

## · 基础论著 ·

## 苦参碱含药血清对大鼠肝干细胞的影响

杨志云 姚树坤 殷飞

**【摘要】** 目的 研究苦参碱含药血清对大鼠肝干细胞系 WBF-344 细胞的增殖及 AFP、Notch1 蛋白和 mRNA 表达的影响。方法 用 MTT 法检测苦参碱含药血清对 WBF-344 细胞增殖的影响,免疫细胞化学及 RT-PCR 方法检测苦参碱含药血清对 WBF-344 细胞 AFP、Notch1 蛋白和 mRNA 表达的影响。结果 5%、10%、20% 浓度的苦参碱含药血清作用于 WBF-344 细胞 24 h、48 h、72 h 均有不同程度的抑制增殖作用,且存在时间、剂量依赖性。正常培养 WB-F344 细胞有少量 AFP、Notch1 蛋白和 mRNA 表达,肝癌前病变模型组血清培养后 AFP、Notch1 蛋白和 mRNA 表达上调,苦参碱含药血清培养后 AFP、Notch1 蛋白和 mRNA 表达较模型组血清 AFP、Notch1 蛋白和 mRNA 表达下调。结论 肝癌前病变模型组血清可能具有诱导 WBF-344 细胞向肝癌细胞方向分化的作用,苦参碱含药血清可逆转此作用,以上作用与调节 Notch1 表达关系密切。

**【关键词】** 苦参碱;含药血清;肝干细胞

**The effect of matrine drug serum on rat liver stem cell in vitro** YANG Zhi-yun, YAO Shu-kun, YIN Fei. Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Corresponding author: YANG Zhi-yun, Email: yangzhiyun6@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To explore matrine drug serum's effect on proliferation of rat liver stem cell and expression of AFP, Notch1 protein and mRNA. **Methods** MTT method was used to examine the proliferation effect of matrine drug serum on rat liver stem cell. The immunocytochemistry stain method was used to study the expression of AFP, Notch1 protein and mRNA. **Results** The 5%, 10%, 20% matrine drug serum can inhibit proliferation of WBF-344 cells in 24 h, 48 h, 72 h, the inhibitory function depended on time and concentration. Expression of AFP, Notch1 protein and mRNA in control group were low and were up-regulated by hepatic precancerous lesion model sera. Expression in matrine drug serum group was lower than that in hepatic precancerous lesion model serum group. **Conclusions** The hepatic precancerous lesion model sera may induce WBF-344 into hepatoma carcinoma cell, matrine drug serum can reverse this effect, which was related to regulation of Notch1 expression.

**【Key words】** Matrine; Drug serum; Liver stem cell

基金项目:河北省自然科学基金项目(C2007001063)

作者单位:100011 北京市,北京地坛医院(杨志云);中日友好医院(姚树坤);河北医科大学附属第四医院消化内科(殷飞)

通讯作者:杨志云 Email: yangzhiyun6@yahoo.com.cn

肝干细胞,亦称肝卵圆细胞,是一种具有多向分化潜能的细胞,在某些细胞因子的作用下可分化为成熟肝细胞,另一方面在某些恶性环境的作用下肝干细胞增殖分化异常,可能发展为肝癌细胞<sup>[1]</sup>。哪些信号分子调控着肝干细胞的分化发育?目前尚不清楚。近年来研究表明,Notch 信号不仅可调控正常细胞的分化,在肿瘤的形成中所起的重要作用已成为近年来研究的热点<sup>[2]</sup>,但 Notch 信号分子对肝干细胞的作用如何尚未见相关报道。现代药理研究证明苦参碱在抑制肝癌细胞增殖、诱导分化、凋亡、抑制肿瘤细胞转移等方面具有很好疗效<sup>[3-5]</sup>,但对肝干细胞的作用尚不十分清楚。本实验利用大鼠肝干细胞系 WBF-344 细胞,观察了苦参碱含药血清对 WBF-344 增殖及对 AFP、Notch1 蛋白和 mRNA 表达的影响,探讨了苦参碱在肝干细胞增殖、分化中的作用。

## 材料和方法

### 一、材料与试剂

大鼠 WBF-344 肝干细胞系由中国医学科学院药物研究所引进。兔抗大鼠 Notch1 多克隆抗体、山羊抗大鼠 AFP 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,逆转录酶、Taq DNA 聚合酶等均购自美国 Promega 公司,目的基因引物由上海生物工程公司合成。

### 二、方法

1. 含药血清的制备:50 只大鼠随机分为 3 组,A、B 组每组 20 只,C 组 10 只,A 组为肝癌前病变模型组,B 组为苦参碱组,C 组为正常对照组。A、B 组大鼠实验开始第一天腹腔注射二乙基亚硝胺(DEN)200 mg/kg,普通饲料喂养 2 周后饲以含 0.015% 2-AAF 的饲料,第 3 周末按经典术式行 2/3 肝大部分切除术,手术 3 d 后继续饲以含 0.015% 2-AAF 饲料 4 周,7 周末实验结束。B 组于造模同时开始灌胃给药(上午 8:00 与下午 5:00 每日灌胃两次),切肝后 3 d 暂停给药,此后继续给药至实验结束;C 组常规饲养,并以等量生理盐水灌胃。于 7 周末最后一次灌胃给药后 2 h 麻醉动物,下腔静脉取血,分离血清,过滤除菌,冻存备用。

2. MTT 法检测清肝化瘀方药血清对 WBF-344 细胞株增殖影响:贴壁生长的 WBF-344 细胞株 0.25% 胰蛋白酶消化后用无血清 RPMI-1640 培养液稀释成  $2 \times 10^5$ /ml 细胞悬液,接种于 96 孔培养板上,180  $\mu$ l/孔,分别加入苦参碱含药血清 20  $\mu$ l/孔、10  $\mu$ l/孔、5  $\mu$ l/孔,每孔总体积不够 200  $\mu$ l 的添加无血清 RPMI 1640 培养液至 200  $\mu$ l,使苦参碱含药血清的终浓度为 20%、10%、5%;同样肝癌前病变模型血清组:用终浓度为 20%、10%、5% 的肝癌前病变模型组血清配制成细胞悬液,200  $\mu$ l/孔,每种浓度均作 6 个平行孔,混匀后放入 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。常规 MTT 检测酶标仪检测 570 nm 波长处的吸光度 A 值,参考波长是 630 nm。

模型血清对细胞生长的增殖率 = (模型组血清平均 A 值/正常对照组血清平均 A 值 - 1)  $\times$  100%,含药血清对模型生长的抑制率 = (1 - 含药血清组平均 A 值/模型组血清平均 A 值)  $\times$  100%

3. 免疫细胞化学检测 AFP、Notch1 蛋白表达:根据 MTT 结果,二种含药血清

均选择对细胞增殖有明显抑制作用的 20% 含药血清浓度和 48 h 作为实验浓度与作用时间。实验血清共分 3 组: A 组为模型组血清; B 组为 20% 苦参碱含药血清; C 组为 20% 正常鼠血清组。免疫细胞化学方法(PV 法)按试剂盒说明书操作,应用彩色图文分析系统对染色阳性部位灰度值进行定量分析。

4. RT-PCR 检测 AFP mRNA、Notch1 mRNA 表达: 引物序列依据文献[6,7],由上海生物工程公司合成。按试剂盒说明提取肝组织总 RNA、反转录成 cDNA、PCR 扩增及电泳。AFP 基因扩增条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 54.2℃ 30 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 5 min。β-肌动蛋白基因扩增条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 28 个循环, 72℃ 延伸 5 min。Notch1 基因扩增条件为: 94℃ 5 min, 然后 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 5 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB)上电泳,用凝胶图像分析系统分析结果。以 Notch1、RBP-Jκ、HES1 与 β-肌动蛋白条带光密度比值进行半定量分析。

表 1 AFP、Notch1 及 β-肌动蛋白 PCR 扩增引物

检测指标	序列	引物长度(bp)
AFP	5' -tgaaattgccacgagacgg-3'	272
	5' -tgtcactactgagcggctaag-3'	
Notch1	5' - atccatggctccatcgtcta-3'	422
	5' - ttctgattgtcgtccatcag-3'	
β-肌动蛋白	5' -gccatgtacgtagccatcca-3'	375
	5' -gaaccgctcattgccgatag-3'	

### 三、统计学处理

用统计软件 SPSS 13.0 进行 one-way ANOVA 单因素方差分析。

## 结 果

### 一、MTT 检测

不同浓度 A 组血清作用于 WBF-344 细胞 24 h、48 h、72 h 均有不同程度的促进增殖作用,不同浓度 B 组血清作用于 WBF-344 细胞 24 h、48 h、72 h 均有不同程度的抑制增殖作用,同一浓度 B 组血清随时间延长该药对 WBF-344 细胞增殖的抑制率逐渐增加,同一时间点 B 组血清随浓度增加该药对 WBF-344 细胞增殖的抑制率逐渐增加,提示苦参碱含药血清对 WBF-344 细胞增殖的抑制作用存在时间和剂量依赖性(图 1)。

### 二、AFP、Notch1 免疫组织化学染色

正常 C 组细胞胞浆、胞膜上可见浅棕色颗粒为阳性表达信号,核不着色; A 组表达阳性信号为深棕色; B 组表达阳性信号为棕黄色(图 2、3,表 2)。

### 三、AFP mRNA、Notch1 mRNA 的 RT-PCR 检测

A 组 WBF344 细胞表达 AFP mRNA、Notch1 mRNA 条带较弱, B 组二者条带明

显增强,C组表达较B组减弱(表3、图4)。

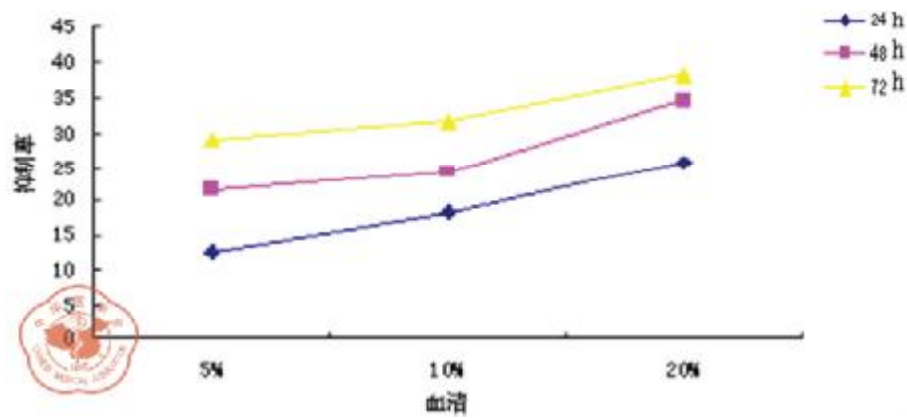


图1 苦参碱含药血清对 WBF-344 细胞增殖的影响

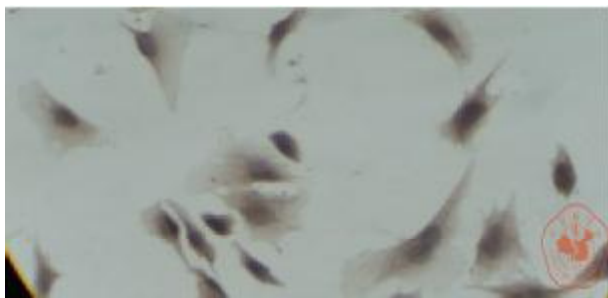


图2 AFP 免疫组织化学染色(PV, 400 ×)

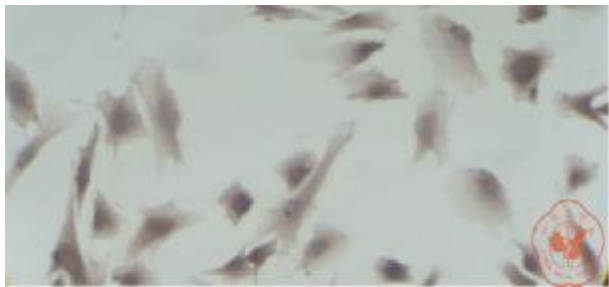


图3 Notch1 免疫组织化学染色(PV,400 ×)

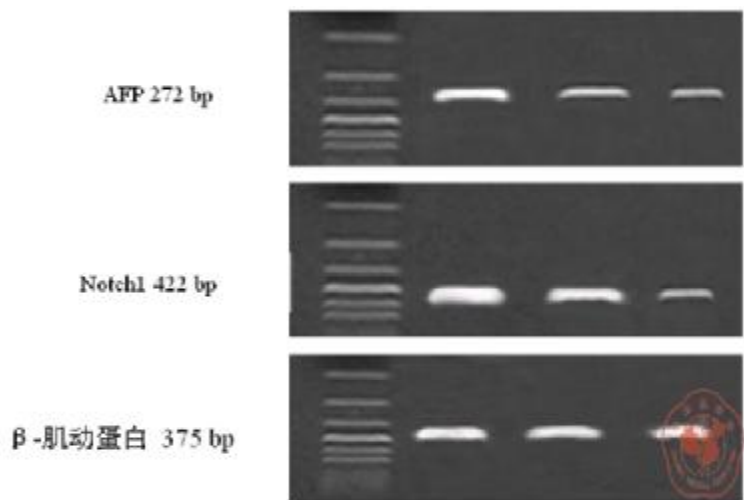


图4 AFP mRNA、Notch1 mRNA RT-PCR 检测

表2 AFP、Notch1 在不同实验组的表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	AFP	Notch1
A	113.17 ± 14.25	84.97 ± 6.41
B	73.06 ± 6.26 *	61.50 ± 5.43 *
C	35.95 ± 4.83 *	33.20 ± 3.60 *

注:与 A 组相比 \*  $P < 0.01$



表3 AFP mRNA、Notch1 mRNA 在不同实验组的表达( $\bar{x} \pm s$ )

组别	AFP mRNA	Notch1 mRNA
A	0.89 ± 0.07	1.20 ± 0.09
B	0.72 ± 0.04 *	0.92 ± 0.04 *
D	0.48 ± 0.04 *	0.53 ± 0.05 *

注:与 A 组相比 \*  $P < 0.01$ 

## 讨 论

肝卵圆细胞已被公认为是肝脏的干细胞,有多向分化潜能和很强的自我复制能力,正常成年肝脏是相对静止的器官,成年肝脏中卵圆细胞数目少,处于休眠状态。当肝脏轻度受损时,成熟肝细胞或胆管细胞经过1~2次有丝分裂,恢复肝脏体积与功能<sup>[8]</sup>。当肝脏实质受到严重破坏或由于病毒、药物等因素作用时,卵圆细胞被激活大量增殖,这些细胞首先出现在胆管旁,然后迁移到肝脏实质,分化为肝细胞和胆管细胞,修复和重建肝脏<sup>[9]</sup>。至此,我们了解到,卵圆细胞作为肝脏的干细胞在一定的刺激下可大量增生并向成熟肝细胞和胆管细胞分化,但在某些恶性因素作用下也可能向肝细胞癌或胆管细胞癌方向发展,究竟是哪些因素调控着卵圆细胞的增殖、分化?这是一个十分复杂的过程,其中包括细胞与细胞之间、细胞与基质之间的相互作用,以及细胞因子、信号通路在时间和空间上协调一致的调控作用。近年来国内外不少学者在此方面进行了探索,有结果发现:在急慢性肝损伤时伴随 wnt、Shh、Notch 信号通路激活而维持干细胞增值和分化<sup>[10]</sup>。肝癌细胞也存在 wnt、Shh、Notch 通路的持续激活,过度表达 EBP50 蛋白持续激活 wnt 通路促进肝癌的形成<sup>[11]</sup>。Notch 受体家族在决定细胞命运中起着关键作用。在不同的细胞类型中,Notch 信号可促进或抑制细胞增殖、分化和凋亡。Notch 信号不仅对正常细胞分化起重要作用,在肿瘤的形成中所起的重要作用已成为近年来研究的热点问题。

本研究结果显示肝癌前病变模型组血清有促进 WB-F344 细胞增殖作用并上调 AFP、Notch1 蛋白表达,AFP 是临床诊断肝癌的一个重要指标,而肝癌前病变模型血清中含有某些致癌因子,在这种致癌因素刺激下肝干细胞向肝癌细胞方向分化;在此过程中 Notch1 高表达,我们推测致癌因素通过激活 Notch1 分子诱导肝干细胞癌变,至少肝干细胞癌变与 Notch1 分子活化关系甚密切。苦参碱血清可抑制 WB-F344 细胞增殖,下调 AFP、Notch1 蛋白表达,我们推测苦参碱可能是通过下调 Notch1 分子来逆转癌变的,这为临床应用苦参碱防治癌变提供了新的实验依据。此过程中 Notch 信号通路中的其它关键分子是否亦活化?它们之间是如何传递活化信号的?其下游目的基因有哪些?待进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- 1 Strick-Marchand H, Morosan S, Charneau P, et al. Bipotential mouse embryonic liver stem cellines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 8360-8365.

- 2 Allman D, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol Rev*, 2002, 187: 75-86.
- 3 王涌, 彭承宏, 张国平. 苦参碱诱导 SMMC-7721 细胞分化过程中侵袭转移相关指标的实验研究. *中药材*, 2003, 26: 566-569.
- 4 陈伟忠, 曾欣, 林勇, 等. 苦参碱对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响及端粒酶活性调控的体外研究. *第二军医大学学报*, 2002, 23: 498-500.
- 5 申晓东, 宋关斌, 严润彬, 等. 苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究进展. *重庆大学学报*, 2005, 28: 125-128.
- 6 Nishikawa Y, Doi Y, Watanabe H, et al. Trans-differentiation of mature rat hepatocytes into bile duct like cells in vitro. *Am J Pathol*, 2005, 166: 1077-1088.
- 7 Jensen CH, Jauho EI, Santoni-Rugiu E, et al. Transit-amplifying ductular (oval) cells and their hepatocytic progeny are characterized by a novel and distinctive expression of delta-like protein/preadipocyte factor 1/fetal antigen1. *Am J Pathol*, 2004, 164: 1347-1359.
- 8 Runge D, Runge DM, Jager D, et al. Serum-free, long-term cultures of human hepatocytes: maintenance of cell morphology, transcription factors, and liver-specific functions. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269: 46-53.
- 9 Braun KM, Thompson AW, Sandgren EP. Hepatic microenvironment affects oval cell localization in albumin-urokinase-type plasminogen activator transgenic mice. *Am J Pathol*, 2003, 162: 195-202.
- 10 Hussain SZ, Sneddon T, Tan X, et al. Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development. *Exp Cell Res*, 2004, 292: 157-169.
- 11 Shibata T, Chuma M, Kokubu A, et al. EBP50, a beta-catenin associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2003, 38: 178-186.

(收稿日期: 2008-01-22)

(本文编辑: 王丹静)

杨志云, 姚树坤, 殷飞. 苦参碱含药血清对大鼠肝干细胞的影响[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2008, 2(2): 33-38.