

# 抗纤复方含药血清对 HSC-LI90 细胞基质金属蛋白酶及其抑制因子基因表达的影响

赵 钢, 王灵台, 陈建杰, 张 斌(上海中医药大学附属曙光医院肝科, 上海 200021)

**摘要:**目的: 观察抗纤复方含药血清对肝星形细胞(HSC) LI90 细胞(HSC-LI90) 基质金属蛋白酶及其抑制因子基因表达的影响。方法: 以 0.5 2.0 4.0g/kg 等不同剂量抗纤复方灌胃大鼠制备的含药血清, 作用 HSC-LI90 细胞 48h, 应用 Northern 印迹杂交的方法, 检测膜型基质金属蛋白酶-2 及其抑制因子-1(TIMP-1) 基因的表达, 并用酶图法检测基质金属蛋白酶-2 的活性。结果: 抗纤复方含药血清抑制 HSC-LI90 细胞 TIMP-1, 增加 HSC-LI90 细胞膜型基质金属蛋白酶基因表达, 对基质金属蛋白酶-2 基因表达及其活性没有影响。结论: 抗纤复方抑制 HSC-LI90 细胞 TIMP-1 基因表达水平, 促进胶原降解, 可能是抗肝纤维化的作用机制之一。

**关键词:** 抗纤复方; HSC-LI90; 基质金属蛋白酶; TIMP-1; Northern 印迹杂交; 酶图法  
中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)04-0031-03

## Effect of Anti-fibrosis Compound Contained Serum on Matrix Metalloproteinase and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Gene Expression of HSC-LI90 Cells

ZHAO Gang, WANG Ling-tai, CHEN Jianjie, ZHANG Bing  
(Shuguang Hospital, Shanghai TCM University, Shanghai 200021)

**Abstract:** Objective: To observe the in vitro effect of anti-fibrosis Compound contained (AFC) serum on matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) mRNA levels of HSC-LI90 cell. Methods: HSC-LI90 cells were exposed in different doses of AFC contained serum(0.5, 2.0 4.0g/kg) for 48 hours. The gene expressions of matrix metalloproteinase-2(MMP-2) and membrane type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and TIMP-1 were investigated by Northern blot, The gelatinase activity of MMP-2 was examined by zymography. Results: AFC contained serum could inhibit the TIMP-1 and increased the MT-MMP the gene expressions of HSC-LI90, The expressions of MMP-2 and MMP-2 activity were not affected by different doses AFC contained serum. Conclusions: AFC contained serum can decrease TIMP-1 mRNA expression of HSC-LI90 cells.

**Key words:** AFC; HSC-LI90; TIMP-1; Matrix metalloproteinase; Northern blot; zymography

抗纤复方是临床治疗肝纤维化的有效药物, 实验研究表明, 该药不仅能够抑制细胞外基质的合成, 而且能够抑制肝纤维化大鼠肝星形细胞 TGF $\beta_1$  的表达, 减少胶原产生<sup>[1,2,3]</sup>。本实验采用整体动物给药, 分离含药血清, 作用于体外培养细胞的血清药理学研究方法, 以 Northern 印迹杂交和酶图法的方法, 研究基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 及其组织抑制因子-1(TIMP-1) 和膜型基质金属蛋白酶 (membrane type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP) 基因及 MMP-2 活性的影响, 探讨抗纤复方影响肝纤维化发生发展的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 抗纤复方的制备** 抗纤复方其无菌制剂由上海中医药大学附属曙光医院制剂中心制备, 2g (生药)/ml。

**1.2 细胞系** 星状细胞系 HSC-LI90 由日本佐贺医科大学肝病中心尾崎教授惠赠, 系表型为活化的人肝星状细胞(HSC), 表达高水平的 CoL- I MMP- II、TIMP1 TGF $\beta_1$  mRNA 等<sup>[4]</sup>。

**1.3 动物** Wistar 大鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体重 300~ 350g, 制备含药血清用, 购自上海中医药大学实验动物中心。

**1.4 抗纤复方含药血清的制备** 大鼠随机分为 5 组, 每组 5 只, 其中 4 组按体重灌胃给予抗纤复方水溶液剂量依次为 0.5g/kg 体重 2.0g/kg 体重 4.0g/kg

体重,于给药后 90min 分别以 1.5% 的苯巴比妥钠腹腔注射麻醉,无菌条件下,行腹主动脉取血约 10ml,置 4℃冰箱中保存过夜,待凝血坚实,血清析出后,于高速离心机中以 3000rpm 离心 10min,取血清。另外 1 组根据体重灌胃给予蒸馏水 1.0ml/100g 体重,90min 后,同上法取血分离血清,为空白对照血清。所有血清均经 56% 30min 灭活后,置 -20℃冰箱中保存备用。

**1.5 细胞培养** 细胞是在 37℃,95% 空气,5% CO<sub>2</sub> 条件下;5% FCS,10units/ml Penicillin,100ug/ml streptomycin (GIBCO-BRL)。HSC-LI90 细胞以 1 × 10<sup>6</sup> 细胞/100mm 的浓度接种于培养皿,24h 后,分别加入 10% 抗纤复方含药血清 10ml,并设空白对照组。培养 48h 后,弃上清,收集细胞,提出总 RNA,观察 HSC-LI90 细胞 MT1-MMP MMP-2 TIMP-1 mRNA 表达。

**1.6 MT1-MMP MMP-2 TIMP-1 mRNA 的 Northern 印迹杂交** 运用 AGPC 法,从 HSC-LI90 细胞中提取总 RNA (Isogen Kit Japan)。20ug 总 RNA 加入 1% 琼脂糖凝胶中,电泳后,将变性的 RNA 转移至硝酸纤维素滤膜 (Amersham Japan) 然后用 <sup>32</sup>P-dCTP 标记的 cDNA 探针与之杂交 16h,杂交浓度 65℃ (杂交液 Amersham Japan)。0.1 × SSC,0.1% SDS,洗膜 2 次以后,放射自显影。定量用 BAS2000 (FUJISU JAPAN) 测定分析。用 MT1-MMP MMP-2 TIMP-1 与 GAPDH 的比值表示 MT1-MMP MMP-2 TIMP-1 表达水平。实验至少重复 3 次,数据用 mean ± S 表示,用单因素方差分析进行统计学处理。

含有 MT1-MMP、MMP-2、TIMP-1、GAPDH cDNA 质粒由日本 I Ozaki 教授馈赠<sup>[4]</sup>。

**1.7 酶图法检测 MMP-2 活性** HSC-LI90 细胞以 1 × 10<sup>6</sup> 细胞/100mm 的浓度接种于培养皿,24h 后,分别加入 10% 抗纤复方含药血清 10ml,并设空白对照组。培养 48h 后,取上清,用 Suprec-500 (TAKARA JAPAN) 浓缩为 100ul, -70℃ 冰箱保存,供实验用。

15ul 上清与酶谱上样缓冲液 (0.5M Tris-HCl (pH6.8), SDS, 70% 甘油, 5% (w/v) BPB) 预混,点样于最终浓度 1mg/ml 明胶的 10% 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 点样孔中,在冰水循环条件下电泳,电泳结束后,取出凝胶,洗脱后,将凝胶置于再生缓冲液 (0.05M Tris-HCl (pH7.5), 0.1M NaCl, 2.5% (w/v) Triton-100) 中,室温,缓慢振荡 1.5h,以除去 SDS。再生后的凝胶,纯水漂洗一次,浸入孵育反应液 (0.05M Tris-HCl (pH7.5), 10mM CaCl<sub>2</sub>) 中,37℃,静置 15~

18h,以考马斯亮蓝染色 15min,脱色,洗净,拍照。条带作积分光密度分析 (同济大学 TJTY-300 图象分析软件), t 检验分析。

## 2 结果

**2.1 MT1-MMP MMP-2 TIMP-1 mRNA 的变化** 抗纤复方含药血清作用 HSC-LI90 细胞 48h 后,0.5、2.0、4.0g/kg 含药血清有增加 MT1-MMP、降低 TIMP-1 mRNA 表达水平的作用,并呈一定剂量依存关系, P < 0.05 或 0.01。而 MMP-2 mRNA 的表达在抗纤复方含药血清作用前后无明显变化 (表 1)。

**2.2 MMP-2 活性** 培养上清经 10% SDS-PAGE (含 0.1% 的明胶) 电泳等处理后。酶活性表现为蓝色背景中的凝胶透亮带。HSC-LI90 细胞分泌有活性的 MMP-2,其活性成分主要在 6.2 × 10<sup>4</sup> 的位置上,抗纤复方对 HSC-LI90 分泌的 MMP-2 活性无影响 (表 2)。

表 1 抗纤复方对 MT1-MMP、MMP-2、TIMP-1 mRNA 表达的影响 (X ± S)

剂量 (mg/kg)	MT1-MMP	MMP-2	TIMP-1
0	0.543 ± 0.14	1.090 ± 0.21	1.43 ± 0.32
0.5	0.675 ± 0.18	0.962 ± 0.20	0.78 ± 0.17*
2.0	1.59 ± 0.29**	0.975 ± 0.21	0.32 ± 0.12**
4.0	1.32 ± 0.25*	1.03 ± 0.25	0.294 ± 0.15**

注:与对照组比较,\* P < 0.05; \*\* P < 0.01

表 2 MMP-2 的酶谱法定量分析

剂量 (mg/kg)	65kD	62kD
0	32.5 ± 5.2	36.6 ± 6.1
0.5	38.2 ± 4.5	40.6 ± 5.7
2.0	34.5 ± 6.3	41.7 ± 4.6
4.0	31.9 ± 5.7	40.3 ± 6.1

## 3 讨论

肝纤维化是以胶原为中心的细胞外基质 (Extracellular matrix: ECM) 在肝脏异常的沉积。这种异常的沉积,不仅仅是由于 ECM 合成的增多,更大程度是由于降解的绝对或相对减少而引起的<sup>[5]</sup>。从某种意义上而言,研究降解应较研究合成更为重要。因此,任何干预胶原合成及/或胶原降解代谢的手段,都是阻断和逆转肝纤维化和肝硬化的有效方法<sup>[10]</sup>。

在 ECM 降解过程中起主导作用的是基质金属蛋白酶 (MMPs),此外,还有它的组织抑制因子 TIMPs。星状细胞 (HSC) 是肝脏间质细胞之一,是肝纤维化时 MMPs、TIMPs 主要细胞来源<sup>[6]</sup>,如果能够促进 ECM 的降解,则有可能缓解、阻止甚至逆转肝

纤维化、早期肝硬化。

星状细胞 HSC-LI90 系表型为活化的人星状细胞, 表达高水平的 CoL- I、MMP- II、TIMP-1 mRNA 等, HSC-LI90 是体外研究肝纤维化发生机理、观察抗肝纤维化药物作用的较为理想的模型<sup>[4]</sup>。我们应用中药血清学药理研究方法观察了抗纤复方对 HSC-LI90 细胞 mRNA 表达的影响。

基质金属蛋白酶是一组多功能因子家族的主要成员之一, 它可以特异地降解各种胶原。MMP-2(IV 型胶原酶) 是特异性 IV 型胶原降解酶, 除了对 IV 型胶原外, 对层粘蛋白(LN)、纤维结合蛋白(FN) 也有一定作用<sup>[7]</sup>, 国内外越来越多的学者已经把它看作是肝纤维化发生过程中的一个非常重要的因素。Arthur 等<sup>[8]</sup> 发现, HSC 表达  $7.2 \times 10^3$  IV 型胶原酶(MMP-2) 基因, 随培养时间的延长而表达增加, 该酶以酶原和活性形式分泌, 可导致正常肝窦内皮下基质破坏。基底膜样基质降解使 HSC 活化。在肝纤维化的发生发展中起重要作用。我们的研究发现抗纤复方含药血清处理 HSC-LI90 细胞 48h 后, MMP-2 mRNA 水平无明显变化, 抗纤复方含药血清对 HSC-LI90 细胞分泌的 MMP-2 亦无影响。

膜型基质金属蛋白酶是由 Sato 等克隆鉴定的一种新的基质金属蛋白酶基因。激活的 MT-MMP·TIMP-2 复合物作为 MMP-2 的一种受体结合在 MMP-2 的受羧基端位点, 导致 MMP-2 的激活<sup>[9]</sup>。我们的 Northern 印迹杂交结果显示抗纤复方明显增加 MT-MMP 基因的表达, 理论上应该使 MMP-2 活性增加, 但实际上抗纤复方对 MMP-2 的转录及活性均无影响, 推测 MMP-2 可能存在不依赖于 MT1-MMP 的激活途径, 值得进一步探讨。

TIMP-1 是能抑制基质金属蛋白酶活性的一组多功能因子家族的主要成员之一, 能结合除 MMP-14、MMP-19 以外的所有 MMPs 而使其活性减弱, 国内外越来越多的学者已经把它看作是肝纤维化发生过程中的一个非常重要的促发因素。许多实验研究表明, 肝损伤激活 HSC, 表达 MMPs 和 TIMPs, 在肝损伤早期阶段, 体外培养的 HSC 一过性表达 MMP-3、MMP-13 等之后, HSC 表型发生变化, 前 MMP-2 和 MT-MMP 表达, MMP-2 活化, 降解局部正常的肝脏基质; 并且 TIMP-1 表达明显, 抑制间质胶原酶(MMP-1/MMP-13) 对胶原的降解。而在肝损伤停止后, TIMP-1 迅速减少, 胶原酶活性增加, 降解 ECM, 纤维逆转<sup>[10, 11]</sup>。因此, TIMP-1 在调节胶原的降解代谢中发

挥着重要的作用。我们的研究表明, 抗纤复方含药血清作用 HSC-LI90 细胞 48h 后 0.5、2.0、4.0g/kg 含药血清有降低 TIMP-1 mRNA 水平的作用, 提示抗纤复具有促进胶原降解的作用。

抗纤复方可明显降低 HSC-LI90 细胞 TIMP-1 mRNA 表达水平, 从而干预肝纤维化及肝硬化时的胶原合成、降解代谢, 发挥其抗肝纤维化的作用。

#### 参考文献:

- [1] Ling Tai wang, Bin Zhang and Jian Jie Chen. Effect of Anti-fibrosis compound prescription on collagen expression of hepatic cells of experimental liver fibrosis of rat[J]. World J Gastroentero, 2000, 12: 877-880.
- [2] 张斌, 王灵台, 陈建杰. 抗纤复方影响大鼠肝贮脂细胞生成 I、II 型胶原的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6: 33-35.
- [3] 赵钢, 张斌, 陈建杰, 王灵台. 抗纤复方对  $\alpha 1(I)$  前胶原基因启动子活性的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 29(22): 694-697.
- [4] Iwata Ozaki, Gang Zhao, Toshihiko Mizuta, et al. Hepatocyte growth factor induces collagenase via the transcription factor Ets-1 in human hepatic stellate cell line[J]. Journal of Hepatology, 2002, 36: 169-178.
- [5] Milani S, Herbst H, Schuppan D, et al. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal fibrotic human liver[J]. Am J Pathol, 1996, 144: 528-537.
- [6] 王宝恩. 肝纤维化时细胞外基质的合成与降解[J]. 中华肝病杂志, 1997, 5(2): 65.
- [7] Jose MP, Diez Itza I, Baibin M, et al: Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas[J]. J Biol Chem, 1994, 269: 16766-16773.
- [8] Arther MJ, Stanley A, Iredale JP. Secretion of 72kD type IV collagenase/gelatinase by cultured human lipocytes[J]. Biochem J, 1992, 287: 701-707.
- [9] Sato H, Takin T, Kinoshita T, et al. Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type matrix metalloproteinase[J]. FEBS LETT. 1996, 385: 238-240.
- [10] Strongin AY, Collier I, Bannikov G et al. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 5331-5338.
- [11] Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cell[J]. Semin Liver Dis, 2001, 21(3): 373.