

梁会娟, 任志芳, 刘伟, 等. 冬凌草甲素通过调控 UBC9 表达对肝星状细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 98-104.

Liang HJ, Ren ZF, Liu W, et al. Effects of Oridonin on proliferation and apoptosis in hepatic stellate cells by regulating UBC9 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 98-104.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 015

冬凌草甲素通过调控 UBC9 表达对肝星状细胞增殖、凋亡的影响

梁会娟^{1*}, 任志芳², 刘伟³, 张彦忠³

(1. 新乡医学院第三附属医院临床药学办公室, 河南 新乡 453003; 2. 濮阳医学高等专科学校, 河南 濮阳 457000; 3. 新乡医学院第三附属医院, 河南 新乡 453003)

【摘要】 目的 探讨冬凌草甲素对肝星状细胞增殖、凋亡的影响和分子机制。**方法** 采用不同浓度的冬凌草甲素干预肝星状细胞(HSC-T6)48 h。分别采用噻唑蓝(MTT)实验、流式细胞术检测 HSC-T6 细胞增殖和凋亡变化。采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和蛋白质印记(Western blot)检测泛素结合酶 9(UBC9)表达变化。转染 UBC9 小干扰 RNA(si-UBC9)下调 HSC-T6 细胞中 UBC9 表达水平,采用上述方法检测细胞增殖、凋亡变化。**结果** 冬凌草甲素干预后,HSC-T6 细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高,UBC9 表达显著降低,并具有显著的剂量依赖关系($P<0.05$)。干扰 UBC9 表达后 HSC-T6 细胞增殖抑制率、凋亡率显著升高,UBC9 表达显著降低($P<0.05$)。过表达 UBC9 能够逆转冬凌草甲素对 HSC-T6 细胞的增殖、凋亡的影响($P<0.05$)。**结论** 冬凌草甲素能够抑制肝星状细胞增殖,诱导细胞凋亡,其机制与下调 UBC9 表达有关。

【关键词】 冬凌草甲素;泛素结合酶 9;肝星状细胞;增殖;凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0098-07

Effects of Oridonin on proliferation and apoptosis in hepatic stellate cells by regulating UBC9

LIANG Huijuan^{1*}, REN Zhifang², LIU Wei³, ZHANG Yanzhong³

(1. Clinical Pharmacy Office of the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China. 2. Puyang Medical College, Puyang 457000. 3. the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003)

【Abstract】 Objective To explore the effects of Oridonin on the proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells and their molecular mechanism. **Methods** Different concentrations of Oridonin were used to intervene in hepatic stellate cells (HSC-T6) for 48 h. The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and flow cytometry were used to detect proliferation and apoptosis in HSC-T6 cells. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the expression changes of ubiquitin-conjugating enzyme 9 (UBC9). The transfection of UBC9 small interfering RNA (si-UBC9) downregulated the expression level of UBC9 in HSC-T6 cells. Changes in cell proliferation and apoptosis were also evaluated using the aforementioned method. **Results** After Oridonin intervention, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of HSC-T6 cells were significantly increased, the expression of UBC9 was significantly decreased and there was a significant dose-dependent relationship ($P<0.05$). After downregulating UBC9 expression, the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of HSC-T6 cells were significantly increased and UBC9 expression was

[作者简介] 梁会娟(1983—),女,硕士,主管药师,研究方向:临床药学和中药药理学研究。E-mail: xyxf4g@163.com

significantly decreased ($P < 0.05$). The overexpression of UBC9 was able to reverse the effects of Oridonin on the proliferation and apoptosis of HSC-T6 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** Oridonin can inhibit proliferation and induce apoptosis in hepatic stellate cells. The underlying mechanism is related to the downregulation of UBC9 expression.

[Keywords] Oridonin; ubiquitin-conjugating enzyme 9; hepatic stellate cells; proliferation; apoptosis

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是一种常见的慢性肝损伤的伤口愈合反应,是慢性肝病最终发展为肝硬化或肝细胞癌的重要病理过程。肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 是肝纤维化的关键细胞,正常肝中 HSC 处于静止状态,当肝受到异常刺激时, HSC 活化、增殖并分泌大量细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 导致肝 ECM 合成和降解失衡,促进 HF 形成^[1]。因此,如何有效的抑制 HSC 增殖,诱导其凋亡是防治 HF 的重要措施。冬凌草甲素是从冬凌草中分离得到的二萜类化合物,具有抗炎、抗癌、神经保护等多种生物学功能^[2-3]。有文献报道冬凌草甲素可诱导 HSC 凋亡和周期阻滞,抑制内源性和转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 诱导的 ECM 合成,是一种潜在的预防 HF 药物^[4]。然而,冬凌草甲素抗 HF 的潜在分子机制并未完全阐明。泛素结合酶 9 (ubiquitin Conjugating Enzyme 9, UBC9) 是小泛素样分子相关修饰物 (small ubiquitin-like molecular related modifiers, SUMO) 泛素化过程的唯一接合酶,研究显示 UBC9 参与 HSC 凋亡过程,下调 UBC9 可抑制 HF 进程^[5]。但冬凌草甲素能否调控 UBC9 影响 HF 进程尚未可知。本研究以 UBC9 为切入点,探讨冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖、凋亡的影响和分子机制,以期冬凌草甲素用于临床防治 HF 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞

大鼠肝星状细胞 HSC-T6 购于美国模式生物保藏中心。

1.2 主要试剂与仪器

杜尔伯格伊戈尔培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清购于美国 Gibco 公司;冬凌草甲素 (批号 111721-201704, 纯度 $\geq 99.7\%$) 购于中国食品药品检定研究院;UBC9 小干扰 RNA (UBC9 small interfering RNA, si-UBC9) 及其阴性对照 (small interfering RNA negative control, si-NC)、UBC9 过表达载体 (UBC9 overexpression vector, pcDNA-UBC9)、空载体 (Empty vector

plasmid, pcDNA) 由上海吉玛制药公司提供;凋亡试剂盒、噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 试剂盒购于上海碧云天公司;山羊抗兔二抗、兔源 UBC9 抗体、细胞周期素 D1 (CyclinD1)、p21、B 细胞淋巴瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 Bcl 相关 X 蛋白 (Bcl associated x protein, Bax) 抗体购于上海赛信通生物技术公司;逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒购于大连 TaKaRa 生化科技公司;TRIzol 试剂、Lipofectamine™ 2000 购于美国 Invitrogen 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养和实验分组

复苏 HSC-T6 细胞后,用含 1% 青链霉素双抗、10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37℃、CO₂ 体积分数 5%、湿度为 70%~80% 的培养箱中培养。每隔 1 d 换液 1 次,当细胞密度到 80% 时,即可进行传代培养。分别采用冬凌草甲素浓度为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的细胞培养液培养 HSC-T6 细胞 48 h,依次记为冬凌草甲素-低组、冬凌草甲素-中组、冬凌草甲素-高组^[6]。同时设置对照组即正常培养的 HSC-T6 细胞。按照下述方法检测 HSC-T6 细胞增殖、凋亡、增殖凋亡相关蛋白、UBC9 的表达水平。

为证实冬凌草甲素对肝星状细胞增殖、凋亡的影响与调控 UBC9 表达有关,将 HSC-T6 细胞分为 si-NC 组 (转染 si-NC)、si-UBC9 组 (转染 si-UBC9)、冬凌草甲素 + pcDNA 组 (转染 pcDNA 后用含 40 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素的细胞培养液孵育 48 h)、冬凌草甲素 + pcDNA-UBC9 组 (转染 pcDNA-UBC9 后用含 40 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素的细胞培养液孵育 48 h)。细胞转染参照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行。

1.3.2 MTT 实验检测细胞增殖

取 5×10^3 个对数期 HSC-T6 细胞接种 96 孔板,当细胞贴壁后,按照上述实验分组进行干预处理后,加入 20 μL MTT 试剂,反应 4 h,吸取孔内培养液,再加入 150 μL 二甲基亚砷,低速振荡 10 min,当结晶溶解后用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度 (absorbance, A) 值。细胞增殖抑制率 = $[(A_{\text{对照孔}} - A_{\text{实验孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%$

1.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡

用适量结合缓冲液重悬各组 HSC-T6 细胞,向

500 μL 细胞悬液中添加 5 μL 的 Annexin V-FITC、5 μL 的 PI 溶液,混合均匀后,室温避光条件下反应 15 min,上机检测细胞凋亡率。

1.3.4 蛋白质印记 (Western blot) 检测蛋白表达水平

使用 RIPA 裂解液对各组 HSC-T6 细胞进行裂解。制备十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶。将蛋白样品与适量上样缓冲液混匀,沸水浴加热 3 min 变性蛋白。取 30 μg 蛋白样品上样后 100 V 电泳 90 min 分离蛋白样品,湿法转膜至硝酸纤维素膜后,置于 5% 脱脂牛奶中 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。置于稀释的一抗溶液中室温反应 2 h;置于二抗稀释液中孵育 1 h。显影后用凝胶成像系统分析目的蛋白(内参为 GAPDH)的相对表达水平。

1.3.5 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 检测 UBC9 mRNA 表达水平

TRIzol 试剂提取各组 HSC-76 细胞总 RNA,以逆转合成的 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环。2 $^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析 UBC9 mRNA 相对表达水平。引物序列(5'-3'): UBC9 上游 GGAAGTCCCGAGACAAAGGG,下游 CAGCCACGAAACCAAATGGG, GAPDH 上游 TGGACCAAGTACATGAACCACC,下游 CTGGTGATTGGACACGGTGA。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 进行统计学分析。实验独立重复 3 次,计量资料符合正态分布以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组间统计分析采用独立样本 t 检验,多组间统计分析采用单因素方差分析和 SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖的影响

与对照组比较,冬凌草甲素-低、-中、-高剂量组 HSC-T6 细胞 CyclinD1 蛋白表达显著降低,细胞抑制率、p21 蛋白表达显著升高($P<0.05$),且冬凌草甲素对 HSC-T6 细胞增殖和相关蛋白表达的影响具有剂量依赖性。见表 1 和图 1。

2.2 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响

与对照组比较,冬凌草甲素-低、-中、-高剂量组 HSC-T6 细胞 Bcl-2 蛋白表达显著降低,Bax 蛋白表

达、凋亡率显著升高($P<0.05$),且冬凌草甲素对 HSC-T6 细胞凋亡和相关蛋白表达的影响具有剂量依赖性。见表 2 和图 2。

2.3 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 中 UBC9 表达的影响

与对照组比较,冬凌草甲素-低、-中、-高剂量组 HSC-T6 细胞 UBC9 mRNA 和 UBC9 蛋白表达显著降低($P<0.05$),冬凌草甲素对 UBC9 mRNA 和 UBC9 蛋白表达的影响具有依赖性。见表 3 和图 3。

2.4 干扰 UBC9 表达对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖的影响

与 si-NC 组比较,si-UBC9 组 HSC-T6 细胞 UBC9 蛋白表达显著降低,表明 HSC-T6 细胞中 UBC9 表达受到抑制。抑制 UBC9 表达后,HSC-T6 细胞 CyclinD1 蛋白表达显著降低,增殖抑制率、p21 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。见表 4 和图 4。

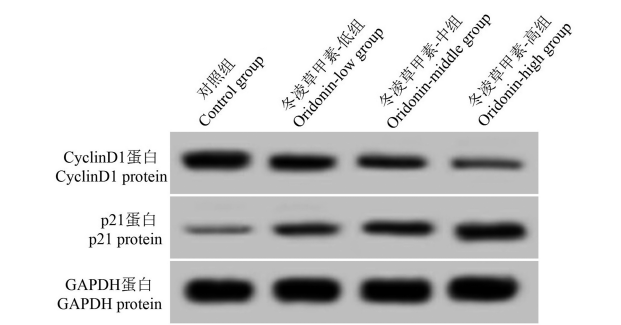


图 1 增殖相关蛋白表达

Figure 1 Expression of proliferation-related proteins

表 1 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of Oridonin on the proliferation of rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	抑制率 (%) Inhibition ratio	CyclinD1 蛋白 CyclinD1 protein	p21 蛋白 p21 protein
对照组 Control group	0.00 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.02
冬凌草甲素-低组 Oridonin-low group	11.25 $\pm$ 1.17 [*]	0.52 $\pm$ 0.05 [*]	0.33 $\pm$ 0.03 [*]
冬凌草甲素-中组 Oridonin-medium group	28.36 $\pm$ 2.74 ^{**}	0.39 $\pm$ 0.04 ^{**}	0.46 $\pm$ 0.04 ^{**}
冬凌草甲素-高组 Oridonin-high group	49.68 $\pm$ 4.33 ^{**&}	0.24 $\pm$ 0.03 ^{**&}	0.59 $\pm$ 0.05 ^{**&}
<i>F</i>	203.542	41.244	62.593
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$;与冬凌草甲素-低组相比,[#] $P<0.05$;与冬凌草甲素-中组相比,[&] $P<0.05$ 。

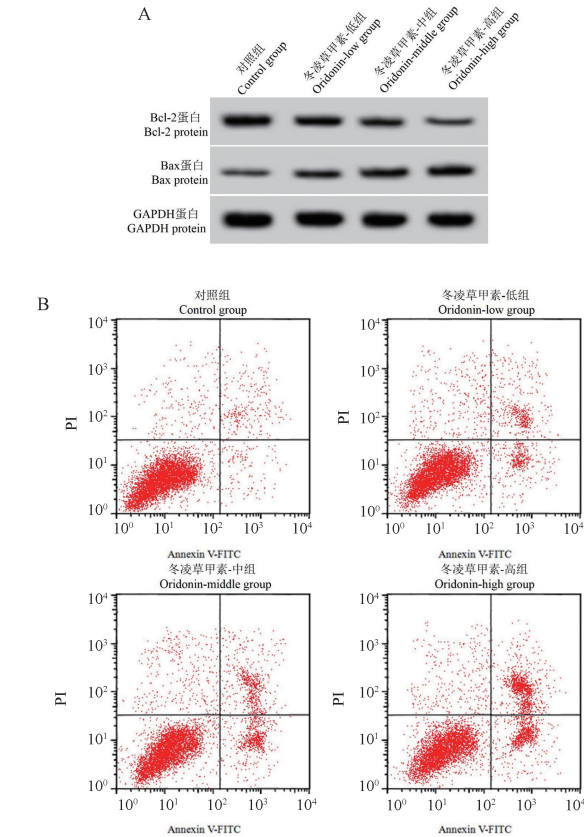
Note. Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the Oridonin-low group, [#] $P<0.05$. Compared with the Oridonin-medium group, [&] $P<0.05$.

表 2 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响 (x̄±s, n=3)

Table 2 Effect of Oridonin on the apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	凋亡率 (%) Apoptosis rate	Bcl-2 蛋白 Bcl-2 protein	Bax 蛋白 Bax protein
对照组 Control group	7.32±0.71	0.77±0.07	0.29±0.03
冬凌草甲素-低组 Oridonin-low group	11.65±1.23 *	0.64±0.06 *	0.44±0.04 *
冬凌草甲素-中组 Oridonin-medium group	17.32±1.65 **	0.52±0.04 **	0.56±0.05 **
冬凌草甲素-高组 Oridonin-high group	22.14±2.19 **&	0.36±0.03 **&	0.68±0.06 **&
F	52.834	33.264	38.826
P	0.000	0.000	0.000

注:与对照组相比, **P*<0.05;与冬凌草甲素-低组组相比, #*P*<0.05;与冬凌草甲素-中组组相比, &*P*<0.05。
Note. Compared with the control group, **P*<0.05. Compared with the Oridonin-low group, #*P*<0.05. Compared with the Oridonin-medium group, &*P*<0.05.



注:A:凋亡相关蛋白表达;B:细胞凋亡流式图。
图 2 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响
Note. A, Apoptosis-related protein expression. B, Flow diagram of apoptosis.
Figure 2 Effect of Oridonin on the apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

表 3 冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 中 UBC9 表达的影响 (x̄±s, n=3)

Table 3 Effects of Oridonin on UBC9 expression in rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	UBC9 mRNA	UBC9 蛋白 UBC9 protein
对照组 Control group	1.00±0.05	0.84±0.08
冬凌草甲素-低组 Oridonin-low group	0.75±0.07 *	0.71±0.06 *
冬凌草甲素-中组 Oridonin-medium group	0.63±0.06 **	0.56±0.04 **
冬凌草甲素-高组 Oridonin-high group	0.49±0.04 **&	0.41±0.03 **&
F	44.532	33.216
P	0.000	0.000

注:与对照组相比, **P*<0.05;与冬凌草甲素-低组组相比, #*P*<0.05;与冬凌草甲素-中组组相比, &*P*<0.05。
Note. Compared with the control group, **P*<0.05. Compared with the Oridonin-low group, #*P*<0.05. Compared with the Oridonin-medium group, &*P*<0.05.

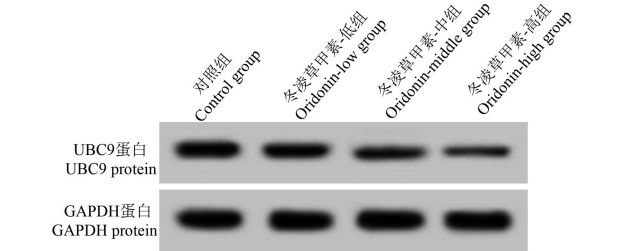


图 3 UBC9 蛋白表达
Figure 3 Expression of UBC9 protein

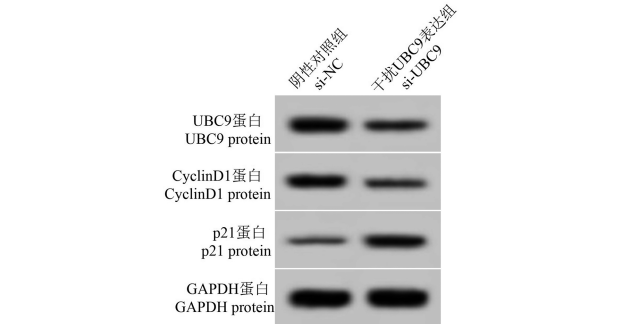


图 4 UBC9 和增殖相关蛋白表达
Figure 4 Expression of UBC9 protein

2.5 干扰 UBC9 表达对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响

抑制 UBC9 表达后, HSC-T6 细胞 Bcl-2 蛋白表达降低, 凋亡率、Bax 蛋白表达显著升高 (*P*<0.05)。见表 5 和图 5。

2.6 过表达 UBC9 逆转冬凌草甲素 (40 μmol/L) 对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖和凋亡的作用

与对照组比较, 冬凌草甲素组 HSC-T6 细胞

CyclinD1、Bcl-2 和 UBC9 蛋白表达显著降低,p21 和 Bax 蛋白表达、增殖抑制率、凋亡率显著升高;与冬凌草甲素 + pcDNA 组比较,冬凌草甲素 + pcDNA-UBC9 组 HSC-T6 细胞 CyclinD1、Bcl-2 和 UBC9 蛋白表达显著升高,p21 和 Bax 蛋白表达、增殖抑制率、凋亡率显著降低($P<0.05$)。见表 6 和图 6。

3 讨论

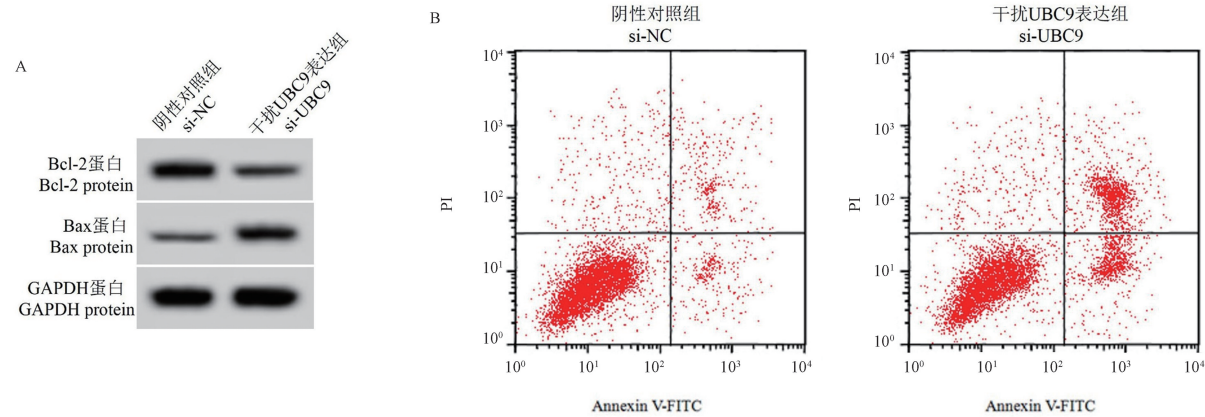
冬凌草甲素是东亚地区常用中草药冬凌草的天然活性成分,近年来因其广泛的生物活性和治疗多种疾病的潜力而受到越来越多的关注。研究显示,冬凌草甲素通过调节相关信号通路抑制细胞增殖、触发自

噬、诱导凋亡、阻滞细胞周期进展等机制对肝癌^[7]、胆管癌^[8]、神经母细胞瘤^[9]等多种类型恶性肿瘤表现出抗肿瘤作用,是潜在的癌症候选治疗药物。冬凌草甲素还可抑制博莱霉素诱导的小鼠肺组织中平滑肌肌动蛋白和 I 型胶原蛋白表达,减轻肺泡空间塌陷、肺气肿和炎症细胞浸润,防治肺纤维化病变^[10]。此外,冬凌草甲素还可通过促进 P21 相关的自噬来预防心肌肥大^[11]。本研究探讨冬凌草甲素的抗 HF 作用发现,冬凌草甲素可显著抑制 HSC-T6 细胞增殖,诱导细胞凋亡,并呈显著的量效依赖关系,与 Bohanon 等^[4]研究结果相吻合。CyclinD1 和 P21 细胞增殖过程中的关键调控蛋白,P21 通过抑制周期

表 4 干扰 UBC9 表达对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖的影响 ($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 4 Effects of inference with UBC9 expression on proliferation of rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	UBC9 蛋白 UBC9 protein	抑制率(%) Inhibition ratio	CyclinD1 蛋白 CyclinD1 protein	p21 蛋白 p21 protein
阴性对照 si-NC	0.83±0.07	6.33±0.61	0.62±0.06	0.22±0.02
干扰 UBC9 表达组 si-UBC9	0.39±0.04*	41.58±4.22*	0.28±0.03*	0.55±0.05*
<i>t</i>	9.453	14.319	8.779	10.614
<i>P</i>	0.001	0.000	0.001	0.000

注:与 si-NC 组相比,* $P<0.05$ 。
Note. Compared with si-NC group, * $P<0.05$.



注:A:凋亡相关蛋白表达;B:细胞凋亡流式图。
图 5 干扰 UBC9 表达对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响

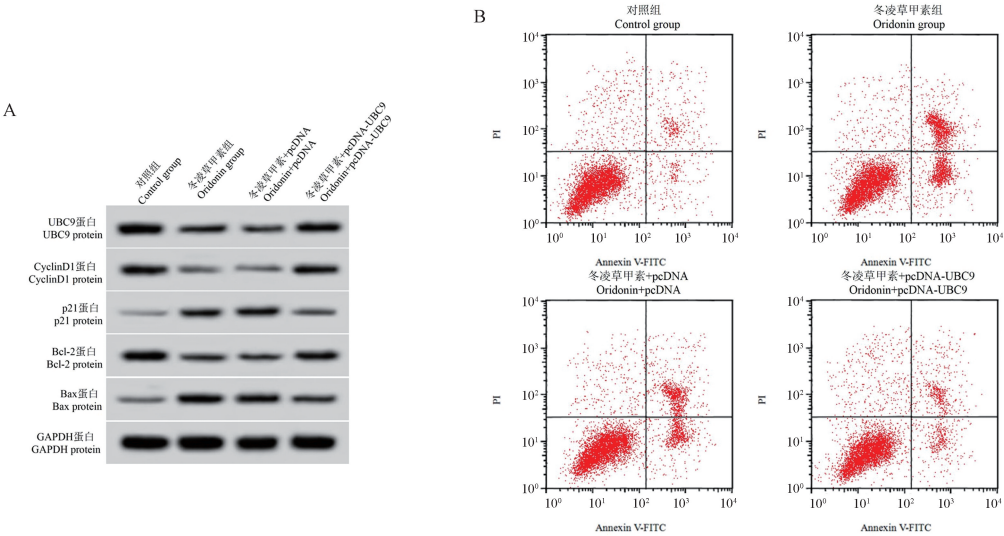
Note. A, Expression of apoptosis-related proteins. B, Flow diagram of apoptosis.

Figure 5 Effects of interference with UBC9 expression on the apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

表 5 干扰 UBC9 表达对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s,n=3$)
Table 5 Effects of interference with UBC9 expression on the apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	凋亡率(%) Apoptosis rate	Bcl-2 蛋白 Bcl-2 protein	Bax 蛋白 Bax protein
阴性对照组 si-NC	7.12±0.71	0.79±0.07	0.28±0.03
干扰 UBC9 表达组 si-UBC9	18.63±1.54*	0.39±0.04*	0.63±0.06*
<i>t</i>	11.756	8.593	9.037
<i>P</i>	0.000	0.001	0.001

注:与 si-NC 组相比,* $P<0.05$ 。
Note. Compared with si-NC group, * $P<0.05$.



注:A;UBC9 和凋亡相关蛋白表达;B:细胞凋亡流式图。

图 6 UBC9 过表达逆转了冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖和凋亡的作用

Note. A, Expression of UBC9 and apoptosis-related proteins. B, Flow diagram of apoptosis.

Figure 6 UBC9 overexpression reversed the effect of Rubescensine A on the proliferation and apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

表 6 UBC9 过表达逆转了冬凌草甲素对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 增殖和凋亡的作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 UBC9 overexpression reversed the effect of Rubescensine A on the proliferation and apoptosis of rat hepatic stellate cells HSC-T6

分组 Groups	UBC9 蛋白 UBC9 protein	抑制率 (%) Inhibition ratio	凋亡率 (%) Apoptosis rate	CyclinD1 蛋白 CyclinD1 protein	p21 蛋白 p21 protein	Bcl-2 蛋白 Bcl-2 protein	Bax 蛋白 Bax protein
对照组 Control group	0.82±0.07	0.00±0.02	6.32±0.63	0.63±0.06	0.21±0.02	0.78±0.07	0.27±0.03
冬凌草甲素 Oridonin	0.41±0.04*	47.21±4.33*	21.62±2.13*	0.23±0.03*	0.57±0.05*	0.35±0.03*	0.67±0.06*
冬凌草甲素+pcDNA Oridonin+pcDNA	0.38±0.03	48.65±4.72	23.58±2.36	0.22±0.02	0.58±0.06	0.34±0.03	0.69±0.07
冬凌草甲素+pcDNA-UBC9 Oridonin+pcDNA-UBC9	0.71±0.07 [#]	20.11±2.03 [#]	11.28±1.14 [#]	0.52±0.05 [#]	0.33±0.03 [#]	0.67±0.06 [#]	0.39±0.04 [#]
F	46.634	145.099	69.359	69.514	54.203	58.447	47.236
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与冬凌草甲素+pcDNA 组相比,[#] $P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the Oridonin+pcDNA group, [#] $P<0.05$.

素依赖激酶 (cyclin dependent kinases, CDKs)/CyclinD1 复合物活性,抑制 G1-S 期相变发挥抗增殖作用^[12]。Bcl-2 和 Bax 是细胞凋亡调控中重要的蛋白,Bax 表达增加、Bcl-2 表达降低可促进线粒体膜通透性改变,抑制孔道开放以及抑制细胞色素 C 从线粒体释放,抑制 Caspases 活化进而抑制细胞凋亡发生^[13]。本研究显示,冬凌草甲素呈剂量依赖性抑制 CyclinD1、Bcl-2 表达,促进 P21、Bax 表达,这提示冬凌草甲素可能通过调控 CyclinD1、P21、Bax、Bcl-2 蛋白抑制 HSC-T6 增殖并诱导其凋亡。

UBC9 是 UBC 家族的重要成员,其通过促使活

化的 SUMO 与目标蛋白接合,进而介导 SUMO 发挥蛋白调节作用,是纤维化的关键调节因子^[14]。研究显示,在肾脏纤维化过程中 UBC9 表达上调^[15]。沉默 UBC9 通过抑制早幼粒细胞白血病蛋白类泛素化可降低主动脉缩窄小鼠心肌纤维化的发展,并部分改善其心功能^[16]。在活化的人 HSC 细胞 LX-2 中 UBC9 表达显著上调,沉默 UBC9 可明显抑制 HSC 增殖,降低平滑肌肌动蛋白和 I 型胶原的表达水平,进而阻止 HF^[17]。此外,多种肝癌细胞中 UBC9 亦呈高表达,干扰 UBC9 表达可明显降低肝癌细胞的增殖、迁移能力,提高其凋亡水平^[18-19]。为探讨

UBC9 在冬凌草甲素抗 HF 中的作用,本研究检测冬凌草甲素干预后 HSC-T6 细胞中 UBC9 表达水平,结果显示冬凌草甲素呈剂量依赖性抑制 UBC9 表达水平,提示 UBC9 表达下调可能与冬凌草甲素的抗 HF 作用有关。进一步研究显示,转染 si-UBC9 干扰 UBC9 表达对 HSC-T6 细胞亦具有显著的增殖抑制和凋亡作用。此外,本研究显示过表达还能够逆转冬凌草甲素对 HSC-T6 细胞的增殖、凋亡以及其相关蛋白表达的影响,提示冬凌草甲素对 HSC-T6 细胞的增殖抑制和凋亡促进作用抑制 UBC9 表达有关。

综上所述,冬凌草甲素可抑制 HSC-T6 细胞增殖,促进细胞凋亡,进而具有预防 HF 的潜在价值,其机制与抑制 UBC9 表达有关,这为开发冬凌草甲素用于临床防治 HF 奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] Huang Y, Deng X, Liang J. Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 352(2): 420-426.
- [2] Xu J, Wold EA, Ding Y, et al. Therapeutic potential of oridonin and its analogs: from anticancer and antiinflammation to neuroprotection [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 474-490.
- [3] 丁明勇, 王卫星. 冬凌草甲素对胆管癌 QBC939 细胞增殖、凋亡及端粒酶活性的影响 [J]. *广西医学*, 2016, 38(3): 308-312.
- [4] Bohanon FJ, Wang X, Ding C, et al. Oridonin inhibits hepatic stellate cell proliferation and fibrogenesis [J]. *J Surg Res*, 2014, 190(1): 55-63.
- [5] 袁金华. 下调 ubc9 对人肝星状细胞增殖的影响及其机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [6] 刘俊保, 岳静宇, 唐引引. 冬凌草甲素对 EC9706 细胞增殖、凋亡的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2014, 11(1): 8-11.
- [7] Ren DL, Ghoorun RA, Wu XH, et al. Oridonin induces apoptosis in HGC-27 cells by activating the JNK signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 255-260.
- [8] Chen K, Ye J, Qi L, et al. Oridonin inhibits hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and cell migration by the hypoxia-inducible factor-1 α /matrix metalloproteinase-9 signal pathway in gallbladder cancer [J]. *Anticancer Drugs*, 2019, 30(9): 925-932.
- [9] Zhu HQ, Zhang C, Guo ZY, et al. Oridonin induces Mdm2-p60 to promote p53-mediated apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(11): 5313-5326.
- [10] Fu Y, Zhao P, Xie Z, et al. Oridonin inhibits myofibroblast differentiation and bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating transforming growth factor β (TGF β)/smad pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(1): 7548-7555.
- [11] Xu M, Wan CX, Huang SH, et al. Oridonin protects against cardiac hypertrophy by promoting P21-related autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 403-413.
- [12] Wu W, Liu Q, Liu Y, et al. Dixdc1 targets CyclinD1 and p21 via PI3K pathway activation to promote schwann cell proliferation after sciatic nerve crush [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 956-963.
- [13] Ye Z, Duan J, Wang L, et al. LncRNA-LET inhibits cell growth of clear cell renal cell carcinoma by regulating miR-373-3p [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19(1): 311-325.
- [14] 方素芬, 郭武华. 类泛素缀和酶 9 在肝纤维化中的作用及机制 [J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(13): 2079-2082.
- [15] Arvaniti E, Vakrakou A, Kaltezioti V, et al. Nuclear receptor NR5A2 is involved in the calreticulin gene regulation during renal fibrosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(9): 1774-1785.
- [16] Liu Y, Zhao D, Qiu F, et al. Manipulating PML SUMOylation via silencing UBC9 and RNF4 regulates cardiac fibrosis [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(3): 666-678.
- [17] Fang S, Yuan J, Shi Q, et al. Downregulation of UBC9 promotes apoptosis of activated human LX-2 hepatic stellate cells by suppressing the canonical NF- κ B signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174374-e0174387.
- [18] 邱君瑶. 沉默 UBC9 对人肝癌 HepG2 细胞增殖与凋亡的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [19] 盛凤, 沈依萌, 万乔浩, 等. 蛋白激酶 B1 去类泛素化修饰抑制肝癌的增殖和转移 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2017, 39(11): 814-820.

[收稿日期] 2020-10-26