

木犀草素对肝星状细胞迁移和增殖的影响^Δ

李 婕^{1,2*}, 李星霞¹, 霍 炎¹, 杨全军¹, 郭 澄^{1,2#}(1.上海交通大学附属第六人民医院药剂科, 上海 200233; 2. 上海交通大学药学院, 上海 200240)

中图分类号 R965;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0580-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.02

摘要 目的:研究木犀草素对肝星状细胞迁移的影响。方法:体外培养肝星状T6(HSC-T6)细胞,细胞计数Kit8(CCK-8)法检测0、10、20、40 μmol/L木犀草素对HSC-T6细胞增殖的影响;通过划痕实验、Transwell实验观察0、10、20、40 μmol/L木犀草素对HSC-T6细胞迁移能力的影响;蛋白印迹法检测木犀草素对细胞外信号调节激酶(ERK)5蛋白磷酸化水平的影响。结果:20、40 μmol/L木犀草素能明显抑制HSC-T6细胞的增殖($P<0.05$);10、20、40 μmol/L木犀草素能明显抑制HSC-T6细胞划痕的修复($P<0.05$);10、20、40 μmol/L木犀草素能明显抑制HSC-T6细胞穿膜($P<0.05$);10、20、40 μmol/L木犀草素能明显抑制细胞中由血清诱导的去磷酸化(p)-ERK5表达($P<0.05$)。结论:木犀草素呈浓度依赖性抑制HSC-T6细胞的增殖和迁移,其机制可能与抑制ERK5蛋白磷酸化水平有关。

关键词 木犀草素;肝星状细胞;迁移;细胞外信号调节激酶5

Effects of Luteolin on the Migration and Proliferation of Hepatic Stellate Cells

LI Jie^{1,2}, LI Xing-xia¹, HUO Yan¹, YANG Quan-jun¹, GUO Cheng^{1,2}(1.Dept. of Pharmacy, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China; 2.School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of luteolin on the migration of hepatic stellate cells cell line (HSC-T6 cells). METHODS: HSC-T6 cells were cultured in vitro. CCK-8 assay was used to measure the effects of 0, 10, 20, 40 μmol/L luteolin on the proliferation of HSC-T6 cells; Scratch test and Transwell metastasis experiment were applied to observe the effects of 0, 10, 20, 40 μmol/L luteolin on the migration ability of HSC-T6 cells; phosphorylation level of ERK5 was detected by Western blot. RESULTS: 20, 40 μmol/L luteolin could significantly inhibit the proliferation of HSC-T6 cells($P<0.05$); 10, 20, 40 μmol/L luteolin inhibited scratch repair of HSC-T6 cells significantly and decreased the number of HSC-T6 cells passing through cell membrane ($P<0.05$); the expression of p-ERK5 in HSC-T6 cells was inhibited by 10, 20, 40 μmol/L luteolin significantly($P<0.05$). CONCLUSIONS: Luteolin inhibit the proliferation and migration of HSC-T6 cells in dose-dependent manner, which may be associated with the inhibition of ERK5 phosphorylation in HSC-T6 cells.

KEYWORDS Luteolin; Hepatic stellate cells; Migration; ERK5

- 版.北京:中国医药科技出版社,2010:43.
- [2] 宗玉英,党合群,骆桂法,等.110种藏药抗肿瘤体外筛选实验研究[J].药学实践杂志,2000,18(5):290.
- [3] Kong Y, Xiao JJ, Meng SC, *et al.* A new cytotoxic flavonoid from the fruit of *Sinopodophyllum hexandrum* [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(5):367.
- [4] 尚明英,孔越,肖军军,等.一种异戊烯基黄酮及其应用:中国,101648934[P].2011-05-11.
- [5] 吴凯南,钟晓刚,马双慰,等.槲皮素对人乳腺癌裸鼠移植瘤的抑制作用及其对血管生成的影响[J].中国肿瘤临床,2003,30(6):434.
- [6] 赵益,孙有智,陈奇,等.肿节风注射液对裸鼠人胃癌SGC-7901移植瘤的抑制及诱导细胞凋亡作用研究[J].中国药房,2009,20(6):412.
- [7] Yadegarynia S, Pham A, Ng A, *et al.* Profiling flavonoid cytotoxicity in human breast cancer cell lines: determination of structure-function relationships [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(10):1 295.
- [8] 丛琳,秦占芬,周景明,等.植物雌激素对动物和人体健康的影响[J].环境与健康杂志,2006,23(2):176.
- [9] 尚明英,王庆辉,蔡少青,等.黄酮类化合物的抗乳腺癌用途:中国,102335165[P].2012-02-01.
- [10] Pedro M, lourenco CF, Cidade H, *et al.* Effects of natural prenylated flavones in the phenotypical ER(+)MCF-7 and ER(-)MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. *Toxicol Lett*, 2006, 164(1):24.
- [11] Li SZ, Li K, Zhang JH, *et al.* The effect of quercetin on doxorubicin cytotoxicity in human breast cancer cells [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(2):352.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81072687);上海市第六人民医院院级科研基金

* 博士研究生。研究方向:分子药理。E-mail:lijieliqing@163.com

通信作者:主任药师,教授,博士研究生导师。研究方向:中药学。电话:021-24058098。E-mail:gboss@126.com

(收稿日期:2013-05-25 修回日期:2013-06-31)

肝纤维化治疗效果差,重则演变为肝硬化、门脉高压症和肝癌,预后极其不良。因此,早期防治肝纤维化,避免慢性肝病发展为肝硬化或终末期肝病,具有重要的临床意义^[1-2]。肝星状细胞(Hepatic stellate cells, HSCs)是产生细胞外基质(ECM)的中心细胞,在肝纤维化过程中发挥着关键的作用^[3]。HSCs已经成为肝纤维化研究和防治的重点^[4]。木犀草素是一种天然四羟基黄酮化合物,化学名为3',4',5,7-四羟基黄酮(3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone),它具有多种药理活性,如抗炎、抗肿瘤、抗过敏、抗菌、抗病毒等^[5-7]。近年来,有研究报道木犀草素对四氯化碳(CCl₄)所致的小鼠肝毒性具有保护作用^[8],但具体的机制并未阐明。本研究旨在观察木犀草素对大鼠肝星状T6(HSC-T6)细胞体外迁移及黏附能力的影响,并探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 仪器

超净工作台(苏州艾可林净化设备有限公司);CO₂培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);硝酸纤维素膜电转系统(美国 BioRad 公司);IX71 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);Odyssey 红外荧光扫描成像系统(美国 LI-COR 公司)。

1.2 药品与试剂

木犀草素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111520-200201);DMEM 完全培养基、胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH30243.01B、SV300087.02);细胞外信号调节激酶 5(ERK5,批号:3371)、磷酸化(p-)ERK5 抗体(批号:3372)均购自美国 CST 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号:sc-25778);IRDyeTM 800 荧光二抗(美国 LI-COR 公司);硝酸纤维素膜(美国 Pall 公司);Transwell 小室(美国 BD 公司)。

1.3 细胞

大鼠 HSC-T6 细胞由 Mount Sinai School of Medicine Friedman 教授赠送。

2 方法

2.1 细胞培养

将 HSC-T6 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,每 3 天换液,当细胞融合密度到 80%~90% 时传代,细胞进入对数生长期后开始实验。

2.2 细胞增殖检测

将 HSC-T6 细胞接种于 96 孔板,每孔 4 000 个,细胞贴壁后分别加入 0、10、20、40 μmol/L 木犀草素处理,培养 48 h 后每孔加入 10 μl 的 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磷酸苯)-2H-四唑单钠盐(CCK-8)试剂,继续培养 1 h 后用酶标仪于 440 nm 波长处测定各孔的光密度(OD)值。OD 值越高,说明活细胞数越多。

2.3 细胞划痕实验

将 HSC-T6 细胞接种于 12 孔培养板,待细胞长至 90% 密度时更换为不含血清的 DMEM 培养基,饥饿过夜后划痕,PBS 洗 2 遍,分别加入含 0、10、20、40 μmol/L 木犀草素的 DMEM 完全培养基,不同时间显微镜下观察划痕的修复情况。结果以培养 30 h 后 HSC-T6 细胞覆盖区域占起始划痕面积的百分比(划痕修复率)表示。

2.4 Transwell 实验

滤膜孔径为 8 μm 的 Transwell 小室下室中分别加入 0.5 ml 含 0、10、20、40 μmol/L 木犀草素的 DMEM 完全培养基,取对数生长期的 HSC-T6 细胞消化,用 DMEM 培养基调整成细胞浓度为 1×10⁶ ml⁻¹ 的单细胞悬液,加入 0.2 ml 于上室,培养 24 h 后取出滤膜,棉签拭去上室滤膜内表面残存细胞,PBS 洗涤,结晶紫染色,显微镜下计数,每张滤膜随机取 5 个视野计穿膜细胞数并取均值。结果以穿膜的细胞占总细胞数的百分比表示。

2.5 木犀草素对 p-ERK5 蛋白表达的影响

将 HSC-T6 细胞接种于 6 孔板,细胞饥饿过夜,分别加入 0、10、20、40 μmol/L 木犀草素处理 2 h 后加入 10% 胎牛血清刺激 30 min,再加入适量的蛋白裂解液,于冰上裂解细胞提取总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。依次进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭,加入 p-ERK5、ERK5 和 GAPDH 一抗,4 °C 孵育过夜,加入 IRDyeTM 800 荧光二抗孵育 1 h,Odyssey 红外荧光扫描成像系统扫描印迹。

2.6 统计学方法

各组数据采用 SPSS 17.0 软件分析,各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以 LSD 法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 木犀草素对 HSC-T6 细胞增殖的影响

与 0 μmol/L 木犀草素组比较,20、40 μmol/L 木犀草素组 OD 值降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 20、40 μmol/L 木犀草素能明显抑制 HSC-T6 细胞的增殖。木犀草素对 HSC-T6 细胞增殖的影响见表 1。

表 1 木犀草素对 HSC-T6 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effect of luteolin on the proliferation of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度, μmol/L	OD	浓度, μmol/L	OD
0	1.151 ± 0.082	20	0.866 ± 0.061*
10	0.990 ± 0.030	40	0.720 ± 0.039*

与 0 μmol/L 组比较: * $P < 0.05$

vs. 0 μmol/L group: * $P < 0.05$

3.2 木犀草素对 HSC-T6 细胞划痕修复的影响

划痕 30 h 后,0 μmol/L 木犀草素组划痕已完全修复,而 10、20、40 μmol/L 木犀草素组明显抑制了可见划痕,表明木犀草素可抑制细胞划痕的修复。木犀草素对 HSC-T6 细胞划痕修复的影响见表 2。

表 2 木犀草素对 HSC-T6 细胞划痕修复的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effect of luteolin on the scratch repair of HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度, μmol/L	划痕修复率, %	浓度, μmol/L	划痕修复率, %
0	100.00 ± 0.21	20	68.10 ± 2.59*
10	85.92 ± 0.73*	40	30.44 ± 3.99*

与 0 μmol/L 组比较: * $P < 0.05$

vs. 0 μmol/L group: * $P < 0.05$

3.3 木犀草素对 Transwell 实验的影响

10、20、40 μmol/L 木犀草素组细胞穿膜百分比分别为(67.96 ± 8.15)%、(43.24 ± 6.40)%、(17.91 ± 7.06)%、与 0 μmol/L

木犀草素组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。木犀草素对HSC-T6细胞穿膜的影响见表3。

表3 木犀草素对HSC-T6细胞穿膜的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effect of luteolin on HSC-T6 cells passing through cell membrane($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度, $\mu\text{mol/L}$	细胞穿膜百分比, %	浓度, $\mu\text{mol/L}$	细胞穿膜百分比, %
0	100.00 \pm 6.23	20	43.24 \pm 6.40*
10	67.96 \pm 8.15*	40	17.91 \pm 7.06*

与0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: * $P < 0.05$

vs. 0 $\mu\text{mol/L}$ group: * $P < 0.05$

3.4 木犀草素对p-ERK5蛋白表达的影响

10%胎牛血清刺激30 min后,p-ERK5的表达量明显增加,与胎牛血清对照组比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素组细胞中p-ERK5的表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);而ERK5蛋白表达无明显变化。p-ERK5蛋白的表达见图1。

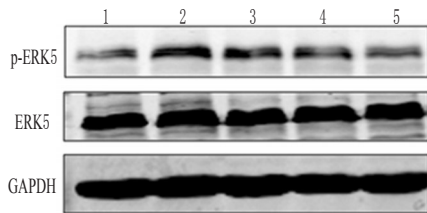


图1 p-ERK5蛋白的表达

1.空白对照;2.胎牛血清对照;3. 10 $\mu\text{mol/L}$;4.20 $\mu\text{mol/L}$;5.40 $\mu\text{mol/L}$

Fig 1 Expression of p-ERK5 protein

1. blank control; 2. FBS control; 3. 10 $\mu\text{mol/L}$; 4. 20 $\mu\text{mol/L}$; 5. 40 $\mu\text{mol/L}$

4 讨论

近年的研究表明,HSCs从Disse间隙移行至肝损伤部位是肝纤维化发生、发展的关键事件。在促肝纤维化因子等刺激下活化的HSCs移行至肝损伤部位,大量聚积,导致损伤部位活化的HSCs数量增加,产生大量的ECM,并最终形成肝纤维化^[9]。因此,本研究探讨了木犀草素对HSCs迁移能力的影响,结果发现木犀草素能抑制HSCs的增殖和迁移,并随剂量的增加,抑制作用增强,提示木犀草素可通过抑制HSCs而抗肝纤维化。

ERK5是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族中最晚发现的信号转导通路^[10]。其可被高糖、低氧、血流切应力、活性氧簇(ROS)、渗透压以及各种丝裂原,如内皮生长因子、神经生长因子等激活^[11]。与其他MAPK通路一样,刺激因子首先激活上游的MAPKKK(MEKK3/MEKK2),然后依次激活MAPKK(MEK5)、ERK5。p-ERK5进入核内,作用于下游底物Myocyte enhancing factor-2C(MEF2C)、转录激活因子(AP-1)、环磷酸腺苷(cAMP)应答元件结合蛋白(Camp responds element binding protein, CREB)、核糖体蛋白S6(Ribosomal protein S6, rpS6)等而调控相关基因的转录。ERK5/MAPK通路对于细胞生存、增殖、分化起着极其重要的作用^[12-13]。Rovida E等^[14]报道ERK5可正向调节血小板衍生因子(PDGF)诱导的人HSC细胞的增殖和迁移;Marchetti A等^[15]报道ERK5有助于转化生长因子(TGF- β)诱导肝细胞Snail的稳定表达,可能参与TGF- β 诱导肝细胞Epithelial-mesenchymal transition(EMT)的过程。本实验研究结果显示,在血清的刺激下,HSC-T6细胞中ERK5被激活,磷酸化水平增加,而木犀草素能够抑制由血清诱导的ERK5的激活,提示木犀草素可能通过抑制ERK5的磷酸化来

发挥功能,从而抑制HSC-T6细胞的增殖和迁移。

综上所述,本实验首次通过体外细胞模型观察到木犀草素能够抑制HSCs的迁移,抑制ERK5的激活是其可能的作用机制之一,为进一步明确其作用机制提供了理论基础,为抗肝纤维化新药的研发提供了有益的探索。

参考文献

- [1] Ghiassi-Nejad Z, Friedman SL. Advances in antifibrotic therapy[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2008, 2(6):803.
- [2] Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25(2):195.
- [3] Li JT, Liao ZX, Ping J, et al. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies[J]. *J Gastroenterol*, 2008, 43(6):419.
- [4] Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis[J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(3):437.
- [5] 李星霞,郭澄.木犀草素的药理活性研究[J]. *中国药房*, 2007, 18(18):1421.
- [6] Lopez-Lazaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2009, 9(1):31.
- [7] Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin[J]. *Planta Med*, 2008, 74(14):1667.
- [8] Domitrovic R, Jakovac H, Tomac J, et al. Liver fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride and its reversion by luteolin[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 241(3):311.
- [9] Novo E, Busletta C, Bonzo LV, et al. Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow-derived hepatic pro-fibrogenic cells[J]. *J Hepatol*, 2011, 54(5):964.
- [10] Nishimoto S, Nishida E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2[J]. *EMBO Rep*, 2006, 7(8):782.
- [11] Drew BA, Burow ME, Beckman BS. MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825(1):37.
- [12] Kato Y, Tapping RI, Huang S, et al. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor[J]. *Nature*, 1998, 395(6703):713.
- [13] Gírio A, Montero JC, Pandiella A, et al. Erk5 is activated and acts as a survival factor in mitosis[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(9):1964.
- [14] Rovida E, Navari N, Caligiuri A, et al. ERK5 differentially regulates PDGF-induced proliferation and migration of hepatic stellate cells[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(1):107.
- [15] Marchetti A, Colletti M, Cozzolino AM, et al. ERK5/MAPK is activated by TGFbeta in hepatocytes and required for the GSK-3beta-mediated Snail protein stabilization[J]. *Cell Signal*, 2008, 20(11):2113.

(收稿日期:2013-11-06 修回日期:2013-12-18)