

中药单体榄香烯体外对人晶状体上皮细胞内胶原蛋白合成的影响

胡艳红¹, 黄秀榕², 祁明信¹, 侯补元², 冯春燕¹, 陈 胜¹, 柯发杰¹

基金项目: 中国福建省卫生厅重点课题资助项目(No. wzzb0605); 中国福建省科技厅青年人才基金项目(No. 2008F3050)

作者单位: ¹(350003)中国福建省福州市, 福建中医学院附属第二人民医院眼科; ²(350003)中国福建省福州市, 福建中医学院病理生理研究中心

作者简介: 胡艳红, 医学博士, 研究方向: 白内障的基础与临床。

通讯作者: 黄秀榕, 教授, 研究方向: 白内障的基础与临床. qihuang@netease.com

收稿日期: 2008-10-30 修回日期: 2009-03-23

Effects of elemene on collagen synthesis of human lens epithelial cell

Yan-Hong Hu¹, Xiu-Rong Huang², Ming-Xin Qi¹, Bu-Yuan Hou², Chun-Yan Feng¹, Sheng Chen¹, Fa-Jie Ke¹

Foundation items: Department of Health Funded Projects Focus on Topics of Fujian Province, China (No. wzzb0605); Youth Fund Projects of Fujian Provincial Science and Technology Department, China(No. 2008F3050)

¹Department of Ophthalmology, the Second Affiliated People's Hospital of Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China; ² Research Center of Pathophysiology, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

Correspondence to: Xiu-Rong Huang. Research Center of Pathophysiology, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China. qihuang@netease.com

Received: 2008-10-30 Accepted: 2009-03-23

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of elemene (Ele) on collagen synthesis of human lens epithelial cells B3 (HLE-B3).

• **METHODS:** Using 10 μ g/L recombinant human basic fibroblast growth factor (rhbFGF) to induce proliferation of HLE-B3. Proliferative HLE-B3 were incubated with 80mg/L Ele in CO₂ incubator for 24 hours. Then The contents of collagen I and collagen III of HLE-B3 were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

• **RESULTS:** The collagen I content of HLE-B3 was 53.5 \pm 5.4 μ g/L in rhbFGF group, which increased obviously compared with control group (38.5 \pm 2.3 μ g/L). The collagen I contents of HLE-B3 was 29.5 \pm 2.9 μ g/L in Ele, which decreased obviously to compare with rhbFGF group ($P < 0.01$); The collagen III content of HLE-B3 was 1.27 \pm 0.29 μ g/L in rhbFGF group, which increased obviously compared with control group (0.8 \pm 0.1 μ g/L). The collagen III contents of HLE-B3 were 0.7 \pm 0.1 μ g/L in Ele groups, which decreased obviously to compare with rhbFGF group ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** Ele could effectively inhibit HLE-B3 proliferation induced by rhbFGF. Ele could inhibit the synthesis of collagen I and collagen III in HLE-B3 as

well. The inhibitive effects of Ele on the HLE-B3 proliferation and the synthesis of collagen I and collagen III make it probably become reliable and effective drugs to prevent and treat posterior capsular opacification.

• **KEYWORDS:** elemene; lens epithelial cell; after-cataract; collagen I; collagen III

Hu YH, Huang XR, Qi MX, *et al*. Effects of elemene on collagen synthesis of human lens epithelial cell. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(8):1456-1457

摘要

目的: 探讨中药单体榄香烯 (effects of elemene, Ele) 对人晶状体上皮细胞系 (human lens epithelial cells B3, HLE-B3) 内 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白合成的影响。

方法: 利用 10 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子 (recombinant human basic fibroblast growth factor, rhbFGF) 诱导 HLE-B3 增殖, 将 80mg/L 的 Ele 作用在处于增殖状态下的 HLE-B3, 24h 后采用双抗体夹心 ABC-酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 Ele 作用后 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白表达。

结果: rhbFGF 作用后 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白浓度为 53.5 \pm 5.4 μ g/L, 较正常组 (38.5 \pm 2.3 μ g/L) 明显升高, Ele 作用后 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白的浓度为 29.5 \pm 2.9 μ g/L, 较 rhbFGF 组明显下降 ($P < 0.01$)。rhbFGF 作用后 HLE-B3 内 III 型胶原蛋白浓度为 1.27 \pm 0.29 μ g/L, 较正常组 (0.83 \pm 0.12 μ g/L) 明显升高, Ele 作用后 HLE-B3 内 III 型胶原蛋白的浓度为 0.69 \pm 0.11 μ g/L, 较 rhbFGF 组明显下降 ($P < 0.01$)。

结论: Ele 抑制 rhbFGF 诱导的 HLE-B3 增殖的同时也能抑制 HLE-B3 内 I, III 型胶原蛋白合成, 干扰 HLE-B3 纤维化, 可望成为防治后囊膜混浊的理想药物。

关键词: 榄香烯; 晶状体上皮细胞; 后囊膜混浊; I 型胶原蛋白; III 型胶原蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2009.08.008

胡艳红, 黄秀榕, 祁明信, 等. 中药单体榄香烯体外对人晶状体上皮细胞内胶原蛋白合成的影响. 国际眼科杂志 2009;9(8):1456-1457

0 引言

胶原蛋白 (collagen) 或称胶原, 是动物细胞合成的一种生物性高分子, 是一类最主要的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。目前的研究表明, ECM 与后囊膜混浊的关系密切; ECM 是构成纤维化性混浊的重要成分。免疫电镜检查显示混浊的晶状体后囊膜的纤维有 I, III 和 IV 型胶原; 此外 ECM 还可调节细胞生长分化及细胞运动。榄香烯 (elemene, Ele) 是天然药物莪术的主要成分, 具有抗血栓形成、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡^[1,2], 我们的研究发现 Ele 能抑制由重组人碱性成纤维细胞生长因子 (recombinant human basic fibroblast growth factor, rhbFGF) 诱导的人晶状体上皮细胞系 (human lens epithelial

cells B3, HLE-B3) 增殖(另文报道), 我们进一步采用双抗体夹心 ABC-酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 Ele 作用后 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白(collagen I) 和 III 型胶原蛋白(collagen III) 表达, 探讨 Ele 是否在抑制 HLE-B3 增殖的同时还能抑制 HLE-B3 内 I 和 III 型胶原蛋白的合成, 从而对阻止晶状体上皮细胞纤维化起重要的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 由广州中山大学眼科研究中心提供; Ele 乳液, 纯度 99.0%, 大连金港制药有限公司; rhbFGF 为英国 PeproTech 公司; DMEM 培养基、胰蛋白酶和 EDTA 分别是美国 Gibco 公司、美国 Amresco 公司和美国 Augus 公司; I 型胶原蛋白(collagen I) 和 III 型胶原蛋白(collagen III) 的 ELISA 试剂盒由上海西唐生物科技有限公司提供。自动酶标读数仪: 美国 BioTek ELX808; 倒置研究显微镜: 日本 IMT-413; 二氧化碳培养箱: 美国 FORMA 2111。取出保存冻存细胞的冻存管立即放入 37℃ 水中, 将溶解的细胞悬液用 10 倍体积以上的培养液进行稀释, 离心, 除上清, 反复洗涤 3 次。以 5×10^8 个/L 接种于培养瓶中, 37℃, 50mL/L CO₂ 培养箱培养。待细胞生长融合后进行传代培养。

1.2 方法 80mg/L Ele 作用 24h 后收集细胞上清液; 取出已经包被了抗人 I, III 型胶原蛋白单克隆抗体的 96 微孔板。设标准孔 8 孔, 每孔各加入标准稀释液 100μL, 第 1 孔加标准品 100μL, 均匀后用加样器吸出 100μL, 移至第 2 孔。如此反复作对倍稀释至第 7 孔, 最后从第 7 孔中吸出 100μL 弃去, 使之体积均为 100μL, 第 8 孔为空白组。待测品孔每孔各加入细胞上清液 100μL, 每组 6 个孔; 将反应板充分混匀后置 37℃, 120min; 用洗涤液将反应板充分洗涤 5 次, 在滤纸上印干; 每孔加第一抗体工作液 50μL, 置 37℃, 60min; 同前洗板后每孔加酶标抗体工作液 100μL, 置 37℃, 60min; 同前洗板后每孔加底物工作液 100μL, 置 37℃ 暗处反应 10min; 每孔加 50μL 终止液混匀。在 492nm 处测吸光度值; 根据标准品 A 值画出标准曲线, 根据样品 A 值在该曲线图上查出相应的 I 型、III 型胶原蛋白含量。

统计学分析: 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件进行数据处理。

2 结果

rhbFGF 组 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白含量较空白组明显增加, 与空白组之间差异具有统计学意义($P < 0.01$, 表 1); Ele 组 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白含量较 rhbFGF 组明显下降, 与 rhbFGF 组之间差异具有统计学意义($P < 0.01$)。说明 Ele 能降低 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白含量。rhbFGF 组 HLE-B3 内 III 型胶原蛋白含量较空白组明显增加, 与空白组之间差异具有统计学意义($P < 0.01$); Ele 组 HLE-B3 内 III 型胶原蛋白含量分别较 rhbFGF 组明显下降, 与 rhbFGF 组之间差异具有统计学意义($P < 0.01$)。说明 Ele 能降低 HLE-B3 内 III 型胶原蛋白含量。

3 讨论

胶原蛋白或称胶原, 是动物细胞合成的一种生物性高分子, 是 ECM 中最主要的一类物质。经过数十年来的研究和发展, 业已发现并确认了胶原蛋白有 25 种类型, 其中 I, III 型胶原蛋白约占胶原蛋白总量的 80% ~ 90%。胶原蛋白纤维化是许多疾病的病理表现之一, 胶原蛋白分子的异常合成和沉积是纤维化反应的基础。如弥漫性肺纤维化早期表现为肺泡炎, 后期为弥漫性肺间质纤维化, 主要是肺间质中成纤维细胞数及其产生的胶原蛋白和其他结缔组织成分增多, 肺泡壁遭破坏, 特发性肺间质纤维化

表 1 Ele 对 HLE-B3 内 I, III 型胶原蛋白含量的影响

分组	I 型胶原蛋白	III 型胶原蛋白
空白组	38.5 ± 2.3	0.83 ± 0.12
rhbFGF 组	53.5 ± 5.4 ^b	1.27 ± 0.29 ^b
Ele 组	29.5 ± 2.9	0.69 ± 0.11

^b $P < 0.01$ vs 空白组、Ele 组

时, 肺组织中 I 型胶原、III 型胶原增高, 肺脏变硬, 顺应性减退^[3]。有研究表明, 高血压左心室肥厚时不仅存在心肌肥大的变化, 心肌间质纤维化亦是重要的病理改变, I, III 型胶原蛋白的表达增强, 促进了间质的纤维化^[4]。ECM 是构成纤维化性混浊的重要成分。免疫电镜检查显示混浊的晶状体后囊膜的纤维有 I 型、III 型和 IV 型胶原, ECM 可调节细胞生长分化及细胞运动。纤维粘连蛋白等 ECM 可促进某些黏附分子磷酸化, 从而促进细胞移行。白内障摘除术后, 残留的晶状体上皮细胞通过细胞膜上的黏附分子与细胞外基质及细胞内骨架蛋白相连, 促使细胞移行并发生晶状体后囊膜皱缩。Ishida 等^[5]研究发现: 米诺地尔能抑制体外培养的晶状体上皮细胞的增殖、移行及胶原分泌。张凤妍等^[6]探讨表皮生长因子、白细胞介素 1、干扰素和生长抑素 8 肽在晶状体后囊膜混浊形成中的作用及影响胶原合成的机制, 发现表皮生长因子、白细胞介素 1 参与晶状体后囊膜混浊形成时的胶原合成, 干扰素和生长抑素 8 肽的作用提示其可用于防治晶状体后囊膜混浊。在本研究中, 10μg/L rhbFGF 作用后, HLE-B3 内 I 型胶原蛋白浓度为 53.5 ± 5.4μg/L, 较正常组(38.5 ± 2.3μg/L) 明显升高, 说明 rhbFGF 能促进 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白的合成。经 Ele 作用后, HLE-B3 内 I 型胶原蛋白的浓度为 29.5 ± 2.9μg/L, 较 rhbFGF 组明显下降。结果提示, Ele 能抑制 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白的合成。我们还发现, 10μg/L rhbFGF 作用后, HLE-B3 内 III 型胶原蛋白浓度为 1.27 ± 0.29μg/L, 较正常组(0.83 ± 0.12μg/L) 明显升高, 说明 rhbFGF 能促进 HLE-B3 内 III 型胶原蛋白的合成。经 Ele 作用后, HLE-B3 内 III 型胶原蛋白的浓度为 0.69 ± 0.11μg/L, 较 rhbFGF 组明显下降。本结果提示, Ele 能抑制 HLE-B3 内 III 型胶原蛋白的合成。本结果提示, rhbFGF 在促进 HLE-B3 增殖的同时, 也能促进 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白、III 型胶原蛋白的合成; Ele 能有效抑制 HLE-B3 内 I 型胶原蛋白、III 型胶原蛋白的合成。进一步说明作为 ECM 重要成分的 I 型胶原蛋白和 III 型胶原蛋白, 是构成纤维化性混浊的重要原因, 也是导致晶状体后囊膜纤维化并发生混浊的重要机制。Ele 有望成为防治后发性白内障的有效药物。

参考文献

- 1 刘跃明, 孙立群, 王义. 榄香烯诱导 Hep-2 细胞凋亡及其对细胞周期各时相的影响. 中国老年学杂志 2008; 28(5): 868-869
- 2 赵瑾瑶, 杨佩满, 邵淑娟. 榄香烯对多耐药人红白血病细胞株的影响. 大连医科大学学报 2006; 28(3): 184-186
- 3 Hu YB, Zeng QF, Feng DY, et al. AP-1 regulates TGF-beta1-induced secretion of Type I collagen in human lung fibroblasts. Zhongnan Daxue Yixueban 2007; 32(5): 776-781
- 4 宋国杰. 分子心脏病学. 天津: 天津科学技术出版社 2001; 117, 127-129, 131-147
- 5 Ishida I, Saika S, Ohnishi Y. Effect of minoxidil on rabbit lens epithelial cell behavior *in vitro* and *in situ*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2001; 239(10): 770-777
- 6 张凤妍, 王国军. 四种细胞因子对牛晶状体上皮细胞胶原合成的影响及对前胶原 mRNA 表达的调控. 中华眼科杂志 2004; 40(8): 545-548