

PTP1B 及瘦素信号通路在奥曲肽抗大鼠肝纤维化中的作用

陈元淦, 张超, 李方跃, 牛森森

摘要 目的 研究蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B) 在奥曲肽 (OCT) 治疗大鼠肝纤维化过程中的作用机制, 及其对瘦素和 JAK2-STAT3 信号通路的影响。方法 将大鼠随机分为: 空白组、OCT 组、模型组。模型组和 OCT 组采用皮下注射四氯化碳 (CCl₄) 法建立肝纤维化模型。饲养 8 周后, 采集标本, 全自动生化分析仪测定血清肝脏生化指标: 总胆红素 (TBIL)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 及大鼠血清白蛋白 (ALB)。ELISA 法测定瘦素水平, HE 染色观察肝脏病理, 免疫组化法检测肝组织瘦素及瘦素受体 (Ob-Rb) 的表达, 碱水解法测定肝脏中羟脯氨酸 (Hyp) 含量。Western blot 法检测肝组织内 PTP1B、JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3 的表达。结果 与空白组比较, 模型组和 OCT 组大鼠血清中 TBIL、ALT、AST 水平上升 ($P < 0.05$), ALB 水平明显降低 ($P < 0.05$), 血清瘦素、肝组织内瘦素及瘦素受体表达增加 ($P < 0.001$)。肝组织中 Hyp 含量明显升

高 ($P < 0.05$)。模型组及 OCT 组 JAK2、STAT3 磷酸化水平较空白组升高 ($P < 0.001$)。OCT 组与模型组比较, 肝脏生化指标改善明显, 病理改变较轻, 血清瘦素含量减少 ($P < 0.05$), 肝组织内瘦素、Ob-Rb 及 Hyp 含量降低 ($P < 0.05$), JAK2、STAT3 磷酸化水平较模型组均有降低 ($P < 0.05$), 而 PTP1B 表达增加 ($P < 0.001$)。结论 应用 OCT 能一定程度上减轻大鼠肝纤维化程度, 减轻肝脏损伤。推测其机制是 OCT 通过上调 PTP1B, 抑制了瘦素及 JAK2/STAT3 信号通路的促肝纤维化效应, 最终达到抗肝纤维化的目的。

关键词 瘦素; 奥曲肽; 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B; JAK2/STAT3
中图分类号 R 575.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0501-05

肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 被认为在肝纤维化的发展过程中有重要地位。各种因素导致肝脏的损伤, 使 HSC 被激活并产生细胞外机制^[1]。瘦素与瘦素受体 (obese receptor, Ob-Rb) 结合, 激活下游信号通路 JAK2/STAT3, 参与了 HSC 的增殖和活化^[2-3]。蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 是 JAK2/STAT3 的负性调控因子。生长抑素是一种能抑制细胞因子合

2016-01-18 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金 (编号: KJ2014A117)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肝胆胰外科一病区, 合肥 230022

作者简介: 陈元淦, 男, 硕士研究生;

张超, 男, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: smallcloud2@hotmail.com

Apoptosis of HK-2 cells induced by high glucose and its regulation mechanism

Yuan Yujun¹, Duan Huifang², Hu Zhijian¹, et al

(¹Clinical Laboratory, ²Medicare Office, The Affiliated Hospital of Jiujiang University, Jiujiang 332000)

Abstract Objective To investigate high glucose-induced apoptosis in HK-2 cells and its possible regulation mechanism. **Methods** HK-2 cells were divided into three groups and treated as follows: normal group, high glucose groups, mannitol groups. The cell proliferation and apoptosis of HK-2 cell was analyzed by MTT, flow cytometry. The expression of Bcl-2 and Caspase family proteins were studied by Western blot, and the activity of Caspase family was analyzed by ELISA. **Results** High glucose could inhibit growth of HK-2 cells. Moreover, high concentrations of glucose could also induce apoptosis with the concentration increased more obviously ($P < 0.01$). Western blot showed that high glucose down-regulated Bcl-2, increased Bak, Bax expression ($P < 0.05$). **Conclusion** High glucose can inhibit the proliferation of HK-2 cells *in vitro* and induce its apoptosis, and its mechanism may regulate the apoptosis of HK-2 cells through Bcl-2 and Caspase families.

Key words high glucose; HK-2; apoptosis; expression

成与分泌的多肽,能够调节炎症、免疫过程。其可通过上调 HSC 内的 PTP1B,抑制 JAK2/STAT3 磷酸化,从而抑制 HSC 的激活^[4]。生长抑素类似物奥曲肽(octreotide, OCT),可被用于治疗门静脉高血压症^[5]。前期实验^[6]显示,OCT 能降低肝纤维化大鼠中瘦素及其受体的表达,减轻肝脏的损害。该实验通过建立肝纤维化模型,观察 OCT 对瘦素及其信号通路和 PTP1B 表达的影响,探究 OCT 在抗肝纤维化中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物 清洁级成年雄性 SD 大鼠 45 只,200 ~ 250 g,购自安徽医科大学实验动物中心,实验前在标准环境下适应性饲养。

1.1.2 药物试剂 四氯化碳(CCl_4)及橄榄油购自国药集团有限公司。将 CCl_4 与橄榄油配成 40% 的混合溶液(容积比 4 : 6)。5% 乙醇溶液用于造模大鼠唯一饮水。OCT (0.1 mg/ml) 购自瑞士 Novartis Pharma Schwaiz 公司,将其稀释成 200 ng/ml 用于皮下注射;羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)测试盒购自南京建成生物工程研究所;瘦素 ELISA 试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司;兔抗鼠瘦素、瘦素受体抗体购自北京博奥森公司;ECL 试剂盒、 β -actin 以及相应二抗均购自北京中杉金桥公司;Western blot 所需一抗(JAK2、STAT3、p-JAK2、p-STAT3、PTP1B)购自英国 abcam 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及造模 将大鼠分为:空白组、OCT 组、模型组,每组 15 只。OCT 组给予腹部皮下注射 OCT 100 ng/100 g,每天 2 次。空白组和模型组皮下注射等量生理盐水。肝硬化模型建立:模型组和治疗组于左右后肢交替注射 40% 的 CCl_4 、橄榄油混合溶液(造模 3 周后出现注射部位溃烂,视情况更改为背部、颈部等部位皮下注射),注射后棉签按压,防止溢出。首次注射剂量为 0.5 ml/100 g,维持剂量为 0.3 ml/100 g(每隔 3 d 注射 1 次)。使用动物实验中心提供的普通饲料用于喂养,5% 乙醇溶液为唯一饮用水(饮水状况不佳时调整乙醇溶液浓度以避免大鼠脱水)。空白组注射等量橄榄油及生理盐水,普通饲料及饮水喂养。造模时间为 8 周,实验过程中每 3 d 测量体重,用于调节药物剂量。

1.2.2 标本采集 末次给药 24 h 后,戊巴比妥钠腹腔麻醉后,腹主动脉采血,4 °C 冰箱静置 120 min

后,14 000 r/min 离心,取上层血清保存,用于后续检测。肝左叶取 1 cm × 1 cm × 1 cm 肝组织,10% 中性甲醛固定。肝右叶取相同大小肝组织,−80 °C 保存。

1.2.3 血清学检测 全自动生化分析仪(安徽医科大学第一附属医院检验科提供)测定总胆红素(total bilirubin, TBIL)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)及大鼠血清白蛋白(serum albumin, ALB)的含量。

1.2.4 形态学及病理学观察 甲醛固定后,肝脏组织常规石蜡包埋、切片、HE 染色,普通光学显微镜下观察肝脏病理学改变。

1.2.5 检测肝脏组织瘦素和 Ob-Rb 的表达 免疫组织化学法测定大鼠肝脏瘦素及 Ob-Rb 的表达。将切片置于 Leica DM4000 光学显微镜下观察,400 倍下每张切片随机选取 5 个不连续视野,将观察到的明显棕黄色颗粒视为阳性细胞。Leica DM4000 进行拍摄,拍摄后的图片使用 Image ProPlus 6.0 图像分析系统测平均光密度(optical density, OD)值。

1.2.6 组织蛋白提取及测定 取大鼠肝组织 20 mg,加入 500 μ l RIPA 细胞裂解液,玻璃匀浆器匀浆,置于冰上裂解 30 min,离心机预冷至 4 °C,14 000 r/min 离心 10 min,取上清液。BCA 法测定蛋白浓度,将样本蛋白总量调成一致。依据不同蛋白分子量,制备 8% ~ 10% SDS-PAGE 进行蛋白电泳,120 ~ 160 min 将蛋白转移到 PVDF 膜上,3% ~ 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h,一抗 4 °C 摇床孵育过夜。一抗浓度分别为 PTP1B(1 : 500)、JAK2(1 : 1 000)、p-JAK2(1 : 1 000)、STAT3(1 : 1 000)、p-STAT3(1 : 1 000);TBST 洗膜 3 次,TBS 洗膜 1 次后将膜置于二抗中,常温下孵育 1 ~ 2 h。TBST 洗膜 3 次,TBS 洗膜 1 次后,用 ECL 发光试剂盒发光。Quantity One 软件分析条带灰度值。

1.2.7 ELISA 法测定血清瘦素含量 按照试剂盒说明书进行操作,用酶标仪在 450 nm 波长下测定样本的吸光度值,随后对照标准曲线测出血清瘦素含量。

1.2.8 碱水解法测定肝脏 Hyp 含量 按照试剂盒说明书进行操作,用酶标仪在 550 nm 下测定样本吸光度值后计算出 Hyp 含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单因素方差分析行多组间差异统计,LSD 法进行组间两两比较。

2 结果

2.1 大鼠状况 模型组 3 只大鼠因感染和营养状况极差而死亡;OCT 组死亡 1 只;空白组大鼠活动、饮食饮水无异常,精神状况好,体重逐渐增加;解剖见肝脏无肿大或萎缩,色泽红润,表面光滑,边缘锐利,脾脏色红润,无肿大。模型组大鼠于注射 CCl_4 当天开始,精神状况逐渐变差,毛发干枯,饮食饮水逐渐减少;解剖见肝脏颜色较浅,表面欠光滑,边缘钝,可见大小不等的结节,脾脏明显肿大。OCT 组大鼠精神,饮食饮水较模型组有明显改善;解剖见肝脏表面欠光滑,色泽较浅,表面结节较模型组明显减少,少数大鼠脾脏轻度肿大。

2.2 大鼠血清相关指标变化及肝组织中 Hyp 含量的变化 与空白组比较,模型组和 OCT 组血清 AST、ALT、TBIL、肝组织中 Hyp 含量升高,ALB 降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,OCT 组 TBIL、AST、ALT 和 Hyp 均有改善,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与空白组比较,模型组和 OCT 组瘦素表达水平均有升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,OCT 组瘦素水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 肝脏形态学检测 HE 染色显示,与空白组比较,模型组肝细胞排列紊乱,部分肝细胞气球样变、脂肪样变以及点状坏死;结缔组织广泛增生包绕肝小叶,正常肝小叶被假小叶取代,中央静脉偏位或缺如。OCT 组较模型组有明显改善,纤维间隔包绕的假小叶减少,炎性细胞浸润程度明显改善,肝细胞变性坏死明显减少。见图 1。

2.4 瘦素及 Ob-Rb 的表达 瘦素及 Ob-Rb 的表达

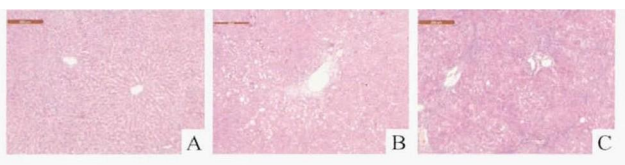


图 1 肝组织 HE 染色 $\times 100$
A: 空白组;B: OCT 组;C: 模型组

见于 HSC 的胞质和胞膜,为黄褐色细颗粒沉积。空白组肝细胞内无表达,或仅在肝窦间隙的间质细胞中及汇管区有极少量表达甚至是不表达;模型组瘦素及 Ob-Rb 表达明显增加,主要见于 HSC 中。在肝脏的汇管区、肝窦、血管周围瘦素及 Ob-Rb 表达增多。与模型组比较,OCT 组阳性表达则明显减少。空白组瘦素表达量为(0.37 ± 0.07),模型组(0.57 ± 0.39)和 OCT 组(0.49 ± 0.24)均比空白组明显增加,差异有统计学意义($F = 25.204, P < 0.001$);与模型组比较,OCT 组瘦素表达降低,差异有统计学意义(0.57 ± 0.39 vs $0.49 \pm 0.24, P < 0.05$)。空白组 Ob-Rb 表达量为(0.38 ± 0.09),模型组(0.55 ± 0.04)和 OCT 组(0.46 ± 0.05)均比空白组明显增加,差异有统计学意义($F = 10.899, P < 0.001$);与模型组比较,OCT 组 Ob-Rb 表达降低,差异有统计学意义(0.55 ± 0.04 vs $0.46 \pm 0.05, P < 0.05$),见图 2。

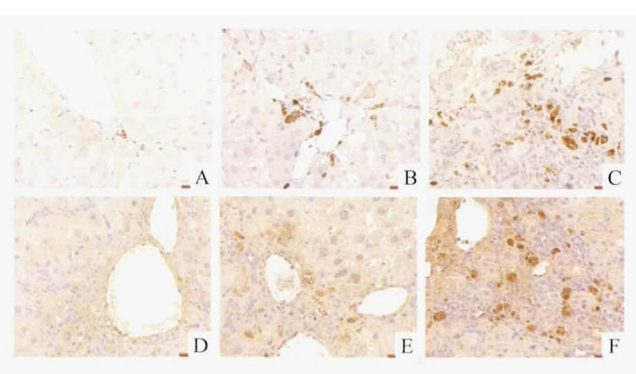


图 2 肝组织瘦素及 Ob-Rb 表达 $\times 400$

A: 空白组;B: OCT 组;C: 模型组;1: 瘦素;2: Ob-Rb

2.5 肝组织内相关蛋白的表达 模型组 PTP1B 显著低于其他两组($P < 0.001$),OCT 组 PTP1B 表达高于空白组($P < 0.05$);模型组和 OCT 组 p-JAK2 较空白组明显升高($P < 0.001$),而 OCT 组的表达较模型组降低($P < 0.05$);模型组和 OCT 组 p-STAT3 表达较空白组明显升高($P < 0.001$),OCT 组较模型组降低($P < 0.05$)。见图 3、4。

表 1 大鼠血清 TBIL、AST、ALT、ALB、瘦素及肝组织中 Hyp 含量($n = 12, \bar{x} \pm s$)

项目	空白组	OCT 组	模型组	F 值
TBIL($\mu\text{mol/L}$)	0.61 ± 0.07	$1.62 \pm 0.33^*$	$2.01 \pm 0.31^{*#}$	75.043
AST(U/L)	101 ± 13	$370 \pm 57^*$	$470 \pm 50^{*#}$	185.036
ALT(U/L)	37 ± 5	$196 \pm 60^*$	$294 \pm 51^{*#}$	81.375
ALB(g/L)	36.19 ± 1.73	$26.68 \pm 1.84^*$	$26.49 \pm 1.69^*$	99.977
瘦素(ng/ml)	8.24 ± 0.37	$10.62 \pm 0.87^*$	$11.75 \pm 0.95^{*#}$	53.398
Hyp(mg/g)	5.43 ± 0.65	$9.45 \pm 0.78^*$	$11.12 \pm 0.93^{*#}$	136.328

与空白组比较: * $P < 0.05$; 与 OCT 组比较: # $P < 0.05$

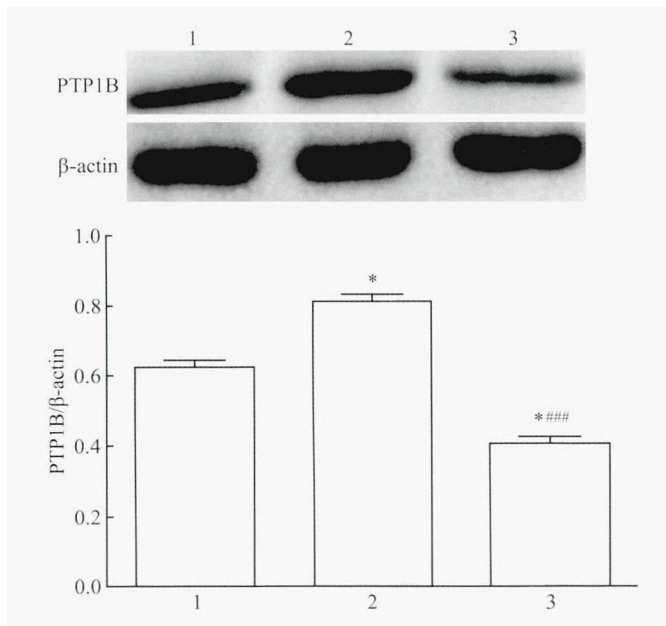


图3 PTP1B 表达水平

1:空白组;2:OCT组;3:模型组;与空白组比较:* $P < 0.05$;与OCT组比较:#### $P < 0.001$

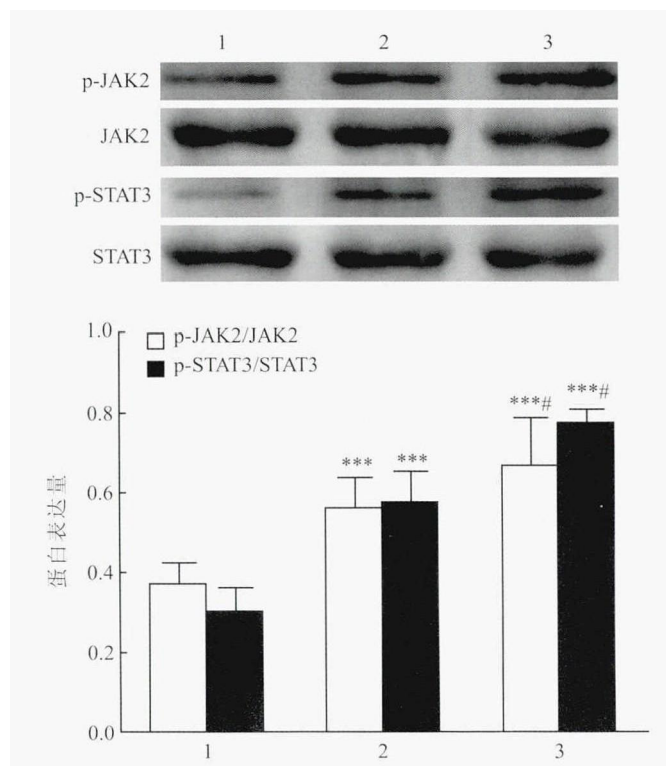


图4 STAT3、p-STAT3、JAK2、p-JAK2 表达水平

1:空白组;2:OCT组;3:模型组;与空白组比较:*** $P < 0.001$;与OCT组比较:## $P < 0.05$

3 讨论

CCl₄ 诱导形成肝纤维化模型是最经典和广泛

的建模方法。本实验利用该方法可制备有效的肝纤维化模型^[7]。TBIL、ALT、AST 和 ALB 是反应肝脏功能的重要指标。Hyp 为胶原纤维中特有的氨基酸,由于肝纤维化时肝内主要增加的成分为胶原纤维,测量肝 Hyp 的含量可以反应肝纤维化的程度。实验结果显示,与模型组比较,OCT 组大鼠生存状态较好,解剖可见肝脏、脾脏外观有明显改善;肝脏血清指标提示 TBIL、ALT、AST 降低明显,肝 Hyp 含量显著降低,肝脏病理改变较轻,纤维间隔包绕的假小叶明显减少。在大鼠肝纤维化模型中应用 OCT,能明显改善大鼠生存质量,一定程度上减轻肝纤维化程度,缓解肝纤维化所致的肝功能损害。肝纤维化是病毒、药物、毒物等各种因素导致的慢性肝损伤,HSC 增殖活化是肝纤维化发生发展的重要环节。前期实验^[4]显示:生长抑素能够抑制 HSC 的增殖和活化。推测 OCT 作为生长抑素类似物,能一定程度上抑制 HSC 的增殖活化,从而具有一定的抗肝纤维化作用,进而缓解了肝脏的损伤。瘦素是近年来发现的调控 HSC 的重要因子,HSC 也能够参与合成和分泌瘦素^[8]。实验结果显示,模型组和 OCT 组大鼠肝脏内 Hyp 含量增加,血清瘦素、肝组织中瘦素及其受体表达水平升高,证实了瘦素与肝纤维化程度密切相关。与 OCT 组比较,模型组大鼠肝功能指标 TBIL、ALT、AST 明显升高,肝纤维化指标 Hyp 增加,血清瘦素水平增加,肝组织瘦素和 Ob-Rb 表达增加。说明 OCT 缓解肝纤维化所致的肝功能损害,可能是基于其抑制了瘦素及其受体的表达。瘦素与 Ob-Rb 结合后,JAK2-STAT3 是主要的下游信号转导通路^[9],而 PTP1B 是调节 JAK2-STAT3 磷酸化的重要因子。Western blot 法检测显示,OCT 组 PTP1B 的表达较模型组和空白组均明显增加,且 JAK2/STAT3 的磷酸化程度减小。提示 OCT 可能上调了 PTP1B 的表达,较高表达的 PTP1B 使瘦素下游通路 JAK2/STAT3 的磷酸化程度降低,这与相关文献^[10]报道相一致。

综上所述,在 CCl₄ 诱导的肝纤维化模型中应用 OCT,能够上调体内 PTP1B 水平,抑制瘦素下游信号通路 JAK2/STAT3 的磷酸化。结合前期细胞水平的研究,推测 OCT 通过该作用机制,抑制 HSC 的增殖与活化,最终能一定程度上抑制肝纤维化并减轻肝脏损害。但是 OCT 促进 PTP1B 的表达是否是其保护作用的唯一机制,以及其是否具有时间和剂量依赖性问题仍然值得进一步研究。

参考文献

- [1] Lee U E, Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(2):195-206.
- [2] De Minicis S, Seki E, Oesterreicher C, et al. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase mediates fibrotic and inflammatory effects of leptin on hepatic stellate cells[J]. Hepatology, 2008, 48(6): 2016-26.
- [3] Handy J A, Fu P P, Kumar P, et al. Adiponectin inhibits leptin signaling via multiple mechanisms to exert protective effects against hepatic fibrosis[J]. Biochem J, 2011, 440(3): 385-95.
- [4] 牛森森, 张超, 李方跃, 等. 生长抑素阻断瘦素诱导肝星状细胞增殖及基质分泌的分子机制[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(20): 3216-9.
- [5] Zhang C, Xu J M, Kong D R, et al. Immediate effects of different schedules of somatostatin on portal pressure in patients with liver cirrhosis[J]. J Clin Pharm Ther, 2008, 33(3): 206-11.
- [6] 姚磊, 张超, 李方跃, 等. 奥曲肽对实验性肝纤维化大鼠瘦素及功能性瘦素受体表达的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(7): 800-4.
- [7] Vanheule E, Geerts A M, Reynaert H, et al. Influence of somatostatin and octreotide on liver microcirculation in an experimental mouse model of cirrhosis studied by intravital fluorescence microscopy[J]. Liver Int, 2008, 28(1): 107-16.
- [8] Saxena N K, Titus M A, Ding X, et al. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation[J]. FASEB J, 2004, 18(13): 1612-4.
- [9] Park H K, Ahima R S. Leptin signaling[J]. F1000Prime Reports, 2014, 6:73.
- [10] White S J, Taylor M J, Hurt R T, et al. Leptin-based adjuvants: an innovative approach to improve vaccine response[J]. Vaccine, 2013, 31(13): 1666-72.

Ocrtiotide promotes PTP1B expression to protect carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis rats

Chen Yuangan, Zhang Chao, Li Fangyue, et al

(Dept of Liver and Biliary Pancreatic Surgery,

The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the mechanisms of octreotide (OCT) protecting carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis rats and the effects of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) on leptin and JAK2/STAT3 signaling. **Methods** Adult male SD rats were divided into three groups: control, OCT and model group. The liver fibrosis models were induced with carbon tetrachloride (CCl₄). The levels of total bilirubin (TBIL), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), serum albumin (ALB) and leptin in serum and Hyp in liver were tested and histopathology changes were observed. Leptin and obese receptor (Ob-Rb) expressions were observed by immunohistochemical staining. The expressions of the phosphorylation of Janus kinase2 (JAK2), signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) and PTP1B were tested by Western blot. **Results** In model and OCT group, compared with the control group, the levels of TBIL, ALT, AST and leptin in serum increased and serum ALB decreased ($P < 0.05$). Compared with the control group, in model and OCT group, the expressions of Hyp, p-JAK2, p-STAT3, leptin and Ob-Rb in liver increased ($P < 0.05$). In OCT group, with lower leptin, Ob-Rb and Hyp expression, the injury of hepatic histopathology was less serious than that in model group. In model group, the expressions of p-JAK2 and p-STAT3 rose more evidently than OCT group ($P < 0.05$), while PTP1B expressions were lower ($P < 0.001$). **Conclusion** OCT can ease the CCl₄-induced hepatic injury and relieve liver fibrosis. OCT dampens leptin signaling by stimulating PTP1B expression, which is a negative regulator of JAK2/STAT3, and thus inhibits liver fibrosis.

Key words leptin; octreotide; protein tyrosine phosphatase; JAK2/STAT3