

RhoA/ROCK信号转导通路介导 高糖诱导的大鼠肝星状细胞的 增殖和胶原合成

李贵芝¹, 刘莎^{1,2}, 张艳^{1,3}, 周红¹ (1.河北医科大学第二医院 内分泌科, 石家庄 050000; 2.河北医科大学第三医院 超声科, 石家庄 050000; 3.衡水市哈励逊医院 内分泌科, 河北 衡水 053000)

摘要: 目的 探讨RhoA/ROCK信号转导通路在高糖诱导大鼠肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 增殖和胶原合成中的作用。方法 将SD大鼠肝星状细胞株HSC-T6在1640培养基中培养24 h, 实验设置对照组 (含5.5 mmol/L葡萄糖)、高糖组 (含25 mmol/L葡萄糖)、高渗透压组 (5.5 mmol/L葡萄糖 + 19.5 mmol/L甘露醇)、高糖 + 法舒地尔 (12.5 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L) 组。采用MTS法检测细胞增殖率; 采用羟脯氨酸 (hydroxyproline, Hyp) 试剂盒测定细胞上清中Hyp水平; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR) 测定 I 和 III 型前胶原mRNA的相对表达量; 采用Western blot检测肌球蛋白磷酸酶靶亚基1 (myosin phosphatase target subunit 1, MYPT1)、细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-Jun氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinases, JNK) 和p38MAPK的磷酸化和总体水平。结果 与对照组相比, 高糖组MYPT1 (0.270 ± 0.007 vs 0.090 ± 0.008 , $P < 0.001$)、ERK (0.851 ± 0.027 vs 0.175 ± 0.038 , $P < 0.001$)、JNK (0.869 ± 0.037 vs 0.488 ± 0.022 , $P < 0.001$) 和p38MAPK (0.498 ± 0.020 vs 0.144 ± 0.011 , $P < 0.001$) 磷酸化水平显著增高, HSC增殖率 (A 值) (2.372 ± 0.098 vs 1.588 ± 0.087 , $P < 0.001$) 和Hyp水平 (27.924 ± 1.069 vs 17.643 ± 0.112 , $P < 0.001$) 显著增高, I 型前胶原mRNA (2.783 ± 0.167 vs 1.004 ± 0.008 , $P < 0.001$) 和 III 型前胶原mRNA (4.958 ± 0.143 vs 1.098 ± 0.014 , $P < 0.001$) 表达显著上调。与高糖组相比, 高糖+法舒地尔 (25 μ mol/L、50 μ mol/L) 组MYPT1 (0.110 ± 0.007 , $P < 0.001$; 0.101 ± 0.006 , $P < 0.001$)、ERK (0.473 ± 0.025 , $P < 0.001$; 0.223 ± 0.031 , $P < 0.001$)、JNK (0.688 ± 0.024 , $P = 0.019$; 0.576 ± 0.035 , $P < 0.001$) 和p38MAPK (0.350 ± 0.021 , $P = 0.012$; 0.305 ± 0.015 , $P = 0.019$) 磷酸化水平显著降低, HSC增殖率 (A 值) (1.819 ± 0.104 , $P < 0.001$; 1.613 ± 0.103 , $P < 0.001$) 和Hyp水平 (21.430 ± 0.714 , $P < 0.001$; 18.574 ± 0.825 , $P < 0.001$) 显著降低, I 型前胶原mRNA (1.580 ± 0.154 , $P < 0.001$; 1.167 ± 0.157 , $P < 0.001$) 和 III 型前胶原mRNA (3.166 ± 0.073 , $P < 0.001$; 2.524 ± 0.085 , $P < 0.001$) 表达显著下调。高糖+法舒地尔12.5 μ mol/L组MYPT1、ERK、JNK和p38MAPK磷酸化水平及Hcy水平均显著高于高糖+法舒地尔25 μ mol/L组和高糖+法舒地尔50 μ mol/L组 (P 均 < 0.001), 高糖+法舒地尔25 μ mol/L组显著高于高糖+法舒地尔50 μ mol/L组 (P 均 < 0.001)。结论 RhoA/ROCK信号转导通路可能通过激活下游的MAPKs介导了高糖诱导的肝HSC的增殖和胶原合成, ROCK可能是防治糖尿病肝纤维化的新靶点。

关键词: 肝星状细胞; RhoA/ROCK信号转导通路; 高糖; 增殖; 胶原合成

RhoA / ROCK signaling transduction pathway mediates high-glucose-induced proliferation of hepatic stellate cell and synthesis of collagen in rats

Li Guizhi¹, Liu Sha^{1,2}, Zhang Yan^{1,3}, Zhou Hong¹ (1.Department of Endocrinology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2.Department of Ultrasonography, the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 3.Department of Endocrinology, Hengshui Harrison Hospital, Hengshui 053000, Hebei Province, China)

Abstract: Objective To investigate the role of RhoA/ROCK signaling transduction pathway on high-glucose-induced proliferation of hepatic stellate cell (HSC) and synthesis of collagen in rats. **Methods** HSC-T6 cells of SD rats were cultured in 1640 medium for 24 h and divided into control group (5.5 mmol/L D-glucose), high-glucose group (25 mmol/L D-glucose), high osmotic pressure group (5.5 mmol/L D-glucose + 19.5 mmol/L mannose) and high-glucose + fasudil group (12.5 μ mol/L, 25 μ mol/L, 50 μ mol/L). Proliferation of HSC was measured by MTS assay. Level of hydroxyproline (Hyp) in the cell supernatant was determined by Hyp kit. The expression of type I and III procollagen mRNA were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. Western blot was used to evaluate the phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1), extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK) and p38mitogen-activated protein kinase (p38MAPK). **Results** Compared with control group, phosphorylation level of MYPT1 (0.270 ± 0.007 vs 0.090 ± 0.008 , $P < 0.001$), ERK (0.851 ± 0.027 vs 0.175 ± 0.038 , $P < 0.001$), JNK (0.869 ± 0.037 vs 0.488 ± 0.022 , $P < 0.001$) and p38MAPK (0.498 ± 0.020 vs 0.144 ± 0.011 , $P < 0.001$) in high-glucose group increased significantly, proliferation of HSC (A value) (2.372 ± 0.098 vs 1.588 ± 0.087 , $P < 0.001$) and Hyp level (27.924 ± 1.069 vs 17.643 ± 0.112 , $P < 0.001$) increased significantly and expression of type I (2.783 ± 0.167 vs 1.004 ± 0.008 , $P < 0.001$) and type III (4.958 ± 0.143 vs 1.098 ± 0.014 , $P < 0.001$) procollagen mRNA upregulated significantly. Compared with high-glucose group, phosphorylation level of MYPT1 (0.110 ± 0.007 , $P < 0.001$; 0.101 ± 0.006 , $P < 0.001$), ERK (0.473 ± 0.025 , $P < 0.001$; 0.223 ± 0.031 , $P < 0.001$), JNK (0.688 ± 0.024 , $P = 0.019$; 0.576 ± 0.035 , $P < 0.001$) and p38MAPK (0.350 ± 0.021 , $P = 0.012$; 0.305 ± 0.015 , $P = 0.019$) in high-glucose + fasudil group (25 μ mol/L, 50 μ mol/L) decreased significantly, proliferation of HSC (A value) (1.819 ± 0.104 , $P < 0.001$; 1.613 ± 0.103 , $P < 0.001$) and Hyp level (21.430 ± 0.714 , $P < 0.001$; 18.574 ± 0.825 , $P < 0.001$) decreased significantly and expression of type I (1.580 ± 0.154 , $P < 0.001$; 1.167 ± 0.157 , $P < 0.001$) and type III (3.166 ± 0.073 , $P < 0.001$; 2.524 ± 0.085 , $P < 0.001$) procollagen mRNA downregulated significantly. Phosphorylation level of MYPT1 ERK, JNK and p38MAPK and level of Hcy in high-glucose + fasudil group (12.5 μ mol/L) were significantly higher than those in high-glucose + fasudil 25 μ mol/L group (all $P < 0.001$), the above indexes in high-glucose + fasudil 25 μ mol/L group were significantly higher than those in high-glucose + fasudil 50 μ mol/L group (all $P < 0.001$). **Conclusions** The RhoA/ROCK signaling transduction pathway may mediate the high glucose-induced hepatic HSC proliferation and collagen synthesis through the activation of downstream MAPKs, and ROCK may be a novel target for the prevention of liver fibrosis in diabetes.

Key words: Hepatic stellate cell; RhoA/ROCK pathway; High glucose; Proliferation; Collagen synthesis

糖尿病在我国发病率呈逐年上升趋势, 目前已成为全球性非传染性流行病之一。非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

影响全世界总人口的25%以上, 在2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 患者中发病率较高^[1]。其特点是除外酒精性和其他明确的肝损伤因素所

致,以肝细胞内的脂肪过度沉积为主要特征的综合征,分为单纯性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)以及相关肝纤维化,最终可进展至肝硬化甚至肝癌^[2]。其发病与2型糖尿病、肥胖、心血管疾病及慢性肾脏疾病有关^[3,4]。研究表明,T2DM是NAFLD进展的独立危险因素,可导致不同程度的肝纤维化甚至肝硬化^[5,6]。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化、转分化是纤维化发生发展的核心环节^[7]。持续的刺激因素使HSC激活和增殖,使细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成增加,导致ECM合成与降解不平衡,最终导致肝脏结构与功能的病理变化。RhoA及其下游效应物Rho激酶(ROCK)调节细胞的多种生物学功能,包括增殖、分化、凋亡和基因表达。Fukushima等^[8]发现ROCK抑制剂法舒地尔可抑制肝星状细胞胶原蛋白的生成并增强胶原酶活性。本研究拟探讨RhoA/ROCK信号转导通路在高糖诱导的大鼠HSC增殖和胶原合成中的作用。

1 资料与方法

1.1 实验材料 大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)购自英润生物科技有限公司(中国湖南长沙),盐酸法舒地尔注射液(天津红日药业有限公司),1640培养基和新生胎牛血清(美国Corning公司),Trizol和胶原酶(美国Invitrogen公司),MTS试剂(北京普洛麦格生物技术有限公司),羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(南京建成生物有限公司),兔抗大鼠磷酸化MYPT1(Thr853)(p-MYPT1)抗体、兔抗大鼠磷酸化ERK(p-ERK)抗体和兔抗大鼠磷酸化JNK(p-JNK)抗体及兔抗大鼠磷酸化p38/MAPK14(T180)(p-p38MAPK)抗体(美国Cell Signaling公司),兔抗大鼠MYPT1抗体、兔抗大鼠ERK抗体、兔抗大鼠JNK1/2/3(T178)抗体和兔抗大鼠p38MAPK(v318)抗体(美国Bioworld生物公司),兔抗大鼠GAPDH抗体(美国Santa Cruz公司);抗兔IgG Antibody IRDye800二抗和抗鼠IgG Antibody IRDye700二抗(美国Rockland公司);I

型和III型前胶原引物(上海生工生物工程技术服务公司合成)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将HSC-T6细胞以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种至培养瓶,加入含10%胎牛血清、100 U/ml双抗的1640培养液4 ml,置于37℃、5% CO₂培养箱培养2~3 d。待细胞生长至融合状态时,细胞以1:4进行传代,实验应用3~5代细胞。细胞培养传代期间以1640培养基重悬细胞并进行细胞计数。

1.2.2 MTS法测定HSC增殖 取对数期生长的细胞接种于96孔板中(每孔细胞数 1×10^4)。培养板放置于5% CO₂、37℃及饱和湿度下培养过夜,细胞贴壁后,更换为无血清1640培养基,细胞同步化2 h。后吸弃各孔培养基,设置为对照组(含5.5 mmol/L葡萄糖)、高糖组(含25 mmol/L葡萄糖)、高渗透压组(5.5 mmol/L葡萄糖+19.5 mmol/L甘露醇)、高糖+法舒地尔组(法舒地尔12.5 μmol/L、25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L),每组设6个复孔。用含10%胎牛血清的1640培养基继续培养24 h,培养结束前的4 h,每孔加入20 μl MTS试剂,置于5% CO₂、37℃培养箱继续培养4 h后终止,在酶联免疫检测仪上490 nm处测定吸光度(A)值。A值越大,细胞增殖率越高。

1.2.3 培养基中Hyp含量测定 根据Hyp试剂盒(南京建成生物有限公司)说明书测定细胞上清中Hyp水平,用来表示胶原含量。

1.2.4 Real-time PCR测定 I型和III型前胶原基因表达 取对数期生长的细胞接种于6孔板中,每孔细胞数 1.5×10^5 个。分组后培养24 h,收集细胞。使用Trizol试剂盒提取总RNA。取3 μg RNA逆转录获得单链的cDNA,应用50 μl反应体系在荧光定量PCR仪上进行扩增反应,反应条件为:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃退火1 min,共进行30~40个循环。以GAPDH为内参,引物序列见表1。

1.2.5 Western blot测定蛋白表达 取对数期生长的细胞接种于6孔板中,每孔细胞数 1.5×10^5 个。分组后培养24 h,收集细胞。用冷D-Hanks缓冲液冲洗细胞后,加入1 ml蛋白裂解液,于预冷离心机中

表1 PCR引物序列

名称	引物序列	产物大小
I型前胶原	上游引物: 5'-CATAAAGGGTCATCGTGGCTTC-3' 下游引物: 5'-GTGATAGGTGATGTTCTGGGAG-3'	176 bp
III型前胶原	上游引物: 5'-GTGACAGAGGTGAAAGAGGATC-3' 下游引物: 5'-CTGTCTTGCTCCATTACACAGT-3'	331 bp
GAPDH	上游引物: 5'-TTCTAGAGACAGCCGCATCT-3' 下游引物: 5'-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3'	374 bp

16000 r/min, 离心10 min, 离心半径为10 cm。取上清液应用BCA法测定总蛋白含量。取约50 μg蛋白加样至10% SDS-PAGE凝胶电泳, 之后转移到PVDF膜上。在室温下用5%脱脂奶粉封闭液封闭1 h, 随后用抗MYPT1、抗p-MYPT1、抗JNK、抗p-JNK、抗ERK、抗p-ERK、抗p38MAPK及抗p-p38MAPK兔抗体在4 °C下孵育过夜, 冲洗。然后在室温加入抗兔IgG Antibody IRDye800和抗鼠IgG Antibody IRDye700二抗孵育1 h。TBST洗膜后用ECL液显影。使用双色红外激光扫描仪对膜进行吸光度扫描。MYPT1、JNK、p38MAPK和ERK通路的活化水平分别以磷酸化的MYPT1、JNK、p38MAPK和ERK与各自总水平的比值表示。

1.3 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析, *A*值、Hyp水平、I型和III型前胶原mRNA相对表达量及MYPT1、JNK、p38MAPK和ERK磷酸化水平等均为正态分布的计量资料, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用SNK-*q*检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组HSC增殖情况 对照组、高糖组、高糖+法舒地尔12.5 μmol/L组、高糖+法舒地尔25 μmol/L组、高糖+法舒地尔50 μmol/L组、高糖+法舒地尔100 μmol/L组、高渗透压组*A*值分别为(1.588 ± 0.087、2.372 ± 0.098、2.151 ± 0.053、1.819 ± 0.104、1.613 ± 0.103、1.607 ± 0.092、1.590 ± 0.082), 差异有统计学意义($F = 75.350$, $P < 0.001$)。与对照组相比, 高糖组*A*值显著升高, 即HSC增殖率显著增加($P < 0.001$), 高糖+法舒地尔组(12.5 μmol/L、25 μmol/L)均显著降低($P < 0.001$ 、 $P = 0.0015$), 高糖+法舒地尔组(50 μmol/L、100 μmol/L)HSC增殖率无显著变化($P = 0.9989$ 、 0.9998)。因此, 后续实验仅选择法

舒地尔12.5 μmol/L、25 μmol/L和50 μmol/L三个浓度。高渗组与对照组的HSC增殖无显著差异($P = 0.986$)。

2.2 各组胶原合成情况 与对照组比较, 高糖组Hyp水平显著升高($P < 0.001$), I型和III型前胶原mRNA表达显著上调(P 均 < 0.001)。与高糖组相比, 高糖+法舒地尔组(25 μmol/L、50 μmol/L)Hyp水平、I型前胶原mRNA及III型前胶原mRNA表达均显著降低(P 均 < 0.001)。高糖+法舒地尔组(12.5 μmol/L)Hyp水平、I型前胶原mRNA及III型前胶原mRNA均显著高于高糖+法舒地尔25 μmol/L组(P 均 < 0.001)和高糖+法舒地尔50 μmol/L组(P 均 < 0.001), 高糖+法舒地尔25 μmol/L组上述指标均显著高于高糖+法舒地尔50 μmol/L组(P 均 < 0.001)。对照组与高渗透压组Hyp水平以及I型和III型前胶原mRNA表达无显著差异($P = 0.271$ 、 0.484 、 0.087)。见表2。

2.3 高糖和法舒地尔对RhoA/ROCK信号转导通路通道的影响 MYPT1是ROCK最主要的底物, p-MYPT1被认为是ROCK通路激活的标志。对照组、高糖组、高糖+法舒地尔12.5 μmol/L组、高糖+法舒地尔25 μmol/L组、高糖+法舒地尔50 μmol/L组、高糖+法舒地尔100 μmol/L组、高渗透压组p-MYPT1相对表达量分别为0.090 ± 0.008、0.270 ± 0.007、0.163 ± 0.005、0.110 ± 0.007、0.101 ± 0.006、0.083 ± 0.005, 差异有统计学意义($F = 370.318$, $P < 0.001$)。与对照组比较, 高糖组p-MYPT1水平显著升高($P < 0.001$)。与高糖组相比, 高糖+法舒地尔组(25 μmol/L、50 μmol/L)p-MYPT1水平均显著降低(P 均 < 0.001)。高糖+法舒地尔组(12.5 μmol/L)p-MYPT1水平显著高于高糖+法舒地尔25 μmol/L组和高糖+法舒地尔50 μmol/L组(P 均 < 0.001), 高糖+法舒地尔25 μmol/L组显著高于高糖+

表2 各组细胞Hyp水平及I型和III型前胶原mRNA相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	Hyp (μg/ml)	I型前胶原mRNA	III型前胶原mRNA
对照组	17.643 ± 0.112	1.004 ± 0.008	1.098 ± 0.014
高糖组	27.924 ± 1.069 ^a	2.783 ± 0.167 ^a	4.958 ± 0.143 ^a
高糖+法舒地尔12.5 μmol/L组	25.714 ± 1.317 ^b	2.287 ± 0.333 ^b	4.527 ± 0.292 ^b
高糖+法舒地尔25 μmol/L组	21.430 ± 0.714 ^{bc}	1.580 ± 0.154 ^{bc}	3.166 ± 0.073 ^{bc}
高糖+法舒地尔50 μmol/L组	18.574 ± 0.825 ^{bcd}	1.167 ± 0.157 ^{bcd}	2.524 ± 0.085 ^{bcd}
高渗透压组	17.298 ± 0.716	1.006 ± 0.083	1.029 ± 0.071
<i>F</i> 值	156.916	102.338	806.891
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与高糖组相比, ^b $P < 0.05$; 与高糖+法舒地尔12.5 μmol/L组相比, ^c $P < 0.05$; 与高糖+法舒地尔25 μmol/L组相比, ^d $P < 0.05$ 。

法舒地尔50 $\mu\text{mol/L}$ 组 ($P < 0.001$)。高渗组和对照组p-MYPT1水平无显著差异 ($P = 0.292$)。见图1。
2.4 高糖和法舒地尔对MAPKs通路的影响 与对照组相比, 高糖组p-ERK1/2、p-p38MAPK和p-JNK水平显著升高 (P 均 < 0.001)。与高糖组相比, 高糖+法舒地尔组 (25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$) p-ERK1/2、p-p38MAPK和p-JNK水平均显著降低 ($P < 0.001$ 、 $P = 0.012$ 、 $P = 0.019$; P 均 < 0.001)。高糖+法舒

地尔组 (12.5 $\mu\text{mol/L}$) p-ERK1/2、p-p38MAPK和p-JNK水平均显著高于高糖+法舒地尔25 $\mu\text{mol/L}$ 组和高糖+法舒地尔50 $\mu\text{mol/L}$ 组 (P 均 < 0.001) , 高糖+法舒地尔25 $\mu\text{mol/L}$ 组显著高于高糖+法舒地尔50 $\mu\text{mol/L}$ 组 (P 均 < 0.001)。高渗组与对照组p-ERK1/2、p-p38MAPK和p-JNK水平无显著差异 (P 值分别为0.406、0.186、0.157)。见表3、图2、图3、图4。

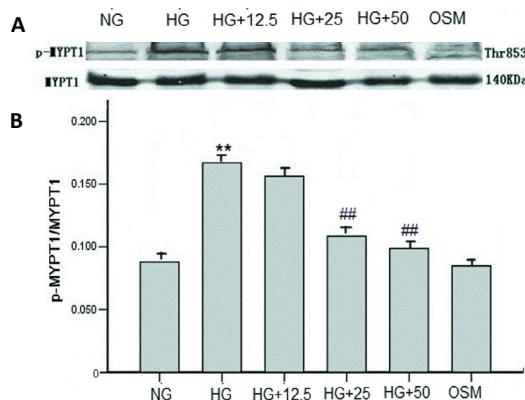


图1 Western blot 检测 p-MYPT1 水平

注: A 为 Western blot 电泳图, B 为 p-MYPT1 相对表达量; NG 为对照组, HG 为高糖组, HG + 12.5 为高糖 + 法舒地尔 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组, HG + 25 为高糖 + 法舒地尔 25 $\mu\text{mol/L}$ 组, HG + 50 为高糖 + 法舒地尔 50 $\mu\text{mol/L}$ 组, OSM 为高渗透压组; 与 NG 组比较, ** $P < 0.05$, 与 HG 组比较, ### $P < 0.05$ 。

表3 各组细胞 p-ERK1/2、p-p38MAPK、p-JNK 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-ERK1/2	p-p38MAPK	p-JNK
对照组	0.175 ± 0.038	0.144 ± 0.011	0.488 ± 0.022
高糖组	0.851 ± 0.027 ^a	0.498 ± 0.020 ^a	0.869 ± 0.037 ^a
高糖+法舒地尔12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.785 ± 0.029 ^b	0.461 ± 0.019 ^b	0.811 ± 0.033 ^b
高糖+法舒地尔25 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.473 ± 0.025 ^{bc}	0.350 ± 0.021 ^{bc}	0.688 ± 0.024 ^{bc}
高糖+法舒地尔50 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.223 ± 0.031 ^{bcd}	0.305 ± 0.015 ^{bcd}	0.576 ± 0.035 ^{bcd}
高渗透压组	0.168 ± 0.029	0.159 ± 0.012	0.523 ± 0.027
F值	317.674	233.161	80.704
P值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与高糖组相比, ^b $P < 0.05$; 与高糖 + 法舒地尔 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, ^c $P < 0.05$; 与高糖 + 法舒地尔 25 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, ^d $P < 0.05$ 。

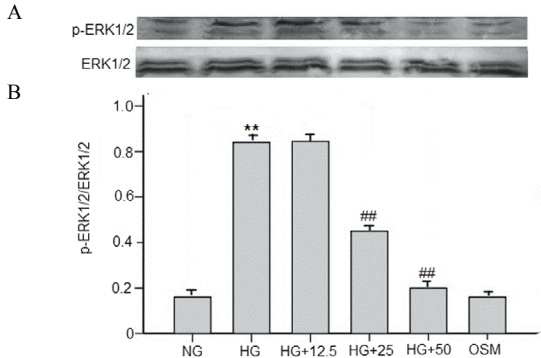


图2 Western blot 检测 p-ERK 水平

注: A 为 Western blot 电泳图, B 为 p-ERK 相对表达量; NG 为对照组, HG 为高糖组, HG + 12.5 为高糖 + 法舒地尔 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组, HG + 25 为高糖 + 法舒地尔 25 $\mu\text{mol/L}$ 组, HG + 50 为高糖 + 法舒地尔 50 $\mu\text{mol/L}$ 组, OSM 为高渗透压组; 与 NG 组比较, ** $P < 0.05$, 与 HG 组比较, ### $P < 0.05$ 。

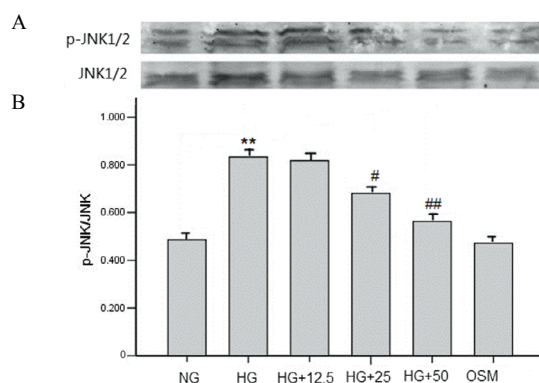


图3 Western blot 检测 p-JNK 水平

注: A 为 Western blot 电泳图, B 为 p-JNK 相对表达量; NG 为对照组, HG 为高糖组, HG + 12.5 为高糖 + 法舒地尔 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组, HG + 25 为高糖 + 法舒地尔 25 $\mu\text{mol/L}$ 组, HG + 50 为高糖 + 法舒地尔 50 $\mu\text{mol/L}$ 组, OSM 为高渗透压组; 与 NG 组比较, ** $P < 0.05$, 与 HG 组比较, ## $P < 0.05$ 。

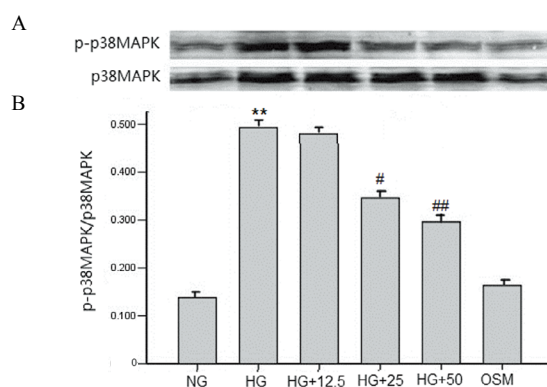


图4 Western blot 检测 p-p38MAPK 水平

注: A 为 Western blot 电泳图, B 为 p-p38MAPK 相对表达量; NG 为对照组, HG 为高糖组, HG + 12.5 为高糖 + 法舒地尔 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组, HG + 25 为高糖 + 法舒地尔 25 $\mu\text{mol/L}$ 组, HG + 50 为高糖 + 法舒地尔 50 $\mu\text{mol/L}$ 组, OSM 为高渗透压组; 与 NG 组比较, ** $P < 0.05$, 与 HG 组比较, ## $P < 0.05$ 。

3 讨论

目前NAFLD发病率呈逐年上升趋势, 普通成人NAFLD患病率为6.3%~45%, 其中10%~30%为NASH^[9]。研究表明, NAFLD患者中约50%同时伴有T2DM^[10], 而T2DM患者中高达70%伴有NAFLD^[11]。NAFLD发病机制包括胰岛素抵抗(insulin resistance IR)、氧化应激、炎症细胞因子释放及脂质积累等, 而IR是NAFLD发生发展的关键因素^[12,13]。NAFLD与T2DM可能通过交互的信号转导通路或相同的病理机制, 在IR的前提下, 两者能够相互影响和发展^[14]。

NAFLD发病机制复杂, 目前对于糖尿病患者发生NAFLD尚无有效防治措施^[15]。NAFLD相关指南提出的治疗方法主要是生活方式的改变, 减轻胰岛素抵抗, 减重, 改善糖耐量异常、血脂异常等高危因素^[16]。有研究表明T2DM大鼠可发生肝纤维化^[17]。HSC是主要参与肝纤维化形成的细胞, 肝纤维化发生的核心环节是HSC的激活、增殖和转分化^[18], 其

活化机制包括多种细胞因子和细胞信号转导通路的相互作用。当肝功能受损时, 激活静息状态HSC, 使其增殖、收缩及迁移能力增加, 同时也可增加ECM的分泌能力^[19]。活化型HSC可表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA), 并且分泌I、III型胶原等ECM成分; 活化型HSC的收缩能力增强可增加肝窦血流阻力, 从而使门脉压力增加, 肝内的结构重建, 进而导致肝纤维化的发生^[20]。与HSC活化相关的信号转导通路主要有核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、TGF- β 1/Smad等^[21,22]。

本研究表明, 高糖刺激了HSC的增殖, 并可诱导I型和III型胶原合成增加, 高渗透压本身对HSC的增殖和胶原合成无影响。这些发现与其他研究结果相一致^[23,24]。RhoA是小G蛋白超家族成员之一, 起着“分子开关”的作用, 能接受上游介导的分子信号并将其活化后传递给下游效应器。ROCK被认为是

最早发现的RhoA下游效应器。ROCK包含两亚型: ROCK1和ROCK2。ROCK特异性抑制剂法舒地尔以氨基末端的ROCK激酶结构域为靶点,对ROCK1和ROCK2均有抑制作用。动物研究表明,ROCK是许多纤维化疾病的重要介质^[25-28]。RhoA/ROCK信号转导通路参与T2DM大鼠肝纤维化的形成,而法舒地尔通过抑制TGF β 1/CTGF的活化和 α -SMA的表达有效抑制了糖尿病大鼠的肝纤维化^[17]。本研究表明,高糖激活了RhoA/ROCK通路,介导了HSC的增殖和胶原合成。

MAPKs信号转导通路在维持HSC活化状态中也发挥重要作用。Peng等^[29]研究表明,血小板源生长因子-bb(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)在体外通过磷酸化ERK、JNK和p38 MAPK诱导HSC的增殖和胶原合成。Sugimoto等^[23]研究表明,高糖通过ROS激活的MAPK途径诱导HSC的活化和I型胶原的产生。本研究表明,在高糖条件下,HSC上ERK、JNK和p38 MAPK通路被激活,法舒地尔不仅抑制了ROCK活性,还抑制了ERK、JNK和p38 MAPK的磷酸化。这些结果提示,ERK、JNK和p38 MAPK是ROCK的下游信号分子,ROCK可能是通过MAPKs信号转导通路在转录水平上调胶原蛋白的表达。同样,FUKUSHIMA等也发现法舒地尔可抑制HSC上MAPKs的磷酸化,推测法舒地尔可能是通过抑制MAPKs通路的激活从而抑制了胶原的沉积^[8]。

综上,RhoA/ROCK信号转导通路可能通过其下游的MAPKs通路的激活介导了高糖诱导的大鼠HSC的增殖和胶原合成,ROCK可能是防治糖尿病肝纤维化的新靶点。

参考文献

- [1] ADAMS L A, ANSTEE Q M, TILG H, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases[J]. *Gut*,2017,66(6):1138-1153.
- [2] ATHYROS V G, POLYZOS S A, KOUNTOURAS J, et al. Non-alcoholic fatty liver disease treatment in patients with type 2 diabetes mellitus; new kids on the block[J]. *Curr Vasc Pharmacol*,2020,2(18):172-181.
- [3] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, DE AVILA L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Hepatol*,2019,71(4):793-801.
- [4] 田彩云, 胡晗, 张国远, 等. 糖代谢紊乱对肝硬化相关并发症的影响[J]. *临床肝胆病杂志*,2021,37(5):1197-1200.
- [5] KASWALA D H, LAI M, AFDHAL N H. Fibrosis assessment in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in 2016[J]. *Dig Dis Sci*,2016,61(5):1356-1364.
- [6] KANG J H, MATSUI T. Changing etiology in liver cirrhosis in Sapporo, Japan[J]. *Euroasian J Hepatogastroenterol*,2018,8(1):77-80.
- [7] TSUCHIDA T, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*,2017,14(7):397-411.
- [8] FUKUSHIMA M, NAKAMUTA M, KOHJIMA M, et al. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase (ROCK) inhibitor, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cells[J]. *Liver Int*,2005,25(4):829-838.
- [9] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. *Hepatology*,2016,64(1):73-84.
- [10] WONG V W. Nonalcoholic fatty liver disease in Asia: a story of growth[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2013,28(1):18-23.
- [11] TARGHER G, BERTOLINI L, PADOVANI R, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients[J]. *Diabetes Care*,2007,30:1212-1218.
- [12] BUZZETTI E, PINZANI M, TSOCHATZIS E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Metabolism*,2016,65(8):1038-1048.
- [13] TILG H. How to approach a patient with nonalcoholic fatty liver diseases[J]. *Gastroenterology*,2017,153(2):345-349.
- [14] WILLIAMS K H, SHACKEL N A, GORRELL M D, et al. Diabetes and nonalcoholic fatty liver disease: a pathogenic duo[J]. *Endocr Rev*,2013, 4(1):84-129.
- [15] YOUNOSSI Z M, LOOMBA R, ANSTEE Q M, et al. Diagnostic modalities for non-alcoholic fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and associated fibrosis[J]. *Hepatology*,2018,68(1):349-360.
- [16] CHITTURI S, WONG V W, CHAN W K, et al. The Asia-Pacific Working Party on non-alcoholic fatty liver disease guidelines 2017-Part 2: Management and special groups[J]. *J Gastroenterol Hepatol*,2018,33(1):86-98.
- [17] ZHOU H, FANG C, ZHANG L, et al. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase inhibitor, ameliorates hepatic fibrosis in rats with type 2 diabetes[J]. *Chin Med J (Engl)*,2014,127(2):225-231.
- [18] YAN Q, GAO P, NAKANO Y, et al. A novel deactivation factor of fibrogenic hepatic stellate cells induces regression of liver fibrosis in mice[J]. *J Clin Hepatol*,2020,36(1):30.
- [19] TÖRÖK N J. Recent advances in the pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis[J]. *J Gastroenterol*,2008,43(5):315-321.
- [20] SOON R K JR, YEE H F JR. Stellate cell contraction: role, regulation, and potential therapeutic target[J]. *Clin Liver Dis*,2008,12(4):791-803.
- [21] ALEGRE F, PELEGRIN P, FELDSTEIN A E. Inflammasomes in liver fibrosis[J]. *Semin Liver Dis*,2017,37(2):119-127.
- [22] YANG J J, TAO H, DENG Z Y, et al. Non-coding RNA-mediated epigenetic regulation of liver fibrosis[J]. *Metabolism*,2015,64(11):1386-1394.
- [23] SUGIMOTO R, ENJOJI M, KOHJIMA M, et al. High glucose stimulates hepatic stellate cells to proliferate and to produce collagen through free radical production and activation of mitogen-activated protein[J]. *Liver Int*,2005,25(5):1018-1026.
- [24] LIN J, CHEN A. Curcumin diminishes the impacts of hyperglycemia on the activation of hepatic stellate cells by suppressing membrane translocation and gene expression of glucose transporter-2[J]. *Mol Cell Endocrinol*,2011,333(2):160-171.
- [25] OLGAR Y, CELEN M C, YAMASAN B E, et al. Rho-kinase inhibition

- reverses impaired Ca^{2+} handling and associated left ventricular dysfunction in pressure overload-induced cardiac hypertrophy[J]. Cell Calcium,2017,67:81-90.
- [26] BABA I, EGI Y, UTSUMI H, et al. Inhibitory effects of fasudil on renal interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction[J]. Mol Med Rep,2015,12(6):8010-8020.
- [27] ZHOU H, LI Y J, WANG M, et al. Involvement of RhoA/ROCK in myocardial fibrosis in a rat model of type 2 diabetes[J]. Acta Pharmacol Sin,2011,32(8):999-1008.
- [28] JIANG C, HUANG H, LIU J, et al. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Int J Mol Sci,2012,13(7):8293-8307.
- [29] PENG Y, YANG H, ZHU T, et al. The antihepatic fibrotic effects of fluorofenidone via MAPK signalling pathways[J]. Eur J Clin Invest,2013,43(4):358-368.

收稿日期: 2020-12-17

李贵芝, 刘莎, 张艳, 等. RhoA/ROCK信号转导通路介导高糖诱导的大鼠肝星状细胞的增殖和胶原合成[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2023,15(2): 28-35.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿医学名词和文字的要求

来稿中医学名词要求: 应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词, 可选用最新版《医学主题词表(MeSH)》《医学主题词注释字顺表》《中医药主题词表》中的主题词。对没有通用译名的名词术语于文内第一次出现时应注明原词。中医名词术语按 GB/T 16751.1/2/3-1997 《中医临床诊疗术语疾病部分 / 证候部分 / 治法部分》和 GB/T 20348-2006 《中医基础理论术语》执行, 腧穴名称与部位名词术语按 GB/T 12346-2006 《腧穴名称与定位》和 GB/T 13734-2008 《耳穴名称与定位》执行。中西药名以最新版本《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。确需使用商品名时应先注明其通用名称。中药应采用正名, 药典未收录者应附注拉丁文名称。

来稿中文字要求: 严格执行《中华人民共和国国家通用语言文字法(2000-10-31)》和新闻出版总署 2010 年 12 月 24 日发布的《关于进一步规范出版物文字使用的通知》, 以及 1992 年新闻出版总署、国家语言文字工作委员会发布的《出版物汉字使用管理规定》, 以 1986 年 10 月国家语言文字工作委员会重新发布的《简化字总表》和 1988 年 3 月国家语言文字工作委员会和新闻出版总署发布的《现代汉语通用字表》为准。

本刊编辑部