

原阿片碱对人肝星状细胞HSC-LX2增殖的抑制作用及机制研究[△]

吴新玉^{1,2*}, 李靖^{1,2}, 张金娟³, 廖尚高^{1,2}, 梅青^{1,2}, 吴亚云⁴, 席晓岚^{1,2#}(1.贵州医科大学药学院, 贵州贵安新区550025; 2.国家苗药工程技术中心教育部民族药与中药开发应用工程研究中心, 贵阳550004; 3.贵州医科大学基础医学院, 贵州贵安新区550025; 4.贵州医科大学附属医院感染科, 贵阳550004)

中图分类号 R361*.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)23-3210-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.23.08

摘要 目的:考察原阿片碱对人肝星状细胞HSC-LX2增殖的抑制作用,并对其机制进行初步探讨。方法:采用MTT法测定25、50、100、200、400、500 μmol/L原阿片碱作用24 h对HSC-LX2细胞增殖的影响,计算细胞增殖抑制率。另取HSC-LX2细胞分为对照组(含5%胎牛血清的1640培养基)和原阿片碱低、中、高浓度组(100、200、400 μmol/L),作用24 h后,流式细胞术测定细胞凋亡率;荧光定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定细胞中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I型胶原蛋白(Collagen I)、III型胶原蛋白(Collagen III)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)、组织金属蛋白酶抑制剂1(TIMP-1) mRNA的相对表达量,Western blot法测定细胞中 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2蛋白的相对表达量。结果:25、50、100、200、400、500 μmol/L原阿片碱对HSC-LX2细胞的增殖抑制率分别为0、6.9%、18.7%、34.2%、48.9%、53.9%。与对照组比较,原阿片碱低、中、高浓度组细胞中Collagen I、TIMP-1 mRNA相对表达量和 α -SMA蛋白相对表达量均显著降低,MMP-2蛋白相对表达量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);原阿片碱中、高浓度组细胞的凋亡率和MMP-2 mRNA相对表达量显著升高, α -SMA、Collagen III mRNA相对表达量和Collagen I、Collagen III蛋白相对表达量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:原阿片碱可抑制HSC-LX2细胞增殖,诱导其凋亡,可降低 α -SMA、Collagen I、Collagen III、TIMP-1表达,升高MMP-2表达有关。

关键词 原阿片碱;肝星状细胞HSC-LX2;增殖;凋亡;机制

Inhibitory Effects of Protopine on the Proliferation of Human Hepatic Stellate Cells HSC-LX2 and Its Mechanism Study

WU Xinyu^{1,2}, LI Jing^{1,2}, ZHANG Jinjuan³, LIAO Shanggao^{1,2}, MEI Qing^{1,2}, WU Yayun⁴, XI Xiaolan^{1,2}(1.School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guizhou Guian New Area 550025, China; 2.National Engineering Research Center of Miao's Medicines & Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education, Guiyang 550004, China; 3.School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guizhou Guian New Area 550025, China; 4.Dept. of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate inhibitory effects of protopine on the proliferation of human hepatic stellate cells HSC-LX2 and to explore its mechanism preliminarily. METHODS: MTT assay was used to detect the effects of 25, 50, 100, 200, 400 and 500 μmol/L protopine on the proliferation of HSC-LX2 cells. The inhibitory effect of cell proliferation was calculated. HSC-LX2 cells were divided into control group (1640 medium containing 5% fetal bovine serum), protopine low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups (100, 200, 400 μmol/L). After treated for 24 h. The apoptotic rate of the cells was detected by flow cytometry. RT-PCR was used to determine the mRNA expression of α -SMA, Collagen I, Collagen III, MMP-2 and TIMP-1 in cells. The protein expressions of α -SMA, Collagen I, Collagen III and MMP-2 were detected by Western blot. RESULTS: The inhibitory rates of 25, 50, 100, 200, 400 and 500 μmol/L protopine on proliferation HSC-LX2 cells were 0, 6.9%, 18.7%, 34.2%, 48.9%, 53.9%, respectively. Compared with control group, mRNA expression of Collagen I, TIMP-1

and protein expression of α -SMA were decreased significantly in protopine low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups, while protein expression of MMP-2 was increased significantly, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Apoptotic rate of HSC-LX2 cells and

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460642)

* 硕士研究生。研究方向:药物生物等效性评价与药理学。

E-mail:1174026219@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:药物生物等效性评价与药理学。电话:0851-88416164。E-mail:gmuxxiaolan@163.com

mRNA expression of MMP-2 were increased significantly in protopine medium-concentration and high-concentration groups, mRNA expression of α -SMA and Collagen III, protein expression of Collagen I and Collagen III were decreased significantly, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: Protopine can induce the apoptosis of HSC-LX2 cells and inhibit their cell proliferation, and reduce the expression of α -SMA, Collagen I, Collagen III and TIMP-1, and increase the expression of MMP-2.

KEYWORDS Protopine; Hepatic stellate cells HSC-LX2; Proliferation; Apoptosis; Mechanism

肝纤维化(Hepatic fibrosis)是指肝实质损伤后修复时通过形成瘢痕取代受损或破坏的肝组织,其实质是细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的合成与降解失衡,致使肝内弥漫性细胞外基质过度沉积。肝纤维化不是一个独立的疾病,也不是一个独立的诊断,而是许多慢性肝病发展的共同病理生理过程^[1]。有研究表明,肝星状细胞(Hepatic stellate cells, HSCs)激活变成肌成纤维细胞是肝纤维化的主要来源^[2],是合成和分泌ECM并可产生胶原酶的一种肝间质细胞^[3],在肝纤维化形成的过程中发挥关键作用^[4]。在肝损伤时,各种因素刺激导致HSCs从静止状态转化为活化状态,其特征在 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的过表达^[5];通过自分泌或者旁分泌激活的HSCs增殖;以I型胶原蛋白(Collagen I)、Collagen III为主的ECM过多沉积,最终形成肝纤维化^[6]。基质金属蛋白酶(MMPs)是一种能降解ECM的酶,在静止的HSCs中,MMPs和组织金属蛋白酶抑制剂1(TIMP-1)处于一种动态平衡,发生肝纤维化时平衡会被打破,TIMP-1被激活,MMP-2的活性被抑制^[7-9],从而影响ECM的稳态并导致肝纤维化。发生肝纤维化时,HSCs的数量显著增多,主要原因固然是因为其激活及增殖所致,但其凋亡的相对不足也可能是一个重要因素。

苗药“消疤草”(苗语称 *Vob h xenk dliangd*)是贵州省黔东南苗族民间用于治疗瘢痕的单味药,能使明显凸出皮肤表面的瘢痕疙瘩明显缩小、变平。本课题组前期研究中发现,“消疤草”对大鼠免疫性肝纤维化具有很好的预防作用,并表现出抑制ECM形成的作用^[10-12]。但“消疤草”中发挥抗肝纤维化作用的活性成分尚不清楚,作用机制亦不明确。本课题组在前期的药效研究基础上,进一步明确了原阿片碱(Protopine)、Macleayin E、 β -卡波林、2-(4-羟基-3-甲氧苯基)-3-[N-2-(4-羟基苯基)乙基]氨基甲酰-5-[N-2-(4-羟基苯基)乙基]氨基甲酰-7-甲氧苯基并二氢咪喃等4个单体可能是“消疤草”抗肝纤维化的有效成分^[13]。原阿片碱是一种异喹啉类生物碱^[14-15],分子式为 $C_{20}H_{19}NO_5$ 。现代药理学研究证明,原阿片碱具有镇痛、抑制血小板聚集、松弛平滑肌、抗心律失常、抗肿瘤、抗肝损伤、抗胆碱酯酶等活性^[16-17],但其对

HSCs和肝纤维化的影响目前尚不清楚。本研究拟通过考察原阿片碱对人肝星状细胞HSC-LX2增殖的影响,初步探讨其对肝纤维化的作用,并从分子机制上探讨其可能的作用机制。原阿片碱的结构式见图1。

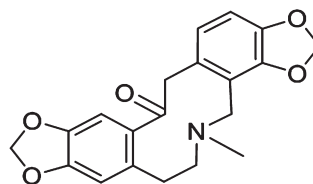


图1 原阿片碱的结构式

Fig 1 The structure of protopine

1 材料

1.1 仪器

2001HY-6003型CO₂细胞培养箱、902型-80℃冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);全波段多功能酶标仪、Universal Hood II型成像分析仪(美国 Bio-Tek 公司);PHS-25型数显台式pH计(上海越平科学仪器有限公司);CP124C型电子天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司];Centrifuge 5810R型高速冷冻离心机(美国 Eppendorf 公司);BD FACSCalibur型流式细胞仪(美国 BD 公司);TS-8型转移脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Promo Vert型倒置显微镜[成贯仪器(上海)有限公司];SW-CJ-2D型超净工作台(苏州净化设备有限公司);LDZX-50FBS型灭菌锅(上海申安医疗器械厂);DYY-6C型电泳仪(北京六一仪器厂);ZHWY-103D型恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);K30型干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司);Step One Plus™型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 Applied Biosystems 公司);XH-B型旋涡混合器(江苏康健医疗用品有限公司)。

1.2 药品与试剂

原阿片碱由廖尚高教授课题组提供,高效液相色谱法(HPLC)和核磁共振检测纯度均在95%以上;磷酸盐缓冲液(PBS粉末,无锡傲锐东源生物科技有限公司,自配,pH 7.2~7.4,质量浓度:11.74 μ g/mL);RPMI-1640培养基、0.25%胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号:8117293、1967534);胎牛血清(美国 ScienCell 公司,批号:23954);

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒、RIPA细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)蛋白酶抑制剂、二甲基亚砜(DMSO,细胞培养级)、MTT试剂、二喹啉甲酸(BCA)法蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:20180913、20180328、20180327、1213C0342、804W054、20180619);SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(批号:Apr-23D)、一抗、二抗稀释液(碧云天生物技术有限公司,批号:061218181026、091018181015);磷脂结合蛋白(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(上海七海复泰生物科技有限公司,批号:20180906);Trizol试剂(美国Ambion Life Technologies公司,批号:101002);RNA提取试剂盒(江苏康为世纪生物科技有限公司,批号:50250);PCR扩增试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:7E220E8);免疫印迹化学发光(ECL)试剂(美国Millipore公司,批号:1722101); α -SMA兔单克隆抗体、Collagen III兔单克隆抗体、MMP-2兔单克隆抗体(美国Abcam公司,批号:5368、17673、1184);Collagen I兔多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:10423R);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(美国Affinity公司,批号:S0001、AF7021);甲醇、乙醇、DMSO(天津市风船化学试剂科技有限公司,分析纯);水为双蒸水; α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2、TIMP-1引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 细胞

HSC-LX2细胞购自美国Millipore公司。

2 方法

2.1 原阿片碱溶液的制备

用DMSO溶解原阿片碱,制成浓度为100 mmol/L的母溶液(现配现用),0.22 μ m的微孔滤膜滤过除菌。

2.2 细胞培养

HSC-LX2细胞使用含有10%胎牛血清及100 u/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的1640高糖培养基于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,每24 h换一次液,待细胞融合至80%~90%时传代培养,取对数生长期细胞用于试验。

2.3 MTT法检测HSC-LX2细胞的增殖抑制率

取对数生长期的HSC-LX2细胞,以0.2%胰蛋白酶消化,以离心半径4 cm(下同)、1 000 r/min离心5 min,收集细胞,用含10%胎牛血清1640培养液混悬细胞,以 5×10^4 mL⁻¹的密度接种于96孔细胞培养板中,每孔100 μ L,边缘用200 μ L无菌的PBS填充以防干燥,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中放置贴壁。再将HSC-LX2细胞随机分为对照组、DMSO组和不同浓度的原阿片碱组(25、50、100、200、400、500 μ mol/L),每组6个复孔。

轻轻吸弃原培养孔中的培养液,对照组加入含5%胎牛血清1640培养基100 μ L,DMSO组加入含5% DMSO的1640培养基100 μ L,原阿片碱组分别加入25、50、100、200、400、500 μ mol/L原阿片碱的含5%胎牛血清1640培养基100 μ L。药物作用24 h后,每孔分别避光加入5% MTT溶液10 μ L,轻微混匀后,于37 $^{\circ}$ C下继续孵育4 h,轻轻弃尽孔中溶液,每孔加入150 μ L的DMSO,摇床振荡10 min。在酶标仪上测定490 nm波长处的光密度(OD),计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%)=[1-(给药组平均OD值/对照组平均OD值)] \times 100%。

2.4 流式细胞术检测HSC-LX2细胞的凋亡率

取对数生长期的HSC-LX2细胞,以0.25%胰酶消化,以1 000 r/min离心5 min,收集细胞,用含10%胎牛血清1640培养液混悬细胞,以 7×10^4 mL⁻¹的密度接种于12孔细胞培养板中,每孔1 mL,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中放置贴壁。再将HSC-LX2细胞随机分为对照组和原阿片碱低、中、高浓度组,每组3个复孔。轻轻吸弃培养孔中的培养液,对照组加入含5%胎牛血清的1640培养基1 mL,原阿片碱低、中、高浓度组加入100、200、400 μ mol/L原阿片碱的含5%胎牛血清的1640培养基1 mL。药物作用24 h后,收集细胞上清,用PBS洗1次,用不含EDTA的胰蛋白酶消化为单细胞悬液,1 000 r/min离心5 min收集细胞,用PBS洗2次(2 000 r/min离心5 min),加入500 μ L的Binding Buffer悬浮细胞;按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书标记细胞,处理后待机上样,利用流式细胞术检测细胞凋亡率。

2.5 RT-PCR法检测HSC-LX2细胞中 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2、TIMP-1 mRNA表达的影响

取对数生长期的HSC-LX2细胞,按“2.4”项下方法培养、分组和加药,每孔2 mL。药物作用24 h后,用Trizol试剂提取细胞总RNA用于合成cDNA。以GAPDH为内参基因,分别对 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2、TIMP-1进行扩增,测定RNA的量及纯度。PCR反应体积为20 μ L,反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性10 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,共40个循环。扩增反应结束后,建立PCR产物的溶解曲线(65~95 $^{\circ}$ C),采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法^[18]计算 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2、TIMP-1 mRNA的相对表达量。引物序列见表1。

2.6 Western blot法检测HSC-LX2细胞中 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2蛋白表达的影响

取对数生长期的HSC-LX2细胞,按“2.4”项下方法培养、分组和加药,每孔8 mL。药物作用24 h后,加预冷后的PBS洗涤1次,加RIPA蛋白裂解液(含PMSF蛋白

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

| 引物名称 | 上游(5'-3') | 下游(5'-3') | 产物长度, bp |
|---------------|-----------------------|----------------------|----------|
| α -SMA | ACTGCCTTGGTGTGTGACAA | TTCCATGTCGTCACAGTTGG | 234 |
| Collagen I | TGGCAAAGATGGAGAGGCTG | AAACCTCTCTCGCCTCTTGC | 213 |
| Collagen III | CTTCGACTTCTCTCCAGCCG | GTAGTCTCACAGCCTTGCCT | 250 |
| MMP-2 | GGTTCAITTTGGCGGACTGTG | GGTGCTGGCTGAGTAGATCC | 170 |
| TIMP-1 | CAGTTTGTGGCTCCCTGGA | GGAAGCCCTTTTCAGAGCCT | 182 |

酶抑制剂)后于冰盒上摇晃裂解离心提取上清液, 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min, 取蛋白上清液用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行定量^[19]。加入 5×蛋白上样缓冲液, 于 100 ℃加热 5 min 变性, 然后进行 SDS-PAGE 电泳, 采用湿转法将蛋白转到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 用 5% 脱脂奶粉将膜封闭 1.5 h, TBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 10 min, 分别加入一抗[GAPDH(1:3 000)、 α -SMA 兔单克隆抗体(1:10 000)、Collagen I 兔多克隆抗体(1:1 000)、Collagen III 兔单克隆抗体(1:1 000)、MMP-2 兔单克隆抗体(1:1 000)]孵育, 4 ℃冷藏过夜。第 2 天 PVDF 膜室温孵育 15 min 后, 用 TBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 10 min, 与相应二抗[HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000)]室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 用 ECL 发光试剂盒显影, 以 Image J 1.8.0 软件分析条带的灰度值, 以目标蛋白灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值评价蛋白的相对表达量。

2.7 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析或 Dunnett's *t* 检验, 两组样本均值之间比较采用 *t* 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制率

与对照组比较, DMSO 组细胞的 OD 值无明显变化 ($P > 0.05$), 50、100、200、400、500 $\mu\text{mol/L}$ 原阿片碱组细胞的 OD 值均明显减小, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。随着原阿片碱浓度的增加, 细胞的 OD 值逐渐减小。各组 HSC-LX2 细胞增殖抑制率的结果见表 2。

3.2 细胞凋亡率

与对照组比较, 中、高浓度原阿片碱组细胞凋亡率显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。各组 HSC-LX2 细胞凋亡的散点图见图 2, 细胞凋亡率的结果见表 3。

3.3 细胞中 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2、TIMP-1 mRNA 的表达

与对照组比较, 原阿片碱低、中、高浓度组细胞中 Collagen I、TIMP-1 mRNA 相对表达量显著降低; 原阿

表2 各组 HSC-LX2 细胞增殖抑制率的结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab 2 Results of proliferation inhibition rates of HSC-LX2 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

| 组别 | OD | 增殖抑制率, % |
|-----------------------------|-----------------|----------|
| 对照组 | 0.671 ± 0.004 | |
| DMSO 组 | 0.652 ± 0.008 | 2.8 |
| 25 $\mu\text{mol/L}$ 原阿片碱组 | 0.672 ± 0.002 | 0 |
| 50 $\mu\text{mol/L}$ 原阿片碱组 | 0.625 ± 0.010* | 6.9 |
| 100 $\mu\text{mol/L}$ 原阿片碱组 | 0.545 ± 0.020** | 18.7 |
| 200 $\mu\text{mol/L}$ 原阿片碱组 | 0.441 ± 0.003** | 34.2 |
| 400 $\mu\text{mol/L}$ 原阿片碱组 | 0.343 ± 0.005** | 48.9 |
| 500 $\mu\text{mol/L}$ 原阿片碱组 | 0.309 ± 0.005** | 53.9 |

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

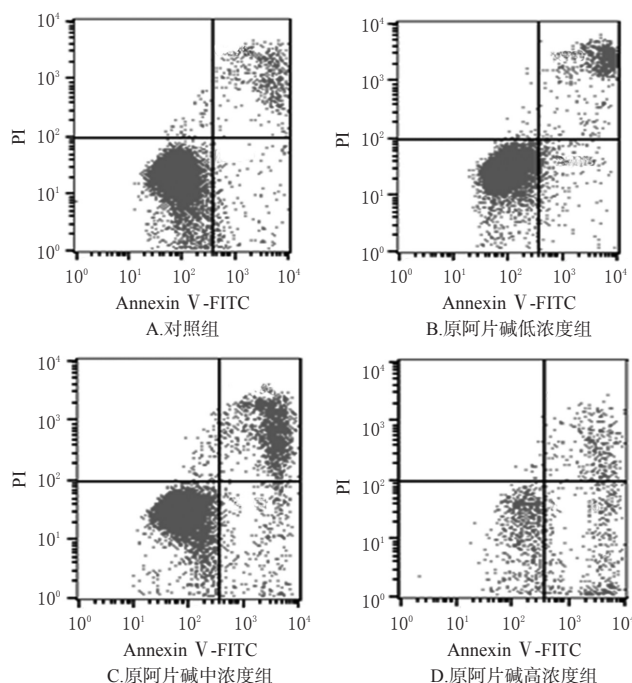


图2 各组 HSC-LX2 细胞凋亡的散点图

Fig 2 Scatter diagram of HSC-LX2 cells apoptosis in each group

表3 各组 HSC-LX2 细胞凋亡率的结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 3 Results of apoptosis rates of HSC-LX2 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 组别 | 细胞凋亡率, % |
|----------|----------------|
| 对照组 | 6.30 ± 1.36 |
| 原阿片碱低浓度组 | 10.10 ± 0.69 |
| 原阿片碱中浓度组 | 23.50 ± 1.16** |
| 原阿片碱高浓度组 | 51.66 ± 0.43** |

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. control group, ** $P < 0.01$

片碱中、高浓度组细胞中 α -SMA、Collagen III mRNA 相对表达量显著降低, MMP-2 mRNA 相对表达量显著增强, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组 HSC-LX2 细胞中 α -SMA、Collagen I、Collagen III、

MMP-2、TIMP-1 mRNA 相对表达量的结果见表4。

表4 各组 HSC-LX2 细胞中 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2、TIMP-1 mRNA 相对表达量的结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Results of mRNA relative expression of α -SMA, Collagen I, Collagen III, MMP-2 and TIMP-1 in HSC-LX2 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | α -SMA/ GAPDH | Collagen I/ GAPDH | Collagen III/ GAPDH | MMP-2/ GAPDH | TIMP-1/ GAPDH |
|----------|-------------------------|----------------------|------------------------|-----------------|------------------|
| 对照组 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| 原阿片碱低浓度组 | 0.97±0.01 | 0.74±0.06* | 0.98±0.05 | 1.06±0.06 | 0.73±0.038** |
| 原阿片碱中浓度组 | 0.85±0.02** | 0.52±0.01** | 0.77±0.03** | 1.34±0.07** | 0.67±0.02** |
| 原阿片碱高浓度组 | 0.51±0.02** | 0.49±0.01** | 0.68±0.03** | 2.30±0.15** | 0.53±0.02** |

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.4 细胞中 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2 蛋白表达

与对照组比较,原阿片碱低、中、高浓度组细胞中 α -SMA 蛋白相对表达量显著降低,MMP-2 蛋白相对表达量显著增强;原阿片碱中、高浓度组细胞中 Collagen I、Collagen III 蛋白相对表达量显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组 HSC-LX2 细胞中 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2 蛋白表达的电泳图见图3,蛋白相对表达量的结果见表5。

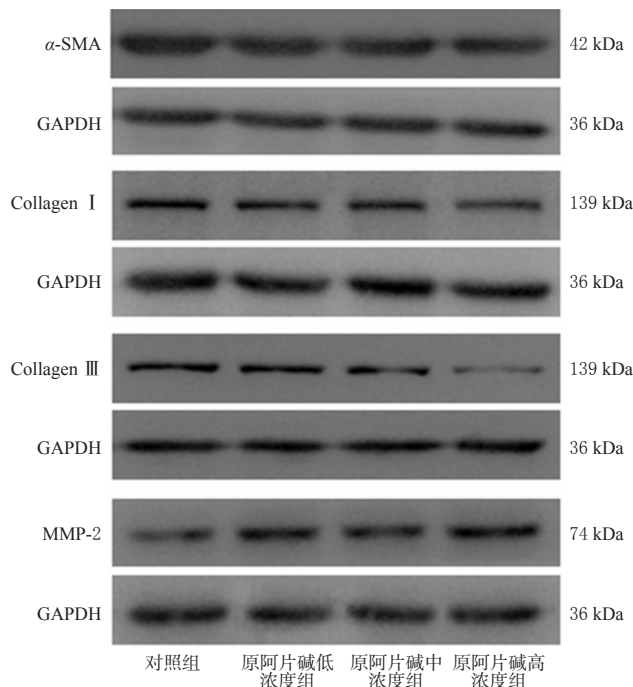


图3 各组 HSC-LX2 细胞中 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2 蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretogram of expression of α -SMA, Collagen I, Collagen III and MMP-2 protein in HSC-LX2 cells of each group

表5 各组 HSC-LX2 细胞中 α -SMA、Collagen I、Collagen III、MMP-2 蛋白相对表达量的结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 5 Results of protein relative expression of α -SMA, Collagen I, Collagen III and MMP-2 in HSC-LX2 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | α -SMA/GAPDH | Collagen I/GAPDH | Collagen III/GAPDH | MMP-2/GAPDH |
|----------|---------------------|------------------|--------------------|-------------|
| 对照组 | 0.83±0.01 | 1.13±0.05 | 1.21±0.06 | 0.57±0.02 |
| 原阿片碱低浓度组 | 0.76±0.01* | 1.01±0.06 | 1.06±0.10 | 0.69±0.03* |
| 原阿片碱中浓度组 | 0.77±0.01* | 0.88±0.03** | 0.91±0.05* | 0.76±0.02** |
| 原阿片碱高浓度组 | 0.71±0.03* | 0.66±0.09** | 0.46±0.05** | 0.99±0.02** |

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

4 讨论

肝纤维化是一种慢性、进行性、弥漫性的肝病生理现象,属可逆病变。近年来的研究发现,尽管不同病因导致肝纤维化的机制不同,但均具有一个共同点,即都有 HSCs 的参与,HSCs 是纤维化反应的重要效应器和细胞因子的主要来源和靶点^[20]。

本研究探讨了原阿片碱对 HSC-LX2 细胞增殖能力的影响,结果发现随着原阿片碱作用浓度的增加,细胞增殖抑制率和凋亡率均逐渐增加。说明原阿片碱对 HSC-LX2 细胞有增殖抑制作用和促凋亡作用。HSCs 在正常情况下处于静息状态,不表达 α -SMA,因此,在肝纤维化的发生发展中, α -SMA 的表达被认为是 HSCs 激活的指标^[21]。本研究结果显示,原阿片碱处理后显著降低了 HSC-LX2 细胞中 α -SMA mRNA 及蛋白的表达,表明原阿片碱对 HSC-LX2 细胞的活化具有抑制作用。HSCs 活化后向肌成纤维细胞转变,可分泌大量 ECM 成分,包括 Collagen I、Collagen III 等,同时大量合成、分泌 TIMPs,抑制 MMPs 活性,从而抑制 ECM 的降解,造成 ECM 产生与降解失衡,最终导致肝纤维化形成^[22-26]。本研究结果显示,经原阿片碱处理后,HSC-LX2 细胞中 Collagen I、Collagen III mRNA 及蛋白的表达降低,MMP-2 mRNA 及蛋白的表达增强,TIMP-1 mRNA 的表达降低,表明 TIMP-1 对 MMPs 的抑制得到改善,使得 ECM 的生成减少,降解增多。提示抑制 HSCs 的增殖和对 HSCs 中 ECM 的降解可能是通过 MMP-2、TIMP-1 的调节来实现的。但本研究尚无确切的证据证明原阿片碱对 TIMP-1 蛋白表达有影响,对于这个问题后期将继续探讨。

原阿片碱是从“消疤草”里分出来的单体化合物,本研究发现其对 HSC-LX2 细胞有增殖抑制作用,提示“消疤草”发挥抗肝纤维化作用的药用成分中可能有原阿片碱,此发现对临床上治疗肝纤维也有一定的参考意义。

参考文献

- [1] DUVAL F, MORENO-CUEVAS JE, GONZALEZ-GARZA MT, et al. Liver fibrosis and mechanisms of the protective action of medicinal plants targeting inflammation and the immune response[J]. *Int J Inflamm*, 2015, 20(5): 943-957.
- [2] 杨小瑜. 肝纤维化的发病机制研究进展[J]. *山东医药*, 2017, 57(11): 108-110.
- [3] SENOO H, YOSHIKAWA K, MORII M, et al. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative: past, present and future[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(12): 1247-1272.
- [4] 高强, 李旭光, 樊莉, 等. 肝纤维化发病机制的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(14): 2780-2785.
- [5] 唐勤彩, 罗和生. 大蒜素对肝纤维化防治作用研究进展[J]. *临床内科杂志*, 2018, 35(2): 138-140.
- [6] WEI S, NIU M, WANG J, et al. A network pharmacology approach to discover active compounds and action mechanisms of San-cao granule for treatment of liver fibrosis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016. DOI: 10.2147/DDDT.S96964.
- [7] BOON L, UGARTE-BERZAL E, VANDOOREN J, et al. Glycosylation of matrix metalloproteases and tissue inhibitors: present state, challenges and opportunities[J]. *Biochem J*, 2016, 473(11): 1471-1482.
- [8] ROHANI MG, PARKS WC. Matrix remodeling by MMPs during wound repair[J]. *Matrix Biol*, 2015. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.03.002.
- [9] 穆华, 张哲, 梁传栋, 等. 卡维地洛对瘦素诱导的人肝星状细胞活化增殖的影响及机制研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(19): 2620-2624.
- [10] 吴亚云, 李惠, 熊涛, 等. 消癥方预防猪血清免疫性肝纤维化的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(10): 974-976.
- [11] 吴亚云, 程明亮, 李宏, 等. 消癥方对体外 CCl₄ 损伤大鼠原代肝细胞保护作用的研究[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(9): 1139-1141.
- [12] 龙历. 贵州苗药“消疤草”预防肝纤维化及作用机理研究[D]. 贵安新区: 贵州医科大学, 2016.
- [13] 梅青, 廖尚高, 周翠琼, 等. 苗药消疤草抗肝纤维化活性成分研究[J]. *中药材*, 2019, 42(8): 1801-1805.
- [14] 郑建芳, 秦民坚. 紫萁属植物生物碱类化学成分与药理作用[J]. *现代药物与临床*, 2007, 22(2): 55-59.
- [15] 陈荃, 王廷璞, 赵兰兰, 等. 红茂草药理作用与人工栽培技术研究进展[J]. *天水师范学院学报*, 2008, 28(2): 49-52.
- [16] 邓敏, 王家富. 普洛托品的药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2001, 32(3): 275-277.
- [17] 李艳红. 原阿片碱的临床应用分析[J]. *世界最新医学信息文摘(电子版)*, 2014, 14(9): 113.
- [18] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [19] 韩富亮, 袁春龙, 郭安鹤, 等. 二喹啉甲酸法(BCA)分析蛋白多肽的原理、影响因素和优点[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(11): 202-207.
- [20] 胡焯, 张国. 肝纤维化的药物治疗研究进展[J]. *实用肝脏病杂志*, 2016, 19(1): 8-11.
- [21] 韦洪元, 唐秀能, 黄仁彬. 中草药黄酮类化合物治疗肝纤维化分子信号通路的研究进展[J]. *中国药房*, 2019, 30(6): 842-846.
- [22] CHEN RJ, WU HH, WANG YJ. Strategies to prevent and reverse liver fibrosis in humans and laboratory animals[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(10): 1727-1750.
- [23] 杜航航, 张恒术. 秋水仙碱对人瘢痕疙瘩成纤维细胞 MMP-1、MMP-2 表达的影响[J]. *中国烧伤创疡杂志*, 2018, 30(1): 48-54.
- [24] 曹媛, 夏延哲, 陈杰, 等. 五味子甲素在人肝星状细胞中的抗纤维化作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2016, 21(8): 878-883.
- [25] 谭勤锐, 李晖, 杨琪, 等. 基质金属蛋白酶及其特定抑制剂在肝纤维化形成中的作用研究进展[J]. *山东医药*, 2017, 57(34): 115-117.
- [26] WANG F, LIU S, DU T, et al. NF- κ B inhibition alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via suppression of activated hepatic stellate cell[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(1): 95-99.

(收稿日期: 2019-08-06 修回日期: 2019-10-18)

(编辑: 邹丽娟)

《中国药房》杂志——中文核心期刊, 欢迎投稿、订阅