

· 实验研究 ·

抗纤复方药物血清对 HSC-LI90 细胞 I 型、IV 型前胶原和基质金属蛋白酶及其组织抑制因子-1 基因表达的影响

赵 钢 王灵台 陈建杰 张 斌

摘要 目的 探讨抗纤复方药物血清对肝星形细胞(HSC)LI90 细胞(HSC-LI90) I 型、IV 型前胶原和基质金属蛋白酶(MMPs)及其组织抑制因子(TIMP-1)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,制备药物血清,作用于 HSC-LI90 细胞 48h,应用 Northern 印迹杂交的方法,检测 I 型、IV 型前胶原、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 及膜型基质金属蛋白酶(MT1-MMP) 及其组织抑制因子(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:(1)抗纤复方不同浓度药物血清能抑制 HSC-LI90 细胞 I 型、IV 型前胶原及其组织抑制因子 TIMP-1 的基因表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);(2)能增加膜型基质金属蛋白酶基因表达($P < 0.01$);(3)对基质金属蛋白酶-2 基因表达及活性无影响($P > 0.05$)。结论:(1)抗纤复方具有抗肝纤维化作用;(2)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 肝星形细胞 I 型前胶原 IV 型前胶原 金属蛋白酶类 组织抑制因子 Northern 印迹杂交 酶图法

Effect of Anti-fibrosis Compound Contained Serum on Procollagen Type I and IV, Matrix Metalloproteinase and Its Tissue Inhibitor-1 Gene Expression in HSC-LI90 Cell Line ZHAO Gang, WANG Ling-tai, CHEN Jian-jie, et al Shuguang Hospital, Shanghai TCM University, Shanghai (200021)

Objective: To study the effects of Anti-fibrosis Compound contained serum (AFCS) on procollagen type I and IV (ProC-I and ProC-IV), matrix metalloproteinase (MMP) and its tissue inhibitor (TIMP-1) gene expression in hepatic stellate cell line LI90 (HSC-LI90). **Methods:** AFCS was prepared by gastric infusing different dosage (0.5g/kg, 2.0 g/kg and 4.0 g/kg) of Anti-fibrosis Compound Recipe to rats. After HSC-LI90 cells were exposed to AFCS for 48 hrs, levels of ProC-I, ProC-IV, gene expression of MMP-2, MMP membrane type 1 (MT1-MMP) and TIMP-1 in the cells were detected by Northern blot, and gelatinase activity of MMP-2 was measured by zymography. **Results:** AFCS of different concentrations could inhibit ProC-I and ProC-IV and TIMP-1 gene expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), increase MT1-MMP gene expression ($P < 0.01$), but it showed no effect on gene expression and activity of MMP-2 ($P > 0.05$). **Conclusion:** Anti-fibrosis Compound Recipe has anti-liver fibrosis action, its effects in inhibiting TIMP-1 gene expression of HSC-LI90 cells and promoting degradation of collagen might be one of the mechanisms of the action.

Key words Anti-Fibrosis Compound Recipe, liver stellate cell, procollagen type I, procollagen type IV, matrix metalloproteinase, tissue inhibitor, Northern blot hybridization, 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 β_1 型转化生长因子(TGF β_1)的表达,减少胶原产生^[1-3]。本实验采用整体动物给药,分离药物血清,作用于体外培养细胞的血清药理学研究方法,用 Northern 印迹杂交方法和酶图

基金项目 国家自然科学基金资助课题(No. 39670906)

作者单位 上海中医药大学附属曙光医院肝病科(上海 200021)

通讯作者 赵 钢, Tel 021-53821650 转 782, E-mail: zhaogangsh

@vip.163.com

万方数据

法研究抗纤复方药物血清作用于肝星形细胞(hepatic stellate cell, HSC)对 I、IV 型前胶原、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)及其组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)和膜型基质金属蛋白酶(membrane type 1 matrix metallo proteinase, 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。

材料与方法

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的工艺制备(1g/ml, pH 5.9)。

2 细胞系 肝星状细胞系 LI-90 细胞由日本佐贺医科大学肝病中心 I Ozaki 教授惠赠,系表型为活化的人肝星状细胞(HSC),表达高水平的 I 型前胶原(Col-I)、MMP-II、TIMP1、TGF β_1 mRNA 等^[4]。

3 动物 Wistar 大鼠,清洁级,雌雄各半,体重 300~350g,制备药物血清用,购自上海中医药大学实验动物中心。

4 抗纤复方药物血清的制备 大鼠随机分为 5 组,每组 5 只,其中 4 组按体重给予抗纤复方水溶液灌胃,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 3000r/min 离心 10min,取血清。另外一组根据体重给予蒸馏水 1.0ml/100g 体重灌胃,90min 后,同上法取血清分离血清,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。

5 细胞培养 细胞是在 37℃,95% O₂,5% CO₂ 条件下;5% FCS,10u/ml penicillin,100μg/ml streptomycin (GIBCO-BRL)。HSC-LI90 细胞以 1×10⁶ 细胞/100mm 的浓度接种于培养皿,24h 后,分别加入 10% 抗纤复方药物血清 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 I 型、IV 型前胶原、MT1-MMP、MMP-2、TIMP-1 mRNA 的表达。

6 I 型、IV 型前胶原、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)。20μg 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

UK),然后用³²P-dCTP 标记的 cDNA 探针与之杂交 16h,杂交浓度 65℃(杂交液为 Amersham UK)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 I 型、IV 型前胶原、MT1-MMP、MMP-2 与 GAPDH 的比值表示 I 型、IV 型前胶原、MT1-MMP、MMP-2、TIMP-1 表达水平。实验至少重复 3 次,数据用均数±标准差表示,应用单因素方差分析进行统计学处理。

含有 I 型、IV 型前胶原、MT-MMP、MMP-2、TIMP-1、GAPDH cDNA 质粒由日本 I Ozaki 教授馈赠^[4]。

7 MMP-2 活性检测采用酶图法 HSC-LI90 细胞以 1×10⁶ 细胞/100mm² 的浓度接种于培养皿,24h 后,分别加入 10% 抗纤复方药物血清 10ml,并设空白对照组。培养 48h 后,取上清,用 Suprec-500 (TAKARA, Japan)浓缩为 100μl, -70℃ 冰箱保存,供实验用。

15μl 上清与酶谱上样缓冲液(0.5mol/L Tris-HCl (pH 6.8), SDS, 70% 甘油, 5% (W/V) BPP)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 (pH 7.5), 0.1mol/L 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 1 次,浸入孵育反应液[0.05mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10mmol/L CaCl₂]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 TJ-TY-300 图像分析软件),t 检验分析。

结 果

1 I 型、IV 型前胶原, MT1-MMP、MMP-2、TIMP-1 mRNA 的表达 见图 1,表 1。抗纤复方药物血清作用 HSC-LI90 细胞 48h 后 0.5、2.0、4.0g/kg 药物血清有降低 I 型、IV 型前胶原、TIMP-1 表达水平;增加 MT1-MMP mRNA 表达水平的作用(P<0.05 或 P<0.01)。而 MMP-2 mRNA 的表达在抗纤复方药物血清作用前后无明显变化。

2 MMP-2 活性 见图 2,表 2。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、具活性成分主要在 6.2×10⁴ 的位置上,抗纤复方对 HSC-LI90 分泌的 MMP-2 活性无影响。

表 1 抗纤复方药物血清对 HSC-LI90 细胞 I 型、IV 型前胶原、TIMP-1、MT1-MMP、MMP-2mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

抗纤复方 (g/kg)	I 型前胶原	IV 型前胶原	MT1-MMP	MMP-2	TIMP-1
0	1.24 ± 0.24	0.84 ± 0.18	0.54 ± 0.14	1.09 ± 0.21	1.43 ± 0.32
0.5	0.62 ± 0.12 *	0.33 ± 0.12 **	0.68 ± 0.18	0.96 ± 0.20	0.78 ± 0.17 *
2.0	0.21 ± 0.09 *	0.37 ± 0.14 *	1.59 ± 0.29 *	0.98 ± 0.21	0.32 ± 0.12 *
4.0	0.15 ± 0.07 *	0.27 ± 0.11 *	1.32 ± 0.25 *	1.03 ± 0.25	0.29 ± 0.15 *

注：与对照组比较，* $P < 0.01$

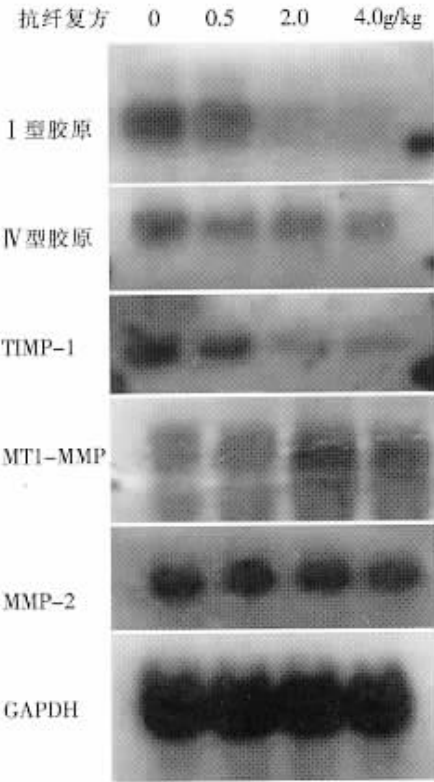


图1 抗纤复方含药血清对 I 型、IV 型前胶原、TIMP-1、MT1-MMP、MMP-2mRNA 表达的影响

表 2 MMP-2 的酶谱法定量分析 ($\bar{x} \pm s$)

抗纤复方(g/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

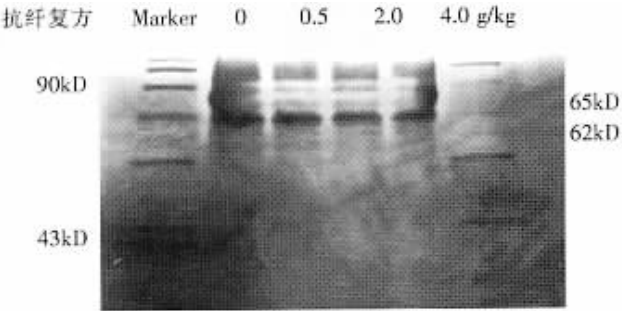


图2 MMP-2的酶谱法分析

万方数据

讨 论

肝纤维化的发生与胶原合成、降解的动态平衡失调有关,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^[5]。HSC 是肝脏间质细胞之一,是肝纤维化时细胞外基质(ECM)过多产生的主要细胞来源^[6]。针对 HSC 活化的不同环节进行抗肝纤维化治疗已形成了共识。如果能够抑制胶原等细胞外基质的合成和(或)促进 ECM 的降解,则有可能缓解、阻止甚至逆转早期肝硬化。

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。肝星状细胞(HSC)是肝脏间质细胞之一,是肝纤维化时 MMPs、TIMPs 主要细胞来源^[6]。

星状细胞 HSC-LI90 系表型为活化的人肝星状细胞,表达高水平的 I 型前胶原、MMP-2、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^[4]。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。

胶原是 ECM 的重要组成部分,在实验性肝纤维化模型中, I 型、IV 型前胶原 mRNA 表达增强,导致其产物过度沉积, I 型、IV 型胶原 mRNA 在一定程度上可以反映 ECM 的沉积。我们实验结果表明,抗纤复方可明显降低 HSC-LI90 细胞 I 型、IV 型胶原 mRNA 表达水平,从而减少胶原的沉积,表明抗纤复方具有抗肝纤维化作用。

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^[7],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。Arther 等^[8]发现,HSC 表达 7.2×10^3 IV 型胶原酶(MMP-2)基因,随培养时间的延长而表达增加,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,这在肝损伤和肝纤维化的发生发展中起重要作用。我们的研究发

现抗纤复方药物血清处理 HSC 48h 后, MMP-2 mRNA 水平无明显变化。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^[9,10]。我们的 Northern 印迹杂交结果显示抗纤复方明显增强 MT1-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, 我们推测 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、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 MMP2 和 MT-MMP 表达, MMP2 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 (MMP1/MMP13) 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^[11]。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, 抗纤复方药物血清作用 HSC-LI90 细胞 48h 后 0.5、2.0、4.0g/kg 药物血清有降低 TIMP-1 mRNA 水平的作用, 提示抗纤复方抑制 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。

抗纤复方可明显降低 HSC-LI90 细胞 I、IV 型前胶原、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 Wang LT, Zhang B, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound prescription on collagen expression of hepatic cells of experimental liver fibrosis of rat. World J Gastroenterol 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.
Zhang B, Wang LT, Chen JJ. Comparative study on effect of Kangxian Recipe on rats' liver lipocytes in producing collagen I and III. Chin J Exp Recipe 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.
Wang LT, Zhang B, Chen JJ. Effect of Kangxian Recipe contained serum on collagen producing function of hepatocytes in rats with liver fibrosis. Chin J Dig Dis 1999 ;19(6):391—393.
- 4 Iwata Ozaki, Gang Zhao, Mizuta I, et al. Hepatocyte growth factor induces collagenase via the transcription factor Ets-1 in human hepatic stellate cell line. J Hepatol 2002 ;36:169—178.
- 5 王宝恩. 肝星形细胞与肝纤维化. 中华肝脏病杂志 2000 ;8(4):179.
Wang BE. Liver stellate cells and liver fibrosis. Chin J Hepatol 2000 ;8(4):179.
- 6 王宝恩. 肝纤维化时细胞外基质的合成与降解. 中华肝脏病杂志 1997 ;5(2):65.
Wang BE. Synthesis and degradation of extracellular matrix during liver fibrosis. Chin J Hepatol 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 hrest carcinomas. 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. 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 1 matrix metalloproteinase. 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 Biol Chem 1995 ;270:5331—5338.
- 11 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cell. Semin Liver Dis 2001 ;21(3):373.

(收稿 2002-12-12 修回 2003-10-08)