

含量的影响;结果见表 4。

表 4 青龙衣不同提取部位对 H₂₂小鼠瘤细胞膜和红细胞膜 SA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 4 Effect of DEQ on SA in cancer cell membrane and erythrocyte membrane in H₂₂-mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组 别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	瘤细胞膜 (A)	红细胞膜 (A)
生理盐水	—	0.070 ± 0.015	0.078 ± 0.018
环磷酰胺	20	0.030 ± 0.013	0.090 ± 0.013
冷醇提取部位	191.37	0.034 ± 0.019*	0.098 ± 0.011*
	95.68	0.042 ± 0.017*	0.116 ± 0.025*
	47.84	0.056 ± 0.023*	0.086 ± 0.012
热醇提取部位	121.17	0.037 ± 0.014*	0.131 ± 0.023*
	60.58	0.048 ± 0.018*	0.126 ± 0.029*
	30.29	0.066 ± 0.011	0.094 ± 0.015*

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs NS group

表 3 和 4 结果表明,青龙衣两个提取部位均能明显降低瘤细胞膜表面 SA 含量,与生理盐水比较差异显著 ($P < 0.05$),并能显著升高红细胞膜表面的 SA 含量,与生理盐水比较差异显著 ($P < 0.05$),表明青龙衣两个提取部位抗肿瘤作用机制很可能是通过影响细胞膜来实现的。

4 讨论

通过生物膜研究疾病,是目前探讨疾病发病机制的重要途径之一。SA 参与许多生物学现象的调控,包括激素的作用、酶的催化、细胞间的识别和黏着、免疫反应、物质转运、突触的传递、神经的再生及神经中枢的高级神经活动等^[5]。研究表明,肿瘤细胞膜表面 SA 含量与正常细胞表面的含量相比有显著增加。肿瘤细胞膜上 SA 的异常增加与肿瘤恶性程度有关^[6]。本实验结果表明青龙衣冷、热醇提取部位均能显著降低荷瘤小鼠瘤细胞表面 SA 含量,说明

其具有一定抗肿瘤转移能力^[7,8],其作用是抑制了正常细胞转变为肿瘤细胞。本实验结果还表明青龙衣不同提取部位均能显著增加红细胞膜表面 SA 含量。提示青龙衣抗肿瘤的机制可能是抑制了肿瘤的血行转移,即抑制了 SA 从红细胞膜表面的脱落,从而延缓正常的红细胞的免疫功能低下的过程。

青龙衣两个提取部位中主要含有胡桃醌、苷类和少量多糖类物质,抗肿瘤作用明显。由本实验看,青龙衣两个提取部位能延长荷瘤小鼠生命,对小鼠肉瘤生长也有明显的抑制作用。从免疫器官的影响来看,具有降低免疫器官指数的趋势,因此可以推测是其毒性作用的表现。但与环磷酰胺比较,作用又较小 ($P < 0.05$),推测与其含有多糖类物质有关。

References:

- [1] Alkhawa J A. Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia* Am [J]. *Chin Med*, 1997, 25(12): 175-180.
- [2] Xu S Y. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.
- [3] Li J W, Zhang T W, Zen W, et al. Apply coomassie blue method to measure protein quantitation [J]. *Chin J Biologic* (中国生物制品杂志), 2000, 13(2): 118-120.
- [4] Xu W. Experiment studies on the inhibition and immune activities on Qinglongyi power injection preparation [J]. *China J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2002, 8(10): 39-41.
- [5] Zhang C M, Liu Y, Yang H C. Biological functions and clinical significances of sialic acid [J]. *J Haerbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 1990, 24(6): 500.
- [6] Lin S Q, Li J W. Effects of expression of α -2, 6-(ST6Gal I) to sialic colon tumor cell [J]. *J Mod Clin Med Bioeng*, 2004, 10(1): 1-3.
- [7] Li S S. Biology progress of sialic acid and sialic acid ramification [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 1997, 2(2): 70.
- [8] Isao K S, Miyazawa T, Itoh M, et al. Possible mechanism of inhibition of experimental pulmonary metastasis of mouse colon adenocarcinoma 26 sublines by a sialic acid: nucleoside conjugate [J]. *Cancer Res*, 1988, 48: 3728.

复方 861 对人肝星状细胞 α -平滑肌肌动蛋白 mRNA 表达的调节作用

王 琳^{1,4}, 王宝恩², 肖培根³, 汪 建⁴, 乔延江¹, 谈学海⁴

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京友谊医院 肝病研究中心, 北京 100050; 3. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 4. 北京华大基因研究中心, 北京 101300)

摘 要:目的 研究复方 861 对人肝星状细胞 (LX-2) 中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 基因表达的调节作用。方法 应用基于 SYBR-Green I 的实时定量荧光 PCR 方法,研究复方 861 分别作用 24、48、72 h 后, LX-2 细胞中 α -SMA

收稿日期:2003-12-06

基金项目:中国科学院创新工程项目 (KSCX2-SW-207)

作者简介:王 琳(1973—),女,山西太原人,助教,博士研究生,1998年毕业于北京中医药大学,而后在北京中医药大学任教,并从事证候学的研究工作,2001年考取北京中医药大学与北京华大基因研究中心联合培养的博士,导师为肖培根院士和王宝恩教授,研究方向为中药基因组学。

mRNA 含量的变化情况。结果 复方 861 在 48 和 72 h 可以显著降低 LX-2 细胞中 α -SMA mRNA 含量。结论 复方 861 可抑制 LX-2 细胞中 α -SMA 基因的表达,提示其抗肝纤维化作用可能与其抑制 LX-2 细胞的活化有关。

关键词:复方 861;实时定量 PCR;人肝星状细胞; α -平滑肌肌动蛋白

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2004)10-1147-04

Effects of Compound 861 on expression of α -smooth muscle actin mRNA in human hepatic stellate cells

WANG Lin^{1,4}, WANG Bao-en², XIAO Pei-gen³, WANG Jian⁴, QIAO Yan-jiang¹, TAN Xue-hai⁴

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Liver Research

Center, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100050, China; 3. Institute of Medicinal Plants Development,

Chinese Academy of Medical Science and Peking Union of Medical College, Beijing 100094,

China; 4. Beijing Genomic Institute, Beijing 101300, China)

Abstract: **Object** To investigate the effects of Compound 861 (Cpd861) on expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in human hepatic stellate cells (LX-2 cells). **Methods** Real-time quantitative PCR method using SYBR Green I technology was taken to measure the effects of Cpd861 on expression of α -SMA mRNA in LX-2 cells treated by Cpd861 for 24, 48 and 72 h. **Results** The expression levels of α -SMA mRNA decreased significantly in LX-2 cells exposed to Cpd861 for 48 h ($P < 0.05$) or 72 h ($P < 0.01$). **Conclusion** Cpd861 can reduce the expression levels of α -SMA mRNA in LX-2 cells.

Key words: Compound 861 (Cpd 861); real-time quantitative PCR; human hepatic stellate cell; α -smooth muscle actin

肝星状细胞是肝纤维化形成时细胞外基质表达和沉积的主要细胞来源。在正常的肝脏中,星状细胞处于静息状态,它的主要功能是贮存维生素 A,同时可能与维持正常的基底膜有关。当肝脏受到损伤时,肝星状细胞由静息状态被激活成为具有增殖、纤维分泌和收缩等活性的肌成纤维细胞,并大量表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)。目前普遍认为, α -SMA 是肝星状细胞活化的重要标志^[1~4]。

复方 861 是北京友谊医院王宝恩教授研制的,由丹参、黄芪、鸡血藤等中药组成的抗纤维化中药复方。实验研究表明,该药具有抑制炎症、降低肝组织中胶原含量,减少肝纤维化相关因子表达等抗肝纤维化作用,能有效逆转慢性肝病所致肝纤维化和早期肝硬化^[5,6]。本研究采用实时定量荧光 PCR 方法,观察该药对人肝星状细胞中 α -SMA mRNA 表达的影响,以期进一步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:复方 861 由北京友谊医院提供,批号 2002053001。高糖 DMEM 培养基、链霉素、L-谷氨酰胺、TRIzol、oligo (dT)₁₅ 和 moloney murine leukemia virus reverse transcriptases (M-MLV RT) 均购自 Invitrogen。胎牛血清为 Hyclone 产品。青霉素为 Sigma 产品。dNTP 为 Promega 公司产品。荧光染料 SYBR Green I 购自上海开放科技发

展有限公司。热启动的 Taq DNA 聚合酶购自北京天为时代科技有限公司。

1.2 细胞株:人肝星状细胞株(LX-2)由美国 Friedman Scott L. 教授和纽约 Mount Sinai 医学院惠赠。细胞用含 5% 胎牛血清、200 mmol/L L-谷氨酰胺、1% 青霉素和 1% 链霉素的 DMEM 培养基培养。

1.3 主要仪器:Thermo Forma 3110 series II 型 CO₂ 培养箱由美国 Forma Scientific Inc 公司生产; iCycler iQ 实时定量 PCR 系统为美国 Bio-Rad 公司产品;2800R 低温离心机为德国 Heraeus 产品。

1.4 方法

1.4.1 总 RNA 的提取和 cDNA 合成:取对数生长期的 LX-2 细胞,胰酶消化,用含 5% 胎牛血清的 DMEM 接种于细胞培养皿中,培养 3 d 后,将培养液小心移除,加入含复方 861 (终质量浓度为 0.01 mg/mL,该剂量作用于 LX-2 细胞 72 h 后,细胞存活率 > 90%) 的新鲜培养液(对照只加同体积培养液)。加药后 24、48、72 h,用 TRIzol 提取细胞总 RNA,后用 oligo (dT)₁₅ 和 M-MLV RT 逆转录合成 cDNA。

1.4.2 实时定量荧光 PCR 检测:采用 iCycler iQ 实时定量 PCR 系统对 cDNA 产物进行扩增和检测。人的 α -SMA 和 G3PDH 引物采用 Primer 3 软件设计,引物序列见表 1。PCR 采用 25 μ L 反应体

系,包含 20x SYBR Green 1.25 μL , cDNA (50 ng RNA) 1 μL ,引物 (5 nmol/ μL) 2 μL ,热启动 Taq DNA 聚合酶 0.75 U,无镁离子的 10 $\times$ 缓冲液 2.5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 2.5 μL ,dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL ,ddH₂O 15.1 μL 。在阴性对照管中,加入 ddH₂O 1 μL 以代替 cDNA。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,59 $^{\circ}\text{C}$ (α -SMA) 或 60 $^{\circ}\text{C}$ (G3PDH) 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s。程序设定在每个循环延伸后,收集荧光,并以荧光强度(单位为 RFU)为纵坐标,循环数为横坐标,绘制曲线,以此计算每个样品的阈值(Threshold Cycle, C_t 值)。分别以含目的基因(α -SMA 和 G3PDH)的 T-easy vector 质粒(已经测序鉴定)为模板标准品,以 10 倍系列稀释,进行扩增。以标准品拷贝数的对数为横坐标,其 C_t 为纵坐标绘制标准曲线。将待测样品 C_t 值与标准曲线对照,即获得待测样品基因拷贝数。为消除样品间因总 RNA 含量不同所致实验误差,用 G3PDH 对结果进行校正。在 PCR 扩增完成后,绘制产物溶解曲线(温度变化 55~95 $^{\circ}\text{C}$),以分析 PCR 产物是否存在非特异性扩增。

表 1 人 α -SMA 和 G3PDH 基因引物序列Table 1 Oligonucleotide PCR primers for human α -SMA and G3PDH

引物名称	序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
α -SMA	正向 ACT GGG ACG ACA TGG AAA AG	265
	反向 TAG ATG GGG ACA TTG TGG GT	
G3PDH	正向 ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG	125
	反向 TTC AGC TCA GGG ATG ACC TT	

1.5 数据统计:采用 GraphPad Prism (version 3.0) 软件,采用 t 检验比较组间差异。

2 结果

2.1 标准曲线和溶解曲线

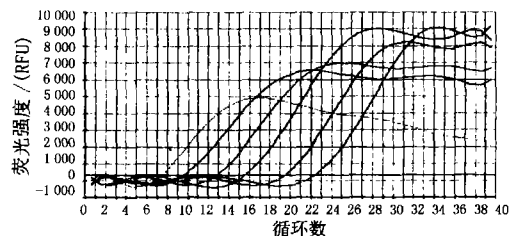
图 1 α -SMA 标准质粒扩增的荧光数据Fig. 1 Fluorescence data for plasmids containing fragment of α -SMA

图 1 所示为不同拷贝数 ($1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^3$) 的标准品(连接有目的基因的质粒)在每个循环时的荧光强度。以标准品的 C_t 值为纵坐标,以其拷贝数的对数为横坐标,绘制标准曲线,结果表明在目的基因

拷贝数从 $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^3$ 内,标准曲线呈很好线性关系,方程为 $Y = -3.168 X + 35.896$, $r = 0.998$ 。

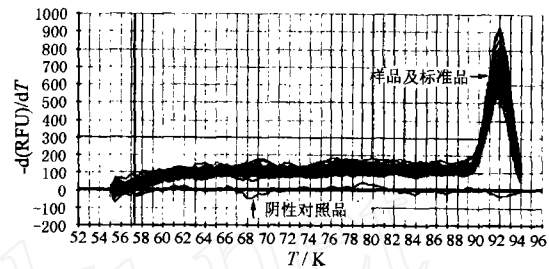
图 2 α -SMA 基因扩增产物的溶解曲线Fig. 2 Melting curve for all PCR products after amplification of α -SMA

图 2 所示为所有标准品和待测样品的溶解曲线图。纵坐标 $-d(\text{RFU})/dT$ 表示荧光强度随温度的变化情况,横坐标为不同温度(T)值。由于本实验所采用的荧光染料 SYBR Green I 只与双链 DNA 结合,因此其荧光强度随温度变化的情况可以显示相应 PCR 产物的溶解温度(melting temperature, T_m 值),即每个产物溶解曲线中,最大峰值出现的位置。因为不同 GC 含量的双链 DNA 其 T_m 值是不同的,由此可以初步判断 PCR 反应产物的特异性。图 2 结果表明所有标准品和待测样品溶解曲线均呈现单一而窄的峰,而阴性对照无明显峰出现,提示本研究中样品未出现污染,所有扩增产物均为特异性扩增产物。此外,本实验还用 2% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析,结果亦显示无非特异性扩增产物(结果未列出)。

2.2 复方 861 对 LX-2 细胞中 α -SMA 基因表达的影响:结果见表 2。与对照组比较,复方 861 作用 24、48、72 h,均可使 LX-2 细胞中 α -SMA mRNA 含量降低。其中药物作用 48 和 72 h 后,药物组与对照组差异显著 ($P < 0.05, 0.01$)。

表 2 复方 861 对 LX-2 细胞 α -SMA mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)Table 2 Effects of Cpd 861 on expression of α -SMA mRNA in LX-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	α -SMA/G3PDH 的相对拷贝数		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	0.033 ± 0.016	0.054 ± 0.005	0.039 ± 0.008
复方 861	0.01	0.028 ± 0.004	$0.022 \pm 0.014^*$	$0.016 \pm 0.005^{**}$

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

肝星状细胞是介导肝纤维化发生的关键因素。肝脏受到各种损伤时,肝星状细胞活化为具有高度

增殖活性和 α -SMA 表达阳性的肌成纤维细胞,合成大量细胞外基质(尤其是 I 型和 III 型胶原),导致肝纤维化发生。LX-2 细胞是活化的人肝星状细胞株,它有典型的星状细胞特征,在培养状态下,可表达 α -SMA 蛋白^[7]。

本实验运用了一种可信、准确而相对经济的基于 SYBR Green I 的实时定量 PCR 技术,检测了复方 861 对 LX-2 细胞中 α -SMA mRNA 表达的影响。为保证反应的特异性,减少非特异性扩增和获得正确的扩增产物,本实验对包括引物、离子浓度和反应程序等在内的各种条件进行了优化。结果显示,本次实验的 PCR 反应具有高度的特异性,扩增产物为均一的目的片段。标准曲线亦显示,在 $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^3$ 内,曲线呈非常好的线性关系。实验结果表明,复方 861 作用 48 和 72 h 后,LX-2 细胞中 α -SMA mRNA 的水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。这说明该药可抑制 LX-2 细胞中 α -SMA 基因的表

达,提示其抗肝纤维化的作用可能与其抑制肝星状细胞的活化有关。

References:

- [1] Friedman S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 2247-2250.
- [2] Iredale J P. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(3): 427-436.
- [3] Bataller R, Brenner D A. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis [J]. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(3): 437-451.
- [4] Reeves H L, Friedman S L. Activation of hepatic stellate cells—a key issue in liver fibrosis [J]. *Front Biosci*, 2002, 7: 808-826.
- [5] Wang T L, Wang B E, Zhang H H. Pathological study of the therapeutic effect on—related liver fibrosis with herbal compound 861 [J]. *Chin Gastro Hepatol* (胃肠病学和肝病杂志), 1998, 7(2): 148-153.
- [6] Ma H, Wang B E, Ma X M, et al. Effects of compound 861 on rat hepatic stellate cell collagen synthesis and degradation *in vitro* [J]. *Chin J Hepatol* (中华肝病杂志), 1999, 7 (Suppl): 30-32.
- [7] Taimr P, Higuchi H, Kocova E, et al. Activated stellate cells express the TRAIL Receptor-2/Death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis [J]. *Hepatology*, 2003, 37(1): 87-95.

川芎嗪对人脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖的影响

徐晓玉,杨丽蓉,陈刚

(重庆医科大学中医药学院,重庆 400050)

川芎为活血化瘀代表性中药,临床应用甚广。川芎嗪(Tranethylpyrazine, TMP)为川芎主要有效成分之一。前期研究表明,川芎嗪注射液能抑制 Lewis 肺癌荷瘤小鼠移植瘤的生长和肺转移,可降低肿瘤组织微血管密度和抑制肿瘤细胞血管内皮生长因子(VEGF)的表达。本试验旨在进一步探讨川芎嗪含药血清对人脐静脉内皮细胞 ECV304 的增殖和对 VEGF 诱导的 ECV304 的增殖是否具有抑制作用,为深入研究川芎嗪抗血管生成的机制,应用川芎嗪治疗血管新生性疾病(肿瘤、类风湿性关节炎、增殖性视网膜病变等)^[1]提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:盐酸川芎嗪注射液,无锡市第七制药有限公司产品,规格:40 mg/2 mL,批号 011014。RPMI-1640 培养基(Gibco,美国);新生小牛血清(中美合资兰州民海生物工程有限公司);

³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)试剂盒(中国科学院上海原子核研究所);四氮唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)、胰酶等,均为美国 Sigma 公司产品。

1.2 主要仪器:3111 型二氧化碳培养箱 TC2323 (SHELLAB, 美国),LS6500 型液体闪烁计数仪(Beckman, 美国),Ⅲ型多头细胞样品收集器(绍兴卫星医疗设备制造有限公司),TECAN SPECTRA Ⅲ 自动酶标仪(澳大利亚),Olympus 倒置相差显微镜(日本)。

1.3 川芎嗪含药血清的制备:取 160~200 g 雌性 Wistar 大鼠 30 只,随机分为 3 组,川芎嗪 143.0、71.5 mg/kg 组,空白对照组(ip 生理盐水),各组 ip 给药,每日 1 次;连续 7 d。末次给药 0.5 h 后,乙醚麻醉,无菌条件下经腹主动脉取血。血液于 4 ℃ 静置 4 h,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液滤过除菌,4 ℃ 冷藏备用。

收稿日期:2004-02-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070915)

作者简介:徐晓玉(1958—),女,四川人,教授,博士生导师,主要从事活血化瘀药及补益药的中药药理学研究,主持国家自然科学基金等科研项目 8 项,发表学术论文 45 篇。Tel: (023)68447637 E-mail: xxy0618@sina.com