

α -亚麻酸对转化生长因子 β 1诱导的肝星状细胞的影响

王莉娟, 吴金明, 方红龙, 刘 扬, 黄智铭

■背景资料

研究表明约1%-5%的非酒精性脂肪肝病(NAFLD)患者最终可发展为肝纤维化及肝硬化, 其中肝星状细胞(HSC)的活化及增殖发挥了重要作用, 若能干扰HSC的活化及增殖, 可能是阻止肝硬化的途径之一。n-3族多不饱和脂肪酸可明显降低细胞中和转录因子(NF- κ B)的含量, 可能对已活化的HSC的增殖有一定抑制作用。

王莉娟, 吴金明, 方红龙, 刘扬, 黄智铭, 温州医学院附属第一医院消化内科 浙江省温州市 325000

王莉娟, 硕士, 主要从事肝纤维化的研究。

作者贡献分布: 本研究由吴金明与王莉娟共同设计; 方红龙、刘扬及黄智铭进行指导, 实验由王莉娟完成; 最终数据分析与论文撰写由王莉娟完成; 吴金明审校。

通讯作者: 吴金明, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 325000, 浙江省温州市府学巷2号, 温州医学院附属第一医院消化内科。phdwu0003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-10-12 修回日期: 2013-01-25

接受日期: 2013-03-06 在线出版日期: 2013-03-28

Effect of ALA treatment on cell proliferation, secretion of types I and III collagen, and α -SMA expression in rat hepatic satellite cells treated with transforming growth factor β 1

Li-Juan Wang, Jin-Ming Wu, Hong-Long Fang, Yang Liu, Zhi-Ming Huang

Li-Juan Wang, Jin-Ming Wu, Hong-Long Fang, Yang Liu, Zhi-Ming Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Jin-Ming Wu, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, 2 Fuxuexiang, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China. phdwu0003@yahoo.com.cn

Received: 2012-10-12 Revised: 2012-01-25

Accepted: 2013-03-06 Published online: 2013-03-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of treatment with α -linolenic acid (ALA) on cell proliferation, secretion of types I and III collagen, and α -smooth muscle actin (α -SMA) expression in transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1)-treated rat hepatic satellite cells (HSCs).

METHODS: Cultured HSCs were divided into five groups: control group, TGF- β 1 group (5 ng/mL) and three TGF- β 1 plus ALA groups (treated with TGF- β 1 plus 50, 150 or 250 ng/mL of ALA). Cell proliferation was assessed by MTT assay. The levels of types I and III collagen were measured by ELISA. Western blot was used to detect

the expression of α -smooth muscle actin.

RESULTS: TGF- β 1 induced cell proliferation and increased the secretion of collagen in HSCs. Compared to the TGF- β 1 group, treatment with different doses of ALA inhibited cell proliferation and decreased the secretion of types I and III collagen and expression of α -SMA (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Treatment with ALA inhibits TGF- β 1-induced cell proliferation, secretion of types I and III collagen, and α -SMA expression in rat HSCs.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: α -linolenic acid; Transforming growth factor- β 1; Hepatic satellite cells; Fatty liver fibrosis; Cirrhosis

Wang LJ, Wu JM, Fang HL, Liu Y, Huang ZM. Effect of ALA treatment on cell proliferation, secretion of types I and III collagen, and α -SMA expression in rat hepatic satellite cells treated with transforming growth factor β 1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 804-808 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/804.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.804>

摘要

目的: 探讨 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA)对转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β , TGF- β 1)诱导的肝星状细胞(hepatic satellite cell, HSC)增殖及分泌功能的影响。

方法: 采用活化的HSC作为研究模型, 将传代的细胞分为5组, 以MTT比色法观察ALA对HSC的增殖效应, 以ELISA检测细胞培养上清液中I型及III型胶原的含量, 以Western blot法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达。

结果: TGF- β 1能诱导HSC增殖并促进胶原的分泌, ALA可不同程度抑制TGF- β 1所诱导的HSC增殖及I、III型胶原和 α -SMA的表达($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。

结论: ALA在高浓度时对TGF- β 1能诱导的

■同行评议者

高泽立, 副教授, 周浦医院消化科, 上海交大医学院九院周浦分院

HSC起抑制作用, 可能对脂肪性肝纤维化及其引起的肝硬化有治疗作用。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: α -亚麻酸; 转化生长因子 β 1; 肝星状细胞; 脂肪性肝纤维化; 肝硬化

王莉娟, 吴金明, 方红龙, 刘扬, 黄智铭. α -亚麻酸对转化生长因子 β 1诱导的肝星状细胞的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 804-808 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/804.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.804>

0 前言

目前非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)越来越引起人们的重视, 研究发现约1%-5%的NAFLD患者最终可发展为肝纤维化及肝硬化^[1]. 其中肝星状细胞(hepatic satellite cell, HSC)的活化及增殖发挥了重要作用^[1]. n-3多不饱和脂肪酸有降低血脂、减少炎症细胞因子、减少肝脏丙二酰CoA的量、增强机体免疫功能、对肿瘤的抑制的分泌等生理作用^[2-4], 其中以 α -亚麻酸(α -linolenic acid, ALA)为代表, 但其对肝纤维化的影响研究较少. n-3多不饱和脂肪酸也为游离脂肪酸的组成部分, 可能对脂肪性肝纤维化产生一定影响. 另外转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)可通过HSC内的TGF- β /Smads信号通路促进纤维化的发生发展, 被认为是调控肝纤维化的核心物质, 用TGF- β 1促进增殖可使n-3多不饱和脂肪酸对HSC的作用结果更容易显现. 探讨ALA对TGF- β 1所诱导的HSC增殖和活化的影响不仅有助于了解n-3多不饱和脂肪酸在脂肪性肝纤维化及肝硬化中所起的作用, 还对已进展为肝硬化患者的营养能量的补充具有指导意义。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM培养基及胎牛血清(美国GIBCO公司), α -亚麻酸(美国Sigma产品), MTT(北京索来宝生物公司), 重组人TGF- β 1(美国Pedro Tech公司), 肝星状细胞系HSC2-T6细胞(温州医学院附属第一医院感染内科陈永平教授惠赠), 大鼠I型及III型胶原ELISA试剂盒(美国ADL公司), 大鼠 α -肌动蛋白抗体及内参 β -tubulin(美国Santa Cruz公司)。

1.2 方法

1.2.1 HSC培养: 肝星状细胞系HSC2-T6细胞用

含10%胎牛血清的DMEM培养瓶, 在37℃、5%CO₂条件下培养, 计数及观察细胞活性, 以 1×10^5 /mL的浓度接种于培养瓶中, 以后每2-3 d换液1次。

1.2.2 自身配对设计: 实验分组: A组: 对照组、B组: TGF- β 1 5 ng/mL组、C组: TGF- β 1 5 ng/mL+ALA 50 mmol/L组、D组: TGF- β 1 5 ng/mL+ALA 150 mmol/L组、E组: TGF- β 1 5 ng/mL+ALA 250 mmol/L组。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖: HSC-T6细胞融合成单层后, 取对数生长期细胞, 分别以0.25%胰蛋白酶消化, 并接种至无菌96孔板内, 每次每组4个复孔, 调整细胞接种密度为 1×10^6 /mL, 每孔均加入细胞悬液200 μ L, 置37℃, 5%CO₂培养箱中, 24 h 96孔板内细胞贴壁后, 吸去原培养液, 按分组加入试剂, 每孔再加入无菌MTT溶液(5 mg/mL), 继续在原条件下孵育4 h, 然后终止培养, 吸去孔内培养液, 每孔加入150 μ L的DMSA, 微型振荡器振荡10 min, 选择490 nm波长, 在酶标仪上检测各孔的吸光(A)值, 实验重复4次。

1.2.4 ELISA法检测I型及III型胶原的表达: 收集做MTT时药物处理后的上清液. 按I型及III型胶原ELISA试剂盒操作说明书操作。

1.2.5 Western blot法检测 α -SMA的表达: 各组蛋白标本经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至PVDF膜, 封闭1 h后, 加入 α -肌动蛋白抗体(1:400)和内参 β -tubulin抗体(1:500), 一抗过夜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2500)作用1 h, 电化学发光法检测, 在暗室中X光胶片曝光并冲洗显影, 测定各条带的灰度值, 经内参照 β -tubulin校正后得到蛋白的相对表达量。

统计学处理 数据用mean \pm SD表示, 采用SPSS17.0作One-way ANOVA分析, 两两比较用LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 以MTT法检测HSC细胞增殖 组间比较 $F = 25.07$, $P < 0.01$, 差异有统计学意义. LSD法多重比较可以发现ALA对HSC的增殖有抑制作用(B、C、D、E 4组各组间差异有统计学意义, $P < 0.05$, A组与E组间差异无统计学意义, $P > 0.05$), 并呈剂量依赖性, A组与E组间无统计学差异可能为ALA对HSC的抑制作用与TGF- β 1对HSC的增殖作用相互抵消所致. TGF- β 1对HSC的增殖有促进作用(A组与B、C、D组比较, $P < 0.05$, 表1, 图1)。

■研究前沿

据研究n-3族多不饱和脂肪酸有降低血脂、减少炎症细胞因子、减少肝脏丙二酰CoA含量、增强机体免疫功能等生理作用, 但是否对脂肪性肝纤维化及其引起的肝硬化有治疗作用尚不能明确。

■相关报道

n-3族多不饱和脂肪酸对脂肪肝及其产生的病理危害可能有一定的治疗的作用, 可能与其在肝病早期即对脂质沉积有一定的抑制作用有关, 推测可能与n-3类脂肪酸能抑制NF- κ B及使花生四烯类产物减少有关。

■创新盘点

本文利用体外刺激活化的肝星状细胞,结果表明其可抑制活化细胞的增殖及减少胶原分泌等作用,多方面说明其可能用于肝纤维化的治疗。

表 1 ALA对HSC增殖的影响 (mean ± SD)

分组	A值	F值	P值
A组	0.52 ± 0.62 ^{egi}	25.07	<0.01
B组	1.14 ± 0.16 ^{agik}		
C组	0.98 ± 0.12 ^{aeik}		
D组	0.80 ± 0.75 ^{aegk}		
E组	0.64 ± 0.11 ^{cegi}		

^a $P < 0.05$, ^c $P > 0.05$ vs A组; ^a $P < 0.05$ vs B组; ^a $P < 0.05$ vs C组; ⁱ $P < 0.05$ vs D组; ^k $P < 0.05$ vs E组。ALA: α -亚麻酸; HSC: 肝星状细胞。

表 2 ALA对I型、III型胶原蛋白表达的影响

分组	I型胶原	III型胶原
A组	76.94 ± 11.89 ^{gik}	3.17 ± 0.50 ^{gik}
B组	159.13 ± 20.30 ^{beikm}	6.51 ± 0.79 ^{beikm}
C组	137.29 ± 17.12 ^{degkm}	5.38 ± 0.57 ^{degkm}
D组	115.69 ± 16.16 ^{degim}	4.28 ± 0.4 ^{degim}
E组	95.86 ± 23.11 ^{dgik}	4.39 ± 1.00 ^{dgik}

^b $P < 0.01$ vs A组; ^d $P < 0.01$ vs B组; ^e $P < 0.05$ vs A组; ^g $P < 0.05$ vs B组; ⁱ $P < 0.05$ vs C组; D组与A、B、C、E组比较^k $P < 0.05$; ^m $P < 0.05$ vs E组。ALA: α -亚麻酸。

表 3 Western blot检测 α -SMA的表达

分组	α -SMA灰度值	F值	P值
A组	34.33 ± 13.65	226.31	<0.01
B组	450.00 ± 18.08		
C组	226.33 ± 23.01		
D组	136.05 ± 15.02		
E组	84.67 ± 15.50		

α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白。

2.2 I型及III型胶原蛋白的表达 I型胶原纤维蛋白组间比较, $F = 19.41$, $P < 0.01$, 差异有统计学意义; III型胶原纤维蛋白组间比较, $F = 16.66$, $P < 0.01$, 差异有统计学意义。抑制作用呈剂量依赖性($P < 0.05$)。LSD法多重比较可以发现TGF- β 1可促进HSC分泌I型及III型($P < 0.01$), 而ALA对I型及III型胶原蛋白的分泌均有一定的抑制作用(B、C、D、E 4组各组间差异有统计学意义, $P < 0.05$, A组与E组间差异无统计学意义, $P > 0.05$, A组与E组间无统计学差异可能为ALA对HSC的抑制作用与TGF- β 1对HSC的增殖作用相互抵消所致), 并呈剂量依赖性($P < 0.05$, 表2, 图2, 3)。

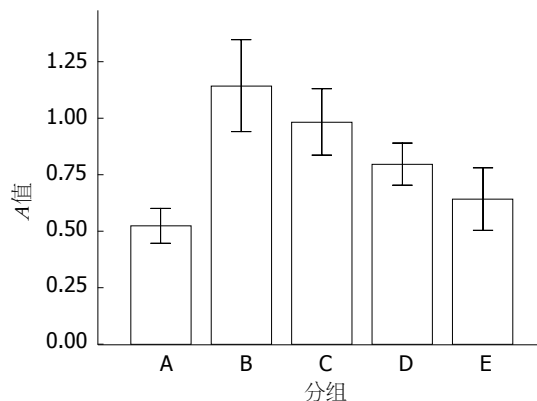


图 1 MTT法检测肝星状细胞增殖。

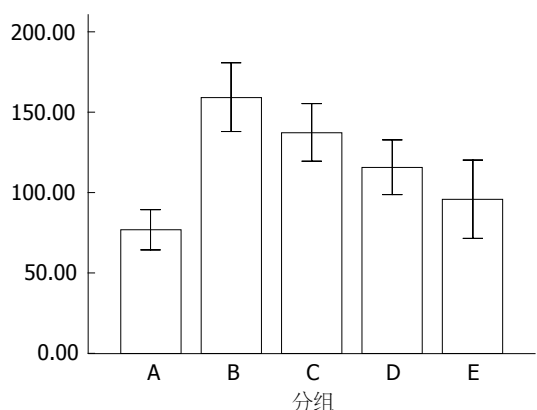


图 2 ELISA法检测I型胶原的表达。

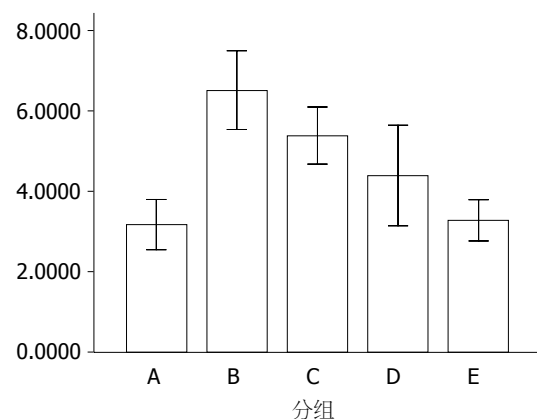
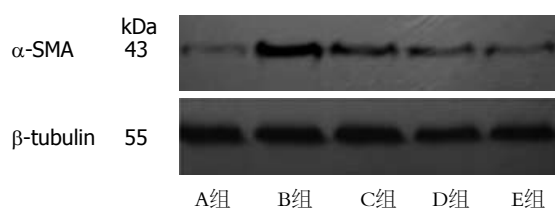


图 3 ELISA法检测III型胶原的表达。

2.3 Western blot检测 α -SMA的表达 α -SMA组间比较 $F = 226.31$, $P < 0.01$, 差异有统计学意义。LSD法检验可以看出TGF- β 1能明显促进HSC表达 α -SMA($P < 0.01$), 经ALA作用后, TGF- β 1诱导的 α -SMA表达受到抑制并呈剂量依赖性($P < 0.05$, 表3, 图4)。

3 讨论

我们的研究结果可证实ALA对在高浓度时对

图4 Western blot检测 α -平滑肌肌动蛋白的表达。

TGF- β 1所诱导的HSC可能起抑制作用,对脂肪性肝纤维化及脂肪性肝硬化可能具有一定治疗作用。TGF- β 1所介导的信号通道被认为在HSC的活化及ECM的产生起重要作用^[5],本实验也证实TGF- β 1可促进HSC的增殖,HSC2-T6肝星状细胞系本身是活化的肝星状细胞系,为使效果更明显,予TGF- β 1再激活。

有研究表明多不饱和脂肪酸(n-3及n-3+n-6)可能不能纠正肝纤维化及脂质沉积^[6]。还有研究发现:n-3族多不饱和脂肪酸对脂肪肝及其产生的病理危害可能有一定的治疗的作用^[7,8],可能与其在肝病早期即对脂质沉积有一定的抑制作用有关^[8],究其机制,推测可能与n-3类脂肪酸能抑制核转录 κ B(nuclear transcription factor, NF- κ B)及使花生四烯类产物减少有关^[2,3]。这提示n-3族多不饱和脂肪酸对脂肪性肝纤维化可能有治疗作用,但对体外HSC的增殖及分泌功能等尚无其他研究成果。因此本实验用MTT法、WB及ELISA法检测ALA对HSC的增值、活化、分泌功能的影响,讨论n-3族多不饱和脂肪酸对脂肪性肝纤维化的作用。

细胞增殖是HSC活化的重要特征之一。MTT法检测结果显示ALA能一定程度的抑制由TGF- β 1诱导的HSC的增殖,并呈浓度依赖性:ALA低浓度时无明显作用;当ALA浓度逐渐升高时可部分抑制HSC的活化,并随着浓度的增高抑制作用增强。

各种原因导致的肝纤维化最后均表现为ECM的增加,星状细胞分泌胶原纤维增加。实验结果提示ALA对HSC分泌胶原纤维有抑制作用,作用随ALA浓度的增加而加强。 α -SMA是HSC活化的标志,活化的HSC表达 α -SMA,表达 α -SMA的多少可一定程度反映HSC的活化程度。高浓度的ALA可使HSC的 α -SMA表达减少,低浓度时作用不明显,说明高浓度时可抑制HSC的活化。

HSC的活化和增殖在脂肪性肝纤维化和肝硬化的发生发展起重要作用。近年来非酒精性

脂肪性肝病发病机制逐渐明确,其中二次打击学说已被普遍认可,以胰岛素抵抗为主的代谢综合征起重要作用^[9]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、TGF- β 、IGF-1等细胞因子刺激并激活HSC,表达 α -SMA活化后以分泌以I型及III型胶原为主的细胞外基质^[10]。已有研究表明:n-3多不饱和脂肪酸的可改善肝脂代谢,能提高肝脏代谢关键酶脂蛋白酶的LDL受体的活性,减少肝内甘油三酯的合成,有直接降脂作用。

NF- κ B是由作为转录因子的Rel家族组成的同二聚体或异二聚体。NF- κ B可阻止TNF- α 所诱导的HSC的凋亡^[11]。NF- κ B的缺失可对活化的HSC凋亡起一定的作用^[12],而n-3族多不饱和脂肪酸可明显降低细胞中NF- κ B的含量^[3],可能与其抑制已活化的HSC的增殖有关。

n-3族多不饱和脂肪酸还能降低细胞膜n-6族不饱和脂肪酸的含量,从而降低n-6族不饱和脂肪酸代谢产物花生四烯类产物等炎症物质的产生^[2],减少对HSC的刺激也可能是n-3族多不饱和脂肪酸对HSC起作用的途径之一。综上所述,n-3族多不饱和脂肪酸可能通过多种途径对HSC的增殖起抑制作用,可能对脂肪性肝纤维化及其引起的肝硬化有治疗作用。

4 参考文献

- 1 Ji G, Zhao X, Leng L, Liu P, Jiang Z. Comparison of dietary control and atorvastatin on high fat diet induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in rats. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 23 [PMID: 21269482 DOI: 10.1186/1476-511X-10-23.]
- 2 Norris JM, Yin X, Lamb MM, Barriga K, Seifert J, Hoffman M, Orton HD, Barón AE, Clare-Salzler M, Chase HP, Szabo NJ, Erlich H, Eisenbarth GS, Rewers M. Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. *JAMA* 2007; 298: 1420-1428 [PMID: 17895458]
- 3 Hardman WE. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J Nutr* 2002; 132: 3508S-3512S [PMID: 12421878]
- 4 Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* (Maywood) 2008; 233: 674-688 [PMID: 18408140 DOI: 10.3181/0711-MR-311.]
- 5 Zhao L, Gandhi CR, Gao ZH. Involvement of cytosolic phospholipase A2 alpha signalling pathway in spontaneous and transforming growth factor-beta-induced activation of rat hepatic stellate cells. *Liver Int* 2011; 31: 1565-1573 [PMID: 22093332 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02632.x.]
- 6 Fernández I, Fontana L, Gil A, Ríos A, Torres MI. Dietary supplementation with monounsaturated

应用要点
ALA可抑制HSC的增殖及分泌,为治疗脂肪性肝纤维化及其所引起的肝硬化提供新的途径。

■同行评价

本文设计合理, 实验方法可信, 统计方法运用合理, 参考文献较新, 值得基础研究者和广大临床医生阅读。

- and long-chain polyunsaturated fatty acids influences the liver structural recovery and hepatocyte binuclearity in female Wistar rats in experimental cirrhosis induced by thioacetamide. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 57: 65-75 [PMID: 16089321]
- 7 Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, Papa G, Rabuazzo AM, Purrello F. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 194-199 [PMID: 18054848]
- 8 González-Pérez A, Horrillo R, Ferré N, Gronert K, Dong B, Morán-Salvador E, Titos E, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Arroyo V, Clària J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J* 2009; 23: 1946-1957 [PMID: 19211925 DOI: 10.1096/fj.08-125674.]
- 9 Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Castella L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-1772 [PMID: 17456850 DOI: 10.2337/db06-1491]
- 10 Yamamoto M, Sumiyoshi H, Nakagami K, Tahara E. Distribution of collagen types I, III, and V in fibrotic and neoplastic human liver. *Acta Pathol Jpn* 1984; 34: 77-86 [PMID: 6328863]
- 11 Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 33: 49-58 [PMID: 10905586]
- 12 Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, Kaneda Y, Fujimoto J. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G631-G639 [PMID: 17640975]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》 (2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊。

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种, 统计到的文献数量共计221177余万篇次, 涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下, 期刊学术水平稳步提升, 编校质量稳定, 再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录。在此, 向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者, 表示衷心地感谢!