

新城疫病毒抑制肝星状细胞活化的初步研究

李亚琳

(渭南师范学院化学与生命科学学院生物系,渭南 714099)

【摘要】目的:探讨新城疫病毒(newcastle disease virus,NDV)在活化肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)中的复制对 HSC 的活化增殖以及细胞生物学功能的影响。**方法:**用不同滴度的 NDV 溶瘤株 Italien(NDV-Italien)感染经转化生长因子- $\beta 1$ (transformation growth factor- $\beta 1$,TGF- $\beta 1$)刺激活化的人 HSC 系 LX-2。MTT 法检测 NDV 对细胞增殖率的影响。免疫荧光显微镜技术检测活化标志物 α -SMA 的表达变化。**结果:**NDV 的感染抑制了 LX-2 细胞的增殖,细胞增殖率和病毒滴度呈负相关。与未刺激组相比,NDV 在 TGF- $\beta 1$ 刺激的 LX-2 细胞中的增殖抑制率提高,LX-2 细胞的活化标志物 α -SMA 的表达显著性下调。**结论:**NDV 在活化 LX-2 细胞中的复制具有抑制细胞增殖和 HSC 活化的作用。

【关键词】新城疫病毒;肝星状细胞;转化生长因子- $\beta 1$

【中国图书分类法分类号】R319

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-08-01

Inhibition of activation of hepatic stellate cell by newcastle disease virus

LI Yalin

(Department of Biology, College of Chemistry and Life Science, Weinan Normal University)

【Abstract】Objective: To explore the influence of newcastle disease virus(NDV) replication in LX-2 cells on the viability and biological function of hepatic stellate cell(HSC). **Methods:** Transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)-stimulated LX-2 cells were infected by different titres of oncolytic NDV-Italien, the proliferation rate of LX-2 cells was detected by MTT assay. Immunofluorescent technique was used to detect the expression of activation markers α -SMA in LX-2 cells. **Results:** NDV infection in LX-2 cells inhibited the cell proliferation in a dose-dependent manner. The growth inhibition rate of activated LX-2 cells was increased, the expression of activation markers α -SMA of LX-2 cells was down-regulated dramatically compared with those of controls. **Conclusions:** Replication of NDV in activated LX-2 cells inhibits the cell proliferation and attenuates the activation of LX-2 cells.

【Key words】newcastle disease virus; hepatic stellate cell; transformation growth factor- $\beta 1$

肝星状细胞(hepatic stellate cell,HSC)活化是肝纤维化发生的主要原因,而肝纤维化是肝癌前病变的重要病理阶段。免疫组化研究显示,肝癌合并肝硬化中活化的 HSC 数量显著增高,而肝癌细胞分泌的细胞因子也具有促进 HSC 活化并增殖的作用^[1];活化 HSC 和癌变细胞的相互作用会进一步加重肝癌合并肝硬化程度。因此着眼于活化 HSC 的靶向治疗是抑制肝纤维化,改善肝癌状况的一个新的研究热点。

新城疫病毒(newcastle disease virus,NDV)是单股负链 RNA 病毒,属副黏病毒科。由于多数 RNA 病毒具有天然地在肿瘤细胞选择性复制的特点,近年来用这类病毒作为新型运载工具在肿瘤基因治疗方面引起了人们的关注^[2-3]。而前期的实验已经证明了 NDV 也能够是在活化的 HSC 中复制。基于这个研

究基础,本研究通过测定细胞增殖以及 α -SMA 的表达,证明了 NDV 在活化的 HSC 中的复制对 HSC 的增殖以及活化标志蛋白 α -SMA 的表达的抑制作用,从而为以 HSC 为靶点的肝癌合并肝纤维化治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒 人 HSC 系 LX-2,美国 Mount Sinai 医学院 Scott L. Friedman 教授馈赠;溶瘤株 NDV-Italien 由德国癌症研究中心 Volker Schirmacher 教授馈赠。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基购于美国 Hyclon;新生牛血清购于中国杭州四季青公司;重组人转化生长因子- $\beta 1$ (transformation growth factor- $\beta 1$,TGF- $\beta 1$)购于以色列 Pepro-Tech Asia;鼠抗人 α -SMA 一抗购于英国 Abcam;羊抗鼠偶联 Alexa Fluor 594 IgG 二抗购于美国 Invitrogen。

1.2 方法

1.2.1 NDV 的感染 细胞按一定密度接种在培养板中,过夜,待细胞完全贴壁后,用不含血清的培养液洗细胞 2 次,然

作者介绍:李亚琳,Email:yal1222@126.com,

研究方向:肿瘤生物治疗。

基金项目:陕西省教育厅资助项目(编号:009JK427);渭南师范学院基金资助项目(编号:10YKZ054)。

后加入一定稀释浓度的 NDV, 置培养箱中 1 h。弃掉病毒液, 再用不含血清的培养液洗细胞 2 次, 换新鲜培养液继续培养。

1.2.2 MTT 检测 NDV 感染对 LX-2 细胞增殖的影响 LX-2 细胞以 5×10^3 个/孔接种在 96 孔板, 培养 24 h 后, 换以 0.5% 小牛血清的 DMEM 饥饿 24 h。接着用 2 ng/ml 的 TGF- β 1 (W/V, 用含 2% NBCS 的 DMEM 配制) 刺激细胞 24 h 或者直接用含 2% NBCS 的 DMEM 培养 24 h。随后分别以 1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800 倍稀释的 NDV ($10^{5.6}$ TCID₅₀/ml) 感染细胞, 每个浓度做 3 个复孔。继续培养 24 h 后, 每孔加 5 g/L 的 MTT 溶液 10 μ l, 4 h 后, 弃掉培养上清, 每孔加 100 μ l 的 DMSO, 溶解形成的甲臍结晶, 于 490 nm 分光光度法检测细胞的吸光度 (absorbance, A) 值, 并计算细胞的生长抑制率, 公式为: 生长抑制率 = (对照组细胞 A 值 - 实验组细胞 A 值) $\times$ 100% / 对照组细胞 A 值。

1.2.3 免疫荧光检测 NDV 感染后 α -平滑肌肌功蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 在 LX-2 细胞中的表达 LX-2 细胞以 1×10^5 个/孔接种在 6 孔板中 (预铺盖玻片)。培养 24 h 后, 用 NDV-Italien (1:400 稀释) 感染细胞。继续培养 24 h 后, 取出盖玻片, 进行 α -SMA 的免疫荧光检测, 步骤如下: PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min; 0.1% 的 Triton X-100 (用 PBS 配) 渗透 5 min; PBST (含 0.2% Tween-20 的 PBS) 洗 2 次后, 用 5% 的羊血清室温封闭 20 min; 直接加入鼠抗人 α -SMA 一抗 (1:50 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; PBST 洗 3 次后, 加入偶联 Alexa Fluor 594 的羊抗鼠 IgG 二抗 (1:800 稀释), 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min; PBST 洗 2 次后, 用 DAPI (1:5 000 稀释) 染核 2 min; PBS 洗 3 次, 荧光显微镜观察 α -SMA 在细胞中的表达。

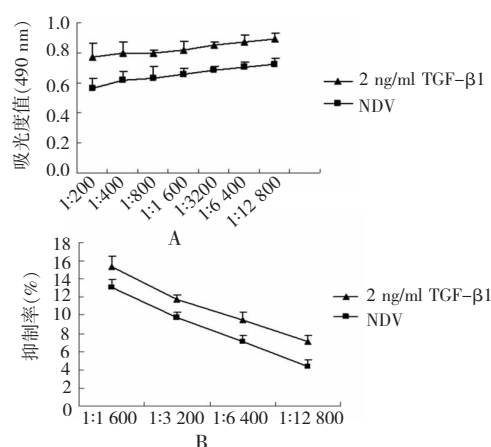
1.3 统计分析

采用 Excel 2007 版进行统计学处理。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, F 检验进行方差齐性检验, 方差齐性情况下行两独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.01$ (双侧)。

2 结果

2.1 NDV 抑制 LX-2 细胞的增殖

LX-2 细胞会随着传代培养而自发活化^[4]。为了考查 NDV 对 LX-2 细胞的增殖影响, 实验用不同稀释浓度的 NDV-Italien 感染传代到第 5 代的 LX-2 细胞以及用 2 ng/ml TGF- β 1 刺激活化的 LX-2 细胞, 并用 MTT 方法检测 NDV 对两组细胞增殖影响。表 1 为由 A 值计算得出的生长抑制率。如图 1 所示, LX-2 细胞无论是在未刺激状态还是刺激后的活化状态, NDV 均可以抑制细胞的增殖 (图 1A), 且具有剂量依赖性。但是 NDV 对 2 ng/ml TGF- β 1 刺激活化细胞的增殖抑制率更高 (图 1B), 与未刺激组相比差异具有统计学意义 ($t=7.232, t_{0.01}=3.707, P=0.00035$)。



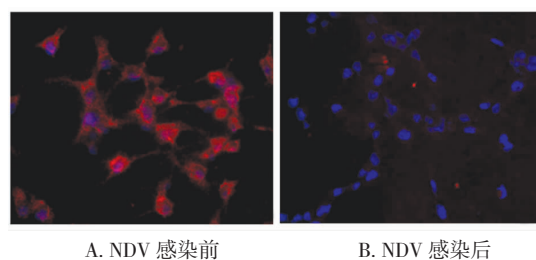
LX-2 细胞经 2 ng/ml TGF- β 1 预刺激后, 再用 NDV-Italien 感染 24 h, MTT 检测细胞在 490 nm 时的吸光度值 (A), 并计算细胞的生长抑制率 (B), 数据为 3 次独立检测的平均值

图 1 NDV 对 LX-2 细胞生长的抑制作用

Fig.1 Inhibition of LX-2 cell proliferation by NDV

2.2 NDV 抑制 LX-2 细胞的 α -SMA 表达

实验用 NDV-Italien 感染传代到第 5 代的 LX-2 细胞, 免疫荧光法检测细胞中 α -SMA 的表达。结果显示, 在 NDV 感染前, LX-2 细胞中有较强的 α -SMA 表达 (图 2A); 而 NDV 感染后, 细胞中 α -SMA 的表达明显消失 (图 2B)。



LX-2 细胞接种在 6 孔板中培养 24 h, 用 NDV-Italien 感染细胞; 24 h 后细胞被固定、渗透, 羊血清封闭后加入鼠抗人 α -SMA 一抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 加入偶联 Alexa Fluor 594 的羊抗鼠 IgG 二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 用 DAPI 染核后, 荧光显微镜观察 α -SMA 的表达

图 2 LX-2 细胞中 α -SMA 的表达 (400 $\times$)

Fig.2 Expressions of α -SMA in LX-2 cells (400 $\times$)

3 讨论

活化 HSC 高表达 α -SMA, 所以 α -SMA 已经被用作判断 HSC 活化以及纤维化发展的标志^[5]。而在 HSC 活化以及肝纤维化过程中, TGF- β 1 无疑是一

表 1 不同 NDV 浓度作用下 LX-2 细胞的生长抑制率 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Growth inhibition rate of LX-2 cell under different concentrations of NDV ($\bar{x} \pm s$)

NDV 浓度	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800
TGF刺激组	0.223 $\pm$ 0.051	0.177 $\pm$ 0.042	0.174 $\pm$ 0.037	0.154 $\pm$ 0.029	0.120 $\pm$ 0.045	0.106 $\pm$ 0.026	0.106 $\pm$ 0.026
未刺激组	0.211 $\pm$ 0.037	0.160 $\pm$ 0.022	0.153 $\pm$ 0.021	0.128 $\pm$ 0.040	0.097 $\pm$ 0.031	0.097 $\pm$ 0.031	0.077 $\pm$ 0.032

注: $\bar{x} \pm s$ 代表不同 NDV 浓度作用下 LX-2 细胞的生长抑制率

个重要的调节因子,是 HSC 活化的一个关键因素^[6]。TGF- β 1 能够促进 HSC 由星状的静止状态转型为成肌纤维细胞样的活化状态,诱导 HSC 活化并产生过量的细胞外基质进而形成肝纤维化^[7-8]。

HSC 活化以及肝纤维化的发生与肝癌发生也有密切的关系。国内几个报道均用免疫组化证明了肝癌组织中活化的 HSC 明显高于正常组织^[9-10];体外实验证明 HSC 在肝癌的血管生成中起主要作用^[11]。有文献报道大鼠的肝癌细胞能促进 HSC 的募集和活化^[12];而肝脏损伤后病变的肝细胞也能诱导 HSC 的活化^[13]。因此,肝癌发生发展过程中,活化的肝星状细胞和病变的肝细胞相互作用,共同促进肿瘤发生进程,而靶向 HSC 的抗纤维化治疗也成为阻止肝癌发生的有效途径之一^[14-15]。

以前的实验也证明了 TGF- β 1 具有促进 HSC 活化作用,并且用不同方法证实了 NDV 能够在活化 LX-2 细胞中高效复制。本实验通过进一步的研究工作探讨 NDV 在活化 LX-2 细胞中的复制对细胞的增殖以及活化功能的影响,证明了 NDV 在活化 HSC 中的复制能够抑制该细胞的增殖及活化,并降低细胞内一些活化相关基因的表达。

MTT 方法证明,LX-2 细胞无论是否被 TGF- β 1 预刺激,NDV 均剂量依赖性地抑制细胞的增殖。TGF- β 1 刺激后,细胞在 490 nm 的 A 值和计算所得的生长抑制率总体高于未刺激组,说明 TGF- β 1 的刺激诱导了 LX-2 细胞的增殖,促进细胞的活化。而当 NDV 感染后,其在 TGF- β 1 刺激活化的 LX-2 细胞的复制率更高,从而对细胞生长抑制率也比未刺激组高。这个结果表明 NDV 更容易在刺激活化的细胞中复制而引起更高的细胞死亡率,即 NDV 的复制效率越高,对细胞的生长抑制率也越高,对细胞活化的抑制也更加有效。

为了证明 NDV 的复制能够抑制 HSC 的活化,本试验检测了 NDV 感染对 LX-2 细胞中的 α -SMA 表达的影响。同预期结果一样,NDV 感染后 α -SMA 表达明显消失。说明 NDV 的复制确实很大程度地降低了 LX-2 的活化程度。NDV 能在活化 HSC 中相对高效地复制,进而抑制细胞的活化功能。

以上实验数据表明:NDV 在活化 HSC 中的复制,能够抑制 HSC 的增殖以及活化相关蛋白的表达,很大程度地抑制了 HSC 的活化功能。该结果为将 NDV 进一步用于抑制肝纤维化以及肝癌治疗提供一定的试验基础。

参 考 文 献

[1] Xia Y H, Song Z J, Chen R X, et al. Analysis of differential gene

expression in rat hepatic stellate cells activated by culture or hepatocellular carcinoma cell induction[J]. Chinese Journal of Oncology, 2009, 31(3): 164-169.

[2] Bian H, Fournier P, Peeters B, et al. Tumor-targeted gene transfer in vivo via recombinant Newcastle disease virus modified by a bispecific fusion protein[J]. Int J Oncology, 2005, 27(9): 377-384.

[3] Bian H, Fournier P, Moormann R, et al. Selective gene transfer to tumor cells by recombinant Newcastle disease virus via a bispecific fusion protein[J]. Int J Oncol, 2005, 26(2): 431-439.

[4] Xu L, Hui A Y, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell line, LX-1 and LX-2; new tools for analysis hepatic fibrosis[J]. Gut, 2005, 54(1): 142-151.

[5] Dong R, Luo Y, Zheng S. α -SMA Overexpression associated with increased liver fibrosis in infants with biliary atresia[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. doi: 22785417 [Epub ahead of print].

[6] Chang X M, Chang Y, Jia A. Effects of interferon- α on expression of hepatic stellate cell and transforming growth factor- β 1 and α -smooth muscle actin in rats with hepatic fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(17): 2634-2636.

[7] Yoshida K, Matsuzaki K. Differential regulation of TGF- β /smad signaling in hepatic stellate cells between acute and chronic liver injuries[J]. Front Physiol, 2012, 3: 53.

[8] Tang L X, He R H, Yang G, et al. Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF- β /Smad signaling in vivo and in vitro[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31350.

[9] 石磊, 贾雅丽, 张晓梅, 等. RNA 干扰技术体外抑制肝星状细胞表皮形态发生素表达及其对肝癌细胞迁移能力的影响[J]. 生物学与生物物理进展, 2011, 38(4): 361-369.

Shi L, Jia Y L, Zhang X M, et al. RNAi suppress the expression of skin morphogenesis element in hepatic stellate cells in vitro and influence hepatoma carcinoma cell metastasis[J]. Progress in Biochemistry and Biophys, 2011, 38(4): 361-369.

[10] 王伟, 官阳, 杨木兰, 等. 活化肝星状细胞与肝细胞肝癌发生及转移的相关性[J]. 临床与实验病理学杂志, 2007, 23(4): 492-494. Wang W, Guan Y, Yang M L, et al. Correlation of activated hepatic stellate cells and the occurring and transferring of hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2007, 23(4): 492-494.

[11] Zhao W, Su W, Kuang P, et al. The role of hepatic stellate cells in the regulation of T-cell function and the promotion of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2012, 41(2): 457-464.

[12] Schulze-Krebs A, Preimel D, Popov Y, et al. Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells[J]. Gastroenterology, 2005, 129(1): 246-258.

[13] Myung S J, Yoon J H, Gwak G Y, et al. Bile acid-mediated thrombospondin-1 induction in hepatocytes leads to transforming growth factor- β -dependent hepatic stellate cell activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(4): 1091-1096.

[14] Kinoshita K, Iimuro Y, Otagawa K, et al. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats[J]. Gut, 2007, 56(5): 706-714.

[15] Campbell J S, Johnson M M, Bauer R L, et al. Targeting stromal cells for the treatment of platelet-derived growth factor C-induced hepatocellular carcinogenesis[J]. Differentiation, 2007, 75(9): 843-852.

(责任编辑:唐秋珊)