

具有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] 刘红英,张 刹,曾文良. 尼美舒利逆转人胃癌细胞耐药的实验研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(3): 197 - 201.
- [2] RATNASINGHE D, DASCHNER P J, ANVER M R, *et al.* Cyclooxygenase-2, Pglycoprotein-170 and drug resistance: is chemoprevention against multidrug resistance possible?

- [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(30): 2147 - 2177.
- [3] SAWICKA M, KALINOWSKA M, SKIERSKI J, *et al.* A review of selected antitumour therapeutic agents and reason for multidrug resistance occurrence [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 55(9): 1057 - 1081.
- [4] MATTEM J, KOOMAGI R, VOLM M. Expression of drug resistance gene products during progression of lung carcinomas[J]. *Oncology Reports*, 2002, 9: 1181 - 1184.

三七总苷对体外培养细胞胶原合成模型的影响

薛 青¹, 薛绍礼², 汪亚松², 张 菁³, 王 怡², 夏觅真²

(1. 首都医科大学宣武医院 2003 级, 北京 100053; 2. 安徽医科大学医学生物工程教研室, 合肥 230032; 3. 安徽医科大学生物技术专业 2002 级, 合肥 230032)

[摘要] 目的 建立体外培养细胞胶原合成模型并研究三七总苷对胶原合成的影响。方法 用不同浓度和比例的新生牛血清和大鼠血清混合, 筛选刺激 HSC-T6 细胞胶原合成的最佳条件, 继而用³H-Proline 掺入法研究三七总苷对其胶原合成的影响。结果 10% 新生牛血清加 3% 大鼠血清为刺激 HSC-T6 细胞胶原合成最佳培养条件。培养 48 和 72 h 后, 0.01, 0.05, 0.25, 1.00 和 1.25 mg · mL⁻¹ 浓度的三七总苷对 HSC-T6 细胞胶原合成有明显的抑制作用 ($P < 0.05$); 并呈剂量效应关系和时间效应关系, 方差分析, F 分别为 4.517 和 5.832 (均 $P < 0.05$)。结论 成功建立了体外培养细胞胶原合成模型, 三七总苷对细胞胶原合成有明显抑制作用。

[关键词] 三七总苷; 肝星状细胞; 胶原合成

[中图分类号] R286; R965

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2008)05-0517-03

Effect of PNS on Collagen Synthesis in HSC-T6 Cells

XUE Qing¹, XUE Shao-li², WANG Ya-song², ZHANG Jing³, WANG Yi², XIA Mi-zhen² (1. Grade 2003, Xuanwu Hospital, Capital Medical Science University, Beijing 100053, China; 2. Department of Medical Biotechnology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 3. Grade 2002, Specialty of Biological Technology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

ABSTRACT Objective To establish a model of collagen synthesis *in vitro* and to probe the effect of PNS on that.

Methods HSC-T6 cells were incubated with the mixed sera containing different concentrations of NBS and rat sera, so as to establish a mixed sera-driven collagen synthesis model. PNS was studied on the collagen synthesis model by ³H-Proline incorporation method. **Results** 10% NBS with 3% rat serum was the best condition for stimulating the collagen synthesis in HSC-T6 cells. After 48 and 72 hours' incubation, 0.01, 0.05, 0.25, 1.00 and 1.25 mg · mL⁻¹ PNS significantly suppressed the collagen synthesis in HSC-T6 cells ($P < 0.05$) in a concentration and time dependent manner ($F = 4.517$ and 5.832, $P < 0.05$). **Conclusion** A mixed sera-driven collagen synthesis model has been successfully established, and PNS markedly inhibits collagen synthesis in HSC-T6 cells.

KEY WORDS PNS; HSC-T6 cell; Collagen synthesis

肝纤维化是一切慢性肝病的共同病理学基础, 是形成肝硬化的必经病理阶段。目前肝纤维化发生机制

的研究已深入到细胞生物学和分子生物学水平。大量资料表明, 肝星状细胞(HSC)的活化是肝纤维化发生的细胞学基础, 是各种病因肝纤维化发生的共同中心环节, 活化的 HSC 也是合成细胞外间质(ECM)的主要细胞^[1,2]。

近年来, 中药抗肝纤维化的研究取得了较大进展^[3], 文献表明, 三七总苷(PNS)具有明显减轻肝细胞坏死、促进肝细胞修复再生、抑制肝组织中成纤维细

[收稿日期] 2007-08-21

[作者简介] 薛 青(1985 -), 女, 江苏涟水人, 在读硕士, 主要从事临床诊治和研究工作。电话: (0)13811185203, E-mail: pippak@sina.com。

[通讯作者] 薛绍礼(1962 -), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事医学生物工程和生物医药研究。电话: 0551 - 5161238, E-mail: xuesl@sina.com。

胞及胶原纤维增生,抑制肝脏胶原纤维合成及沉积作用,具有抗肝纤维化作用^[4,5]。

以往的研究大都在实验肝纤维化动物模型进行^[3,5]。由于体外培养细胞在药物研究中有许多优点,近期开始有用体外培养正常大鼠肝星状细胞进行研究的个别报道^[4]。传代细胞在经济性、方便性、易标准化、可控性和重复性等方面有原代细胞无可比拟的优点,因此,笔者在本实验中建立体外传代肝星状细胞胶原合成模型,研究 PNS 对模型细胞胶原合成的影响,从细胞水平上探讨三七抗纤维化的作用及其机制,同时为研究其他抗肝纤维化药物建立了一个简便、客观、经济、实用的体外研究方法。

1 材料与方法

1.1 细胞株 永生化大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 为本室冻存。

1.2 药物与试剂 三七总苷购自黑龙江珍宝岛公司(批号:050505)。超级新生牛血清(NBS)购于杭州四季青生物工程材料有限公司(批号:060912),经 56 ℃ 灭活、分装,保存于 -20 ℃ 备用;大鼠血清为健康大鼠股动脉放血、凝血、离心获得,经 0.22 μm 滤膜过滤除菌、分装,保存于 -20 ℃ 备用。³H-Proline 购自中国原子能研究院同位素研究所(批号:2004-1),比活性为 37 MBq · mL⁻¹。RPMI1640、胰蛋白酶、DMSO 和 MTT 等均为进口试剂。

1.3 传代肝星状细胞胶原合成模型的建立

1.3.1 细胞接种及其同步化 将 HSC-T6 用 5% NBS 的 RPMI 1640 培养基稀释成 5 × 10⁴ · mL⁻¹ 的浓度,接种于 96 孔板,每孔 100 μL,5% 二氧化碳条件,37 ℃ 培养过夜。用不完全 RPMI 1640 培养基同步化培养 24 h,分别按下述“1.3.2”“1.3.3”和“1.3.4”分组换液。

1.3.2 不同 NBS 浓度的胶原合成组 培养基为含终浓度分别为 10.00%, 11.60%, 13.10%, 16.30% 和 22.50% 的 RPMI 1640。

1.3.3 混合血清胶原合成组 培养基为含 10% NBS 加终浓度分别为 0.00%, 1.60%, 3.10%, 6.30% 和 12.35% 的 RS 的 RPMI 1640。

1.3.4 对照组 培养基为无血清 RPMI 1640。

1.3.5 胶原合成试验 上述 3 组换液 24 h 后每孔加 7.4 kBq 的³H-脯氨酸,继续培养 48 h,用 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞于用 10% 三氯醋酸预湿的 49 型玻璃纤维滤膜上。滤膜用 0.9% 氯化钠溶液洗数次,置于 80 ℃ 干烤 6 h,置于闪烁杯中,加入闪烁液(0.5% PPO 和 0.05% POPOP 的二甲苯溶液),

BECKMAN LS-6500 型液体闪烁计数仪检测,以 3 个复孔 dpm 均值表示结果。

1.4 PNS 对 HSC-T6 细胞胶原合成模型的影响 将 HSC-T6 细胞按方法“1.3.1”接种并同步化培养 24 h 后,分组换液,培养基为含 10% NBS 和 3% RS 的 RPMI 1640,继续培养。分别于终止培养前 24, 48, 72 h 每孔分别加终浓度为 0.01, 0.05, 0.25, 1.00, 1.25 mg · mL⁻¹ PNS。终止培养前 48 h,每孔加 7.4 kBq 的³H-脯氨酸,继续培养细胞,按方法“1.3.5”消化和收集细胞、检测。设 10% NBS 和 3% RS 的 RPMI 1640 对照孔,实验重复 3 次,按下式计算抑制率:抑制率(IR)(%) = [1 - (dpm_{PNS}/dpm_{Medium})] × 100%。HSC-T6 细胞胶原合成模型筛选条件见表 1。

表 1 HSC-T6 细胞胶原合成模型培养条件的筛选

		混合血清		新生牛血清	
NBS 浓度/%	RS 浓度/%	³ H-Proline dpm 值	浓度/%	³ H-Proline dpm 值	
无血清	0	5 623.8 ± 1 703.7	无血清	6 832.5 ± 472.5	
10	0	9 809.5 ± 807.0 * ¹	10.0	9 571.5 ± 1 545.3 * ^{1*2}	
10	1.6	11 606.7 ± 1 722.5 * ²	11.6	12 427.8 ± 2 322.0 * ^{1*2}	
10	3.1	13 528.3 ± 807.3 * ³	13.1	11 396.5 ± 480.2 * ^{1*3}	
10	6.3	15 131.2 ± 363.8 * ³	16.3	10 931.0 ± 1 097.3 * ^{1*3}	
10	12.5	17 305.7 ± 532.6 * ³	22.5	9 271.8 ± 2 016.7 * ⁴	

与无血清培养基比较, *¹P < 0.05, *⁴P < 0.01; 与含 10% NBS 培养基比较, *²P < 0.05, *³P < 0.01

2 结果

2.1 含 NBS 和 RS 混合血清的培养基对 HSC-T6 细胞胶原合成的刺激作用 明显优于等血清的 NBS 组 RS 在 12.5% ~ 3.1% 范围内呈浓度依赖性,故实验选择用 10% NBS 加 3% RS 的 RPMI 1640 培养基培养 HSC-T6 细胞,作为细胞胶原合成模型。

2.2 PNS 对 HSC-T6 细胞胶原合成模型的影响 PNS 对 HSC-T6 细胞胶原合成模型有抑制作用,与对照组相比,培养 24 h,不同浓度 PNS 组均差异无显著性;培养 48 和 72 h 后,各浓度 PNS 组均差异有显著性或极显著性(均 P < 0.05 或 P < 0.01)。从 dpm 值看,随着作用时间的延长,胶原合成抑制作用相应增强,经单因素方差分析, F = 5.832, P < 0.05;随着 PNS 浓度的增加,胶原合成抑制作用也相应增强,经单因素方差分析, F = 4.517, P < 0.05。从抑制率也可以看出,随着作用时间和 PNS 浓度的增加,抑制率呈逐渐增加的趋势,见表 2。

3 讨论

胶原是一类结构和组成都特殊的蛋白,虽然胶原

表 2 ^3H - Proline 掺入法检测 PNS 对 HSC 细胞胶原合成的抑制作用 $\bar{x} \pm s, n = 3$

组别与浓度/ (mg · mL ⁻¹)	24 h		48 h		72 h	
	dpm 值	IR/%	dpm 值	IR/%	dpm 值	IR/%
0.01	16 196.5 ± 996.2	9.88	12 210.7 ± 483.8 ^{*1}	25.31	12 064.0 ± 591.7 ^{*1}	23.34
0.05	15 953.2 ± 796.3	11.23	12 609.5 ± 476.1 ^{*1}	22.88	12 399.1 ± 783.1 ^{*1}	21.21
0.25	15 934.1 ± 233.5	11.34	12 131.1 ± 473.8 ^{*1}	25.80	9 960.0 ± 529.1 ^{*2}	35.21
1.00	15 896.5 ± 746.7	11.55	12 074.1 ± 285.6 ^{*1}	26.15	9 123.2 ± 863.5 ^{*1}	42.03
1.25	15 442.4 ± 688.3	14.08	11 733.9 ± 400.1 ^{*1}	28.23	9 103.1 ± 460.2 ^{*2}	42.16
对照组	17 972.2 ± 1 439.8	-	16 349.6 ± 1 433.0	-	15 737.3 ± 70.7	-

与对照组比较, ^{*1} $P < 0.05$, ^{*2} $P < 0.01$

蛋白有多种,但各种胶原分子的氨基酸组成有一个共同的特征,即甘氨酸占胶原氨基酸残基的 30%,脯氨酸占 25%,还存在胶原特有的、占相当比例的羟脯氨酸和羟赖氨酸^[6]。检测细胞增殖也可以用氨基酸掺入法,但一般用 ^3H -亮氨酸掺入法。因为胶原分子组成的特殊性,用 ^3H -脯氨酸掺入法检测胶原合成是可行的,结果客观可信。因细胞增殖而影响其结果的可能微乎其微,完全可以忽略不计。所以所建立的细胞体外胶原合成模型及其研究方法可以作为抗肝纤维化,尤其是作用于肝星状细胞或其他相关细胞的胶原合成这个环节的药物的通用研究方法。

本实验结果显示,通过新生牛血清和大鼠血清不同比例和浓度的组合,筛选出最佳培养条件,建立了混合血清体外培养细胞胶原合成模型。

用所建立的混合血清体外培养细胞胶原合成模型,研究了 PNS 对 HSC 细胞胶原合成的抑制作用,结果显示, PNS 对 HSC 细胞胶原合成有明显的抑制作用,而且在实验浓度和时间范围内呈剂量效应关系和时间效应关系。笔者曾经建立了 HSC 细胞增殖模型并研究了 PNS 对 HSC 细胞增殖模型的影响,实验证明 PNS 明显抑制 HSC 细胞增殖,综合本实验结果, PNS 不仅抑制 HSC 细胞增殖,而且抑制 HSC 细胞胶原合成。

肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化的必经途径,其实质是肝内 ECM 的合成和降解失去平衡,导致 ECM 尤其是胶原的过度沉积和分布异常。尽管几种肝脏细胞均能合成 ECM,但目前一致认为,激活的 HSC 为肝纤维化时产生各种 ECM 成分的主要细胞群。肝损伤过程中, HSC 发生表型转变,获得肌成纤维细胞特性,增加胶原合成和细胞收缩性。这些活化的 HSC 在肝损伤部位移行、增殖,使肝脏炎症永久化并在纤维性瘢痕形成中发挥关键作用,它是肝纤维化形成过程

中的中心环节。

以往的临床应用,以及动物试验和原代肝星状细胞试验都报道三七和 PNS 有抗肝纤维化和肝硬化效果,本实验通过建立的传代细胞胶原合成模型也证实了这点,而且至少是通过抑制星状细胞增殖和胶原合成这两种途径抗肝纤维化。

在药效和药物敏感试验中,与动物试验相比,细胞模型具有很多优势。所以如果条件许可、实验可行,此类试验一般首先在细胞上进行。而与原代细胞相比,传代细胞因为可以随时随地冻存、转运、复苏,不受动物来源、时间等限制,不需要经过复杂繁琐的制备过程,具有经济、方便、快捷、易于标准化、重复性好等优点,所以一般此类试验尽可能选用传代细胞进行。本实验所建立的传代体外培养细胞胶原合成模型及其 PNS 抑制胶原合成试验,不仅从细胞水平证实了 PNS 抗肝纤维化和肝硬化的效果及其机制,而且对其他抗肝纤维化和肝硬化药物研究及其类似的实验都有重要的参考意义和实用价值。

[参考文献]

- [1] IREDAL J P. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(1): 43-45.
- [2] 武凡, 张树三, 康格非. 三七苷对肝纤维化大鼠分泌型磷脂酶 A2 和肿瘤坏死因子表达的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(1): 51-52.
- [3] 王伟芹, 尹常健. 中药抗肝纤维化作用机制研究近况[J]. *山东中医药大学学报*, 2003, 27(1): 75-78.
- [4] 熊磊, 刘平, 谭英姿, 等. 三七总苷对肝星状细胞增殖及胶原生成的影响[J]. *中西医结合肝病杂志*, 1999, 9(3): 19-21.
- [5] 张荣华, 周子成, 洪多伦, 等. 三七抗肝纤维化的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2000, 22(4): 307-309.
- [6] 查锡良. *医学分子生物学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 311.