·博士之窗·

抗纤复方对人 α_1(Ⅰ)前胶原基因启动子活性的影响*

赵　钢△　张　斌　陈建杰　王灵台

内容提要　**目的** 探讨抗纤复方(AFC)对人 α_1(Ⅰ)前胶原基因启动子活性的作用及其机制。**方法** 以含人 α_1(Ⅰ)前胶原基因上流 2.3kb,0.8kb,476bp,173bp 启动子片段为研究靶序列,以氯霉素乙酰基转移酶(CAT)为报告基因,构建基因重组质粒,转染成纤维细胞(NIH3T3),建立稳定的 α_1(Ⅰ)前胶原启动子转染细胞体系,用抗纤复方和(或)转移生长因子($TGF\beta_1$)处理 NIH3T3 细胞,测定 CAT 活性。**结果**:(1)抗纤复方能够抑制 α_1(Ⅰ)前胶原启动子报导基因质粒 phCAT-Cα_1(Ⅰ)2.3,phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.8,phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.4 的活性,不能抑制 α_1(Ⅰ)前胶原启动子报导基因质粒 phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.1 的活性;(2)$TGF\beta_1$ 能促进 phCAT-Cα_1(Ⅰ)2.3 的活性,抗纤复方能拮抗 $TGF\beta_1$ 这一促进作用。**结论** 抗纤复方能够作用于胶原 α_1(Ⅰ)基因调控片段,抑制胶原合成。

关键词　抗纤复方　胶原　启动子　转移生长因子 β_1

Effect of Anti-fibrosis Compound on Activity of Human α_1(Ⅰ) Precollagen Gene Promoter ZHAO Gang, ZHANG Bin, CHEN Jian-jie, et al *Shuguang Hospital, Shanghai TCM University, Shanghai (200021)*

Objective: To study the effect of Anti-fibrosis Compound (AFC) on activity of human α_1(Ⅰ) precollagen gene promoter (PGP-α_1) and its mechanism. **Methods**: Segments containing phCAT-Cα_1(Ⅰ)2.3, phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.8, phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.4 and phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.1 were taken as series of targets, and chloramphenicol acetyltransferase (CAT) as reporter gene, to construct gene recombination plasmid, transform into NIH3T3, and make a stable PGP-α_1 transfection cell line. It was treated by AFC and/or transforming growth factor β_1 ($TGF\beta_1$), and the CAT activity was assessed. **Results**: (1) AFC could inhibit the promoter phCAT-Cα_1(Ⅰ)2.3, phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.8, phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.4 activity, but showed no effect on phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.1 activity. (2) $TGF\beta_1$ could promote the activity of phCAT-Cα_1(Ⅰ)2.3, AFC could antagonize the promotion of $TGF\beta_1$. **Conclusion**: AFC could specifically affect the collagen α_1(Ⅰ) gene regulation segment, inhibit the synthesis of collagen.

Key words　Anti-fibrosis Compound, collagen, promoter, transforming growth factor β_1

有研究显示抗纤复方具有抑制肝星形细胞(hepatic stellate cell, HSC)和肌成纤维样细胞(myofibroblast, MFB)生长,减少胶原蛋白沉积的抗肝纤维化作用[1~3],但其机制尚不清。本研究从基因调控等分子水平,研究抗纤复方对人 α_1(Ⅰ)型前胶原基因启动子的调控作用,并探讨其机制。

材料和方法

1　药物的制备　中药抗纤复方由黄芪 15g　丹参 15g　紫河车 10g　郁金 15g 等药物组成。其无菌制剂原液由上海中医药大学附属曙光医院制剂中心按既定工艺制备(1g/ml, pH5.9),用 DMEM 培养液将其稀释成 0.05、0.1、0.5mg/ml 溶液,供实验用[4]。

2　5′-末端上流依次欠失的 α_1(Ⅰ)前胶原启动子报告基因重组质粒　含有 α_1(Ⅰ)前胶原启动子 2.3kb(−2.3kb to +42bp)片段质粒。pcDNA-hCOL(Ⅰ)2.3(括号内数字是从转录点起始碱基数)[5],由日本 Dr. Ⅰ Ozaki 馈赠。重新构建的重组体所用载体为不含启动子,但含有 SV40 增强子、氯霉素乙酰基转移酶(CAT)报告基因的质粒 pCAT-Enhan cer(promega)。5′-末端上流依次欠失长度不同 α_1(Ⅰ)前胶原启动子质粒 phCAT-Cα_1(Ⅰ)2.3(−2.3kb～+42bp), phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.8(−0.8kb～+42bp), phCAT-Cα_1

* 国家自然科学基金项目(No. 39670906)
上海中医药大学附属曙光医院(上海 200021)
△博士
万方数据

(Ⅰ)0.4(-476bp～+42bp),phCAT-Cα1(Ⅰ)0.1(-173bp～+42bp)分别是以限制性内切酶 BamHI-HindIII、ThaI-HindIII、KpaI-HindIII、NotI-HindIII(Promega 公司)酶切 2.3kbα1(Ⅰ)前胶原启动子片段,并与经相同酶切形成粘性末端的线性 pCAT-Enhancer 载体,经 T_4DNA 连接酶(Promega 公司)连接,连接混和物转染至感受态大肠杆菌 HB101,经氨苄青霉素抗性筛选后扩增阳性克隆,纯化重组质粒(Qiagen plasmid mini kit),酶切,序列测定鉴定。

3 细胞培养及稳定的 α1(Ⅰ)前胶原启动子转染细胞体系(stabe transfection)的建立 NIH 3T3 细胞由日本细胞银行(JCRB)提供。细胞在 37℃,95% 空气,5% CO_2 条件下;10% FCS,10u/ml 青霉素,100μg/ml 庆大霉素(GIBCO-BRL)。

NIH3T3 细胞,1×10^5 细胞/100ml 的浓度接种于培养皿,培养 24h 后,交换培养液,运用 DNA-磷酸钙共沉淀基因转染法[6],将质粒 phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3、phCAT-Cα1(Ⅰ)0.8、phCAT-Cα1(Ⅰ)0.4 、phCAT-Cα1(Ⅰ)0.1 分别导入 NIH3T3 细胞。利用质粒中含有药剂耐性基因 Neo,在质粒导入 NIN3T3 细胞 12h 后,加入 500μg/ml 的 G418(geneticin)处理细胞,克隆出含有 α1(Ⅰ)前胶原启动子稳定转染细胞株,建立稳定的转染细胞体系。

4 细胞增殖分析 采用 MTT 分析法[7]。100μl NIH3T3 细胞悬浮液(1×10^4/ml)接种于 96 孔培养板中,培养 24h 后,换用含有各种浓度的抗纤复方和空白对照组的培养液,37℃ 培养,培养后第 1、3、5 天时,分别行 MTT 分析,在分析中加入 20μl 5mg/ml 的 MTT(Sigma 公司),37℃ 培养 24h,然后再加入 150μl 1∶1 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)酒清混合停止反应液,摇动 10min 后,用 CS-9350pv(shimadzu TOKYO,JAPAN)分光光度计在波长 555nm 测定 OD。

5 CAT 活性测定 含有 α1(Ⅰ)前胶原启动子重组报导基因质粒 NIH3T3 细胞。5×10^5 细胞数接种于 10cm 培养器中,培养 6h 后 换上分别含有 0、0.05、0.1、0.5mg/ml 的抗纤复方及 0.5mg/ml 的抗纤复方和(或)2ng/ml TGFβ1 的 DMEM 培养液。处理培养 48h 后,用 PBS(-)洗涤细胞 2 次,0.9ml 的 CAT 分解缓冲液(Promega)分解细胞,15 000 r/min,离心 15min,取上清,测定蛋白含量,一定的蛋白量,用分解缓冲液调制成 200μl 溶液,然后加入 10μl 8mmol/L 的乙酰辅酶 A,1μl 的 ^{14}C 标记的氯霉素(0.1μci/μl),37℃ 温育 1h,加入 0.9ml 乙酸乙酯,振荡 30s,12 000r/min 离心 10min,吸取上清;在真空下,使乙酸乙酯挥发 然后,将反应物用 25μl 的乙酸乙酯复溶,在 25mm 薄层分析(TLC)硅胶板起点上加入复溶反应物,电吹风吹干样品 将 TLC 板放入含有 200ml 氯仿∶甲酸 95∶5 的 TLC 缸中 24min,将 TLC 板爆光 X 片。CAT 的活性定量用 BAS2000(FUJISU JAPAN)测定分析。

实验至少重复 3 次,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 t 检验作统计学分析。实验中用无启动 pCAT3-Enhancer 质粒作为阳性对照,质粒 pcDNA/CAT(日本 Dr. I Ozaki 馈赠)作内对照。

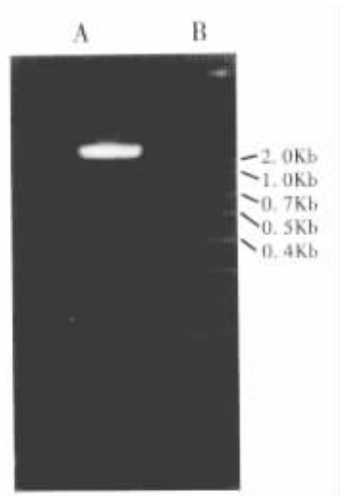
结 果

1 基因重组质粒的鉴定 见图 1。基因重组质粒 phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3 经酶切鉴定正确。经测序,插入片段与 GENBANK(U06669)报道的序列完全一致。

2 抗纤复方对 NIH3T3 细胞增殖的影响 见图 2。不同浓度的抗纤复方处理 NIH3T3 细胞 48h 以后,在显微镜下未看到抗纤复方对细胞毒性样作用,处理细胞 5 天后,MTT 分析也表明抗纤复方处理对细胞增殖没有影响。

3 抗纤复方对人前胶原 α1(Ⅰ)启动子区域调控的影响 见图 3A、图 3B。抗纤复方能够浓度依存地抑制 phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3、phCAT-Cα1(Ⅰ)0.8、phCAT-Cα1(Ⅰ)0.4 启动子的活性,而在 phCAT-Cα1(Ⅰ)0.1 中则未看到这种抑制效果。

4 抗纤复方对 TGFβ1 诱导的 phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3 活性的影响 见图 4A、图 4B。预试验显示 TGFβ1 诱导 phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3 的活性在 2ng/ml 达最大值,选择该浓度。在已转染该重组报导基因质粒的细胞中,加入 TGFβ1 同时加入 0.5mg/ml 的抗纤复方,显



A:phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3 HincII 酶切结果
B:DNA 标准分子量

图 1 phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3 HincII 酶切鉴定结果

万方数据

示 TGFβ1 诱导 phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3 活性的作用受到明显抑制。

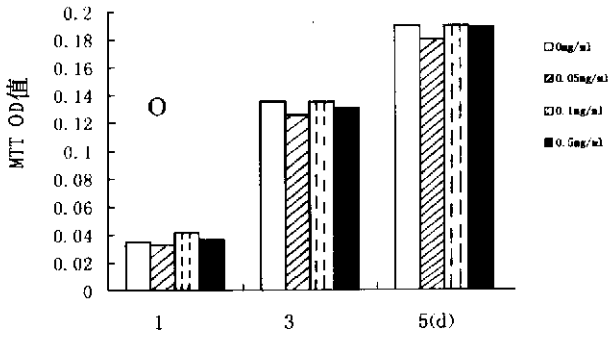


图 2　抗纤复方对 NIH3T3 细胞增殖的影响

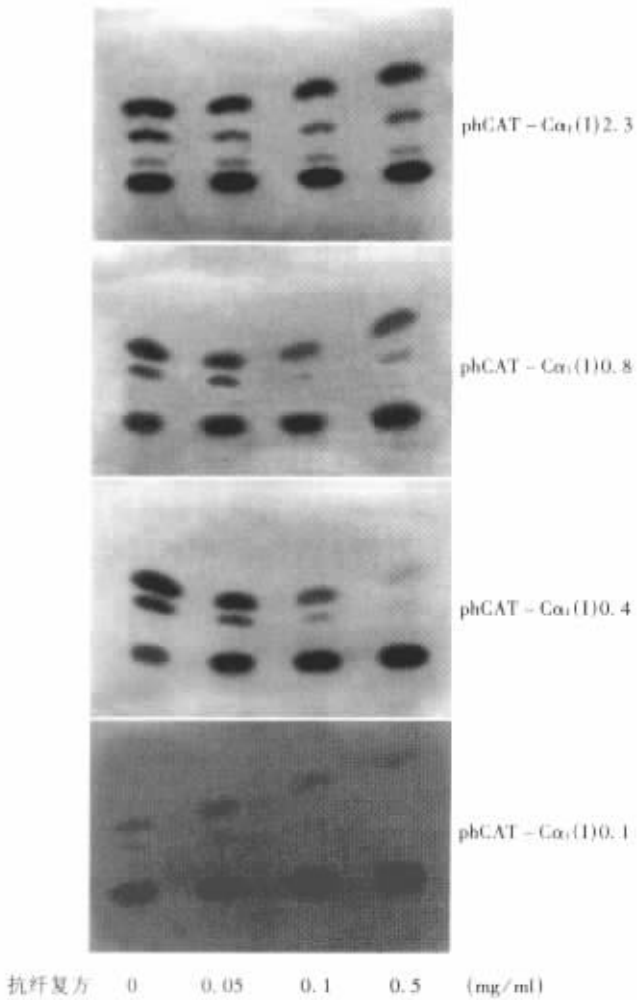


图 3A　抗纤复方对 α1(Ⅰ)前胶原启动子的活性的影响

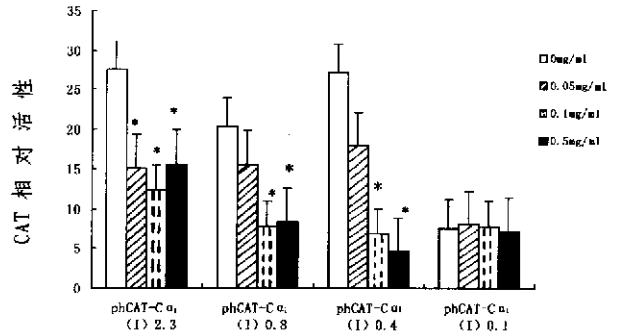


图 3B　抗纤复方对 α1(Ⅰ)前胶原启动子活性的影响

注：与正常对照组比较，* $P<0.01$ 浓度分别为 0.05、0.1、0.5mg/ml 的抗纤复方处理含有不同长度的 α1(Ⅰ)前胶原启动子质粒，抗纤复方能够抑制 α1(Ⅰ)前胶原启动子质粒 phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3，phCAT-Cα1(Ⅰ)0.8，phCAT-Cα1(Ⅰ)0.4 的活性，不能抑制 phCAT-Cα1(Ⅰ)0.1 的活性

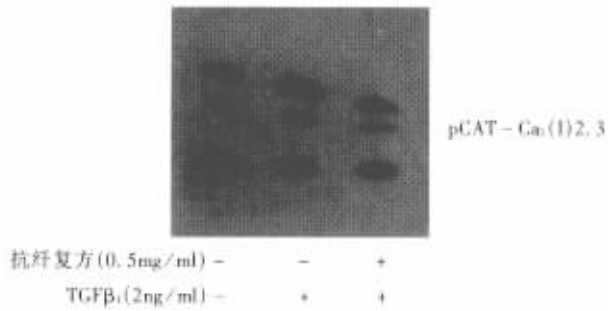


图 4A　抗纤复方对 TGFβ1 激活 phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3 活性的抑制

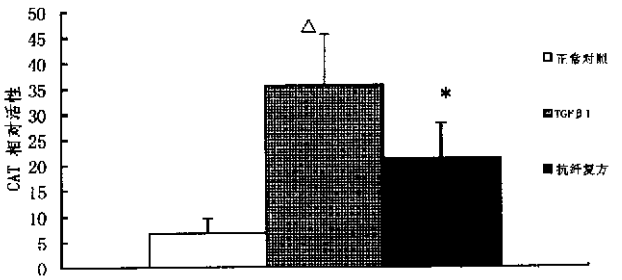


图 4B　抗纤复方对 TGFβ1 激活 phCAT-Cα1(Ⅰ)2.3 活性的抑制

注：与 TGFβ1 组比较，* $P<0.01$ 与正常对照组比较，△ $P<0.01$

讨　论

HSC 是肝纤维化形成过程中合成胶原等细胞外基质(ECM)的主要细胞。Ⅰ型胶原是纤维化时病变

万方数据

部位沉积的主要胶原蛋白，其由两条 α_1(Ⅰ)链与一条 α_2(Ⅰ)链组成。这两种多肽链由不同基因编码。纤维化时Ⅰ型胶原在病变部位的合成与沉积受多种因素影响。

研究表明抗纤复方能明显减少实验性肝纤维化大鼠总胶原和Ⅰ、Ⅲ型胶原的含量，对已形成的胶原亦有一定的溶解和吸收作用[1~3]。

抗纤复方抗肝纤维化作用的机制，张斌等[8,9]报道其能抑制 HSC 产生 $TGF\beta_1$，阻断肝纤维化形成过程中肝星状细胞自分泌放大过程，减少胶原的产生。王皓等[10]则认为抗纤复方在翻译前水平影响胶原的产生。

笔者在启动子水平研究了抗纤复方对前胶原 α_1(Ⅰ)启动子活性的作用。结果抗纤复方明显抑制该启动子的活性，提示抗纤复方在转录水平抑制 α_1(Ⅰ)胶原的合成，这一结果支持王皓等抗纤复方在翻译前水平影响胶原产生的观点。

$TGF\beta_1$ 具有促进 HSC 增殖，并刺激Ⅰ型胶原的合成，是肝纤维化发生时起重要作用的一个细胞因子，已被作为评价治疗肝纤维化疗效的指标之一[11]。

在笔者的研究中，运用稳定的 α_1(Ⅰ)前胶原启动子转染细胞体系，发现 $TGF\beta_1$ 在转录水平上调 α_1(Ⅰ)前胶原启动子的活性。进一步的实验显示抗纤复方能拮抗 $TGF\beta_1$ 对 α_1(Ⅰ)前胶原启动子活性的上调。提示抗纤复方对 α_1(Ⅰ)前胶原启动子活性的抑制可能与这一拮抗作用有关。

α_1(Ⅰ)前胶原表达调节机制已被广泛研究，许多因子参与了 α_1(Ⅰ)前胶原启动子表达的调节。核酸因子如 AP-1[5]、SP-1[12]与 $TGF\beta_1$ 启动子相作用，增加或抑制 α_1(Ⅰ)前胶原启动子活性。细胞因子如白细胞介素[13]、$TGF\beta_1$[14]自身亦可调节 α_1(Ⅰ)前胶原的表达。研究表明，上述诸多因子对 α_1(Ⅰ)前胶原调节，都是通过影响启动子上流区域的应答部位而实现调节的。我们的研究表明，抗纤复方能抑制 phCAT-Cα_1(Ⅰ)2.3、phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.8、phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.4 的活性，但是不能抑制 phCAT-Cα_1(Ⅰ)0.1(－173bp～＋42bp)的活性，在－476bp 到－173bp 之间可能存有抗纤复方调控元件，抗纤复方是通过尚未知的机制，通过－476bp 到－173bp 区域调节 α_1(Ⅰ)前胶原启动子活性，还需进一步研究抗纤复方的抑制机制。总之，抗纤复方抑制 α_1(Ⅰ)前胶原的表达是通过抑制 α_1(Ⅰ)前胶原 α_1 启动子活性实现的，其调控区域可能是在 α_1(Ⅰ)前胶原启动子上流－476bp 到－173bp 之间。

万方数据

参 考 文 献

1. Ling Tai Wang, Bin Zhang, Jian Jie Chen. Effect of Anti-fibrosis compound prescription on collagen expression of hepatic cells of experimental liver fibrosis of rat. World J Gastroentro 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、Ⅲ型胶原的比较研究. 中国实验方剂学杂志 2000;6(1):33－35.
3. 王灵台，张 斌，陈建杰. 抗纤复方药物血清对肝纤维化大鼠肝细胞生成胶原的影响. 中华消化杂志 1999;19(6):391－393.
4. Miyamura M, Ono M, Kyotani S, et al. Effects of Sho-saiko-to extracts on fibrosis and regeneration of the liver in rats. J Pharmacol 1998;50:97－105.
5. Kiins J, Glick A, Sporn MB, et al. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor β_1 gene. J Biol Chem 1989;264:402－408.
6. Oka H, Yamamoto S, Kuroki T, et al. Prospective study of chemoprevention of hepatocellular carcinoma with Sho-saikoto. Cancer 1995;76:743－749.
7. Sladowski D, Steer SJ, Clothier, RH, et al. An improved MTT assay. J Immunol Methods 1993;157:203－207.
8. 张 斌，王灵台. 抗纤复方对大鼠肝贮脂细胞产生转化生长因子 β_1 的影响. 胃肠病学和肝病学杂志 1999;8(1):16－18.
9. 王灵台，张 斌，陈建杰. 抗纤复方对大鼠肝贮脂细胞表达 $TGF\beta_1$ 的影响. 中西医结合肝病杂志 1999;9(1):21－23.
10. 王 皓，高春芳，孔宪涛. 抗纤复方及 $TGF\beta_1$ 对胶原基因启动子活性的影响. 中国免疫学杂志 1999;15(12):547－549.
11. Imgaki Y, Truter S, Ramirez F. Transforming growth factor-beta stimulates alpha 2 (I) collagen gene expression through a cis-acting element that contains Sp1-binding site. J Biol Chem 1994;269:14828－14834.
12. Geiser AG, Busam KL, Kim SJ, et al. Regulation of the transforming growth factor-beta 1 and beta-3 promoters by transcription factor sp1. Gene 1993;129:223－228.
13. Bristol LA, Ruscetti FW, Brody DT, et al. IL-1 alpha induces expression of active transforming growth factor beta in nonproliferating T cells via a post-transcriptional mechanism. J Immunol 1990;145:4108－4114.
14. Van Obberghen-Schilling E, Roche NS, Flanders KC, et al. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. J Biol Chem 1988;263:7741－7746.

(收稿：2002－03－11 修回：2002－06－11)