

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2015.01.04

抗肝硬化不同中药组方大鼠含药血清对肝硬化 HSC-T6 细胞相关基因表达的影响

崔爱玲, 孙晓慧, 刘中景, 于朝霞

(青岛市传染病医院 中西医结合科, 山东 青岛 266033)

摘要:[目的]观察抗肝硬化不同中药组方大鼠含药血清对肝硬化 HSC-T6 细胞相关基因表达的影响及其效果差异。[方法]将 30 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、秋水仙碱对照组、抗肝硬化不同中药组(1 号方组、2 号方组、3 号方组)共 5 组,每组 6 只,HSC-T6 细胞复苏后常规培养,采用半定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)和 ELISA 法观察药物对肝硬化 HSC-T6 细胞 I 型胶原(Co1 I)、Ⅲ型胶原(Co1 Ⅲ)和前凋亡蛋白(Bax)的 mRNA 表达的影响。[结果]与正常对照组比较,抗肝硬化不同中药 1 号方和 2 号方对 Co1 I、Co1 Ⅲ、Bax mRNA 的表达差异均有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),而 3 号方除对 Bax mRNA 的表达与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),而其对 Co1 I、Co1 Ⅲ mRNA 的表达与正常对照组比较,差异无统计学意义。[结论]抗肝硬化不同中药组方大鼠含药血清对肝硬化 HSC-T6 细胞相关基因表达均有不同程度的抑制作用。

关键词:抗肝硬化不同中药;大鼠含药血清;肝星状细胞;基因表达

中图分类号:R575.2

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2015)01-0010-04

Effects of drug-containing serum of different anti-hepatic-cirrhosis prescription on related gene expression of HSC-T6 cells

CUI Ai-ling, SUN Xiao-hui, LIU Zhong-jing, YU Zhao-xia

(Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Qingdao Infectious Disease Hospital, Qingdao 266033, China)

Corresponding author: YU Zhao-xia, E-mail: lzj1955@163.com

Abstract:[Objective]To investigate influences and effects of drug-containing serum of different anti-hepatic-cirrhosis prescription on related gene expression of HSC-T6 cells. [Methods]Thirty SD rats were randomly divided into five groups: control group, colchicine group and three different prescription trial groups (Group 1, Group 2 and Group 3). After the resuscitation and culture of HSC-T6 cells, the influences of different drugs on mRNA expression of Collagen Type I, Collagen Type Ⅲ and apoptosis protein Bax in HSC-T6 cells were detected by semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR)and ELISA analysis. [Results]As compared with the control group, mRNA expression of Collagen Type I, Collagen Type Ⅲ and apoptosis protein Bax showed significant differences in Group 1 and Group 2($P<0.05$; $P<0.01$). As compared with the normal control, Group 3 had significant effect on mRNA expression of apoptosis protein Bax with no significant effect on mRNA expression of Collagen Type I ($P<0.05$). [Conclusion]Drug-containing serum of different anti-hepatic-cirrhosis prescription had varying inhibitory effects on related gene expression of HSC-T6 cells.

Key words:anti-hepatic-cirrhosis prescription; drug-containing serum in rats; hepatic stellate cells; gene expression

收稿日期:2014-08-21

基金项目:青岛市中医药科研计划重点资助(No:2009-ZYZ002)

作者简介:崔爱玲,女,副主任药师

通讯作者:于朝霞, E-mail: lzj1955@163.com

肝纤维化的中医药防治研究是我国近年来中西医结合防治慢性肝病的一大热点。部分研究已逐步深入到从细胞、分子水平来探讨中医药抗肝纤维化的机制和复方机理。本研究主要观察抗肝硬化不同中药组方的含药血清对大鼠肝星状细胞的影响,包括对 Col I、ColⅢ、Bax 等相关基因的表达,来探讨抗肝硬化不同中药组方抗肝纤维化的药效环节与作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验药品

中药:购置于广州中医药大学第一附属医院中药房,经广州中医药大学中药学院鉴定教研室鉴定。中药以“桃红活血汤”为基本方(赤芍、丹参、桃仁、红花各 15 g),并结合 2006 年中国中西医结合学会肝病专业委员会《肝纤维化中西结合诊疗指南》临床肝硬化常见辨证分型,以肝郁脾虚、肝肾阴虚、脾肾阳虚 3 种分型为“扶正”组方,组成扶正活血共 3 个不同方剂(简称 1 号方、2 号方、3 号方)。1 号方(活血化瘀健脾益气):桃红活血汤加黄芪 15 g、党参 15 g、白术 12 g、炙甘草 12 g;2 号方(活血化瘀滋养肝肾):桃红活血汤加熟地 30 g、白芍 30 g、麦冬 30 g、枸杞子 15 g;3 号方(活血化瘀温补脾肾):桃红活血汤加附子 9 g、干姜 12 g、炙甘草 12 g、肉苁蓉 15 g、菟丝子 15 g。药物制备:将扶正活血方原药浸泡 20 min(水浸过药面 2 cm)。武火煮沸后改用文火煎 30 min,冷却 30 min 后滤渣取汁。将滤渣如上法再煎煮 2 次取汁。将 2 次药汁混合,用文火适度浓缩至 120 ml,浓度为 0.75 kg/L,制成扶正活血方大剂量水煎剂,置冰箱 4℃ 备用。

西药:秋水仙碱,成人(60 kg)的日用量为 1 mg,大鼠的剂量为成人用量的 30 倍(即 0.25 mg/kg)。使用时以蒸馏水调制药液成 0.025 g/L。

1.2 实验动物及试剂

SD 大鼠购于广州中医药大学实验动物中心,HSC-T6 细胞由广州中医药大学热带病研究所提

供,RPMI1640 培养基(美国 GIBCO 公司),注射用青霉素钠、注射用硫酸链霉素(哈药集团制药总厂),小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司),Trysin1:250(胰蛋白酶)(美国 Difco 公司),EDTA(美国 GIBCO 公司),PI(美国 SIGMA 公司),RNase(美国 SIGMA 公司),MTT(美国 SIGMA 公司)。

1.3 实验动物分组及含药血清标本采集

将 SD 大鼠随机分为正常血清对照组(简称正常组)、秋水仙碱对照组(简称阳性组)、扶正活血组(1 号方组、2 号方组、3 号方组)共 5 组,每组 6 只;以上各组均以相应的药物灌胃(正常血清对照组以生理盐水灌胃)。灌胃量均为 1 ml/100 g 体质量。每天灌胃 2 次,间隔 12 h,连续给药 3 d。

末次给药后 1 h 采血(灌药前禁食不禁水 12 h),10 g/L 戊巴比妥钠(0.35 ml/100 g)腹腔麻醉,腹主动脉采血,室温下静置 4 h,3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,同组血清相混,将各组血清用 56℃ 水浴灭活 30 min,以除去可能存在的生物活性物质,再用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌,置于-20℃ 冰箱保存备用。

1.4 细胞总 RNA 的提取

按照《分子克隆实验指南》^[1]取 RNA 样品稀释 100 倍,在 260 nm 和 280 nm 测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值以判断 RNA 浓度及纯度。

1.5 (RT-PCR)引物设计

利用 Primer 5.0 引物设计软件设计合成引物,用于合成所需的 4 个相关基因片段及内参 18 S(表 1),引物由美国 Invitrogen(上海)英骏生物技术有限公司合成。然后根据这 4 个基因序列的不同特点,进行 RT-PCR 扩增。

1.6 cDNA 的合成

按照德国 QZAGEN 子公司(北京天根生化科技有限公司)TIANScript M-MLV 试剂盒提供的实验方法,在冰上添加试剂,并加入上述提取的 RNA 模板,合成 First-strand cDNA。

表 1 半定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

基因名称	序列	产品尺寸/bp
I 型胶原	F:5'-AGAGCCTGCCGTAATCG-3'	405
	R:5'-CGGTGCTTCCCCTTTGG-3'	
Ⅲ型胶原	F:5'-GTGTATTTCGTTCCCAGAG-3'	275
	R:5'-AACAGTGACAGCCCTTG-3'	
前凋亡蛋白	F:5'-TGGCAACTTCAACTGGG-3'	257
	R:5'-AGATGGTGAGCGAGGC-3'	
18 S	F:5'-TGCGGAAGGATCATTAACGGA-3'	300
	R:5'-AGTAGGAGAGGAGCGAGCGACC-3'	

1.7 RT-PCR 扩增反应

以上述合成好的 cDNA 为模板,加入表 1 中的特异引物对,在 PCR 仪上进行 PCR 反应,PCR 反应结束后取出-20℃保存,用于电泳检测。

1.8 结果判定

用凝胶图像分析仪进行分析,根据 Marker 确认目标基因扩增片断的条带,测定各个目的基因产物的条带的平均光密度(AveoD),与同时测定的内参对照物(GAPDH)的条带光密度比较,以其比值表示目的基因 mRNA 的量,分析各目的基因的表达

情况。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件,利用 ANOVA 检验和 Dunnett's 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

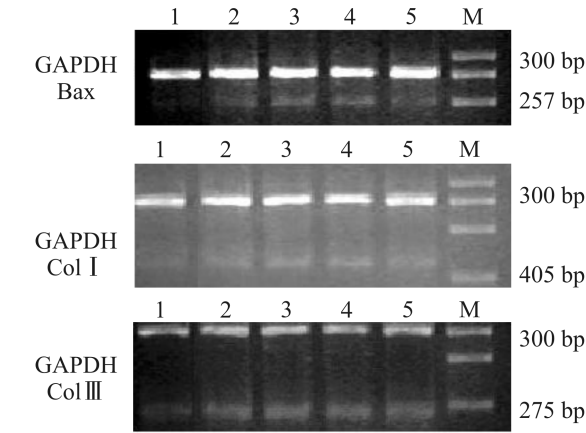
不同组别对 HSC-T6 细胞 Col I、Col III 和 Bax mRNA 表达的影响,见表 2。各组肝组织 Bax、Col III、Col I RNART-PCR 凝胶电泳结果,见图 1。

表 2 不同组别对 HSC-T6 细胞 Col I、Col III 和 Bax mRNA 表达的影响

$\bar{x} \pm s$

组别	例数	Col I /GAPDH	Col III /GAPDH	Bax/GAPDH
正常对照组	6	0.89±0.11	1.44±0.13	0.83±0.04
秋水仙碱组	6	0.49±0.09 ²⁾	1.06±0.13 ²⁾	1.27±0.05 ²⁾
1 号方组	6	0.69±0.11 ¹⁾	1.18±0.09 ¹⁾	1.13±0.05 ¹⁾
2 号方组	6	0.64±0.11 ¹⁾	1.09±0.12 ²⁾	1.12±0.06 ¹⁾
3 号方组	6	0.72±0.12	1.31±0.15	1.04±0.06 ¹⁾

与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 、²⁾ $P < 0.01$ 。



1:正常组;2:秋水仙碱组;3:3号方组;4:2号方组;5:1号方组;M:Marker。

图 1 各组肝组织 Bax、Col III、Col I RNART-PCR 凝胶电泳结果

3 讨论

肝纤维化的防治是世界性难题,现代医药也缺乏针对性较强的治疗药物,而中医药防治研究是近年来国内防治肝纤维化的一大热点,基于“正虚血瘀”是肝纤维化的基本病机,所以本研究拟从“扶正活血”立法,观察扶正活血不同组方对肝纤维化大鼠作用机理及其疗效差异^[2]。

目前认为,HSC 细胞的活化、增殖、过度分泌是肝纤维化形成的中心环节,HSC 细胞激活后,转化为肌纤维母细胞样细胞表型,合成大量细胞外基质

(ECM)沉积于肝脏,最终导致肝纤维化的发生^[3-4]。而近年来的研究证实^[5],中药复方的抗肝纤维化租用是通过多途径药理作用实现的:①拮抗 HSC 的活化。a. 抑制肝活化 HSC 的细胞增殖与胶原生成;b. 抑制枯否细胞(KC)的旁分泌而减轻 HSC 的活化;c. 抑制活化 HSC 的自分泌,阻断活化的级联反应,从而阻止肝纤维化的持续发展。②抗肝细胞脂质通过氧化损伤以减轻过氧化产物对 HSC 的刺激。③调节肝组织基质金属蛋白酶火星,逆转肝窦毛细血管瘤,从而改善肝细胞周围细胞外基质的微环境。中医扶正活血治疗均有抑制 HSC 增殖的作用,HSC 是肝纤维化病理形成的细胞学基础^[6],各种慢性肝损伤均可致肝星状细胞的活化增殖、从而产生大量的胶原等细胞外基质,沉积于肝脏而形成肝纤维化^[7]。

Bax 是细胞凋亡的重要调控基因,Bax 蛋白的超表达则使细胞凋亡,其表达状态与细胞凋亡指数是呈正相关^[8]。

本研究以 HSC-T6 细胞中 Col I、Col III 和 Bax 等相关基因表达进行了定量分析,探讨扶正活血含药血清影响其基因表达的分子机制。研究显示,对 HSC-T6 相关基因的表达,其中扶正活血 1 号方和 2 号方对 Col I、Col III 和 Bax mRNA 的表达与阴性对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。而 3 号方组除对 Bax mRNA 的表达与阴性

对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),而其对 Col I、ColⅢ mRNA 的表达与阴性对照组差异无统计学意义,效果不明显。

参考文献

[1] 萨姆布鲁克,黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社, 2005:1—693.

[2] 刘成海,刘 平,胡义扬,等. 中医药抗肝纤维化临床与基础研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2007, 9(2):112—119.

[3] 胡爱荣,丁一生,程明亮. 丹芍化胶囊对肝纤维化大鼠肝星状细胞增殖、活化及凋亡的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(2):141—143.

[4] 陈尉华,陆伦根,曾民德,等. 异甘草酸镁对大鼠肝星状细胞增殖和氧应激的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(6):426—430.

[5] 蔡 锐,伍参荣,胡海平,等. 桃红四物汤加丹参对肝星状细胞增殖和凋亡影响[J]. 湖南中医学院学报, 2005, 25(6):22—24.

[6] RIPPE R A. Life or death; the fate of the hepatic stellate cell following hepatic injury [J]. Hepatology, 1998, 27(5):1447—1448.

[7] MURPHY F R, ISSA R, ZHOU X, et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition; implications for liver fibrosis [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 11069 — 11076.

[8] IREDALE J P, BENYON R C, PICKERING J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 1998, 102:538—549.

(上接第 9 页)

尚需深入研究,今后在鼻胆管中药溶石治疗上尚有继续探讨研究的必要。

参考文献

[1] 王长洪,杨 卓,麻树人,等. 鼻胆管注入溶石中药治疗胆总管较大结石疗效观察[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2007, 15(4):234—236.

[2] 田金沙,林一帆,巩 阳,等. 加减利石化胆汤预防胆总管结石 ERCP 术后复发的临床研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1):204—205.

[3] 徐海荣,刘世峰,刘 刚,等. 十二指肠镜治疗胆总管结石的临床应用研究[J]. 四川医学, 2012, 33(3):461—463.

[4] 郑知强,姚宇亮,肖思洁. 单纯胆总管结石 ERCP/EST 与 LCBDE 的临床对比分析[J]. 中国医药指南, 2012, 10(36):576—576.

[5] 宛新建,李兆申,邹晓平,等. 218 例巨大胆总管结石病人临床诊疗分析[J]. 中华肝胆外科杂志, 2009, 15(9):662—666.

[6] WILLIAMS E J, GREEN J, BEKINGHAM I, et al. Guidelines on the management of common bile duct stones(CBDS)[J]. Gut, 2008, 5:1004—1021.

[7] 中华医学会外科学分会胆道外科学组. 肝胆管结石病诊断治疗指南[J]. 中国消化外科杂志, 2007, 6(2): 156—161.

[8] 费 凇,苏树英,李杰原,等. 十二指肠镜下子母镜联合 U-100 激光治疗难治性胆总管结石的疗效[J]. 中国全科医学, 2010, 13(11):1220—1221.

[9] 高文艳,王长洪,麻树人,等. 内镜下治疗肝内外胆管结石 1478 例回顾性分析[J]. 中国中医急症, 2011, 20(1):35—37.