

## 罗汉果甜苷对肝星状细胞 HSC-T6 增殖及肝纤维化相关基因的影响

王 勤<sup>1</sup>, 王 巍<sup>1</sup>, 龙 颖<sup>2</sup>, 夏 星<sup>1</sup>, 覃洪含<sup>1</sup>, 唐慧勤<sup>1</sup>, 王志萍<sup>1</sup>, 潘为高<sup>1</sup>

1. 广西中医药大学 广西中药药效研究重点实验室, 广西 南宁 530001

2. 桂林市中医院 药剂科, 广西 桂林 541002

**摘要:** 目的 研究罗汉果甜苷含药血清对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 的毒性以及对细胞增殖与相关基因表达的影响, 初步探讨其抗肝纤维化作用机制。方法 以罗汉果甜苷含药血清干预 HSC-T6, 乳酸脱氢酶 (LDH) 法检测罗汉果甜苷含药血清对 HSC-T6 的细胞毒性; MTT 法检测其对 HSC-T6 生长的抑制作用; RT-PCR 法检测 HSC-T6 中 I 型胶原 (Col-I)、转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 及基质金属蛋白酶抑制因子-1 (TIMP-1) mRNA 表达。结果 罗汉果甜苷含药血清对 HSC-T6 无特异毒性, 罗汉果甜苷含药血清体积分数为 20%、10% 时可显著抑制 HSC-T6 的增殖 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 并对 Col-I、TGF- $\beta$ 1 及 TIMP-1 mRNA 表达均表现显著抑制作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。结论 罗汉果甜苷含药血清对 HSC-T6 细胞无特异毒性, 对 HSC-T6 细胞增殖、Col-I 有抑制作用, 促进细胞外基质 (ECM) 降解, 这可能是其抗肝纤维化的部分作用机制。

**关键词:** 罗汉果甜苷; 肝纤维化; HSC-T6; 细胞增殖; 细胞外基质; 含药血清

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)03-0331-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.019

## Effects of mogrosides on proliferation of hepatic stellate cell-T6 and hepatofibrosis-related gene

WANG Qin<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, LONG Ying<sup>2</sup>, XIA Xing<sup>1</sup>, QIN Hong-han<sup>1</sup>, TANG Hui-qin<sup>1</sup>, WANG Zhi-ping<sup>1</sup>, PAN Wei-gao<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Efficacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

2. Department of Pharmacy, Guilin Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guilin 541002, China

**Abstract: Objective** To investigate the cytotoxicity of serum containing mogroside (SCM) to hepatic stellate cell (HSC)-T6 of rats and its effects on the proliferation and related gene expression. **Methods** HSC-T6 was cultured *in vitro* and treated with SCM. Lactate dehydrogenase (LDH) assay was used to evaluate the cytotoxicity of SCM; MTT assay was used to evaluate the inhibitory effect of SCM on HSC-T6; The mRNA expression of collagen alpha1 type I (Col-I), transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1), and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) was determined by RT-PCR. **Results** SCM exhibited no cytotoxicity to HSC-T6 according to the result of LDH assay, but inhibited the cell proliferation of HSC-T6 at 20% and 10% ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ) concentration in the MTT assay significantly. From the results of RT-PCR, the mRNA expression of Col-I, TGF- $\beta$ 1, and TIMP-1 was significantly reduced by 20% and 10% SCMs ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ). **Conclusion** SCM has no cytotoxicity on HSC-T6. SCM could inhibit the cell proliferation of HSC-T6 and Col-I, promote the degradation of extracellular matrix (ECM), which may be some parts of the mechanism of anti-hepatofibrosis.

**Key words:** mogroside; hepatofibrosis; hepatic stellate cells-T6; cell proliferation; extracellular matrix; serum containing mogroside

肝纤维化是胶原等细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积的结果。研究证实肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 及其活化形式, 即类成纤维细胞是 ECM 的主要来源。活化的 HSC 释放转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor-beta 1,

TGF- $\beta$ 1)、基质金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 等多种细胞因子, 从而促进 ECM 的异常合成, 抑制其降解<sup>[1]</sup>。罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex A. M. Lu et Z. Y. Zhang 为广西特色中药, 味甘, 性凉, 其水提醇沉物

收稿日期: 2012-08-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81160518); 广西自然科学基金创新研究团队项目 (2011GXNSFF018006); 广西中医药大学中药药效研究重点实验室开放课题 (09-007-06-02)

作者简介: 王 勤 (1957—), 男, 广西南宁人, 教授, 硕士, 主要从事中药药效研究及新药开发。Tel: (0771)3137585 E-mail: 175057354@qq.com

及其分别经石油醚、氯仿、醋酸乙酯和正丁醇萃取后的水部位均能有效对抗  $\text{CCl}_4$  所致急性肝损伤<sup>[2]</sup>。在前期研究中也发现, 罗汉果中的主要甜味成分罗汉果甜苷有显著的肝保护作用<sup>[3-4]</sup>, 但其对肝纤维化的干预作用还较少见报道。本实验通过研究罗汉果甜苷含药血清对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 的毒性以及对细胞增殖与相关基因的影响, 探讨其抗肝纤维化作用及可能机制。

## 1 材料

### 1.1 药物及试剂

罗汉果提取物, 总苷质量分数 $\geq 80\%$ , 桂林莱茵生物科技股份有限公司, 批号 090201; 秋水仙碱片, 云南植物药业有限公司产品, 批号 100807。DMEM 培养液, Gibco 公司; 胎牛血清, Hyclone 公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒, 南京建成生物工程有限公司; MTT, Amersco 公司; Trizol 试剂, Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒, Fermentas 公司;  $2\times\text{PCR mix}$ , Takara 公司。

### 1.2 动物及细胞株

SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量  $120\sim 150\text{ g}$ , 广西医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK (桂) 2009-0002。肝星状细胞 HSC-T6, 广西医科大学黄仁彬教授馈赠, 为 SV40 转染 SD 大鼠 HSC, 其表型为活化的 HSC。

### 1.3 仪器

SW—CJ—1F 超净工作台, 苏州净化设备厂; 311 型二氧化碳培养箱, Thermo Forma 725 超低温冰箱, 美国 Thermo Forma 公司; XD—101 倒置显微镜, 南京江南光电集团股份有限公司; SS—325 高压灭菌锅, 日本 Tomykoko 公司; 5415R 小型台式离心机, 5810R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Model—450 酶联免疫检测仪, Gel doc 2000 凝胶成像分析系统, PAC-300 低压电泳仪, PCR 仪, 美国 Bio-Rad 产品。

## 2 方法

### 2.1 含药血清的制备

取大鼠 42 只, 随机分为 3 组, 分别为罗汉果甜苷组、秋水仙碱阳性对照组和对照组, 每组 14 只。罗汉果甜苷组  $\text{ig}$  给药  $400\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ <sup>[4]</sup>, 阳性对照组  $\text{ig}$  秋水仙碱  $0.1\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 对照组  $\text{ig}$  生理盐水  $10\text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 每天分 2 次给药, 连续给药 7 d。末次给药后 1 h, 各组大鼠腹主动脉取血,  $4\ 000\text{ r}/\text{min}$  离心 15 min, 合并同组大鼠血清,  $56\text{ }^\circ\text{C}$  灭活 30 min,

用  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过除菌, 置  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存。罗汉果甜苷组血清用对照组血清以  $1:0, 1:1, 1:3$  稀释进行预实验, 结果发现  $1:3$  稀释的含药血清对 HSC-T6 细胞增殖有显著抑制作用。根据预实验结果, 以不影响细胞生长的最大血清体积分数 (20%) 为罗汉果甜苷含药血清最大给药剂量, 共设含药血清体积分数 5%、10%、20% 3 个梯度, 均以对照组血清稀释至相应体积分数备用。HSC-T6 细胞培养体系中各组大鼠血清终体积分数为 20%。

### 2.2 LDH 法检测对 HSC-T6 的细胞毒性

将 HSC-T6 以  $1\times 10^5/\text{mL}$  接种于 24 孔板, 培养 12 h 后, 换含 20% 空白大鼠血清的培养液, 分别设罗汉果甜苷含药血清 5%、10%、20% 组, 秋水仙碱含药血清 20% 组和对照血清 20% 组, 每组设 4 个复孔。继续培养 48 h 后收集细胞上清液, 以 LDH 试剂盒检测细胞上清液中 LDH 的量。

### 2.3 MTT 法检测 HSC-T6 细胞增殖

将 HSC-T6 细胞以  $1\times 10^5/\text{mL}$  接种于 96 孔板, 培养 12 h 后, 换含 20% 空白大鼠血清的培养液, 分组与给药同“2.2”项, 每组设 5 个复孔, 培养 44 h 后各孔均加入 MTT  $20\text{ }\mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 吸出全部液体, 加入  $100\text{ }\mu\text{L}$  DMSO, 微量振荡器上振荡 5 min, 酶标仪双波长 ( $570/630\text{ nm}$ ) 比色, 测定吸光度 ( $A$ ) 值。

抑制率 = (对照孔  $A$  值 - 给药孔  $A$  值) / 对照孔  $A$  值

### 2.4 RT-PCR 法检测 HSC-T6 肝纤维化相关基因表达

将细胞以  $1\times 10^5/\text{mL}$  接种于  $50\text{ mL}$  培养瓶中, 12 h 后换含 20% 空白大鼠血清, 分组与给药同“2.2”项, 每组 3 瓶。各组培养 4 h 后, 采用 Trizol 法抽提细胞中总 RNA, 核酸蛋白测定仪测定 RNA 的量及纯度,  $A_{260}/A_{280}$  均在  $1.8\sim 2.0$ 。取 I 型胶原 (Col-I)、TGF- $\beta 1$  和 TIMP-1 mRNA  $5\text{ }\mu\text{g}$ , 用 M-MuLV 逆转录酶将其逆转录成 cDNA, 以 RT-PCR 法检测 Col-I、TGF- $\beta 1$  及 TIMP-1 mRNA 表达的变化。根据 GeneBank 查找基因序列并自行设计引物。引物序列为  $\beta$ -actin 正向引物  $5'$ -AACCCTAAGGCCAACCG-TGAAAAG- $3'$ , 反向引物  $5'$ -TCATGAGGTAGTCT-GTCAGGT- $3'$ , 产物长度  $240\text{ bp}$ ; Col-I 正向引物  $5'$ -TGCCGTGACCTCAAGATGTG- $3'$ , 反向引物  $5'$ -CACAAGCGTGCTGTAGGTGA- $3'$ , 产物长度  $462\text{ bp}$ ; TGF- $\beta 1$  正向引物  $5'$ -ATGGTGGACCGCAACAAC- $3'$ , 反向引物  $5'$ -TGAGCACTGAAGCGAAA GC- $3'$ , 产物长度  $329\text{ bp}$ ; TIMP-1 正向引物  $5'$ -GCCTCTGGC-

ATCCTCTTG-3', 反向引物 5'-CTGCGGTTCTGG-GACTTG-3', 产物长度 287 bp。PCR 扩增 cDNA 条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s; 退火温度: Col-I, 55 °C, TIMP-1 及 TGF- $\beta$ 1, 52 °C、30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。所有 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳后, 用凝胶成像系统拍照, Quantity One 软件测定灰度值。

### 2.5 统计学分析

应用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验。

## 3 结果

### 3.1 对 HSC-T6 的细胞毒性

与对照组相比, 各体积分数的罗汉果甜苷含药血清组对 HSC 细胞均无显著毒性。见表 1。

### 3.2 对 HSC-T6 增殖的影响

与对照组相比, 罗汉果甜苷 10%、20% 含药血清组细胞生长受到明显抑制 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 而 5% 含药血清组无显著变化, 表明罗汉果甜苷含药血清抑制 HSC-T6 生长的作用呈明显的量效关系。见表 2。

### 3.3 对 HSC-T6 肝纤维化相关基因表达的影响

罗汉果甜苷 10%、20% 含药血清均显著抑制 Col-I、TGF- $\beta$ 1 和 TIMP-1 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 而 5% 含药血清则无显著作用。见表 3 和图 1。

表 1 罗汉果甜苷含药血清对 HSC-T6 上清液中 LDH 量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 1 Effect of SCM on content of LDH in supernate of HSC-T6 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

| 组别    | 体积分数 / % | LDH / (U·mL <sup>-1</sup> ) |
|-------|----------|-----------------------------|
| 对照    | 20       | 533.70 ± 83.93              |
| 罗汉果甜苷 | 5        | 525.30 ± 63.56              |
|       | 10       | 583.59 ± 101.77             |
|       | 20       | 640.21 ± 80.29              |
| 秋水仙碱  | 20       | 797.17 ± 71.27**            |

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$

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

表 2 罗汉果甜苷含药血清对 HSC-T6 增殖的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Inhibition of SCM on cell proliferation of HSC-T6 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别    | 体积分数 / % | A 值           | 抑制率 / % |
|-------|----------|---------------|---------|
| 对照    | 20       | 0.60 ± 0.03   | —       |
| 罗汉果甜苷 | 5        | 0.59 ± 0.02   | 2.65    |
|       | 10       | 0.55 ± 0.03*  | 8.49    |
|       | 20       | 0.52 ± 0.02** | 14.27   |
| 秋水仙碱  | 20       | 0.48 ± 0.02** | 20.40   |

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下表同

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group, same as below

表 3 罗汉果甜苷含药血清对 HSC-T6 中 Col-I、TGF- $\beta$ 1 和 TIMP-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effects of SCM on mRNA expression of Col-I, TGF- $\beta$ 1, and TIMP-1 in HSC-T6 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别    | 体积分数 / % | Col-I           | TGF- $\beta$ 1  | TIMP-1          |
|-------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 对照    | 20       | 0.565 ± 0.057   | 0.533 ± 0.059   | 1.285 ± 0.150   |
| 罗汉果甜苷 | 5        | 0.427 ± 0.098   | 0.455 ± 0.028   | 1.250 ± 0.277   |
|       | 10       | 0.355 ± 0.112*  | 0.407 ± 0.023*  | 0.935 ± 0.095*  |
|       | 20       | 0.262 ± 0.081** | 0.330 ± 0.031** | 0.660 ± 0.115** |
| 秋水仙碱  | 20       | 0.253 ± 0.030** | 0.251 ± 0.026** | 0.649 ± 0.073** |

## 4 讨论

正常肝脏中胶原约占肝脏蛋白总量的 5%~10%, I 型和 III 型胶原各占 40%, 当肝脏发生纤维化时, 胶原蛋白增加到 50% 左右, 且 I/III 型比例失调<sup>[5]</sup>, I 型胶原是肝纤维化、肝硬化时 ECM 的主要成分。胶原主要经过转录、翻译、翻译后修饰、去除端肽及交联等合成。因此, 作用于胶原合成的任何一个环节均可减少其在肝脏细胞外间质的沉积。

肝纤维化是由于各种肝损害细胞因子引起的肝细胞损伤、坏死、凋亡及肝组织炎症反应。在这些

细胞因子中, TGF- $\beta$  起主要调节作用, 即有促进 HSC 向肌纤维母细胞转化和增殖、促进 ECM 的形成、抑制基质分解酶合成、促进肝细胞凋亡等作用<sup>[6-7]</sup>。TGF- $\beta$  是一组具有多种功能的蛋白多肽, 广泛存在于动物正常组织及转化细胞中, 目前已鉴定出 5 种不同分子类型的 TGF- $\beta$ , 在肝脏中量最高、功能最重要的是 TGF- $\beta$ 1。TGF- $\beta$ 1 通过 HSC 表面 I 型受体激活 Ras/Jpk, 作用于转录因子 SP-1、NF-1, 增强其前胶原  $\alpha$ 1 基因转录, 抑制基质金属蛋白酶 (MMP) 活性, 促进 TIMPs 表达增加<sup>[8]</sup>。大量实验

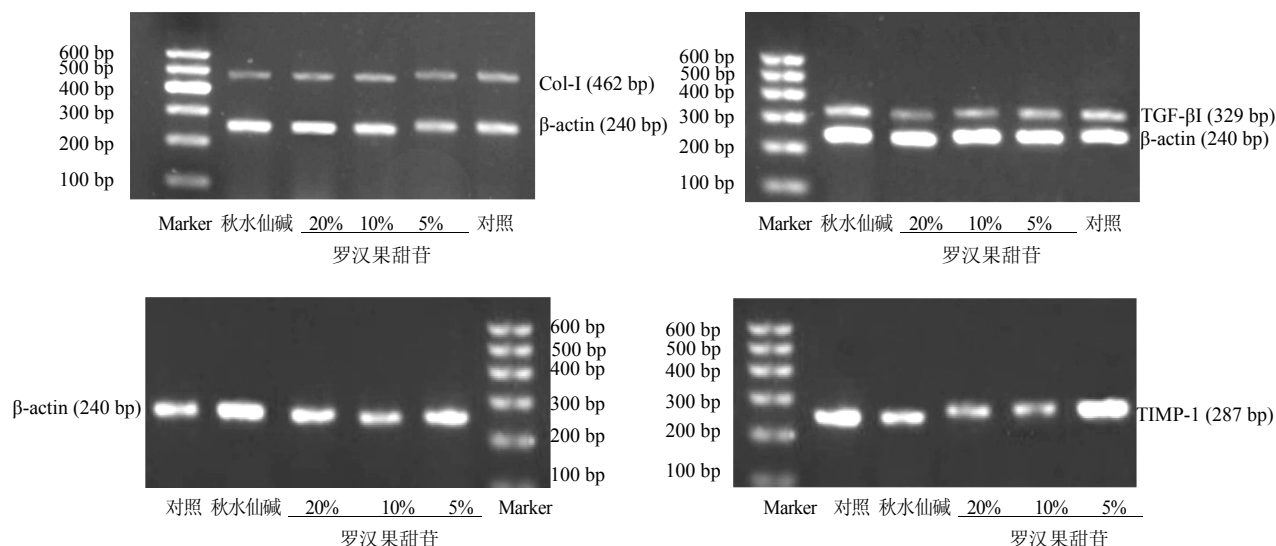


图 1 罗汉果甜苷含药血清对 HSC-T6 中 Col-I、TGF- $\beta$ 1、TIMP-1 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effects of SCM on mRNA expression of Col-I, TGF- $\beta$ 1, and TIMP-1 in HSC-T6

研究也证实,血清 TGF- $\beta$ 1 水平升高与肝纤维化组织学程度相平行<sup>[9]</sup>。

MMPs 与 TIMPs 是肝组织中一对调节基质沉淀和降解的主要细胞因子, MMPs 具有降解 ECM 的功能,而 TIMPs 可选择性地结合 MMPs,抑制其降解 ECM 的活性。在肝组织中, TIMP-1/MMP-1 非常重要<sup>[10]</sup>。在正常情况下, MMPs 和 TIMPs 维持着动态平衡,当肝脏受到损伤因子作用时,活化的 HSC 表达大量 TIMPs,抑制 MMPs 活性,从而使胶原降解减少。降解 I、III 型胶原的 MMPs 主要是 MMP-1,选择性抑制 MMP-1 的是 TIMP-1<sup>[11]</sup>。

在本研究中发现,罗汉果甜苷含药血清在无明显细胞毒的浓度下,显著抑制活化状态 HSC-T6 的细胞活力,20%、10%含药血清对 HSC-T6 中 Col-I、TGF- $\beta$ 1 和 TIMP-1 mRNA 的表达均有显著的抑制作用,这可能是罗汉果甜苷抗肝纤维化的作用机制之一,但其具体作用机制尚待进一步探索。

#### 参考文献

[1] 孙妮弋,桂双英,吴 丽,等. 芍药苷对肝纤维化大鼠肝脏星状细胞基质金属蛋白酶 13 及组织金属蛋白酶抑制因子 1 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1447-1451.

[2] 王 勤,李爱媛,黄荣奇,等. 罗汉果保肝活性部位的研究 [J]. 中药药理与临床, 1998, 14(6): 31-32.

[3] 肖 刚,王 勤. 罗汉果甜苷对小鼠实验性肝损伤保护作用的研究 [J]. 中国药房, 2008, 19(3): 163-165.

[4] 王 勤,肖 刚. 罗汉果甜苷对大鼠慢性肝损伤保护作用的实验研究 [J]. 广西中医药, 2007, 30(5): 54-56.

[5] 陈兆霓,黄仁彬,张士军,等. 复方玉郎伞对肝星状细胞的影响 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(12): 1060-1063.

[6] Seki E, De Minicis S, Österreicher C H, *et al.* TLR4 enhances TGF- $\beta$  signaling and hepatic fibrosis [J]. *Nat Med*, 2007, 11(13): 1324-1332.

[7] 赵珍东,段 启,姚丽梅,等. 姜黄素对肝星状细胞转化生长因子  $\beta$ 1 及受体和 I、III 型胶原 mRNA 表达的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 957-961.

[8] Okuno M, Akita K, Moriwaki H, *et al.* Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF- $\beta$  [J]. *Gastroenterology*, 2001, 120(7): 1784-1800.

[9] Hinz B. Tissue stiffness, latent TGF- $\beta$ 1 activation, and mechanical signal transduction: Implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2009, 11(2): 120-126.

[10] Fowell A J, Collins J E, Duncombe D R, *et al.* Silencing tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) with short interfering RNA reveals a role for TIMP-1 in hepatic stellate cell proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(2): 277-282.

[11] 史苗年,张更荣. 肝硬化患者血清 TGF- $\beta$  和 TIMP-1 检测的临床意义 [J]. 放射免疫学杂志, 2008, 21(3): 279-280.