文章编号:1000-5404(2007)07-0585-03

论著

丹参酮Ⅱ-A磺酸钠对纤维化人肾间质成纤维细胞体外增殖及cyclin E蛋白表达的影响

孙兴旺[1],曹 灵[2],于国华[1],唐学清[1],郭庆喜[1],张 弦[1],王 巍[1],许 凯[1] (泸州医学院:[1]基础医学院病理学教研室,[2]附属医院肾内科,泸州 646000)

提 要: 目的 研究丹参酮Ⅱ-A磺酸钠(sodium tanshinone Ⅱ-A sulfonate,DS-201)对人肾间质纤维化来源的成纤维细胞(human renal interstitial fibroblasts,hRIFs)体外增殖及细胞周期素E(cyclin E)基因表达的影响,探讨该药治疗肾间质纤维化的作用机制。**方法** 体外培养并鉴定hRIFs;用四甲基偶氮唑(MTT)法检测对照组与不同DS-201浓度组hRIFs的增殖活性;用免疫细胞化学S-P法和图像分析技术检测对照组与不同DS-201浓度组hRIFs cyclin E基因的表达。**结果** 随药物浓度的升高和作用时间的延长,抑制率逐渐升高,抑制作用逐渐增强,呈剂量依赖性和时间依赖性。用药组阳性细胞的平均光密度值在第3、5、7、9天显著低于对照组($P<0.05$,$P<0.01$),第1天用药各组与对照组之间无统计学差异($P>0.05$)。**结论** ① DS-201对hRIFs体外增殖有显著抑制作用,可能是其治疗肾间质纤维化的机制之一。② DS-201抑制hRIFs体外增殖可能是通过抑制细胞中cyclin E基因的表达,阻滞细胞通过G_1/S关卡,延长细胞周期实现的。

关键词: 丹参酮Ⅱ-A磺酸钠;肾脏;纤维化;成纤维细胞;细胞周期素E
中图法分类号: R285.5; R329.28; R692.05 **文献标识码**: A

Effect of sodium tanshinone Ⅱ-A sulfonate on proliferation and cyclin E expression in human renal interstitial fibroblasts *in vitro*

SUN Xing-wang[1], CAO Ling[2], YU Guo-hua[1], TANG Xue-qing[1], GUO Qing-xi[1], ZHANG Xuan[1], WANG Wei[1], XU Kai[1] ([1]Department of Pathology, [2]Department of Nephrology, The Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

Abstract: Objective To study the effect of sodium tanshinone Ⅱ-A sulfonate (DS-201) on the proliferation of human renal interstitial fibroblasts (hRIFs) and the expression of cyclin E. **Methods** After hRIFs were cultured and identified, MTT was used to detect the cells at passage 3-4 in present or absent of DS-201 at different concentrations. The expression of cyclin E was analyzed by immunocytochemistry and the image-analytical technique. **Results** With the increase of the drug concentration and prolongation of action time, the inhibitory ratio was increased in a dose- and time-dependent manner. The expression of cyclin E was stronger in drug groups than in control group on the 3rd, 5th, 7th and 9th day ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** DS-201 significantly inhibits the hRIFs *in vitro*, which may be one of its mechanisms to suppress renal interstitial fibrosis. The mechanism of this inhibition may be due to that sodium tanshinone Ⅱ-A sulfonate inhibits the expression of cyclin E, thus blocks the G_1/S point and extents the cell cycle.

Key words: sodium tanshinone Ⅱ-A sulfonate; renal interstitium; fibrosis; fibroblasts; cyclin E

DS-201是中药丹参(*Salvia Mihiorrhiza Bung*)脂溶成分丹参酮Ⅱ-A经磺化而成的水溶性钠盐。药理实验证实DS-201有抗急性缺氧、改善左心室功能及减少血栓形成等效用。在肾脏疾病研究领域,丹参有延缓大鼠梗阻性肾间质纤维化的作用,但具体作用机制尚不清楚。细胞周期蛋白E(cell cycle protein E,cyclin E)被认为与肿瘤细胞的增殖有密切关系[1],在细胞增殖中的作用已引起人们的广泛注意。本实验拟采用S-201体外干预hRIFs,观察药物对hRIFs体外增殖过程中cyclin E基因表达的影响,揭示该药治疗肾间质纤维化的作用机制。

基金项目:四川省中医药管理局科研基金(200022)
Supported by the Scientific Research Fund of Sichuan Administration of Traditional Chinese Medicine (200022)

作者简介:孙兴旺(1965-),男,陕西省临潼市人,副教授,主要从事器官纤维化分子病理方面的研究。电话:(0830)3160528,E-mail:lzsunxw@163.com
通讯作者:曹 灵,电话:(0830)3357648

收稿日期:2006-04-12;**修回日期**:2006-11-22

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

0.25% 胰蛋白酶(Sigma 公司)、RPMI1640 培养液(GIBCO)、小牛血清(成都哈里生物制品有限公司)、1:100 多聚赖氨酸、DS-201(四川广汉本草植化有限公司),MTT(成都天泰生命科技有限公司),鼠抗人 cyclin E 单克隆抗体、DAB(均购自基因公司),S-P 超敏试剂盒(福州迈新生物科技有限公司);24 孔培养板(晶美生物工程公司),酶联免疫检测仪(Anthos enyth200,奥地利)、倒置相差显微镜(日本,Olympus)、CO_2 培养箱(SHELLAB,美国)、超净工作台(上海净化设备厂)。

1.2 细胞培养

参照文献[2,3]培养鉴定 hRIFs。选取第 3~4 代对数生长期成纤维细胞用于下列实验。

1.3 MTT 比色实验

hRIFs 经胰蛋白酶消化后用无血清 1640 培养基制成 6×10^4/ml 细胞悬液接种至 96 孔培养板,每孔细胞悬液量为 100 μl。培养 18 h 后更换培养基,加入 DS-201 终浓度分别为 0.5、1.0、2.0mg/ml 含 10% 小牛血清的 1640 培养基 200 μl 继续培养;同一药物浓度组设 25 个复孔,以不加药组为对照。于更换培养基后的第 1、3、5、7、9 天每组取 5 个复孔参照文献[3]做 MTT 比色实验,用酶联免疫检测仪在波长 490 nm 处检测吸光度值[D(490)]。按抑制率(IR)=[1-用药组 D(490)/实验组 D(490)]×100% 计算获得 IR,并求其均值 IR_A。

1.4 免疫细胞化学检测 cyclin E 表达

hRIFs 用无血清 1640 培养基制成 6×10^4/ml 悬液接种至 5 块 24 孔培养板中(24 孔板中预先放置多聚赖氨酸处理过的盖玻片);每孔细胞悬液量为 1 ml。培养 18 h 后更换培养基,加入 DS-201 终浓度分别为 0.5、1.0、2.0 mg/ml 含 10% 小牛血清的 1640 培养基 2 ml 继续培养;同一药物浓度组设 25 个复孔,以不加药组为对照。于更换培养基后的第 1、3、5、7、9 天每组各取 4 张细胞爬片按超敏 S-P 试剂盒说明书步骤做 cyclin E 的免疫细胞化学染色,阳性信号为棕黄色颗粒。每组各取 1 张细胞爬片用 0.01 mol/L PBS 缓冲液代替一抗行免疫细胞化学染色,结果作为实验的阴性对照。

1.5 图像分析

每张染色以后的 hRIFs 爬片随机选取 10 帧图像,采用 GD-10.0 多媒体彩色病理图文分析系统(成都电子科技大学金盘公司多媒体图像研究所研制)自动分析每帧图像 cyclin E 表达阳性 hRIFs 的平均光密度值 AI[4],求得各浓度组各时间点阳性 hRIFs 平均光密度值的均值 AI_A。

1.6 统计学分析

数据用 $x\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 MTT 比色实验结果

DS-201 对 hRIFs 体外生长具有明显的抑制作用,并随药物 DS-201 浓度的升高和作用时间的延长,抑制作用逐渐增强($P<0.05$)(表 1)。

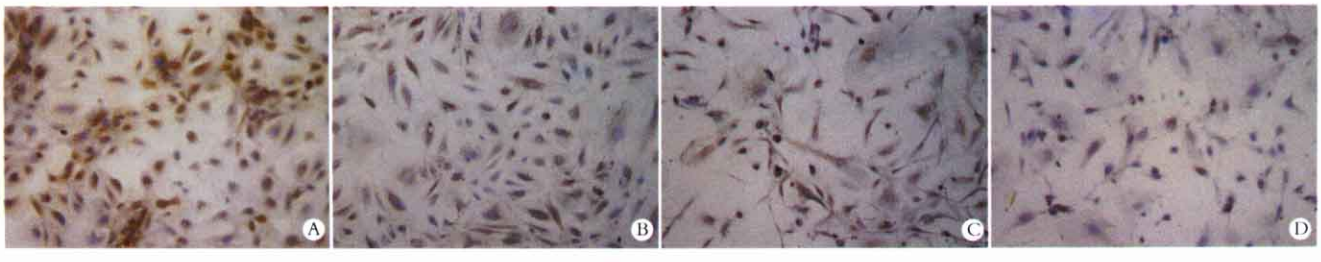
表 1 不同浓度 DS-201 组体外培养肾间质纤维化成纤维细胞 IR_A 的比较[($x\pm s$)%]

浓度(mg/ml)	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天
0.5	7.36±1.05	12.11±2.13	57.08±2.95	67.04±5.61	76.36±8.98
1.0	16.38±7.06	18.17±4.23[a]	62.04±5.26[a]	88.28±0.18[b]	91.37±0.54[b]
2.0	21.10±7.66[a]	25.72±2.27[bc]	79.89±2.86[bc]	90.09±0.58[b]	91.59±0.44[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 0.5 mg/ml 组比较; c: $P<0.01$, 与 1.0 mg/ml 组比较

2.2 cyclin E 免疫细胞化学染色结果

cyclin E 阳性表达呈棕黄色颗粒状,主要位于细胞核。同一时间点与对照组相比,各 DS-201 组 hRIFs 随着用药浓度的升高,细胞总量逐渐递减,cyclin E 阳性表达的细胞数量也相应减少,细胞中阳性信号的颜色由棕黄色转变为淡黄色甚至呈阴性表达。用药后的 hRIFs 形态由均一的梭形变成圆形、椭圆形、细长不规则条状等,且随着药物浓度的增大形态变化越明显(图 1)。



A: 对照组; B: 0.5 mg/ml 组; C: 1.0 mg/ml 组; D: 2.0 mg/ml 组

图 1 成纤维细胞培养第 5 天 cyclin E 表达 (S-P ×100)

2.3 cyclin E 阳性细胞图像分析结果

对照组 cyclin E 阳性细胞的平均光密度值第 5 天达到高峰,第 7~9 天逐渐下降;0.5 mg/ml 组和 1.0 mg/ml 组平均光密度值达到峰值的时间均为体外培养后的第 3 天;2.0 mg/ml 组平均光密度值从第 1 天开始便呈现下降趋势。体外培养第 3、5、7、9 天,用药组 cyclin E 平均光密度值相对于对照组显著

降低（$P<0.05$，$P<0.01$），第 1 天各组之间无统计学差异（$P>0.05$）。除 2.0 mg/ml 组与 0.5 mg/ml 组相比较于第 9 天有显著差异（$P<0.05$）外，第 1、3、5、7、9 天各用药组组间两两比较平均光密度值无显著差异（$P>0.05$）（表 2）。

表 2　DS-201 对肾间质纤维化成纤维细胞 cyclin E 表达的影响（$x\pm s$）

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天	第 9 天
对照组	0.977 8 ±0.255 2	1.978 6 ±0.208 4	2.468 7 ±0.267 0	1.519 4 ±0.150 8	1.251 3 ±0.230 2
0.5 mg/ml 组	0.793 3 ±0.493 2	1.343 9 ±0.126 3[b]	1.087 3 ±0.366 0[b]	1.004 2 ±0.264 7[a]	0.792 3 ±0.110 5 [a]
1.0 mg/ml 组	0.666 1 ±0.481 3	1.117 3 ±0.197 6[b]	0.814 8 ±0.219 6[b]	1.033 8 ±0.309 2[a]	0.421 2 ±0.282 7[b]
2.0 mg/ml 组	1.047 7 ±0.228 8	0.955 3 ±0.313 6[b]	0.881 8 ±0.164 4[b]	0.629 2 ±0.183 3[bc]	0.502 7 ±0.072 3[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，与 0.5 mg/ml 组比较

3　讨论

肾间质纤维化形成的机制尚未完全明确，一般认为成纤维细胞的过量增殖和细胞外基质的过量分泌、异常沉积是导致肾间质纤维化的重要原因。成纤维细胞又是产生细胞外基质的功能细胞，因此与肾间质纤维化有密切关系[5]。能够抑制成纤维细胞增殖的药物，对临床预防和治疗肾间质纤维化必将有积极的意义。

本实验结果显示：DS-201 对成纤维细胞体外生长的抑制效应随着培养时间的延长、药物浓度的升高而逐渐增强，说明 DS-201 能够抑制肾间质纤维化来源的成纤维细胞的体外增殖，且这种效应呈现剂量依赖性和时间依赖性。也与左强等[6]发现丹参酮Ⅱ-A 对瘢痕来源的成纤维细胞的增殖具有显著抑制作用的结论较为吻合。

细胞增殖与细胞周期有密切关系，其中 G_1 期的启动是细胞周期的关键[7]。cyclin E 是细胞周期素依赖性激酶 2（CDK2）的活化因子之一，主要表达于 G_1/S 期转换阶段，是 DNA 复制起始的关键因子，在细胞通过 G_1/S 关卡过程中发挥重要作用[8,9]。实验结果显示对照组 cyclin E 阳性细胞的平均光密度值的变化规律是：第 5 天达到高峰，第 7～9 天逐渐下降；在培养的第 1 天各浓度 DS-201 组与对照组比较，cyclin E 阳性的细胞平均光密度值无显著差异；而在培养的第 3、5、7、9 天，DS-201 组平均光密度值与对照组相比较则有显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），这可能与在培养的第 1 天更多的细胞处于潜伏期、细胞自身 cyclin E 的表达很低有关。然而，第 1 天 2.0mg/ml 浓度组 cyclin E 阳性细胞平均光密度值增高，有可能是高浓度 DS-201 刺激 hRIFs 引起的反应性增殖所致。虽然在除第 7 天 2.0 mg/ml 浓度组以外的各时间点，各用药组的 cyclin E 阳性细胞平均光密度值之间无统计学意义，但各用药组 cyclin E 阳性细胞平均光密度值均呈现下降趋势，同时随用药浓度的升高，cyclin E 阳性细胞的平均光密度值达到峰值的时间有提前趋势，各用药组的峰值也随用药浓度的升高在逐渐降低，提示了 DS-201 抑制 cyclin E 的表达具有一定浓度依赖关系。

综上所述，DS-201 能够抑制肾间质纤维化来源的成纤维细胞体外增殖，且呈现剂量依赖性和浓度依赖性，这可能是其延缓肾间质纤维化的机制之一；DS-201 抑制成纤维细胞的增殖可能是通过抑制细胞中 cyclin E 的表达，延长细胞周期实现的。

参考文献：

[1] Strohmaier H, Spruck C H, Kaiser P, *et al*. Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line[J]. Nature, 2001, 413(6853): 316－322.

[2] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版公司，1996：186－187.

[3] 孙兴旺，于国华，曹　灵，等. 人肾间质纤维化成纤维细胞的培养与鉴定[J]. 泸州医学院学报，2005，28(2)：117－119.

[4] 孙兴旺，陈　明，曹　灵，等. 大鼠早期糖尿病肾小球及肾小管的动态病理变化[J]. 泸州医学院学报，2000，23(5)：364－367.

[5] Dynlacht B D. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle[J]. Nature, 1997, 389(6647): 149－152.

[6] 左　强，张培华，罗少军，等. 丹参酮Ⅱ-A 对瘢痕成纤维细胞增殖及凋亡的影响[J]. 广东医学，2004，25(6)：636－637.

[7] Hirama T, Koeffler H P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer[J]. Blood, 1995, 86(3): 841－854.

[8] Reed S I. Cyclin E: in mid-cycle[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1278(2－3): 151－153.

[9] Reed S I. Control of the G_1/S transition[J]. Cancer Surv, 1997, 29: 7－23.

（编辑　薛国文）