

排钱草生物碱对乙醛刺激的人源肝星状细胞增殖及细胞外基质的影响

钟鸣¹, 张宝璟², 王超², 余胜民¹, 宗杨², 马骁驰², 张厚利^{2*} (1.广西中医药研究院, 南宁 530001; 2.大连医科大学药学院, 大连 116044)

摘要: 目的 研究排钱草生物碱对乙醛刺激的人源肝星状细胞(LX-2)的增殖抑制作用及其对细胞外基质生成的影响。方法 采用 MTT 法检测排钱草生物碱对乙醛刺激下人源肝星状细胞的增殖的作用; LDH 比色法检测排钱草生物碱对 LX-2 的细胞毒性; 运用 Real-time PCR 技术检测细胞中 α -SMA、Co1- I、MMP-2 及 TIMP-1 mRNA 的表达情况。结果 排钱草生物碱对乙醛刺激下的肝星状细胞的增殖具有明显抑制作用, 呈剂量依赖性。排钱草生物碱各剂量组培养上清液中 LDH 活力差异无显著性。LX-2 细胞中的 α -SMA、Co1- I、及 TIMP-1 mRNA 随药物浓度增加, 其表达下降, MMP-2 mRNA 表达上升。结论 排钱草生物碱可能通过抑制 LX-2 细胞的增殖和减少细胞外基质的合成, 从而发挥抗肝纤维化作用。

关键词: 排钱草; 乙醛; 人源肝星状细胞; 细胞增殖; 细胞外基质

中图分类号: R285.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)01-0004-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.002

Effect of *Phyllodium Pulchellum* Alkaloid on the Proliferation and Extracellular Matrix in Human Hepatic Stellate Cell Stimulated by Acetaldehyde

ZHONG Ming¹, ZHANG Baojing², WANG Chao², YU Shengmin¹, ZONG Yang², MA Xiaochi², ZHANG Houli^{2*} (1.Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science, Nanning 530001, China; 2.College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of *Phyllodium puchellum* alkaloid on the proliferation and extracellular matrix in human hepatic stellate cell (HSC-LX2) stimulated by acetaldehyde. **METHODS** MTT assay was used to evaluate the inhibitory effect of the drugs on HSC-LX2. The content of LDH was determined by using colorimetric method, Real-time PCR was applied to measure the expression of α -SMA, Co1- I, MMP-2 and TIMP-1 mRNA. **RESULTS** *P. pulchellum* alkaloid could inhibit proliferation of HSC-LX2 cells in concentration manners. The activity of LDH in supernatant had no statistical significance compared with control group. From the results of Real-time PCR, the expression of α -SMA, CoL-I and TIMP-1 mRNA in drug groups were notably lower than those in model group stimulated by acetaldehyde, while the MMP-2 mRNA was increased. **CONCLUSION** The *P. pulchellum* alkaloid can inhibit the expression of α -SMA, Col-I and TIMP-1 mRNA in HSC-T6, reduce the synthesis and deposition of extracellular matrix in liver, so as to interfere with course of the liver fibrosis.

KEY WORDS: *Phyllodium puchellum*; acetaldehyde; hepatic stellate cells; proliferation inhibition; extracellular matrix

排钱草为壮族民间常用草药, 来源于豆科植物(*Phyllodium puchellum*)的干燥根, 别名钱排草、叠钱草、钱串草, 主要分布于广西、广东、福建和江西等地。排钱草具有清热解毒、祛风行水、活血消肿的功效, 从排钱草中分离得到的化学成分主要包括生物碱类、醇类、糖类、挥发油以及酚类等^[1]; 常用来治疗急、慢性肝炎、肝脾肿大、血吸虫病、跌打损伤等症^[2]。

酒精性肝纤维化(alcoholic liver fibrosis, ALF)是过度摄入酒精而引起的肝脏组织受损, 其发生途径是通过刺激肝星状细胞(hepatic stellate cells,

HSC), 使其转化为成纤维细胞, 同时, 使细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成明显增多而降解相对减少的可逆动态病理过程^[3]。酒精在生物体内的代谢产物为乙醛, 相关文献报道指出, 乙醛在肝纤维化的形成与发展过程当中所起的作用不容忽视^[4]。前期研究表明, 排钱草总生物碱能改善免疫性肝纤维化大鼠肝组织的病变程度, 提高血清 IFN- γ 的含量^[5]。排钱草总生物碱对化学损伤性肝纤维化具有较强的改善作用, 降低血清 ALP、ALT 的活性, 降低肝脏羟脯氨酸的含量^[6]。但排钱草对 ALF 的作用尚未见报道, 本实验采用乙醛刺

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2015020667); 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118258); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能14123006-6)

作者简介: 钟鸣, 男, 博士, 教授 Tel: (0771)3132303 E-mail: gxmyszm@163.com

*通信作者: 张厚利, 女, 博士, 副教授 Tel:

(0411)86110414 E-mail: houlishz@163.com

激建立体外肝纤维化模型,通过观察排钱草提取物对人源肝星状细胞 HSC-LX2 的增殖抑制作用,对 Collagen-I、 α -SMA、TIMP-1、MMP-2 的基因转录水平,以此来评价排钱草生物碱在抗 ALF 方面的防治作用。本实验有助于进一步了解 ALF 的病理机制并以此为平台评价和筛选抗 ALF 药物。

1 仪器与材料

1.1 材料

排钱草样品,于 2015 年 9 月采收自广西南宁,样品编号:20150907,由广西壮族自治区民族医院研究院戴斌主任药师鉴定为豆科植物排钱草 *Phyllodium pulchellum* (L) Desv 的根;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物制品研究所,批号:20150410);Real-time PCR 试剂盒(宝生物工程有 限公司,批号:20151012)。HSC-LX2 细胞株购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。

1.2 仪器

BSC-1300 超净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);BB150 CO₂ 培养箱(美国 Thermo);FC 型酶标仪(美国 Thermo);UV-2100 紫外可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司);TC-512 型 PCR 扩增仪(英国 TECHNE 公司);Applied BiosystemTM 荧光定量 PCR 仪(美国 Invitrogen 公司)。

2 方法

2.1 排钱草生物碱的提取分离

取排钱草干燥根部 10 kg,加入三蒸水并加盐酸调节 pH,使 pH 维持在 2~3 左右。超声提取药材 3 次,保持每次提取时药液的 pH 不变,频率为 100 Hz,提取时间为 1 h。超声提取后抽滤,合并滤液,并将滤液经强酸型阳离子交换树脂柱吸附。按照药材:树脂=1.5:1 过柱,并随时观察流出液的 pH 变化以及超载情况。待所有滤液经过树脂柱吸附后,复用三蒸水清洗树脂柱至流出液 pH 为中性时停止。将树脂转移出来,加入浓氨水搅拌均匀,静置 30 min,再加入 95%乙醇浸泡提取至提取液无色时停止。将此提取液浓缩蒸干,得到乙醇粗提物。复用氯仿萃取乙醇粗提物,得氯仿萃取物,过硅胶柱层析,石油醚-丙酮梯度洗脱,然后经制备 HPLC,得到排钱草生物碱(32.6 mg·g⁻¹)。

2.2 细胞培养

复苏后的细胞置于含 10%胎牛血清 DMEM 培

养液中,5% CO₂, 37 °C 培养箱中常规培养。待细胞贴壁 80%后,用 0.25%胰酶消化,2 mL 细胞培养液终止消化,按 1:3 或 1:4 进行细胞传代。

2.3 对乙醛诱导的肝星状细胞增殖的抑制活性的测定

取对数生长的 HSC-LX2 细胞接种于 96 孔细胞培养板中(密度为 5×10^4 mL⁻¹),每孔加入 100 μ L 细胞悬液,每组 6 复孔;待细胞生长至 80%以上融合度时,加入不含血清的培养基同步化处理 24 h。实验分为正常细胞组、模型组、给药组。给药组依次加入不同浓度的药物,分别为 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ mol·L⁻¹;模型组及给药组均加入终浓度 200 μ mol·L⁻¹ 的乙醛(乙醛每 12 h 补加一次)。给药处理 48 h 后,弃去每孔内所有液体,加入 0.5 mg·mL⁻¹ 的 MTT 10 μ L,于培养箱中继续孵育 4 h,每孔再加入 100 μ L 三联液,放入 CO₂ 培养箱中继续孵育 12~15 h 后置于酶标仪下测定每孔 OD 值(570 nm)。以细胞存活率计算排钱草生物碱对细胞增殖的影响。细胞存活率=(实验组 OD 值/模型组 OD 值)×100%。

2.4 细胞培养上清液中 LDH 活性的检测

取对数期生长的 HSC-LX2,以 2×10^4 mL⁻¹ 的密度接种于 96 孔培养板中,分别设空白对照组,给药组(浓度分别为 25, 50, 100 μ mol·L⁻¹)。培养 24 h 后,收集各孔上清液,按照 LDH 细胞毒性检测试剂盒说明操作,490, 630 nm 处双波长测定吸光度(OD 值),细胞培养上清中 LDH 活性=(样品孔吸光度-背景空白对照孔吸光度)/(标准管吸光度-样品对照孔吸光度)×标准空白管浓度(U·L⁻¹)。

2.5 Real-Time PCR 法检测乙醛诱导的 HSC 中 Collagen-I、 α -SMA、TIMP-1、MMP-2 mRNA 的表达

将 HSC-LX2 细胞以每孔 8×10^5 的密度接种于 6 孔板。待细胞生长至 80%以上融合度时,加入不含血清的培养基同步化处理 24 h。实验分为正常细胞组、模型组、给药组。给药组依次加入高、中、低(100, 50, 25 μ mol·L⁻¹)浓度的药物,每组 2 个复孔,重复 3 次。模型组及给药组均加入终浓度 200 μ mol·L⁻¹ 的乙醛(乙醛每 12 h 补加一次)。给药后的培养板置于 CO₂ 培养箱中继续孵育 48 h。按 RNAiso Plus 试剂盒提取细胞的总 RNA。取总 RNA 1 μ L(1 μ g· μ L⁻¹),根据 RT-PCR 试剂盒使用说

说明书, 逆转录为 cDNA, 以适量的 cDNA 为模板, 以 GAPDH 为内参, 扩增基因片段。引物序列如下: GAPDH 上游 5'-GACAGCACTGTGTTGGCATAG-3', 下游 5'-GGGACCTGACAGACTACCTC-3'。Collagen I 上游 5'-GACATGTTCTAGCTTTGTGGACCT-3', 下游 5'-AGGGACCCTTAGGCCAT TGTGTA-3'; α -SMA 上游 5'-AGCCAGTCGCCA TCAGGAAC-3', 下游 5'-GGGAGCATCATCACC AGCAA-3', TIMP-1 上游 5'-GATTTCGACGCTGT GGGAAA-3', 下游 5'-CGGTTCTGGGACTTGTG GA-3', MMP-2 上游 5'-TCCCGAGATCTGCAAG CAAG-3', 下游 5'-AGAATGTGGCCACCAGCA AG-3'。PCR 产物的分析使用比较阈值法进行相对定量分析。

2.6 统计学处理

结果采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。所有的统计分析由 SPSS 软件做 t 检验分析, $P < 0.05$ 表明具有显著性差异。

3 结果

3.1 排钱草生物碱的提取分离

排钱草中含量最高的生物碱经薄层层析, 光谱数据分析被鉴定为 5-甲氧基- N,N -二甲基色胺。 $^1\text{H-NMR}$ 谱和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱数据与文献报道的数据基本一致^[7]。

3.2 对乙醛诱导的 HSC 增殖的抑制活性

当给予终浓度 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙醛刺激后, HSC-LX2 细胞增殖率显著增加, 与对照组细胞相比, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而加入排钱草生物碱作用于细胞 48 h 后, 排钱草生物碱表现出对细胞增殖不同程度的抑制作用, 此抑制作用呈现明显的剂量依赖性, 结果见表 1。

3.3 细胞培养上清液中 LDH 活性的检测

HSC-LX2 细胞在经过乙醛刺激和排钱草生物碱作用后, 各组细胞上清中 LDH 活性无明显变化, 与对照组比较, 无显著性差异, 结果见表 2。

3.4 Real-Time PCR 法检测乙醛诱导的肝星状细胞中 α -SMA、Collagen- I、MMP-2、TIMP-1 mRNA 的表达

HSC-LX2 细胞在乙醛刺激后, Collagen- I、 α -SMA、TIMP-1 mRNA 表达水平与对照组相比均显著升高; 此时, 加入排钱草生物碱作用于 HSC-LX2 细胞 48 h 后, 表现出对 Collagen I、

α -SMA、TIMP-1 mRNA 表达水平不同程度的抑制作用, 对 MMP-2 mRNA 表达的促进作用, 这种改善作用均呈现剂量依赖性。结果见图 1。

表 1 排钱草生物碱对乙醛刺激的 LX-2 细胞增殖的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of *Phyllodium pulchellum* on LX-2 stimulated by acetaldehyde proliferation ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	乙醛/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	OD 值	存活率/%
对照组	—	0	0.41 ± 0.08	—
模型组	—	200	$0.87 \pm 0.07^{1)}$	100.00
给药组	6.25	200	$0.76 \pm 0.07^{2)}$	87.36
	12.5	200	$0.65 \pm 0.07^{2)}$	74.71
	25	200	$0.55 \pm 0.06^{2)}$	63.22
	50	200	$0.46 \pm 0.08^{2)}$	52.87
	100	200	$0.39 \pm 0.07^{2)}$	44.83

注: 与对照组比较, $^{1)}P < 0.05$, 与模型组比较, $^{2)}P < 0.05$ 。

Note: Compared with blank control group, $^{1)}P < 0.05$; compared with model group, $^{2)}P < 0.05$.

表 2 排钱草生物碱对 LX-2 细胞 LDH 活性的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of *P. pulchellum* on activity of LDH in LX-2 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	乙醛浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	药物浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
对照组	0	0	217 ± 15.3
模型组	200	0	225 ± 17.2
给药组	200	25	213 ± 19.6
	200	50	229 ± 16.8
	200	100	234 ± 18.4

4 讨论

肝纤维化是对多种原因, 包括病毒、自身免疫、药物、酒精、胆汁瘀积以及代谢疾病在内的各种病因引起的慢性肝损害所致的病理改变, 表现为 ECM 分泌和降解失衡, ECM 的合成大量增加, 远远超过了基质的降解。多数慢性肝病患者都有不同程度的肝纤维化, 早期肝纤维化尚存在可逆性, 所以早期干预、阻止肝纤维化的进展是预防肝硬化发生、发展的关键。中药应用于肝脏疾病的预防和治疗已有数千年的历史, 具有提高免疫力, 调节肝脏功能, 改善肝脏血液循环, 有效修复肝细胞损伤的作用^[8]。

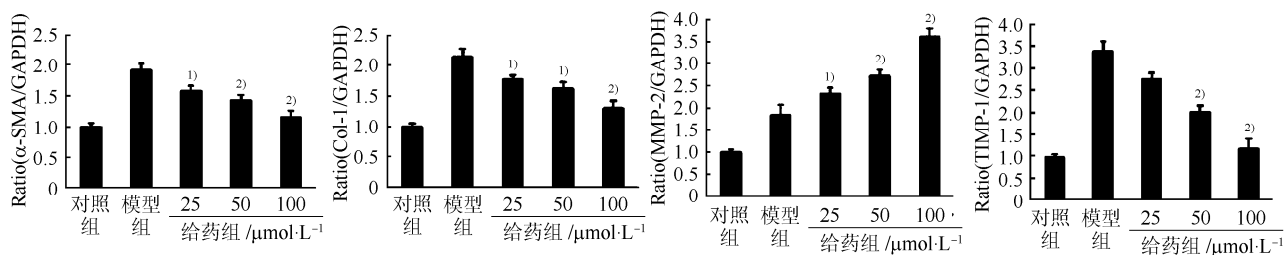


图1 排钱草对乙醛诱导 LX-2 细胞 $\alpha\text{-SMA}$ 、Collagen I、MMP-2、TIMP-1 mRNA 表达的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effect of *P. pulchellum* on the mRNA levels of $\alpha\text{-SMA}$, Collagen I, MMP-2, TIMP-1 mRNA in LX-2($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

HSC 是一种分布于肝脏肝索与肝窦内皮细胞之间间隙内的细胞, 它的激活和增殖是肝纤维化发病的中心环节。肝脏受损时, 静息的 HSCs 发生转录活化, 产生对损伤的应答能力, 被激活成肌成纤维细胞, 发生表型及功能的改变, 通过分泌刺激自身的增殖, 并有大量的胶原产生和分泌 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, $\alpha\text{-SMA}$)过度表达等^[9]。酒精在生物体内经乙醇脱氢酶的作用下转化成乙醛, 乙醛作为 ALF 的关键分子, 参与肝星状细胞的激活与增殖^[10]。因此, 抑制 HSC 活化或诱导其凋亡可以作为抗肝纤维化治疗的理想途径。

肝纤维化病变的主要机制是 ECM 的过度增多和异常沉积。肝脏 ECM 的降解主要通过基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其组织抑制物(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)的平衡来调节^[11]。其中, MMP-2 属于间质胶原酶, 它可参与沉积间质胶原的降解, 是 I 型、III 型胶原以及 $\alpha\text{-SMA}$ 的主要降解酶, 其酶活性主要受 TIMP-1 抑制^[12]。本实验中, 在乙醛诱导下, MMP-2 和 TIMP-1 的表达均有增加, 可能的解释是 TIMP-1 的表达增加是对 MMP-2 增多的适应性反应, 进而 TIMP-1 的明显增加抑制了 MMP-2 的活性, 相对而言, MMP-2 的增加是相对不足的, 因此, 可以通过调节 MMP-2/TIMP-1 的表达, 起到抗肝纤维化的作用。

本研究发现, 乙醛能显著地促进 HSC 的增殖和胶原的合成, 具有诱导肝纤维化的作用, 排钱草生物碱能抑制乙醛的这些作用。排钱草生物碱可能通过以下机制发挥抗肝纤维化的作用: ①排钱草生物碱可明显抑制 HSC 细胞的增殖, 且这种

抑制作用不是特异性细胞毒性所致; ②排钱草生物碱可显著抑制以 $\alpha\text{-SMA}$ 表达增加为特征的 HSC 细胞的激活; ③排钱草生物碱可降低 I 型胶原的表达, 调节胶原降解过程中 MMP-2/TIMP-1 的平衡, 加强对 ECM 的降解作用。

REFERENCES

- [1] SHEN C C, WANG S T, TSAI S Y, et al. Cinnamylphenols from *Phyllodium pulchellum* [J]. J Nat Prod, 2005, 68(5): 791-795.
- [2] 江苏新医学院编, 中药大辞典(下册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 2092.
- [3] TOMMASO M, ELISABETTA C, CALOGERO S, et al. Alcohol induced hepatic fibrosis: Role of acetaldehyde [J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(1/2): 17-21.
- [4] GIANLUCA S B, FRANCESCO R, ANTONIO D S, et al. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells [J]. Hepatology, 2001, 33(5): 1130-1140.
- [5] 黄琳芸, 钟鸣, 杨增艳, 等. 排钱草总生物碱对肝纤维化大鼠血清干扰素- γ 和肝脏组织病理学的影响[J]. 中国中医药科技, 2006, 13(2): 101-102.
- [6] 罗崇念, 卞庆亚, 王硕. 排钱草的药理研究与临床应用[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(1): 158-162.
- [7] BABIN F, TAM H D, DIEHL A M. Chemical and enzymatic oxidative coupling of 5-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamine with amines [J]. J Med Chem, 1987, 30(50): 1239-1241.
- [8] YIN L H, YU H, PENG J Y. Molecular mechanism and intervention of Chinese medicine of carbon tetrachloride induced liver injury [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(9): 1147-1155.
- [9] FRIDMEN S. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Gastroenterology, 2008, 134(6): 1655-1669.
- [10] JIAO J, FRIEDMAN S L, ALOMAN C. Hepatic fibrosis [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25(3): 223-229.
- [11] WU Y, HE H, LIU J. Protective effect of juniperus extract on CCl₄-induced liver fibrosis of rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(1): 35-38.
- [12] 熊敏莉, 吴建新. 基质金属蛋白酶及其抑制因子与肝纤维化[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(24): 4318-4321.

收稿日期: 2016-05-09