

## 细胞珠蛋白对肝星状细胞氧化损伤的保护作用

吕颖慧<sup>1,2</sup>, 王启钊<sup>1,2</sup>, 李招发<sup>1,2</sup>, 刁勇<sup>1,2</sup>, 许瑞安<sup>1,2</sup>

1 华侨大学分子药理学研究所, 泉州 362021

2 分子药物教育部工程研究中心, 泉州 362021

**摘要:** 为揭示细胞珠蛋白对肝星状细胞氧化损伤的保护作用及相关机制, 通过 siRNA 干扰内源性细胞珠蛋白基因, 利用重组细胞珠蛋白作用于完全活化的人肝星状细胞系 LX-2 及大鼠原代肝星状细胞, 并在 LX-2 细胞内过表达细胞珠蛋白, 考察在过氧化氢及铁过载两种不同作用机制的氧化反应模型中细胞的增殖性及细胞内超氧化物水平。结果表明内源性细胞珠蛋白对于两种氧化反应导致的肝星状细胞损伤都具有显著性的保护作用, 证明其在活化肝星状细胞内的表达上调是其应对氧化应激的保护性措施; 重组细胞珠蛋白不仅能保护完全活化的 LX-2 细胞免受氧化应激损伤, 并且能抑制未完全活化的原代肝星状细胞过度增殖以及保护其被过度损伤; 重组细胞珠蛋白对细胞内的活性氧清除效果不理想, 可能与其进出细胞缺乏相应的主动运输机制有关。进一步在 LX-2 细胞内过表达细胞珠蛋白对无论是铁过载或是过氧化氢引起的氧化反应均能发挥较好的保护性作用。本研究为加速肝纤维化药物新靶点开发提供了理论依据。

**关键词:** 细胞珠蛋白, 肝星状细胞, 过氧化氢, 铁过载, 肝纤维化

## Role of cytoglobin in protecting hepatic stellate cells against oxidation induced damage

Yinghui Lü<sup>1,2</sup>, Qizhao Wang<sup>1,2</sup>, Zhaofa Li<sup>1,2</sup>, Yong Diao<sup>1,2</sup>, and Rui'an Xu<sup>1,2</sup>

1 *Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China*

2 *Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Quanzhou 362021, China*

**Abstract:** The aim of this study was to reveal the protection role and the related mechanism of cytoglobin on the oxidation induced hepatic stellate cell damage. We applied siRNA to interfere the endogenous cytoglobin gene, used recombinant cytoglobin protein to treat the completely activated human hepatic stellate cell line LX-2 and the incompletely activated primary rat hepatic stellate cells, or over-expressed cytoglobin protein in LX-2 cells. We used two different oxidative-stress related models, the hydrogen peroxide model and the iron-overload model in our experiments and investigated the proliferation status and the intracellular superoxide level of the cells. The results showed that endogenous cytoglobin exerted significant

**Received:** December 20, 2010; **Accepted:** May 16, 2011

**Supported by:** Key Project of Fujian Provincial Department of Science and Technology (No. 2010Y0036), Project of Huaqiao University (No. JB-ZR1133), Scientific and Technological Project of Quanzhou (No. 2007Z41).

**Corresponding author:** Rui'an Xu. Tel/Fax: +86-595-22690952; E-mail: ruianxu@hqu.edu.cn

福建科技厅重点项目 (No. 2010Y0036), 华侨大学基本科研业务费专项基金 (No. JB-ZR1133), 泉州市科技计划项目 (No. 2007Z41) 资助。

protective effects on hydrogen peroxide or iron-overload induced LX-2 cell damage, confirming that upregulation of cytoglobin was the protective response of activated hepatic stellate cells to oxidative stress. Recombinant cytoglobin protein could protect LX-2 cells from oxidation induced damage, and prevent primary rat hepatic stellate cells from excessive proliferation and injury. The cytoplasmic reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity of the recombinant cytoglobin protein was not as good as its capacity in scavenging ROS outside the cells, likely owing to the lack of active transporting mechanisms. Intracellular over-expression of cytoglobin protein could exert significant protective effect on LX-2 cells treated with hydrogen peroxide or iron-overload. Our results would accelerate the exploitation of new anti-fibrotic targets.

**Keywords:** cytoglobin, hepatic stellate cells, hydrogen peroxide, iron-overload, liver fibrosis

细胞珠蛋白 (Cytoglobin, Cygb) 是新近发现的哺乳动物中 4 种球蛋白 (Globin) 之一, 由 190 个氨基酸残基组成, 分子量 21.4 kDa, 编码基因定位于染色体 17q25<sup>[1]</sup>。Cygb 最初由 Kawada 等在大鼠肝星状细胞 (Hepatic stellate cells, HSC) 中发现, 且证实不论在活体或者离体状态, Cygb 蛋白与其 mRNA 均显著上调, 故 Cygb 初期仅被认为可以作为判断 HSC 激活和诊断肝纤维化与肝硬化的一个标记物而已<sup>[2]</sup>。我们的前期研究首次证明 Cygb 不仅具有预防肝纤维化的作用, 还能有效实现肝纤维化的逆转, 且其作用与协调肝脏中细胞间的氧化应激密切相关<sup>[3-6]</sup>; 最近的研究表明 Cygb 在肾脏中也能发挥显著的抗纤维化作用, 这种作用同样通过减小肾脏中的氧化应激实现<sup>[7]</sup>, 提示其抗氧化功能在对抗组织纤维化中的重要作用。本课题组早期已成功克隆 *cygb* 基因<sup>[8]</sup>, 并已建立成熟的体外表达纯化大量 Cygb 蛋白的有效方法<sup>[9-10]</sup>, 为进一步阐明 Cygb 这一功能基因在肝纤维化、肝硬化中的抗氧化治疗作用提供了有利条件。

众所周知, 肝脏中存在着机制复杂的氧化应激反应, 并且在肝纤维化进程中, 中心环节——肝星状细胞发生由静息态向活化态的转变。因此, 探讨 Cygb 蛋白在肝脏氧化损伤中的具体保护作用及机制必须要考虑到上述的复杂因素。本研究采用了过氧化氢及铁过载两种不同作用机制的氧化反应模型来模拟肝脏内的实际氧化刺激环境。其中过氧化氢主要模拟在肝脏中广泛存在的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 活性氧中间体; 铁过载模型则主要用以触发肝脏内的脂质过氧

化反应, 铁与花生四烯酸的协同增效反应主要发生于酒精性脂肪肝诱发的肝纤维化进程中。这两种模型基本可以代表在肝脏中的主要氧化应激分子作用。本实验还选取了两种不同活化状态的肝星状细胞——未完全活化的原代大鼠肝星状细胞 (Rat hepatic stellate cells, rHSC) 及完全活化的人肝星状细胞系 (LX-2) 为研究对象, 较全面揭示 Cygb 蛋白在肝纤维化中的抗氧化作用及机制, 并探讨将其应用于肝纤维化抗氧化治疗中的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*Cygb* 质粒 (pCygb) 与 *EGFP* 质粒 (pEGFP) 为本实验室构建并保存; SD 大鼠购自福建吴氏实验动物中心; 人肝星状细胞系 LX-2 购自上海天呈科技有限公司; 胶原酶、Nycodenz、肝素钠、花生四烯酸 (AA)、次氨基三乙酸 (NTA)、硝酸铁 (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)、MTT 试剂购自 Sigma 公司; 链霉蛋白酶购自 Roche 公司; OPTI-MEM I 及 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; DMEM、Dnase I 及胎牛血清均购自 Hyclone 公司; desmin 及  $\alpha$ -SMA 抗体购自 SantaCruz 公司; 兔抗 CYGB 抗体由 Kawada 博士惠赠; 超氧化物阴离子荧光探针 (Dihydroethidium) 购自碧云天生物技术研究所; 其余生化试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

rHSC 分离培养采用本实验室已报道的方法<sup>[4,11]</sup>,

分离纯化后的细胞经台盼蓝鉴定存活率 > 95%，desmin 及  $\alpha$ -SMA 免疫细胞化学染色鉴定纯度 > 95%，可满足实验需求。rHSC 培养 48 h 后换液，然后每 2~3 d 换液 1 次，本文中应用分离后体外培养 5 d 的 rHSC 进行实验。人肝星状细胞系 LX-2 培养于含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液。

### 1.2.2 Cygb 蛋白制备

Cygb 蛋白制备参照本实验室已成功建立的方法<sup>[9-10]</sup>。

### 1.2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用

细胞均以  $1.0 \times 10^8$ /L 接种于 96 孔板，100  $\mu$ L/孔。培养过夜后，加入终浓度为 200  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 于 37  $^{\circ}$ C 作用 48 h，行 MTT 检验。Cygb 蛋白 (10 mg/L, 50 mg/L) 或维生素 E (VE, 50  $\mu$ mol/L) 分别于 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理前 30 min 或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后 30 min 加入培养液中。

### 1.2.4 Fe-NTA/AA 作用

Fe-NTA 溶液配制参照文献[12]。简述如下：取 5 mL 50 mmol/L Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液与 5 mL 150 mmol/L NTA 溶液混合，用 1 mol/L 碳酸氢钠溶液调节 pH 值至 7.4，定容至 20 mL，得 25 mmol/L Fe-NTA 母液，现配现用。细胞均以  $1.0 \times 10^8$ /L 接种于 96 孔板，100  $\mu$ L/孔。培养过夜后，用 DMEM 培养液或含有终浓度 20  $\mu$ mol/L AA 的培养液换液，继续培养 16 h 后，吸除培养液并用 D-hank's 缓冲液冲洗细胞以去除残留的 AA，然后分别加入含终浓度为 1 000  $\mu$ mol/L 或 100  $\mu$ mol/L Fe-NTA 的 DMEM 培养液，到既定时间后进行结晶紫检测。Cygb 蛋白 (10 mg/L, 50 mg/L) 于 Fe-NTA 处理前 30 min 或 Fe-NTA 处理后 30 min 加入培养液中。

### 1.2.5 细胞毒性实验

分别用 MTT 检验及结晶紫染色检测过氧化氢或铁过载对肝星状细胞的毒性作用。MTT 检验中，向每孔细胞中加入 10  $\mu$ L (96 孔板) 5 mg/mL MTT 试剂，继续培养 4 h，终止培养，吸弃培养液，每孔加入 100  $\mu$ L (96 孔板) DMSO，振荡使结晶物充

分溶解，于酶标仪 492 nm 处测 OD 值，以 630 nm 作参比波长；结晶紫染色中，细胞用 10% 甲醛固定 30 s，1 $\times$ PBS 漂洗 2 次；加入结晶紫染液孵育 10 min，1 $\times$ PBS 漂洗 5 遍，然后加入 33% 乙酸水溶液溶解，570 nm 读数。实验中设置 6 个平行样，重复 3 次。用未经抗氧化物或氧化物处理的细胞作为对照 (Control)，相对增殖率 (Relative growth rate, RGR) 用以下公式计算：

$$\text{相对增殖率} \% = \frac{\text{样品组吸光值}}{\text{对照组吸光值}} \times 100\%$$

### 1.2.6 细胞内超氧化物检测

细胞相应处理后，除去培养液，用 D-Hank's 缓冲液冲洗两遍，然后加入 10  $\mu$ mol/L 的超氧化物阴离子荧光探针 (Dihydroethidium) 工作液，37  $^{\circ}$ C 孵育 60 min，用 D-Hank's 缓冲液冲洗 2 遍，荧光显微镜绿色激发观察。

### 1.2.7 RNA 干扰实验

对照 siRNA (NC) 及 Cygb 干扰 RNA (si1&si2) 以双链 RNA 形式由上海吉玛公司合成 (每 OD siRNA 中加入 150  $\mu$ L DEPC 水，配成 20  $\mu$ mol/L 母液，分装，-20  $^{\circ}$ C 保存备用)。采用 Lipofectamine 2000 转染，按照说明书操作，简述如下：在无双抗培养基中接种 LX-2 细胞，转染时细胞汇合度达 30%~50%，用适量无血清 OPTI-MEM I 培养基稀释相应 siRNA (终浓度 100 nmol/L)，混匀。摇匀 Lipofectamine 2000，取适量用 OPTI-MEM I 稀释并轻轻混匀后室温孵育 5 min。将稀释的 siRNA 和稀释的 Lipofectamine 2000 混合，室温孵育 20 min 后加入细胞培养板中，37  $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 48 h 后提取总 RNA 行 RT-PCR 检验并用 real-time PCR 定量分析 ( $n=3$ )；72 h 后提取总蛋白进行 Western blotting 检验并用凝胶成像系统对条带进行分析。应用筛选得到的有效 siRNA 按上述方法转染 48 h 后分别加入相应浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 或 Fe-NTA/AA 作用。设计得到的 siRNA 序列如表 1 所示。

表 1 设计得到的 siRNA 序列

Table 1 Designed sequences of siRNAs

Name	Sequence (5'-3')
si1	S UGGUGAGGUUCUUGUGAAAdTdT
	A UUCACAAAGAACCUCACCAAdTdT
si2	S CCUCAAGCACAAGGUGGAAdTdT
	A UUCCACCUUGUGCUUGAGGdTdT
NC	S GCACAAGUGUGGAACCUAGdTdT
	A CUAGGUUCCACACUUGUGCdTdT

### 1.2.8 基因转染实验

pCyg<sub>b</sub> 及 pEGFP 分别转染 LX-2 细胞后 48 h 加入氧化刺激物, 继续作用 24 h 进行检测。用过氧化氢刺激的细胞行 MTT 检测, 用 Fe-NTA/AA 刺激的细胞行结晶紫检测。

### 1.2.9 数据统计

所有数据用均值±标准偏差 ( $\bar{x}+s$ ) 表示, 并经 *t*-test 检验差异是否具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 内源性 Cygb 蛋白对于氧化反应引起的肝星状细胞损伤的保护性作用

#### 2.1.1 Cygb-siRNA 筛选

用设计合成的 3 个 siRNA 序列转染 LX-2 细胞

48 h 后提取总 RNA 行 RT-PCR、72 h 后提取总蛋白行 Western blotting, 结果如图 1 所示, 可见 si1 转染后能明显减少 Cygb 基因的表达, si2 效果不明显, 因此本实验中应用 si1。

#### 2.1.2 siRNA 干扰 Cygb 后 LX-2 细胞对氧化损伤的反应

如图 2 所示, 100 μmol/L 过氧化氢作用于 NC 转染的 LX-2 细胞 1 d 未对细胞增殖产生影响, 而 Cygb 被干扰的细胞增殖率显著降低 ( $P<0.01$ ), 显然 Cygb 被干扰使 LX-2 对过氧化氢的毒性更加敏感了; 继续延长作用时间, 过氧化氢对细胞的毒性作用也逐渐明显, 且对于 Cygb 被干扰的细胞毒性要显著大于转染对照 RNA 的细胞组 ( $P<0.01$ ), 说明肝星状细胞内源性的 Cygb 在过氧化氢造成的氧化环

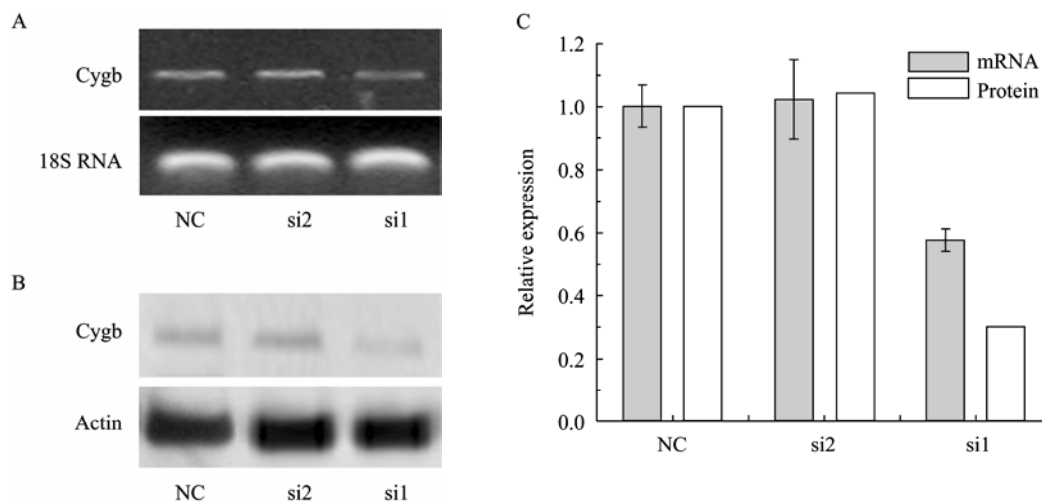


图 1 Cygb-siRNA 的筛选

Fig. 1 Screening of Cygb-siRNA. (A) RT-PCR. (B) Western blotting. (C) Quantification of the expression of cygb mRNA and protein, respectively.

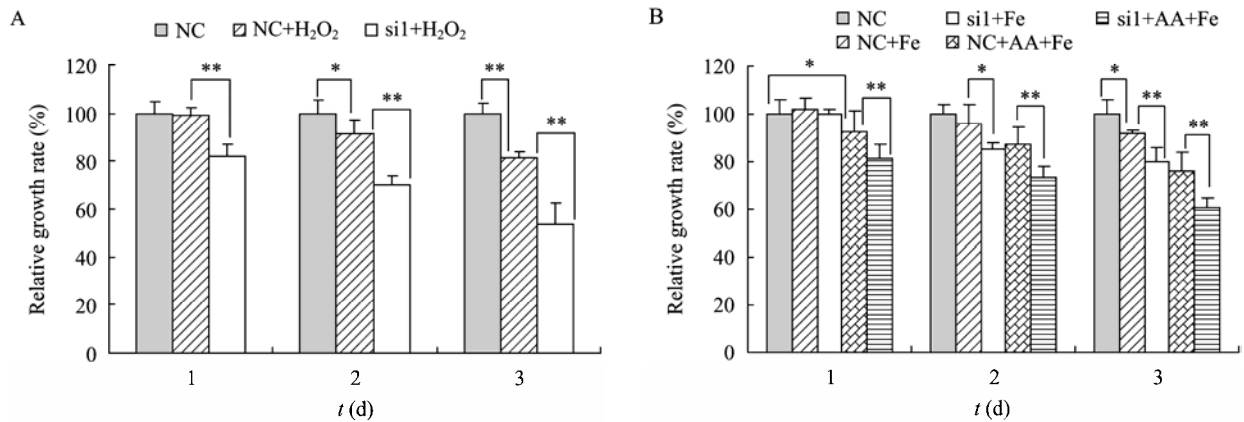


图2 siRNA 干扰 Cygb 后氧化反应对 LX-2 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of oxidation on the proliferation of LX-2 cells transfected with siRNA targeting Cygb. (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated. (B) Fe-NTA/AA treated. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

境中对细胞具有显著的保护性作用；同样，无论是  
 单用 50  $\mu\text{mol/L}$  Fe-NTA 作用或是 50  $\mu\text{mol/L}$   
 Fe-NTA+20  $\mu\text{mol/L}$  AA 协同作用，Cygb 被干扰的细胞  
 均比转染对照 siRNA 的细胞更易产生损伤，证实  
 内源性 Cygb 在 Fe-NTA/AA 造成氧化环境中对肝星  
 状细胞同样具有显著的保护性作用。

## 2.2 重组 Cygb 蛋白对氧化反应引起的肝星状细胞损伤的保护性作用

### 2.2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤

经 Cygb 蛋白预处理后再加入 200  $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 48 h，进行 MTT 检测结果如图 3 所示。过氧化氢对 rHSC 及 LX-2 细胞均表现出明显的毒性；加入 50  $\mu\text{mol/L}$  VE、高浓度 Cygb 蛋白、低浓度 Cygb 蛋白预处理都能对过氧化氢造成的细胞损伤起到一定的保护作用，其中 50 mg/L Cygb 蛋白起到的保护作用最明显 ( $P < 0.01$ )，能完全抵消 200  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢对 LX-2 细胞的作用 (图 3B，与未过氧化氢处理的对照组相比较  $P > 0.05$ )。

### 2.2.2 Fe-NTA/AA 损伤

加入 50 mg/L Cygb 蛋白预处理能够抑制 100  $\mu\text{mol/L}$  Fe-NTA 引起的 rHSC 增殖 (图 4A，作用 1 d  $P < 0.01$ ；作用 2 d  $P < 0.05$ )；在 1 000  $\mu\text{mol/L}$  Fe-NTA 与 AA 共同作用的情况下，Cygb 蛋白预处理

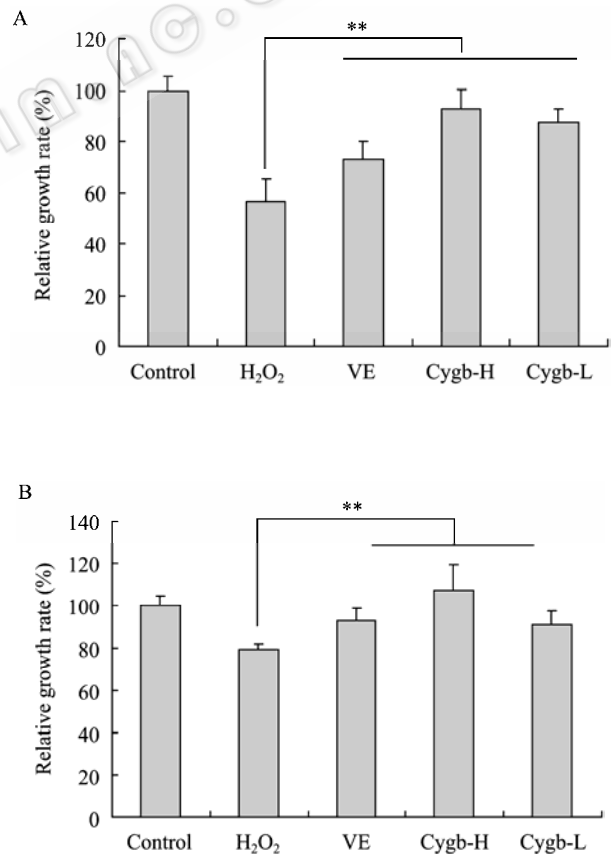
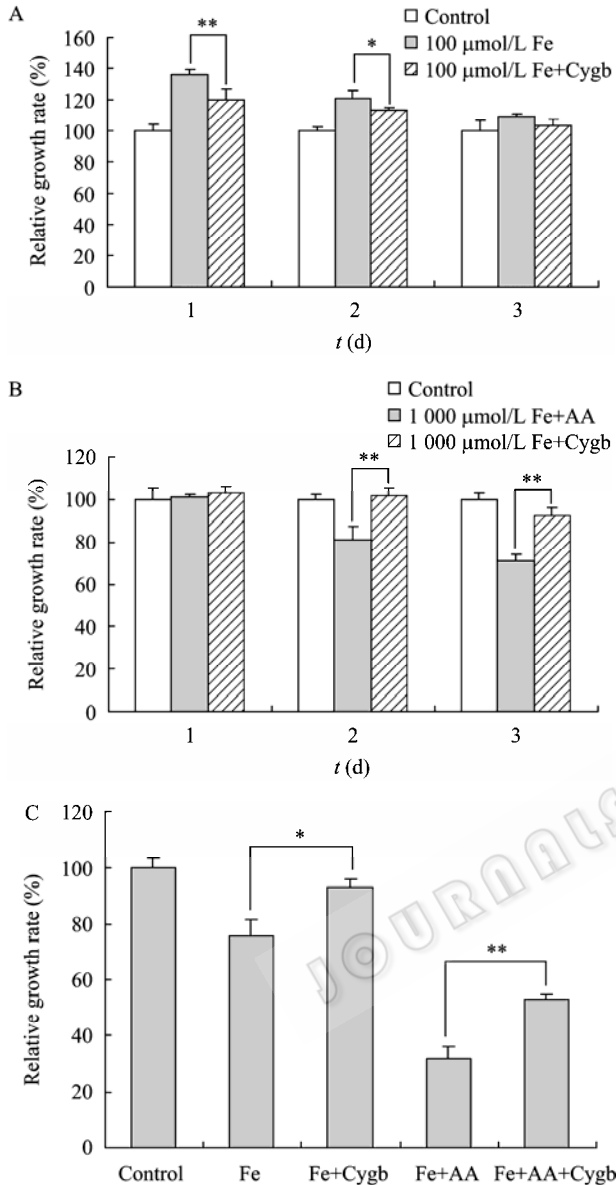


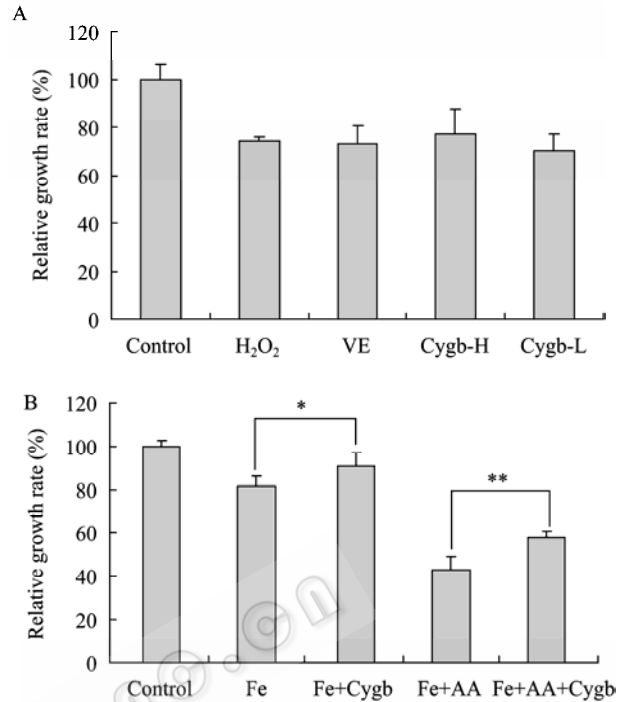
图3 Cygb 蛋白对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的保护性作用

Fig. 3 Protection effects of Cygb protein towards the injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) rHSC. (B) LX-2. VE: 50  $\mu\text{mol/L}$ ; Cygb-H: 50 mg/L; Cygb-L: 10 mg/L. \*\* $P < 0.01$ .



**图 4 Cygb 蛋白对 Fe-NTA/AA 损伤的保护性作用**  
 Fig. 4 Protection effects of Cygb protein towards the injury induced by Fe-NTA/AA. (A,B) rHSC. (C) LX-2. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ .

理同样能够减小由 Fe 与 AA 引起的协同增效作用 (图 4B, 作用 2 d&3 d  $P<0.01$ )。因此, 在 Fe-NTA/AA 作用下, Cygb 蛋白能够起到抑制 rHSC 细胞过度增殖以及保护其被过度损伤的作用。对于 LX-2 细胞, 50 mg/L Cygb 蛋白预处理组细胞增殖率显著高于单用 500 μmol/L Fe-NTA 处理组 ( $P<0.05$ ), 且能极显著降低 500 μmol/L Fe-NTA+20 μmol/L AA 对 LX-2



**图 5 Cygb 蛋白对氧化反应引起的 LX-2 细胞损伤的治疗性作用**

Fig. 5 Therapeutic effects of Cygb protein on LX-2 cells towards the injury induced by oxidation. (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated. (B) Fe-NTA/AA treated. VE: 50 μmol/L; Cygb-H: 50 mg/L; Cygb-L: 10 mg/L. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ .

造成的毒性作用 ( $P<0.01$ )。

### 2.3 重组 Cygb 蛋白对氧化反应引起的肝星状细胞损伤的治疗性作用

加入 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 30 min 后再加入 Cygb 蛋白处理, 48 h 后进行 MTT 检测结果如图 5 所示。过氧化氢对 LX-2 细胞表现出明显的毒性, 抑制率约 25%; 加入 50 μmol/L VE、高浓度 Cygb 蛋白、低浓度 Cygb 蛋白的各組细胞相对增殖率与单加过氧化氢的阳性对照组相比未表现出显著性差异 (图 5A,  $P>0.05$ ), 说明 Cygb 蛋白或是 VE 之类的抗氧化剂对过氧化氢造成的细胞损伤没有显著的治疗性作用。然而 Fe-NTA 作用 30 min 后加入 50 mg/L Cygb 蛋白处理的 LX-2 细胞增殖率却显著高于单用 500 μmol/L Fe-NTA 处理组 (图 5B,  $P<0.05$ ), 且能显著降低 500 μmol/L Fe-NTA+20 μmol/L AA 对 LX-2 造成的毒性作用 (图 5B,  $P<0.01$ )。

## 2.4 Cygb 蛋白对于氧化反应引起的肝星状细胞内超氧化物水平的影响

### 2.4.1 $H_2O_2$ 处理

加入 500  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢作用后会引起 rHSC 及 LX-2 细胞内超氧化物显著增多 (图 6A2、B2), 而加入 Cygb 蛋白预处理的细胞内超氧化物含量明显降低, 高浓度组 (图 6A4、B4) 荧光强度明显弱于低浓度组 (图 6A3、B3), 与对照组相差无几 (图 6A1、B1), 说明 Cygb 蛋白预处理可显著减少由过

氧化氢引起的肝星状细胞内超氧化物的增加。

### 2.4.2 Fe-NTA 处理

加入 500  $\mu\text{mol/L}$  Fe-NTA 作用后会引起 rHSC 及 LX-2 细胞内超氧化物显著增多 (图 7A2、B2), 而加入 Cygb 蛋白预处理的两种细胞内超氧化物含量都明显降低 (图 7A3, A4, B3, B4), 证明 Cygb 蛋白预处理可显著减少由 Fe-NTA 引起的细胞内超氧化物的增加。

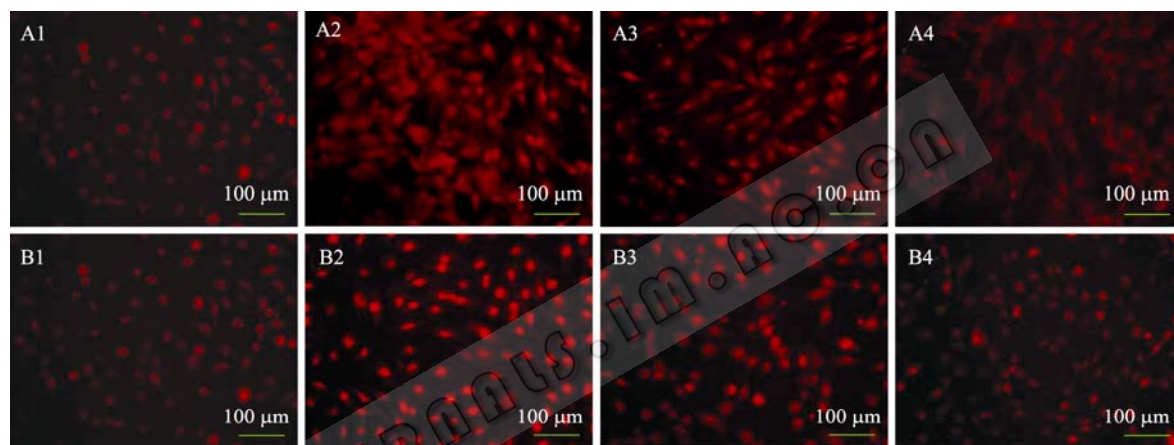


图 6 细胞内超氧化物检测

Fig. 6 Intracellular superoxide assay. The red fluorescence represented the superoxide in the cells. (A) rHSC. (B) LX-2. 1-4: control,  $H_2O_2$  group, 10 mg/L Cygb group and 50 mg/L Cygb group, respectively.

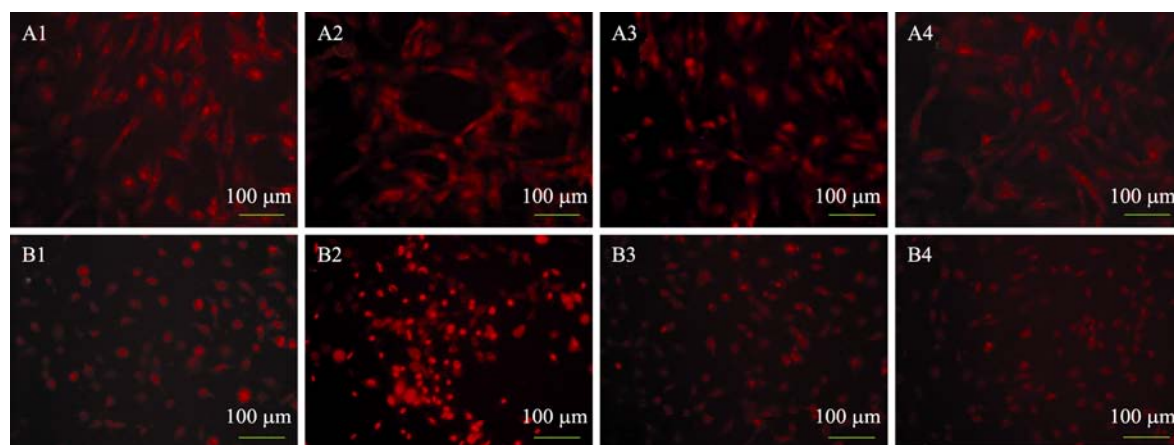


图 7 细胞内超氧化物检测

Fig. 7 Intracellular superoxide assay. The red fluorescence represented the superoxide in the cells. (A) rHSC. (B) LX-2. 1-4: control, Fe-NTA group, 10 mg/L Cygb group and 50 mg/L Cygb group, respectively.

## 2.5 细胞内过表达 Cygb 蛋白对氧化反应引起的肝星状细胞损伤的保护性作用

如图 8 所示, 无论是单用 500  $\mu\text{mol/L}$  Fe-NTA 处理, 或是 Fe-NTA+20  $\mu\text{mol/L}$  AA 协同作用 24 h 后, 转染 pCygb 的 LX-2 细胞增殖率均要显著高于转染 pEGFP 的细胞组 (图 8, Fe-NTA/AA model); 同样, 用 400  $\mu\text{mol/L}$  过氧化氢处理 24 h 后, 转染 pCygb 的细胞增殖率要明显高于转染 pEGFP 的细胞组 (图 8,  $\text{H}_2\text{O}_2$  model), 说明 LX-2 细胞内过表达 Cygb 蛋白会对氧化损伤造成的毒性作用起到保护性作用。

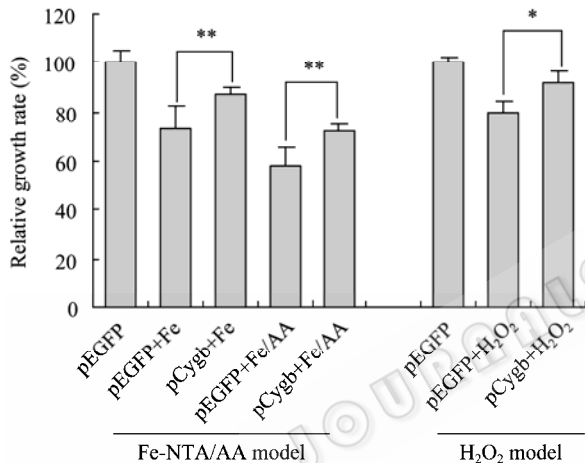


图 8 LX-2 细胞内过表达 Cygb 蛋白对氧化损伤的保护性作用

Fig. 8 Effects of oxidation on the proliferation of LX-2 cells over-expressing Cygb gene. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ .

## 3 讨论

本文选取了两种肝脏中有代表性的氧化模型: 过氧化氢模型及铁过载模型, 研究了 Cygb 蛋白在肝纤维化氧化应激中发挥的具体作用。结果表明内源性 Cygb 蛋白对于两种氧化反应导致的肝星状细胞损伤都具有显著性的保护作用, 证明其在活化肝星状细胞内的表达上调是其应对氧化应激的保护性措施, 而并非只是纤维化的标志分子。利用重组 Cygb 蛋白的实验则进一步证实了 Cygb 蛋白对人肝星状细胞系 LX-2 及原代大鼠肝星状细胞都能发挥显著

的保护作用, 且对于铁过载导致的肝星状细胞损伤还具有显著的治疗性作用。

为何预处理时 Cygb 蛋白及 VE 均能表现出明显的保护作用, 而过氧化氢作用 30 min 后处理却效果不佳呢? 目前多项研究已经证实 Cygb 作为一种胞浆蛋白在细胞内发挥作用, 而并非一种分泌性蛋白<sup>[13-15]</sup>, 并且尚无相关细胞表面 Cygb 受体的报道出现, 因此 Cygb 蛋白进出细胞尚缺乏相应的主动运输机制。由文献[16]可知过氧化氢较易从溶液中扩散穿透细胞膜进入细胞中。若先用过氧化氢处理细胞半小时, 则大部分过氧化氢已经透过细胞膜进入细胞中发挥作用, 而 Cygb 蛋白则由于缺乏细胞表面受体或其他的主动运输机制而较难被细胞吸收而在胞内发挥作用; 若先用 Cygb 蛋白进行预处理, 则由于 Cygb 具有显著的过氧化物酶活性, 加入的过氧化氢会首先与溶液中的 Cygb 蛋白相互作用, 大大降低实际对细胞发挥作用的过氧化氢的浓度, 因而会对细胞产生显著保护作用, 从理论上讲, 只要溶液中的 Cygb 蛋白能够完全反应掉加入的过氧化氢, 则可完全抵消过氧化氢产生的毒性。而在铁过载模型中, Cygb 蛋白却能对肝星状细胞发挥显著的保护性作用, 这是由于肝星状细胞表面不具备铁吸收受体而导致大部分 Fe 游离于胞外, 因而同样在胞外的 Cygb 蛋白可较充分发挥其抗氧化作用。简而言之, 重组 Cygb 蛋白对胞内的活性氧清除效果不理想, 可能与其进出细胞缺乏相应的主动运输机制有关。由此推论, 通过将 Cygb 基因导入细胞中使其在细胞内过量表达或者通过基因工程手段在 Cygb 蛋白上连接小分子穿膜肽<sup>[17]</sup>, 使其能够穿过细胞膜进入胞内发挥作用, 可能是实现 Cygb 蛋白直接应用于肝纤维化治疗的解决方案。在此前提下, 本实验进一步利用脂质体将 Cygb 质粒转染入肝星状细胞中使其过表达, 证实细胞内过表达 Cygb 蛋白对无论是铁过载或是过氧化氢引起的氧化反应均能发挥较好的保护性作用。

由课题组前期研究可知过氧化氢与 Fe-NTA/AA



的氧化作用机制不同, Fe-NTA/AA 所引发的脂质过氧化反应较过氧化氢要温和, 因而对完全活化的 LX-2 细胞及未完全活化的 rHSC 产生截然不同的作用<sup>[11]</sup>。本文的实验证实重组 Cygb 蛋白不仅能保护完全活化的 LX-2 细胞免受氧化应激损伤, 并且能发挥抑制未完全活化的原代肝星状细胞过度增殖以及保护其被过度损伤的作用, 提示该蛋白在肝纤维化进展的不同阶段都能发挥抗氧化治疗作用。

本文为全面阐释 Cygb 的抗氧化作用及机制、加速药物新靶点开发提供了理论依据。

## REFERENCES

- [1] de Sanctis D, Dewilde S, Pesce A, et al. Crystal structure of cytoglobin: the fourth globin type discovered in man displays heme hexa-coordination. *J Mol Biol*, 2004, 336(4): 917-927.
- [2] Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, et al. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 25318-25323.
- [3] Lv YH, Wang QZ, Diao Y, et al. Cytoglobin: a novel potential gene medicine for fibrosis and cancer therapy. *Curr Gene Ther*, 2008, 8(4): 287-294.
- [4] Xu RA, Harrison PM, Chen M, et al. Cytoglobin overexpression protects against damage-induced fibrosis. *Mol Ther*, 2006, 13(6): 1093-1100.
- [5] Xu RA, Chen L, Xiao WD. *Molecular Gene Medicine*. Beijing: Peking University Press and Peking University Medical Press, 2008: 289.  
许瑞安, 陈凌, 肖卫东. 分子基因药理学. 北京: 北京大学, 北京大学医学出版社, 2008: 289.
- [6] Li XY, Xu RA, Wang GJ, et al. Effects of rAAV/rSTAP on mRNA level of interstitial collagenase in rat stellate cells. *Chin J Clin Pharm Ther*, 2004, 9(11): 1236-1238.  
李欣燕, 许瑞安, 王广基, 等. 重组副腺病毒介导的大鼠星状细胞激活相关蛋白基因转染对大鼠肝星状细胞表达间质胶原酶 mRNA 的影响. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(11): 1236-1238.
- [7] Mimura I, Nangaku M, Nishi H, et al. Cytoglobin, a novel globin, plays an antifibrotic role in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299(5): F1120-F1133.
- [8] Li XY, Xu RA, Wang GJ, et al. Cloning of stellate cell activation-associated protein (STAP) gene and construction of its recombinant adenovirus-associated virus. *Chin J Pharm Biotech*, 2005, 12(6): 351-353.  
李欣燕, 许瑞安, 王广基, 等. 大鼠星状细胞激活相关蛋白基因的克隆及其重组腺相关病毒载体的构建. *药物生物技术*, 2005, 12(6): 351-353.
- [9] Zhang TT, Li ZF, Xu RA. Preparation, purification and activity of recombinant rat cytoglobin. *J Huaqiao Univ: Nat Sci*, 2009, 30(6): 671-675.  
张亭亭, 李招发, 许瑞安. 重组大鼠细胞球蛋白的制备、纯化与活性. *华侨大学学报: 自然科学版*, 2009, 30(6): 671-675.
- [10] Xu RA, Wang GJ, Diao Y. Production and function of recombinant cytoglobin protein: CN, 200510094205. 2005-09-05.  
许瑞安, 王广基, 刁勇. 重组细胞球蛋白 (Cytoglobin) 的生产方法及其用途: 中国, 200510094205. 2005-09-05.
- [11] Wang QZ, Lv YH, Li ZF, et al. Construction, detection and analysis of the oxidative stress models of hepatic stellate cells. *Chin J Clin Pharm Ther*, 2010, 15(9): 1002-1007.  
王启钊, 吕颖慧, 李招发, 等. 肝星状细胞氧化应激模型的构建、检测与分析. *中国临床药理学与治疗学*, 2010, 15(9): 1002-1007.
- [12] Sakurai K, Cederbaum AI. Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nitrosylacetate in HepG2 cells that express cytochrome P450 2E1. *Mol Pharmacol*, 1998, 54(6): 1024-1035.
- [13] Trent JT III, Hargrove MS. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem*, 2002, 277(22): 19538-19545.
- [14] Burmester T, Ebner B, Weich B, et al. Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(4): 416-421.
- [15] Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, et al. Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 8063-8069.
- [16] Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, 1989, 58: 79-110.
- [17] Deshayes S, Morris MC, Divita G, et al. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(16): 1839-1849.