

绿原酸对肝星状细胞增殖、细胞外基质生成及降解的影响*

史海涛, 师阿盟, 商博鑫, 王燕, 董蕾, 戴菲

西安交通大学医学院第二附属医院 消化内科(西安 710004)

【摘要】 目的 研究绿原酸(CGA)对肝星状细胞增殖、胶原蛋白(Collagen) I、Collagen III、基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达及分泌的影响。**方法** 体外培养大鼠肝星状细胞株 HSC-T6, 随机分为 5 组: 阴性对照组、血小板衍生生长因子(PDGF)组、PDGF+CGA (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组、PDGF+CGA (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组和 PDGF+CGA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组。干预 24 h 后, MTT 法检测 HSC-T6 的增殖情况; RT-PCR 检测 Collagen I、Collagen III、TIMP-1 及 MMP-2 mRNA 表达; ELISA 检测细胞上清液中 Collagen I、Collagen III、TIMP-1 及 MMP-2 的蛋白含量。**结果** CGA 可明显抑制 PDGF 诱导的肝星状细胞增殖($P < 0.05$), 且随着剂量的增加, 抑制作用逐渐增强($P < 0.05$); CGA 可明显抑制 PDGF 诱导的 Collagen I、Collagen III、TIMP-1 的表达和分泌($P < 0.05$), 但对 MMP-2 的表达和分泌无明显影响。**结论** CGA 可通过抑制肝星状细胞增殖及细胞外基质合成、促进细胞外基质降解来发挥抗肝纤维化作用。

【关键词】 绿原酸 肝星状细胞 增殖 细胞外基质

Effect of Chlorogenic Acid on Hepatic Stellate Cell Proliferation, Generation and Degradation of Extracellular Matrix

SHI Hai-tao, SHI A-meng, SHANG Bo-xin, WANG Yan, DONG Lei, DAI Fei. Department of Gastroenterology, Second Affiliate Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of chlorogenic acid (CGA) on hepatic stellate cell proliferation and the expression and secretion of Collagen I, Collagen III, tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). **Methods** An immortalized rat hepatic stellate cell (HSC) line was cultured *in vitro*. The cells were divided into 5 groups: control group; platelet-derived growth factor (PDGF) (10 ng/mL), PDGF+CGA (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PDGF+CGA (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PDGF+CGA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and CGA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) group. After 24 hours treatment, the proliferation of HSC was detected by MTT method. The mRNA expression of Collagen I, Collagen III, TIMP-1 and MMP-2 were detected by RT-PCR. The protein levels of Collagen I, Collagen III, TIMP-1 and MMP-2 in the culture supernatant of HSC were measured by ELISA.

Results PDGF increased the hepatic stellate cell proliferation, the mRNA expression and the protein levels of Collagen I, Collagen III and TIMP-1 ($P < 0.05$), which were significantly decreased by CGA ($P < 0.05$). However, CGA had no significant influence on the expression of MMP-2. **Conclusion** The antifibrotic effect of CGA may be related with the inhibition of hepatic stellate cell proliferation and generation of extracellular matrix and promotion of extracellular matrix degradation.

【Key words】 Chlorogenic acid Hepatic stellate cell Proliferation Extracellular matrix

肝纤维化以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过量沉积为主要特点,是各种慢性肝病发展的共同病理过程^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是产生 ECM 的最主要细胞,其被激活后大量增殖并分泌胶原形成 ECM^[2]。ECM 由胶原、非胶原糖蛋白、弹性蛋白、蛋白聚糖及氨基聚糖组成,主要由基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)降解,基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases,

TIMPs)是 MMPs 抑制剂,其主要抑制 MMPs 的活性^[3]。在肝纤维化的发病机制中,血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是 HSC 增殖最重要的丝裂原,其可明显促进 HSC 增殖,且可促进 HSC 合成分泌胶原蛋白(Collagen) I Collagen III 及 TIMP-1,促进 ECM 的生成,抑制 ECM 的降解^[4]。研究表明,饮用咖啡可降低肝纤维化的发生风险^[5],但具体作用机制及何种成分发挥作用尚不清楚。绿原酸(chlorogenic acid, CGA)是咖啡中含量丰富的一种多酚,具有明显的抗炎抗氧化活性^[6,7]。本课题组前期研究表明 CGA 可减轻

四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化^[8,9],但具体机制尚不清楚,本研究旨在研究 CGA 对 HSC 增殖及 ECM 合成和降解的影响,为 CGA 治疗肝纤维化提供实验及理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠肝星状细胞 HSC-T6 由美国加利福尼亚旧金山总医院肝病研究中心 Frideman 教授、第二军医大学张俊平教授、西安交通大学第一附属医院许君望教授惠赠,系 SV40 转染的大鼠肝星状细胞,具有活化 HSC 的表型^[10]。CGA (Sigma); DMEM (Hyclone); PDGF (PeproTech); 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青有限公司); MTT (Sigma); DMSO (Sigma); RNA Fast200 (上海飞捷生物有限公司); cDNA 逆转录试剂盒 (Fermentas); PCR Master mix (大连 TaKaRa 公司)。

1.2 细胞培养及实验分组

HSC-T6 细胞于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、含 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,2~3 d 后 0.25% 胰酶消化传代,取对数生长期细胞用于实验。设立 5 组:阴性对照组(无药物处理)、PDGF (10 ng/mL) 组、PDGF (10 ng/mL) + CGA (12.5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL) 组。

1.3 MTT 检测 HSC 增殖

收集对数期细胞,用培养基配制成细胞悬液,浓

度调至 1×10^6 /mL,每孔 200 μL 接种于 96 孔板,待贴壁后,吸去孔中培养基,换成无血清 DMEM 培养基 200 μL,饥饿 24 h 后加入各组药物,以培养液作为空白对照调零组,每组 5 个复孔,置于 37 °C、含 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内孵育培养,于 24 h 后检测。检测前每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μL,继续培养 4 h 后小心吸去孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO,置摇床上低速振荡 10 min。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的光密度 (OD) 值,实验重复 3 次。

1.4 ELISA 检测细胞上清 Collagen I、Collagen III、TIMP-1 及 MMP-2 蛋白含量

细胞接种于 6 孔板,按分组药物处理 24 h 后,终止培养,收集细胞培养液上清,3 000 r/min,离心 15 min,收集上清,按照试剂盒说明书进行操作,检测蛋白含量。

1.5 RT-PCR 检测 Collagen I、Collagen III、TIMP-1 及 MMP-2 mRNA 表达

细胞处理同 1.4。采用 Fast200 试剂盒提取各组细胞总 RNA。用分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度,cDNA 合成按照 Fermentas 逆转录试剂盒操作说明提取。以 NCBI GenBank 中提供的基因序列行 β-actin、Collagen I、Collagen III、TIMP-1 及 MMP-2 的引物设计,由北京奥科生物工程有限公司合成,所用基因引物序列见表 1。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C

表 1 RT-PCR 所用基因引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

Target gene	Sequence	Product (bp)	Gene No.
β-actin	Forward: 5'-CTATCGGCAATGAGCGGTTCC-3'	147	NM_031144.2
	Reverse: 5'-TGTGTTGGCATAGAGGTCTTTACG-3'		
Collagen I	Forward: 5'-ACAGGCGAACAAGGTGACAGAG-3'	159	NM_053304.1
	Reverse: 5'-GCCAGGAGAACCAGCAGAGC-3'		
Collagen III	Forward: 5'-AGATGCTGGTGCTGAGAAGAAAC-3'	136	NM_032085.1
	Reverse: 5'-GCTGGAAAGAAGTCTGAGGAAGG-3'		
TIMP-1	Forward: 5'-ACAGGTTTCCGGTTCGCTAC-3'	134	NM_053819.1
	Reverse: 5'-CTGACAGCAGTGATGTGCAA-3'		
MMP-2	Forward: 5'-CCGACCAAGGATATAGCC-3'	192	NM_031054.2
	Reverse: 5'-TGTCAGTATCAGCATCAGG-3'		

45 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min 终止反应。所得 PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离并染色后,用凝胶成像系统对拍摄的照片进行密度扫描,以目的基因对 β-actin 的 OD 值的比值表示目的基因的 mRNA 相对量。

1.6 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。先进行方差齐性检验,若

方差齐,采用单因素方差分析及 LSD-*t* 进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CGA 对 HSC 增殖的影响

由图 1 可以看出,与阴性对照组相比,PDGF 干预 24 h 后可增加 HSC 细胞增殖 ($P < 0.05$);与 PDGF

组相比,大、中、小剂量的CGA均可抑制HSC增殖(P 均 <0.05),且随着剂量的增加,抑制效应逐渐增强(P 均 <0.05);但不同剂量CGA组与阴性对照组相比,HSC细胞增殖仍增加(P 均 <0.05)。

细胞上清中蛋白含量无明显影响($P>0.05$)。

图1 CGA对HSC增殖的影响

Fig 1 Effect of CGA on the proliferation of HSC

1: Control group; 2: PDGF (10 ng/mL) group; 3-5: PDGF (10 ng/mL)+CGA (12.5, 25, 50 μ g/mL) groups. * $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. PDGF group; Δ $P<0.05$, vs. former concentration

2.2 CGA对Collagen I及Collagen III mRNA和蛋白表达的影响

如图2及表2所示,与阴性对照组比较,PDGF组Collagen I及Collagen III mRNA表达及细胞上清中蛋白含量均增加($P<0.05$)。与PDGF组比较,各剂量CGA组Collagen I及Collagen III mRNA表达及细胞上清中蛋白含量均减少(P 均 <0.05),且随着剂量的增加,这种抑制作用更为显著(P 均 <0.05)。

2.3 CGA对MMP-2及TIMP-1 mRNA和蛋白表达的影响

见图3、表2,与阴性对照组比较,PDGF组TIMP-1 mRNA表达及细胞上清中蛋白含量均增加($P<0.05$)。与PDGF组比较,各剂量CGA组TIMP-1 mRNA表达及细胞上清中蛋白含量减少($P<0.05$),且随着浓度增加,抑制作用更为显著(P 均 <0.05)。然而,不管是RT-PCR还是ELISA结果均提示CGA对HSC内MMP-2 mRNA表达及

图2 CGA对HSC Collagen I及Collagen III mRNA表达的影响

Fig 2 Effect of CGA on mRNA expression of Collagen I and Collagen III in HSCs

1-5: Denotes the same as those in fig 1. * $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. PDGF group; Δ $P<0.05$, vs. former concentration

图3 CGA对HSC TIMP-1及MMP-2 mRNA表达的影响

Fig 3 Effect of CGA on mRNA expression of TIMP-1 and MMP-2 in HSCs

1-5: Denotes the same as those in fig 1. * $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. PDGF group; Δ $P<0.05$, vs. former concentration

表2 CGA对HSC培养上清中Collagen I、Collagen III、TIMP-1及MMP-2蛋白含量的影响($n=5$, ng/mL)

Table 2 Effect of CGA on protein levels of Collagen I, Collagen III, TIMP-1 and MMP-2 in the culture supernatant of HSC ($n=5$, ng/mL)

	Control	PDGF	PDGF+12.5 μ g/mL CGA	PDGF+25 μ g/mL CGA	PDGF+50 μ g/mL CGA
Collagen I	148.16 \pm 24.72	308.19 \pm 30.30*	266.32 \pm 34.54*·#	208.32 \pm 29.96*·#· Δ	152.08 \pm 31.64#· Δ
Collagen III	112.89 \pm 18.75	199.87 \pm 26.93*	174.72 \pm 14.92*·#	149.26 \pm 14.38*·#· Δ	119.33 \pm 20.34#· Δ
TIMP-1	171.02 \pm 17.19	373.47 \pm 28.35*	331.20 \pm 25.31*·#	270.02 \pm 15.18*·#· Δ	205.82 \pm 12.87*·#· Δ
MMP-2	92.35 \pm 8.89	100.13 \pm 10.06	99.83 \pm 10.96	106.69 \pm 21.44	108.48 \pm 24.74

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. PDGF group; Δ $P<0.05$, vs. former concentration

3 讨论

肝纤维化主要表现为 ECM 沉积,其降解与产生失去平衡,导致 Collagen I 为主的胶原过度沉积。ECM 的降解主要靠 MMPs, MMPs 的活性受 TIMPs 的调节, MMPs 促进 ECM 降解,而 TIMPs 抑制 MMPs 的活性, MMPs 和 TIMPs 的失衡是肝纤维化形成和进展的重要因素^[3]。研究表明肝纤维化早期主要为 MMP-2 增加, MMP-2 可降解由 IV 型胶原构成的肝脏正常的基底膜,破坏 HSC 的微环境,促进 HSC 活化和增殖。随着肝纤维化进展, MMP-2 下降,伴随 TIMP-1 表达上调,致使 TIMPs/MMPs 值升高,胶原降解减少,结果 ECM 总量较正常肝脏明显增加^[11]。因此, TIMP-1 及 MMP-2 的平衡在肝纤维化细胞外基质代谢中起着重要的作用。

PDGF 是相对分子质量为 30×10^3 的阳离子亲水性糖蛋白,由 A 链、B 链 2 条多肽链组成二聚体,有 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB 3 种异构体形式。目前发现 PDGF-BB 对 HSC 的促分裂作用最强。肝损伤时,巨噬细胞、血小板、炎症细胞、内皮细胞及激活的 HSC 均可以分泌 PDGF,以自分泌、旁分泌的方式发挥作用^[12]。PDGF 是促进 HSC 分裂及增殖的最强的细胞因子,PDGF 与其受体结合后,通过一系列信号途径使 G_0/G_1 期细胞进入 S 期,合成 DNA,然后进入 G_2 期,发生有丝分裂^[4]。PDGF 可促进 HSC 分泌 Collagen I 及 Collagen III,还可通过刺激 HSC 合成分泌 TIMP-1 来抑制 ECM 的降解,促进肝纤维化的进展^[4,13]。本实验发现,10 ng/mL PDGF 可明显促进 HSC 增殖,促进 HSC 合成及分泌 Collagen I、Collagen III 及 TIMP-1,但对 MMP-2 的表达无明显影响,这与目前的研究结果一致,提示其可能是通过增加 TIMP-1/MMP-2 的比例影响 ECM 的降解。

流行病学调查发现饮用咖啡可明显延缓慢性肝病进展、降低肝纤维化发病风险及肝硬化的病死率^[5,14]。本课题组及其余研究者证实,咖啡及咖啡提取物可减轻四氯化碳或胆管结扎诱导的大鼠肝纤维化^[15,16]。但具体作用机制及何种成分发挥作用尚不清楚。有研究发现不含咖啡因的咖啡也具有抗肝纤维化作用,而含咖啡因的其他饮料不具有抗肝纤维化作用^[5],提示咖啡抗肝纤维化作用可能是除咖啡因之外的其他成分起主要作用。CGA 也是咖啡中含量丰富的一种多酚化合物,本课题组前期动物实验表明 CGA 可通过促进 HSC 凋亡、抑制肝脏炎症等发挥抗肝纤维化作用^[8,9]。本实验发现 CGA 可以明显抑制 PDGF 诱导的 HSC 增殖,且可明显

抑制 PDGF 诱导的 Collagen I、Collagen III 及 TIMP-1 mRNA 和蛋白的表达及分泌,但对 MMP-2 无明显影响,提示 CGA 主要通过抑制 HSC 增殖、减少胶原分泌、降低 TIMP-1 水平从而促进胶原降解而发挥抗肝纤维化作用,本实验结果进一步阐明了 CGA 的抗肝纤维化作用,为其临床药物开发提供了实验依据。但 CGA 对 HSC 增殖、胶原合成及降解影响的具体机制如何,是否与抗氧化抗炎活性有关,还需进一步的深入研究。

参 考 文 献

- Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*,2010;7(8):425-436.
- Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, *et al*. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative-past, present and future. *Cell Biol Int*,2010;34(12):1247-1272.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases—structure, function, and biochemistry. *Cir Res*,2003;92(8):827-839.
- Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci*,2002;7(1):1720-1726.
- Corrao G, Zambon A, Bagnardi V, *et al*. Coffee, caffeine, and the risk of liver cirrhosis. *Ann Epidemiol*,2001;11(7):458-465.
- Yun N, Kang JW, Lee SM. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *J Nutr Biochem*,2012;23(10):1249-1255.
- Karthikesan K, Pari L, Menon VP. Protective effect of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetes. *J Funct Foods*,2010;2(2):134-142.
- Shi HY, Dong L, Bai YH, *et al*. Chlorogenic acid against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Eur J Pharmacol*,2009;623(1-3):119-124.
- Shi H, Dong L, Jiang J, *et al*. Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. *Toxicology*,2013;303(1):107-114.
- Vogel S, Piantadosi R, Frank J, *et al*. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism *in vitro*. *J Lipid Res*,2000;41(6):882-893.
- Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, *et al*. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol*,2001;34(2):239-247.
- Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*,2004;15(4):255-273.
- Zhou CH, Mei CL, Gao CF, *et al*. Regulation of type I collagen expression by PDGF. *J Am Soc Nephrol*,2002;13(1):737-737.
- Tverdal A, Skurtveit S. Coffee intake and mortality from liver cirrhosis. *Ann Epidemiol*,2003;13(6):419-423.
- Shi H, Dong L, Zhang Y, *et al*. Protective effect of a coffee preparation (Nescafe pure) against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Clin Nutr*,2010;29(3):399-405.
- Shin JW, Wang JH, Kang JK, *et al*. Experimental evidence for the protective effects of coffee against liver fibrosis in SD rats. *J Sci Food Agric*,2010;90(3):450-455.