

蛇葡萄素对大鼠肝星状细胞增殖及胶原蛋白、细胞因子生成的影响

邹静¹,王小琴²,郑作文^{2*}

(1. 广东食品药品职业学院, 广州 510520; 2. 广西中医药大学, 南宁 530000)

[摘要] **目的:**研究蛇葡萄素对大鼠肝星状细胞(HSC-T6)的增殖及胶原蛋白、细胞因子生成的影响。**方法:**对 HSC-T6 增殖的影响:用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液制备成 HSC-T6 细胞 3×10^4 个/mL 细胞悬液 100 μ L/孔接种于 96 孔培养板。设细胞对照组、秋水仙碱 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和 100.0, 75.0, 50.0, 25.0, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 个不同质量浓度蛇葡萄素组,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养 48 h。采用 MTT 法检测蛇葡萄素对大鼠肝细胞 HSC-T6 增殖的影响。对 HSC-T6 生成 I, III, IV 型胶原蛋白及细胞因子(TGF- β_1 , PDGF)含量的影响:取终质量浓度分别为 50.0, 25.0, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛇葡萄素, 3×10^4 个/mL 细胞悬液 100 μ L/孔细胞液接种于 96 孔培养板。阳性组秋水仙碱的质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养 48 h。ELISA 法检测 HSC-T6 细胞生成的胶原蛋白(I, III, IV)、转化生长因子(TGF- β_1)及血小板衍生因子(PDGF)含量。**结果:**蛇葡萄素 100.0, 75.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 HSC-T6 细胞的增殖有明显抑制作用,其无毒浓度为 50.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蛇葡萄素可使 HSC-T6 细胞生成的 I, III, IV 型胶原蛋白, TGF- β_1 , PDGF 含量明显低于细胞对照组($P < 0.05$), 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蛇葡萄素也可使 HSC-T6 细胞生成的 III 型胶原蛋白含量明显低于细胞对照组($P < 0.05$)。**结论:**蛇葡萄素能抑制 HSC-T6 增殖并可使 HSC-T6 生成的 I, III, IV 型胶原蛋白, TGF- β_1 , PDGF 含量降低。

[关键词] 蛇葡萄素; HSC-T6; 胶原蛋白; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0163-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014080163

Effect of Ampelopsin on HSC-T6 Cell Proliferation and Content of Collagen and Cytokine

ZOU Jing¹, WANG Xiao-qin², ZHENG Zuo-wen^{2*}

(1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;
2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of ampelopsin on the HSC-T6 cell proliferation rate and the content of collage and cytokine **Method:** Effect of ampelopsin on the cell (HSC-T6) proliferation rate. High glucose DMEM medium containing 10% fetal bovine serum was used to prepare HSC-T6 cells 3×10^4 cells/mL suspension 100 μ L/well, which was seeded in 96-well culture plates. The control group, colchicine $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ group and 100.0, 75.0, 50.0, 25.0, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 5 different concentrations of ampelopsin groups were designed. Cells were cultured at 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 for 48 h. The cell proliferation inhibition rate was measured by MTT. Effect of ampelopsin on the content of collage (I, III, IV) and cytokine (TGF- β_1 , PDGF) was dected by ELISA. **Result:** Ampelopsin at 100.0, 75.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ might effectively inhibit proliferation of HSC-T6 cells, and the non-toxic drug concentration was 50.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the contents of collage I, III, IV and TGF- β_1 , PDGF in HSC-T6 cells were significantly lower than control group at 50.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of ampelopsin ($P < 0.05$), the contents

[收稿日期] 20130813(002)

[基金项目] 广东食品药品职业学院自然科学青年项目(2011YZ009)

[第一作者] 邹静, 硕士研究生, 药学中级, 从事教学及科研工作, Tel:13929520137, E-mail:ilkame@163.com

[通讯作者] * 郑作文, 硕士研究生, 教授, 从事教学及科研工作, Tel:18977112788, E-mail:zzw_nn@163.com

of collagen Ⅲ in HSC-T6 cells was significantly lower than control group by ampelopsin at 25.0 mg · L⁻¹ (*P* < 0.05). **Conclusion:** Ampelopsin could inhibit the proliferation of HSC-T6 and reduce the content of collagen I , Ⅲ , Ⅳ and TGF-β₁ , PDGF.

[**Key words**] ampelopsin; HSC-T6; collagen; cytokin

蛇葡萄素为一黄酮类化合物,又名双氢杨梅树皮素、二氢杨梅素、福建茶素、白荛素等,结构式为 3, 5, 7, 3', 4', 5'-六羟基-2, 3-双氢黄酮醇^[1],其广泛存在于藤茶、无刺根等植物中。已有文献报道,蛇葡萄素对 SGC-7901 细胞凋亡及裸鼠移植瘤有较强的抑瘤作用^[2-3],能显著抑制 PC3 细胞的增殖,引起细胞 S 期阻滞,诱导细胞凋亡^[4],且具有抗实验性肝纤维化等作用^[5-6]。肝星状细胞的增殖活化是肝纤维化形成的关键,因此本文研究蛇葡萄素对 HSC-T6 细胞增殖及其生成的肝纤维化主要成分胶原蛋白和刺激肝星状细胞增殖的主要细胞因子含量的影响。

1 材料

1.1 药物 蛇葡萄素由广西中医药大学中药化学教研室从藤茶[*Ampelosis grossedentata* (Hand. -Mazz.) W. T. Wang]的嫩茎叶提取分离得到藤茶总黄酮,再经丙酮热溶重结晶,得白色针状结晶物(蛇葡萄素),经高效液相测定蛇葡萄素的纯度,达 98% 以上。

1.2 试剂 MEM 干粉培养基(美国 Gibco 公司, cat: No. 12800-058); 胎牛血清(Gibco 公司), 胰酶(Hyclone 公司, 批号 SH3004201), 秋水仙碱(江苏豪森药业股份有限公司, 批号 090601)。

1.3 细胞 HSC-T6 细胞购买于上海博蕴有限公司冻存备用。

1.4 仪器 EPOCH-全波长酶标仪(美国 BIO-TEK)。

2 方法

2.1 对 HSC-T6 增殖的影响 取对数生长期 HSC-T6 细胞以 0.25% 胰酶消化,用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液制备成 3 × 10⁴ 个/mL 细胞悬液,接种 96 孔板,每孔 100 μL。设细胞对照组、秋水仙碱组和 5 个不同浓度蛇葡萄素组。细胞接种后,在 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱预培养 24 h。置 37 ℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,细胞贴壁后,弃上清。药物组用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释药物,细胞对照组只加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,每组设 4 个复孔,100 μL/孔。蛇葡萄素组终质量浓度分别为 100.0, 75.0, 50.0, 25.0, 12.5 mg · L⁻¹。阳性组秋水仙碱质量浓度为 1.0 mg · L⁻¹。置 37 ℃ 5% CO₂ 培养 48 h。每孔加 MTT 溶液(5 g ·

L⁻¹) 10 μL, 37 ℃ 继续培养 4 h, 弃上清。每孔加 DMSO 150 μL, 室温下用振荡器轻轻震荡 5 min。用酶标仪于 450 nm 波长处测吸光度(*A*)。

抑制率 = (1 - 药物 *A* / 对照 *A*) × 100%

2.2 对 HSC-T6 生成的 I , Ⅲ , Ⅳ 型胶原蛋白及

TGF-β₁, PDGF 含量的影响 细胞接种及培养同

2.1, 设细胞对照组、阳性对照组和 5 个不同浓度蛇葡萄素组。细胞接种后,在 37 ℃ , 5% CO₂ 培养箱预培养 24 h。细胞贴壁后,弃上清。药物组用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释药物,细胞对照组只加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,每组 3 个复孔,100 μL/孔。蛇葡萄素组终质量浓度分别为 50.0, 25.0, 12.5 mg · L⁻¹。阳性组秋水仙碱质量浓度为 1.0 mg · L⁻¹。置 37 ℃ 5% CO₂ 培养 48 h。收集细胞上清液 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液,按 ELISA 试剂盒操作说明书检测 I , Ⅲ , Ⅳ 型胶原蛋白及 TGF-β₁, PDGF 含量。

2.3 统计学处理 采用 SPSS 12.0 进行数据的统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验(方差不齐时采用 *t* 检验校正公式), *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HSC-T6 增殖的影响 蛇葡萄素作用于 HSC-T6 48 h 后,可明显抑制细胞增殖,且呈剂量依赖关系,以抑制率在 10% 以内的蛇葡萄素浓度(50.0, 25.0, 12.5 mg · L⁻¹) 为无毒浓度作后续研究。见表 1。

表 1 蛇葡萄素对 HSC-T6 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度 / mg · L ⁻¹	<i>A</i>	抑制率 / %
细胞对照	-	0.99 ± 0.08	-
秋水仙碱	1.0	0.41 ± 0.01 ²⁾	58.66
蛇葡萄素	100.0	0.25 ± 0.02 ²⁾	75.08
	75.0	0.32 ± 0.01 ²⁾	67.68
	50.0	0.90 ± 0.01	9.22
	25.0	0.92 ± 0.05	6.68
	12.5	0.98 ± 0.09	0.67

注:与细胞对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(表 2 同)。

3.2 对 HSC-T6 生成的 I , Ⅲ , Ⅳ 型胶原蛋白及细胞因子(TGF-β₁, PDGF) 含量的影响 蛇葡萄素作用于 HSC-T6 48 h 后能减少 I , Ⅲ , Ⅳ 型胶原蛋白及

TGF-β₁,PDGF 含量,其中 50.0 mg·L⁻¹¹ 的蛇葡萄素使细胞生成的 I,Ⅲ,Ⅳ型胶原蛋白及 TGF-β₁,PDGF 浓度明显低于细胞对照组(*P* < 0.05),25.0

mg·L⁻¹作用下 HSC-T6 细胞生成的Ⅲ型胶原蛋白浓度明显低于细胞对照组(*P* < 0.05),且呈现一定的剂量依赖关系。见表 2。

表 2 蛇葡萄素对 HSC-T6 细胞生成的 I,Ⅲ,Ⅳ型胶原蛋白及细胞因子 TGF-β₁,PDGF 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$) μg·L⁻¹

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	I 型胶原蛋白	Ⅲ型胶原蛋白	Ⅳ型胶原蛋白	TGF-β ₁	PDGF
细胞对照	-	18.47 ± 1.28	14.13 ± 0.21	29.87 ± 0.93	44.97 ± 3.60	11.18 ± 0.40
秋水仙碱	1.0	12.57 ± 1.23 ²⁾	13.13 ± 0.20 ²⁾	22.95 ± 1.49 ²⁾	36.20 ± 2.39 ¹⁾	9.90 ± 0.44 ¹⁾
蛇葡萄素	50.0	14.00 ± 1.78 ¹⁾	11.64 ± 0.65 ²⁾	24.90 ± 2.09 ¹⁾	35.60 ± 1.28 ¹⁾	9.78 ± 0.36 ¹⁾
	25.0	15.19 ± 2.52	12.13 ± 0.07 ²⁾	25.85 ± 2.99	38.29 ± 0.089	10.75 ± 0.47
	12.5	19.41 ± 1.66	14.72 ± 0.76	27.95 ± 1.86	41.30 ± 0.95	11.15 ± 1.44

4 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理特点,肝脏的星状细胞是其病理形成的细胞学基础,受炎症细胞因子等病理因素激活的星状细胞在大量增殖后转化为肌成纤维细胞,后者生成大量的细胞外基质(ECM)。从病理学的角度看,肝纤维化是的 ECM 合成和降解之间失去平衡的结果,当肝脏的 ECM 合成远远大于降解时,肝纤维化便随之发生。肝纤维化的共同途径是 HSC 的活化为肌成纤维细胞,并合成大量的 ECM 在肝内大量沉积^[7-8],其中胶原蛋白是 ECM 的主要成分,而肝脏中尤以 I,Ⅲ,Ⅳ型胶原含量较多^[9]。已证实在肝纤维化的后期,胶原等 ECM 降解的减少是导致肝硬化的主要原因^[10]。因此就针对 HSC 的抗肝纤维化而言治疗主要应该集中在抑制 HSC 激活、抑制 HSC 增殖及胶原合成或促进胶原蛋白降解等几方面^[11]。细胞因子在 HSC 的活化和肝纤维化的发生发展中起重要作用。TGF-β₁ 在肝纤维化中的主要作用是促进细胞外基质合成并抑制其降解,也有间接促肝星状细胞增殖作用^[12]。PDGF 主要促进肝星状细胞增殖,通过与肝星状细胞上相应受体结合发挥生物学活性。另外 PDGF 也促进肝星状细胞移行,并诱导肝星状细胞合成转化生长因子等细胞因子^[13]。本实验结果显示,蛇葡萄素可显著降低 HSC-T6 生成的 I,Ⅲ,Ⅳ型胶原蛋白及 TGF-β₁,PDGF 含量,提示蛇葡萄素抗肝纤维化的作用可能与减少 TGF-β₁,PDGF 的含量从而使胶原蛋白合成减少有关。

[参考文献]

[1] 何桂霞. 显齿蛇葡萄中总黄酮和二氢杨梅素的含量测定[J]. 中国中药杂志,2000,25(7):423.
[2] 郑作文,吕林艳,王小琴,等. 蛇葡萄素诱导人胃癌细胞凋亡的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):292.

[3] 郑作文,郭成贤,唐云丽,等. 蛇葡萄素对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究,2010,37(3):284.
[4] 倪峰,姚欣,郭丹,等. 蛇葡萄素对人前列腺癌 PC3 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中药药理与临床,2012,28(3):39.
[5] 郑作文,胡远燕. 藤茶双氢杨梅树皮素对实验性慢性肝损伤的保护作用[J]. 中国药物应用与监测,2008,3(5):12.
[6] 邝满元,贾蕾,罗明英. 二氢杨梅素对肝纤维化大鼠肝功能及肝纤维化指标的影响[J]. 中国民族民间医药,2009,8(6):6.
[7] Lee S J, Kim Y G, Kang K W, et al. Effects of colchicine on liver func-tions ofcirrhotic rats; beneficial effects result from stellate cell inactivation and inhibition of TGF betal expression[J]. Chem Biol Interact,2004,147(1):9.
[8] 张晓平,陈建明,强世平,等. 山桃仁水煎提取物对肝纤维化小鼠血清 I,Ⅲ型前胶原的降解作用[J]. 福建中医药,2002,33(4):36.
[9] 王志荣,陈锡美,李定国,等. 粉防己碱抑制肝纤维化大鼠肝组织 c-fos 和 c-junmRNA 表达[J]. 上海医学,2003,26(5):332.
[10] Friedman S L Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications [J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol,2004(1):98.
[11] 姜春萌,刘成,刘平. 肝纤维化过程中肝星状细胞的研究进展[J]. 中华消化杂志,2000,20(4):258.
[12] 郭平,王继峰. 转化生长因子-β 与器官纤维化[J]. 生命的化学,2003,23(6):23.
[13] CAMPB ELL JS, HU GHES SD, GILB ER TSON DG, et al. Platelet-derived growth factor Cinduces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(9):3389.

[责任编辑 聂淑琴]