

苦参碱对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖的体外抑制作用

姜孟臣¹, 陈虹², 刘洪琪¹, 陈莉^{3*}

(1. 武警医学院附属医院 烧伤科, 天津 300162; 2. 武警医学院 药学教研室, 天津 300162;

3. 武警医学院 生物教研室, 天津 300162)

组织损伤修复是人体自我保护的一个正常病理过程, 而过度修复则会出现组织纤维化, 影响组织、器官的正常功能, 人增生性瘢痕是创伤过度修复的异常结果。苦参碱(matrine, Mat)广泛存在于豆科植物苦参、苦豆子及广豆根中, 近年研究发现其具有较强的抗组织纤维化作用^[1], 目前关于Mat对人增生性瘢痕成纤维细胞(下文简称为成纤维细胞)作用的报道较少。本实验以成纤维细胞为靶细胞观察不同质量浓度的Mat在体外对该细胞增殖的影响, 并对其抗纤维化作用机制进行初步研究。

1 材料与仪器

苦参碱标准品(中国药品生物制品检定所提供); DMEM培养基(Gibco公司产品); MTT、Hoechst 33342、PI(碘化丙啶)、胰蛋白酶、胶原酶(均为Sigma公司产品); 胎牛血清(中国医学科学院血液学研究所提供); 转化生子因子- β (TGF- β)多克隆抗体(Gibco公司产品); 抗(SP-900试剂盒)、DAB显色试剂盒(均由北京中山生物技术有限公司提供); 青霉素、链霉素(华北制药厂生产)。仪器: 550型全自动酶标仪(BIORAD, 美国); E800型荧光显微镜(NIKON, 日本)。

2 方法

2.1 细胞培养: 手术切取增生性瘢痕组织(6例, 年龄为6~32岁), 在无菌条件下, 用D-Hank's液浸泡、剪碎, 经胶原酶消化, 离心, 收集细胞, 以 1×10^6 /mL体外培养于DMEM培养基中, 培养基内含10%胎牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素, 置5% CO₂孵育箱中37进行体外培养, 待长成致密单层细胞后, 用0.125%胰蛋白酶消化、传代, 实验所用的细胞为第4~5代细胞。

2.2 细胞生长曲线的测定: 取对数生长期的成纤维细胞, 用0.125%胰蛋白酶液消化细胞, 制成细胞混悬液, 计数、调整细胞浓度为 2×10^5 /mL, 接种于

25 mL培养瓶内, 培养24 h后, 实验组加入不同质量浓度Mat(0.5、1.0、2.0 mg/mL), 对照组加等量培养基。以后每天随机从4组细胞中, 各取出3瓶细胞, 用台盼蓝拒染法, 在光镜下计活细胞数, 取平均值, 以时间为横坐标, 活细胞数为纵坐标, 作图得细胞生长曲线^[2]。

2.3 Mat对成纤维细胞的细胞毒作用: 按2.2项方法制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 2×10^4 /mL, 接种于96孔培养板上, 每孔加200 μ L细胞悬液, 培养24 h后, 加入不同质量浓度Mat(0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、1.75、2.0 mg/mL), 另设对照组(不加Mat)和空白对照组(只加培养基)。每组设8个复孔, 加药后48 h, 加MTT(5 mg/mL)20 μ L, 4 h后, 离心, 去上清液, 加入DMSO 200 μ L, 避光振荡10 min, 用全自动酶标仪(波长490 nm)测定各孔吸光度(A)值, 按文献方法计算细胞生长抑制率^[3]。

2.4 荧光双染法检测细胞凋亡比例: 取对数生长期的细胞加入Mat(0.5、1.0、2.0 mg/mL), 另设对照组(不加Mat), 每组设9瓶细胞, 分别于处理24、48、72 h取出细胞, 每一时段每组取3瓶细胞, 按文献方法^[4], 将细胞消化、离心、洗涤后制成细胞悬液, 用Hoechst 33342和PI进行荧光双染色, 每瓶细胞染色后滴片, 在荧光显微镜下观察细胞核形态变化, 并摄像记录, 同时计数凋亡细胞, 随机选4个视野, 每个视野计数250个细胞, 共计数1 000个细胞, 重复4次, 取平均值。按文献方法计算细胞凋亡比率^[3]。

2.5 免疫细胞化学法(SP法)检测TGF- β 的表达: 取对数生长期的细胞消化、调整细胞浓度, 将处理后的盖玻片置于6孔板内培养(每孔一片盖玻片), 每孔接种 5×10^5 个细胞, 培养24 h后, 加入Mat(0.5、1.0、2.0 mg/mL), 正常对照组(只加培养基)。每组设9个复孔。再培养24 h后, 取出生长细胞后的盖玻片, 用冷丙酮固定, 晾干后, PBS冲洗

* 收稿日期: 2004-04-23

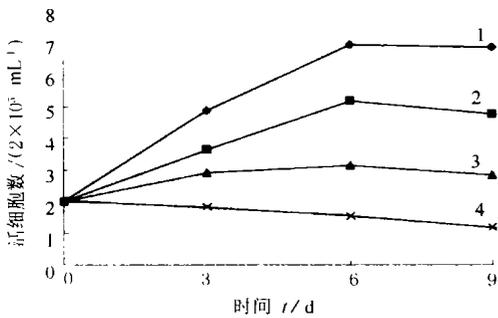
作者简介: 姜孟臣(1962—), 男, 籍贯内蒙古, 副主任医师, 硕士, 主要研究方向为瘢痕防治。Tel: (022) 60578676 60579602

3 次, 每次 5 min, 0.3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 用 0.5% TritonX-100 处理 10 min, 热修复 8 min, 自然冷却, 血清封闭 15 min, 加抗, 4 过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 加抗, PBS 冲洗, 加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素, PBS 冲洗, DAB 显色 6 min, 冲洗, 苏木素核复染, 常规脱水封片, 用普通光学显微镜观察 Mat 对外培养人成纤维细胞 TGF-β 表达的影响, 并做摄像记录。形态学评价分析: 二甲苯封片后, 光镜下观察, 胞质中出现棕黄色颗粒为阳性, 每张玻片高倍镜下 (×400 倍) 至少计数 100 个细胞, 计算 TGF-β 阳性细胞率。

2.6 统计处理: 采用统计软件 SPSS10.0 进行数据处理, 组间行 t 检验。

3 结果

3.1 Mat 抑制成纤维细胞生长: 由细胞生长曲线, 可见成纤维细胞经 3 种不同质量浓度 Mat 处理后, 细胞生长受到明显地抑制, 以 2 mg/mL Mat 的抑制作用最强, 见图 1。



1-对照 2-0.5 mg/mL Mat 3-1.0 mg/mL Mat
4-2.0 mg/mL Mat
1-control 2-0.5 mg/mL Mat 3-1.0 mg/mL Mat
4-2.0 mg/mL Mat

图 1 Mat 对成纤维细胞生长的抑制作用 (n=3)

Fig. 1 Inhibitory effect of Mat on growth of fibroblasts

3.2 Mat 对成纤维细胞的细胞毒作用: 成纤维细胞经 Mat 处理 48 h 后, 经 MTT 法检测, 活细胞数明显减少, 半数抑制浓度 IC₅₀ 值为 1.25 mg/mL, 与对照组相比差异显著, 见表 1。

3.3 Mat 诱发成纤维细胞凋亡: 荧光双染法染色后可见对照组细胞核均匀一致, 被 Hoechst 33342 染成蓝色荧光, 经 Mat 处理后, 核染色质凝集、碎裂、出现凋亡小体, 凋亡细胞数目随用药质量浓度增加及用药时间延长逐渐增多, 以 2.0 mg/mL 作用最为明显, 于加药后 24 h 细胞凋亡比率达 40% 以上, 加药后 48 h 细胞凋亡比率达 60% 以上。

3.4 Mat 下调 TGF-β 的表达: TGF-β 蛋白颗粒在

表 1 Mat 对成纤维细胞的细胞毒作用 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Cytotoxicity of Mat on fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	质量浓度/(mg · mL ⁻¹)	A ₄₉₀	生长抑制率/%
空白	-	0.086 ± 0.005 8	-
对照	-	0.381 ± 0.025 7	-
Mat	0.50	0.338 ± 0.029 5*	14.58
	0.75	0.303 ± 0.027 6**	31.61
	1.00	0.268 ± 0.023 6**	45.33
	1.25	0.237 ± 0.024 9**	48.81
	1.50	0.215 ± 0.018 7**	56.27
	1.75	0.207 ± 0.016 7**	59.15
	2.00	0.193 ± 0.015 2**	61.24

与对照组比较: * P < 0.05 ** P < 0.001

* P < 0.05 ** P < 0.001 vs control group

对照组成纤维细胞的胞浆内呈高密度棕黄色信号, 阳性细胞表达率为 100%, 尤以核膜附近较为密集, 而经 Mat 作用后, 成纤维细胞的胞浆内可见阳性颗粒由深变浅呈淡黄色阴性信号, 阳性细胞表达率明显降低, 2.0 mg/mL Mat 组阳性细胞表达率仅为 30%, 表明 Mat 可抑制人成纤维细胞 TGF-β 蛋白的表达。

4 讨论

本实验结果表明, Mat 能有效地抑制体外人增生性瘢痕成纤维细胞的增殖。用 2.0 mg/mL Mat 处理成纤维细胞 24 h 后, 活细胞数较对照组减少 40% 以上, 48 h 达 60% 以上, 且随时间延长对细胞的抑制率也增加, 细胞生长曲线测定及 MTT 细胞毒实验检测均证明 Mat 对细胞增殖有明显抑制作用, 其抑制率与药物浓度呈剂量依赖关系, 并与作用时间呈正相关。荧光双染法证明, Mat 可诱导成纤维细胞凋亡, 使细胞核染色质凝集、边移、并发生碎裂, 出现凋亡小体, 而且还观察到凋亡细胞的比例与药物浓度及作用时间呈正相关。TGF-β 是重要的细胞因子, 主要有 3 种生物学作用: 抑制大多数细胞的增殖, 但促进某些间质细胞的增殖; 免疫抑制作用; 促进细胞外基质的合成。其对胶原蛋白合成、分泌有重要的影响, TGF-β 的免疫细胞化学实验结果表明, 经 Mat 作用后, TGF-β 的表达明显减弱, 说明 Mat 能抑制 TGF-β 的细胞内合成, 也将影响胶原蛋白的合成。

本实验证明 Mat 能有效地抑制人增生性瘢痕成纤维细胞增殖, 诱导其凋亡, 且能抑制 TGF-β 的细胞内合成, 这将为该药物开发及临床抗瘢痕治疗提供理论依据, 但其作用机制还有待于进一步研究。

References:

[1] Chen W Z, Zhu L, Zhang X R, et al. Effect of matrine on

experiment rat liver fibrosis [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2000, 19(5): 410-413.

- [2] Zhang M, Mai X, Chen X Y, et al. The study of anti-carcinoma activity of PAB231 *in vitro* [J]. *Acta Acad Med CPAPF* (武警医学院学报), 2000, 9(3): 243-245.
- [3] Yu B M, Lu A G, Zheng M H, et al. Preliminary study on

ATRA induced LoVo cell apoptosis [J]. *Pract J Cancer* (实用癌症杂志), 1998, 13(3): 167-170.

- [4] Chen X Y, Zhang M, Mai X. The rapid test by Hoechst 33342/PI live biofluorescence of medicament sensitivity of tumour cell [J]. *Acta Acad Med CPAPF* (武警医学院学报), 2001, 10(4): 300-302.

大黄素葡甲胺犬静脉注射体内药动学研究

蒋王林^{1,2}, 张尊建², 高玉白¹, 田京伟¹, 傅风华^{1*}

(1. 山东省天然药物工程技术研究中心 烟台大学药学院, 山东 烟台 264003;

2. 中国药科大学 分析测试中心, 江苏 南京 210009)

大黄素具有抗炎作用, 能显著抑制醋酸所致的小鼠毛细血管通透性增加^[1]; 促进豚鼠离体肠管收缩^[2]; 呈剂量依赖性加强豚鼠结肠平滑肌细胞电和收缩活动, 机制与抑制细胞膜 K_{ATP} 等钾通道的活性相关^[3]; 亦明显抑制大鼠肝纤维化形成^[4]。本实验对大黄素 iv 给药在犬体内的药动学进行了研究, 为临床用药提供理论指导。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂: 大黄素葡甲胺冻干粉针 (由山东省天然药物工程技术研究中心制剂室提供, 纯度 > 95%, 批号 011106); 肝素钠注射液 (徐州万邦生化制药有限公司, 批号 020419); 大黄素葡甲胺对照品 (自制, 纯度 > 99.5%); 色谱纯甲醇, 高氯酸、醋酸乙酯为分析纯, 重蒸水 (自制)。

1.2 动物: Beagle 犬 6 只, 雌雄各半, 4 个月龄, 6.5~8.0 kg, 中国科学院上海实验动物中心提供, 动物合格证号: 中科沪动管第 99-0011 号。

1.3 仪器: HPLC 色谱仪 (泵: TSP P2000; 自动进样品: TSP AS3000; 检测器: UV3000; 工作站 OS/2 cHemstation; 恒温箱); 色谱柱: Discovery C₁₈ 柱 (25 cm × 4.6 mm, 5 μm); 低压溶剂过滤器; 冷冻离心机, 涡旋振荡器。

2 方法

2.1 色谱条件^[5]: 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (85:15); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 254 nm; 柱温为 40 °C; 采用标准曲线法定量测定血浆中大黄素葡甲胺浓度。

2.2 试验方案: 取大黄素葡甲胺冻干粉针, 生理盐

水溶解, 配成 4.0 mg/mL 药液, 犬耳缘 iv 给药, 剂量为 4.0 mg/kg (按对大鼠实验性肠黏连具有治疗作用的有效剂量 10 mg/kg 制定), 给药体积为 1.0 mL/kg, 10 s 给完, 分别于给药 2、10、20、30、40、50、60、75、90、120 min 后犬股静脉抽血 2 mL, 肝素抗凝, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 0.40 mL, 待测。

2.3 样品处理方法: 取血浆 0.40 mL 于 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 6% 高氯酸 0.20 mL, 闭塞, 振摇 1 min, 加入醋酸乙酯 0.40 mL, 闭塞, 振摇 1 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 精密吸取醋酸乙酯层 0.20 mL 于 1.5 mL Eppendorf 管中, 于 40 °C 吹干, 精密吸取甲醇 0.60 mL, 振摇溶解转移至 1.5 mL 进样瓶中, 自动进样, 上高效液相色谱 (HPLC) 柱, 进样体积为 20 μL, 用标准曲线法进行色谱分析。

2.4 标准曲线: 取空白犬血浆, 加入大黄素葡甲胺对照品使血浆中浓度为 0.13、0.26、0.65、1.30、3.25、6.5、16.25 μg/mL, 分别取血浆样品 0.40 mL, 按 2.3 项进行 HPLC 测定, 得大黄素葡甲胺峰面积 (A_{bb})。以 A_{bb} 值作为纵坐标, 以血浆中大黄素葡甲胺质量浓度 (C_{bb}) 为横坐标, 得标准曲线为: $Y = 87\,708 X + 893$ ($r = 0.999\,6$), 结果表明血浆中大黄素葡甲胺质量浓度 0.043~5.375 μg/mL 线性关系良好。

2.5 回收率: 取分别含大黄素葡甲胺对照品 1.70、0.85、0.425、0.213 μg/mL 的犬血浆 0.40 mL, 每一浓度分别取 6 个样品于 1.5 mL Eppendorf 管

* 收稿日期: 2004-05-24

作者简介: 蒋王林 (1974—), 男, 安徽芜湖人, 中国药科大学药物分析在读硕士, 现于山东省天然药物工程技术研究中心工作, 从事中药活性成分的药理研究。Tel: (0535) 6706030-8004 Fax: (0535) 6706036 E-mail: wangling@luye-pharm.com

* 通讯作者 Tel: (0535) 6706060 E-mail: Fenghua@Luye-pharm.com