

[文章编号] 1000-4718(2008)01-0189-03

# 肝复康对 PDGF 介导的肝星状细胞 信号转导的分子机制\*

李 聪<sup>1</sup>, 湛焱焱<sup>2</sup>, 姜妙娜<sup>1</sup>, 崔晓栋<sup>1</sup>, 贾玉杰<sup>1△</sup>  
(大连医科大学<sup>1</sup> 病理生理教研室, <sup>2</sup> 生化教研室, 辽宁 大连 116027)

**[摘要]** 目的: 通过观察中药肝复康含药血清对肝星状细胞(HSC-T6)细胞株 I、III 型胶原、 $\alpha$ -SMA 基因表达的影响。探讨其抗纤维化的作用机制。方法: 常规方法制备肝复康含药血清,并用不同浓度肝复康含药血清干预 HSC-T6 细胞株,以逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)观察分析 I、III 型胶原、 $\alpha$ -SMA mRNA 表达的变化。以 Western blotting 检测 ERK 蛋白在不同干预情况下的表达。结果: 经肝复康含药血清处理,可下调 HSC-T6 细胞株 I、III 型胶原、 $\alpha$ -SMA mRNA 表达以及 ERK 蛋白表达水平,不同浓度含药血清作用强度也有所不同。结论: 中药肝复康对肝纤维化具有明显的抑制作用,其作用机制可能是通过非特异性干扰 PDGF 功能,抑制 I、III 型胶原、 $\alpha$ -SMA mRNA 的转录,以达到抗纤维化的作用。

**[关键词]** 肝复康; 肝星状细胞; 肝硬化; 血小板源性生长因子

**[KEY WORDS]** Ganfukang compound; Hepatic stellate cells; Liver cirrhosis; Platelet-derived growth factor

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

中药肝复康是本研究室多年来通过反复实验,依四逆散、逍遥散和当归养血汤等化裁组方总结出的抗纤维化经验方,其主要成分有:柴胡、当归(补血合血)、黄芪(益气)、赤芍(活血化瘀)、丹参(活血化瘀)等。经本校附属医院传染科试用后,证实该方具有明显的阻断病毒性乙型肝炎慢性化、减轻肝纤维化及保护肝功的作用,既往的动物实验也已证实其防治作用<sup>[1-3]</sup>。本实验拟从分子水平观察该方抗纤维化的作用。应用半定量 RT-PCR 技术以及 Western blotting 检测方法,进一步揭示中药肝复康对肝星状细胞在肝纤维化中的分子机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 肝星状细胞的性质与传代培养

大鼠肝星状细胞(HSC-T6)细胞株由上海中医药大学肝病研究所徐列明教授惠赠。参照文献<sup>[4]</sup>的方法进行传代培养。

### 2 药物及含药血清的制备

**2.1 药物的制备** 中药肝复康由柴胡、当归(补血合血)、黄芪(益气)、赤芍、白芍(活血化瘀)、丹参(活血化瘀)等组成。其无菌原液由大连医科大学中西医结合研究所按既定的工艺制备(1.95 kg/L)。

**2.2 含药血清的制备** SD 大鼠,清洁级,雌雄各半,体重 300-350 g,随机分为 5 组,分别为正常对照组、模型对照组,及肝复康低、中、高剂量组。按肝复康低、中、高剂量灌胃制备药物血清用,将肝复康按每只 2.08 mL、4.16 mL 和 8.32

mL 分别给大鼠灌胃 7 次,每次间隔 24 h,第 7 次灌胃前 12 h 禁食并在灌胃后 1 h 分别以 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,从下腔静脉取血约 10 mL,对照组血清均以生理盐水代替药物制备。

### 3 肝复康干预 HSC 实验

将传代培养的 HSC 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,按常规方法( $10^5$  cells/cm)接种于 6 孔板中。待细胞近铺满孔底(>80%),换无血清的 DMEM 培养 24 h,而后分为 5 组:即空白对照组:加 10% 正常对照血清的 DMEM;模型对照组:加 10% 正常对照血清 + 血小板衍生生长因子(PDGF,终浓度 60  $\mu$ g/L)的 DMEM;肝复康低剂量组:加 10% 低剂量药物血清 + 血小板衍生生长因子(终浓度 60  $\mu$ g/L)的 DMEM;肝复康中剂量组:加 10% 中剂量药物血清 + 血小板衍生生长因子(终浓度 60  $\mu$ g/L)的 DMEM;肝复康高剂量组:加 10% 高剂量药物血清 + 血小板衍生生长因子(终浓度 60  $\mu$ g/L)的 DMEM。

### 4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 I、III 型胶原和 $\alpha$ -SMA 的 mRNA 表达水平

**4.1 RNA 提取及 cDNA 的合成** 分别取各孔,用 Trizol™ 试剂盒(Invitrogen),按照厂家推荐的操作步骤抽取总 RNA。采用大连 TaKaRa 公司的 RNA PCR 2 步法试剂盒(DRR019A),按其推荐的试剂及浓度加入反应。

**4.2 引物** I 型胶原:上游引物为 5'-TGCCGTGACCT-CAAGATGTG-3',下游引物为 5'-CACAAGCGTGCTGTAG-GTGA-3'; III 型胶原:上游引物为 5'-AGATCATGTCTT-GACTCAAGTC-3',下游引物为 5'-TTTACATTGCCATTGGC-

[收稿日期] 2006-07-25 [修回日期] 2006-12-25

\* [基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (No. 20050161003)

△通讯作者 Tel:0411-84720035; E-mail: pathophy@163.com

CTGA - 3';  $\alpha$  - SMA: 上游引物为 5' - TGTGCTGGACTCTG - GAGATG - 3', 下游引物为 5' - GATCACCTGCCATCAGG - 3';  $\beta$  - actin: 上游引物为 5' - GGTATGGGTCAGAAGGACTCC - 3', 下游引物为 5' - GGCTCCTAGCACCATGAAGATCA - 3', 设置  $\beta$  - actin 为参照。由大连 TaKaRa 公司完成引物合成, PAGE 级别。

**4.3 扩增 PCR** 反应体系为 50  $\mu$ L, 5  $\times$  buffer 10  $\mu$ L, I、III 型胶原、 $\alpha$  - SMA、TIMP - 1、MMP - 2 引物 (20  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L (分别进行), TaKaRa Ex Taq HS 酶 0.25  $\mu$ L, 用水补至 40  $\mu$ L 加入第 1 步反应后液体 10  $\mu$ L。用 PCR 仪扩增。

**5 I、III 型胶原及  $\alpha$  - SMA mRNA 表达半定量分析**

将 PCR 反应产物分别在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳。用凝胶成像系统 (UVP 公司) 对 DNA 条带进行吸光度扫描。实验重复 5 次。

**6 Western blotting 检测不同方式处理后 ERK 蛋白的表达**

制备对数生长期肝星状细胞, 随机分为 6 组, 分别为: 对照组加 10% 正常对照血清的 DMEM; 模型组加 10% 正常对照血清的 DMEM; 肝复康组加 10% 中剂量药物血清; ERK 阻断剂组加 U0126 (ERK 阻断剂, 终浓度为 10  $\mu$ mol/L); PI3K 阻断剂组加 LY - 294002 (PI3K 阻断剂, 终浓度为 10  $\mu$ mol/L); STAT 阻断剂组加 Parthenolide (JAK - STAT 阻断剂, 终浓度为 50  $\mu$ mol/L)。以上各组均作用 30 min 后, 除对照组外, 其余各组均加入血小板衍生生长因子 (终浓度 60  $\mu$ g/L)。反应 10 min 后, 提取不同分组 HSC 总蛋白样品, 考马斯亮蓝法测定样品蛋白含量并调整各上样量至 19.5  $\mu$ g, 行 Western blotting 检测。

**7 统计学处理**

多组比较用方差分析, 两组间比较用 *t* 检验。数据用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

**结 果**

**1 药物血清对 HSC - T6 细胞 I、III 型胶原 mRNA 表达的影响**

在未加入 PDGF 刺激的空白对照组, HSC - T6 细胞 I、III 型胶原 mRNA 表达呈相对低水平; 加入对照血清及 PDGF 刺激的模型对照组, 与空白对照组相比 I、III 型胶原 mRNA 表达明显上调 ( $P < 0.01$ ); 在药物血清组, 与模型对照组相比, 由 PDGF 刺激诱导的 HSC - T6 细胞 I、III 型胶原 mRNA 表达增加明显受到抑制 ( $P < 0.01$ ); 不同剂量药物产生的干预效果不同, 肝复康各剂量之间比较, 以中剂量组 I 型胶原 mRNA 表达降低最明显, 优于低剂量组 ( $P < 0.01$ ), 和高剂量组相比无显著差异; 中剂量组 III 型胶原 mRNA 表达在 3 个剂量组之间相比无显著差异, 见图 1、2。

**2 药物血清对 HSC - T6 细胞  $\alpha$  - SMA mRNA 表达的影响**

在空白对照组, HSC - T6 细胞  $\alpha$  - SMA mRNA 表达呈相对低水平; 而模型对照组  $\alpha$  - SMA mRNA 表达明显高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ); 药物血清各组均具有能明显抑制这种升高的作用 ( $P < 0.01$ ), 3 个剂量组之间相比无显著差异, 见图 3。

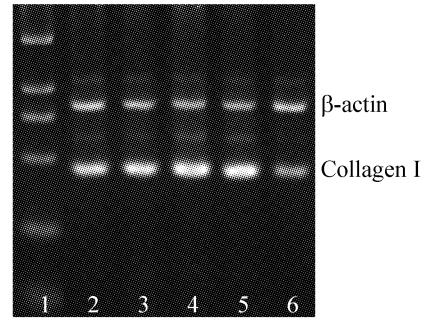


Fig 1 Expression of collagen I mRNA. 1: marker, from upper to lower: 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; 2: medium dosage medicine serum group; 3: high dosage medicine serum group; 4: low dosage medicine serum; 5: model group; 6: control group.

图 1 I 型胶原 mRNA 表达

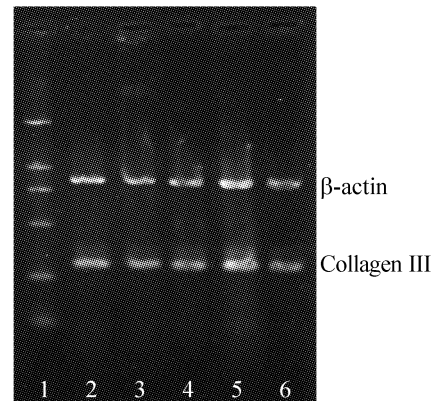


Fig 2 Expression of collagen III mRNA. 1: marker, from upper to lower: 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; 2: medium dosage medicine serum group; 3: high dosage medicine serum group; 4: low dosage medicine serum; 5: model group; 6: control group.

图 2 III 型胶原 mRNA 表达

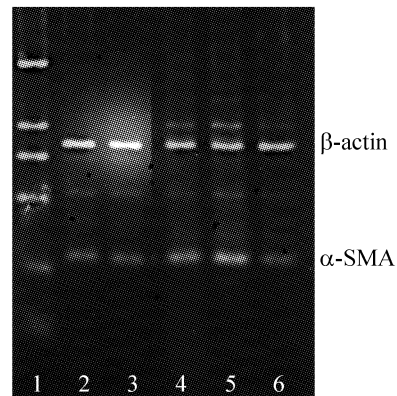


Fig 3 Expression of  $\alpha$  - SMA mRNA. 1: marker, from upper to lower: 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; 2: medium dosage medicine serum group; 3: high dosage medicine serum group; 4: low dosage medicine serum; 5: model group; 6: control group.

图 3  $\alpha$  - SMA mRNA 表达

### 3 不同组 HSC - T6 细胞 ERK 蛋白的表达

HSC - T6 细胞 ERK 蛋白表达在不同干预条件下存在差别,表现为对照组、模型组、肝复康组、阻断剂组各免疫印迹

条带的灰度及面积不同,灰度越深所占面积越大,表明 ERK 蛋白表达量越多,见图 4。

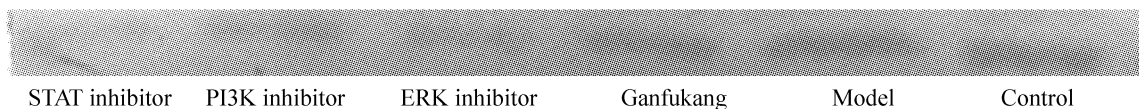


Fig 4 ERK protein expression detected by Western blotting.

图 4 Western blotting 显像后条带情况

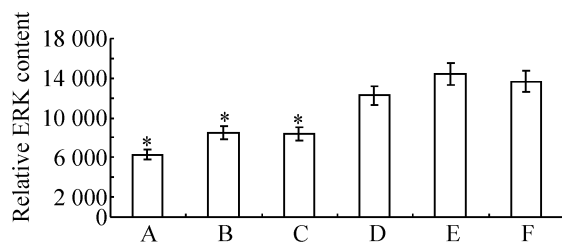


Fig 5 Effects of Ganfukang, ERK blocker, PI3K blocker, STAT blocker on PDGF - induced ERK protein levels in HSC.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ . A: STAT inhibitor; B: PI3K inhibitor; C: ERK inhibitor; D: Ganfukang; E: model; F: control. Above column graph is processed by Qutiscan analysis software. \*  $P < 0.05$  vs model group.

图 5 用 Qutiscan 分析软件处理后的柱状图

## 讨 论

肝纤维化的发生机制是十分复杂的病理过程<sup>[5]</sup>,多数研究表明间质细胞,尤其是肝星形细胞(hepatic stellate cell, HSC)在肝纤维化的发生发展中起重要作用。而血小板衍生生长因子(platelet - derived growth factor, PDGF)是目前已知多肽生长因子中对肝星形细胞作用最强的有丝分裂原。激活的肝星形细胞主要特征包括 HSC 增殖和  $\alpha$  - 平滑肌激动蛋白( $\alpha$  - muscle muscle actin,  $\alpha$  - SMA)的表达。活化的肝星形细胞可合成大量的细胞外基质(I型和III型胶原等),直接导致肝纤维化。HSC - T6 是用于探讨肝纤维化分子机制1个比较理想的模型。本实验中,HSC - T6 细胞在用 PDGF 刺激后,I、III型胶原、 $\alpha$  - SMA mRNA 显著升高,而与正常非药物血清相比:药物血清可显著抑制 HSC - T6 细胞 I、III型胶原、 $\alpha$  - SMA mRNA 转录。

PDGF 可启动不同的信号转导通路发挥其生物学效应,目前已知的主要通路有:Ras/细胞外信号调节激酶(extracellular signal - regulated kinase, ERK)途径;磷脂酰肌醇3 - 激酶(phosphatidylinositol - 3 kinase, PI3K)途径;Janus 激酶(Janus kinase, JAK)/信号转导子和转录激活子途径(signal transducer and activator of transcription, STAT)。尽管有关血小板衍生生长因子在肝星形细胞内信号转导中的3个途径这一方面的发现,已经逐渐得到人们的关注,国外有学者曾就此做过相关研究<sup>[6]</sup>。但有关中药对上述3个途径的具体干预作用

却报道甚少,而针对这3个途径之间相互作用(cross - talk)的研究,则更是鲜有报道。本实验发现:应用中药肝复康可通过干预 Ras/ERK 途径,从而减弱 ERK 的表达,以达到抗肝纤维化的目的。同时,在分别应用 STAT、PI3K 阻断剂后,其 ERK 的表达也有不同程度的下降,因此,我们推测在肝星形细胞内 Ras/ERK 和 JAK/STAT 途径之间、Ras/ERK 和 PI3K 途径之间存在着相互作用,即 cross - talk。Marra 等<sup>[7]</sup>曾对 PDGF 在肝星形细胞内 Ras/ERK 和 PI3K 途径的相互关系进行了观察,认为在 Ras/ERK 和 PI3K 途径之间存在着 cross - talk。本实验也得出了类似的结论。但针对其它途径之间的关系尚未见报道。

## [参 考 文 献]

- [1] 徐婷婷,姜妙娜,贾玉杰,等. 肝复康对实验性大鼠肝纤维化肝组织 I、III 型胶原含量的影响[J]. 山东中医杂志, 2004, 23(11): 682 - 684.
- [2] 车颖,徐婷婷,姜妙娜,等. 肝复康对实验性肝纤维化大鼠肝细胞的保护作用[J]. 中药材, 2004, 27(6): 428 - 429.
- [3] 车颖,徐婷婷,姜妙娜,等. 肝复康抗大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 599 - 600.
- [4] 张国,张法灿,王天才,等. 活血软坚方对肝星状表达细胞 Smad 信号的影响及意义[J]. 中华肝脏杂志, 2004, 12(4): 213 - 215.
- [5] 牛春红,韩德五,刘近春,等. TNF -  $\alpha$  和 IL - 10 在肝硬化发生发展中动态变化的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(12): 2469, 2473.
- [6] Imanishi Y, Maeda N, Otagawa K, et al. Herb medicine Inchin - ko - to (TJ - 135) regulates PDGF - BB - dependent signaling pathways of hepatic stellate cells in primary culture and attenuates development of liver fibrosis induced by thioacetamide administration in rats [J]. J Hepatol, 2004, 41(2): 242 - 250.
- [7] Marra F, Pinzani M, DeFranco R, et al. Involvement of phosphatidylinositol 3 - kinase in the activation of extracellular signal - regulated kinase by PDGF in hepatic stellate cells [J]. FEBS Lett, 1995, 376(3): 141 - 145.