

- 3 Iwasaki T, Nakata A, Mukai M, Shinkai K, Yano H, Sabe H, Schaefer E, Tatsuta M, Tsujimura T, Terada N, Kakishita E, Akedo H. Involvement of phosphorylation of Tyr-31 and Tyr-118 of paxillin in MM1 cancer cell migration. *Int J Cancer* 2002;97:330-335
- 4 Shigetomi A, Kotoh T, Harada T, Morikawa S, Nakamura T. Development of an experimental model for spontaneous lymph node metastasis of human esophageal carcinoma in nude mice histopathological analysis. *Hum Cell* 1992;5:273-281
- 5 Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rudiger M, Schluter K, Stanke G, Winkler J. The molecular architecture of focal adhesions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:376-416
- 6 Tu LC, Chou CK, Chen HC, Yeh SF. Protein kinase C-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase requires cytoskeletal integrity and is uncoupled to mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells. *J Biomed Sci* 2001;8:184-190
- 7 Haier J, Nicolson GL. Role of the cytoskeleton in adhesion stabilization of human colorectal carcinoma cells to extracellular matrix components under dynamic conditions of laminar flow. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:713-721
- 8 Turner CE. Paxillin interactions. *J Cell Sci* 2000;113:4139-4140
- 9 Vadlamudi R, Adam L, Tseng B, Costa L, Kumar R. Transcriptional up-regulation of paxillin expression by heregulin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1999;59:2843-2846
- 10 Salgia R, Li JL, Ewaniuk DS, Wang YB, Sattler M, Chen WC, Richards W, Pisick E, Shapiro GI, Rollins BJ, Chen LB, Griffin JD, Sugarbaker DJ. Expression of the focal adhesion protein paxillin in lung cancer and its relation to cell motility. *Oncogene* 1999;18:67-77
- 11 刘红岩. 整合素激活 FAK 介导的信号传导途径研究进展. 国外医学免疫学分册 2000;23:1-5
- 12 Rodina A, Schramm K, Musatkina E, Kreuser ED, Tavitian A, Tatosyan A. Phosphorylation of p125FAK and paxillin focal adhesion proteins in src-transformed cells with different metastatic capacity. *FEBS Lett* 1999;455:145-148
- 13 Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, Hunter T. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 2001;21:4016-4031
- 14 苏剑敏, 桂律, 周逸平, 查锡良. 粘着斑激酶在胃癌中的表达及其临床意义. 实用癌症杂志 2000;15:341-343
- 15 Cajot JF, Sordat I, Silvestre T, Sordat B. Differential display cloning identifies motility-related protein (MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1997;57:2593-2597

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 丹参对 TGF- $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 细胞 c-fos mRNA 表达和 AP1 蛋白结合活性的影响

胡旭东, 王晓玲, 董普德, 吴小江, 刘平

胡旭东, 王晓玲, 董普德, 吴小江, 上海中医药大学生物教研室 上海市 200032  
刘平, 上海中医药大学肝病研究所 上海市 200032  
上海市高等学校科学技术自然科学基金资助课题, No. 99C03  
项目负责人: 王晓玲, 200032, 上海市零陵路 530 号, 上海中医药大学生物教研室. wxlzzx@sohu.com  
电话: 021-54231704  
收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-04-03

### 摘要

目的: 研究丹参对 TGF $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 成纤维细胞功能的影响。

方法: 将正常大鼠进行丹参灌胃, 分离含药血清, 温育 TGF $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 成纤维细胞. RT-PCR 法检测 c-fos 基因表达, Gel mobility shift assay 法检测 AP1 蛋白的结合活性。

结果: 经 TGF $\beta$ 1 刺激后, 细胞 c-fos mRNA 表达及 AP1 蛋白结合活性明显增强, 丹参含药血清可分别抑制由 TGF $\beta$ 1 引起的细胞 c-fos mRNA 表达及 AP1 蛋白结合活性的增强。

结论: 丹参可以抑制 TGF $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 成纤维细胞中的 c-fos 基因表达及 AP1 蛋白结合活性。

胡旭东, 王晓玲, 董普德, 吴小江, 刘平. 丹参对 TGF- $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 细胞 c-fos mRNA 表达和 AP1 蛋白结合活性的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11(10):1634-1636  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1634.asp>

### 0 引言

正常情况下, 成纤维细胞中胶原蛋白处于合成代谢和分解代谢的动态平衡中. 在某些条件诱导下, 导致合成代谢大于分解代谢, 造成胶原蛋白(其中以 I 型胶原为主)过度增生沉积于细胞间质中而发生纤维化. 这是心脏、肝脏、肾脏等各种脏器发生纤维化的细胞学基础. 纤维化阶段是抑制和逆转疾病进一步发展的关键时期, 也是药物介入的最佳时期, 因此, 此阶段常作为治疗学上的研究对象和药物作用的关键环节。

在纤维化的起始阶段, 各种始动因素促使多种细胞因子的释放, 其中转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1, TGF $\beta$ 1) 是目前所知最强大的促胶原生成因子, 在各种纤维化模型中, TGF $\beta$ 1 mRNA 主要定位在纤维化局部区域. TGF $\beta$ 1 对胶原基因表达的调节有一部分直接发生在转录水平上, TGF $\beta$ 1 可使 I 型胶原  $\alpha$ 1 和  $\alpha$ 2 链的转录速率分别增加 2-3 和 4 倍, 他通过诱导细胞核内立早基因(immediate early genes)内如 c-fos 与 c-jun 的表达增加转录调节因子(如 AP1、NF1 等), 并通过增强转录调节因子 AP1、NF1 等与响应顺式作用元件的结合活性, 使胶原基因的启动子活性增强而促进胶原的合成. 在小鼠、大鼠及人胶原基因的启动子上均有 TGF $\beta$ 1 的作用位点<sup>[2, 11]</sup>; 其中 I 型胶原  $\alpha$ 2 链

(COL1A2)启动子中存在一个核转录因子AP1(c-fos和c-jun的产物)结合位点对TGFβ1调节I型胶原的表达起着非常关键的作用。

丹参是活血化瘀药的代表之一,素有“丹参一味,功同四物”之称,广泛应用于心血管疾病中。近年来,临床<sup>[5]</sup>与动物实验<sup>[3,6]</sup>均证实,丹参能有效改善肝脏炎症,减轻细胞外基质的增生与沉积,有较好的抗纤维化作用,也常常作为抗纤维化复方的君药。因此,在既往研究的基础上,探讨丹参影响TGFβ1促I型胶原生成的机制及其抗纤维化的主要作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 药物:丹参为唇形科植物丹参*saliva miltiorrhiza* Bge的干燥根及根茎,由上海中华制药厂协助制成流浸膏。主要试剂:重组人TGFβ1, Calbiochem 公司产品;1640培养基及Moloney鼠白血病病毒逆转录酶, GIBCO 公司产品;PCR markers 及六聚体随机引物、gel mobility shift assay 试剂盒, Promega 产品;γ-<sup>32</sup>P-ATP (5 000 Ci/mmol) 北京福瑞生物工程公司;其余试剂为国产或进口分析纯。引物: GAPDH引物(甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 长度为299 bp)<sup>[8]</sup>、c-fos引物(长度为432 bp)<sup>[9]</sup>。细胞:小鼠胚胎 NIH/3T3 成纤维细胞株, 购自中国科学院上海细胞研究所。

1.2 方法 (1)丹参含药血清制备方法:使用丹参流浸膏灌胃,用量为体重65 kg成人的10倍,对照组给予等量的生理盐水;大鼠2次/d灌胃2 d,第3 d首次灌胃2 h后追加1次,再1 h后自后腔静脉采血,离心分离含药血清<sup>[1]</sup>。(2)细胞培养:以含100 mL/L小牛血清的1640培养液,在50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37 °C潮湿空气的培养箱中培养,长至亚单层后,更换为丹参含药血清及TGFβ1(5 ng/mL)继续培养24 h,收取细胞层标本。(3)RT-PCR 及其产物分析:异硫氰酸胍一步法提取细胞总RNA<sup>[10]</sup>,取总RNA 1-2 μg 经逆转录后,进行PCR 30-35个循环扩增。产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳,紫外透射反射仪观察及照相,以GAPDH作为内参照,调节各组总RNA用量。(4)gel mobility shift assay:参照文献方法提取细胞核蛋白<sup>[7,13]</sup>,考马斯亮蓝法定量蛋白。5'-末端标记寡核苷酸,反应体系为:寡核苷酸(1.75 pmol/μL) 2 μL、T4 激酶缓冲液 1 μL、[γ-<sup>32</sup>P-ATP] 1 μL、无核酸酶水 5 μL、T4 激酶 1 μL, 37 °C 10 min,加入0.5 mol/L EDTA 1 μL 终止反应,再加入89 μL TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 1 mmol/L EDTA)。G-25柱分离除去未标记核苷酸。DNA结合反应体系为:无核酸酶水 5 μL 5×shift缓冲液 2 μL、核提取物 10 μg 蛋白,室温 10 min,加入1 μL <sup>32</sup>P 标记寡核苷酸,室温 20 min。反应结束后,取10 μL 样品经40 g/L凝胶,0.5×TBE 缓冲液(TRIS 碱 5.39 g, 硼酸 2.75 g, EDTA-Na<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.37 g)电泳,固定、增感、水洗、干胶、放射自显影 10-72 h,定影、显影。

## 2 结果

2.1 丹参对 c-fos mRNA 表达的影响 TGFβ1 作用组较对照组 c-fos mRNA 表达显著增加,丹参加 TGFβ1 组较 TGFβ1 单独作用组 c-fos mRNA 表达量显著减少(图1)。

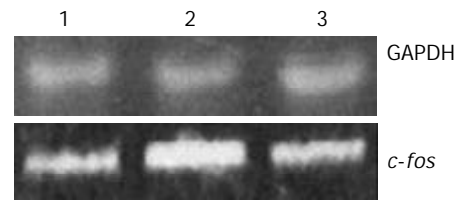


图1 c-fos RT-PCR 电泳图。1: 丹参+TGFβ1 组; 2: TGFβ1 组; 3: 对照组。

2.2 丹参对转录因子 AP1 对启动子结合活性的影响 TGFβ1(5ng/mL)作用后, NIH/3T3 细胞 AP1 对启动子结合活性明显增加,而 100 mL/L 丹参药物血清可拮抗 TGFβ1 的作用,使 AP1 对启动子结合活性下降(图2)。



图2 AP1 结合活性分析。1: 阳性对照组(Hela 细胞核提取物); 2: 正常对照; 3: TGFβ1 组; 4: 丹参+TGFβ1 组。

## 3 讨论

TGFβ1 是目前所知的最强大的促胶原生成因子。在小鼠、大鼠及人胶原 2 条多肽链基因的启动子上均有 TGFβ1 的作用位点<sup>[2]</sup>,因此, TGFβ1 对胶原的调节至少有一部分直接发生在转录水平。TGFβ1 的促胶原表达是通过转录调节因子的参与而进行的。目前已知,由 c-fos 和 c-jun 基因产物组成的 AP1 蛋白及其家族参与了 TGFβ1 对胶原启动子的作用<sup>[2,12]</sup>。

本文的研究结果显示,经 TGFβ1 作用后, c-fos 的表达和 AP1 蛋白的结合活性明显增加,提示 TGFβ1 的促胶原生成作用有一部分是通过促进 c-fos 的转录增加和 AP1 蛋白的表达增加而实现的,而丹参可降低 TGFβ1 刺激的 c-fos 的转录增加及 AP1 蛋白的结合活性。结合以往的研究发现:丹参对 TGFβ1 所产生的明显促进 I 型胶原 α2 链基因表达的作用也有部分抑制效果<sup>[1]</sup>。表明丹参通过拮抗 TGFβ1 的作用来影响胶原蛋白的表达,丹参对 TGFβ1 刺激的 NIH/3T3 细胞 I 型胶原表达的抑制作用有一部分是其抑制 c-fos 基因表达和 AP1 蛋白结合活性的结果。国外已有文章报道,胶原基因启动子竞争性结合物可以通过拮抗 TGFβ 与启动子的结合从而抑制

由 TGF $\beta$  诱导的胶原细胞中胶原蛋白的生成<sup>[15]</sup>, 丹参对胶原蛋白产生的抑制作用是否也与胶原基因启动子的竞争性结合有关, 值得进一步研究.

最近的研究证明, 丹参抗纤维化的有效成分之一的丹参酚酸 B 可通过干扰 TGF $\beta$ 1 在肝星状细胞胞质中的信号通路进而影响肝星状细胞的胶原生成<sup>[4, 14]</sup>, 和本研究中丹参影响成纤维细胞 TGF $\beta$ 1 的细胞核内信号转导的结果相结合, 可看到丹参抗纤维化作用的一些作用位点和机制, 为丹参的进一步临床应用和开发提供理论依据.

#### 4 参考文献

- 1 王晓玲, 刘平, 董普德, 谭英姿, 钱汝红, 胡旭东, 蒋文娟. 丹参对转化生长因子  $\beta$ 1 刺激的 NIH/3T3 细胞表达 I 型胶原和 c-fos mRNA 的影响. 中西医结合肝病杂志 2001;11:19-20
- 2 王晓玲, 刘平, 刘成. 转化生长因子  $\beta$ , 对 I 型胶原基因转录的调节. 中西医结合肝病杂志 1998; 8(增刊):196-199
- 3 胡义扬, 刘平, 刘成, 顾宏图, 徐列明, 刘成海, 季光. 丹参提取物对 CCl<sub>4</sub> 和 DMN 诱导的大鼠肝纤维化的影响. 上海中医药杂志 1999;10:7-10
- 4 刘成海, 刘平, 胡义扬, 朱大元. 丹酚酸 B 盐对转化生长因子 - $\beta$ 1 刺激肝星状细胞活化与胞内信号转导的作用. 中华医学杂志 2002;82:1267-1272
- 5 余亚新, 杨汉青, 朱立专, 曹莉, 刘宗良, 朱礼尧, 张尔康, 田永明, 沈怀成, 滕士超. 大剂量丹参治疗肝纤维化的临床观察. 上海中医药杂志 1994;2:8-10
- 6 张灵芝, 赵元昌, 韩德五, 陈贤明, 许瑞龄, 尹镭, 马学惠. 丹参在抗肝细胞坏死中的钙拮抗作用. 中国病理生理杂志 1993;9:191-195
- 7 Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research* 1983;11:1475-1489
- 8 Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, Appay MD, Philippe M, Sassy-Prigent C, Bariety J, Michel JB. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. Effect of losartan and spironolactone. *Hypertension* 1995;26: 101-111
- 9 Potter JJ, Rennie-Tankersley L, Anania FA, Mezey E. A transient increase in c-myc precedes the transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblast-like cells. *Liver* 1999; 19:135-144
- 10 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
- 11 Carcamo J, Weis FM, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 1994;14:3810-3821
- 12 Jardine H, MacNee W, Donaldson K, Rahman I. Molecular mechanism of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced glutathione depletion in alveolar epithelial cells. Involvement of AP-1/ARE and Fra-1. *J Biol Chem* 2002;277: 21158-21166
- 13 Smart DE, Vincent KJ, Arthur MJ, Eickelberg O, Castellazzi M, Mann J, Mann DA. JunD regulates transcription of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and interleukin-6 genes in activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2001;276:24414-24421
- 14 王晓玲, 刘平, 谭英姿, 董普德, 蒋文娟. 丹参酚酸乙对转化生长因子  $\beta$ 1 刺激的大鼠肝星状细胞的观察. 中华肝脏病杂志 2001;6: 96-97
- 15 Meisler NT, Chiu JF, Cutroneo KR. Promoter competitors as novel antifibrotics that inhibit transforming growth factor-beta induction of collagen and noncollagen protein synthesis in fibroblasts. *J Cell Biochem* 1999;75:196-205

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用

郝悦, 周新民

郝悦, 武警海南总队医院消化内科 海南省海口市 570203  
周新民, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化内科 陕西省西安市 710033  
项目负责人: 郝悦, 570203, 海南省海口市文明东路 49, 武警海南总队医院消化内科. haikouhaoyue@hotmail.com  
电话: 0898-68284056 传真: 0898-65343033  
收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-03-26

#### 摘要

目的: 探讨左旋精氨酸(L-arg)对大鼠肝脏缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用.

方法: 将 24 只 SD 大鼠随机分为对照组(n =12)和灌喂精氨酸组(n =12). 制备大鼠肝 I/R 损伤模型, 观察损伤后谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)和肝组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量变化及肝组织病理变化.

结果: L-arg 组: ALT、AST、LDH 明显下降 t 分别为 3.66,

14.28, 6.22 (P <0.01). MDA 含量明显降低(t =3.21, P <0.01), SOD 及 NO 活性明显升高(t =3.71, 8.93, P <0.01), 组织的病理改变也轻于对照组.

结论: 左旋精氨酸具有减轻肝 I/R 引起的肝功损害和脂质过氧化损害, 其机制可能与血清 NO 含量增加有关.

郝悦, 周新民. 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1636-1638

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1636.asp>

#### 0 引言

肝 I/R 损伤是临床上广泛关注的问题, 常见于许多临床病理过程和创伤外科疾病的肝脏手术过程, 如失血性休克, 肝切除和肝移植等. 肝 I/R 时, 肝脏组织细胞发生了一系列代谢、结构和功能的紊乱<sup>[1]</sup>. 本实验探讨精氨酸对大鼠肝 I/R 损伤的作用及影响.