

鳖甲提取物对 IgG4 相关眼眶病成纤维细胞实验研究

何伟豪¹ 闫希冬² 田艳明³ (通讯作者)

(1.新疆石河子市石河子大学 830002; 2.新疆 474 医院眼五科 830013;
3.新疆乌鲁木齐市新疆军区总医院眼科 830099)

【摘要】目的: 利用分子量小于6000kDa的鳖甲提取物(P6)对IgG4-ROD泪腺成纤维细胞进行干预, 观察P6对成纤维细胞的增殖的影响。方法: 采取熊莎^[1]等的方法, 提取P6。将第四代细胞分成4组: 空白对照组、不同浓度P6干预组(质量浓度分别为25mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L)、10ug/L TGF- β +P6组(P6质量浓度同前)、10ug/L TGF- β 组。每组设4个复孔, 铺于96孔板上, 培养48h, 加入CCK-8试剂检测细胞增殖率。结果: 与空白组比较, 所有浓度P6均可抑制成纤维细胞增殖, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 加入TGF- β 后, 仅25mg/L P6对细胞增殖仍有显著抑制($P<0.05$)。结论: P6可抑制IgG4-ROD泪腺成纤维细胞增殖, 以25mg/L的P6抑制效果最佳, 且可逆转TGF- β 对成纤维细胞的促增殖作用。

【关键词】鳖甲; IgG4相关眼眶病; 成纤维细胞; 增殖

Experimental study of IgG 4-related orbital disease fibroblasts

He Weihao 1 Yan Xidong 2 Tian Yanming 3 (corresponding author)

(1. Xinjiang Shihezi University 830002; 2. Fifth Department of Ophthalmology, Xinjiang 474 Hospital 830013;
3. Ophthalmology of Xinjiang Military Region General Hospital 830099)

[Abstract] Objective: To observe the effect of IgG 4-ROD fibroblasts less than 6000 kD A with P6 on the proliferation of fibroblasts. Methods: P6 was extracted by using the method of Xiong Sha [1] et al. The fourth generation cells were divided into 4 groups: blank control group, intervention group with different concentrations of P6 (mass concentration: 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L), 10 ug / LT GF- β + P6 group (P6 mass concentration same as before), and 10 ug / LT GF- β group. Four complex wells were prepared for each group, spread on 96-well plates and cultured for 48h, and CCK-8 cell proliferation rate was measured by adding the reagent. Results: Compared with the blank group, all concentrations of P6 were statistically significant ($P<0.05$). After the addition of TGF- β , only 25 mg/L P6 still significantly inhibited cell proliferation ($P<0.05$). Conclusion: P6 inhibited the proliferation of IgG 4-ROD lacrimal gland fibroblasts with 25 mg/L of P6, and reversed the pro-proliferative effect of TGF- β on fibroblasts.

[Key words] Trapa; IgG 4 related orbital disease; fibroblasts; proliferation

1 引言

IgG4 相关性眼病 (IgG4-related ocular disease, IgG4-ROD) 是一种由 IgG4 介导的发生于眼眶及其附属器官的疾病, 本质上是 IgG4 相关性疾病 (IgG4-related disease, IgG4-RD)。该病可累及除眼球外的任何眼部附属器, 当泪腺受累时, 可出现双侧泪腺无痛性肿大, 随着患者泪腺肿大不断增大, 其内部纤维化的程度也不断加重, 进而导致泪腺功能逐渐丧失, 对患者的生活质量及健康带来了极大的困扰。目前治疗 IgG4-ROD 的方法并不全面, 还需进行探索, 找到一种副作用低且经济有效的治疗方法, 最大程度的保留患者泪腺的功能。

目前研究表明, IgG4-RD 纤维化的形成可能与 TGF- β 1 及相关炎症分子有关。而鳖甲及其复方制剂对于 TGF- β 1、Th2 等相关致纤维化的炎症分子均具有抑制性, 推测鳖甲及其复方制剂可能具有抗泪腺纤维化的作用。本课题通过取材人 IgG4-ROD 泪腺细胞进行原代成纤维细胞培养, 通过 CCK-8 技术观察成纤维细胞增殖的情况, 从而验证鳖甲提取物抗泪腺纤维化的作用。

2 材料与方法

2.1 实验材料

选取 2021 年 10 月至 2022 年 8 月之间于我院就诊并行泪腺摘除术的患者 6 例, 纳入标准: (1) 经过免疫组化证实为 IgG4 相关性眼病的患者; (2) 患者病程持续 1 年及以上且未经治疗; (3) 取得患者知情同意。排除标准: (1) 患者泪腺无纤维化形成; (2) 病程小于 1 年或经过治疗的患者; (3) 未取得患者知情同意。

2.2 主要药品、试剂与仪器

CCK-8 试剂盒 (北京博奥森), PBS, FBS, DMEM (美国, GIBCO), 0.25% 胰酶, 链霉素 (美国, HyClone), TGF- β 1 (美国, PeproTech), BSA (德国, Biofroxx), 醋鳖甲中药饮片 (北京四方中药饮片公司), 酶标仪 (美国 BIO-RAD, xMark)。

2.3 成纤维细胞的分离及培养

选取确诊为 IgG4-ROD 患者的泪腺 6 例, 在超净台上用刀片将组织分割成碎块, 加入 0.2% II 型胶原酶溶液 15ml,

消化 3h。加入等体积的 10%FBS 完全培养基终止消化。离心机设置 1000rpm, 5min, 离心后离心管底可见细胞沉淀, 去除上清液。吸取 3ml 经完全培养基重悬后的细胞悬液, 分别加入 3 个 T25 细胞培养瓶中。用 6ml 含 2%链霉素完全培养基将每个培养瓶中的悬液混匀, 将培养瓶放入培养箱中, 2d 后观察细胞生长状态, 待细胞贴壁并长满瓶底后用 0.25%胰酶消化并传代。

2.4 成纤维细胞的鉴定

取第三代细胞, 接种于 6 个激光共聚焦小皿中, 当培养皿底部铺满贴壁细胞后, 去除培养基。用 4%多聚甲醛固定细胞后用 0.5%TritonX-100 增加细胞膜对抗体的通透性, 并加入 5%PBS-BSA 封闭液封闭 1h。加入兔抗人 Vimentin 抗体、兔抗人 Pan Cytokeratin 抗体, 孵育过夜。将稀释的 Alexa Fluor 488 标记驴抗兔 IgG 二抗, 加入到培养皿中, 室温避光孵育 1h。加 DAPI 对细胞核进行复染, 室温下避光孵育 10min, 设置荧光显微镜发射波长为 488nm, 观察蛋白表达情况, 成纤维细胞鉴定的标志蛋白是波形蛋白^[2], 经免疫荧光染色检测显示, 成纤维细胞中的波形蛋白染色呈阳性, 并集中于胞浆内, 而胞核未被染色, 本实验中的细胞可被鉴定为成纤维细胞 (图 1)。

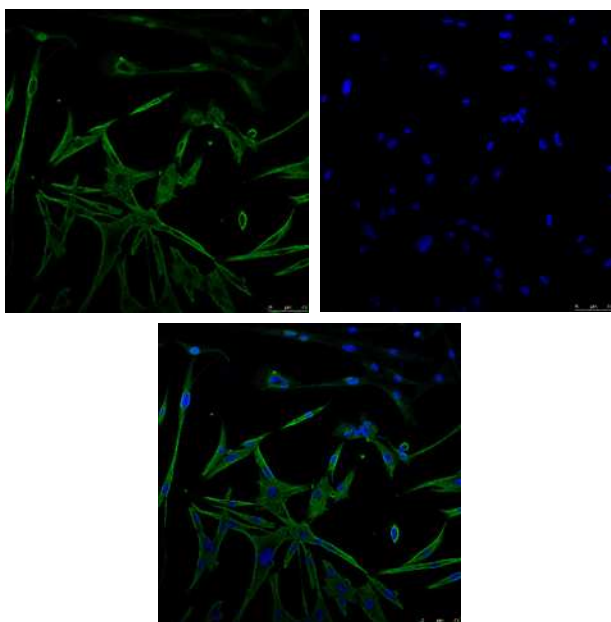


图 1 细胞免疫荧光鉴定结果 (×200)

2.5 鳖甲提取物 (P6) 的提取

购置鳖甲 400g, 于我院药剂科鉴定后明确为中药材鳖甲, 本实验提取方法取自熊莎^[1], 获得鳖甲冻干粉 1.818g。

2.6 CCK-8 法测定细胞增殖

将第 4 代细胞接种至 96 孔板, 培养 24h; 通过预实验确定 TGF-β 的最适浓度为 10ug/L; 并将 P6 浓度设置为 25, 50, 100, 200mg/L。将培养的细胞在显微镜下观察, 所有细胞均贴壁后, 将细胞分为 10 组, 每组 4 个孔, 分别为空白组 (不加 P6 及 TGF-β)、TGF-β 单加组、不同浓度 P6 单

加组 (P6 浓度为 25, 50, 100, 200mg/L)、P6+TGF-β 组 (P6 质量浓度同前), 再次培养 48h, 并在测定吸光度值前 4h 向每个孔中加入 CCK-8 试剂 20ul, 设置酶标仪吸光度 OD 值为 450, 检测细胞吸光度, 观察细胞增殖情况。

表 3-1 TGF-β 对成纤维细胞增殖的影响 (预实验)

组别	浓度 (ug/L)	增殖率 (%)	P 值
空白	-	100.00 ± 2.03	-
TGF-β	5	114.35 ± 7.78	0.005 ^a
	10	114.42 ± 5.05	0.005 ^a
			0.986 ^a

注: ^a与空白组作比较 ^a不同浓度 TGF-β 组间比较

2.7 统计学分析

本实验采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析, 以均数 ± 标准差来表示, 以组别为因素进行析因设计方差分析, 组间分析采用单因素方差分析, 并以 LSD 法进行多样本间的显著性检验, 检验水准 α=0.05, P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 CCK-8 法测定细胞增殖

经过 48h 培养后, 与空白组相比, 四组被不同质量浓度 P6 干预的成纤维细胞增殖率均有显著差异 (P<0.05), 随着药物浓度的降低, 细胞增殖活性逐渐下降, 其中以 25mg/L 的 P6 抑制细胞增殖的效果最强。加入 TGF-β 后, 同样与空白组相比, 虽然增殖率低于对照组, 但只有 25mg/L P6 组对成纤维细胞增殖的抑制有统计学意义 (P<0.05)。TGF-β +P6 组与 P6 单加组相比, 四组细胞的增殖活性略有上升, 但均不具显著差异。

表 3-2 P6 对成纤维细胞增殖的影响

组别	浓度 (mg/L)	增殖率 (%)	F 值	P 值
空白	0	100.00 ± 8.87	-	-
P6	200	74.05 ± 14.45	12.365 ^a	0.004 ^a
	100	66.54 ± 19.03	5.489 ^a	0.037 ^a
	50	64.88 ± 16.32	15.050 ^a	0.002 ^a
	25	59.63 ± 11.57	105.590 ^a	0.000 ^a
TGF-β +P6			4.840 ^a	0.010 ^a
	200	71.05 ± 28.00	0.190 ^b	0.671 ^b
	100	78.03 ± 45.82	0.079 ^b	0.784 ^b
	50	67.45 ± 31.15	0.009 ^b	0.926 ^b
TGF-β	10ug/L	42.31 ± 11.06	4.720 ^b	0.051 ^b
			2.454 ^a	0.091 ^a
TGF-β	10ug/L	104.34 ± 7.90	0.533 ^a	0.493 ^a

注: ^a与空白组相比较, ^a与 TGF-β 组相比较, ^b与 P6 单加组相比较

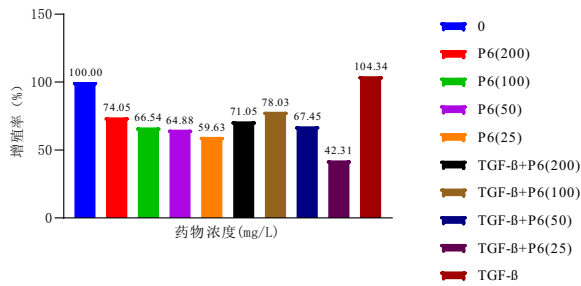


图 3-2 不同浓度 P6 对成纤维细胞增殖的影响

4 讨论

IgG4-ROD 目前被认为是 IgG4 相关性疾病在眼部的表现,其最困扰患者的症状是不断发展的受累组织或器官的纤维化,并随着纤维化的不断发展,组织器官的功能逐渐下降,直至器官完全被纤维化,最终只能切除病变器官,而造成组织器官纤维化的最直接因素是患者病灶中产生的 TGF- β ,进一步产生成纤维细胞。对于抗纤维化的研究,鳖甲及其提取物在不同脏器中已初见成效,在抗肝纤维化的报道中^[3],鳖甲 I-C-F-6 寡肽可使肝细胞停止在 G1/G0 期,使得 G2/M 期细胞比例降低,通过影响细胞周期来抑制肝细胞增殖,减少细胞外基质的蓄积,抑制纤维化的发生。还可通过降低 Wnt/ β -catenin 信号通路下游的 TGF- β 1、 α -SMA、CTGF、VEGF 来抑制肝细胞增殖,从而减轻肝纤维化。而除抗肝纤维化外,鳖甲及其提取物对多种脏器的纤维化均有抑制作用,对于 TGF- β 1、Th2 等相关致纤维化的炎性分子均具有抑制性,推测其对 IgG4-ROD 的泪腺纤维化有抑制作用,故本课题通过分子量小于 6000kDa 的鳖甲提取物 P6 对成纤维细胞进行干预,来观察对泪腺成纤维细胞的影响。

参考文献:

- [1]熊莎.鳖甲抗肝纤维化活性肽的分离鉴定及其作用机制研究[D].湖北中医药大学.
- [2]杨洪霞,孙佳欢,姚廷亭,等.尖叶假龙胆有效成分维菊叶龙胆酮抑制 TGF- β 1 诱导心肌成纤维细胞表型转化的研究[J].河北中医药学报, 2022, 37 (05): 1-6+12.
- [3]孙海涛.NF- κ B P65 通过 Wnt 信号通路调控 HSCs 活化的分子机制及鳖甲寡肽 I-C-F-6 的干预作用[D].南方医科大学, 2018.
- [4]刘莹,何颖,邹爱英.中药量效关系研究进展[C]//中华中医药学会,世界中医药学会联合会中药专业委员会,北京药师协会.中华中医药学会 2014 年医院药学会学术年会世界中联中药专业委员会 2014 年国际学术会议暨北京药师协会慢病防治药学会专业委员会成立大会论文汇编. 2014: 401-402
- [5]王爱青,何媛.黄芪多糖对急性高血压大鼠眼压、视网膜、内外颗粒层、视神经纤维及 caspase-3、视网膜神经节细胞凋亡影响随机平行对照研究[J].实用中医内科杂志, 2018, 32 (01): 61-64.
- [6]范丽丽,邓家刚,郝二伟.中药剂量与功效相关性研究进展[J].中国中医药信息杂志, 2010, 17 (10): 104-106.

本课题中鳖甲提取物的处理采取熊莎^[1]等的方法,对鳖甲进行物理提取,并将 P6 根据不同浓度分为四组,对成纤维细胞进行干预,发现不同浓度 P6 干预对成纤维细胞增殖的抑制效果不同,P6 的浓度与细胞抑制呈负相关,且差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),以 25mg/L 时抑制效果较好,细胞增殖率明显受到抑制。一般认为,药物的疗效与浓度呈正相关,但中药有着不同的量效关系,部分中药具有双向调节作用^[4],研究表明 3ml/kg 黄芪治疗大鼠蛋白尿的效果优于 0.75ml/kg 和 6ml/kg 的黄芪。通过黄芪活性组分黄芪多糖^[5]治疗高血压大鼠的研究发现,高剂量黄芪多糖对大鼠的视网膜及视神经的改善并不明显,甚至出现部分恶化,而低剂量黄芪多糖可改善视网膜水肿,抑制视网膜神经节细胞凋亡。中等剂量的鹿茸能显著地增强离体心脏的收缩,产生正向肌力的作用,而大剂量使用鹿茸,则出现抑制作用;小剂量的金银花可兴奋网状内皮系统,而大剂量则产生抑制^[6]。本课题中 P6 可能具有双向调节作用,推测 25mg/L 可能为 P6 抑制 IgG4-ROD 成纤维细胞增殖的最适浓度,高于或低于 25mg/L,对细胞增殖的抑制效果均会降低,但具体原因还需进一步研究。在加入 TGF- β 后,在 P6 与 TGF- β 共同干预下,200mg/L、100mg/L 及 50mg/L 的 P6 对成纤维细胞增殖率虽有下降趋势,但差异并不显著,仅 25mg/L 的 P6 仍对细胞增殖有抑制作用。这说明 P6 可抑制成纤维细胞的增殖,TGF- β 则具有一定的促进成纤维细胞增殖的作用,且在一定浓度范围内其促增殖作用与 P6 的抑制作用相当。

综上所述,本研究结果证明了,不同浓度的鳖甲提取物 P6 均可抑制成纤维细胞的增殖,推测 25mg/L 是其最适浓度,在最适浓度下,可抑制成纤维细胞增殖,且可逆转 TGF- β 对成纤维细胞促增殖的作用,可为临床治疗 IgG4-ROD 泪腺纤维化提供一个新的方向。