

## Fe-NTA诱导的氧应激通过调节Bcl-2家族蛋白及线粒体膜电位影响人肝星状细胞和肝细胞的凋亡

刘梅, 李树杰, 李阳, 解瑞金, 汲书生

刘梅, 李阳, 解瑞金, 汲书生, 山东省济宁市第一人民医院  
消化内科 山东省济宁市 272100

李树杰, 山东省济宁市第一人民医院风湿免疫科 山东省  
济宁市 272100

刘梅, 主治医师, 主要从事肝纤维化及肝炎方面的研究.

**作者贡献分布:** 此课题由刘梅与李树杰设计; 细胞培养、指标检测由刘梅、李阳及李树杰完成; 数据分析由刘梅与解瑞金完成, 论文写作由刘梅、汲书生及李树杰完成.

**通讯作者:** 李树杰, 主治医师, 272100, 山东省济宁市健康路6号, 济宁市第一人民医院风湿免疫科. liumei\_lsj@163.com

收稿日期: 2016-07-09

修回日期: 2016-07-26

接受日期: 2016-08-07

在线出版日期: 2016-09-08

Province, China. liumei\_lsj@163.com

Received: 2016-07-09

Revised: 2016-07-26

Accepted: 2016-08-07

Published online: 2016-09-08

### Abstract

#### AIM

To investigate the influence of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced oxidative stress on apoptosis in human hepatic stellate cells (HSCs) and hepatocytes and investigate the role for Bcl-2 family proteins and mitochondrial membrane potential in this process.

### METHODS

Human hepatic stellate cell line LX-2 and Chang liver cells were used. Fe-NTA of different concentrations was used to induce oxidative stress, and superoxide dismutase (SOD) and methane dicarboxylic aldehyde (MDA) were then measured. After the two types of cells were treated with Fe-NTA, the apoptosis rates were determined by Annexin V-FITC + PI double staining. The change in the activity of intracellular Caspase-3 was detected by colorimetry and the change of mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining. Real-time PCR was applied to evaluate the mRNA expression of anti-apoptotic gene Bcl-2 and apoptosis gene Bax, and Western blot was used to detect the protein expression of Bcl-2 and Bax.

### RESULTS

For both human HSCs and hepatocytes, the

### 背景资料

在各种不同病因导致的慢性肝病中, 肝纤维化是病情发展的必经之路, 想要避免肝病进展为肝硬化甚至肝癌, 必须在肝纤维化阶段就采取有效的治疗, 但是目前对肝纤维化仍没有十分有效的治疗手段.

### 同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科; 朱争艳, 研究员, 天津市第三中心医院

### Ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress influences apoptosis in human hepatic stellate cells and hepatocytes through regulating Bcl-2 family proteins and mitochondrial membrane potential

Mei Liu, Shu-Jie Li, Yang Li, Rui-Jin Xie, Shu-Sheng Ji

Mei Liu, Yang Li, Rui-Jin Xie, Shu-Sheng Ji, Department of Gastroenterology, Ji'ning First People's Hospital, Ji'ning 272100, Shandong Province, China

Shu-Jie Li, Department of Rheumatology, Ji'ning First People's Hospital, Ji'ning 272100, Shandong Province, China

Correspondence to: Shu-Jie Li, Attending Physician, Department of Rheumatology, Ji'ning First People's Hospital, 6 Jiankang Road, Ji'ning 272100, Shandong

## ■ 研究背景

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化发病机制中的重要细胞, 肝纤维化的治疗有以下3个研究方向: 抑制HSC的增殖、抑制HSC的激活、诱导活化的HSC凋亡。

oxidative stress generated by iron load gave rise to a decrease in SOD level and an increase in MDA level, which, compared with the control group, were statistically significant. The oxidative stress induced by Fe-NTA could not initiate apoptosis of HSCs and also failed to decrease the mitochondrial membrane potential of HSCs. However, the activity of intracellular Caspase 3 was reduced, the mRNA and protein expression of anti-apoptotic gene Bcl-2 elevated, and the mRNA and protein expression of apoptotic gene Bax declined. In contrast, the oxidative stress induced by Fe-NTA increased the apoptosis rate of hepatocytes, with Caspase 3 activity gradually rising and mitochondrial membrane potential decreasing. The mRNA and protein expression of anti-apoptotic gene Bcl-2 declined and the mRNA and protein expression of apoptotic gene Bax rose.

## CONCLUSION

Fe-NTA-induced oxidative stress can exert an impact on apoptosis in human HSCs and hepatocytes by regulating Bcl-2 family proteins and mitochondrial membrane potential. Specifically, to inhibit apoptosis of HSCs, Fe-NTA-induced oxidative stress up-regulates Bcl-2 expression, down-regulates Bax expression, maintains mitochondrial membrane potential and reduces the activity of Caspase 3. However, Fe-NTA-induced oxidative stress has an opposite effect on hepatocytes, which initiates apoptosis of hepatocytes.

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Liver fibrosis; Fe-NTA-induced oxidative stress; Hepatic stellate cells; Mitochondrial membrane potential; Apoptosis

Liu M, Li SJ, Li Y, Xie RJ, Ji SS. Ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress influences apoptosis in human hepatic stellate cells and hepatocytes through regulating Bcl-2 family proteins and mitochondrial membrane potential. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(25): 3705-3711 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v24/i25/3705.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i25.3705>

## 摘要

### 目的

研究Fe-NTA诱导的氧应激对人肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)和人肝细胞凋亡的影响, 并明确其机制与Bcl-2家族蛋白及细胞线粒体膜电位变化的关系。

## 方法

采用人肝星状细胞株及人肝细胞株张氏肝, 取不同浓度的次氨基三乙酸铁(Fe-NTA)处理产生氧应激, 测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA); 用Annexin V-FITC+PI双染色法测定Fe-NTA作用后两种细胞的凋亡率; 用比色法检测细胞内Caspase 3活性的改变; 用阳离子荧光染料JC-1染色, 检测细胞内线粒体膜电位的改变; 用RT-PCR检测抗凋亡基因Bcl-2和凋亡基因Bax的mRNA表达情况; 用免疫印迹技术检测Bcl-2和Bax的蛋白表达情况。

## 结果

铁负载产生氧应激后, 两种细胞中SOD水平均下降, MDA含量均升高, 与对照组比较有显著差异; Fe-NTA诱导的氧应激不能使HSC发生凋亡, 亦未能使HSC线粒体膜电位下降, 反而使细胞内Caspase 3活性逐渐降低, 抗凋亡基因Bcl-2的mRNA与蛋白表达水平升高, Bax的mRNA与蛋白表达水平降低; Fe-NTA诱导的氧应激使肝细胞发生凋亡增多, 肝细胞内Caspase 3活性逐渐升高, 同时线粒体膜电位下降, 抗凋亡基因Bcl-2的mRNA与蛋白表达水平降低; Bax的mRNA与蛋白表达水平升高。

## 结论

Fe-NTA诱导的氧应激通过调节Bcl-2家族蛋白及线粒体膜电位影响人肝星状细胞和肝细胞的凋亡, 通过上调Bcl-2表达及下调Bax表达、维持线粒体膜电位不致崩溃、降低Caspase 3活性而抑制肝星状细胞的凋亡, 而对人肝细胞起到相反的作用, 诱导肝细胞凋亡。

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 肝纤维化; 氧应激; 肝星状细胞; 线粒体膜电位; 凋亡

**核心提要:** 诱导肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)发生凋亡是肝纤维化治疗的重要方法之一。本文研究作为肝纤维化的重要发病机制之一的氧应激, 对肝纤维化发生发展的重要细胞-HSC凋亡的影响, 并明确其作用机制。

刘梅, 李树杰, 李阳, 解瑞金, 汲书生. Fe-NTA诱导的氧应激通过调节Bcl-2家族蛋白及线粒体膜电位影响人肝星状细胞和肝细胞的凋亡. *世界华人消化杂志* 2016; 24(25): 3705-3711

URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v24/i25/3705.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v24.i25.3705>

## 0 引言

肝纤维化发病机制的研究中, 不同病因包括病毒、酒精、肥胖、糖尿病、药物及其他代谢异常等引起的肝纤维化都可以通过增加氧应激作为发病的基础机制, 使反应性氧化物(reactive oxygen species, ROS)形成增多和脂肪酸化障碍, 导致肝细胞脂肪贮积及肝纤维化的发生<sup>[1]</sup>. 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化是形成肝纤维化的主要因素<sup>[2]</sup>, 活化的HSC转化为肌纤维母细胞样细胞表型, 产生大量胶原蛋白等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分, 同时通过各种途径阻碍ECM的降解, 加重肝纤维化的程度<sup>[3]</sup>. 氧应激可引起HSC活化, 进而出现ECM的合成和分泌增加、降解减少. 线粒体是氧应激和ROS产生的最大来源, 也是ROS作用的首要靶点.

目前肝纤维化尚无十分有效的治疗手段, 通过诱导细胞凋亡使HSC减少是治疗的策略之一<sup>[4]</sup>. 但是氧应激及脂质过氧化对HSC的凋亡起到何种作用及其内在机制尚不清楚. 目前在临床上保肝药物中, 抗氧化剂的使用较为普遍, 但抗氧化剂对细胞凋亡方面是否有作用尚未见相关报道. 本文在细胞水平研究Fe-NTa诱导的氧应激对人HSC凋亡的影响, 同时以人肝细胞为对照, 明确其作用机制是否与线粒体膜电位的变化及调节Bcl-2家族有关, 为抗氧化剂在治疗肝纤维化和保护肝细胞等方面有更广泛的应用提供新的理论依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝星状细胞株LX-2细胞, 由美国Freidman教授提供, 其表型为活化的HSC; 人肝细胞株张氏肝由中科院上海生命科学研究细胞资源中心提供; 高糖DMEM培养液购自美国GIBCOL公司; BRL PRMI 1640培养基购自美国Gibco公司; 胎牛血清购自美国Hyclone公司; 小牛血清购自北京鼎国生物技术有限公司; 胰蛋白酶购自美国SIGMA公司; 细胞上清液丙二醛检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 细胞裂解液超氧化物歧化酶检测试剂盒-WST购自日本株式会社同仁化学研究

所; MitoCapture<sup>TM</sup>线粒体凋亡检测试剂盒购自美国BioVision公司; Annexin V-FITC+PI凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司; Caspase 3/CPP32比色测定试剂盒购自美国BioVision公司; TRIzol总RNA抽提液购自Invitrogen公司; Oligo dT 18、10 mmol/L dNTP购自Takara公司; M-MLV逆转录酶、RNasin购自美国Promega公司; SYBR Green Realtime PCR试剂盒购自日本东洋纺生物科技有限公司; Bcl-2小鼠抗人、Bax兔抗人单克隆抗体购自Santa Cruz公司; Fe-NTa溶液用0.1 mol/L的FeNO<sub>3</sub>(Sigma公司)和Na<sub>2</sub>NAC(Fluka公司)两种母液混合配制而成, NaHCO<sub>3</sub>调节pH至7.4, 0.22 μmol/L的微孔滤器过滤, 现配现用.

### 1.2 方法

**1.2.1 药物干预:** 取处于对数生长期的肝星状细胞株LX-2细胞和肝细胞株张氏肝细胞, 经胰蛋白酶消化后, 用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养液和含10%小牛血清的1640培养液调至调终浓度为 $2.5 \times 10^5$ /mL的单细胞悬液接种于25 cm<sup>2</sup>的细胞培养瓶中(检测MDA含量用24孔细胞培养板), 置于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜. 24 h后细胞贴壁良好, 换用含0.2%胎牛血清和小牛血清的高糖DMEM培养, 使其生长同步化. 再培养24 h后更换培养液并加入不同浓度的Fe-NTa产生氧应激, 取低、中、高3个浓度, 分别为0.5、1.0、1.5 mmol/L, 同时设空白对照组, 培养24 h后进行以下实验.

**1.2.2 氧应激指标的测定:** (1)检测细胞裂解液中SOD活性: 用刮刀刮下细胞, 冻溶法破碎细胞膜, 制成样品溶液, 用试剂盒检测细胞裂解液中的SOD活性. 本实验重复3次; (2)检测细胞上清液中MDA含量: 细胞接种于24孔细胞培养板, 药物干预24 h后检测细胞上清液中MDA含量. 本实验重复3次.

**1.2.3 细胞凋亡的检测:** 消化细胞移入试管中, 在4 °C 500 g离心10 min沉淀细胞, 弃上清后用冷的PBS洗涤2次. 将收集的细胞重悬于200 μL结合缓冲液中, 加入10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI, 轻轻混匀后避光室温反应15 min. 反应结束后再加入200 μL结合缓冲液, 流式细胞仪上样检测. 本实验重复3次.

**1.2.4 Caspase 3活性的检测:** 制成单细胞悬液, 取适量细胞500 g离心10 min, 弃掉上清液. 用50 μL冷的细胞裂解缓冲液重悬细胞, 并置于

### ■ 相关报道

有相关研究表明, 一些临床应用多年的老药, 如黄连素、维生素D、还原性谷胱甘肽等可通过不同的途径和机制影响HSC, 产生抑制肝纤维化的作用.



■ 创新盘点

氧应激是肝纤维化的重要发病机制之一,可激活HSC,促进纤维化的发生,但氧应激对HSC凋亡的影响和机制却鲜有报道。本研究建立氧应激模型,着重研究氧应激与人HSC凋亡之间的关系,并旨在阐明其内在机制。

表 1 定量PCR引物序列

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (3'→5')	GenBank Number
<i>Bcl-2</i>	GGGAGAACAGGGTACGATAA	GCTGGGAGGAGAAGATGC	NM_000657
<i>Bax</i>	CGCTCACCATCTGGAAGAA	TGTCCCGAAGGAGGTTTATT	NM_138764
<i>β-actin</i>	CTGGCACCCAGCACAAATG	GGACAGCGAGGCCAGGAT	BC016045

冰上孵育30 min, 每5 min振荡1次。10000 g离心1 min, 将上清液转移至新试管中并置于冰上。加50 μL细胞裂解缓冲液稀释蛋白, 再加50 μL 2X反应缓冲液, 最后加底物DEVD-pNA, 使其终浓度为200 mol/L, 置于37 °C反应2 h。用酶联免疫检测仪测量样品在405 nm的吸光度。各测定A值减去背景的A值, 再除以空白对照的A值, 即得到各加药组相对于空白对照组Caspase 3活性升高或降低的倍数。

1.2.5 线粒体膜电位检测: 制成单细胞悬液, 取适量细胞500 g离心10 min, 弃掉上清液。用1 mL稀释为1%的MitoCapture溶液使细胞重悬, 在37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>的孵育箱中孵育15-20 min。500 g离心10 min沉淀细胞并弃上清, 用1 mL预热的孵育液重悬细胞, 立即用流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位。本实验重复3次。

1.2.6 实时荧光定量PCR检测Bcl-2和Bax mRNA表达: 抽提细胞总RNA并用紫外分光光度仪检测RNA纯度和浓度, RNA A<sub>260/280</sub>>1.8。根据GenBank中的基因序列, 采用Primer 5.0引物设计软件设计Bcl-2和Bax的PCR扩增引物(表1), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。将得到的RNA逆转录为cDNA, 再以cDNA为模板进行PCR扩增。根据SYBR Green Realtime PCR试剂盒说明书, 扩增条件为95 °C 60 s, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 共40个循环。结果处理采用相对定量法即以β-actin作为内参照, 同时以对照组作为基准, 用药物干预组目的基因表达量与对照组的比值来表示。

1.2.7 Western bolt检测蛋白水平表达: 抽提细胞总蛋白, 并取少量在分光光度计上测定蛋白浓度, 其余准备Western bolt分析。取蛋白质等量样品与等体积2×加样缓冲液混合, 煮沸变性5 min, 10%浓度的SDS-PAGE 120 V电泳45 min及160 V电泳80 min, 0.65 mA/cm<sup>2</sup>膜面积的电流强度转移至硝酸纤维素滤膜上。加封闭液4 °C过夜封闭, 弃去封闭液后加一抗(各抗体应用浓度: Bcl-2为1 : 3000, Bax为

1 : 3000, GAPDH为1 : 10000, 一抗稀释液为TTBS+5%BSA)室温下孵育2 h。TTBS振荡洗膜3次, 每次15 min。与辣根过氧化物酶标记的二抗(二抗稀释浓度为1 : 5000, 二抗稀释液为TTBS+50 mL/L BSA)室温孵育1 h。TTBS振荡洗膜3次, 每次15 min, 再用TBS漂洗1次。硝酸纤维素膜与配好的ECL试剂反应5 min, 胶片曝光, 显影<sup>[5]</sup>。

统计学处理 所有数据用SAS6.12统计软件进行统计, 数据以mean±SD表示, 采用单因素方差分析, 以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氧应激指标SOD和MDA检测 Fe-NTa干预后使LX-2和张氏肝的SOD活力均较其对照组明显降低, LX-2对照组为0.616 U/mL±0.024 U/mL, Fe-NTa干预组浓度由低到高SOD活力依次为0.487 U/mL±0.016 U/mL, 0.401 U/mL±0.012 U/mL, 0.343 U/mL±0.008 U/mL(与对照组比较P<0.05); 张氏肝对照组为0.525 U/mL±0.012 U/mL, Fe-NTa干预组浓度由低到高SOD活力依次为0.346 U/mL±0.015 U/mL, 0.273 U/mL±0.013 U/mL, 0.198 U/mL±0.006 U/mL(与对照组比较P<0.05)。MDA含量均较对照组明显升高, LX-2对照组为3.648 nmol/mL±0.196 nmol/mL, Fe-NTa干预组浓度由低到高MDA含量依次为5.409 nmol/mL±0.196 nmol/mL, 9.277 nmol/mL±0.303 nmol/mL, 11.406 nmol/mL±0.766 nmol/mL(与对照组比较P<0.05); 张氏肝对照组为1.864 nmol/mL±0.197 nmol/mL, Fe-NTa干预组浓度由低到高MDA含量依次为3.374 nmol/mL±0.142 nmol/mL, 6.271 nmol/mL±0.239 nmol/mL, 9.624 nmol/mL±0.197 nmol/mL(与对照组比较P<0.05)。

2.2 氧应激对两种细胞凋亡的影响 Fe-NTa干预肝细胞后可诱导其凋亡明显增多, 凋亡细胞占全部细胞的百分比在对照组为8.333%±

1.050%, Fe-NTa干预组浓度由低到高凋亡细胞百分数依次20.600%±0.800%, 47.400%±0.702%, 65.400%±0.900%, 各干预组与对照组比较均有统计学意义( $P<0.05$ ). Fe-NTa干预LX-2后不能诱导其发生早晚期凋亡及死亡. 正常细胞占全部细胞的百分比在各干预组与对照组比较无统计学意义( $P>0.05$ ).

**2.3 氧应激对两种细胞Caspase 3活性的影响** 结果发现Fe-NTa诱导的氧应激使LX-2细胞内Caspase 3活性与对照组比较明显下降, 且随Fe-NTa剂量的增加而下降的越明显, 呈现一定的剂量依赖性. 1.5 mmol/L的Fe-NTa使Caspase 3活性降到最低, 为对照组的0.588倍(与对照组比较 $P<0.05$ ). 对比而言, 肝细胞内Caspase 3活性与对照组比较明显升高, 且随Fe-NTa剂量的增加而升高的越明显, 呈现一定的剂量依赖性. 在所选的加样量中, 1.5 mmol/L的Fe-NTa使Caspase 3活性升到最高, 为对照组的3.28倍(与对照组比较 $P<0.05$ ).

**2.4 氧应激对线粒体膜电位的影响** 正常电位的线粒体会吸收荧光染料JC-1, 使其聚集在线粒体内部呈现红色点状荧光, 如线粒体膜电位下降, 则JC-1染料分散在电位较低的细胞质和被破坏的线粒体中, 呈绿色荧光. 用流式细胞仪的FITC通道和PI通道分别可区分发出绿色荧光和红色荧光的细胞. 本研究发现, Fe-NTa干预肝细胞后可引起肝细胞线粒体膜电位下降, 并随着Fe-NTa浓度的增加, 发生线粒体膜电位下降的肝细胞数也增加, 呈现一定的量效关系. 发出绿色荧光的细胞数(即发生线粒体膜电位下降的细胞)占细胞总数的比例分别为10.100%±1.808%、11.430%±1.222%、40.030%±3.233%、73.33%±3.073%, 中、高加药组与对照组比较有显著差异( $P<0.05$ ). Fe-NTa干预后未能引起LX-2的线粒体膜电位下降, 各干预组与对照组比较无统计学意义( $P>0.05$ ).

**2.5 氧应激影响抗凋亡基因Bcl-2和凋亡基因Bax的表达** 实时荧光定量PCR结果发现Fe-NTa诱导的氧应激可升高LX-2抗凋亡基因Bcl-2 mRNA表达的水平, 降低凋亡基因Bax mRNA表达的水平; Western blot检测蛋白表达水平, 发现Bcl-2蛋白表达升高, Bcl-2与GAPDH灰度值的比值分别为0.350±0.014、0.529±0.010、0.660±0.011、0.826±0.007, Bax蛋白

表达降低, Bax与GAPDH灰度值的比值分别为1.145±0.027、0.892±0.025、0.967±0.017、0.729±0.017(与对照组比较 $P<0.05$ ). 相对而言, Fe-NTa诱导的氧应激可降低肝细胞抗凋亡基因Bcl-2 mRNA表达的水平, 升高凋亡基因Bax mRNA表达的水平; Western blot检测蛋白表达水平, 发现Bcl-2蛋白表达降低, Bcl-2与GAPDH灰度值的比值分别为0.547±0.024、0.325±0.007、0.094±0.002、0.025±0.003, Bax蛋白表达升高, Bax与GAPDH灰度值的比值分别为1.222±0.017、1.467±0.007、2.090±0.064、1.634±0.012(与对照组比较 $P<0.05$ ).

### 3 讨论

最近的研究表明肝纤维化和肝硬化是一个可逆的过程<sup>[6]</sup>. 减少炎症因子和诱导活化的HSC发生凋亡可减轻肝纤维化<sup>[4]</sup>. 在肝损伤修复的动物模型中也发现了HSC的凋亡, 由激活的HSC分泌的金属蛋白酶组织抑制剂的表达减少, 解除了对胶原酶活性的抑制使胶原降解增加, 再加上HSC的减少使细胞外基质的分泌减少, 两个原因使细胞外基质降解<sup>[7,8]</sup>. 因此, 抑制HSC活化和增殖、诱导激活的HSC发生凋亡对治疗和预防肝纤维化是重要的<sup>[9]</sup>. 最近有研究证明fas配体<sup>[10]</sup>、内质网应激<sup>[11]</sup>、肿瘤坏死因子相关性凋亡配体<sup>[12]</sup>、激活的库普弗细胞<sup>[13]</sup>等都可引起大鼠HSC发生凋亡. 由慢性肝病引起的人类肝纤维化发生逆转也有少数报道<sup>[14]</sup>. 但是作为脂肪肝和肝纤维化最重要的发病机制之一, 氧应激对HSC凋亡的影响及作用机制尚不甚清楚. 同时, 在正常情况下肝细胞增殖与凋亡维持在动态平衡, 而在病理情况下, 细胞增殖凋亡平衡破坏, 过度凋亡使肝细胞数量减少, 肝脏缩小. 在急性、慢性、病毒性肝炎及肝硬化的研究中也提示肝细胞凋亡导致肝细胞的数目减少是肝脏体积缩小的原因之一<sup>[15]</sup>. 因此我们建立Fe-NTa诱导的氧应激模型, 着重研究氧应激与人肝星状细胞和肝细胞凋亡之间的关系, 并旨在阐明其内在机制.

我们采用铁负载的方法建立氧应激模型, 用Fe-NTa干预细胞<sup>[16]</sup>, 检测SOD和MDA. 通过研究发现所选浓度的Fe-NTa干预细胞后使两种细胞的SOD活力较对照组明显降低, 而MDA含量较对照组明显升高, 并且随药物浓度的增加其变化愈加显著, 呈现出明显的剂量

### 应用要点

氧应激对人HSC存在抗凋亡作用, 机制是通过调节线粒体凋亡途径的Bcl-2家族蛋白、维持线粒体膜电位和降低Caspase 3活性. 由此, 本文作者推测具有抗氧化作用的药物可能通过调节这一通路来达到诱导HSC凋亡, 从而达到治疗肝纤维化的目的.

## ■名词解释

线粒体膜电位: 线粒体在呼吸氧化过程中, 将所产生的能量贮存于线粒体内膜, 形成质子及其他粒子浓度的不对称分布而形成线粒体膜电位。线粒体膜电位下降被认为是细胞凋亡级联反应过程中早期发生的事件, 线粒体膜电位一旦崩溃则细胞的凋亡将不可逆转。

依赖性。这表明我们采用Fe-NTa与两种细胞在体外共同培养引起铁超载, 是较为理想的细胞氧应激模型。氧应激在细胞凋亡中的作用是复杂的, 可通过不同的途径与凋亡的发生有关。另外, 在某些环境下氧应激有抗凋亡的作用, 可能与ROS抑制Caspase的活性或抑制核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)激活以及Bcl-2的表达增多有关。可见, 氧应激在细胞凋亡中的作用是有两面性的<sup>[17,18]</sup>。我们的研究发现所选浓度的Fe-NTa不能诱导HSC发生早晚期凋亡及死亡, 但却可以诱导肝细胞发生凋亡。Novo等<sup>[19]</sup>的研究也发现氧应激不能使完全活化的人星状细胞发生凋亡, 得出与本研究相类似的结果。至于氧应激对细胞凋亡的影响为何会得出互相矛盾的结果, 是否与细胞种类的不同或氧应激的程度轻重存在某种关联有待于更深入的研究<sup>[20]</sup>。

线粒体是氧应激作用的主要靶点。线粒体不但是真核细胞生存不可缺少的细胞器, 他在细胞死亡途径中也起到重要作用<sup>[21]</sup>。在依赖线粒体的凋亡途径中线粒体的膜电位在凋亡早期就会发生明显下降, 释放出线粒体内的细胞色素c, 与Caspase 9共同作用后进一步激活Caspase 3, 导致凋亡的发生。线粒体的膜电位一旦崩溃则细胞的凋亡将不可逆转<sup>[22]</sup>。我们发现各浓度组Fe-NTa干预LX-2后均未能引起HSC的线粒体膜电位下降, 包括对照组在内的各组发生线粒体膜电位下降的细胞数都很少, 不到细胞总数的2%。这表明氧应激抑制了HSC线粒体膜电位下降这一凋亡早期事件。同时发现氧应激使HSC细胞内Caspase 3活性与对照组比较明显下降, 且随Fe-NTa剂量的增加而下降的越明显, 呈现一定的剂量依赖性。这表明氧应激抑制了HSC中凋亡效应酶Caspase 3的活性。氧应激使HSC并未发生线粒体膜电位的下降, 也没有发生Caspase 3活性的增加, 反而氧应激使Caspase 3的活性呈下降趋势, 由此我们认为氧应激对于HSC有抗凋亡作用, 并且推测此抗凋亡作用是通过维持HSC的线粒体膜电位产生的。相反, Fe-NTa诱导产生的氧应激可使人肝细胞线粒体膜电位下降、Caspase 3活性增加, 从而凋亡增多。

为了解氧应激对细胞凋亡影响的上游事件, 我们进一步检测Bcl-2家族蛋白表达情况的变化。Bcl-2家族的凋亡蛋白由抑制凋亡蛋白和

促进凋亡蛋白两类蛋白质所组成, 其中Bcl-2主要分布在线粒体膜与细胞质中, 阻止细胞凋亡一切早期征象的发生, 包括 $\Delta\Psi$ m下降, Caspase蛋白激活等; 而Bax则分布于细胞质中, 具有促进细胞凋亡的作用<sup>[23]</sup>。有人发现Bcl-2基因沉默的细胞对TNF诱导的凋亡敏感性增加, 在丙肝导致的肝硬化患者的肝星状细胞中发现Bcl-2显著表达<sup>[19]</sup>, 这表明Bcl-2是调节线粒体途径凋亡的主要抗凋亡蛋白。本研究发现Fe-NTa诱导的氧应激可升高HSC中Bcl-2 mRNA表达和蛋白表达水平, 同时降低凋亡基因Bax的mRNA表达和蛋白表达, 而对人肝细胞起到相反的影响。因此认为, 氧应激维持HSC正常的线粒体膜电位但却使肝细胞线粒体膜电位下降是通过调节线粒体凋亡途径的Bcl-2家族蛋白起作用的。

由此我们证明了Fe-NTa诱导的氧应激对人HSC存在抗凋亡作用的同时可促使人肝细胞凋亡增加, 并且其内在机制是通过调节线粒体凋亡途径的Bcl-2家族蛋白来阻止人肝星状细胞凋亡征象的发生, 包括维持HSC线粒体膜电位和降低Caspase 3活性, 同时通过下调Bcl-2表达上调Bax表达、诱使线粒体膜电位下降、升高Caspase 3活性来促使人肝细胞凋亡增加。由此, 我们推测抗氧化剂类药物可能具有通过调节Bcl-2家族蛋白和影响细胞的线粒体膜电位的途径来达到诱导肝星状细胞凋亡增加, 保护肝细胞凋亡减少的作用, 从而达到治疗肝纤维化的目的, 为我们下一步的研究奠定了理论基础, 并为临床上更好的治疗肝纤维化提供了理论依据。

## 4 参考文献

- Shiha G, Sarin SK, Ibrahim AE, Omata M, Kumar A, Lesmana LA, Leung N, Tozun N, Hamid S, Jafri W, Maruyama H, Bedossa P, Pinzani M, Chawla Y, Esmat G, Doss W, Elzanaty T, Sakhuja P, Nasr AM, Omar A, Wai CT, Abdallah A, Salama M, Hamed A, Yousry A, Waked I, Elshahar M, Fateen A, Mogawer S, Hamdy H, Elwakil R. Liver fibrosis: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL). *Hepatol Int* 2009; 3: 323-333 [PMID: 19669358 DOI: 10.1007/s12072-008-9114-x]
- Kukla M. Angiogenesis: a phenomenon which aggravates chronic liver disease progression. *Hepatol Int* 2013; 7: 4-12 [PMID: 26201617 DOI: 10.1007/s12072-012-9391-2]
- Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 425-456



- [PMID: 21073339 DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130246]
- 4 Kisseleva T, Brenner DA. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S84-S87 [PMID: 16958681 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2006.04584.x]
  - 5 Wang SY, Tseng CP, Tsai KC, Lin CF, Wen CY, Tsay HS, Sakamoto N, Tseng CH, Cheng JC. Bioactivity-guided screening identifies pheophytin a as a potent anti-hepatitis C virus compound from *Lonicera hypoglauca* Miq. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385: 230-235 [PMID: 19450556 DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.043]
  - 6 Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology* 2006; 43: S82-S88 [PMID: 16447275 DOI: 10.1002/hep.20974]
  - 7 Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; 48: 548-557 [PMID: 11247901]
  - 8 Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 11069-11076 [PMID: 11796725 DOI: 10.1074/jbc.M111490200]
  - 9 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669 [PMID: 18471545 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003]
  - 10 Cariers A, Reinehr R, Fischer R, Warskulat U, Häussinger D. c-Jun-N-terminal kinase dependent membrane targeting of CD95 in rat hepatic stellate cells. *Cell Physiol Biochem* 2002; 12: 179-186 [PMID: 12297723]
  - 11 De Minicis S, Candelaresi C, Agostinelli L, Taffetani S, Saccomanno S, Rychlicki C, Trozzi L, Marzoni M, Benedetti A, Svegliati-Baroni G. Endoplasmic Reticulum stress induces hepatic stellate cell apoptosis and contributes to fibrosis resolution. *Liver Int* 2012; 32: 1574-1584 [PMID: 22938186 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2012.02860.x]
  - 12 Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* 2003; 37: 87-95 [PMID: 12500193 DOI: 10.1053/jhep.2003.50002]
  - 13 Fischer R, Cariers A, Reinehr R, Häussinger D. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology* 2002; 123: 845-861 [PMID: 12198711]
  - 14 Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol* 2004; 40: 860-867 [PMID: 15094237 DOI: 10.1016/j.jhep.2004.03.007]
  - 15 Alarifi S, Ali D, Al-Doaiss AA, Ali BA, Ahmed M, Al-Khedhairy AA. Histologic and apoptotic changes induced by titanium dioxide nanoparticles in the livers of rats. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 3937-3943 [PMID: 24143098 DOI: 10.2147/IJN.S47174]
  - 16 Ye SF, Hou ZQ, Zhang QQ. Protective effects of *Phellinus linteus* extract against iron overload-mediated oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Phytother Res* 2007; 21: 948-953 [PMID: 17602436 DOI: 10.1002/ptr.2182]
  - 17 Pessayre D, Berson A, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 57-69 [PMID: 11296697]
  - 18 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84 [PMID: 16978905 DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001]
  - 19 Novo E, Marra F, Zamara E, Valfrè di Bonzo L, Monitillo L, Cannito S, Petrai I, Mazzocca A, Bonacchi A, De Franco RS, Colombatto S, Autelli R, Pinzani M, Parola M. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut* 2006; 55: 1174-1182 [PMID: 16423888 DOI: 10.1136/gut.2005.082701]
  - 20 Lin HJ, Tseng CP, Lin CF, Liao MH, Chen CM, Kao ST, Cheng JC. A Chinese Herbal Decoction, Modified Yi Guan Jian, Induces Apoptosis in Hepatic Stellate Cells through an ROS-Mediated Mitochondrial/Caspase Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011: 459531 [PMID: 20976079 DOI: 10.1155/2011/459531]
  - 21 Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 143-183 [PMID: 17029566 DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105122]
  - 22 Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 170-177 [PMID: 10816121]
  - 23 Volkmann N, Marassi FM, Newmeyer DD, Hanein D. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death Differ* 2014; 21: 206-215 [PMID: 24162659 DOI: 10.1038/cdd.2013.153]

# 同行评价

本文立意较新颖,有一定的学术意义,实验设计比较科学、精密,结论较可靠,讨论较深入,有一定的学术价值。

编辑: 于明茜 电编: 胡珊





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
8226 Regency Drive, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

