

去甲斑蝥素对 LPS 诱导的体外培养的肝细胞损伤的保护作用

周钧¹, 王琴², 王群伟¹, 段文斌¹

(中南大学湘雅二医院 1. 微创外科中心; 2. 妇产科, 长沙 410011)

[摘要]目的: 通过体外观察去甲斑蝥素(NCTD)对LPS所致肝细胞损伤和TNF- α 表达的影响, 探讨NCTD的作用及其机制。方法: 胶原酶IV灌流分离培养大鼠肝细胞, 将细胞分为对照组、LPS组、NCTD组。对照组用无血清DMEM培养, LPS组用LPS(40 mg/L)诱导, NCTD组用不同浓度NCTD(0.5, 1.0, 2.5 μ g/mL)与LPS(40 mg/L)共同作用, 各组作用时间均为24 h。MTT法检测肝细胞的增殖情况、测定培养上清液乳酸脱氢酶(LDH)含量, ELISA法检测TNF- α 和IL-6表达。结果: LPS(40 mg/L)作用于原代培养大鼠肝细胞24 h后, 与对照组相比, 细胞生长抑制率达27%, 培养上清液LDH含量增加20倍, TNF- α 和IL-6的表达以及NF- κ B DNA结合活性均明显增加($P < 0.05$)。给予不同浓度NCTD后, 培养上清液LDH, TNF- α 和IL-6的含量及NF- κ B DNA结合活性均明显下降, 且呈量效关系。结论: NCTD拮抗LPS所致的肝细胞损伤, 其保护作用的机制可能与其抑制TNF- α 和IL-6的表达有关。

[关键词] 去甲斑蝥素; 肝细胞; LPS; TNF- α

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.03.013

Effects of norcantharidin on lipopolysaccharide-induced hepatocyte injury in vitro

ZHOU Jun¹, WANG Qin², WANG Qunwei¹, DUAN Wenbin¹

(1. Department of Minimal Invasive Surgery; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT

Objective: To study the effects of norcantharidin (NCTD) on lipopolysaccharide (LPS)-induced hepatocyte injury and the expression of TNF- α and IL-6 in vitro.

Methods: Hepatocytes were isolated from male Sprague-Dawley rats by collagenase perfusion. LPS at concentration of 40 mg/L was used to induce injury to the cultured cells, and NCTD (0.5, 1.0, 2.5 μ g/mL) was added at the same time. After 24 h of incubation, the cell proliferation rates were detected by MTT. LDH, TNF- α and IL-6 were measured by appropriate reagent kits. NF- κ B DNA binding activity was measured.

Results: 40 mg/L LPS caused a 27% growth inhibition in primary hepatocytes. LDH leakage was 20-fold higher in NCTD-treated hepatocytes than in normal ones. TNF- α and IL-6 expression significantly increased. In cells treated with NCTD at doses of 0.5, 1.0 and 2.5 μ g/mL, LDH leakage, TNF- α and IL-6 expression, and NF- κ B DNA binding activity were attenuated in a dose dependent manner.

Conclusion: NCTD protects hepatocytes from injury induced by LPS; the protection is associated with suppression of the inflammatory cytokine TNF- α and IL-6.

KEY WORDS

norcantharidin; hepatocytes; lipopolysaccharide; TNF- α

收稿日期 (Date of reception): 2011-02-18

作者简介 (Biography): 周钧, 博士, 主治医师, 主要从事肝胆胰外科方面的研究。

通信作者 (Corresponding author): 王琴, Email: wangqiner2004@163.com

肝脏是人体生物转化和解毒最重要的脏器, 同时与肠道存在密切的血供联系。因此, 在机体发生严重感染、休克、严重创伤等情况下, 肝脏也首当其冲面临来自肠道的细菌和毒素的侵袭^[1]。肝脏在机体清除大肠杆菌等产生的内毒素过程中具有重要作用, 而内毒素中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)成分与其受体结合后又可通过多种途径引起肝细胞损伤^[2-3]。随着内毒素信号通路的研究进展, 使用药物阻断早期肝细胞损伤的研究已成为一种趋势。

去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是斑蝥素的重要衍生物, 是一种特异性蛋白磷酸酶抑制剂, 在既往研究^[4]中被证实具有抗癌、抗纤维化、抗炎等多种生物学活性。但NCTD对抗内毒素对机体损伤的作用未见报道。本研究通过体外观察NCTD对LPS所致肝细胞损伤以及对TNF- α 和IL-6表达的影响, 探讨NCTD的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性SD大鼠购于上海西普尔-比凯实验动物有限公司, 体质量约200 g, 合格证SCXK(沪)2003-000; LPS, NCTD和胶原酶IV均购于美国Sigma公司; LPS(美国Sigma公司产品)以三蒸水配制成2 g/L储存液, 分装冻存于-20℃, 临用前用培养液稀释至终浓度; 槲皮素(美国Sigma公司产品)用DMSO配制成10 mmol/L储存液, 1周内使用, 临用前用培养液稀释至终浓度; NF- κ B p65检测试剂盒为美国Sigma公司产品; TNF- α 和IL-6 ELISA检测试剂盒购于美国Biosource公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原代肝细胞分离及培养

取雄性SD大鼠1只, 3%戊巴比妥麻醉, 无菌条件下打开腹腔, 按文献[5]采用0.5 g/L胶原酶IV两步法原位灌流消化分离肝细胞, 台盼蓝染色计数细胞活力>85%, 含10%FBS和20 U/L胰岛素的DMEM培养液(Gibco)洗涤后重悬细胞, 并调整密度至 1×10^8 /L, 接种于鼠尾胶包被的培养板。第2天换液, 去除未贴壁的细胞。细胞贴壁48 h后状态良好成多边形, 细胞较大, 胞质丰富, 核仁明显, 部分细胞片状融合, 可以用于实验。

1.2.2 LPS对原代培养大鼠肝细胞损伤作用及槲皮素的作用

细胞贴壁48 h后更换不含胰岛素的DMEM培养液, LPS组加入终浓度为40 mg/L LPS诱导肝细

胞损伤; 另设空白对照组。加入终浓度为0.5, 1.0, 2.5 μ g/mL的NCTD进行干预, 分别命名为N0.5, N1.0, N2.5组。孵育24 h后进行检测。

1.2.2.1 MTT实验

按上述分组接种肝细胞于96孔板, 每组设6复孔, 孵育24 h后每孔加5 g/LMTT试剂20 μ L, 孵育4 h后小心吸干培养液, 每孔加150 μ L DMSO并振荡30 min溶解沉淀, 于酶标仪490 nm处读取吸光度值, 根据公式: 抑制率=(1-处理组吸光度值/对照组吸光度值) \times 100%, 计算肝细胞生长抑制率^[6]。

1.2.2.2 LDH含量测定

按如上所述分组接种肝细胞于24孔板, 每组设6复孔, 孵育24 h后吸取各孔培养上清液0.5 mL, 在全自动生化仪上测定各组细胞培养上清液中LDH含量。

1.2.2.3 培养上清TNF- α 和IL-6蛋白ELISA检测

按如上所述分组接种肝细胞于96孔板, 每组设6复孔, 孵育24 h后吸取培养上清液, 按试剂盒说明书操作, 每孔加培养上清50 μ L, 并做标准曲线, 经与抗体孵育2 h, 生物素亲和素放大30 min, 加显色液20 min终止后, 于酶标仪490 nm处读取数据, 根据标准曲线计算各孔TNF- α 和IL-6的浓度。

1.2.2.4 细胞核内NF- κ B活性的测定

结合反应的混合物(总体积15 μ L)在室温孵育20 min后, 于8%非变性的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析。电泳后, 凝胶用凝胶干燥器(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)干燥, 并于-70℃下用增感屏和X线片曝光。结合带用生物影象分析系统(Millipore Co. Imaging System, Ann Arbor, MI), 以光密度扫描法定量测定, $A_{450\text{ nm}}$ 值代表被测样品活性。

1.3 统计学处理

用SPSS 11.5统计学软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因方差分析, 均数的两两比较采用 t 检验; $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长状态

各组细胞边缘整齐, 细胞质均匀, 没有黑点或斑, 显示各组细胞均生长良好(图1)。

2.2 细胞生长抑制率

LPS组肝细胞生长抑制率达29.0%, 与对照组相比, 抑制率显著升高($P < 0.05$); 而加入2.5 μ g/mL

NCDT 可使细胞生长抑制率降至 7.1%, 与 LPS 相比较, 抑制率明显降低 ($P<0.05$), 且 0.5~2.5 $\mu\text{g/mL}$ NCDT 降低 LPS 所致抑制肝细胞生长的效应呈量效关系 ($P<0.05$, 图 2)

2.3 细胞培养上清液中 LDH 含量

40 mg/L LPS 作用 24 h 后, 肝细胞培养上清 LDH 含量与对照组比较显著升高 ($P<0.05$), 0.5,

1.0, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ NCDT 干预后 LDH 含量明显下降, 且呈量效关系 ($P<0.05$, 图 3)。

2.4 细胞培养上清中 TNF- α 和 IL-6 的含量

LPS(40 mg/L) 刺激肝细胞后, 细胞培养液中 TNF- α 和 IL-6 均明显增加 ($P<0.05$), NCDT(0.5~2.5 $\mu\text{g/mL}$) 可降低 LPS 所致的培养上清液中 TNF- α 和 IL-6 的增加 ($P<0.05$, 图 4), 且呈量效关系。

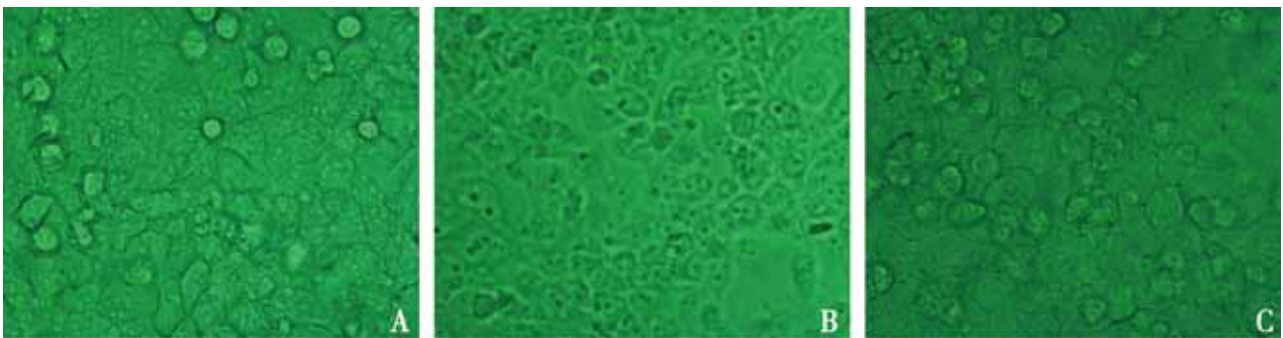


图 1 光镜下各组细胞的生长状态。A: 对照组; B: LPS 组; C: N2.5 组。

Figure 1 Light microscope showing the growth status of hepatocytes in groups. A: Control group; B: LPS group; C: N2.5 group.

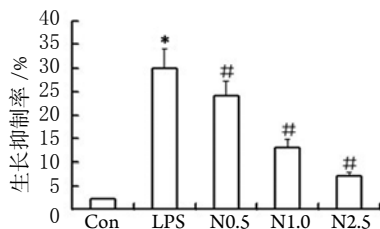


图 2 各组肝细胞生长抑制率 ($n=6, \bar{x} \pm s$)。与对照组比较, $^*P<0.05$; 与 LPS 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

Figure 2 Growth inhibition of hepatocytes in groups ($n=6, \bar{x} \pm s$). $^*P<0.05$ vs the con group; $^{\#}P<0.05$ vs the LPS group.

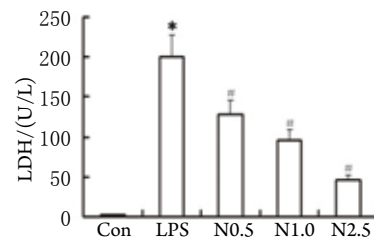


图 3 各组肝细胞培养上清液中 LDH 含量 ($n=6, \bar{x} \pm s$)。与对照组比较, $^*P<0.05$; 与 LPS 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

Figure 3 Comparison of LDH in supernatant among the groups ($n=6, \bar{x} \pm s$). $^*P<0.05$ vs the con group; $^{\#}P<0.05$ vs the LPS group.

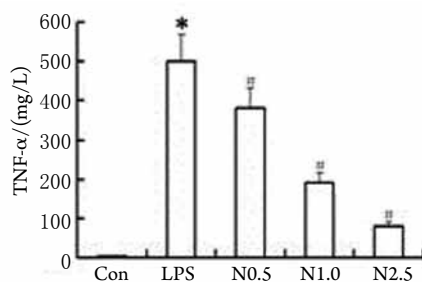
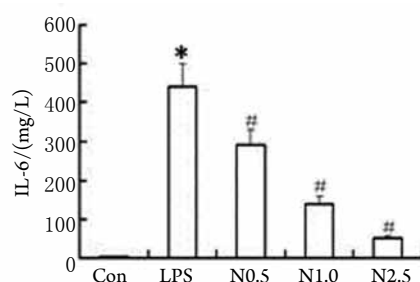


图 4 肝细胞培养上清 TNF- α 和 IL-6 含量 ($n=6, \bar{x} \pm s$)。与对照组比较, $^*P<0.05$; 与 LPS 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

Figure 4 Comparison of TNF- α and IL-6 in supernatant among the groups ($n=6, \bar{x} \pm s$). $^*P<0.05$ vs the con group; $^{\#}P<0.05$ vs the LPS group.



2.5 NF- κ B DNA 结合活性

LPS(40 mg/L) 刺激后, 肝细胞核内 NF- κ B DNA 活性明显增加 ($P<0.05$), NCDT(0.5~2.5 μ g/mL) 对 NF- κ B DNA 活性具有抑制作用且呈量效关系 ($P<0.05$, 图 5)。

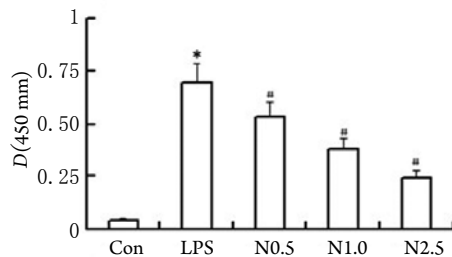


图 5 NF- κ B DNA 结合活性 ($n=6, \bar{x} \pm s$)。与对照组比较, $^*P<0.05$; 与 LPS 组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

Figure 5 NF- κ B DNA binding activity ($n=6, \bar{x} \pm s$). $^*P<0.05$ vs the con group; $^{\#}P<0.05$ vs the LPS group.

3 讨论

斑蝥素是一种强效丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 1 和 2A 抑制剂, 主要对细胞周期产生影响, 诱导细胞凋亡, 影响癌细胞蛋白质的合成过程, 具有抗肿瘤特性。NCDT 是来源于斑蝥属 (*mylabris phalerata pall*) 去甲基化形式的斑蝥素, 分子式为 $C_8H_8O_4$, 相对分子质量为 168.14, 是更容易合成、毒性更低、同时保留抗癌活性的斑蝥素衍生物^[5]。NCDT 作用靶点多, 作用机制复杂。研究^[6]发现: 斑蝥素可明显抑制高转移卵巢癌细胞株 (HO-8910PM 细胞) Smad3 和 NF- κ Bp65 的表达, 并可能通过进一步降低调控肿瘤转移相关靶基因 VEGF、尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂 (uPA), 黏着斑激酶 (FAK) 及 TGF- β 1 的表达水平, 促进 HO-8910PM 细胞凋亡, 抑制其生长和侵袭转移能力。NCDT 还可以通过影响肿瘤转移和基质溶解相关基因蛋白的表达, 维持基质金属蛋白酶 2/ 基质金属蛋白酶抑制因子 (MMP2/TIMP) 动态平衡, 降低细胞外基质和基底膜的降解和破坏, 从而发挥抑制癌细胞侵袭和转移的作用^[6-9]。但 NCDT 对 LPS 损伤原代培养的肝实质细胞有何影响, 目前研究尚少。在本研究中, 40 mg/L LPS 作用于原代培养大鼠肝细胞 24 h 后, 与对照组相比, 细胞生长抑制率达 29%, 培养上清液 LDH 含量增加 19 倍。给予 0.5, 1.0, 2.5 μ g/mL NCDT 后, 反映细胞损伤各项指标: 上清液中 LDH, TNF- α 和 IL-6 的含量及细胞核内 NF- κ B

DNA 结合活性均有明显改善, 且呈量效关系。这表明 NCDT 对 LPS 所致肝细胞损伤有明确的保护作用, 且提示 NCDT 在 2.5 μ g/mL 时保护作用明显, 使用时应控制剂量。

TNF- α 已是公认的最主要的炎症因子之一, 不仅可以直接作用于肝细胞表面的 TNF- α 受体, 对其造成损伤, 还可以通过诱导各种炎症细胞趋化因子、细胞间黏附分子、血管黏附分子的生成, 将损伤作用进一步放大^[10-11]。IL-6 可由淋巴细胞及非淋巴细胞产生, 在调节免疫应答、急性期反应、促进骨髓造血等方面均具有重要作用, IL-6 可增加 TNF- α 的效应, 作为炎症介质被认为是 TNF- α 的某些生物效应的放大因子。本实验也显示 LPS 诱导肝细胞损伤后 TNF- α 和 IL-6 的表达明显增加, 而 NCDT 可使 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达上调受到抑制, 这可能与抑制 NF- κ B 活性有关。

参考文献

1. Efstathopoulos N, Tsaganos T, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. Early apoptosis of monocytes contributes to the pathogenesis of systemic inflammatory response and of bacterial translocation in an experimental model of multiple trauma[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 145(1): 139-146.
2. Zhou Z, Wang L, Song Z, et al. Abrogation of nuclear factor-kappa B activation is involved in zinc inhibition lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production and liver injury[J]. Am J Pathol, 2004, 164(5): 1547-1556.
3. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoi[J]. J Clin Invest, 2006, 116(5): 1317-1326.
4. 刘伏友, 孙岩, 孙林, 等. 去甲基斑蝥素对 TGF- β 1 诱导的人近端肾小管细胞上皮间质转分化以及转录因子 Snail1 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(11): 952-957.
LIU Fuyou, SUN Yan, SUN Lin, et al. Effect of norcantharidin on inhibition of tubular epithelial-mesenchymal transition and downregulation of snail1 in hk-2 induced by TGF- β 1[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western, 2009, 10(11): 952-957.
5. Tsauer W, Lin JG, Lin PY, et al. The effects of cantharidin analogues on xanthine oxidase [J]. Anticancer Research, 1997, 17(3C): 2095-2098.
6. 何太平, 莫丽儿, 梁念慈. 斑蝥素对高转移卵巢癌细胞 HO-8910PM 中 NF- κ B (P65)、FAK 表达及 FAK 磷酸化水平的影响[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(6): 698-701.
HE Taiping, MO Lier, LIANG Nianci. Effect of cantharidin on expression of NF- κ B (P65) and FAK and phosphorylation level of FAK

- of highly metastatic ovarian carcinoma HO-8910P M cells[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2005, 21(6): 698-701.
7. 何太平, 何振辉, 莫丽儿, 等. 斑蝥素抑制 NF- κ B(P65) 及 Smad3 在高转移卵巢癌细胞株 HO-8910PM 中的表达[J]. 广东医学院学报, 2005, 23(2): 111-114.
HE Taiping, HE Zhenhui, MO Lier, et al. cantharidin inhibits expression of NF- κ B(P65) and Smad3 in highly metastatic ovarian carcinoma HO-8910PM cells [J]. Academic Journal of Guangzhou Medical College, 2005, 23(2): 111-114.
 8. 范跃祖, 赵泽明, 傅锦业, 等. 去甲斑蝥素对荷瘤裸鼠胆囊癌移植瘤的抗癌作用机制[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(9): 618-622.
FAN Yuezhu, ZHAO Zeming, FU Jinye, et al. Anti-tumor mechanism onorcantharidin for the implanted tumors of human gallbladder carcinoma in nude mice in vivo[J]. Chinese Journal of Surgery, 2006, 44(9): 618-622.
 9. Fan YZ, Fu JY, Zhao ZM, et al. Effect of norcantharidin on proliferation and invasion of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11 (16): 2431-2437.
 10. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease[J]. J Pathol, 2008, 214(2): 149-160.
 11. Tukov FF, Luyendyk JP, Ganey PE, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide/ranitidine-induced inflammatory liver injury[J]. Toxicol Sci, 2007, 100(1): 267-280.
- (本文编辑 郭征)

欢迎订阅 2012 年《中南大学学报(医学版)》

《中南大学学报(医学版)》原名《湖南医科大学学报》，创刊于 1958 年，为教育部主管、中南大学主办的医药卫生类综合性学术期刊。该刊已被美国医学文献分析和联机检索系统(Medline, Pubmed)及其《医学索引》(IM)、荷兰《医学文摘》(EM)、美国《化学文摘》(CA)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)、中国科学引文数据库(核心库)(CSCD)等国内外多家重要数据库和权威文摘期刊收录；是中国科技论文统计源期刊、中文核心期刊及中国期刊方阵“双效”期刊；为“第 2 届、第 3 届中国高校精品科技期刊”、“2008 年中国精品科技期刊”和湖南省“十佳科技期刊”。

本刊为月刊，国际标准开本(A4 幅面)，每月月末出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷，图片彩色印刷。定价 20 元/册，全年 240 元。国内外公开发行。国内统一刊号：CN43-1427/R，国际标准刊号：ISSN 1672-7347；国内邮发代号：42-10，国外邮发代号：BM422；欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅，漏订或需增订者也可直接与本刊编辑部联系订阅。

欢迎投稿

地址：湖南省长沙市湘雅路 110 号湘雅医学院 75 号信箱
电话：0731-84805495, 0731-84805496
Email: xyxb2005@vip.163.com, xyxb2005@126.com

欢迎订阅

邮编：410078
传真：0731-84804351

Http://www.csumed.org; www.csumed.com; www.csumed.net
Http://xyxb.csu.edu.cn