

生长抑素对瘦素诱导肝星状细胞的活化增殖、PTP1B 表达及 JAK2-STAT3 通路的影响

李 望 张 超 李方跃 牛森森

摘要 目的 研究生长抑素对瘦素诱导大鼠肝星状细胞(HSC)的活化增殖、蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(PTP1B)表达及 JAK2-STAT3 通路的影响,探讨生长抑素抗肝纤维化的相关机制。方法 以重组大鼠瘦素作用于 HSC-T6 细胞(100 ng/ml),同时加入各浓度的生长抑素(10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} mol/L)。在处理 24 h 后,采用 CCK-8 法检测 HSC 增殖的变化,免疫细胞化学检测 p-JAK2 及 p-STAT3 蛋白表达,RT-PCR 法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和 PTP1B 的 mRNA 表达。结果 CCK-8 法显示生长抑素可通过剂量依赖方式抑制瘦素诱导的 HSC-T6 细胞增殖($P < 0.05$);免疫细胞化学检测显示,生长抑素组 HSC-T6 细胞质 p-JAK2 及细胞核内 p-STAT3 蛋白表达明显低于瘦素对照组($P < 0.05$);RT-PCR 法检测生长抑素干预组 HSC α -SMA mRNA 的表达较瘦素对照组及空白对照明显降低($P < 0.05$),而 PTP1B 的 mRNA 表达量升高($P < 0.05$)。结论 生长抑素能上调 PTP1B 的表达,阻断瘦素在 HSC 内 JAK2-STAT3 信号通路的转导,并且抑制瘦素诱导 HSC 的活化与增殖。

关键词 生长抑素;瘦素;肝星状细胞;JAK2-STAT3 信号转导;蛋白酪氨酸磷酸酶 1B

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1387-05

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化与增殖是肝纤维化发生发展的中心环节,活化后高表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)^[1]。瘦素通过结合于 HSC 的瘦素受体(obese receptor, Ob-R)激活胞内 JAK2-STAT3 的信号传导,引起 HSC 的活化、增殖^[2]。该课题组前期研究^[3]显示,生长抑素类似物奥曲肽能够降低肝纤维化大鼠血清瘦素和 Ob-Rb 的水平,说明生长抑素可作用于瘦素机制发挥抗肝纤维化的作用。此外,有研究^[4-5]显示,蛋白酪氨酸磷酸酶 1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)能够阻断瘦素下游的 JAK2-

STAT3 传导,而生长抑素又对蛋白酪氨酸磷酸酶类有激活上调的作用,但是生长抑素能否激活 PTP1B 尚不清楚。该研究假设生长抑素能够上调 PTP1B 表达,进而抑制瘦素诱导 HSC 的增殖、JAK2-STAT3 信号通路活化及 α -SMA 的转录,旨在探讨生长抑素在防治纤维化中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)由安徽医科大学药学院提供。重组大鼠瘦素购自美国 Pepro-tech 公司;生长抑素、p-JAK2 抗体、p-STAT3 抗体均购自北京博奥森公司;CCK-8 检测试剂盒购自南京贝博生物公司。TRIzol 总 RNA 提取试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自美国 Thermo 公司; α -SMA 和 PTP1B 引物由上海捷瑞生物工程公司合成;二步法免疫组化检测试剂盒购自北京中衫金桥公司。

1.2 细胞的培养及药物处理 HSC-T6 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下,待生长至覆盖瓶底 80%~90% 时传代。每次实验均取对数生长期的细胞进行,按加入药物不同分组。空白对照组:加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液;瘦素对照组:在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中加瘦素,终浓度为 100 ng/ml;生长抑素组:在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中加瘦素 100 ng/ml 和相应浓度的生长抑素。

1.3 CCK-8 法检测 HSC-T6 细胞增殖的变化 将传代细胞调制成 5×10^5 /ml 的悬液,每孔 100 μ l 接种到 96 孔培养板中,待 24 h 细胞贴壁后,弃去培养液,分为瘦素对照组(100 ng/ml)和生长抑素 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} mol/L 浓度组,每组设 6 复孔,另设空白对照孔,以培养液代替细胞悬液。继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液后再培养 4 h,于酶标仪双波长(450 nm, 630 nm)测吸光度(A)值。细胞抑制率(%) = (1 - 给药孔平均 A 值/对照孔平均 A 值) $\times 100$ %。

2014-06-13 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学重点项目(编号:KJ2014A117)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院普通外科,合肥 230022

作者简介:李 望,男,硕士研究生;

张 超,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: smallecloud2@hotmail.com

1.4 免疫细胞化学检测 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达 选择对数生长期 HSC-T6 细胞,以 5×10^5 /ml 的密度接种于内置有细胞爬片的 6 孔板内,培养过夜。次日按分组要求分别加入含瘦素(200 ng/ml)、瘦素 + 生长抑素(200 ng/ml + 10^{-7} mol/L)、空白对照的培养液,继续于孵箱中培养 24 h 后采用 PV6002 二步法免疫细胞化学法,一抗为兔来源的 p-STAT3 和 p-JAK2 抗体,DAB 显色。其余按试剂盒说明书操作。先观察整张细胞爬片,后每片选取 5 个视野,于显微镜下观察($\times 400$),蛋白表达以胞质或胞核染呈黄色至棕褐色为阳性细胞。对各组进行平均光密度值(OD)测定,按细胞图像分析系统(Image-Pro Plus 6.0)测定免疫细胞化学的要求进行系统设置和操作,阳性表达越多 OD 值越大。

1.5 RT-PCR 法检测 α -SMA 和 PTP1B mRNA 的表达 选择处于对数生长期的大鼠 HSC-T6 细胞制成单细胞悬液,以 2.0×10^5 个/ml 接种于 6 孔板细胞贴壁后按空白对照组、瘦素对照组(200 ng/ml)、生长抑素组(瘦素 200 ng/ml + 10^{-7} mol/L)加入含相应药物的培养液。置于细胞培养箱中继续培养 24 h 后收集细胞。采用 TRIzol 一步法抽提细胞中总 RNA。用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度 A_{260}/A_{280} 均在 1.8 ~ 2.0,并反转录成 cDNA。采用 Primer Premier 5.0 软件设计 α -SMA 和 PTP1B 的引物(引物序列见表 1),以 gapdh 为内参,由上海捷瑞生物工程公司合成。

表 1 α -SMA、PTP1B 和 gapdh 的引物序列

基因	序列	扩增长度 (bp)
α -SMA	正义链 5'-AACAGGAGTATGACGAAGCTGGC-3'	165
	反义链 5'-TGATTTGGAAAAGAAGCTGAAGGC-3'	
PTP1B	正义链 5'-CTGCCTCTTTCTCAATTCCTA-3'	161
	反义链 5'-CGGGTCTTTCTCTTTGTCATC-3'	
gapdh	正义链 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'	252
	反义链 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'	

PCR 反应体系为: $10 \times$ Taq Buffer 2.5 μ l、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l、10 mmol/L dNTP 0.5 μ l、上游引物 0.5 μ l、下游引物 0.5 μ l、Taq 酶 1 μ l、水 13.5 μ l 及 DNA 模板(cDNA 溶液) 5 μ l。反应条件为: gapdh: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 35 个循环; α -SMA: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 35 个循环; Ptpn1: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共

35 个循环。电泳分析:取 3 μ l PCR 反应产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳,结果用凝胶成像系统进行拍摄,分别将每个样本所测得的 α -SMA 和 PTP1B 各个条带积分光密度,与对应的内参 gapdh 的比值作为半定量值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差分析进行多组间差异统计及 LSD 法进行组间两两比较。

2 结果

2.1 生长抑素对细胞增殖的影响 CCK-8 法检测细胞抑制率显示:生长抑素呈剂量依赖性抑制瘦素诱导 HSC-T6 增殖,以 400 ng/ml 浓度时最为明显,其 A 值最大,抑制率为 21.92%,各组间差异有统计学意义($F = 28.6889, P < 0.05$)。生长抑素各浓度组与瘦素对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),空白对照组显著低于瘦素对照组($P < 0.05$)。见表 2 图 1。

表 2 不同浓度生长抑素对 HSC 增殖的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	生长抑素 (mol/L)	A 值	抑制率 (%)
空白对照	0	0.8815 \pm 0.0256	-
瘦素对照(含瘦素 100 ng/ml)	0	0.9556 \pm 0.0293 [#]	-
生长抑素(含瘦素 100 ng/ml)	10^{-10}	0.8755 \pm 0.0307 [*]	8.39
	10^{-9}	0.8583 \pm 0.0368 [*]	10.18
	10^{-8}	0.8292 \pm 0.0379 [*]	13.24
	10^{-7}	0.7942 \pm 0.0290 [*]	16.90
	10^{-6}	0.7462 \pm 0.0233 [*]	21.92

与瘦素对照组比较: * $P < 0.05$; 与空白对照组比较: [#] $P < 0.05$

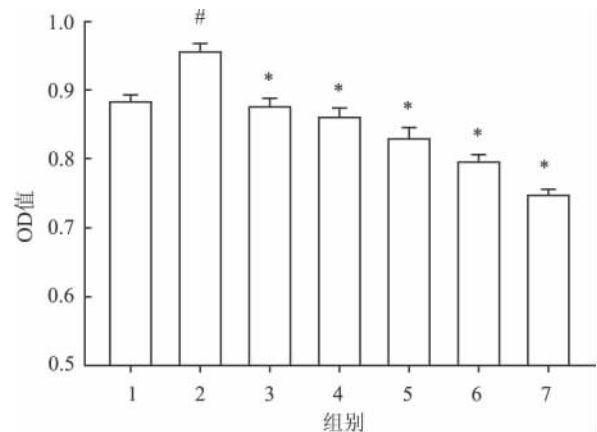


图 1 不同浓度生长抑素对 HSC 增殖的影响

1: 空白对照组; 2: 瘦素对照组; 3 ~ 7: 生长抑素 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 浓度组; 与瘦素对照组比较: * $P < 0.05$; 与空白对照组比较: [#] $P < 0.05$

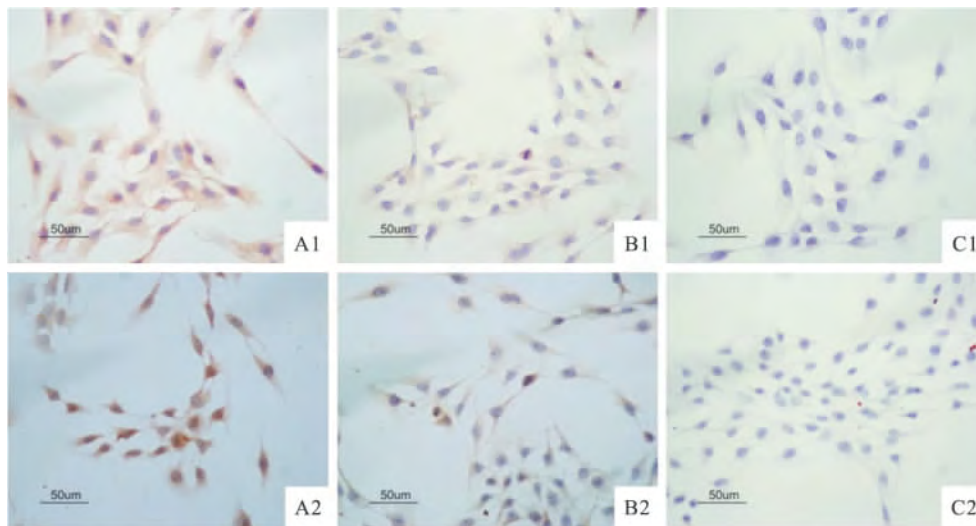


图2 生长抑素对胞内 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达的影响 二步法 ×400
A:瘦素对照组;B:生长抑素组;C:空白对照组;1:p-JAK2;2:p-STAT3

2.2 生长抑素对 p-JAK2 蛋白表达的影响 p-JAK2 的表达见于 HSC-T6 细胞的胞质,表现为棕黄色颗粒样,见图 2。空白对照组 HSC-T6 细胞中 p-JAK2 表达较少,在瘦素作用 24 h 后浓度的增大,表达增加,OD 值差异有统计学意义 ($0.066 0 \pm 0.002 0$ vs $0.126 9 \pm 0.004 1$, $P < 0.05$),而生长抑素组与瘦素对照组比较表达显著减少,OD 值降低 ($0.096 5 \pm 0.002 5$ vs $0.126 9 \pm 0.004 1$, $P < 0.05$)。

2.3 生长抑素对 p-STAT3 蛋白表达的影响 p-STAT3 的表达见于 HSC-T6 细胞的胞核或核周,表现为棕黄色颗粒样,见图 2。空白对照组 HSC-T6 细胞中 p-JAK2 表达较少,在瘦素作用 24 h 后浓度的增大,表达增加,OD 值差异有统计学意义 ($0.153 8 \pm 0.006 5$ vs $0.209 7 \pm 0.005 8$, $P < 0.05$),而生长抑素组与瘦素对照组比较表达显著减少,OD 值降低 ($0.184 6 \pm 0.003 4$ vs $0.209 7 \pm 0.005 8$, $P < 0.05$)。

2.4 生长抑素对 α -SMA mRNA 表达的影响 空白对照组、瘦素对照组和生长抑素组间比较差异有统计学意义 ($F = 69.996 9$, $P < 0.05$)。瘦素对照组在瘦素作用 HSC-T6 细胞 24 h 后 α -SMA mRNA 相对内参的表达量为 $1.303 5 \pm 0.020 5$,高于空白对照组的 $1.128 4 \pm 0.019 5$ ($P < 0.05$)。生长抑素组 α -SMA mRNA 相对内参的表达量为 $1.123 8 \pm 0.023 4$,显著低于瘦素对照组 ($t = 10.004$, $P < 0.05$),而与空白对照组相比差异无统计学意义 (P

> 0.05),见图 3。

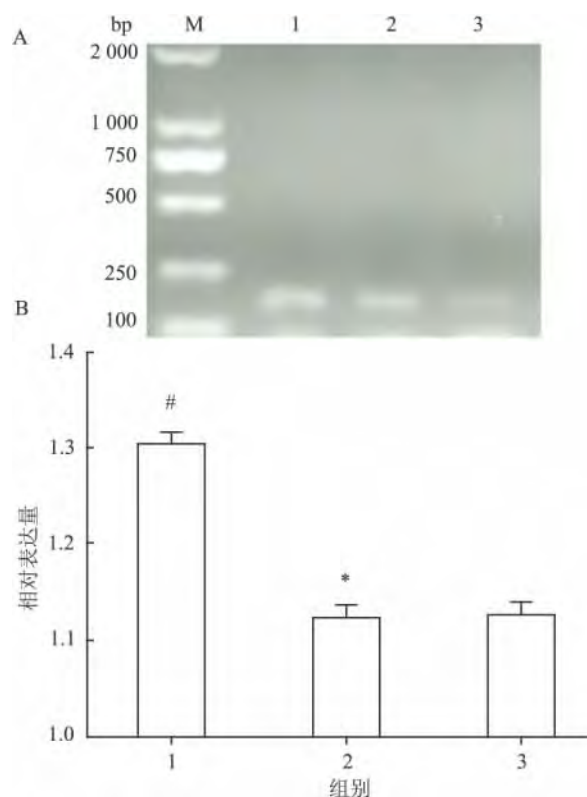


图3 α -SMA mRNA 的表达

A:电泳图;B:相对表达量;M:Marker;1:瘦素对照组;2:生长抑素组;3:空白对照组;与瘦素对照组比较:* $P < 0.05$;与空白对照组比较:# $P < 0.05$

2.5 生长抑素对 PTP1B mRNA 表达的影响 空白对照组、瘦素对照组和生长抑素组间比较差异有

统计学意义 ($F = 18.4738, P < 0.05$)。瘦素对照组在瘦素作用 HSC-T6 细胞 24 h 后 PTP1B mRNA 相对内参的表达量为 0.6686 ± 0.0224 , 低于空白对照组的 0.8007 ± 0.0284 ($P < 0.05$)。生长抑素组 PTP1B mRNA 相对内参的表达量为 0.7621 ± 0.0307 , 显著高于瘦素对照组 ($t = 4.264, P < 0.05$), 而与空白对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 4。

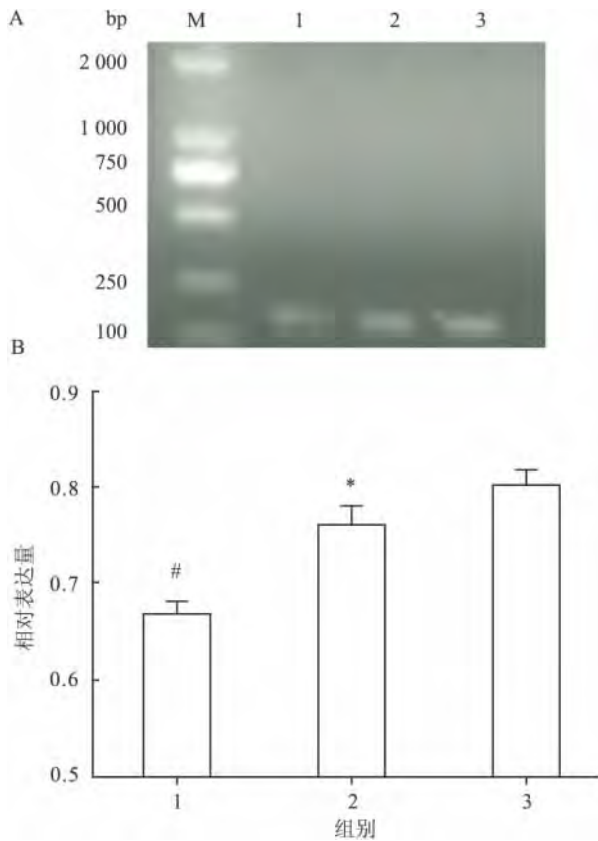


图4 PTP1B mRNA 的表达

A: 电泳图; B: 相对表达量; M: Marker; 1: 瘦素对照组; 2: 生长抑素组; 3: 空白对照组; 与瘦素对照组比较: * $P < 0.05$; 与空白对照组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

本研究选择瘦素作为促肝纤维化的刺激因子, 采用 CCK-8 法测定细胞抑制率, 生长抑素在低剂量水平 ($10^{-6} \sim 10^{-10}$ mol/L) 既可抑制瘦素诱导 HSC-T6 的增殖, 并且呈明显的量效关系, 生长抑素浓度越高, HSC 的增殖抑制越明显。该结果表明生长抑素有抑制瘦素诱导的 HSC 增殖的作用, 与 Pan et al^[6] 的研究一致。此外, 瘦素刺激 HSC-T6 细胞后 α -SMA mRNA 表达增高, 给予生长抑素干预后能下

调瘦素诱导的 α -SMA mRNA 表达, 表明生长抑素还能够下调瘦素对 HSC 的活化水平。

HSC-T6 细胞在瘦素刺激诱导后, 胞质内的 p-JAK2 蛋白表达增加, 细胞核内 p-STAT3 表达增加, 表明瘦素激活了 HSC-T6 细胞的 JAK2-STAT3 信号通路。JAK2-STAT3 是瘦素在细胞内主要的信号转导通路, 其功能性受体 Ob-Rb 的胞内保守基序能够与 JAK2 结合并激活后者, 激活的 JAK2 随后磷酸化 Tyr985 (瘦素受体中第 985 位酪氨酸残基) 和 Tyr1138 (瘦素受体中第 1138 位酪氨酸残基), 磷酸化的 Tyr1138 能够结合 STAT3, 后者进一步被磷酸化激活而形成同型二聚体并易位到细胞核中, 调控各种靶基因的转录^[7]。瘦素下游的 JAK2-STAT3 信号传导是一个复杂的酪氨酸磷酸化过程, 其相应的信号传导物和转录激活因子只有通过磷酸化激活才能够转移到细胞核内。

本研究在瘦素作用的基础上给予生长抑素干预, 显示胞内 p-JAK2 和 p-STAT3 均表达下降, 表明生长抑素能抑制 JAK2-STAT3 信号通路上的酪氨酸磷酸化。但是, 生长抑素如何作用于瘦素下游的 JAK2-STAT3 的传导尚不明确。生长抑素是一种抑制性调控因子, 生长抑素类似物, 特别是奥曲肽已经广泛使用于临床治疗, 尤其对肝硬化门静脉高压症失代偿期大出血的患者止血效果好, 但作用机制仍不明确, 若较长时间使用对肝硬化是否有治疗作用也不明确。前期的研究^[8-9] 显示, 生长抑素能够快速降低肝硬化门静脉高压症患者的门静脉压力, 推测这种作用也与其直接作用于 HSC 有关。Murray et al^[10] 研究发现, 生长抑素在大鼠肝细胞表面结合生长抑素受体 2 或 3 后, 可以激活胞内蛋白酪氨酸磷酸酶类, 后者活化后进一步抑制 STAT5 的磷酸化及其核内定位。本研究结果表明, 生长抑素能够上调瘦素诱导的 HSC 细胞内 PTP1B 的 mRNA 表达水平, 提示生长抑素抑制 JAK2-STAT3 信号通路的磷酸化作用可能与其激活 PTP1B 有关。

蛋白质酪氨酸的可逆磷酸化是真核生物各种生理活动的一个重要调控机制, 受作用相反的一对酶即蛋白质酪氨酸激酶和蛋白质酪氨酸磷酸酶的调节, 前者催化酪氨酸的磷酸化, 后者使其脱磷酸化^[11]。PTP1B 是第一个被发现并纯化的哺乳动物蛋白酪氨酸磷酸酶类, 参与多种细胞信号通路的脱磷酸化调控。本研究在细胞水平上发现生长抑素能上调大鼠 HSC 内 PTP1B 的 mRNA 转录水平, 同时

抑制瘦素诱导 JAK2-STAT3 磷酸化及细胞增殖,下调活化标志物 α -SMA 的基因表达,提示生长抑素可能通过激活 PTP1B 阻断瘦素下游的 JAK2-STAT3 磷酸化,从而抑制瘦素介导的促肝纤维化作用,发挥抗肝纤维化效应。

参考文献

- [1] Hellerbrand C. Hepatic stellate cells—the pericytes in the liver[J]. *Pflugers Arch* 2013 465(6):775–8.
- [2] Palianopoulou M, Papanikolaou V, Stefanou N, et al. The activation of leptin-mediated survivin is limited by the inducible suppressor SOCS-3 in MCF-7 cells[J]. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011, 236(1):70–6.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Mei S, Cammalleri M, Azara D, et al. Mechanisms underlying somatostatin receptor 2 down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in response to hypoxia in mouse retinal explants[J]. *J Pathol* 2012 226(3):519–33.
- [6] Pan Q, Li D G, Lu H M, et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of somatostatin on activated hepatic stellate cells[J]. *World J Gastroenterol* 2004 10(7):1015–8.
- [7] Marie C S, Verkerke H P, Paul S N, et al. Leptin protects host cells from *Entamoeba histolytica* cytotoxicity by a STAT3-dependent mechanism[J]. *Infect Immun* 2012 80(5):1934–43.
- [8] 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* 2013 38(3):206–11.
- [9] 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.
- [10] Murray R D, Kim K, Ren S G, et al. Central and peripheral actions of somatostatin on the growth hormone-IGF-I axis[J]. *J Clin Invest* 2004 114(3):349–56.
- [11] St-Pierre J, Tremblay M L. Modulation of leptin resistance by protein tyrosine phosphatases[J]. *Cell Metab* 2012 15(3):292–7.

Effect of somatostatin on leptin-induced activation, proliferation, PTP1B expression and JAK2-STAT3 signaling of hepatic stellate cells

Li Wang, Zhang Chao, Li Fangyue, et al

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of somatostatin on leptin-induced activation, proliferation, PTP1B expression and JAK2-STAT3 signaling of rat hepatic stellate cells (HSC-T6). **Methods** HSC-T6 cells were treated with recombinant rat leptin (100 ng/ml) and various concentrations of somatostatin (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} mol/L). After incubation for 24 h, the cell proliferation rates of the groups were determined by CCK-8. Immunocytochemical staining assay was applied to evaluate phosphorylation of Janus kinase 2 (JAK2) and protein expression of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3). The mRNA expression of α -SMA and PTP1B was evaluated by RT-PCR. **Results** With CCK-8, somatostatin could promote leptin-induced proliferation of hepatic stellate cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The expressions of cytoplasmic p-JAK2 and nuclear p-STAT3 after somatostatin intervention were significantly lower than that of the leptin control group ($P < 0.05$). Compared with the group with leptin, α -SMA mRNA of somatostatin group was significantly down-regulated after the treatment ($P < 0.05$), while PTP1B mRNA expression was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Somatostatin up-regulates PTP1B expression, inhibits JAK2-STAT3 signal transduction in HSC and the cell activation and proliferation induced by leptin.

Key words somatostatin; leptin; hepatic stellate cell; JAK2-STAT3 signal transduction; protein tyrosine phosphatase 1B