

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.005

高脂培养抑制 LPS 诱导的 HSC-T6 细胞活化*

胡彬^{1,2,3} 王赫^{2,3} 晏贤春^{2,3} 蒋芳^{2,3} 王清明^{2,3} 杨俊涛^{2,3,Δ}

(1 中南大学生物科学与技术学院 湖南 长沙 410013; 2 蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 国家蛋白质科学中心(北京), 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 102206; 3 蛋白质药物国家工程研究中心 北京 102206)

摘要 目的: 鉴定高脂培养对肝星形细胞活化的影响。**方法:** 培养 HSC-T6 细胞系, 加入含有游离脂肪酸的高脂培养基处理, 利用 LPS 处理活化, 通过检测 α -SMA 的表达分析星形细胞的活化程度, 通过 Q-PCR 分析 HSCs 细胞胶原的表达, 通过 Q-PCR 实验分析 LPS 相关通路靶基因表达情况。**结果:** 高脂培养能够抑制 LPS 诱导的 HSC-T6 细胞增殖, 降低 HSC-T6 细胞 α -SMA 和胶原 I 和 TIMP-1 表达的水平, Q-PCR 的分析表明, 高脂培养能够抑制 HSCs 活化后的 NF- κ B 通路下游靶基因 MCP-1 和 IL-6 的表达。**结论:** 在体外培养实验中, 高脂培养能够抑制 LPS 诱导的 HSC-T6 细胞活化。

关键词: 游离脂肪酸; 肝星形细胞; LPS; 肝纤维化

中图分类号: Q593.1, R575.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)08-1420-03

The Fat Culture Inhabited LPS-Induced Activation of HSCs-T6 Cells*

HU Bin^{1,2,3}, WANG He^{2,3}, YAN Xian-chun^{2,3}, JIANG Fang^{2,3}, WANG Qing-ming^{2,3}, YANG Jun-tao^{2,3,Δ}

(School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha, Hunan, 410013, China;

2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences Beijing, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing, 102206, China; 3 National Engineering Research Center for Protein Drugs, Beijing, 102206, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of high-fat medium on the activation of hepatic stellate cells. **Methods:** HSC-T6 cell line was cultured, and treated with high-fat medium which containing free fatty acid, activated with LPS. The degree of activation was analyzed by detecting α -SMA expression. The expression of collagen-I and TIMP-1 was analyzed by Q-PCR, and the activation of transcription factor which related to LPS pathway was analyzed by Q-PCR assay. **Results:** High-fat medium was able to inhibit the activation of HSC-T6 cells which induced by LPS, reduced the expression of collagen level in the HSC-T6 cells. Q-PCR analysis showed that the high-fat medium inhibited the expression of MCP-1 and IL-6 which were the target genes of NF- κ B in activated HSCs. **Conclusion:** In vitro culture experiments, high-fat medium can inhibit the activation of HSC-T6 cells which induced by LPS.

Key words: Free fatty acids; HSC-T6; LPS; Liver fibrosis

Chinese Library Classification(CLC): Q593.1, R575.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1420-03

前言

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是各种慢性肝病导致的肝脏持续损伤, 细胞外基质蛋白长期积累而形成的一种肝脏病理状态, 肝纤维化是所有慢性肝损伤的一种病理过程, 最终的结果是逐步形成肝硬化^[1]。肝纤维化的病因多样, 病毒感染、化学损伤、酒精和脂肪性肝炎就能够诱导肝脏损伤, 持续慢性化就会发展为肝纤维化^[2]。大量研究表明, 肝纤维化是逆的^[3,4]。当损伤因素消失时, 如清除病毒感染等致病因素, 肝脏能够逐渐的进行自我修复, 包括疤痕溶解、组织结构重新形成等。在细胞生物学上, 肝脏纤维化的形成和恢复是一个多细胞参与的过程。但是, 最重要的参与细胞是肝脏星形细胞^[5]。肝脏星形细胞是一种储脂细胞, 在其活化的过程中, 脂肪逐渐消失, 促纤维化基因的

表达逐渐增加^[6]。在肝纤维化恢复的过程中, 活化的肝星形细胞的表型逆转目前被认为是一种可能的细胞生物学机制^[7]。

但在体外, 高脂培养对活化的肝脏星形细胞的作用尚不清楚。内毒素(LPS)是一种星形细胞的活化剂, 能够诱导星形细胞活化, 增强星形细胞的增殖能力, 并促进促纤维化基因的表达^[8]。因此, 本研究拟通过体外添加高脂培养基, 观测高脂培养后, 检测 LPS 诱导的星形细胞系 HSC-T6 细胞系的活化指标, 分析高脂培养对星形细胞活化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

HSC-T6 细胞由本室保存, LPS 购自 SIGMA 公司, Trizol-NA 提取试剂, 油酸和软脂酸(购自 Sigma 公司), DMEM 培养

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31000405); 国家高技术研究发展计划(2012AA020201);

重大科学仪器研究专项(2013YQ140405); 国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项(2013ZX10002009-001)

作者简介: 胡彬(1985-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 肝脏疾病的分子机制研究, E-mail: binbin03080426@163.com

Δ 通讯作者: 杨俊涛, E-mail: superyjt79@163.com

(收稿日期: 2013-09-15 接受日期: 2013-10-01)

基(Hyclone),高脂培养基按参考文献配置。Q-PCR 引物由北京奥科公司合成,报告基因检测试剂购自 Promega 公司,SYGR-PCR 试剂购自 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 高脂培养及 LPS 处理 HSC-T6 细胞 HSC-T6 细胞复苏后,持续培养,培养至 5 天,6 孔培养板中加入含有高脂培养基(50-200 μ M)的 DMEM 培养基,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,加入 LPS,处理 48h 后,加入 MTX 继续培养 4h,进行增殖检测。

1.2.2 Western 检测 HSC-T6 细胞经过高脂培养和 LPS 处理后,用胰酶消化贴壁细胞,并收集至备用的细胞培养液中。600 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟收集细胞,加入 RIPA 裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 15 分钟。4 $^{\circ}$ C 16 000-20 000 $\times$ g 离心 10-15 分钟。测定上清蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 电泳并进行转印及抗体孵育检测。

1.2.3 Q-PCR 检测 HSC-T6 细胞经过高脂培养及 LPS 处理 24h 后,提取 HSC-T6 细胞的总 RNA,反转录试剂盒合成 cDNA,以此为模板利用实时定量 PCR 试剂,检测活化相关的各基因表达情况。各基因引物如下:collagen-I (gene ID:29393):上游 5-agacctggcagagaggagt3;下游 5-atccagaccgtgtgtctctc-3。TIMP-1 (gene ID:116510):上游 5-atgctcaaaggattcgacgc-3;下游 5-ccacagccagcactataggt-3。MCP-1 (gene ID:24770):上游 5-tgctgtactactcattcactggcaa-3;下游 5-gtttctgatctcacttggtctgg-3。IL-6 (gene ID:24498):上游 5-ccggagaggagacttcacag-3;下游 5-acagtgcattcatcgctgttc-3。GAPDH (gene ID:24383):上游 5-ctaccacggcgaagttcaac-3;下游 5-tactcagcaccagcatcacc-3)。

2 结果

2.1 高脂培养抑制 LPS 诱导 HSC-T6 的细胞增殖

肝纤维化形成和恢复的可能机制为肝星形细胞在储脂和活化之间进行的细胞生物学转换^[9]。本研究利用高脂培养基处理 HSC-T6 细胞,并利用 LPS 诱导活化。活化的肝星形细胞会发生增殖^[10],但是,我们发现,经过高脂培养基处理的 HSC-T6 细胞,LPS 刺激后,细胞增殖受到了抑制(图 1),且呈现出剂量依赖性。这表明,高脂培养会使活化的 HSC-T6 细胞增殖降低。

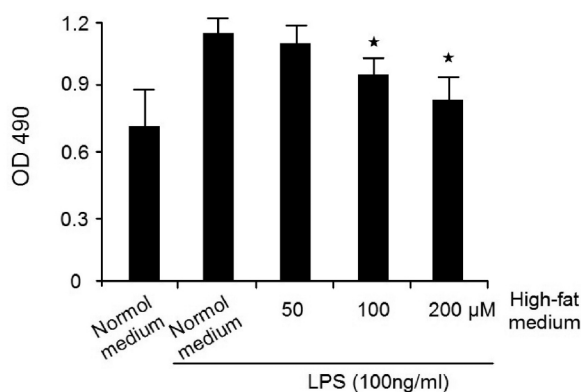


图 1 高脂培养能够抑制 LPS 活化的 HSC-T6 细胞的增殖(P<0.05)

Fig.1 High-fat medium can inhibit the proliferation of activated HSC-T6 cells(P<0.05)

2.2 高脂培养抑制了 HSC-T6 细胞的活化基因的表达

为进一步确证高脂培养基对 HSC-T6 细胞活化的影响,本研究通过 western 实验检测了 LPS 处理后 HSC-T6 细胞 α -SMA 的表达。结果显示,与对照组相比,高脂培养基处理后 HSC-T6 细胞 α -SMA 的表达降低(图 2)。这表明,高脂培养能够抑制 HSC-T6 的活化。进一步,我们通过 Q-PCR 检测 HSC-T6 细胞活化相关靶基因的表达。结果显示,高脂培养能够下降 HSC-T6 细胞活化相关基因如 collagen-I 和 TIMP-1 的表达(图 3)。以上结果表明,高脂培养可以抑制 LPS 诱导的 HSC-T6 细胞活化。

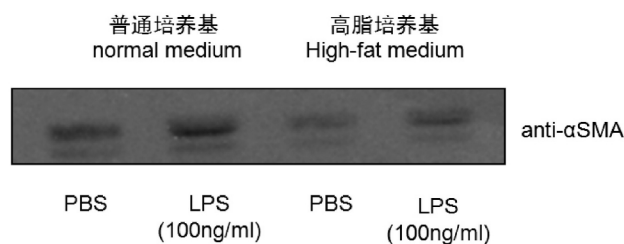


图 2 高脂培养能够抑制 LPS 活化的 HSC-T6 细胞 α -SMA 的表达

Fig.2 High-fat medium inhibited the expression of α -SMA induced by LPS in HSC-T6 cells

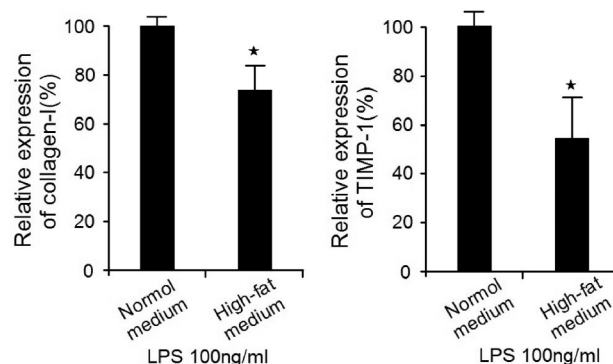


图 3 高脂培养能够抑制 LPS 活化的 HSC-T6 细胞 collagen-I 和 TIMP-1 的表达(P<0.05)

Fig.3 High-fat medium inhibited the expression of collagen-I and TIMP-1 induced by LPS in HSC-T6 cells(P<0.05)

2.3 高脂培养抑制 LPS 诱导 HSC-T6 细胞 NF- κ B 通路下游靶基因 MCP-1 和 IL-6 的表达

为进一步分析高脂培养抑制 HSC-T6 细胞活化的分子机制,本研究分析了 HSC-T6 细胞内 NF- κ B 通路下游靶基因 MCP-1 和 IL-6 的表达。我们可以看到,相比未处理的 HSC-T6 细胞组,高脂培养处理后的 HSC-T6 细胞中 MCP-1 和 IL-6 表达下调(图 4)。MCP-1 和 IL-6 的表达下调显示 HSC-T6 细胞内 NF- κ B 通路活性下降,这表明体外高脂培养能够在 HSC-T6 细胞中抑制 LPS 诱导的 NF- κ B 通路活化。

3 讨论

肝星状细胞(HSCs)是肝脏的一种非实质细胞,其位于 Disse 隙内,围绕在肝窦周围,具有摄取和储存维生素 A 的功能^[11]。活化的肝星形细胞能够发生一系列变化,促进细胞因子的

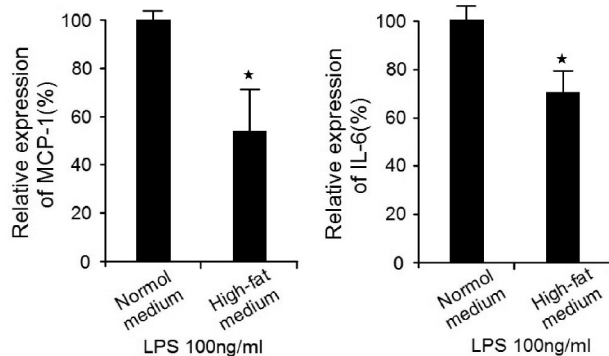


图4 高脂培养处理能够抑制 LPS 诱导的 HSC-T6 细胞内 NF- κ B 通路靶基因 MCP-1 和 IL-6 的表达 ($P < 0.05$)

Fig.4 High-fat medium decreased the expression of MCP-1 and IL-6 (target gene of NF- κ B pathway) in HSC-T6 cells induced by LPS ($P < 0.05$)

释放,使基质合成显著增加,造成细胞外基质的大量累积而形成肝纤维化^[12]。肝星形细胞的活化是肝纤维化形成的始动环节,活化的 HSCs 表达大量的 α -SMA^[13]。在肝纤维化恢复后,肝脏内的星形细胞还是以储脂状态存在。这其中的细胞生物学机制有可能是活化的星形细胞凋亡,又或者是活化的星形细胞重新恢复和非活化表型^[14]。但是,目前对其中具体机制仍不清楚。

本研究首先检测了在高脂培养的情况下,星形细胞对 LPS 刺激的增殖反映情况,结果显示,高脂培养的星形细胞接受 LPS 刺激后,增殖能力下降。同时,western blot 检测表明 α -SMA 的表达情况也下降。 α -SMA 是星形细胞活化的标志,高脂培养能够降低 α -SMA 的表达,从而可以说明其能够降低肝星形细胞的活化程度,或者说抑制肝星形细胞的活化。

LPS 激活的 HSCs 合成大量的 ECM^[15],其中 I 型胶原为主要组成成分^[16]。高脂培养能够抑制 HSC-T6 的 collagen-I 的表达。此外,在转录水平上,通过 Realtime-PCR 检测了 NF- κ B 通路下游靶基因 MCP-1 和 IL-6 的表达,结果显示高脂培养能够抑制 MCP-1 和 IL-6 的表达。综上,我们的结果显示高脂培养能够抑制 LPS 诱导的 HSC-T6 细胞活化。

近年来,肝纤维化的分子生物学机制的研究已经取得了较大的进展,各国科学家从肝纤维化发生发展的各个环节入手已经研究了不少抗肝纤维化药物^[17-20],丰富的临床和基础研究领域也已经提供了一些新的治疗手段,但目前临床应用中还无理想的抗肝纤维化药物,因此,我们希望在促肝纤维化恢复的领域加强研究,力争取得新的突破。

参考文献(References)

- [1] Wells RG. Mechanisms of liver fibrosis: new insights into an old problem[J]. Elsevier Journal, 2006, 3(4): 489-495
- [2] Giuseppe P. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2000, 21(3): 49-98
- [3] Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis: Fact or fantasy [J]. Hepatology, 2006, 43(2-1): S82-S88

- [4] Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible[J]. Gut, 2000, 46(4): 443-446
- [5] Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (4): 2247-2250
- [6] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis [J]. J Clin Invest, 2005, 115(4): 209-218
- [7] Kisseleva T, Cong M, Paik YH, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(24): 9448-53
- [8] Bernd S, Katharina B, Marina F, et al. A TLR4/MD2 fusion protein inhibits LPS-induced pro-inflammatory signaling in hepatic stellate cells [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 2008, 375(2): 210-214
- [9] Matthew LC, Rahman TM, Sanjeev K. Proteomic approaches in the search for biomarkers of liver fibrosis [J]. Trends in Molecular Medicine, 2010, 16(4): 171-183
- [10] Friedman SL. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications[J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2004, 1(2): 98-105
- [11] Kordes C, Sawitz A, Haussinger D. Hepatic and pancreatic stellate cells in focus[J]. J Biol Chem, 2009, 390(10): 1003-1012
- [12] Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in liver fibrosis[J]. Clin Liver Dis, 2008, 12(4): 759-768
- [13] Sun WY, Song Y, Hu SS, et al. Depletion of β -arrestin2 in hepatic stellate cells reduces cell proliferation via ERK pathway[J]. Journal of cellular biochemistry, 2012, 114(5): 1153-1162
- [14] Zhao YZ, Kim J Y, Park EJ, et al. Tetrastine induces apoptosis in Hepatic stellate cells[J]. Phytother Res, 2004, 18(4): 306-309
- [15] Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, et al. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis [J]. Int J Bio -chem Cell Biol, 2009, 41(11): 2089-2093
- [16] Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver [J]. Biochem Cell Biol, 2009, 41(8-9): 1639-1642
- [17] Bansal R, Prakash J, Post E, et al. Novel Engineered Targeted Interferon-gamma Blocks Hepatic Fibrogenesis in Mice [J]. Hepatology, 2011, 54(2): 586-596
- [18] Xia JR, Liu NF, Zhu NX. Specific siRNA targeting the receptor for advanced glycation end products inhibits experimental hepatic fibrosis in rats[J]. Int. J. Mol. Sci, 2008, 9(4): 638-661
- [19] Li J, Liu P, Zhang RX, et al. Icaritin induces cell death in activated hepatic stellate cells through mitochondrial activated apoptosis and ameliorates the development of liver fibrosis in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 137: 714-723
- [20] Giuseppe D, Daniela CA, Giovanna M, et al. Garlic extract prevents CCl4-induced liver fibrosis in rats: The role of tissue transglutaminase [J]. Digestive and Disease, 2010, 42(8): 571-577