

· 研究论文 ·

Kallistatin 通过 Akt-eNOS 信号通路对肝星状细胞氧化损伤的保护作用

黄晓平^{1,2}, 王晓², 谢晓兰¹, 徐文涛¹, 杨会勇², 李招发²,
林俊生², 刁勇^{2*}

(1. 泉州师范学院化工与材料学院, 福建 泉州 362000; 2. 华侨大学分子药理学研究院, 福建 泉州 362021)

摘要: 为揭示 kallistatin 对肝星状细胞氧化损伤的保护作用及相关分子机制, 本文以过氧化氢和铁过载为氧化模型, 以大鼠原代肝星状细胞及完全活化的人肝星状细胞系 LX-2 为对象, 研究了 kallistatin 在对肝星状细胞活力、超氧化物、NADPH 和 Akt、eNOS 等分子的影响。实验结果显示, kallistatin 既能避免肝星状细胞受氧化损伤, 还能修复氧化应激造成的细胞损伤; 其主要机制为 kallistatin 能清除细胞内的超氧化物、降低细胞内 NADPH 活力; 另外, kallistatin 还能激活 Akt 和 eNOS 等分子发挥抗氧化作用。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: 组织激肽释放酶结合蛋白; 肝星状细胞; 氧化损伤; 肝纤维化

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2017) 09-1397-07

Role of kallistatin in protecting hepatic stellate cells against oxidation through inhibition of oxidative stress and activation of Akt-eNOS signaling

HUANG Xiao-ping^{1,2}, WANG Xiao², XIE Xiao-lan¹, XU Wen-tao¹, YANG Hui-yong²,
LI Zhao-fa², LIN Jun-sheng², DIAO Yong^{2*}

(1. College of Chemical Engineering and Materials Sciences, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China;
2. Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: The present study was aimed to investigate the role and mechanisms of kallistatin in protection against oxidative stress-induced hepatic stellate cell damage. The effects of kallistatin on the viability, the intracellular superoxide level and Akt, eNOS molecules were investigated in human hepatic stellate cell line LX-2 and the incompletely activated primary rat hepatic stellate cells. Two different oxidative-stress related models, the hydrogen peroxide model and the iron-overload model were used in the experiments. The results show that kallistatin protected the hepatic stellate cells from oxidative damage and repaired the cell damage by oxidative stress. The main mechanism is antioxidant activity of kallistatin, which can remove the oxidized substances inside the cells. On the other way, kallistatin activates Akt and eNOS molecules to generate the antioxidant effect. Our results help to explore new anti-fibrotic targets.

Key words: kallistatin; hepatic stellate cell; oxidation damage; liver fibrosis

收稿日期: 2017-03-03; 修回日期: 2017-04-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81502687, 81371669); 福建省自然科学基金资助项目 (2017J01548); 泉州市科技计划项目 (2016Z070, 2016N006); 华侨大学中青年教师科技创新资助计划 (ZQN-PY319).

*通讯作者 Tel: 86-595-22692516, Fax: 86-595-22692518, E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0199

组织激肽释放酶结合蛋白 (kallistatin) 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 与其他的丝氨酸蛋白酶抑制剂一样, kallistatin 不仅仅只在肝脏中表达, 它在肾脏、心脏和血管中都有表达^[1-4]。Kallistatin 是一种负调控的蛋白, 目前研究发现 kallistatin 具有抗炎和抗氧化等多种功能^[1-3], 在肝病患者血液中 kallistatin 的表达量急剧减少, 而在脓血症和肺炎患者中, kallistatin 的表达量与疾病的严重程度密切相关^[5-7]; 在脂多糖诱导肝脏炎症中, 肝脏中 kallistatin 的表达量急剧下降, 而在转基因小鼠中过表达 kallistatin 可以降低脂多糖诱导的死亡率^[8], 说明 kallistatin 在体内与炎症有着密切的关系。在肝损伤和肝纤维化的整个过程中都有炎症和氧化应激伴随, 而 kallistatin 的抗氧化作用在内皮细胞上已得到证实^[9, 10], 但在肝星状细胞中 kallistatin 的抗氧化作用及其机制还未见相关报道。因此, 本文以肝星状细胞为模型研究 kallistatin 的抗氧化作用及其分子机制, 为 kallistatin 开发为抗纤维化药物打下理论基础。

肝脏中的氧化应激反应机制比较复杂, 其氧化环境可能由不同氧化物组成^[11, 12]。氧化应激是促使肝星状细胞由静息态转向活化态的一个重要因素, 而肝星状细胞由静息态向活化态的转变是肝纤维化的中心环节, 因此在肝纤维化的治疗中抗氧化也成为了一种重要的策略^[13-16]。鉴于肝脏中的氧化应激比较复杂, 体外研究多用过氧化氢和铁过载模型模拟肝脏中的氧化应激。过氧化氢主要模拟在肝脏中广泛存在的 H_2O_2 活性氧中间体; 铁过载模型模拟肝脏内的脂质过氧化反应。

因此, 本研究采用过氧化氢和铁过载两种作用机制不同的氧化反应模型来模拟肝脏内的氧化环境。选取了两种不同活化状态的肝星状细胞——完全活化的人肝星状细胞系 (LX-2) 和未活化的原代大鼠肝星状细胞 (rat hepatic stellate cells, rHSC) 为研究对象, 较全面揭示 kallistatin 抗氧化作用及其分子机制, 并探讨将其应用于肝纤维化治疗中的可能性。

材料与方 法

材料 Nycodenz、胶原酶、花生四烯酸 (AA)、肝素钠、硝酸铁 [$Fe(NO_3)_3$]、次氨基三乙酸 (NTA)、MTT 试剂和 NADPH 定量检测试剂盒均购自 Sigma-Aldrich 公司; 链霉菌蛋白酶购自 Roche 公司; 超氧化物阴离子荧光探针 (dihydroethidium) 购自 Invitrogen 公司; DMEM、DNase I 及胎牛血清均购自 Hyclone

公司; Desmin、Akt、phospho-Akt、eNOS、phospho-eNOS、 α -SMA、GAPDH 等抗体购自 Cell Signaling 公司; kallistatin 抗体购自 Abcam 公司; Wistar 大鼠 (SYXK (闽) 2016-0001) 购自福建吴氏实验动物中心; 人肝星状细胞系 LX-2 为本实验室保存。

星状细胞的分离与培养 rHSC 分离参考文献^[1]中的方法。台盼蓝检测分离纯化后的细胞活力, 利用 Desmin 及 α -SMA 抗体进行免疫细胞化学染色鉴定纯度, 当细胞纯度高于 95%, 才可满足实验需求。rHSC 培养 48 h 后换液, 然后每 2~3 天换液 1 次, 本文中应用分离后体外培养 5 天的 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。

Kallistatin 制备 参照本实验室^[17, 18]已经建立的方法。

H_2O_2 损伤模型 细胞均以每孔 5.0×10^3 个接种于 96 孔板。培养过夜后, 加入终浓度为 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 于 37°C 作用 12 h, 在加入 H_2O_2 之前或之后 30 min, 向培养液中加 kallistatin (0.3 和 $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 或谷胱甘肽 (GSH, $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行保护或修复, 最后利用细胞毒性实验 (MTT) 检验细胞活力。

Fe-NTA/AA 损伤模型 Fe-NTA 溶液配制: 取 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Fe(NO_3)_3$ 溶液 10 mL 与 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NTA 溶液 10 mL 混合, 用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠溶液调节 pH 值至 7.4, 定容至 40 mL, 配成 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe-NTA 母液。肝星状细胞均以每孔 5.0×10^3 个接种于 96 孔板。培养 12 h 后, 用 DMEM 培养液或含有终浓度 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AA 的 DMEM 培养液换液, 继续培养 12 h 后, 吸出培养液并用 PBS 清洗细胞以去除残留的 AA, 然后分别加入含终浓度为 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fe-NTA 的 DMEM 培养液, 制备 Fe-NTA/AA 氧化损伤模型。在加入 Fe-NTA 之前或之后 30 min, 向培养液中加入 kallistatin (0.3 和 $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 培养一定时间后进行 MTT 检测, 计算细胞活力。

MTT 细胞造模完成并加入药物处理完成后, 向每孔细胞中加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 试剂 $10 \mu\text{L}$, 继续培养 2 h, 终止培养, 将培养基吸出, 每孔加入 $200 \mu\text{L}$ DMSO, 振荡充分溶解结晶, 酶标仪检测溶解物在 492 nm 处吸光度 (OD) 值, 以 630 nm 作参比波长, 以未经处理的细胞作为对照, 计算细胞活力。

细胞内超氧化物检测 细胞相应处理后, 去除培养液, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 遍, 然后加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 超氧化物阴离子荧光探针 (dihydroethidium) 工作液, 37°C 孵育 60 min, 用 PBS 缓冲液清洗 2 遍, 荧光显

显微镜观察拍照, 利用 Image-Pro Plus 软件进行荧光强度分析。

Western blotting 细胞处理后, 去除培养基, 用 PBS 缓冲液冲洗 2 遍, 然后加入 RAPI 裂解液 500 μL 裂解细胞, 12000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清, BCA 法测定蛋白浓度。加入上样缓冲液, 取 20 μg 样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电转移法将蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。用相应的兔抗 eNOS 和 Akt 等抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min。室温孵育羊抗兔二抗 1 h。TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。加 ECL 进行显色, 利用化学发光成像系统进行成像, Image J 软件分析图片灰度值。

数据统计 所有数据用均值 \pm 标准偏差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 结果采用 SPSS19 进行统计学分析, $*P < 0.05$ 为有显著性差异, $**P < 0.01$ 为有极显著性差异。

结果

1 重组 kallistatin 对氧化反应引起的肝星状细胞损伤的保护性作用

1.1 H_2O_2 损伤模型 利用 kallistatin 预处理细胞再加入 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 作用, H_2O_2 对 rHSC 和 LX-2

具有明显的细胞毒性; 而加入 GSH (0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、kallistatin (0.3 和 0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预处理组, 细胞活力明显比模型组要高, 说明 kallistatin 能在一定程度保护细胞免受 H_2O_2 氧化损伤, 其中 0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ kallistatin 起到的保护作用最明显 ($P < 0.01$), 能完全抵消 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 对 rHSC 和 LX-2 细胞的损伤作用 (图 1A, B)。

1.2 Fe-NTA/AA 损伤模型 有文献报道, 氧化应激能激活 HSC 并引起 HSC 过度增殖^[19, 20]。本实验研究发现, 加入 0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ kallistatin 预处理能够抑制 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-NTA 引起的 rHSC 增殖, 但 3 天后 kallistatin 对 rHSC 的增殖抑制作用消失, 这可能由于体外培养 3 天, rHSC 已经完成了活化 (图 2A)。当 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-NTA 与 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 合用时, kallistatin 预处理同样能够减小由 Fe-NTA 与 AA 引起的氧化损伤 (图 2B)。对于 LX-2 细胞, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-NTA 与 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 合用, 细胞活力明显比单用 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-NTA 细胞活力要小, 二者相比具有显著性差异, 说明 Fe-NTA 与 AA 具有协同增效的作用; 加入 0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ kallistatin 预处理能显著提高细胞活力, 与模型组相比具有显著性差异 (图 2C)。

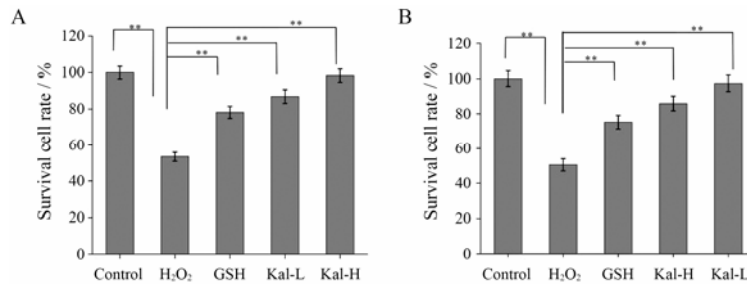


Figure 1 Protection effects of kallistatin (Kal) towards the injury induced by H_2O_2 . A: rHSC; B: LX-2. H_2O_2 : 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; GSH: 0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Kal-L: 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Kal-H: 0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. $**P < 0.01$

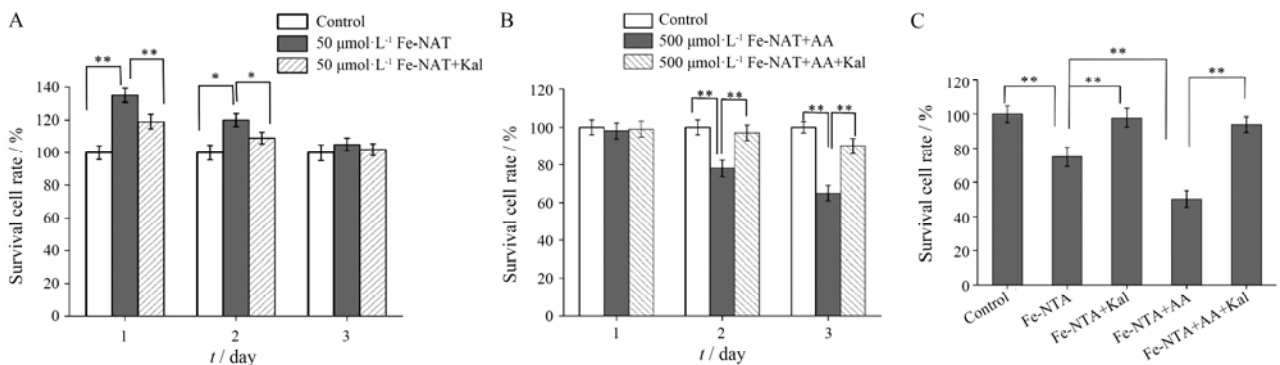


Figure 2 Protection effects of kallistatin protein towards the injury induced by Fe-NTA/AA. Kallistatin was added into medium before the oxidation model built. A: rHSC cell, Kal: 0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Fe-NAT: 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. B: rHSC cell, Kal: 0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Fe-NAT: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; AA: 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. C: LX-2 cell, Kal: 0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Fe-NAT: 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, AA: 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

2 Kallistatin 对氧化损伤的治疗作用

H_2O_2 ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 30 min, 再加入 kallistatin 处理, 48 h 后进行 MTT 检测, 结果如图 3 所示。 H_2O_2 对 LX-2 细胞表现出明显的毒性, 细胞活力约 50%, 加入 $0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSH 组细胞活力与 H_2O_2 模型组相比没有显著性差异 (图 3A, $P > 0.05$); $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ kallistatin 组细胞活力与 H_2O_2 模型组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 $0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ kallistatin 组与 H_2O_2 模型组相比具有极显著性差异 ($P < 0.01$) (图 3A)。说明 GSH 抗氧化剂对 H_2O_2 造成的细胞损伤没有治疗作用, 但 kallistatin 对 H_2O_2 造成的细胞损伤有一定的治疗作用, 这可能与抗氧化机制有关。

Fe-NTA 作用 30 min 后加入 $0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ kallistatin 处理的 LX-2 细胞活力与单用 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-NTA 处理组的细胞活力相比具有显著性差异 (图 3B, $P < 0.05$), 且能显著降低 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-NTA 与 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA 合用对 LX-2 造成的毒性作用 (图 3B, $P < 0.01$)。

3 Kallistatin 对氧化反应引起的肝星状细胞内超氧化物水平的影响

3.1 H_2O_2 处理 加入 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 作用会引起 rHSC 及 LX-2 细胞内超氧化物显著增多 (图 4A, B), 加入 kallistatin 预处理则细胞内超氧化物含量明显降低, $0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ kallistatin 组荧光强度与对照组相

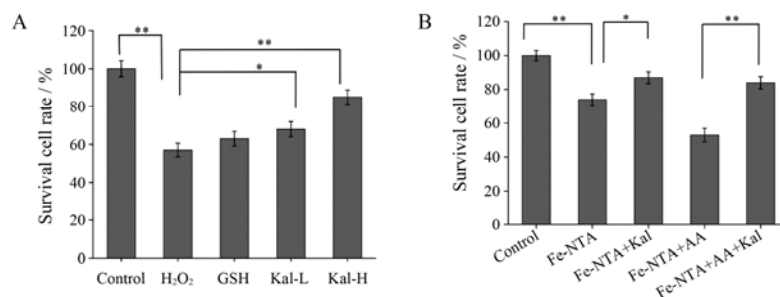


Figure 3 Therapeutic effects of kallistatin on LX-2 cells towards the injury induced by oxidation. Kallistatin was added into medium after the oxidation model built. A: H_2O_2 treated. H_2O_2 : $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, GSH: $0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Kal-L: $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Kal-H: $0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. B: Fe-NTA/AA treated. Fe-NTA: $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, AA: $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Kal: $0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $n=6$, $\bar{x}\pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

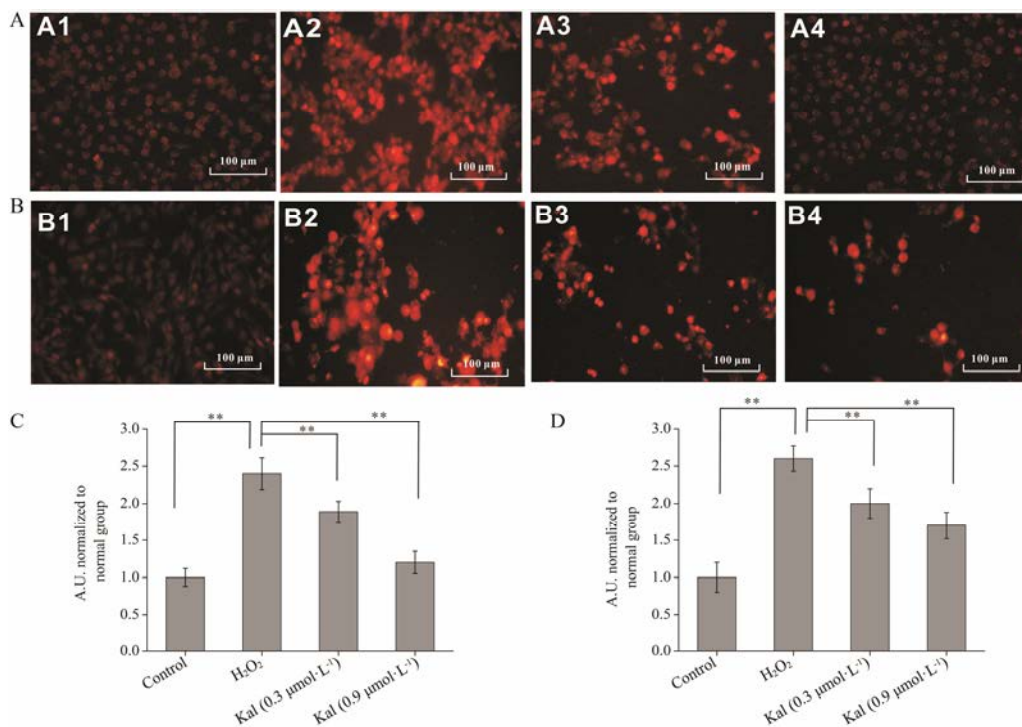


Figure 4 Effect of kallistatin on intracellular superoxide levels after H_2O_2 exposure in rHSC (A) and LX-2 (B). Kallistatin was added into medium before the oxidation model built. The red fluorescence represented the reactive oxygen species (ROS) in the cells. 1–4: Control, $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 group, 0.3 and $0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Kal group, respectively. Intensity arbitrary units (A.U.) reflecting the relative value of intracellular ROS levels in rHSC (C) and LX-2 (D). $n=3$, $\bar{x}\pm s$. ** $P < 0.01$

近,二者没有显著性差异(图4C, D),而 $0.3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ kallistatin 组荧光强度明显要比 $0.9\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ kallistatin 组要强(图4C, D),说明 kallistatin 预处理可显著减少由 H_2O_2 引起的肝星状细胞内超氧化物增多,且呈现剂量关系。

3.2 Fe-NTA 处理 加入 $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-NTA 作用后也会引起 rHSC 及 LX-2 细胞内超氧化物显著增多(图5A, B),而加入 kallistatin 预处理,两种细胞内超氧化物含量都明显降低(图5C, D),说明 kallistatin 预处理可显著减少由 Fe-NTA 引起的细胞内超氧化物的增加。

4 Kallistatin 通过激活 Akt-eNOS 信号通路抑制 H_2O_2 诱导 ROS 形成

利用 PI3K 抑制剂 LY294002 和 eNOS 抑制剂 L-NAME,研究 kallistatin 避免细胞受氧化损伤的相关分子机制。实验结果显示,抑制剂 LY294002 阻断 PI3K-Akt 信号通路后, LX-2 细胞活力与 kallistatin 组相比具有显著性差异(图6A); Western blotting 结果显示,当 kallistatin 作用 1 h 时后,磷酸化 Akt (P-Akt) 表达量上调;当 LY294002 阻断 Akt 信号通路,则 kallistatin 诱导 Akt 和 eNOS 的磷酸化作用也被抑制(图6B, C),且 kallistatin 清除 ROS 和抑制 NADPH 酶

活能力也明显受阻(图6D~F)。eNOS 在细胞中可以合成 NO 发挥抗氧化作用,当加入 eNOS 抑制剂 L-NAME 后,细胞中的 ROS、NADPH 含量显著增加,同时 kallistatin 诱导 eNOS 磷酸化,清除 ROS 和 NADPH 的能力明显下降(图6D~F)。以上结果说明, Akt-eNOS 信号通路介导了 kallistatin 抗氧化作用。

讨论

本文选取 H_2O_2 和铁过载这两种肝脏中典型的氧化应激模型,研究 kallistatin 在肝纤维化氧化应激中发挥的作用。结果表明, kallistatin 对肝星状细胞系 LX-2 和原代鼠肝星状细胞 HSC 都能发挥很好的保护作用,对这两种氧化损伤模型都具有良好的治疗作用。预示 kallistatin 能从抗氧化的方面减慢甚至抑制肝纤维化发展。

活性氧和超氧阴离子等在体内产生的自由基通过脂质氧化作用而损伤、破坏肝细胞,产生脂质过氧化物 MDA 等,可直接激活 HSC,介导 HSC 的分化、增殖和胶原的合成。在损伤修复模型中, kallistatin 都能显著提高细胞活力,清除 HSC 细胞内形成的 ROS,而 GSH 却不能起到损伤修复的作用,这可能由于 kallistatin 是一种细胞内的分泌蛋白,细胞膜表面有

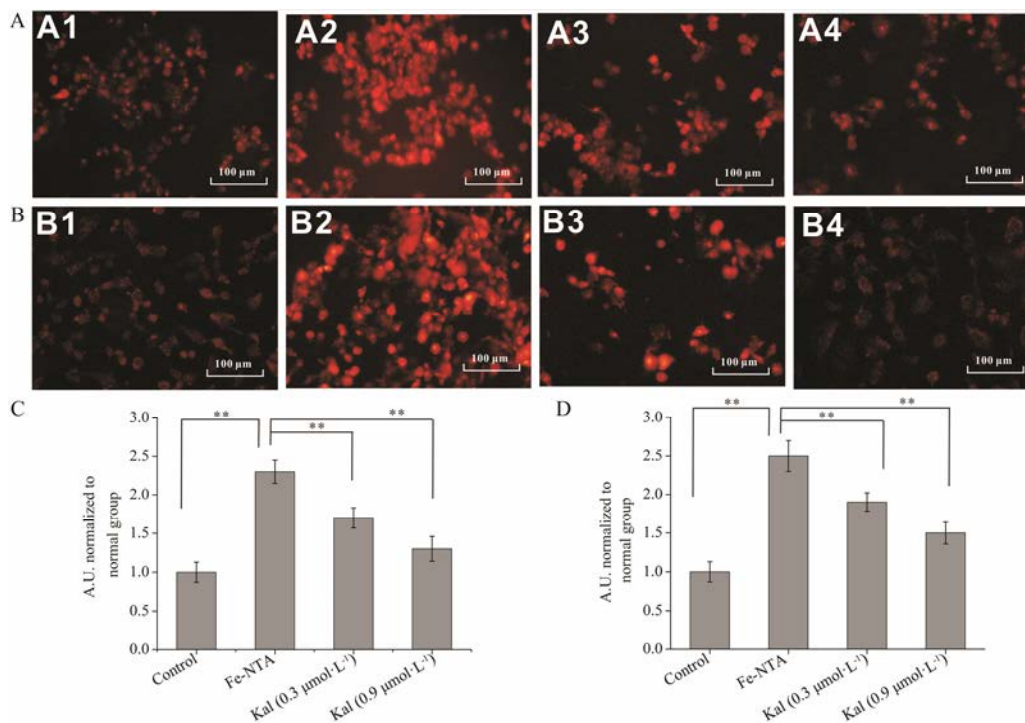


Figure 5 Effect of kallistatin on intracellular superoxide levels after Fe-NTA exposure in rHSC (A) and LX-2 (B). Kallistatin was added into medium before the oxidation model built. The red fluorescence represented the ROS in the cells. 1-4: Control, $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-NTA group, 0.3 and $0.9\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Kal group, respectively. Intensity arbitrary units (A.U.) reflecting the relative value of intracellular ROS levels in rHSC (C) and LX-2 (D). $n=3$, $\bar{x}\pm s$. ** $P<0.01$

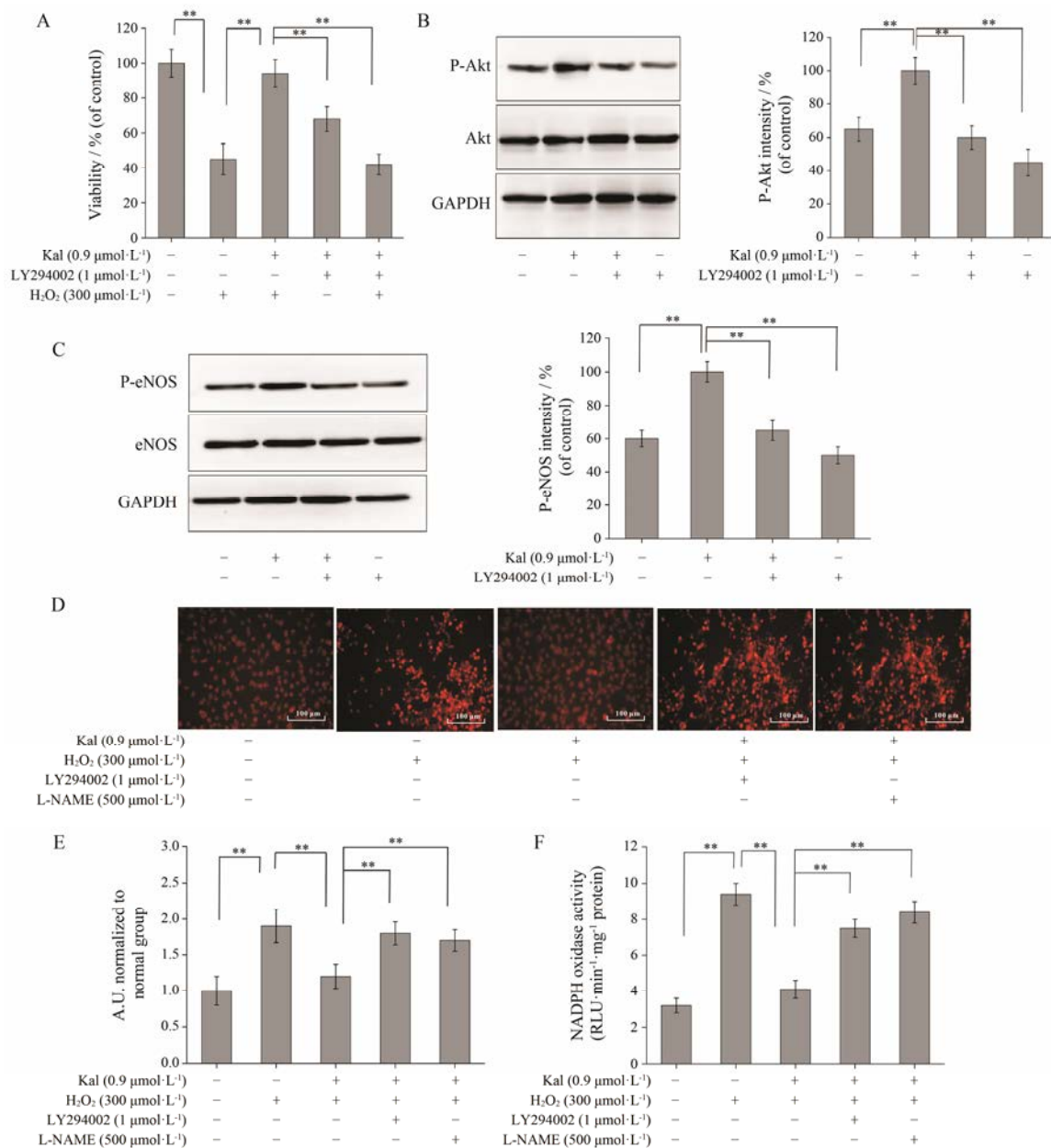


Figure 6 Kallistatin protects against oxidation by stimulating Akt and eNOS phosphorylation. Cells were treated with kallistatin (0.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in the presence or absence of LY294002 (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and L-NAME (500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 30 min. Then the cells were exposed to hydrogen peroxide for 12 h. A: Kallistatin protects cells from oxidative damage by MTT analysis. B: Kallistatin stimulates Akt phosphorylation in LX-2 cells as determined by Western blotting analysis. C: Kallistatin stimulates eNOS phosphorylation in LX-2 cells as determined by Western blotting analysis. D: Kallistatin inhibits H₂O₂-induced ROS formation in LX-2 cells, as indicated by representative images of ROS-induced dichlorofluorescein (DCF) fluorescence. E: Intensity arbitrary units (A.U.) reflecting the relative value of intracellular ROS levels. F: Kallistatin inhibits H₂O₂-induced NADPH oxidase activity. $n=3$, $\bar{x}\pm s$. ** $P<0.01$

kallistatin 的受体, 受体可以介导其抗氧化作用, 而 GSH 只有 γ -谷氨酰基转肽酶水解成半胱氨酸才能进入细胞。Shen 等^[10]研究发现, kallistatin 可以通过内皮细胞膜表面的 kruppel-like-factor 4, 上调内皮细胞内 eNOS 表达, 清除由 TNF- α 诱导氧化反应。磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3k/Akt) 通路是细胞内重要的抗氧化通路。Shen 等^[9]的研究也发现, kallistatin

能够激活内皮细胞的 Akt, 增加 NO 的生成, 削弱 TNF- α 等氧化因子对血管产生病变等途径维持内皮细胞正常的功能。本文研究发现, 在 LX-2 细胞中 kallistatin 激活 Akt 和 eNOS 等分子, 降低细胞内的 NADPH 和 ROS 等含量发挥抗氧化作用。这些结果都提示, kallistatin 的抗氧化作用可以运用到治疗肝纤维化过程中。

本研究证实, kallistatin 既可以保护肝星状细胞避免 H_2O_2 的损伤, 还可修复由于氧化造成的细胞损伤。其主要机制, kallistatin 能抑制细胞内 ROS 的形成, 降低细胞内 NADPH 的含量; 另外, kallistatin 还能激活 Akt-eNOS 信号通路发挥抗氧化作用。本文为全面阐释 kallistatin 的抗氧化作用与机制, 以及筛选抗肝纤维化新药物的靶点开发提供一些理论依据。

References

- [1] Huang X, Wang X, Lv Y, et al. Protection effect of kallistatin on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats *via* antioxidative stress [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e88498.
- [2] Shen B, Hagiwara M, Yao YY, et al. Salutary effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis *via* antioxidative stress [J]. *Hypertension*, 2008, 51: 1358–1365.
- [3] Wang GQ, Wang X, Huang XP, et al. Inhibition of integrin $\beta 3$, a binding partner of kallistatin, leads to reduced viability, invasion and proliferation in NCI-H446 cells [J]. *Cancer Cell Int*, 2016, 16: 90.
- [4] Zhang JJ, Bledsoe G, Kato K, et al. Tissue kallikrein attenuates salt-induced renal fibrosis by inhibition of oxidative stress [J]. *Kidney Int*, 2004, 66: 722–732.
- [5] Chao J, Schmaier A, Chen LM, et al. Kallistatin, a novel human tissue kallikrein inhibitor: levels in body fluids, blood cells, and tissues in health and disease [J]. *J Lab Clin Med*, 1996, 127: 612–620.
- [6] Lin WC, Lu SL, Lin CF, et al. Plasma kallistatin levels in patients with severe community-acquired pneumonia [J]. *Crit Care*, 2013, 17: R27.
- [7] Cheng Z, Lv Y, Pang S, et al. Kallistatin, a new and reliable biomarker for the diagnosis of liver cirrhosis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 194–200.
- [8] Lin WC, Chen CW, Huang YW, et al. Kallistatin protects against sepsis-related acute lung injury *via* inhibiting inflammation and apoptosis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12463.
- [9] Shen B, Gao L, Hsu YT, et al. Kallistatin attenuates endothelial apoptosis through inhibition of oxidative stress and activation of Akt-eNOS signaling [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299: H1419–H1427.
- [10] Shen B, Smith RS Jr, Hsu YT, et al. Kruppel-like factor 4 is a novel mediator of Kallistatin in inhibiting endothelial inflammation *via* increased endothelial nitric-oxide synthase expression [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 35471–35478.
- [11] Parola M, Robino G. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2001, 35: 297–306.
- [12] Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress [J]. *Mol Aspects Med*, 2000, 21: 49–98.
- [13] Aravinthan A, Pietrosi G, Hoare M, et al. Hepatocyte expression of the senescence marker p21 is linked to fibrosis and an adverse liver-related outcome in alcohol-related liver disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e72904.
- [14] Hsu YC, Chiu YT, Cheng CC, et al. Antifibrotic effects of tetrandrine on hepatic stellate cells and rats with liver fibrosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22: 99–111.
- [15] Panebianco C, Oben JA, Vinciguerra M, et al. Senescence in hepatic stellate cells as a mechanism of liver fibrosis reversal: a putative synergy between retinoic acid and PPAR-gamma signalings [J]. *Clin Exp Med*, 2016. DOI: 10.1007/s10238-016-0438-x.
- [16] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. *Compr Physiol*, 2013, 3: 1473–1492.
- [17] Huang X, Wang X, Dong H, et al. High level expression of recombinant human kallistatin in *Pichia pastoris* and its bioactivity [J]. *Chin J Biotechnol (生物工程学报)*, 2010, 26: 249–255.
- [18] Zhang Q, Xing YM, Liu J, et al. Expression of recombinant human kallistatin in *Pichia pastoris* by high density cell culture, and its purification and characterization [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 1107–1112.
- [19] Galli A, Svegliati-Baroni G, Ceni E, et al. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells *via* a MMP2-mediated mechanism [J]. *Hepatology*, 2005, 41: 1074–1084.
- [20] Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, van Goor H, et al. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells [J]. *Liver*, 2001, 21: 1–12.