

丹芍化纤胶囊对体内外活化肝星状细胞增殖的影响

姚玉梅* 耿晓霞* 吴亚云* 程明亮*

摘要 目的:研究中药复方制剂丹芍化纤胶囊对体内外活化肝星状细胞(HSCs)增殖的影响。方法:(1)体内实验:雄性 Wistar 大鼠 57 只分为正常组、模型组、治疗组。除正常组外,其余各组采用 CCl₄、饮酒、高脂低蛋白饮食等复合病因刺激制备肝纤维化动物模型 8 周,然后治疗组给予丹芍化纤胶囊(1g/kg 体重)灌胃治疗 8 周。实验结束时部分大鼠用于测定肝功能及肝脏纤维化程度;部分用于分离 HSCs,流式细胞仪检测细胞周期百分比。(2)体外实验:制备丹芍化纤胶囊大鼠药物血清;分离培养大鼠 HSCs,并分为小牛血清组、正常大鼠血清组、丹芍化纤药物血清组,分别加入 5%、10%、20% 以上 3 种血清干预培养的 HSCs,MTT 比色法测定原代 HSCs 增殖情况。结果:(1)体内实验:治疗组较模型组肝功能、肝脏纤维化程度及 HSCs 增殖明显减轻。(2)体外实验:丹芍化纤药物血清组较同浓度小牛血清组、正常大鼠血清组明显抑制 HSCs 增殖,且此作用呈剂量依赖性。结论:丹芍化纤胶囊能显著抑制体内外 HSCs 增殖。

主题词 细胞增殖/药物作用 星形细胞/药物作用 @ 丹芍化纤胶囊

Effect of Danshao Huaxian Capsule on Proliferation of Activated Hepatic Stellate Cells in vivo and in vitro

Yao Yumei, Geng Xiaoxia, Wu Yayun, et al.

(Affiliated Hospital of Guizhou Medical College, Guiyang 550004)

Objective: To study on effect of Danshao Huaxian Capsule on proliferation of activated hepatic stellate cells(HSCs) in vivo and in vitro. **Methods:** (1) In vitro experiment: 57 male Wistar rats were divided into a normal group, a model group and a treatment group. The rats of model group and treatment group were made hepatic fibrosis model with complex stimulation of CCl₄, drinking alcohol, high lipids and low protein diet for 8 weeks. The treatment group were treated for 8 weeks with intragastric perfusion of Danshao Huaxian Capsule, 1g/kg. At the end of experiment, a part of the rats were used for detection of hepatic functions and hepatic fibrosis degrees, and another part of the rats were used to separate HSCs. Cell cycle percentage was detected with flow cytometry. (2) In vivo experiment: prepare Danshao Huaxian Capsule serum of the rat; separate cultured HSCs of the rat and divide into calf serum group, normal rat serum group and Danshao Huaxian Capsule serum group. 5%, 10% and 20% of the above serum was respectively added into the cultured HSCs. Primary HSCs proliferation was detected with MTT method. **Results:** (1) In vitro experiment: The hepatic function, hepatic fibrosis level and HSCs proliferation reduced significantly. (2) In vivo experiment: Danshao Huaxian Capsule serum group could significantly inhibit proliferation of HSCs as compared with calf serum group and normal rat serum group at the same content. The action showed dose-dependence. **Conclusion:** Danshao Huaxian Capsule can obviously inhibit proliferation of HSCs in vivo and in vitro.

Key Words Cell proliferation/drug action; Stellate cells/drug action; @ Danshao Huaxian Capsule

肝星状细胞(HSCs)是肝纤维化过程中细胞外基质(ECM)的主要来源细胞^[1],在肝纤维化发生、发展过程中起核心作用。我们以往的研究^[2~4]表明,中药复方制剂丹芍化纤胶囊在抗肝纤维化方面作用显著,但其具体作用机制尚未完全明确。因此,在本研究中,我们结合体内外实验观察了丹芍化纤胶囊对 HSCs 增殖的影响,旨在探寻该药抗肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物:清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重(200±20)g 者 67 只(用于制备动物模型及药物血清),体重(450±20)g 者 5 只(用于体外实验分离 HSCs)。均由

贵阳医学院实验动物中心提供。

1.2 药品和主要试剂:(1)丹芍化纤胶囊:由丹参、赤芍、防己、银杏叶各 431g,黄芪 341g 组成,贵阳制药厂生产,批准文号 981201。以上 5 味中,丹参、银杏叶用乙醇回流提取 2 次,滤过,滤液回收乙醇浓缩为稠膏,相对密度为 1.30~1.35(60℃测),其余 3 味用水煎煮 2 次,滤过,滤液加乙醇,静置沉淀后滤过,滤液浓缩为 1.30~1.35(60℃测),将两稠膏合并加入适量淀粉充分混匀,真空干燥(真空度 0.07~0.08MPa),粉碎成细粉,用 85%乙醇制粒,干燥后装入胶囊即可,每粒含原生药材 2.06g。临用前取胶囊内容物研磨成粉末,用蒸馏水稀释至所需浓度。(2)流式细胞仪检测试剂盒(DNA Kit)由 BD 公司提供。(3)Ⅳ型胶原酶、链酶蛋白酶 E、胰蛋白酶、Nycodenz 均购自美国 Sigma 公司;DNA 酶 I、DMEM 干粉购自美国 Gibco 公司;小牛血

基金项目:贵州省高层次人才基金资助(2003-01)

* 贵阳医学院附属医院感染科,贵州省贵阳市贵医街 28 号 (550004)

收稿日期:2004-12-14;修回日期:2005-03-10

清购自杭州四季青公司;小鼠单克隆 Desmin 抗体、生物素化羊抗小鼠二抗、链酶亲和素-生物素-酶复合物(SABC)试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器:日立 7170A 全自动生化分析仪、FACS Calibur 临床型流式细胞仪(美国 BD 公司)、Nikon ts100/f 显微图像采集系统。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 分组:将 57 只大鼠随机分成正常组、模型组、治疗组,每组各 19 只。

2.1.2 动物模型制备及 HSCs 分离:除正常组外,其余各组根据我们以往方法^[2]用 CCl_4 等复合病因刺激制备大鼠肝纤维化模型,即皮下注射 40% CCl_4 花生油溶液 0.3ml/100g(首次用纯 CCl_4 0.5ml/100g),每周 2 次,共 8 周;同时喂以高脂低蛋白饲料(79.5%玉米粉、20%猪油、0.5%胆固醇),间日以 30%乙醇为饮料。正常组给予正常饮食。8 周后取模型组大鼠 12 只(此时共剩 15 只大鼠,其余 4 只造模过程中死亡),股动脉放血处死,留取血液及全部肝脏。血液 1 500 转/分钟离心 10 分钟后将血清置于一 80℃ 低温冰箱保存;肝脏取相同部位用 10%中性甲醛固定。剩余 3 只大鼠分离 HSCs(方法详见体外实验部分),分离后即由流式细胞仪测细胞凋亡。治疗组大鼠于制备肝纤维化模型 8 周后每天给予丹芍化纤胶囊灌胃 1 次,剂量为 1g/kg 大鼠体重(相当于临床用药量的 16 倍)。此时正常组给予生理盐水。观察 8 周,实验结束时股动脉放血处死部分动物,其余(每组取 3 只)分离 HSCs,标本处理方法同前(此时治疗组共剩 13 只大鼠,其余 6 只造模过程中死亡)。

2.1.3 肝脏纤维化程度测定:动物处死后,立即解剖,取相同部位 1cm×1cm×0.5cm 大小肝叶浸于 10%中性甲醛缓冲液中固定 24 小时以上,常规石蜡包埋切片行 HE 及 Van-Gieson 染色。光镜下观察肝脏病理变化并参照王宝恩等肝纤维化分级法^[3]进行胶原纤维增生程度半定量分析。

2.1.4 血清学指标检测:透明质酸(HA)按试剂盒说明用放射免疫法测定;丙氨酸氨基转移酶(ALT)由日立 7170A 全自动生化分析仪测定。

2.1.5 流式细胞仪(FCM)检测 HSCs 凋亡:将 HSCs 悬液分别用 Triton X-100、RNA 酶处理,然后 65mg/L 碘化丙啶(PI)4℃ 染色 1 小时,避光静置 30 分钟后上机检测细胞凋亡和细胞周期。测量数据输入 HP300 Consort30 计算机,应用 Single histogram statistics 软件

进行资料处理,检测细胞周期百分比。

2.2 体外实验

2.2.1 HSCs 的分离^[6-8]:将 5 只(450±20)g 大鼠麻醉、消毒后暴露肝脏,无菌操作下行门静脉穿刺、固定。从门静脉灌入 D-Hank's 液行原位预灌注至肝脏变为淡黄色。取下肝脏置于无菌盘内,换用含 0.05%Ⅳ型胶原酶、0.1%链酶蛋白酶的 Hank's 液循环灌注至肝脏软化后,剔除肝包膜、血管、结缔组织,剪碎肝组织,加入含 0.005%DNaseI 的 Hank's 液约 20ml,37℃ 振荡消化(150 次/分钟)30 分钟。200 目滤网过滤、洗涤、离心后沉淀物按 1:2 体积与 18%Nycodenz 混匀,上覆少许 DMEM 培养液,2 800 转/分钟离心 17 分钟。经密度梯度离心后吸取分离液与培养液之间界面处细胞。吹洗、离心后用含 20%小牛血清的 DMEM 吹打混匀,取少许 0.4%台盼蓝染色计算存活率及产率。

2.2.2 HSCs 的培养与鉴定:将细胞按 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种于 6 孔板中,5% CO_2 、37℃ 培养箱中培养。待细胞中度激活时(约 7 天)免疫细胞化学 SABC 法测定 Desmin,胞浆染成棕黄色者为阳性细胞。

2.2.3 药物血清的制备^[9]:10 只大鼠随机分为正常组、给药组,每组 5 只。给药组每日予丹芍化纤胶囊 1g/kg 大鼠体重灌胃,正常组按 1g/kg 大鼠体重灌以生理盐水,均每日 2 次,连续 3 日,于末次给药后 2 小时再重复灌胃 1 次,第 2 次灌胃 1 小时后股动脉取血,2 000 转/分钟离心 15 分钟,混合同组大鼠血清,滤过除菌,56℃、30 分钟灭活,分装,置于一 80℃ 备用。

2.2.4 细胞增殖功能测定:采用 MTT 比色法^[10]。待原代细胞长至单层后(约 14 天)用 0.25%胰蛋白酶消化,配成 $1 \times 10^5/\text{ml}$,按 100μl/孔加入 96 孔板中培养 72 小时,然后分为小牛血清组、正常大鼠血清组、丹芍化纤药物血清组,各组分别加入含 5%、10%、20%相应血清的 DMEM 培养,每一血清浓度均设置 3 个复孔。温育 48 小时后,去培养基,每孔加入 5mg/ml MTT20μl,继续孵育 4 小时,然后再加入二甲亚砜(DMSO)100μl,振荡混匀后酶标仪测定 570nm 之吸光度(OD)。

2.3 统计学处理:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较用 *t* 检验或 *t'* 检验;计数资料(肝纤维化程度)两两比较用 Ridit 分析。

3 结果

3.1 丹芍化纤胶囊治疗 8 周对大鼠肝脏纤维化程度的影响:经 HE、V-G 染色光镜下观察,正常组大鼠肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,无胶原纤维增生;模型组大鼠肝小叶结构破坏,肝索排列紊乱,汇管

区纤维结缔组织增生,内有较多炎性细胞浸润,同时,胶原纤维向肝实质延伸,形成纤维间隔,包绕、分割正常肝组织,形成假小叶,纤维化程度较正常组显著增加($P<0.01$);治疗组大鼠肝组织结构改善明显,汇管区结缔组织增生显著减少,纤维间隔显著变薄、减少,与模型组比较差异有显著性($P<0.01$)。各组大鼠肝纤维化程度分级及HSCs细胞凋亡具体情况见表1。

3.2 丹芍化纤胶囊治疗8周后大鼠血清学指标变化:表2示,模型组大鼠HA、ALT均较正常组大鼠显著增加($P<0.01$);但经丹芍化纤胶囊治疗8周后,治疗组大鼠HA、ALT较模型组显著降低。HA恢复明显,几乎恢复到正常水平;而ALT仍较正常为高。

3.3 丹芍化纤胶囊治疗8周对大鼠HSCs细胞周期的影响:表3示,模型组S期细胞比例显著高于正常组,经丹芍化纤胶囊治疗后S期细胞比例明显下降,但尚未恢复至正常水平。治疗组 G_0 - G_1 期细胞比例较模型组、正常组明显增加, G_2 -M期细胞比例明显减少。

3.4 分离培养HSCs产率、存活率及鉴定:本法分离HSCs的产率为 $(2\sim3)\times 10^7$ /只,经台盼蓝染色,新分离的HSCs存活率为96%以上。原代培养7天左右的

Desmin染色阳性细胞(胞浆染成棕黄色者)在95%以上。

3.5 丹芍化纤胶囊对分离培养HSCs增殖的影响:表4示,随着血清浓度的增加,小牛血清组和正常大鼠血清组HSCs增殖能力逐渐增强,且同血清浓度者以小牛血清组增殖能力较强($P<0.01$);而丹芍化纤药物血清组HSCs增殖能力随血清浓度的增加呈下降趋势,表现出明显的剂量依赖性,且与同浓度小牛血清组和正常大鼠血清组比较明显降低($P<0.01$),说明HSCs增殖受到明显抑制。

4 讨论

丹芍化纤胶囊是我们根据中医活血化瘀、通络软坚理论及多年临床探索研制而成的中药复方制剂,主要由防己、丹参、赤芍、黄芪、银杏叶等组成。临床及实验室研究均表明该药预防人和大鼠肝纤维化作用明显^[2~4],但其具体作用机制尚未完全明确。

目前研究已证实,当肝脏受到损伤后,HSCs大量活化、增殖,同时功能发生诸多改变,如合成各种ECM、细胞因子和生长因子,分泌TIMPs等,直接导致肝纤维化的形成^[10]。因此,抑制HSCs的增殖成为抗肝纤维化的重要策略之一。

在本实验中我们观察到,模型组大鼠肝脏纤维化程度、血清HA及ALT水平均较正常组显著增加,HSCs S期细胞比例亦有所增加,表明肝损伤后体内HSCs大量增殖;而经丹芍化纤胶囊治疗8周后,在治疗组大鼠肝脏纤维化程度较模型组大鼠明显减轻、肝功能明显改善的同时,前者的HSCs S期细胞比例显著减少,提示该药减少ECM沉积、抗肝纤维化的作用与抑制HSCs增殖的作用有关。同时,在丹芍化纤胶囊治疗8周后,HSCs中 G_0 - G_1 期细胞比例明显提高,提示丹芍化纤胶囊抑制其增生的作用机制可能是通过 G_0 / G_1 阻滞来实现的。

与此同时,我们还利用体外培养的实验方法观察了丹芍化纤胶囊对HSCs增殖的影响。实验结果显示,正常大鼠血清能够维持HSCs生长,浓度越高HSCs增殖活性越强;而经丹芍化纤胶囊制备的大鼠药物血清作用48小时后,活化的HSCs逐渐变圆变小,并不

表1 各组大鼠肝纤维化程度分级情况(只)

组别	肝纤维化程度					
	0	I	II	III	IV	V
正常组	16	0	0	0	0	0
模型组	0	0	0	1	7	1
治疗组	1	6	2	1	0	0

表2 各组大鼠血清HA、ALT水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	HA(ng/ml)	ALT(U/L)
正常组	16	192.52±11.97	32.40±2.30
模型组	12	316.17±78.48 [*]	174.50±6.02 [*]
治疗组	10	200.78±31.71 [*]	93.13±5.79 [*]

与正常组比较, $\Delta P<0.01$;与模型组比较, $* P<0.01$;表3同

表3 各组大鼠HSCs细胞周期百分比比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	G_0 - G_1	S	G_2 -M
正常组	3	68.40±6.47	1.82±0.33	29.76±6.80
模型组	3	62.27±17.96	9.83±1.81 [*]	23.26±10.95
治疗组	3	94.30±1.33 [*]	3.11±1.27 [*]	2.58±0.73 [*]

表4 各组不同浓度血清对HSCs增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	OD值		
		5%血清浓度	10%血清浓度	20%血清浓度
小牛血清组	3	0.7203±0.0140	0.8010±0.0150	0.9180±0.0185
正常大鼠血清组	3	0.5910±0.0235 [*]	0.6407±0.0114 [*]	0.7933±0.0215 [*]
丹芍化纤药物血清组	3	0.3587±0.0206 [*] [△]	0.2913±0.0190 [*] [△]	0.1133±0.0070 [*] [△]

与同浓度小牛血清组比较, $* P<0.01$;与同浓度正常大鼠血清组比较, $\Delta P<0.01$

(下转第790页)

览群书,更要在一辈子的临床实践中积累丰富的经验,正如“熟读王叔和,还要临证多”(路志正语)。我们只有通过长期的临床实践,细心揣摩,深刻领悟其中的奥妙,掌握辨证论治的诀窍,从而进一步抓住辨证论治规律,在这种感性认识层次上的领悟,才能成为一名高明的医生。

中医治病的优势,在于辨证论治,治病求本,只有准确地辨证,才能抓住疾病的本质。但是,中医的临证,未必时时都能效若桴鼓之应。因此,要从实践的成败中来认识和检验所学,注意总结正反两方面的经验,“失败是成功之母”,只有正确地认识成败之缘由,才能立于不败之地。纵观中医古今医著医案,大都介绍的是成功的经验,可是成功的案例背后却隐藏着失败,这些从失败的案例中抽取出来的成功经验,表面上看来中医某病证是治疗好了,可仔细分析之,自己为什么却不能达到此种境界呢?这是因为你没有从失败中吸取教训,或是还没有走出误区。《灵枢·九针十二原》篇中说:“言不可治者,未得其术也”。在《内经》的作者看来,任何疾病都是可治的,然不可治者,是未得其术,即尚未掌握其治疗的方法。因此,一个临床工作者,不仅要总结有效成功的案例,还要学会辨析为什么久治不效的原因,只有以这样的心态接受现实,从成败中寻求证治规律,才能进一步提高临床辨证论治水平。

4 写作

在临床的科学实践与探索中,发现问题有时比解决问题更难,因为在孰视无睹的眼皮下,发现问题者不仅要有真知灼见,更要独具慧眼。写文章的题目选择与

提炼就在于读书与临证的发现。本人初试文笔,不仅困难不少,更多的是无从下手,但后来选择了肾病专业为突破口,才逐渐摸索出了头绪。如为了把握激素与中医药应用的证治规律,以“激素与中医药”为研究目标,逐渐发表了10余篇研究论文。而为了能把当代名老中医治疗肾病的经验与共性规律学到手,又连续发表了《当代名老中医治疗肾炎、肾病》等系列研究论文。与此同时,使自己在肾病领域的研究找到了自己的热点、重点和难点,对于解决临床上实际困难起到了良好的促进作用。

读书发现问题,省悟感觉另有洞天,临证久治不愈的病促使自己不断的追求与进取。如肾炎水肿一证,自《内经》降世以来,治从肺脾肾着手已成定论,虽然有效,但鉴于现代认识的不断深化,感到中医治疗仍有突破的可能。故此,潜心研究中医的外治理论渊源,临床积极探索,理论与临证相结合,陆续发表了“肾炎水肿中医外治的理论与实践”系列研究论文,特别是《药浴法治疗肾衰的临床观察》一文发表后,受到了广泛关注。

读书思考写文章,理论临床两提高。这是自己的真实写照,也是临证实践摸索出的经验与规律。写文章并非易事,因为在任何时候,读书、临证都会遇到诸多无法解决或困惑的问题。对于这些问题,不要把它当作包袱,而应当看作工作的目标,看成是路途上的里程碑,当你写完最后一个字的时候,就象是走近或又超越了一个里程碑,顺着这样的目标进取,就可能达到《内经》中认可的“工巧神圣”的辨证论治境界。

(上接第782页)

断有细胞脱落而悬浮于上清中,该血清较正常大鼠血清及小牛血清能明显抑制 HSCs 对 MTT 的转化,即抑制 HSCs 的增殖,且此作用呈明显的药物浓度依赖性。由此可见,丹芍化纤胶囊对体内外活化的 HSCs 均有强大的抑制增殖作用,从而明确了该药抗肝纤维化的作用靶点之一在于抑制 HSCs 增殖,而这一作用可能与 G_0/G_1 阻滞有关,但关于丹芍化纤胶囊治疗后如何实现 G_0/G_1 阻滞的具体机理有待进一步研究。

参考文献

- 1 杨伟峰,陈厚昌,蒋毅萍.影响肝星状细胞活化的因素.中华肝脏病杂志,2004,12(2):121~123.
- 2 李诚秀,罗俊,李玲,等.汉丹肝乐预防肝纤维化的实验研究.中国公共卫生,1998,11(9):527~529.
- 3 张慧娜,李诚秀,黄能慧,等.汉丹肝乐对免疫性肝纤维化的预防作用.贵州医药,2001,25(5):415~417.
- 4 程明亮,丁一生,罗永芳,等.汉丹必要治疗慢性活动性肝炎肝纤维化的临床研究.中国中西医结合杂志,1996,16(7):431~432.
- 5 程明亮,杨长青.肝纤维化的基础研究与临床.北京:人民卫生出版社,2002:269~270.
- 6 罗云,戴立里,沈鼎明,等.原位循环灌注法分离大鼠肝星状细胞.重庆医科大学学报,2002,27(1):48~52.
- 7 张艺军,杨希山,吴平生,等.一种简便又经济的肝脏贮脂细胞分离方法.第一军医大学学报,2001,21(4):304~306.
- 8 朱永红,胡大荣.肝星形细胞系的建立和应用.世界华人消化杂志,1999,7(3):348~349.
- 9 殷继东,田德英,黄巧英.抗纤方对肝星状细胞活化增殖、凋亡和基质金属蛋白酶-1及其抑制剂表达的影响.中西医结合肝病杂志,2002,12(4):211~214.
- 10 Murphy FR,Issa R,Zhou X,et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. J Biol Chem,2002,277(13):11069~11076.