

# 苦杏仁苷对 HSC-T6 细胞分泌作用的影响

骆欢欢, 赵昉, 张奉学, 刘妮

广州中医药大学, 广东 广州 510006

**[摘要]** 目的: 观察苦杏仁苷对肝星状细胞(HSC)-T6细胞型胶原 mRNA、型胶原 mRNA 活化, 以及型胶原、透明质酸分泌的影响。方法: 将 HSC-T6 细胞系分为以下 4 组, 每组细胞均置于 6 孔板中。4 组分别为: 正常组, 苦杏仁苷高剂量 ( $10^{-3}$  mol/L) 组, 苦杏仁苷中剂量 ( $10^{-4}$  mol/L) 组和苦杏仁苷低剂量 ( $10^{-5}$  mol/L) 组。RT-PCR 检测型胶原 mRNA、型胶原 mRNA, 酶联免疫法检测 HSC-T6 型胶原的分泌, 放射免疫法检测透明质酸的含量。结果: 各苦杏仁苷组对型胶原基因表达均有明显的抑制作用, 与正常组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。以苦杏仁苷中剂量组最为明显, 苦杏仁苷高剂量组次之, 苦杏仁苷低剂量组再次之。提示苦杏仁苷对 HSC-T6 细胞型胶原 mRNA 表达有明显的抑制作用, 但这种抑制作用或并不与剂量成正比。各苦杏仁苷组对型胶原基因表达均有明显的抑制作用, 与正常组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。以苦杏仁苷高、中剂量组明显, 苦杏仁苷低剂量组次之。24 h 时, 型胶原的  $OD_{450}$  值苦杏仁苷各组与正常组比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。72 h 时, 苦杏仁苷各组与正常组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但苦杏仁苷各组组间比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。正常组透明质酸分泌曲线与苦杏仁苷低剂量组稍有重叠, 位置较苦杏仁苷高、中剂量组分泌曲线高。但 24 h、72 h 时, 4 组透明质酸含量比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。96 h 时, 苦杏仁苷高、中剂量组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其余组间比较, 差异仍无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 苦杏仁苷对 HSC-T6 细胞活化后的细胞外基质 (ECM) 分泌功能有明显的抑制作用, 此可能是其抗肝纤维化的主要机制之一。

**[关键词]** 肝纤维化; 肝星状细胞 (HSC); 苦杏仁苷; 分泌

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2016) 03-0224-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.03.088

肝纤维化的发展是细胞外基质 (ECM) 合成增加且同时降解减少的结果。肝星状细胞 (HSC) 的活化是肝纤维化发生的中心环节, HSC 的分泌作用导致 ECM 大量合成。本实验观察苦杏仁苷对 HSC-T6 细胞型胶原 mRNA、型胶原 mRNA 活化, 以及型胶原、透明质酸分泌的影响。报道如下。

## 1 实验材料

1.1 实验细胞 HSC-T6 细胞株, 由广州中医药大学热带医学研究所病毒室冻存复苏。

1.2 实验药物 苦杏仁苷购自中国药品生物制品检定所, 每支约 20 mg, 分子量 457.4, 编号: 110820-200403。在实验前对苦杏仁苷水溶物进行低温间歇灭菌,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。临时配成所需的药物溶度, 且用 5% 血清的高糖 DMEM 培养液稀释。即用 DMEM 培养基溶解药物为 20 mmol/L 母液浓度后, 以微孔滤膜过滤除菌,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.3 主要试剂 高糖 DMEM 培养液 HEPEPS 购自美国 GIBCO 公司; 胎牛血清购自杭州四季清生物制品公司; L-谷

氨酰胺、二甲基亚砷 (DMSO) 和胰蛋白酶均购自 Sigma 公司; EDTA 购自上海生物工程公司, 由 Amresco 进口分装; 青霉素、链霉素购自华北制药有限公司。TIANGEN RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、dNTP、RNA 酶抑制剂、Oligo-dt 均为 TIANGEN 公司产品。DNA Marker、PCR 试剂盒、优化 PCR 试剂盒为天为时代生物技术公司产品。透明质酸放射免疫试剂盒购自北京北方生物技术研究所 (批号: 20091020)。型胶原 ELISA 试剂盒购自 Bioscience Laboratories, R&D 公司分装 (批号: E0900951)。

1.4 主要仪器 YJ-875 型净化工作台, 苏州净化设备公司; 细胞培养瓶、细胞培养板, Corning 美国公司; 细胞计数板、微孔滤膜 ( $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.2\ \mu\text{m}$ ), 上海半岛实业有限公司; Leica 荧光生物显微镜, 倒置显微镜 (Olympus BX600);  $-86^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱, 美国 Revco; 美国 SHELDON2300-2E 型电热恒温二氧化碳培养箱; 美国宝特 ELX800 型全自动酶标仪; 美国 UNO 的 PCR 仪; 上海原子核所日环仪器 TSN-695B 型放射

**[收稿日期]** 2015-12-08

**[基金项目]** 广东省自然科学基金课题 (S2012010008917)

**[作者简介]** 骆欢欢 (1980-), 女, 副研究员, 研究方向: 中医临床基础。

免疫γ 测量仪。

1.5 引物及序列 α<sub>1</sub>(I)型胶原引物由 INVTROGEN 公司合成。引物序列如下：α<sub>1</sub>(I)型胶原引物：上游：5'-CAT AAA GGG TCA TCG TGG CTT C-3'，下游：5'-GTG ATA GGT GAT GTT CTG GGA G-3'；α<sub>2</sub>(I)型胶原引物：上游：5'-CGA GGT AAC AGA GGTGAA AGA-3'，下游：5'-AAC CCA GTATT C TCC AGT CTT-3'。β-actin 引物：上游：5'-TGG TGG GTA TGG GTC AGA AGG ACT C-3'，下游：5'-CAT GGC TGG GGT GTT GAA GGT CT CA-3'。

2 实验方法与统计学方法

2.1 细胞分组 HSC- T6 细胞系是由大鼠 HSC 经过 SV40 病毒转染后形成的永生细胞系，具有无限传代的特性。本研究将 HSC- T6 细胞系分为以下 4 组，每组细胞均置于 6 孔板中。4 组分别为：正常组，苦杏仁苷高剂量(10<sup>-3</sup>mol/L)组，苦杏仁苷中剂量(10<sup>-4</sup>mol/L)组和苦杏仁苷低剂量(10<sup>-5</sup>mol/L)组。

2.2 RNA 的提取 在 6 孔板中接种 1×10<sup>6</sup> HSC- T6 细胞，用含有 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基，使细胞贴壁生长，至铺满 50% 面积后更换培养液。同时按前述分组剂量加入干预药物。每个药物浓度做 6 个复孔，同时做不加药物的正常组。细胞经药物作用 48 h 后，进行消化、收集，采用 TIANGEN 总 RNA 提取试剂盒，参照试剂盒说明书提取细胞总 RNA。取细胞加 1 mL 裂解液，混匀后静置 5 min，加入 200 μL 三氯甲烷，剧烈震荡 30 s，静置 10 min，4℃ 12000 rpm 离心 10 min。取上清加 1/2 体积无水乙醇，静置 2 min，后转入离心柱中，4℃ 12000 rpm 离心 30 s。然后加入 0.5 mL 去蛋白液，静置 2 min 后 4℃ 离心 30 s，加入漂洗液 0.7 mL，静置 2 min，4℃ 离心 30 s，再加入 0.5 mL 的漂洗液，同上。转收集管后空离心柱 4℃ 12000 rpm 离心 2 min 后，干燥 RNA 10 min。加入无 RNA 酶水 50 μL，静置 2 min，4℃ 12000 rpm 离心，收集离心液 - 70℃ 保存备用。

2.3 RT-PCR 检测 反应体系为 20 μL，内含 cDNA 4 μL，10× buffer 2 μL，dNTP(10 mol/L) 0.4 μL，上、下游引物各 0.2 μL，Taq 酶 0.5 U，用水补至 20 μL。用 PCR 仪扩增。PCR 反应的条件为：94℃ 预变性 2 min，94℃ 变性 30 s，58℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 45 s，30 个循环后，72℃ 延伸 10 min，4℃ 保温。PCR 产物在 3% 琼脂糖凝胶上电泳后，采用凝胶成像分析仪进行扫描，观察条带的灰度强弱。

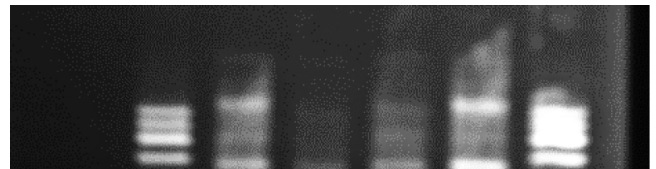
2.4 酶联免疫 (ELISA) 法检测 细胞按 1×10<sup>5</sup> 接种于 48 孔板中，每孔 0.3 mL，代细胞汇合达 60% 后弃上清，加入经过 2% DMEM 稀释的含药培养基 0.3 mL。每个浓度接种 8 个复孔。加药 24 h 后吸取上清(每个浓度吸 4 个复孔)，72 h 后吸取另 4 个复孔。按试剂盒说明书操作检测 HSC- T6 细胞 型胶原的分泌。

2.5 放射免疫法检测 细胞培养上清液每 24 h 收集 1 次，以放射免疫法检测上清液中透明质酸的含量。

2.6 统计学方法 计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示，利用 SPSS13.0 软件进行统计分析，采用单因素方差分析。

3 实验结果

3.1 4 组 RT-PCR 检测 α<sub>1</sub>(I)型胶原 mRNA 表达比较 见图 1、表 1。各苦杏仁苷组对 α<sub>1</sub>(I)型胶原基因表达均有明显的抑制作用，与正常组比较，差异均有统计学意义(P < 0.05)。以苦杏仁苷中剂量组最为明显，苦杏仁苷高剂量组次之，苦杏仁苷低剂量组再次之。提示苦杏仁苷对 HSC- T6 细胞 α<sub>1</sub>(I)型胶原 mRNA 表达有明显的抑制作用，但这种抑制作用或并不与剂量成正比。



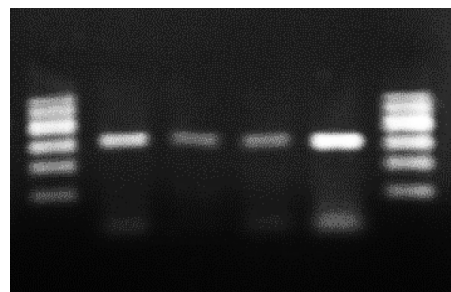
Marker 由上至下为 600、500、400、300 bp，目的产物为 626 bp

图 1 各组 α<sub>1</sub>(I)型胶原 mRNA 电泳结果图

组别	α <sub>1</sub> (I)型胶原 mRNA	β-actin	比值
苦杏仁苷高剂量组	19541± 899 <sup>①</sup>	60331	0.32
苦杏仁苷中剂量组	13658± 143 <sup>①</sup>	32171	0.42
苦杏仁苷低剂量组	29269± 1314 <sup>①</sup>	51797	0.57
正常组	45312± 391	46933	0.97

与正常组比较，①P < 0.05

3.2 4 组 RT-PCR 检测 α<sub>2</sub>(I)型胶原 mRNA 表达比较 见图 2、表 2。各苦杏仁苷组对 α<sub>2</sub>(I)型胶原基因表达均有明显的抑制作用，与正常组比较，差异均有统计学意义(P < 0.05)。以苦杏仁苷高、中剂量组明显，苦杏仁苷低剂量组次之。提示苦杏仁苷对 HSC- T6 细胞 α<sub>2</sub>(I)型胶原 mRNA 表达有明显的抑制作用，但这种抑制作用也不与剂量明显成正比。



Marker 由上至下为 600、500、400、300、200、100 bp，目的产物为 320 bp

图 2 各组 α<sub>2</sub>(I)型胶原 mRNA 电泳结果图

表2 4组RT-PCR检测 型胶原 mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	型胶原 mRNA	$\beta$ -actin	比值
苦杏仁苷高剂量组	18432 $\pm$ 677 <sup>①</sup>	60331	0.31
苦杏仁苷中剂量组	17067 $\pm$ 391 <sup>①</sup>	32171	0.53
苦杏仁苷低剂量组	28416 $\pm$ 1116 <sup>①</sup>	51797	0.55
正常组	40704 $\pm$ 256	46933	0.87

与正常组比较, ① $P < 0.05$

3.3 4组ELISA法检测 型胶原比较 见表3。24 h时, 型胶原的OD<sub>450</sub>值苦杏仁苷各组与正常组比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。72 h时, 苦杏仁苷各组与正常组比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 但苦杏仁苷各组组长间比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。提示苦杏仁苷作用72 h后对 型胶原的分泌有明显抑制作用, 这一作用不呈现剂量依赖。

表3 4组ELISA法检测 型胶原比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	72 h
苦杏仁苷高剂量组	0.089 $\pm$ 0.002	0.078 $\pm$ 0.005 <sup>①</sup>
苦杏仁苷中剂量组	0.090 $\pm$ 0.010	0.078 $\pm$ 0.002 <sup>②</sup>
苦杏仁苷低剂量组	0.093 $\pm$ 0.010	0.079 $\pm$ 0.010 <sup>③</sup>
正常组	0.104 $\pm$ 0.010	0.091 $\pm$ 0.005

与正常组比较, ① $P < 0.05$

3.4 4组放射免疫法检测透明质酸含量比较 见表4、图3。24 h的苦杏仁苷高剂量组、苦杏仁苷中剂量组各有1孔因处理不当干涸, 其值被剔除。正常组分泌曲线与苦杏仁苷低剂量组稍有重叠, 位置较苦杏仁苷高、中剂量组分泌曲线高, 提示苦杏仁苷高、中剂量组均有抑制透明质酸分泌的趋势。但24 h、72 h时, 4组透明质酸含量比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。96 h时, 苦杏仁苷高、中剂量组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 其余组间比较, 差异仍无统计学意义( $P > 0.05$ )。提示苦杏仁苷对透明质酸分泌可能有一定的抑制作用, 但效果并不显著, 也不呈现明显的剂量依赖。

表4 4组放射免疫法检测透明质酸含量比较( $\bar{x} \pm s$ ) ng/mL

组别	24 h	72 h	96 h
苦杏仁苷高剂量组	298.72 $\pm$ 11.84	455.71 $\pm$ 133.83	1207.45 $\pm$ 69.05 <sup>①</sup>
苦杏仁苷中剂量组	277.05 $\pm$ 100.67	698.85 $\pm$ 61.92	796.27 $\pm$ 138.81
苦杏仁苷低剂量组	345.25 $\pm$ 65.58	784.70 $\pm$ 120.47	1634.50 $\pm$ 376.87
正常组	337.31 $\pm$ 58.10	778.14 $\pm$ 96.08	1434.26 $\pm$ 315.58

与苦杏仁苷中剂量组同期比较, ① $P < 0.05$

#### 4 讨论

肝纤维化是肝脏在损伤愈合过程中的一种反应, 其特征是ECM的过度沉积, 其中 型胶原、 型胶原是ECM的主要成分。HSC致肝纤维化作用的最直接途径是大量ECM的产生。 型胶原分子是由2个 $\alpha 1$ ( )链和1个 $\alpha 2$ ( )链组成的

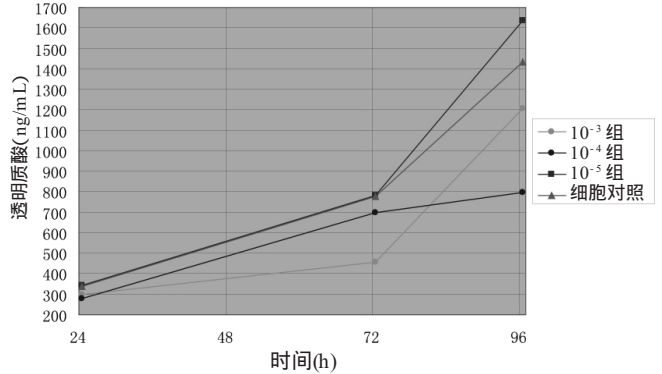


图3 不同浓度苦杏仁苷透明质酸分泌曲线比较

异质三联体。在所有类型的肝纤维化中都有 型胶原的增生。体外实验结果表明, 活化的HSC的 型胶原 mRNA 表达较静止状态时增加60~70倍<sup>[1]</sup>。免疫组织化学研究也证明, 肝硬化大鼠肝脏 型胶原蛋白表达明显增加<sup>[2]</sup>。故目前抗肝纤维化治疗中针对HSC的治疗主要集中于抑制HSC激活、增殖及胶原合成, 促进胶原降解。本实验发现, 苦杏仁苷对HSC-T6细胞 型胶原 mRNA 表达有明显的抑制作用, 对HSC-T6细胞 型胶原 mRNA 表达也有明显的抑制作用, 但这种抑制作用不与剂量成正比; 同时, HSC-T6细胞分泌 型胶原作用的研究也印证了上述结果, 在作用72 h后HSC对 型胶原分泌有明显抑制作用, 且不呈现剂量依赖。提示苦杏仁苷对HSC-T6细胞活化后的ECM分泌功能有明显的抑制作用, 这可能是其抗肝纤维化的主要机制之一。

而透明质酸则是反映肝纤维化发生发展动态最灵敏的ECM成分。本实验发现, 在24 h、72 h、96 h各不同时间段, 苦杏仁苷高、中剂量组均有抑制透明质酸分泌的趋势, 提示苦杏仁苷对透明质酸分泌可能有一定的抑制作用, 且极为敏感, 在48~72 h就已有表现, 但效果并不显著, 也难以判断是否存在剂量依赖性。另外, 本实验过程中, 由于24 h的苦杏仁苷高、中剂量组各有1孔处理不当干涸, 其值被剔除, 也可能导致实验结果的部分偏差。

#### [参考文献]

- [1] Failli P, DeFranco RM, Caligiuri A, et al. Nitrovasodilators inhibit platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of activated human hepatic stellate cells[J]. Gastroenterology, 2000, 119(2): 479-492.
- [2] Bedossa P, Ferlicot S, Paradis V, et al. Dystroglycan expression in hepatic stellate cells: role in liver fibrosis[J]. Lab Invest, 2002, 82(8): 1053-1061.

(责任编辑: 吴凌)