

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2017.09.04

奥曲肽对人肝纤维化进程的调控及相关分子机制研究

蒋亚玲¹, 周 贤², 刘 蔚¹, 杨伟兴¹, 冯 雯¹, 葛 英³

¹ 西南医科大学附属中医院 脾胃科, 四川 泸州, 646000;

² 西南医科大学附属第一医院 消化内科, 四川 泸州, 646000;

³ 绵阳市人民医院 神经内科, 四川 绵阳 621000)

摘要:[目的]:通过探讨奥曲肽干预人肝星状细胞株 LX-2 后的细胞增殖和凋亡情况以及 STAT3、SOCS3 的表达水平,进一步研究奥曲肽对人肝纤维化进程可能的调控机制。[方法]体外培养 LX-2,使用不同浓度的奥曲肽(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} mmol/L)作用于 LX-2 24 h 后,采用 MTT 法和 TUNEL 荧光法分别检测 LX-2 的增殖和凋亡情况,采用免疫细胞化学法检测 STAT3、SOCS3 蛋白水平的表达,采用 RT-PCR 法检测 STAT3 和 SOCS3 mRNA 水平的表达。[结果]奥曲肽可以降低 LX-2 的增殖速度,并促进其凋亡;同时,奥曲肽能够下调 STAT3、SOCS3 在蛋白及 mRNA 水平的表达。[结论]奥曲肽可以通过抑制 LX-2 增殖、促进其凋亡从而延缓肝纤维化进展,并且该作用可能是通过抑制 STAT3、SOCS3 的表达实现的。

关键词:奥曲肽;人肝星状细胞;增殖;凋亡;STAT3;SOCS3

中图分类号:R575 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-038X(2017)09-656-05

Study on the regulation and molecular mechanism of octreotide on human liver fibrosis

JIANG Ya-ling¹, ZHOU Xian², LIU Wei¹, YANG Wei-xing¹, FENG Wen¹, GE Ying³

(¹Department of Gastroenterology, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinan Medical University, Luzhou 646000, China; ²Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Xinan Medical University, Luzhou 646000, China; ³Department of Neurology, People's Hospital in Mianyang, Mianyang 621000, China)

Corresponding author: ZHOU Xian, E-Mail: zhouxian68@163.com

Abstract: [Objective] To study the effect of octreotide on proliferation, apoptosis and the expression level of STAT3 and SOCS3 in hepatic stellate cells LX-2, further to discuss the possible regulation mechanism of octreotide on human hepatic fibrosis process. [Methods] LX-2 were cultured in vitro, and were intervened by different concentrations of octreotide (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mmol/L) for 24 h, proliferation and apoptosis of LX-2 were detected by MTT and TUNEL, the expression of STAT3 and SOCS3 protein were measured by immunocytochemistry, and the expression of STAT3 and SOCS3 mRNA levels were detected by RT-PCR. [Results] octreotide can reduce the proliferation of LX-2, and promote apoptosis. At the same time, octreotide can enhance the proliferation of SOCS3 and STAT3 at mRNA and protein level. [Conclusion] Octreotide may inhibit LX-2 proliferation, and promote apoptosis to delay the progress of liver fibrosis, and the effect may be through inhibition the expression of STAT3 and SOCS3.

Key words: octreotide; human hepatic stellate cells; proliferation; apoptosis; STAT3; SOCS3

肝纤维化是继发于多种慢性肝损害后肝脏组织的代偿修复反应,是发展为肝硬化甚至肝癌的必经

阶段。肝星状细胞(hepatic stellate cell, hsc)被认为是肝纤维化形成的关键细胞,是产生细胞外基质的主要来源细胞。HSC 的激活、增殖、并转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)是肝纤维化发生的中心环节^[1]。因此,抑制 HSC 的活化、增殖、诱导活化的 HSC 凋亡、促进其已合成的细胞外基质降

收稿日期:2017-05-10

基金项目:泸州市科技局计划项目(No:2011-I-S37)

作者简介:蒋亚玲,硕士,主要从事肝纤维化的基础及临床研究

通讯作者:周 贤, E-Mail: zhouxian68@163.com

解则成为阻止和逆转肝纤维化的主要途径之一。

研究表明,生长抑素及其衍生物奥曲肽具有抑制多种激素的释放,抑制包括 HSC 等多种细胞增殖的作用^[2]。然而其抑制 HSC 增殖的分子机制尚未完全阐明。也有研究证实,JAK/STAT3/SOCS3 信号通路能够调节细胞过度生长,与肝脏及血液系统等恶性增生性疾病的发生关系密切^[3-4]。本文旨在研究在奥曲肽抑制人肝星状细胞活化增殖和凋亡中 STAT3 和 SOCS3 的表达变化,为奥曲肽今后用于临床治疗肝纤维化提供更多理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝星状细胞株 LX-2 购自上海汉博生物科技有限公司,醋酸奥曲肽注射液由瑞士诺华制药有限公司生产(Novartis Pharma AG),批准文号:国药准字 H20090948;MTT 细胞增殖检测试剂盒购于上海碧云天公司,Tunel 荧光凋亡试剂盒购于美国 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞实验及分组 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 LX-2,按加入奥曲肽浓度(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} mmol/L)不同进行分组。

1.2.2 MTT 法 用胰蛋白酶消化 LX-2 细胞,离心后制成 5×10^4 /ml 的细胞悬液,将细胞悬液接种到 96 孔板中(每孔 100 μ l),培养 24 h 待细胞贴壁后分组,分为对照组、奥曲肽组(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} mmol/L 浓度组),每组设 6 个复孔,其中对照组每孔加入 100 μ l 普通培养液代替,各组继续培养 24 h 后弃旧培养基,加入无血清的 DMEM 90 μ l/孔,MTT 液 10 μ l/孔,混匀后继续培养 4 h,弃培养基,加入 Formazan 溶解液 100 μ l/孔,直至光学显微镜下 Formazan 全部溶解,用酶标计数仪测定每孔 570 nm 波长的吸光值(A 值)。按下列公式计算抑制率:细胞抑制率=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.3 TUNEL 荧光法 取细胞浓度为 5×10^4 /ml 的 LX-2 接种至六孔板内爬片,待细胞生长至 80% 左右融合时,换无血清的 DMEM 培养液同步

化 24 h,按照不同浓度分为对照组和奥曲肽组,每组设 6 复孔,再予以药物干预 24 h。室温条件下,4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 缓冲液洗 5 min $\times 3$ 次;滴加 0.2% TritonX-100,2 $^{\circ}$ C $\sim$ 8 $^{\circ}$ C 冰浴上作用 2 min,弃 TritonX-100,PBS 缓冲液洗 5 min $\times 3$ 次。按照说明书配制 Tunel 混合液,每张盖玻片滴加 60 μ l Tunel 混合液,37 $^{\circ}$ C、湿盒中避光孵育 60 min,PBS 缓冲液洗 5 min $\times 3$ 次,晾干。滴加 DAPI 染色约 5 min,PBS 缓冲液洗 5 min $\times 3$ 次。荧光抗淬灭剂封片,倒置荧光显微镜观察拍照,其中红色为凋亡细胞,蓝色为非凋亡细胞,并计算凋亡率。凋亡率(%)=凋亡细胞/总细胞数目 $\times 100\%$ 。

1.2.4 免疫细胞化学 取六孔板接种 LX-2 细胞进行爬片,分别加入奥曲肽浓度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} mmol/L 培养基及空白对照培养基,继续培养 24 h,采用 PV 二步法检测 STAT3 和 SOCS3 蛋白,一抗为兔抗人 STAT3 和 SOCS3 抗体,二抗为鼠抗兔抗体,采用 DAB 显色,显微镜观察,每张图片随机选取 5 个视野拍照($\times 200$),使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行图片结果分析。

1.2.5 RT-PCR 法 采用 TRIzol 一步法提取各组细胞总 RNA,用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度,OD260/OD280 均在 1.8 $\sim$ 2.0 之间。采用 25 μ l 反应体系,以 GAPDH 作为内参基因,RNA 逆转录成 cDNA,GAPDH 内参基因引物购自 Applied Biosystem 公司,STAT3 及 SOCS3 引物由上海捷瑞生物工程公司合成(引物序列见表 1)。

PCR 反应体系为:2 $\times$ Taq MasterMix 12.5 μ l、上游引物 1.5 μ l、下游引物 1.5 μ l、ddH₂O:6.5 μ l、DNA 模板(cDNA 溶液)3 μ l。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;循环周期:94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 彻底延伸 5 min。电泳分析:取 5 μ l PCR 反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,结果使用凝胶成像系统成像,采用凝胶分析软件进行灰度值分析,各组以 STAT3、SOCS3 基因与内参基因 GADPH 进行灰度值比较,其前后两者的比值表示目的基因相对表达量。

表 1 STAT3 及 SOCS3 引物序列

基因	序列		扩增长度(bp)
STAT3	上游引物序列	5'-CCT GAA GCT GAC CCA GGT AG-3'	133
	下游引物序列	5'-TTC CAA ACT GCA TCA ATG AAT C-3'	
SOCS3	上游引物序列	5'-TCG CCA CCT ACT GAA CCC T-3'	247
	下游引物序列	5'-GGT CCA GGA ACT CCC GAA T-3'	

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验方法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 奥曲肽对肝星状细胞增殖的影响

MTT 结果显示,与对照组比较,奥曲肽在 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ mmol/L 浓度范围内呈浓度依赖性及时间依赖性抑制 LX-2 增殖,奥曲肽浓度越高,干预时间越长,其发挥抑制 LX-2 细胞增殖的作用最强,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.2 奥曲肽对人肝星状细胞凋亡的影响

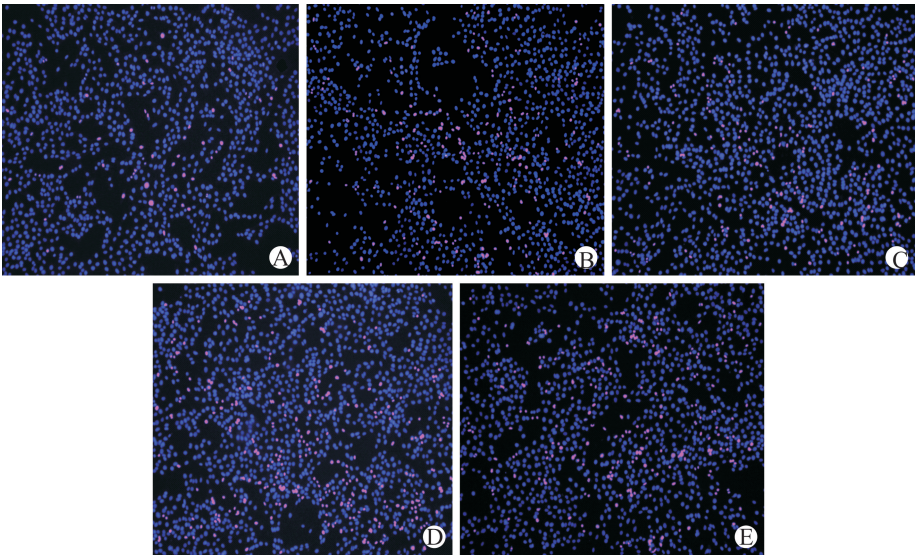
TUNEL 荧光法结果显示:奥曲肽可以促进 LX-2 凋亡,随奥曲肽浓度的增加干预时间的延长,LX-2 凋亡率逐渐增加,各组间差异具有统计学意义($P < 0.05$),结果见表 2,图 1。

2.3 RT-PCR 法检测 STAT3、SOCS3 mRNA 的表达

RT-PCR 法结果显示,各 OCT 组 STAT3 mRNA、SOCS3 mRNA 表达量均明显低于对照组,STAT3 mRNA 表达量与 OCT 浓度成正比,SOCS3 mRNA 表达量与 OCT 浓度无关,结果见图 2。

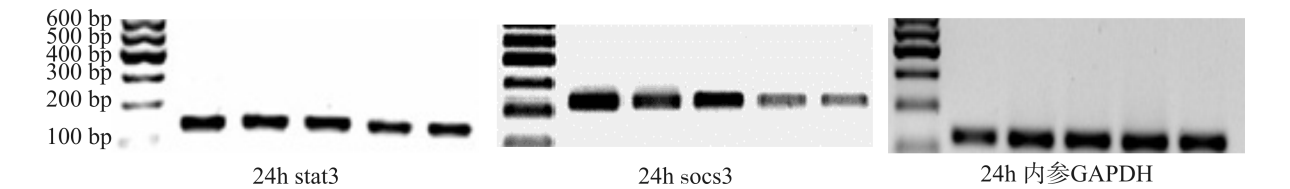
表 2 奥曲肽对 LX-2 细胞 MTT 值及抑制率和凋亡率的影响

组别	A 值	抑制率/%	24 h 凋亡率
对照组	0.939±0.040	—	4.998±0.780
10 ⁻⁶ mmol/L	0.814±0.037	10.500±3.97	9.132±0.808
10 ⁻⁵ mmol/L	0.715±0.029	23.834±3.04	11.836±1.052
10 ⁻⁴ mmol/L	0.653±0.032	30.415±3.42	14.714±1.185
10 ⁻³ mmol/L	0.551±0.044	41.363±4.68	16.346±0.643



A: 对照组; B: 10⁻⁶ mmol/L; C: 10⁻⁵ mmol/L; D: 10⁻⁴ mmol/L; E: 10⁻³ mmol/L。

图 1 TUNEL 荧光法测不同浓度奥曲肽对 LX-2 细胞凋亡的影响



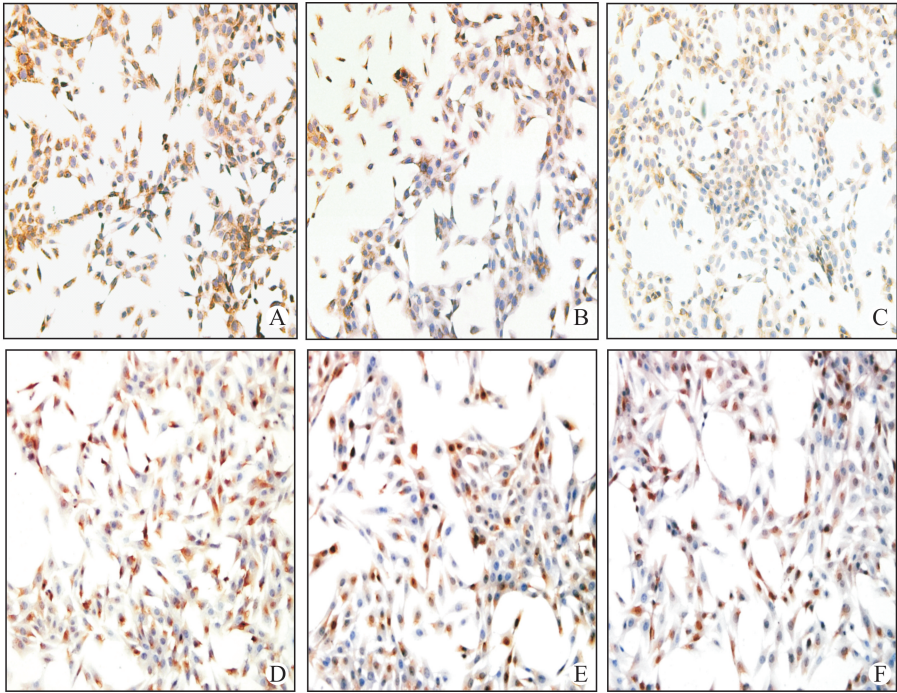
条带从左至右依次为对照组、10⁻³ mmol/L、10⁻⁴ mmol/L、10⁻⁵ mmol/L、10⁻⁶ mmol/L。

图 2 RT-PCR 检测奥曲肽对 STAT3 mRNA、SOCS3 mRNA 表达的影响

2.4 免疫细胞化学法检测 STAT3、SOCS3 蛋白的表达

免疫细胞化学结果显示:LX-2 细胞的胞质中可表达 STAT3 蛋白、SOCS3 蛋白。OCT 可以降低

STAT3、SOCS3 蛋白的表达。STAT3 蛋白表达量随奥曲肽浓度增加而增加,SOCS3 mRNA 表达量与 OCT 浓度无关,结果见图 3。



A:24 h 对照组;B:48 h 对照组;C:72 h 对照组;D:24 h 10⁻⁴ mmol/L;E:48 h 10⁻⁴ mmol/L;F:72 h 10⁻⁴ mmol/L;G:24 h 10⁻⁶ mmol/L;H:48 h 10⁻⁶ mmol/L;I:72 h 10⁻⁶ mmol/L。

图 3 不同浓度奥曲肽干预 LX-2 Stat3、Socs3 蛋白表达情况(×200)

3 讨论

JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription-3)信号通路及其负调控细胞因子 SOCS3 能够抑制细胞过度生长、诱导细胞凋亡^[5],具有维持细胞稳定的作用^[6],被广泛认为可能是治疗肝纤维化的潜在靶点^[7-8]。STAT3 分子过高表达可以通过上调凋亡抑制基因(如 Bcl-XL、Bcl-2、c-Myc、Mcl-1、c-Jun、Fas、VEGF、周期素 D1)的表达,达到抑制细胞凋亡的目的,广泛参与人类多种恶性肿瘤的发生、演进^[9]。近期研究亦表明,STAT3 具有加重肝纤维化的作用^[10-12]。

1997 年 SOCS 家族的发现并补充了 JAK/STAT 信号通路的负调控机制。目前已知的 SOCS 家族由 SOCS1-7、CIS 组成,其中对 STAT3 抑制作用最明显的是 SOCS3。有研究表明,在正常生理条件下、肝纤维化早期及进展期,SOCS3 的表达量均不同。SOCS3 低表达与炎症、肿瘤和自身免疫疾病相关,而高表达与糖尿病和病原免疫逃脱相关^[13]。JAK/ STAT 信通路诱导 SOCS3 表达增加,产生的

SOCS3 以两种不同的方式抑制 JAK/STAT 信号转导。SOCS3 除了能够直接抑制 JAK1、JAK2 和 TYK2 的催化活性,SOCS3 还可以通过泛素化途径使 JAK 和相关细胞因子受体降解,最终抑制抑制 JAK/STAT 信号转导^[14]。研究表明,在正常肝脏中,SOCS3 表达较少^[15],Wang 等^[16]采用 CCl4 致大鼠肝纤维化模型时发现,在造模初期肝组织表达 SOCS3 明显高于正常组,但是在造模后期,SOCS3 表达水平反而低于正常组。由此可见,在肝纤维化发展阶段,SOCS3 表达量明显降低。多项研究报道^[17-18]指出,SOCS3 过表达可以抑制 STAT3 的磷酸化和下调 cyclinD1 和 Bcl-x1,从而抑制 HSC 增殖。

本研究结果表明:OCT 具有抑制 HSC 细胞增殖并促进其凋亡的作用。各 OCT 组 STAT3、SOCS3 在 mRNA 及蛋白水平均明显低于对照组,STAT3 的表达量与 OCT 浓度呈正相关,而 SOCS3 随干预时间延长而逐渐减少。综上所述,JAK/STAT 信号通路及负调控因子 SOCS3 可能是 OCT

作用于 HSC 细胞的分子机制之一,预示着这可能成为奥曲肽治疗肝纤维化的新靶点,也为奥曲肽治疗肝纤维化新的实验和理论依据。但与此同时,奥曲肽是否通过其他信号通路及细胞因子作用于 HSC 尚有待进一步研究。

参考文献

[1] 石磊,秦恩强,贾雅丽,等.肝星状细胞中表皮形态发生素表达调控机制及其作用研究[J].生物化学与生物物理进展,2016,43(5):506—513.

[2] 杨文燕,戴强.长效奥曲肽对肝纤维化大鼠 IL-6、IL-8 的影响[J].重庆医学,2009,38(3):293—294+296+379+244.

[3] Mughal T I, Girnius S, Rosen S T, et al. Emerging therapeutic paradigms to target the dysregulated Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in hematological malignancies[J]. Leukemia & lymphoma, 2014, 55(9):1968—1979.

[4] Block E T, Cronstein B N. Interferon-gamma inhibits adenosine A2 A receptor function in hepatic stellate cells by STAT1-mediated repression of adenylyl cyclase[J]. Int J Interferon, Cytokine Mediat Res, 2010 (2):113—113.

[5] Nobori K, Munehisa Y. Intracellular signaling pathways for cardiac hypertrophy; ERK, JAK-STAT, S6 kinase[J]. Nihon Rinsho, 2007, 65(4):196—200.

[6] Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and co-existence[J]. J Clin Invest, 2009, 119 (7): 1745 — 1754.

[7] Pascarella S, Clément S, Dill M T, et al. Intrahepatic mRNA levels of SOCS1 and SOCS3 are associated with cirrhosis but do not predict virological response to therapy in chronic hepatitis C[J]. Liver Int, 2013, 33 (1):94—103.

[8] Culig Z. Suppressors of cytokine signalling-3 and-1 in human carcinogenesis[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2013, 5(1):277—283.

[9] 杨卫富,李德春. Stat3 与肿瘤的关系研究进展[J].蚌埠医学院学报, 2013, 38(2):234—236.

[10] Xu MY, Hu JJ, Shen J, et al. Stat3 signaling activation crosslinking of TGF-beta1 in hepatic stellate cell exacerbates liver injury and fibrosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(11):2237—2245.

[11] Lin S, Saxena NK, Ding X, et al. Leptin increases tissue inhibitor of metalloproteinase 1(TIMP-1) gene expression by a specificity protein 1/signal transducer and activator of transcription 3 mechanism[J]. Mol Endocrinol, 2006, 20(12):3376—3388.

[12] Plum W, Tschaharganeh DF, Kroy DC, et al. Lack of glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3-mediated signaling in hepatocytes enhances chronic liver injury and fibrosis progression in a model of sclerosing cholangitis[J]. Am J Pathol, 2010, 176(5):2236—2246.

[13] Mahony R, Ahmed S, Diskin C, et al. SOCS3 revisited; a broad regulator of disease, now ready for therapeutic use? [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(17):3323—3336.

[14] Babon J J, Nicola N A. The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3[J]. Growth Factors, 2012, 30(4):207—219.

[15] Li Y, Han M F, Li W N, et al. SOCS3 expression correlates with severity of inflammation in mouse hepatitis virus strain 3-induced acute liver failure and HBV-ACLF[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2014, 34(3):348—353.

[16] Wang B, Zhang X H, Yang M F, et al. Expression and significance of SOCS3 in liver tissue of rats with severe acute pancreatitis complicated by liver injury[J]. The People's Liberat Army Med J, 2012, 37(11):1036—1039.

[17] 刘青娟,邢玲玲,郝军,等. SOCS-3 对 OSM 诱导的肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(11):1165—1167, 1171.

[18] da Silva CG, Studer P, Skroch M, et al. A20 promotes liver regeneration by decreasing SOCS3 expression to enhance IL-6/STAT3 proliferative signals[J]. Hepatology, 2013, 57(5):2014—2025.