

• 药理 •

复方 861 含药血清对 HSC-T6 细胞 I 型胶原、II 型胶原 mRNA 表达影响的研究

阴赓宏, 马红, 马雪梅, 王宝恩

(首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050)

摘要: 观察复方 861 含药血清对 HSC-T6 细胞 I 型胶原(CoL- I)、II 型胶原(CoL- II) mRNA 表达影响。以不同剂量复方 861 灌胃大鼠制备的含药血清, 作用 HSC-T6 细胞 48h, 应用逆转录定量 PCR 方法测定其对 HSC-T6 细胞 CoL- I、CoL- II mRNA 表达的影响。结果表明: 复方 861 0.5、1.0、2.0、6.0g/kg 等不同剂量含药血清 HSC-T6 细胞 CoL- I、CoL- II mRNA 表达。与空白对照组比较, 具有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。因此, 复方 861 可降低 HSC-T6 细胞 CoL- I、CoL- II mRNA 表达水平, 具有抗肝纤维化作用。

关键词: 复方 861; HSC-T6 细胞; I 型、II 型胶原; mRNA; 逆转录 PCR

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2002)05-0021-03

Effect of Compound 861-contained Serum on CoL- I, CoL- II Gene Expression of HSC-T6 Cells

YIN Cheng-hong, MA Hong, MA Xue-mei, WANG Bao-en

(Beijing Friendship Hospital, Capital University of Medical Science, Beijing 100050, China)

Abstract: To observe the effect of Compound 861-contained(Cpd 861) serum on CoL- I、CoL- II mRNA expression of HSC-T6 cells in vitro, HSC-T6 cells were exposed in different doses of Cpd 861-contained serum (0.5, 1.0, 2.0, 6.0g/kg) for 48 hours. CoL- I、CoL- II mRNA levels were measured by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). CoL- I、CoL- II mRNA levels of HSC-T6 cells at different doses of Cpd 861-contained serum were lower than those of normal control. Cpd 861-contained serum can decrease CoL- I and CoL- II mRNA expression of HSC-T6 cells.

Key words: Cpd 861; HSC-T6; CoL- I; CoL- II mRNA; RT-PCR

复方 861 是临床治疗肝纤维化的有效药物^[1], 由丹参 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.、黄芪 *Salvia miltiorrhiza* Bge.、柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 等 10 味中药组成。实验研究表明, 该药不仅能够抑制细胞外基质的合成^[2], 而且能够提高肝纤维化大鼠肝细胞胶原酶及血清胶原酶活性, 促进胶原降解^[3]。为了探讨该方的抗肝纤维化作用机理, 本实验采用整体动物给药, 分离含药血清, 作用于体外培养细胞的血清药理学研究方法, 以 RT-PCR 方法进一步观察复方 861 对 HSC-T6 细胞 I 型胶原(CoL- I)、II 型胶原(CoL- II) mRNA 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 复方 861 的制备 复方 861 由江苏江阴天江制

药公司生产的颗粒剂配制而成, 以蒸馏水稀释成 0.025、0.05、0.10、0.3g/ml 等不同浓度。

1.2 细胞系 星状细胞系 HSC-T6 由美国加利福尼亚旧金山总医院肝病中心实验室 Friedman 教授惠赠, 系 SV40 转染 SD 大鼠肝星状细胞而成, 其表型为活化的 HSC, 表达高水平的 CoL- I、TIMP1(组织基质金属蛋白酶抑制因子 1) mRNA 等^[4]。

1.3 动物 Wistar 大鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体重 300~350g, 制备含药血清用, 购自中国医学科学院实验动物中心, 动物合格证号: SCXK 11-00-0002。

1.4 复方 861 含药血清的制备 大鼠随机分为 5 组, 每组 5 只, 其中 4 组按体重灌胃给予复方 861 水溶液 1.0ml/100g 体重, 每天 2 次, 剂量依次为 0.5g/kg 体重、1.0g/kg 体重、2.0g/kg 体重、6.0g/kg 体重, 于给药后 90min 分别以 1.5% 的苯巴比妥钠腹腔注射麻

醉, 无菌条件下, 行腹主动脉取血约 10ml, 置 4℃冰箱中保存过夜, 待凝血坚实, 血清析出后, 于高速离心机中以 3000rpm 离心 10min, 取血清。另外 1 组根据体重灌胃给予蒸馏水 1.0ml/100g 体重, 90min 后, 同法取血分离血清, 为空白对照血清。所有血清均经 56℃、30min 灭活后, 置 -20℃冰箱中保存备用。

1.5 主要试剂 胎牛血清、总 RNA 提取试剂盒 (TRIzol)、MMV 逆转录酶: 均为 GIBCO 公司产品。RNA 酶抑制剂、Oligo (dt) 15 Primers、Taq 酶、PCR Markers 琼脂糖均为 Promega 公司产品。

1.6 主要仪器 美国 SHEL-LAB CO2 培养箱, 日本岛津 UV-1206 紫外分光光度计, 奥地利 SLT LAB INSTRUMENT 酶标仪, 日本 Olympus 倒置显微镜, 美国 PERKIN ELMER CETUS 公司 DNA 扩增仪, Bio-Rad 公司凝胶成像系统 (Quantity One)。

1.7 细胞培养 复苏后处于对数生长期的 HSC-T6 细胞, 胰酶消化, 以 5% FCS 的 1640 培养液均匀种于 200ml 培养瓶中, 培养 24h 后, 分别加入 10% 的复方 861 含药血清约 10ml, 4 瓶重复。并设空白对照组。培养 48h, 弃上清, 以细胞刷取细胞, 离心后 -20℃保存备用。

1.8 以 RT-PCR 方法^[5] 观察复方 861 对 HSC-T6 细胞 CoL- I、CoL- III mRNA 表达的影响

1.8.1 RNA 提取 应用 TRIzol (一步法) 总 RNA 提取试剂盒提取 HSC-T6 细胞总 RNA, 采用分光光度法测定提取的总 RNA 含量及纯度, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间。

1.8.2 cDNA 的合成 采用 50μl 逆转录反应体系, 内含 5×buffer 10μl, dNTP 2μl (1mM), Oligodt (15 Primers) 5μg/ml, MMV400 单位, RNA 酶抑制剂 80 单位, RNA4μg, 42℃反应 1h, 95℃5min 灭活 MMV。

1.8.3 共扩增定量 PCR PCR 反应体系为 50μl, 内含 10×buffer 5μl, 4×dNTP 0.8μl (0.4mM), CoL- I (CoL- III)、GAPDH 引物各 5μl (1μM), cDNA 5μl, Taq 酶 0.3μl (0.03U/μl), MgCl₂ 4μl (2.0mM), 用水补至 50μl。PCR 反应在 0.2ml 薄壁管中进行, 用毛细管 PCR 仪扩增。PCR 反应参数为: 94℃预变性 2min; 94℃变性 30s; 55℃退火 30s; 72℃延伸 50s, 30 个循环; 72℃后延伸 7min。CoL- I、CoL- III、GAPDH 引物序列^[6,7,8] 见表 1。

1.8.4 扩增产物定量分析 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, CoL- I、CoL- III 和 GAPDH 的扩

增产物分别为 514bp、425bp 和 300bp。扩增产物以凝胶成像系统进行半定量分析, 用 CoL- I (CoL- III)/GAPDH 的比值表示 CoL- I (CoL- III) 的相对表达水平。

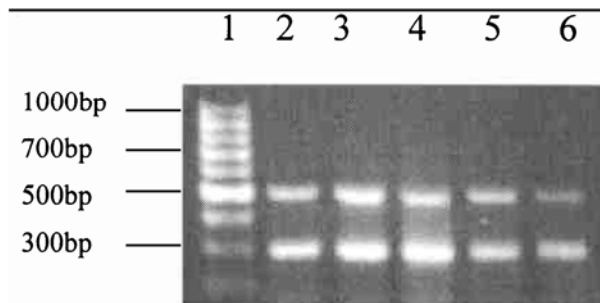
表 1 CoL- I、CoL- III、GAPDH 引物序列

引物	序 列	长度 (bp)
CoL- I	上游 5'-GGT TTG GAG AGA GCA TGA CC-3' (3941~3960)	514
	下游 5'-TTT GGG GAA ATT GAG TTT GG-3' (4454~4435)	
CoL- III	上游 5'-ATG GTG GCT TTC AGT TCA GC-3' (1509~1528)	425
	下游 5'-TGG GGT TTC AGA GAG TTT GG-3' (1933~1914)	
GAPDH	上游 5'-GAG GAC CAG GTT GTC TCC TG-3' (856~875)	300
	下游 5'-GGA TGG AAT TGT GAG GGA GA-3' (1155~1136)	

1.9 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用单因素方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 复方 861 含药血清对 HSC-T6 细胞 CoL- I mRNA 水平的影响 复方 861 含药血清作用 HSC-T6 细胞 48h 后, 0.5、1.0、2.0、6.0mg/kg 含药血清均有降低 CoL- I mRNA 水平的作用, $P < 0.05$ 或 0.01, 结果见图 1、表 2。



泳道 1 为 PCR markers, 泳道 2 为空白血清对照组, 泳道 3、4、5、6 为复方 861 含药血清组 (下图同)。

图 1 复方 861 含药血清对 HSC-T6 细胞 CoL- I mRNA 表达的抑制作用

表 2 复方 861 含药血清对 HSC-T6 细胞 CoL- I mRNA 水平的影响

组别	剂量 (mg/kg)	CoL- I / GAPDH
空白对照组		0.58 ± 0.04
含药血清	0.5	0.28 ± 0.09*
	1.0	0.29 ± 0.13*
	2.0	0.31 ± 0.18*
	6.0	0.40 ± 0.08*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; n = 4

2.2 复方 861 含药血清对 HSC-T6 细胞 CoL- III mRNA 水平的影响 复方 861 含药血清作用 HSC-T6 细胞 48h 后, 0.5、1.0、2.0、6.0mg/kg 含药血清均有降低

Col-Ⅲ mRNA 水平的作用, $P < 0.05$ 或 0.01 , 结果见图 2 表 3。

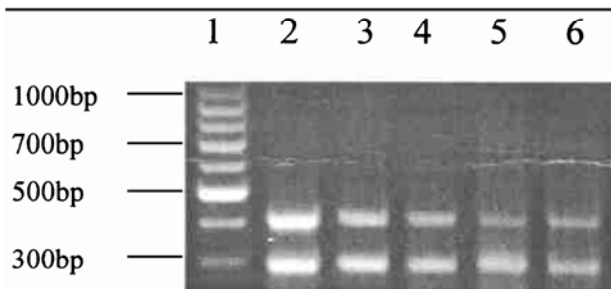


图 2 复方 861 含药血清对 HSC-T6 细胞
Col-Ⅲ mRNA 表达的抑制作用

表 3 复方 861 含药血清对 HSC-T6 细胞 Col-Ⅲ mRNA 水平的影响

组别	剂量(mg/kg)	Col-Ⅲ/CAPDH
空白对照组		1.05 ± 0.10
含药血清	0.5	0.65 ± 0.04 [*]
	1.0	0.60 ± 0.10 [*]
	2.0	0.54 ± 0.05 [*]
	6.0	0.72 ± 0.07 [*]

3 讨论

肝纤维化、肝硬化的病理基础是细胞外基质的沉积。近年来的大量研究表明,肝星状细胞是肝纤维化病理形成的细胞学基础^[9]。星状细胞(HSC)是肝脏非实质细胞之一,位于 Disse 间隙,在正常肝脏中参与维生素 A 的贮存和代谢,具有维持和调节肝内窦周血流等作用。慢性肝炎、肝纤维化及肝硬化时,由于肝脏细胞膜的破坏,释放胞浆内的促有丝分裂因子,使邻近的 HSC 增殖。

肝星状细胞受炎性细胞因子等病理因素刺激后活化,大量增殖并生成胶原等细胞外基质,沉积于肝脏而形成肝纤维化。因此, HSC 参与发病的关键取决于其激活与否。星状细胞系 HSC-T6 是由 SV40 转染培养 15d 的 SD 大鼠肝星状细胞转化而成,其表型为活化的 HSC,表达高水平的 Col-Ⅰ、TIMP1 mRNA 等^[4],故 HSC-T6 是体外研究肝纤维化发生机理、观察抗肝纤维化药物作用的较为理想的模型。

中药血清药理学研究方法是 20 世纪 80 年代出现的一种较为适合中药研究特点的药理学方法^[10],

本实验应用该研究方法,观察了抗肝纤维化及早期肝硬化有效药物复方 861 对 HSC-T6 细胞 Col-Ⅰ、Col-Ⅲ mRNA 表达的影响。结果表明,复方 861 可明显降低 HSC-T6 细胞 Col-Ⅰ、Col-Ⅲ 基因表达水平,表明复方 861 可干预肝纤维化及肝硬化时的胶原合成代谢,发挥其抗肝纤维化作用。

参考文献:

- [1] 段钟平,王宝恩,王泰龄,等. 复方中药 861 冲剂治疗乙型肝炎肝纤维化[J]. 中华肝脏病杂志, 1999, 7(1): 38.
- [2] 马红,王宝恩,董忠,等. 复方 861 对大鼠肝星状细胞增殖及胶原合成的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学杂志, 1998, 3(3): 172-174.
- [3] 王爱民,王宝恩,董忠,等. 复方丹参合剂提高胶原酶活性逆转实验性肝纤维化的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 1997, 5(1): 56-58.
- [4] Friedman SL, Lalazar A, Crong L, et al. HSC-T6 cells, an immortalized rat hepatic stellate cell line[J]. Hepatology, 1997, 26(4Pt): 338A.
- [5] Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, et al. Quantitative analysis of MDR₁ (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 7160-7164.
- [6] Brandsten C, Lundmark C, Christersson C, et al. Expression of collagen alpha1(I) mRNA variants during tooth and bone formation in the rat[J]. J Dent Res, 1999, 78(1): 11-19.
- [7] Glumoff, V., Makela, J. K. and Vuorio, E. Cloning of cDNA for rat pro alpha 1(III) collagen mRNA. Different expression patterns of type I and type III collagen and fibronectin genes in experimental granulation tissue[J]. Biochim. Biophys. Acta, 1994, 1217(1): 41-48.
- [8] Tso JY, Sun XH, Kao TH, et al. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase cDNAs: Genomic complexity and molecular evolution of the gene[J]. Nucleic Acids Res. 1985, 13: 2485-2502.
- [9] Friedman SL. Cellular sources of Collagen and regulation of Collagen production in liver[J]. Semin Liver Dis, 1990, 10(1): 20-29.
- [10] 阴赓宏,谭余庆,霍海如,等. 中药血清药理学研究方法及其应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 1997, 3(6): 41-43.