的 HSCs 分泌合成 ECM 增多,并转化为成纤维细胞。 α -SMA 是 ECM 的成分之一,是 HSCs 活化的标志物^[10],若肝脏中出现 α -SMA 阳性细胞表示 HSCs 开始向肌成纤维细胞转化,促进肝纤维化的发生。

目前的研究认为激活的 HSCs 有两个去向:发生细胞凋亡^[11] 和由激活态转变回静止态^[12]。活化的 HSCs 通过发生细胞凋亡而消除,是纤维化逆转的主要机制。HSCs 凋亡主要通过死亡受体信号传导通路,当死亡因子 Fas 及其配体 FasL 结合时,启动凋亡通路,引起下游的 caspase-3 等表达,导致细胞凋亡。

本研究通过体外培养人 HSCs,加入不同浓度的乳酸培养基来模拟慢性肝病时体内乳酸堆积的情况,观察乳酸堆积对 HSCs 的影响。结果发现,低浓度(≤ 2 mmol/L)乳酸能激活 HSCs,促进其增殖,但是当乳酸浓度持续增高后,乳酸对 HSCs 的毒性增强,引起细胞凋亡。在低浓度乳酸刺激下,HSCs 由 G₀/G₁ 期进入 S 期的过程增加,导致 G₀/G₁ 期细胞减少,处于 S 期的细胞则相应增加,同时细胞的凋亡率明显减少。目前认为细胞周期有 2 个突发性的转折点:G₁ 至 S 期及 G₂ 至 M 期^[13]。因此认为,低浓度乳酸对 HSCs 的细胞周期具有重要的调控作用,使 S 期的细胞明显增加而处于增殖状态,提示低浓度乳酸对肝纤维化的作用可能是通过影响 HSCs 的增殖周期实现的。在低浓度乳酸刺激下,HSCs 分泌 α -SMA 增加,促进 HSCs 向成纤维细胞分化,进一步加重肝纤维化。在低浓度乳酸刺激下,FasL mRNA 的表达减少和 caspase-3 活性降低,故推测低浓度乳酸对 HSCs 凋亡的影响可能是通过抑制死亡受体通路的激活和降低凋亡执行蛋白 caspase-3 的活性。

总之,本研究从分子水平证实了低浓度乳酸可促进 HSCs 增殖,使细胞从静止期(G₀)进入分裂间期;促进 ECM 合成,减少细胞凋亡的死亡受体通路激活,抑制 HSCs 凋亡,使 HSCs 向成纤维细胞分化,增加肝纤维化风险。

参考文献

- PELLICORO A, RAMACHANDRAN P, IREDALE J P, et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14 (3): 181-194.
- 康玮玮,周莉,党双锁,等.肝爽颗粒治疗慢性乙型肝炎的多中心临床研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32 (12): 5689-5693.
- CHEN Y X, WENG Z H, ZHANG S L. Notch3 regulates the activation of hepatic stellate cells[J]. *World J gastroenterol*, 2012, 18(12): 1397-1403.
- SEKI N, TOH U, KAWAGUCHI K, et al. Tricin inhibits proliferation of human hepatic stellate cells in vitro by blocking tyrosine phosphorylation of PDGF receptor and its signaling pathways[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(7): 2346-2355.
- CHEN Y, CHOI S S, MICHELOTTI G A, et al. Hedgehog controls hepatic stellate cell fate by regulating metabolism[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(5): 1319-1329.
- XU R, ZHANG Z, WANG F S. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury[J]. *Cell Mol Immunol*, 2012, 9(4): 296-301.
- FRIEDMAN S L. Evolving challenges in hepatic fibrosis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(8): 425-436.
- 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.
- HERNANDEZ-GEA V, FRIEDMAN S L. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6(1): 425-456.
- ZHOU L, LIU S, HAN M, et al. miR-185 inhibits fibrogenic activation of hepatic stellate cells and prevents liver fibrosis[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 10: 91-102.
- 严栋梁,陈杰,葛创,等.川芎嗪对刀豆蛋白 A 诱导的小鼠肝纤维化 TNF- α 、IL-6、IL-10 表达的影响[J]. *中国医学创新*, 2017, 14(19): 19-22.
- BEDOSSA P, PARADIS V. Approaches for treatment of liver fibrosis in chronic hepatitis C[J]. *Clin Liver Dis*, 2003, 7(1): 195-210.
- SUBOJ P, BABYKUTTY S, SNNIVAS P, et al. Aloe emodin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via activation of caspase-6 in human colon cancer cells[J]. *Pharmacology*, 2012, 99(1/2): 91-98.