

醉鱼草苷 IV 对大鼠肝星状细胞增殖、活化的影响

陈月圆, 李典鹏, 黄永林, 卢凤来, 刘金磊, 文永新*

(中国科学院广西植物研究所 广西植物功能物质研究
与利用重点实验室, 广西 桂林 541006)

[摘要] 目的: 观察醉鱼草苷 IV 对大鼠贮脂细胞株(HSC-T6)增殖及活化的影响。方法: 用不同质量浓度的醉鱼草苷 IV 处理 HSC-T6, 采用噻唑蓝(MTT)法测定醉鱼草苷 IV 对 HSC-T6 增殖的影响。采用 20, 14, 9.8, 6.86 mg·L⁻¹ 醉鱼草苷 IV 干预细胞 24 h, 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测 I 型胶原(Col-I), III 型胶原(Col-III) mRNA 的表达; Annexin V/PI 双染色法结合流式细胞术检测醉鱼草苷 IV 对 HSC-T6 凋亡的影响。结果: 醉鱼草苷 IV 可显著抑制 HSC-T6 的增殖, 且呈明显的量效关系。醉鱼草苷 IV (6.86 mg·L⁻¹) 对 HSC-T6 Col-III mRNA 表达具有显著的抑制作用($P < 0.05$); 醉鱼草苷 IV (9.8 mg·L⁻¹) 对细胞分泌羟脯氨酸(Hyp)和 HSC-T6 Col-I mRNA 表达具有显著的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$) 及对 HSC-T6 具有显著的诱导凋亡作用($P < 0.01$), 从而达到抗肝纤维化的作用。结论: 醉鱼草苷 IV 可体外抑制 HSC-T6 的增殖和活化, 对肝纤维化有潜在的干预作用, 其机制可能与抑制贮脂细胞增殖及细胞外基质的合成有关。

[关键词] 肝纤维化; 醉鱼草苷 IV; 贮脂细胞; 增殖

[中图分类号] R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0203-04

Effects of Buddlejasaponin IV on Proliferation and Activation of Hepatic Stellate Cells

CHEN Yue-yuan, LI Dian-peng, HUANG Yong-lin, LU Feng-lai, LIU Jin-lei, WEN Yong-xin*

(Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization,
Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese
Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of buddlejasaponin IV on proliferation and activation of rat hepatic stellate cell line HSC-T6. **Method:** HSC-T6 cells was incubated with buddlejasaponin IV at different concentrations (20, 14, 9.8, 6.86 mg·L⁻¹) for 24 hours. Effect of buddlejasaponin IV on proliferation of HSC-T6 was observed by MTT assay. Col-I and Col-III mRNA expressions were assayed by reverse transcription ploymerase chain reaction (RT-PCR) after incubation. Apoptosis of HSC-T6 was detected by Annexin V/PI staining combined with flow cytometry method. **Result:** Buddlejasaponin IV could inhibit HSC-T6 cell proliferation, in a dose-and time-dependent manner. Buddlejasaponin IV with 6.86 mg·L⁻¹ inhibited Col-III mRNA expression ($P < 0.05$). Buddlejasaponin IV with 9.8 mg·L⁻¹ decreased Hyp secretion, inhibited Col-I mRNA expression ($P < 0.05$) and induced apoptosis significantly ($P < 0.01$), so as to achieve the effect of anti-hepatic fibrosis. **Conclusion:** Buddlejasaponin IV could interfere liver fibrosis via inhibiting proliferation and activation of HSC-T6 cells and inhibiting the synthesis of extracellular matrix.

[Key words] hepatic fibrosis; buddlejasaponin IV; hepatic stellate cells; proliferation

[收稿日期] 20110228(005)

[基金项目] 广西植物研究所科学研究基金(桂植业 09009, 11011); 桂林市科学研究与技术开发计划项目(20110201)

[第一作者] 陈月圆, 硕士, 助理研究员, 从事天然产物化学与药理活性研究, Tel: 18777395158, E-mail: chyy@gxib.cn

[通讯作者] * 文永新, 研究员, 从事天然产物化学与药理活性研究, Tel: 15878396799, E-mail: wyx@gxib.cn

醉鱼草苷 IV (buddlejasaponin IV) 是一个具有 Δ^{11} -13,28-环氧齐墩果烯型活性结构的三萜皂苷。韩国学者从国外特有植物 (*pleurospermum kamtschaticum*) 中分离得到了醉鱼草苷 IV, 同时研究了其在抑制一氧化氮 (NO)、前列腺素 E2 (PGE2) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 因子方面具有显著抗炎效果, 也发现在醋酸扭体、热板致痛有明显镇痛作用^[1]。此外, 该团队也采用 poloxamer-407, Triton WR-1339, 高胆固醇饮食等作为诱导剂, 醉鱼草苷 IV 具有显著的抑制高胆固醇血症和高脂血症, 其效果与普罗布考相当^[2]。资料表明, 具有同样的 13,28-环氧-齐墩果烯型结构的柴胡皂苷 a, d 具有显著的抗炎作用和降低血清胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG) 作用^[3], 也有研究报道柴胡皂苷 a 有抑制肿瘤细胞增殖的活性^[4]。文献表明皂苷糖链结构与生物活性有密切关系, 皂苷糖链部分的结构包括单糖组成、数目、连接方式等直接影响皂苷的生物活性, 醉鱼草苷 IV 且比柴胡皂苷 a 多了一个糖, 因此预测醉鱼草苷 IV 可能具有较好生物活性。2007 年 Elsharkawy 和 Mann 提出肝脏炎症 \rightarrow 纤维化 \rightarrow 癌 (IFC) 轴线分子生物研究, 认为肝细胞受损后致凋亡和坏死 \rightarrow 枯否细胞活化, 产生大量 TNF- α 、白细胞介素 (IL)-6 等炎症因子 \rightarrow 肝星状细胞 (HSC) 活化, 加重肝细胞的损伤, 肝细胞损伤后可促进肿瘤的发生, 核因子 κ B 从转录水平调节 IFC 轴线^[5]。但关于醉鱼草苷 IV 在抗肝纤维化药理活性, 对肝纤维细胞的增殖活性干预作用未见报道。因此, 本研究将观察其对体外培养的大鼠肝星状细胞 (HSC-T6) 增殖及胶原分泌的影响, 探索其抗肝纤维化的药理活性, 为开发醉鱼草苷 IV 提供药理实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 HSC-T6 细胞株, 由广西医科大学姜海行教授馈赠。

1.2 药物与试剂 秋水仙碱 (昆明制药有限公司, 批号 20050901), 醉鱼草苷 IV (纯度大于 99.8%) 由本课题组从风轮菜属植物中分离制备, 通过波谱方法 (^1H 和 ^{13}C NMR) 并与文献^[5]对照确定其结构为醉鱼草苷 IV, DMEM 培养基 (Gibco 产品, 批号 13200-035), 胎牛血清 (Hyclone 产品, 批号: NTM0133), 噻唑蓝 (MTT) (Sigma 公司, 批号 3544B04), FBS (Gibco 产品, 批号 16000-036), 乳酸脱氢酶 (LDH) 测试盒 (批号 2007090) 和羟脯氨酸

(Hyp) 测试盒 (南京生物工程研究所, 批号 2007102), Annexin V 凋亡试剂盒 (Biovision 公司, 批号 081104)。

1.3 仪器 CO_2 培养箱 (美国 Thermo), 高速冷冻离心机 (美国 Thermo), 相差倒置显微镜 (德国 Zeiss); 酶标仪 (美国 Thermo); PCR 仪 (美国 Bio-Rad); 核酸蛋白测定仪 (日本岛津), 凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad), 低压电泳仪 (美国 Bio-Rad); Epica-XL II 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter)。

2 方法

2.1 细胞培养 将冷冻保存于超低温冰箱中的 HSC-T6 复苏后接种于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中, 37°C , 5% CO_2 条件下培养。倒置显微镜下观察细胞, 待细胞生长状态良好, 并且细胞密度在 $1 \times 10^9/\text{L}$ 以上时, 0.25% 胰蛋白酶消化后传代。每次试验均在呈指数生长的细胞种进行。

2.2 醉鱼草苷 IV 对细胞增殖的影响 将细胞生长状态良好, 并且细胞密度在 $1 \times 10^9/\text{L}$ 以上的培养瓶中的细胞接种在 96 孔板中, 接种密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 每孔 200 μL , 设正常对照组, 在加入含醉鱼草苷 IV 40, 20, 10, 5, 2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DMEM 培养液中培养 24 h 后, 各组 HSC-T6 (每个浓度设 5 个复孔, 重复 5 次) 中加入 MTT 20 μL , 继续培养 4 h 后, 弃上清液, 加入 DMSO 100 μL , 微量振荡器上振荡 5 min, 上酶标仪于双波长 (570 nm, 630 nm) 处测吸光度 (A)。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.3 醉鱼草苷 IV 及阳性药的配制 以 MTT 法得出的小于 20% 抑制率的药物浓度为基础, 以 0.7 倍稀释, 将醉鱼草苷 IV 配成 4 个质量浓度 20, 14, 9.8, 6.86 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为给药浓度, 阳性药秋水仙碱 6.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 对细胞上清液中乳酸脱氢酶、羟脯氨酸含量的影响 将 HSC 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 12 孔板, 培养 12 h 后, 换含 20, 14, 9.8, 6.86 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 醉鱼草苷 IV 及 6.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙碱的培养液, 每个浓度设 4 个复孔。继续培养 24 h 后, 吸取上清液, 采用 LDH、Hyp 测试盒测定上清液中 LDH、Hyp 含量。

2.5 RT-PCR 法检测 Col-I, Col-III mRNA 的表达 相关引物均由上海生工公司合成, 各引物序列分别为 β -actin 的 FP: 5'-AACCCTAAG GCCAA CCGTGAAAAG-3', RP': 5'-TCATGAGG TAGTCTG TCAGGT-3'; 产物长度 240 bp; Col-I 的 FP: 5'-TG CCGTGACCTCAAGATGTG-3', RP: 5'-CACAAAGCGTC

CTGTAGGTGA-3',产物长度:462 bp; Col-Ⅲ的 FP: 5'-AGGGCAGGGAACAAC-3', RP: 5'-ACCCATTCCT CCGACT-3',产物长度:595 bp。

①将细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 50 mL 培养瓶中,分为空白对照组、秋水仙碱阳性组、单体药 20, 14, 9.8, 6.86 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组,每组 3 瓶。12 h 后,细胞贴壁生长良好。换含各药物的培养液,继续培养 24 h。

②采用 Trizol 法抽提细胞中总 RNA。用核酸蛋白测定仪测定 RNA 含量及纯度, A_{260}/A_{280} 均在 1.8 ~ 2.0。

③RNA 电泳,考察 RNA 完整性, RNA 完整性良好。

④计算 RNA 含量,并取 RNA 2 μg ,采用 M-MuLV 逆转录酶将其逆转录成 cDNA。⑤以 β -acting 为内参, PCR 扩增 cDNA,条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,各自退火温度(Col-I 为 55 $^{\circ}\text{C}$; Col-Ⅲ 为 54 $^{\circ}\text{C}$) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 总共 35 个循环。⑥所有 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳后,凝胶成像系统拍照, Quantity One 软件测定灰度值。

2.6 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡 将传代的 HSC 接种于 50 mL 培养瓶中,接种密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,培养 12 h 后,细胞贴壁生长良好。实验设空白对照组、秋水仙碱阳性组(6.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、实验组(20, 14, 9.8, 6.86 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),换含各药物的培养液,继续培养 24 h。生长至 80% 以上融合度时,先弃去培养基, PBS 液冲洗两次,加 100 μL 结合缓冲液重悬,轻轻混匀细胞后,加 5 μL 异硫氰酸荧光素(FITC)-磷脂结合蛋白 V(Annexin V)染料染色 20 ~ 30 min, 5 μL 碘化丙啶(PI)燃料染色 5 min,加入适量结合缓冲液,调整细胞浓度到 $1 \times 10^5/\text{mL}$,采用流式细胞仪检测。激发波长 488 nm,发射波长 530 nm。结果判定标准为:所得流式图中的左上象限(第一象限)为无意义的部分,右上象限(第二象限)代表死亡细胞与 annexin V 和 PI 都结合,左下象限(第三象限)代表正常细胞与 annexin V 和 PI 都不结合,右下象限(第四象限)代表凋亡细胞只与 annexin V 结合。

2.7 统计学分析 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 HSC-T6 细胞增殖的影响 研究发现,醉鱼草苷 IV 各剂量组与 HSC-T6 细胞作用 24 h,均可不

同程度地抑制 HSC-T6 的增殖,呈明显的量效关系。其中, 80, 40, 20, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 A 均数与空白对照组比较有显著的抑制作用。见表 1。

表 1 醉鱼草苷 IV 对 HSC-T6 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	药物剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞增殖/A	抑制率/%
醉鱼草苷 IV	80	0.012 \pm 0.001 ²⁾	93.3
	40	0.121 \pm 0.009 ²⁾	33.6
	20	0.149 \pm 0.017 ²⁾	18.2
	10	0.163 \pm 0.015 ¹⁾	10.7
	5	0.182 \pm 0.010	0.44
空白对照	-	0.183 \pm 0.006	-

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

3.2 对细胞上清液中 HDL, Hyp 含量的影响 给予醉鱼草苷 IV 20, 14, 9.8, 6.86 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,细胞上清液中 LDH 含量与空白对照组比较,无统计学意义。而秋水仙碱组与空白对照组比较,具有显著性差异。醉鱼草苷 IV 20, 14, 9.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个浓度及秋水仙碱对细胞分泌 Hyp 具有显著的抑制作用,与空白组比较具有统计学意义。见表 2。

表 2 醉鱼草苷 IV 对 HSC-T6 上清液中乳酸脱氢酶、羟脯氨酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

分组	药物剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	Hyp/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
醉鱼草苷 IV	20	828.7 \pm 145.0	27.7 \pm 1.2 ²⁾
	14	704.1 \pm 69.9	28.2 \pm 2.3 ²⁾
	9.8	693.2 \pm 122.2	28.5 \pm 1.1 ²⁾
	6.86	601.3 \pm 211.3	30.4 \pm 3.9
秋水仙碱	6.25	1 582.6 \pm 341.8 ²⁾	25.6 \pm 1.5 ²⁾
空白对照	-	658.9 \pm 22.4	34.5 \pm 1.8

3.3 对 HSC-T6 Col-I, Col-Ⅲ mRNA 的影响 结果发现,①RNA 完整性良好,见图 1;②与空白对照组比较,单体药 20, 14, 9.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组及秋水仙碱组对 HSC-T6 Col-I mRNA 表达具有显著的抑制作用

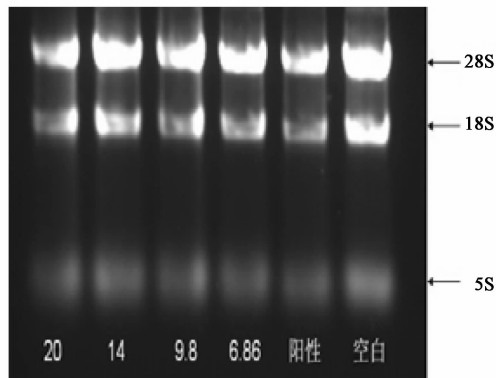


图 1 RNA 完整性检测

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 单体药 20, 14, 9.8, 6.86 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组及秋水仙碱组对 HSC-T6 Col-III mRNA 表达具有显著的抑制作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

3.4 单体药对 HSC-T6 凋亡的影响 醉鱼草苷 IV 20, 14, 9.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单体药及秋水仙碱对 HSC-T6 具有显著的诱导凋亡作用, 6.86 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单体药对细胞凋亡的影响不具有统计学意义。见表 4。

表 3 醉鱼草苷 IV 对 HSC-T6 细胞 Col-I, Col-III mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Col- I	Col-III
醉鱼草苷 IV	20	0.60 \pm 0.05 ²⁾	0.06 \pm 0.01 ²⁾
	14	0.64 \pm 0.04 ²⁾	0.61 \pm 0.02 ²⁾
	9.8	0.74 \pm 0.02 ¹⁾	0.78 \pm 0.03 ¹⁾
	6.86	0.84 \pm 0.02	0.85 \pm 0.02 ¹⁾
秋水仙碱	6.25	0.59 \pm 0.02 ²⁾	0.41 \pm 0.02 ²⁾
空白对照	-	0.85 \pm 0.04	0.84 \pm 0.01

表 4 醉鱼草苷 IV 对 HSC-T6 凋亡的影响

分组	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	各细胞状态所占比例/%			
		-	死亡	正常	凋亡
醉鱼草苷 IV	20	0.71	3.22	79.88	16.19 ²⁾
	14	2.20	4.18	82.10	11.52 ²⁾
	9.8	5.64	1.85	91.12	1.39 ²⁾
	6.86	4.42	1.36	93.59	0.63
秋水仙碱	6.25	1.48	5.74	77.19	15.59 ²⁾
空白对照	-	4.21	0.82	94.40	0.57

4 讨论

当前, 临床虽然已有一些治疗肝纤维化的中西药物, 但疗效还不够理想, 而且有些药物副作用较大, 费用较高。所以国内外的研究者都在努力寻找疗效确切、价格低廉、毒副作用小的防治肝纤维化药物, 以便能阻止和逆转肝纤维化的进程, 最终治愈大多数慢性肝病。本实验从细胞分子水平发现醉鱼草苷 IV 能有效地抑制 HSC-T6 的生长, 且呈明显的量效关系, 通过乳酸脱氢酶法评价醉鱼草苷 IV 对 HSC-T6 的毒性, 发现给药剂量浓度的单体药对细胞

无毒性, 而阳性对照秋水仙碱毒性较大; 通过消化法测定 HSC-T6 上清液中羟脯氨酸含量, 发现单体药可抑制 HSC-T6 的 Hyp 分泌; 通过 RT-PCR 法测定 HSC-T6 的 I, III 型胶原蛋白 mRNA 表达, 发现单体药可抑制 HSC-T6 的 I, III 型胶原蛋白的 mRNA 表达, 且 RNA 完整性良好, 通过流式细胞术测定单体药对 HSC-T6 凋亡的影响, 发现醉鱼草苷 IV 可诱导 HSC-T6 凋亡。由此推断, 醉鱼草苷 IV 可通过抑制 HSC-T6 细胞增殖、降低细胞 Hyp 分泌、抑制细胞 I, III 型胶原蛋白表达及诱导细胞凋亡, 从而达到抗肝纤维化的作用, 且毒性低。但肝纤维化形成是一个多因素的复杂的过程, 进一步提示醉鱼草苷 IV 具有抗肝纤维化作用。除上述作用外, 可能还有调节相关细胞活性因子、调控细胞内信号传导等作用。因此尚需进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Jong-Heon Won, Ho-Taek Im, Yang-Hee Kim, et al. Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF- κ B inactivation [J]. Bri J Pharm, 2006, 148(2): 216.

[2] Jung Hyun-Ju, Nam Jung-Hwan, Park Hee-Juhn, et al. The MeOH extract of Pleurospermum kamschaticum and its active component buddlejasaponin (IV) inhibits intrinsic and extrinsic hyperlipidemia and hypercholesterolemia in the rat [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 112(2): 255.

[3] 吴立军, 天然药物化学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 284.

[4] Wen-Sheng Wu, Heu Hsua-Yin. Involvement of p-15 and p-16 gene expression in Saikosaponin A and TPA-induced growth inhibition of HepG2 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 285(2), 183.

[5] Elsharkawy A M, Mann D A. Nuclear factor-kappa B and the hepatic inflammation—fibrosis—canceraxis [J]. Hepatology, 2007, 46(2): 590.

[责任编辑 聂淑琴]