

大黄素对大鼠胰腺星状细胞TGF- β 1含量的影响

梁晓强, 章学林, 顾宏刚, 张静喆

■背景资料

胰腺纤维化是慢性胰腺炎的典型病理表现, 细胞外基质合成和降解在纤维化过程中起重要作用。以往研究认为大黄素对肝肾纤维化及急性胰腺炎有良好的治疗作用, 用于慢性胰腺炎的治疗研究较少, 同时较多研究认为胰腺星状细胞可能是胰腺纤维化的始动细胞和主要效应细胞。因此, 以胰腺星状细胞为体外实验研究靶点, 观察药物对其干预的影响显得尤为重要。

梁晓强, 上海中医药大学附属龙华医院中医外科研究所 上海市 200032
章学林, 顾宏刚, 张静喆, 上海中医药大学附属龙华医院普外科 上海市 200032
上海市重点学科基金资助项目, No. T0304
上海市医学领军人才基金资助项目, No. LJ06048
上海市教育委员会科研创新基金资助项目, No. 09YZ131
作者贡献分布: 所有作者对此文所作贡献均等; 此课题由梁晓强、章学林及顾宏刚设计; 研究过程由梁晓强操作完成; 数据分析由梁晓强完成; 本论文写作由梁晓强与章学林完成。
通讯作者: 张静喆, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院普外科. zjzzq@sina.com
电话: 021-64385700-3815
收稿日期: 2009-01-09 修回日期: 2009-02-15
接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-04-08

Effect of emodin on transforming growth factor- β 1 in rat pancreatic stellate cells

Xiao-Qiang Liang, Xue-Lin Zhang, Hong-Gang Gu, Jing-Zhe Zhang

Xiao-Qiang Liang, Institute of Chinese Traditional Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Xue-Lin Zhang, Hong-Gang Gu, Jing-Zhe Zhang, Department of General Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by: the Key Subject Foundation of Shanghai, No. T0304; the Medical Leading Talents Foundation of Shanghai, No. LJ06048; and the Science Research Innovation Project of Shanghai Education Commission, No. 09YZ131

Correspondence to: Jing-Zhe Zhang, Institute of Chinese Traditional Surgery, Longhua hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 Wanping South Road, Shanghai 200032, China. zjzzq@sina.com

Received: 2009-01-09 Revised: 2009-02-15

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-04-08

Abstract

AIM: To observe effect of emodin on TGF- β 1 in rat pancreatic stellate cells.

METHODS: We used SD male rats to identify, isolate, and culture pancreatic stellate shaped cells in vitro, and after passage, we used ELASA to observe effect of emodin on TGF-beta1 in rat pancreatic stellate cells.

RESULTS: The TGF-beta1 content of pancreatic stellate cell of emodin in different concentrations was lower than that of control group ($258.90 \pm$

54.46 ng/L, 118.24 ± 36.51 ng/L, 58.22 ± 2.00 ng/L vs 694.36 ± 712.08 ng/L, $P < 0.05$ or 0.01). As the concentration of emodin increased, TGF- β 1 content was reduced accordingly. However, no significant difference was observed.

CONCLUSION: Emodin can cut down TGF- β 1 content of pancreatic stellate cells, which confirms emodin can prevent and cure pancreatic fibrosis by inhibiting expression of TGF- β 1.

Key Words: Pancreatic fibrosis; Emodin; Transforming growth factor- β 1

Liang XQ, Zhang XL, Gu HG, Zhang JZ. Effect of emodin on transforming growth factor- β 1 in rat pancreatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(10): 1018-1020

摘要

目的: 观察大黄素对大鼠胰腺星状细胞TGF- β 1含量的影响。

方法: 取SD雄性大鼠胰腺进行胰腺星状细胞分离、鉴定及体外培养, 传代后用不同浓度大黄素(20、40、60 μ mol/L)对其进行干预, 用ELASA法观察胰腺星状细胞内TGF- β 1含量的变化。

结果: 不同浓度大黄素TGF- β 1含量明显低于对照组(258.90 ± 54.46 ng/L, 118.24 ± 36.51 ng/L, 58.22 ± 2.00 ng/L vs 694.36 ± 712.08 ng/L $P < 0.05$ 或 0.01), 并且随着大黄素浓度的升高, 其TGF- β 1的含量逐渐降低, 但其差异无统计学意义。

结论: 大黄素可降低PSC中TGF- β 1的含量, 说明大黄素可以通过抑制TGF- β 1的表达发挥防治胰腺纤维化的作用。

关键词: 胰腺纤维化; 大黄素; 转化生长因子- β 1

梁晓强, 章学林, 顾宏刚, 张静喆. 大黄素对大鼠胰腺星状细胞TGF- β 1含量的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(10): 1018-1020

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1018.asp>

0 引言

慢性胰腺炎的典型病理表现是胰腺纤维化, 细

■同行评议者

姚希贤, 教授, 河北医科大学附属第二医院消化内科

胞外基质合成和降解在纤维化过程中起重要作用。较多研究认为胰腺星状细胞(pancreatic stellate cell, PSC)可能是胰腺纤维化的始动细胞和主要效应细胞^[1-5]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)调节细胞生长分化, 刺激细胞外基质的合成并抑制其降解, 在组织的修复和纤维化形成中起到非常重要的作用。近年有一些动物实验研究表明大黄素具有抗胰腺纤维化的作用^[6], 本研究即从体外实验的角度, 以 δ SD大鼠的胰腺分离、培养的PSC作为靶细胞, 研究大黄素对其TGF- β 1含量的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠, 清洁级, 体质量 350 ± 20 g, 由上海第二医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(沪2008-0031)。Forma series II型细胞培养箱为美国Thermal公司生产。HS-840-U型细胞培养用超净工作台为江苏苏净集团安泰公司制造。LD4-2A型低速离心机为北京医用离心机制造厂产品。倒置生物显微镜(Olympus, CX31)、胰蛋白酶(批号: 08071101)和DMEM高糖培养液(批号: 08041601)由杭州吉诺生物有限公司提供。胎牛血清(批号: 080428)由杭州四季青公司提供。胶原酶(批号: C5138-10)、链酶蛋白酶(批号: 459643)由美国Sigma公司提供。 α -SMA试剂盒(批号: 080425)由南京建成生物工程研究所提供。TGF- β 1测定ELASA试剂盒(批号: 080926)由南京建成生物工程研究所提供。大黄素(Emodin, EM, 批号8283C)20 mg, 纯度98%, 上海君创生物技术有限公司提供, 置于4℃冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理: 依据大鼠PSC分离与培养的参考文献[7-9], 取新鲜分离的细胞、原代培养7 d的细胞及传代的细胞分别采用细胞免疫化学染色观察 α -SMA, 新鲜分离的细胞 α -SMA染色阴性, 提示无平滑肌细胞污染。在培养第7天时, 95%以上细胞 α -SMA表达阳性, 传代后 α -SMA阳性率>99%。取传代的细胞备用。

1.2.2 TGF- β 1含量的测定: 取传代的PSC接种到96孔细胞培养板, 每孔接种100 μ L, 置于37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中孵育培养72 h后, 加不同浓度的大黄素, 分为对照组(不含大黄素, 含DMSO浓度与各实验组相同的培养液)、大黄素20、40、60 μ mol/L共4组, 每个浓度设6个复孔, 继续置于

37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中孵育培养。培养72 h后, 取上清液采用ELASA法测定TGF- β 1含量, 操作按试剂盒进行(试剂盒由南京建成生物有限公司提供)。

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析方法。运算程序运用SPSS11.5统计软件包进行。

2 结果

对照组TGF- β 1含量明显高于大黄素治疗各组(258.90 ± 54.46 , 118.24 ± 36.51 , 58.22 ± 2.00 ng/L vs 694.36 ± 712.08 ng/L $P < 0.05$ or 0.01), 并且随着大黄素浓度的升高, 其TGF- β 1的含量逐渐降低, 但其差异无统计学意义。

3 讨论

转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是一种多肽类细胞生长因子, 可来源于血小板、炎症细胞、胰腺腺泡细胞、导管上皮细胞及PSC等, 通过与细胞表面高亲和力受体结合, 调节细胞生长分化, 能刺激间质细胞增生、抑制上皮类细胞生长、促进细胞外基质合成并抑制其降解, 在组织的修复和纤维化形成中起关键作用, 是重要的促纤维化因子之一。其具体促纤维化作用包括: 增加PSC合成分泌ECM; 抑制PSC分泌金属基质蛋白酶(MMP)并刺激PSC分泌蛋白酶抑制剂(TIMP)而减少ECM降解; 上调PSC表达TGF- β 及TGF- β 受体, 产生自身放大效应; 调节其他细胞因子生成^[10]。

大黄素(emodin, EMD)为三羟甲基蒽醌衍生物, 是中药大黄的主要有效成分, 其药理作用与大黄有许多相似之处, 具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒等多种生物学活性, 对于急性胰腺炎有良好的治疗作用。同时较多报道证实大黄素有良好的抗肝纤维化作用^[11]。有实验用大黄素干预大鼠肝纤维化模型, 发现大黄素能抑制大鼠肝组织 α -肌动蛋白表达, 提示大黄素能抑制HSC活化从而发挥抗肝纤维化的作用; 同时与模型组比较, 大黄素组TGF- β 1染色面积明显减少, 提示大黄素可能是通过抑制TGF- β 1来发挥抗纤维化作用^[12]。实验研究还显示, 大黄素剂量依赖性增加TGF- β 1表达和TGF- β 1含量, 提示大黄素可能通过调节TGF- β 1信号传导通路来发挥抗纤维化作用^[13]。

本实验首先成功地分离了大鼠胰腺星状细胞, 新鲜分离的PSC在倒置相差显微镜下呈球

■研发前沿

目前对于胰腺纤维化体外研究的热点主要集中在胰腺星状细胞的分离、鉴定及体外培养, 研究重点在于如何在以胰腺星状细胞为靶点的基础上, 深入开展药物对其干预及其作用机制的研究, 这也是亟待进一步研究的问题。

■相关报道

目前, 已有动物实验研究发现大黄素可以降低胰腺纤维化模型大鼠血清透明质酸及血清层黏蛋白的含量, 可抑制胰腺组织TGF- β 1的表达, 从而发挥抗胰腺纤维化的作用。这为将大黄素应用于胰腺纤维化的体外实验研究奠定了基础。

■应用要点

目前对于慢性胰腺炎的体外实验研究愈来愈受到重视,本文以胰腺星状细胞作为靶点,深入研究药物对其干预作用为胰腺纤维化的防治提供了新的途径。

形,直径约为胰腺腺泡细胞的1/3-1/2,或红细胞的2-3倍,细胞核与胞质比例较大,胞质脂滴围绕在核周围,在328 nm紫外光激发下可见蓝绿色自发荧光现象, α -SMA染色阴性,提示无平滑肌细胞污染。72 h细胞向四周伸出突起,呈明显星形外观,似体内形态。7 d时细胞约40%融合,14 d时细胞已80%融合。在培养第7天时,95%以上细胞 α -SMA表达阳性,传代后 α -SMA阳性率>99%,提示此时的PSC已经活化,可以进行后续的实验。

本实验进一步用不同浓度的大黄素对活化的PSC进行干预,结果表明大黄素可以降低PSC上清液中的TGF- β 1的含量($P<0.05$, $P<0.01$),并且随着大黄素浓度的升高,其TGF- β 1的含量逐渐降低,但其差异无统计学意义。提示大黄素可以通过抑制TGF- β 1的表达,从而发挥抑制胰腺纤维化的作用。

■同行评价

本文选题较好,研究方法先进,结论明确,分析论证合乎逻辑,具有良好科学性和一定创新性。

4 参考文献

- 1 Yoo BM, Yeo M, Oh TY, Choi JH, Kim WW, Kim JH, Cho SW, Kim SJ, Hahm KB. Amelioration of pancreatic fibrosis in mice with defective TGF-beta signaling. *Pancreas* 2005; 30: e71-e79
- 2 马晶晶, 王兴鹏. 胰腺星状细胞与胰腺纤维化. 国外医

学·消化系疾病分册 2005; 25: 215-217

- 3 万远太, 王天才. 胰星状细胞与胰纤维化发生机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 376-380
- 4 Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Naidoo D, Wilson JS. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 780-794
- 5 郑永青, 王昱良, 夏时海. 胰腺星状细胞在慢性胰腺炎胰腺纤维化中的作用机制. *胰腺病学* 2007; 7: 415-416
- 6 王彩花, 高志强, 叶斌, 谢传高, 钱可大, 蔡建庭, 杜勤. 大黄素干预大鼠慢性胰腺炎胰腺纤维化进展的研究. *中华医学杂志* 2006; 86: 2552-2555
- 7 Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 1998; 43: 128-133
- 8 贾一韬, 李兆申. 大鼠胰星状细胞的分离与培养. *胰腺病学* 2003; 3: 158-161
- 9 万远太, 赵秋, 王天才, 王波, 李德明. 大鼠胰星状细胞体外分离培养的实验研究. *华中科技大学学报(医学版)* 2005; 34: 125-127
- 10 Talukdar R, Tandon RK. Pancreatic stellate cells: new target in the treatment of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 34-41
- 11 李元, 郭顺根, 吴宇泽, 庞奕晖, 戚红丹. 大黄素抗肝纤维化作用机制研究进展. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2007; 16: 378-381
- 12 展玉涛, 刘宾, 李定国, 毕春山. 大黄素抗肝纤维化的作用机制. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 245-246
- 13 唐甜, 杨静. 大黄素对家兔实验性皮肤创伤的促愈合作用及其机制. *中国药理学与毒理学杂志* 2006; 20: 112-119

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标,选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种,统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年),涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度,5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊,分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表,第66页)。(常务副总编辑:张海宁 2009-04-08)