

实验研究

抗纤软肝颗粒对肝星状细胞增殖与凋亡的影响

杨玲¹ 朱清静² 张赤志² 明安萍²

摘要 目的:研究抗纤软肝颗粒(KXR)对肝星状细胞增殖、凋亡及凋亡相关蛋白的影响。方法:传代培养的大鼠肝星状细胞系 HSC-T₆ 与中药复方抗纤软肝颗粒(终浓度为 5mg/ml、2.5mg/ml、1.25mg/ml)及药物血清(5%、10%、20%)共同培养 48 小时后,应用 MTT 法测定细胞增殖,TUNEL 法及流式细胞仪测定细胞凋亡、免疫组化检测凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax。结果:抗纤软肝颗粒无论是药物还是含药血清,均能显著抑制 HSC-T₆ 增殖,并使细胞周期阻滞于 S 期,在安全浓度范围内,5mg/ml 组和 10% 药物血清组作用最强($P < 0.01$);并可诱导 HSC 凋亡,且凋亡抑制分子 Bcl-2 表达下调,促凋亡分子 Bax 表达增强($P < 0.01$)。结论:抗纤软肝颗粒抗肝纤维化的作用机制可能在于抑制肝星状细胞增殖,并通过下调 Bcl-2/Bax 比率,促进 HSC 凋亡。

主题词 细胞分裂/药物作用 显形细胞/药物作用 @ 抗纤软肝颗粒

由于肝纤维化是肝脏细胞外基质(ECM)异常生成和积累的结果,肝细胞、Kupffer 细胞、内皮细胞等均参与肝纤维化形成,但以肝星状细胞(HSC)作用最主要,后者在诸多因素(如细胞因子、生长因子、肝细胞、Kupffer 细胞、内皮细胞等)的调控下,HSC 持续激活导致胶原生成细胞增多,并最终引起 ECM 的大量沉积,同时在肝纤维化的逆转过程中,HSC 的减少主要通过凋亡机制^[1]。因此,HSC 的激活增殖是各种原因引起肝纤维化形成的中心环节,阻抑激活的肝星状细胞增殖和诱导其凋亡是治疗慢性肝损伤和肝纤维化的重要策略^[2]。抗纤软肝颗粒(KXR)是我们临床长期应用于肝纤维化治疗的经验方,前期研究显示该方能降低实验肝纤维化大鼠血清透明质酸(HA)、层粘蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)及组织羟脯氨酸(HyP)含量,血清药理学实验显示该方能抑制 HSC 的增殖及胶原合成和分泌,抑制 HSC TGFβ₁ mRNA 的表达^[3]。为进一步证实该方的抗纤维化作用和

机制,本实验应用激活的肝星状细胞模型观察了 KXR 对 HSC 增殖及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物:抗纤软肝颗粒由鳖甲、海藻、生牡蛎、丹参、莪术、山楂等组成,经水提醇沉法制成颗粒剂(由湖北中医学院附属医院药剂科制备),每克含原生药 2g。质控标准:每 10g 颗粒剂中有效成分原儿茶醛含量不得少于 0.090mg^[4]。批号 010316。用 DMEM 液溶解,约 0.45μm 滤膜过滤除菌后,置 4℃ 冰箱备用。

1.1.2 动物:雄性 Wistar 大鼠 10 只,清洁级,购自湖北省医学科学院实验动物中心。证书号为 20010322。

1.1.3 肝星状细胞系(HSC-T₆):HSC-T₆ 由上海中医药大学徐列明教授惠赠,为 SV40 转染的 Sprague-Dawley 大鼠星状细胞,其表现型为活化的 HSC,表达高水平的 I 型胶原、TIMP-1mRNA 等^[5]。

1.1.4 主要试剂:MTT,碘化丙啶购自 Sigma 公司;原位末端标记试剂盒、Bcl-2 单抗、Bax 单抗,购自武汉博士德生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 KXR 药物血清的制备:KXR 配制成 4.06g 生药/ml 药液,按成人 10 倍剂量(即 1ml/100g 体重)给大鼠连续 3 天灌胃,每天给药 2 次,第 3 天给药后 1 小时,无菌条件下颈动脉取血,分离血清,56℃ 灭活 30min,分装冻存^[6]。设生理盐水对照组给予生理盐水灌胃,方法同前,每组 5 只大鼠。

1.2.2 HSC 的培养及传代:HSC-T₆ 培养于 37℃、5% CO₂ 的含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素、100mg/ml 链霉素、1% L-谷氨酰胺的 DMEM(低糖与高糖比例为 1:1)培养液中,在倒置显微镜下观察细胞长到亚单层或细胞密度约 80%~90% 时是 HSC-T₆ 传代的标志,0.25% 胰蛋白酶 37℃ 消化,完全培养基调整细胞浓度,以 1×10⁵/ml 传代。

1.2.3 实验分组及药物处理:待细胞长满培养板底后,换用 5% FCS 的 DMEM 培养基,培养 24h 后加入不同浓度的 KXR(以含 5% FCS 的 DMEM 培养基倍比稀释成 40mg/ml、20mg/ml、10mg/ml、5mg/ml、

基金项目:湖北省自然科学基金课题(2000J042),湖北省教育厅科研基金课题(2000A06010)

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院,武汉市汉口解放大道 1277 号(430022)

2 湖北中医学院附属医院

收稿日期:2002-09-16;修回日期:2002-11-03

2.5mg/ml、1.25mg/ml、0.625mg/ml、0.3125mg/ml、0.45 μ m 滤膜过滤),或不同浓度的 KXR 药物血清(实验设 5%、10%、20%3 个浓度)作用 48 小时,4 孔重复,另设空白对照组(予含 5%FCS 的 DMEM 培养基)及生理盐水对照血清组(设 5%、10%、20%3 个浓度)。

1.2.4 MTT 法测定细胞抑制率:将浓度为 1×10^5 /L 细胞接种于 96 孔培养板中,待细胞贴壁后加入不同浓度的药物,设复孔和对照孔。置 37℃、5%CO₂ 条件下培养 48 小时后,每孔加入 20 μ l MTT,继续培养 4 小时,去培养基,洗板 1 次,加入二甲基亚砜(DMSO)100 μ l,振荡混匀,于酶标仪波长 570nm 处测定各孔吸光度值(A 值)。

细胞存活率=(药物组 OD 值/对照组 OD 值)×100%

细胞抑制率=(1-药物组 OD 值/对照组 OD)×100%

最后选择 90%以上的星状细胞存活的浓度作为以下实验所用药物浓度。

1.2.5 细胞计数法测定细胞增殖:取生长状态良好的细胞,按 1.0×10^5 个/ml 的密度接种于 24 孔培养板中,每组设 3 个复孔,每天换相应培养基 1 次,于实验次日起,每天消化各组细胞,血细胞计数板计数,连续观察 3 天,结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

1.2.6 TUNEL 法:以胞核呈棕褐色染色为阳性细胞,选择细胞分布均匀、染色背景清晰的区域,在高倍镜下计数 100 个细胞,计算阳性细胞所占百分比,即为凋亡指数。

1.2.7 流式细胞术分析:经处理因素作用 48 小时后,收集各组细胞,每组 1×10^6 细胞用 80%冷乙醇固定,经 40 μ l 柠檬酸缓冲液冰上孵育 30min, PBS 洗涤细胞,加入碘化丙啶染液(30 μ g/ml 碘化丙啶,0.1% Tritonx-100,37mg/ml EDTA,0.1% RNaseA),室温下进行 DNA 染色 20min,样品 4℃避光保存,经上述处理后的

细胞,荧光标记成功后,应用 FAC Sort 流式细胞仪(美国 Becton Dickson 公司)进行检测,Cellquest 软件进行分析^[7]。

1.2.8 Bcl-2、Bax 免疫组化检测:按链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)免疫组织化学染色试剂盒说明书操作。结果判定标准:阳性信号为棕黄色或棕褐色,位于胞浆内、胞膜和核膜上,运用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统细胞测定程序对各组肝星状细胞 Bcl-2 及 Bax 阳性细胞进行显微图像分析,每组随机检测 4 个视野细胞的光密度,计算其平均光密度。

1.2.9 统计学处理:用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 不同浓度的 KXR 对 HSC-T₆ 增殖的抑制作用:表 1 示,不同浓度的 KXR 与 HSC-T₆ 共培养 48h 后,其 MTT OD 值均低于空白对照组,经统计学处理,40、20、10、5、2.5mg/ml 组均能显著抑制 HSC-T₆ 增殖,剂量越大,抑制作用越明显($P < 0.01$, $P < 0.05$),而随着剂量的减小,抑制作用显著减弱,在 1.25mg/ml 以下,抑制作用不明显($P > 0.05$),表明该方能抑制 HSC 增殖,且随着 KXR 作用浓度的增加,抑制率增高,显示抗纤软肝颗粒对 HSC 增殖的抑制作用存在一定的剂量依赖性。

2.2 不同浓度的 KXR 对 HSC-T₆ 细胞周期及凋亡的影响:表 2 示,将 5mg/ml、2.5mg/ml、1.25mg/ml 浓度的 KXR 加入培养细胞中,作用 24h、48h、72h 后,每个浓度取 3 孔细胞,经胰蛋白酶消化后,台盼蓝拒染法计数活细胞数,实验结果表明,上述浓度的 KXR 均能抑制 HSC 的增殖,随作用时间的延长,抑制作用有加强的趋势。应用流式细胞仪测得各组细胞在不同细胞周期的 DNA 含量,表 2 结果显示, KXR 能阻止细胞由 G₀~G₁ 期进入 S 期,但对于 G₂~M 期无影响,表明

表 1 不同浓度 KXR 对 HSC 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/ml)	标本数	MTT(OD 值)	抑制率(%)	存活率(%)
空白对照组	—	4	0.664±0.007	—	100.00
KXR 组	40	4	0.463±0.005**	30.27	69.73
	20	4	0.524±0.009**	21.08	78.92
	10	4	0.559±0.007**	15.81	84.19
	5	4	0.602±0.005*	9.34	90.66
	2.5	4	0.623±0.003**	6.17	93.32
	1.25	4	0.637±0.005	4.07	95.93
	0.625	4	0.646±0.005	2.71	97.29
	0.3125	4	0.655±0.006	1.36	98.64

与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 2 不同浓度的 KXR 对 HSC-T₆ 细胞周期及凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	标本数	细胞数($\times 10^5$)			各周期 DNA 含量(%)			凋亡率(%)
		24 小时	48 小时	72 小时	G ₀ ~G ₁	S	G ₂ ~M	
空白对照组	3	12.59 $\pm$ 1.09	30.51 $\pm$ 1.21	41.77 $\pm$ 1.95	41.23 $\pm$ 2.47	48.73 $\pm$ 3.85	10.04 $\pm$ 4.38	4.02 $\pm$ 0.59
1.25mg/ml KXR	3	9.57 $\pm$ 0.64*	25.21 $\pm$ 1.62**	36.36 $\pm$ 1.13**	61.73 $\pm$ 0.76**	30.47 $\pm$ 3.76**	9.46 $\pm$ 7.23	27.80 $\pm$ 1.80**
2.5mg/ml KXR	3	8.46 $\pm$ 0.62**	21.10 $\pm$ 1.00**	32.27 $\pm$ 1.08**	55.66 $\pm$ 1.32**	34.00 $\pm$ 2.12*	10.34 $\pm$ 1.08	13.89 $\pm$ 1.49**
5mg/ml KXR	3	7.05 $\pm$ 0.51**	17.60 $\pm$ 0.72**	28.32 $\pm$ 1.97**	47.75 $\pm$ 0.42*	42.31 $\pm$ 4.28	9.94 $\pm$ 4.55	9.48 $\pm$ 1.32**

与空白对照组相应时相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 不同浓度的 KXR 药物血清对 HSC 增殖及凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	血清浓度(%)	细胞数($\times 10^5$)	MTT OD 值	抑制率(%)	凋亡率(%)
生理盐水组	5	9.62 $\pm$ 2.15(3)	0.258 $\pm$ 0.010(4)	—	2.13 $\pm$ 0.43(3)
对照血清组	10	21.62 $\pm$ 2.39(3)	0.289 $\pm$ 0.014(4)	—	4.48 $\pm$ 1.09(3)
	20	30.33 $\pm$ 1.98(3)	0.374 $\pm$ 0.009(4)	—	4.79 $\pm$ 1.26(3)*
KXR	5	7.34 $\pm$ 2.27(3)	0.232 $\pm$ 0.009(4)*	10.08(4)	5.38 $\pm$ 1.38(3)*
药物血清组	10	12.55 $\pm$ 1.53(3)*	0.254 $\pm$ 0.016(4)*	12.11(4)	14.07 $\pm$ 1.77(3)**
	20	24.52 $\pm$ 1.07(3)*	0.333 $\pm$ 0.009(4)*	10.96(4)	7.35 $\pm$ 0.94(3)*

与生理盐水相应浓度组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 括号内为标本数

表 4 KXR 对 HSC 表达 Bcl-2、Bax 的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	标本数	Bax 光密度值	Bcl-2 光密度值	Bcl-2/Bax
空白对照组	4	0.1216 $\pm$ 0.0070	0.1623 $\pm$ 0.0090	1.33
1.25mg/ml KXR	4	0.1356 $\pm$ 0.0070*	0.1450 $\pm$ 0.0090*	1.06
2.5mg/ml KXR	4	0.1419 $\pm$ 0.0120*	0.1353 $\pm$ 0.0100**	0.953
5mg/ml KXR	4	0.1499 $\pm$ 0.0100**	0.1261 $\pm$ 0.0100**	0.84
10%生理盐水血清	4	0.1507 $\pm$ 0.0076	0.1629 $\pm$ 0.0090	1.08
10%KXR 含药血清	4	0.1684 $\pm$ 0.0085▲	0.1491 $\pm$ 0.0031▲	0.89
与凋亡的相关性	—	$r = 0.785, P = 0.002$	$r = -0.735, P = 0.006$	—

与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 10%生理盐水血清比较, ▲ $P < 0.05$

KXR 对于细胞增殖的抑制主要作用于 G₁/S 关卡,即细胞周期限制点,而对于 M 期的限制点无作用,且 KXR 作用各组,在 DNA 直方图均可见明显的亚二倍体峰(sub-G₁ 峰),各组的凋亡率明显高于对照组($P < 0.05, P < 0.01$),且随着 KXR 的增加,HSC 凋亡率也呈升高趋势,存在剂量依赖关系。上述结果显示,KXR 对 HSC-T₆ 增殖的抑制与其抑制细胞周期及诱导细胞凋亡密切相关。

2.3 不同浓度的 KXR 药物血清对 HSC-T₆ 增殖及凋亡的影响:表 3 示,KXR 药物血清系列浓度与对照血清相比均可抑制 HSC 增殖,但以 10%药物血清抑制作用最强(抑制率为 12.11%),随药物浓度的进一步增加,抑制作用无进一步加强趋势,说明含药血清并非浓度越高效应越好。流式细胞仪测定细胞凋亡率结果显示 5%、10%、20%的 KXR 含药血清均可促进 HSC 凋亡,以 10%组作用最强,凋亡率达 14.07% $\pm$ 1.77% ($P < 0.01$)。

2.4 TUNEL 法对 HSC 凋亡的检测:经 TUNEL 标记后,凋亡细胞的核呈棕色或棕褐色着色,核形态呈碎

点状,不规则,大小不一致,非凋亡细胞的核不着染,核相对较大,形态大小比较一致。空白对照组凋亡细胞少,在不同视野下进行细胞计数,测得其凋亡率为 3.79% $\pm$ 0.51%,而 KXR5mg/ml、2.5mg/ml、1.25mg/ml 组的 HSC 凋亡率明显增多,凋亡率分别为 22.04% $\pm$ 3.25%、14.01% $\pm$ 1.94%、7.12% $\pm$ 1.17%,各组间比较差异有显著性($P < 0.01$)。5%、10%、20%含药血清组的凋亡率分别为 6.41% $\pm$ 1.04%、16.16% $\pm$ 1.42%、8.71% $\pm$ 1.09%,与相应浓度的对照血清(5%、10%、20%生理盐水对照血清组的凋亡率分别为 1.92% $\pm$ 0.51%、4.55% $\pm$ 1.33%、5.68% $\pm$ 1.15%)相比,差异有显著性($P < 0.05$)。

2.5 KXR 对 HSC 表达 Bcl-2、Bax 的影响:表 4 示,KXR 可引起 Bcl-2 表达下降,Bax 表达上升,导致 Bcl-2/Bax 比值显著下降,显示 Bcl-2 表达水平与凋亡呈负相关,Bax 则与凋亡呈正相关,提示 KXR 可能通过调控凋亡相关蛋白的表达诱导 HSC-T₆ 凋亡。

3 讨论

增殖与凋亡是细胞生命活动中不可缺少的两个过

程。肝星状细胞的激活增殖在肝纤维化的发生发展过程中处于中心环节,抑制或阻断这一环节是有助于肝纤维化治疗的关键。而在肝纤维化恢复期,激活状态的HSC减少是凋亡的结果。因此,对于HSC增殖与凋亡的调控是未来抗肝纤维化治疗的方向。

肝纤维化属中医“症积痞块”的范畴,我们认为,肝纤维化的基本病机是血瘀痰结,治疗上主张化痰化瘀,双管齐下,以软坚消痰、活血化痰为基本大法,并结合肝脏体阴用阳,用药忌刚宜柔,纯用活血化瘀之品易损伤藏血之脏的生理病理特点,多选用作用和缓的活血化瘀药和软坚消痰药,并兼有养阴行气功能的药物配伍,经长期临床实践筛选出KXR为抗肝纤维化的基本方。方中鳖甲能抑制炎症反应,促进肝细胞修复和再生,改善肝内微循环,抑制纤维增生,促进胶原溶解和再吸收,并能提高血浆蛋白含量;莪术能抗炎、抗病毒、改善肝脏微循环,调节免疫,并能抑制成纤维细胞增殖^[8];海藻、牡蛎属海洋类药物,富含人体必需的氨基酸、微量元素和维生素等,对实验小鼠免疫功能有正向调节作用,海藻提取物褐藻胶对四氯化碳所致肝纤维化具有防治作用^[9];丹参及其提取物能减轻炎症,有效地促进胶原降解和吸收,被广泛用于抗肝纤维化。诸药合用,经多途径、多环节、多靶点发挥抗肝纤维化作用。

本实验同时采用直接加药法和含药血清法进行实验,以便排除中药杂质等因素的影响,保证实验结果的可靠性。两种方法所得结果一致,说明KXR确实具有抑制肝星状细胞增殖和促进凋亡的作用。细胞周期的调控主要受周期素(cyclin)和周期依赖性激酶(CDK)对其下游作用底物的磷酸化的制约,其中Rb蛋白磷酸化是G₁/S关卡调控的中心;而凋亡则是受基因高度调控的细胞主动死亡过程。实验表明,KXR能明显阻止肝星状细胞由G₀~G₁期进入S期($P<0.01$),而对G₂~M期无影响;能诱导凋亡蛋白Bax的表达,下调凋亡抑制蛋白Bcl-2的表达。提示KXR可能通过阻

止Cyclin与相应CDK结合为激酶复合物对Rb蛋白磷酸化,从而抑制下游增殖信号的生成,使细胞不能通过G₁/S关卡而阻止于G₀~G₁期;同时通过下调Bcl-2/Bax的比率,增加细胞对凋亡的敏感性^[10],促进凋亡因子的释放等途径诱导HSC凋亡,共同达到减少HSC数量,抑制HSC增殖的作用。我们前期动物实验研究发现,KXR能显著改善肝纤维化大鼠肝脏胶原纤维增生^[11,12],结合体外实验,我们推测该方通过抑制HSC增殖,促进HSC凋亡,从而减少胶原纤维在肝脏内的沉积,可能是其抗纤维化的机理之一。

参考文献

- 1 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. *J Clin Invest*, 1998, 102(3): 538-543.
- 2 Iwamoto H, Nakamura M, Tada S, et al. Platelet derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor AG1295 attenuates rat hepatic stellate cell growth. *J Lab Clin Med*, 2000, 135(5): 406-412.
- 3 杨玲, 朱清静, 张赤志. 抗纤软肝冲剂药物血清对激活肝星状细胞表达I型前胶原及TGF- β_1 mRNA的影响. *中国中医基础医学杂志*, 2001, 7(8): 38-40.
- 4 冯汉鸽, 张洪, 谈道彬. 抗纤软肝冲剂的制备及质量研究. *中西医结合肝病杂志*, 2000, 10(4): 31-32.
- 5 Fredman SL, Lalazar A, Wong L, et al. HSC-T₆ cells, an immortalized rat hepatic stellate cell line. *Hepatology*, 1997, 26(4pt2): 338A.
- 6 王宁生, 雷燕, 刘平, 等. 关于血清药理学的若干思考. *中国中西医结合杂志*, 1999, 19(5): 263-266.
- 7 舒丹, 陶得定, 龚建平. 流式细胞术的亚G₁峰法分析细胞凋亡的重新评价. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(1): 59-61.
- 8 张金凤, 王强, 赵永德, 等. 莪术体外抑制成纤维细胞生长的初步研究. *滨州医学院学报*, 1997, 20(2): 113.
- 9 郑刚, 郝军, 贾钢锐, 等. 褐藻胶对大鼠实验性肝纤维化的防治作用. *中国海洋药物*, 1997, (1): 30-32.
- 10 朱国平, 姜阳, 徐冲. Bcl-2蛋白家族与细胞凋亡. *细胞生物学杂志*, 2001, 23(1): 20-23.
- 11 张赤志, 严红梅. 抗纤软肝冲剂治疗肝硬化31例. *中西医结合肝病杂志*, 1999, 9(12): 19-21.
- 12 熊益群, 严红梅, 张赤志. 抗纤软肝冲剂抗大鼠肝纤维化的实验研究. *中国实验方剂学杂志*, 2000, 6(2): 20-21.

《中华中医院博览》大型画册征稿通知

《中医杂志》即将迎来创刊50周年,为了回报中医药界多年来对《中医杂志》的大力支持,中医杂志社与北京华夏书苑联合策划、编辑《中华中医院博览》大型画册,面向全国选择具有一定知名度的中医医院,作彩色专版介绍。宗旨:展示各级中医院的医、教、研成果及医疗水平;为国内外中医药机构之间的信息交流与技术沟通提供平台,架设桥梁;为海内外患者提供有效、快捷的求医信息。画册采用进口铜版纸全彩色印刷,图文并茂,大16开本。每个单位限4页,图片配合文字。主要介绍单位领导、医疗骨干、重点学科、专科门诊、特色医疗等内容,并附医院详细介绍。

联系地址:北京市9345信箱,邮编:100093,电话:(010)64465966,传真:(010)64465986,联系人:王惠玲、张慧、李燕军。广告招商电话:(010)64465989,13601326684,王先生,E-mail:ZYBYL@163.net