

丹参酮 II_A 对腹部术后粘连大鼠成纤维细胞增殖及其相关基因表达的影响

蒙晓¹, 王成蹊², 蔡洪福³, 侯连兵^{1*}

1. 南方医科大学 南方医院药学部, 广东 广州 510515

2. 广东药学院, 广东 广州 510006

3. 福建医科大学附属协和医院, 福建 福州 350001

摘要: 目的 探讨丹参酮 II_A 对腹部术后粘连模型大鼠成纤维细胞增殖, 以及对成纤维细胞粘连相关基因纤溶酶原激活剂 (TPA)、纤溶酶原激活剂抑制剂-1 (PAI-1) 和炎症相关的环氧酶-2 (COX-2) 表达的影响。方法 腹部术后粘连模型大鼠成纤维细胞经不同质量浓度丹参酮 II_A 培养后, 以 CCK-8 法检测丹参酮 II_A 对成纤维细胞增殖的影响; 荧光定量 RT-PCR 技术检测丹参酮 II_A 对成纤维细胞中 TPA、PAI-1、COX-2 mRNA 表达的影响, 以地塞米松注射液为阳性对照。结果 丹参酮 II_A 对成纤维细胞增殖有显著抑制作用 ($P < 0.001$), 并呈质量浓度相关; 还可显著降低成纤维细胞中 TPA、PAI-1、COX-2 mRNA 的表达量 ($P < 0.001$), 且丹参酮 II_A 质量浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 时作用较强。结论 丹参酮 II_A 能有效抑制成纤维细胞增殖, 明显降低成纤维细胞中 TPA、PAI-1、COX-2 mRNA 的表达, 表明丹参酮 II_A 对腹部术后粘连发生机制有一定影响。

关键词: 丹参酮 II_A; 术后粘连; 成纤维细胞; 细胞增殖; 粘连相关基因

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1381-04

Effects of tanshinone II_A on fibroblast proliferation and related gene expression in rats with postoperative abdominal adhesion

MENG Xiao¹, WANG Cheng-xi², CAI Hong-fu³, HOU Lian-bing¹

1. Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

3. Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

Key words: tanshinone II_A; postoperative adhesion; fibroblast; cell proliferation; adhesion related gene

粘连是腹部术后常见的并发症之一, 表现为原本分离的脏器或脏器与腹壁之间出现异常的纤维化粘连条带, 易导致炎症、疼痛、肠梗阻甚至女性不孕等病症。因此, 研发防治术后粘连的有效药物是医药科研领域中的重要课题。以活血化瘀疗法改善微循环是中医药防治术后粘连的理论依据之一^[1], 丹参酮 II_A 是常用的活血化瘀中药丹参中的主要有效成分, 具有诱导 CYP450 多种亚型、延缓心肌肥厚、体外抗白血病等药理作用^[2-4]。本实验观察丹参酮 II_A 对腹部术后粘连模型大鼠成纤维细胞增殖, 成纤维细胞中粘连和炎症主要相关基因纤溶酶原激活剂 (TPA)、纤溶酶原激活剂抑制剂-1 (PAI-1) 和

炎症相关的环氧酶-2 (COX-2) 表达的影响, 为丹参酮 II_A 用于防治术后粘连提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雌性 Wistar 大鼠, 体质量 170~200 g, 购自南方医科大学实验动物中心, 合格证号 SCXK (粤) 20060015。

1.2 药品与试剂

丹参酮 II_A (质量分数 $\geq 98\%$), 陕西森弗高科实业有限公司, 批号 110206; 地塞米松注射液, 广州白云山天心制药股份有限公司, 批号 110105; CCK-8 试剂, 日本同仁化学研究所; DMEM 高糖培

收稿日期: 2011-11-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30873271); 广东省科技计划项目 (2008A030201016, 2009B050500003); 广东省技术创新项目 (20101022106)

作者简介: 蒙晓 (1985—), 女, 苗族, 硕士研究生, 研究方向为药剂与药理学评价。Tel: 13600471238 E-mail: leptt@126.com

*通讯作者 侯连兵 Tel: (020)61642175 E-mail: hlianbing@163.com

培养基、0.25%胰酶，南京凯基生物科技发展有限公司；胎牛血清（FBS），美国 Gibco 公司；即用型 SABC 免疫组化试剂盒，武汉博士德生物工程有限公司；PrimeScript II 1st Strand cDNA 合成试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)、引物设计与合成，TaKaRa 公司；Trizol 试剂，Invitrogen 公司。

1.3 主要仪器

SpectraMax M5 多功能酶标仪，美国 Molecular Device 公司；Stratagene MX3005p 荧光定量 PCR 仪，美国 Agilent 公司；倒置相差显微镜，日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 腹部术后粘连大鼠模型的制备^[5]

大鼠禁食不禁水 12 h 后，ip 10%水合氯醛 4 mL/kg 麻醉，腹壁去毛，75%乙醇消毒皮肤，沿腹正中中线纵向切开 1 cm，提出盲肠置于消毒纱布上，晾干数分钟使肠膜表面干燥。解剖刀片轻刮整个盲肠膜面 10 遍，使肠面轻度点状渗血，滴数滴无水乙醇于创面，回纳盲肠。大鼠腹壁两边内侧各用手术刀片轻刮 10 遍造成创面，封闭腹腔、消毒创口回笼饲养。

2.2 成纤维细胞培养

粘连模型大鼠术后 7 d 用铁锤击头部致死，外皮用 75%乙醇浸泡 15 s 消毒，无菌条件下打开腹腔，剪取腹壁与脏器间或脏器与脏器间的粘连组织，剪成约 1 mm³ 的小块，铺入 25 cm² 细胞培养瓶内，CO₂ 孵箱里培养 2~3 h，待组织块贴壁牢固后加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液 3 mL，2~3 d 换液 1 次。5~7 d 细胞可长满培养瓶底，用 0.25%胰蛋白酶消化，以 1:2 传代，每隔 3~5 d 传代 1 次，取第 3~8 代成纤维细胞进行实验。

2.3 对成纤维细胞增殖的影响

取生长状态良好的成纤维细胞，4×10³/孔接种于 96 孔细胞培养板，24 h 后吸弃培养液，分别加入含不同质量浓度的丹参酮 II_A、地塞米松注射液（阳性对照）培养液 200 μL，使药物的终质量浓度均分别为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μg/mL。对照组加入细胞培养液 200 μL，以不含细胞的培养液作空白对照，每组设 3 个复孔。加药后继续培养 72 h，吸弃上清，每孔加入含 10% CCK-8 试剂的新培养基 100 μL，37 °C 孵育 2 h，酶标仪测定各组在 450 nm 波长处的吸光度（A）值。用 SPSS 软件对结果进行 One-way ANOVA 分析。

2.4 对成纤维细胞中 TPA、PAI-1、COX-2 mRNA 表达的影响

取生长状态良好的成纤维细胞，每皿约 2.5×10⁶ 个接种于直径 10 cm 培养皿中，分别加入含不同质量浓度丹参酮 II_A 的培养液，使药物终质量浓度分别为 1.0、2.0 μg/mL，以地塞米松注射液（2.0 μg/mL）为阳性对照，以细胞培养液作为对照。细胞加药处理 72 h，Trizol 试剂提取总 RNA，用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 进行逆转录反应。逆转录的 cDNA 用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 进行 PCR 反应。PCR 反应体系（20 μL）配制：SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (2×) 10.0 μL，PCR 正向引物（10 μmol/L）0.8 μL，PCR 反向引物（10 μmol/L）0.8 μL，ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μL，cDNA 模板 2.0 μL（总量 100 ng），无 RNase 灭菌蒸馏水 6.0 μL。反应条件：95 °C、30 s 预变性；95 °C、3 s，59 °C、30 s 退火（40 个循环）。反应使用引物由 TaKaRa 公司设计并合成，以 β-actin 为内参引物，引物序列见表 1。所得结果用 2^{-ΔΔCt} 方法^[6]

表 1 基因引物序列及产物片段

Table 1 Sequence of gene primers and fragment of product

名称	引物序列	产物片段 / bp
β-actin	正向: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	150
	反向: GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	
TPA	正向: CGCTGTACCTCACAGCATCTGTTTA	150
	反向: CATCCGCTTATCGATCATGCAC	
PAI-1	正向: ACCATCTCCGTGCCCATGA	96
	反向: GGGCAGTTCCAGGATGTCGTA	
COX-2	正向: AACACGGACTTGCTCACTTTGTTG	110
	反向: AATGGAGGCCTTTGCCACTG	

分析目的基因的相对表达量。

3 结果

3.1 对成纤维细胞增殖的影响

与各自对照组相比,丹参酮 II_A 和地塞米松质量浓度为 0.5~8.0 μg/mL 时,对成纤维细胞增殖均有不同程度的显著抑制作用 ($P < 0.001$),且与质量浓度呈相关性。结果见表 2。

3.2 对成纤维细胞中 TPA、PAI-1、COX-2 mRNA 表达的影响

与对照组相比,丹参酮 II_A 质量浓度为 1.0、2.0 μg/mL 时均能降低成纤维细胞中 TPA、PAI-1 及 COX-2 mRNA 的表达 ($P < 0.001$);地塞米松 2.0 μg/mL 虽能降低 TPA、COX-2 mRNA 的表达 ($P < 0.001$),但却明显增加 PAI-1 的表达 ($P < 0.001$)。结果见表 3。

表 2 丹参酮 II_A 对腹部术后粘连大鼠成纤维细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of tanshinone II_A on proliferation of fibroblast in rats with postoperative abdominal adhesions ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A_{450} 值	抑制率 / %
对照	—	2.524 ± 0.010	—
丹参酮 II _A	0.5	2.142 ± 0.004***	15.13
	1.0	1.980 ± 0.007***	21.55
	2.0	1.083 ± 0.009***	57.10
	4.0	0.485 ± 0.008***	80.78
	8.0	0.232 ± 0.004***	90.82
对照	—	2.521 ± 0.006	—
地塞米松	0.5	1.844 ± 0.002***	26.87
	1.0	1.742 ± 0.005***	30.92
	2.0	1.715 ± 0.006***	31.98
	4.0	1.705 ± 0.006***	32.38
	8.0	1.684 ± 0.012***	33.21

与对照组比较:*** $P < 0.001$, 下表同

*** $P < 0.001$ vs control group, same as below

4 讨论

因手术创伤引起的脏器浆膜损伤、缺血、炎症和异物残留均是导致术后粘连的主要原因。术后粘连的形成是一个复杂的过程,涉及到多种细胞的增殖和相关细胞中粘连与炎症基因表达量的变化,成纤维细胞在术后粘连中起重要的作用,成纤维细胞增殖越快,粘连越容易发生,且程度越严重。成纤

表 3 丹参酮 II_A 对腹部术后粘连大鼠成纤维细胞中 TPA、PAI-1、COX-2 mRNA 表达的影响 ($n = 3$)

Table 3 Effect of tanshinone II_A on mRNA expression of TPA, PAI-1, and COX-2 in fibroblast of rats with postoperative abdominal adhesions ($n = 3$)

组别	$\rho / (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$		
		PAI-1	TPA	COX-2
对照	—	1.000	1.000	1.000
丹参酮 II _A	1.0	0.779***	0.128***	0.402***
	2.0	0.825***	0.036***	0.439***
地塞米松	2.0	1.372***	0.016***	0.005***

维细胞中 TPA、PAI-1 是调控粘连产生的主要相关基因,COX-2 是诱发炎症的主要相关基因。TPA 的溶栓机制是激活内源性纤溶酶原转变为纤溶酶,其表达量越高,纤溶作用越强,越利于抑制纤维性粘连产生,而 PAI-1 则相反,其表达量越高,抑制纤溶作用越强,越易导致纤维性粘连产生。因此,TPA 与 PAI-1 的比率越高,越利于防止粘连产生。COX-2 是一种经刺激而迅速产生的诱导酶,各种化学、物理、生物因子损伤性刺激均可诱导其产生,进而催化前列腺素 (PGs) 合成参与炎症反应。COX-2 主要参与早期炎症反应,其表达量越低,越利于防止炎症产生。

本实验中,丹参酮 II_A 和地塞米松均能有效抑制成纤维细胞增殖,且丹参酮 II_A 的抑制作用与质量浓度呈正相关,高于 1.0 μg/mL 时作用明显强于地塞米松。荧光定量 RT-PCR 结果表明,丹参酮 II_A 均可显著降低成纤维细胞中 TPA、PAI-1 和 COX-2 mRNA 的表达,且在 1.0 μg/mL 时,TPA/PAI-1 的值较 2.0 μg/mL 时的高 2.77 倍;而在 1.0 μg/mL 时,COX-2 mRNA 的表达量较 2.0 μg/mL 时减少 8.42%,表明丹参酮 II_A 在抗粘连的同时还具有一定的抗炎作用,且以 1.0 μg/mL 时的抗粘连、抗炎效果较佳。地塞米松虽然明显降低成纤维细胞中 COX-2 和 TPA mRNA 的表达,但却使 PAI-1 的表达增高,TPA/PAI-1 的值降低,TPA/PAI-1 值较丹参酮 II_A 1.0、2.0 μg/mL 组分别降低 92.86%、73.16%,COX-2 表达量较丹参酮 II_A 1.0、2.0 μg/mL 组分别减少 98.75%、98.86%,表明地塞米松虽有很强的抗炎作用,但抗粘连作用远不及丹参酮 II_A。本实验结果表明丹参酮 II_A 对术后粘连发生的改善作用强于地塞米松,值得深入研究。

参考文献

- [1] 邝婉容, 曾煦欣, 杨安平, 等. 丹参防治术后粘连的研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(14): 17-18.
- [2] 和凡, 钟国平, 赵立子, 等. 丹参酮 II_A 对大鼠细胞色素 P450 酶的诱导作用 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 938-942.
- [3] 严丽, 李永胜, 梁黔生, 等. 丹参酮 II_A 磺酸钠对大鼠肥厚心肌血管紧张素受体 STAT3 的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 588-592.
- [4] 刘晓丹, 刘文达, 刘培庆, 等. 丹参酮 II_A 对白血病 K562 细胞的体外诱导凋亡作用研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1663-1666.
- [5] 曾煦欣, 杨西晓, 黄嗣航, 等. 术后粘连防治药物的药效学动物模型制作与评价 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(7): 814-817.
- [6] 侯春梅, 李新颖, 叶伟亮, 等. MTT 法和 CCK-8 法检测悬浮细胞增殖的比较 [J]. 军事医学科学院刊, 2009, 33(4): 400-401.

欢迎订阅《中草药》杂志 1996—2009 年增刊

为了扩大学术交流, 提高新药研究水平, 经国家新闻出版主管部门批准, 我部从1996年起, 每年出版增刊一册。

1996年增刊: 特邀了国内知名专家就中药新药研究的方向、法规及如何与国际接轨等热点问题撰文阐述。

1997年增刊: 包括紫杉醇的化学成分、提取工艺及组织培养等方面的科研论文, 并特邀国内从事紫杉醇研究的知名专家撰写综述文章, 充分反映了紫杉醇研究方面的新成果、新进展和新动态。

1998年增刊: 以当今国际研究的热点银杏叶为专论重点, 包括银杏叶的化学成分、提取工艺、质量控制、药理作用及临床应用等方面, 充分反映了国内银杏叶开发研究方面的新成果、新进展和新动态。

1999年增刊: 为“庆祝《中草药》杂志创刊30周年”会议论文集, 特邀中国工程院院士、国家药品监督管理局药品评审中心及知名专家就中药新药研究热点问题撰写了综述文章。

2000年增刊: 以“中药新理论、新剂型、新工艺和新技术”为主要内容。

2001年增刊: 特邀了中国工程院院士、专家就加快中药现代化的进程, 我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章。

2002年增刊: 以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容。

2003—2008年增刊: 包括中药创新药物开发的思路和方法、中药现代化研究、中药知识产权保护、中药专利的申请及中药走向国际等热点内容。

2009年增刊: 为庆祝“《中草药》杂志创刊40周年”和“《中草药》英文版 (*Chinese Herbal Medicines*, CHM) 创刊”, 以中药创新药物开发的思路和方法、活性天然产物的发现及其作用机制研究、中药代谢组学研究、生药学研究、中药的安全性评价和不良反应监控、中药新药审评法规的最新进展、中药知识产权保护和专利的申请、民族药研究为主要内容; 学术水平高, 内容丰富, 信息量大。

以上各卷增刊选题广泛、内容新颖、学术水平高、科学性强, 欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行, 邮局订阅《中草药》不含增刊, 但能提供订阅凭证者, 购买增刊7折优惠, 款到寄刊。

地址: 天津市南开区鞍山西道308号

邮编: 300193

网址: www.tiprpress.com; www.中草药杂志社.中国

电话: (022)27474913 23006821

传真: (022)23006821

E-mail: zcy@tiprpress.com

《中草药》杂志编辑部