

化浊解毒含药血清对大鼠肝星状细胞增殖及细胞因子的影响

郭敏¹, 李佃贵^{2*}

(1. 河南中医学院第一附属医院消化诊疗中心, 郑州 450000;
2. 河北医科大学中医院, 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 观察化浊解毒含药血清对体外培养活化的大鼠肝星状细胞增殖及活性的影响, 探讨化浊解毒方治疗肝纤维化的作用机制。**方法:** 不同剂量(分别含有生药 30, 60, 120 g·L⁻¹)的化浊解毒方, 按 0.01 mL·g⁻¹体重 SD 大鼠灌胃给药, 以制备含药血清; 常规培养活化的肝星状细胞(HSC-T6), 用不同浓度的含药血清进行干预, 用 MTT, ELISA, RT-PCR 法分别检测肝星状细胞增殖、细胞上清液中 I 型胶原的含量以及细胞中转化生长因子-β₁(TGF-β₁) mRNA 基因的表达。**结果:** 与正常血清组比较, 化浊解毒方含药血清各浓度组均呈现出抑制 HSC 增殖的作用($P < 0.05$), 且呈剂量和时间依赖性。与正常血清组比较, 化浊解毒方含药血清各个浓度组在作用 48 h 后, 细胞上清液中的 I 型胶原的含量均降低($P < 0.05$), 均能下调细胞中 TGF-β₁ mRNA 的表达($P < 0.05$)。**结论:** 化浊解毒方之所以能有有效的治疗肝纤维化可能与化浊解毒方抑制肝星状细胞的增殖和活性有关。

[关键词] 肝纤维化; 肝星状细胞; 化浊解毒方; 增殖; 转化生长因子-β₁

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)15-0263-04

Effects of Huazhuo Jiedu Recipe on Proliferation and Activity in Rat Cultured Hepatic Stellate Cells *in vitro*

GUO Min¹, LI Dian-gui^{2*}

(1. Henan Institute of Traditional Chinese Medicine Diagnosis and Treatment
Center First Affiliated Hospital Digestion, Zhengzhou 450000, China;

2. Hebei Province Traditional Chinese Medicine Hospital, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Huazhuo Jiedu Recipe (HZJD) on the proliferation and activity in rat hepatic Stellate cells (HSCs) *in vitro*. **Method:** The drug-containing serum of HZJD was prepared by feeding healthy SD rats at various doses (20, 15, 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹) of HZJD, and used to incubate the HSCs cultured *in vitro*. The impact of drug-containing serum on HSCs proliferation was estimated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) at 24, 48 h and 72 h after by intervention of drug-containing serum; the content of collagen 1 (COL I) was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); the expression of transforming growth factor betal (TGF-β₁) mRNA was measured by RT-PCR. **Result:** The proliferation of HSCs was inhibited significantly after intervention with various dose of HZJD drug-containing serum. With a concentration-dependent manner compared with the normal serum control group ($P < 0.05$). The content of COL I and the expression of TGF-β₁ mRNA were degraded after intervened with HZJD drug-containing serum at various dose in HSCs ($P < 0.05$). **Conclusion:** Drug-congtaining serum of HZJD could inhibit the proliferation and activity of HSCs *in vitro*.

[Key words] hepatic fibrosis; hepatic stellate cell; Huazhuo Jiedu fang; proliferation; transforming growth factor-β₁

[收稿日期] 20120309(019)

[第一作者] 郭敏, 主治医师, 博士, 从事中医药防治肝纤维化的临床与实验研究, Tel: 18003859100, E-mail: hbguomin@sina.com

[通讯作者] * 李佃贵, 教授, 从事浊毒理论在消化系统疾病中的应用研究, Tel: 18003859100, E-mail: wjzhangbing@sina.com

肝纤维化见于大多数慢性肝脏疾病中,进一步发展可形成肝硬化,严重影响患者健康与生命。前瞻性研究表明,慢性乙型肝炎发展为肝硬化的年发生率为 2.1%;另一项对 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者进行平均 9 年(1~18.4 年)的随访研究表明,进展为肝硬化的发生率为 23%^[1-2]。而肝星状细胞的活化和增殖是肝纤维化发生的中心环节^[3],因此有效的抑制肝星状细胞增殖和活化是治疗肝纤维化的关键。

化浊解毒方是李佃贵教授在“浊毒”理论指导下组方而成,经多年临床实践证明能有效的逆转肝纤维化^[4]。但对其具体作用机制尚不清楚。本实验将运用细胞培养、中药血清药理学及各种生化检测手段,观察中药复方化浊解毒方含药血清对大鼠肝星状细胞增殖及活性的影响,了解其逆转肝纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 动物及分组 健康 SD 大鼠 20 只,体重(210±0.23)g,购自河北医科大学实验动物中心(动物合格证号 810024)。将大鼠随机分为 4 组:正常对照组(control),化浊解毒方高剂量组(HG),化浊解毒方中剂量组(HZ),化浊解毒方低剂量组(HD),每组 10 只制备含药血清。

1.2 细胞 肝星状细胞(HSCs-T6)由河北医科大学第二附属医院消化科惠赠,为活化型永生的大鼠肝星状细胞系。

1.3 药物 化浊解毒方由红景天,绞股蓝,鳖甲,三棱,田基黄,茵陈,黄连,虎杖,黄柏等组成,由河北省中医院免煎颗粒配成中药复方溶液,每毫升含有生药 2 g。

1.4 试剂及仪器 双抗(华北制药厂)DMEM 高糖培养基(GIBCO 公司),FBS(北京燕生科技有限公司),MTT(Sigma 公司),RNA 提取试剂盒(TianGen 公司),逆转录试剂盒(TianGen 公司),KT201-Taq PCR(TianGen 公司),I 型胶原 ELISA 试剂盒(美国 biotech 公司);CO₂ 培养箱(美国 NATURE),XDS-1B 型倒置显微镜(Olympus),PCR 仪(英国 TECHNE 公司),TECAN 酶标仪(奥地利)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 实验动物在清洁级动物室饲养,饮用自来水,食用标准颗粒饲料,随意饮食。按体表面积法^[8]计算出每只大鼠所需药物,将干扰素 1 000 U·mL⁻¹及中药低、中、高 3 个剂量给大鼠分别按每 100 g 体重给予 0.4,0.8,1.6 mL 中药灌胃,

其中正常血清组灌服同等剂量的生理盐水。给药组均在每天上午 8:00 给药,半小时后给予正常饮食,连续灌胃 10 d,于末次给药 2 h 后无菌条件下进行腹主动脉取血,将同组的鼠血混装于无菌容器中封口静置约 4 h 使血液凝固,置 4℃ 冰箱过夜,使血清充分析出,继用 12 000 r·min⁻¹离心 5 min,取血清,56℃ 30 min 灭活补体,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌,-70℃ 保存备用。

2.2 细胞的复苏与传代培养 将 HSC-T6 细胞从液氮中取出,迅速置于 37℃ 水浴箱中 1 min 内使其融化,无菌条件下打开冻存管,将细胞及其冻存液一起转入已灭菌的盛有 10 mL 20% FBS-DMEM(高糖)培养基的离心管中,1 500 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清,将细胞转移至 3 mL 20% FBS-DMEM 的培养瓶中置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中。24 h 后进行常规传代培养。待细胞生长稳定后进行后续试验。

2.3 细胞分组 分为 4 组:HG 组(加化浊解毒方高剂量含药血清),HZ 组(加化浊解毒方中剂量含药血清),HD 组(加化浊解毒方低剂量含药血清),control 组(正常不含药血清)。每组设 8 个复孔,血清添加量为 20%。

2.4 MTT 法检测化浊解毒方含药血清对 HSC-T6 增殖的影响 取待传代的 HSC-T6 用 10% FBS-DMEM 培养基稀释成 2×10⁴/mL 接种到 96 孔培养板中,每孔 200 μL,待细胞贴壁后,继续培养至细胞融合约 70% 左右,换为不含血清的高糖 DMEM 培养基继续培养,使细胞生长同步化。24 h 后更换为用 1% FBS-DMEM 培养基稀释的含药血清,分别在培养 24,48,72 h 后,加入 5 g·L⁻¹ MTT,20 μL/孔,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 4 h,加入二甲基亚砜(DMSO)150 μL/孔,震荡溶解 10 min 后,用酶标仪测定 492 nm 的吸光度(A)。

2.5 ELISA 法检测 HSCs 培养上清液中 I 型胶原(COL I)的含量 取待传代的 HSCs 用 10% FBS-DMEM 培养基稀释成 2×10⁴/mL 密度接种到 96 孔培养板中,每孔 200 μL,待细胞贴壁后,继续培养至细胞融合约 70% 左右,换为不含血清的高糖 DMEM 培养基继续培养,使细胞生长同步化。24 h 后更换为用 1% FBS-DMEM 培养基稀释的含药血清,继续培养 48 h 后取细胞培养的上清液,按试剂盒说明操作,用酶标仪测定 492 nm 的 A。

2.6 半定量 RT-PCR 检测转化生长因子 1(TGF-β₁) mRNA 及 PPAR_γ mRNA 的表达 将传代的 HSC 用 10% FBS-DMEM 培养基稀释成 2×10⁵/mL 密度

接种于6孔板中,每孔1 mL,待细胞贴壁后,继续培养至细胞融合约70%左右,换为不含血清的高糖DMEM培养基继续培养,使细胞生长同步化。24 h后更换为用1% FBS-DMEM培养基稀释的含药血清,继续培养48 h后,弃上清,用预冷的PBS冲洗,

表1 引物序列及片段长度

基因	上游引物	下游引物	长度/bp
TGF- β_1	5'-TAA TGG TGG ACC GCA ACA ACG -3'	5' TTG CTG TAC TGT GTG TCC AG -3'	680
β -actin	5-GCC ATG TAC GTA GCC ATC CA-3	5-GAA CCG CTC ATT GCC GAT AG-3	375

PCR反应体系(25 μ L):2 μ L cDNA, primer1 1 μ L, primer2 1 μ L, 2 \times Master Mix 12.5 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。

PCR条件:94 $^{\circ}$ C 5 min,然后94 $^{\circ}$ C变性45 s,50 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s(35个循环),72 $^{\circ}$ C终末延伸5 min。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶电泳后,至凝胶成像仪中照相,照片进行A和面积扫描。计算每一样品和其内参对照的相对含量。

2.7 统计学方法 使用SPSS 13.0 for windows 统计软件,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,均数间两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 化浊解毒方含药血清对HSCs增殖的影响(表2) HSCs在不同浓度化浊解毒方含药血清培养基中培养24 h,只有高剂量组有抑制其增殖的作用($P < 0.05$);培养48 h后,化浊解毒方含药血清各剂量组均有明显抑制HSCs增殖的作用,其中高剂量组效果更为明显($P < 0.05$),且效果优于中、低剂量组($P < 0.05$);培养72 h后,化浊解毒方含药血清各剂量组均有明显的抑制HSCs增殖的作用($P < 0.05$),各个剂量组之间效果无明显差别。

表2 化浊解毒方含药血清对HSC增殖作用的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ g·L ⁻¹	A		
		24 h	48 h	72 h
正常	-	0.391 \pm 0.045	0.494 \pm 0.041	0.367 \pm 0.062
含药血清	30	0.387 \pm 0.045	0.315 \pm 0.043 ^{1,2)}	0.236 \pm 0.055 ¹⁾
	60	0.353 \pm 0.061	0.266 \pm 0.046 ^{1,2)}	0.233 \pm 0.056 ¹⁾
	120	0.216 \pm 0.051 ¹⁾	0.160 \pm 0.044 ¹⁾	0.195 \pm 0.042 ¹⁾

注:同正常血清组比较¹⁾ $P < 0.05$;同化浊解毒方含药血清高剂量组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 化浊解毒方含药血清对HSCs培养上清液中I型胶原蛋白含量的影响(表3) HSCs在不同浓度化浊解毒方含药血清培养基中培养48 h后,各组均能抑制HSCs细胞分泌I型胶原的作用,其中高剂量组效果更为明显,且效果优于中、低剂量组($P <$

再根据总RNA提取试剂盒说明提取总RNA,进行完整性鉴定。根据cDNA第一链合成试剂盒进行逆转录为cDNA。取2 μ L的cDNA在PCR仪上进行扩增反应。扩增体系按试剂盒说明。引物序列及扩增片段长度见表1。

0.05)。

表3 化浊解毒方含药血清对肝星状细胞分泌COL I含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	COL I/ μ g·L ⁻¹
正常	-	186.25 \pm 17.99
含药血清	30	162.63 \pm 19.83 ^{1,2)}
	60	158.00 \pm 15.23 ^{1,2)}
	120	117.88 \pm 16.98 ¹⁾

注:同正常血清组比较¹⁾ $P < 0.05$;同化浊解毒方含药血清大剂量组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 化浊解毒方含药血清对HSCs细胞表达的TGF- β_1 mRNA的影响(表4,图1) 与正常血清对照组比较,化浊解毒方含药血清各剂量组均能够下调TGF- β_1 mRNA的表达($P < 0.05$);且化浊解毒方高剂量含药血清组的TGF- β_1 mRNA表达明显低于中、低剂量组($P < 0.05$)。

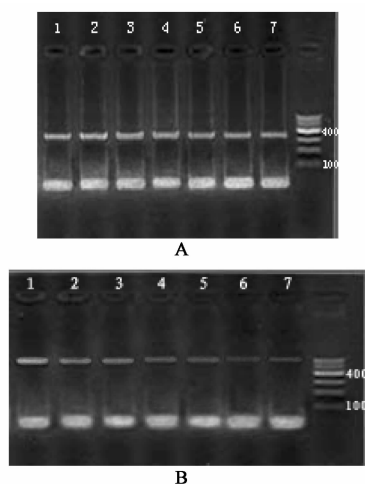
表4 化浊解毒方含药血清对HSCs中的TGF- β_1 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·L ⁻¹	TGF- β_1 / β -actin
正常	-	1.20 \pm 0.035
含药血清	30	0.72 \pm 0.045 ^{1,2)}
	60	0.52 \pm 0.027 ^{1,2)}
	120	0.34 \pm 0.030 ¹⁾

注:同正常血清组比较¹⁾ $P < 0.05$;同化浊解毒方含药血清大剂量组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

目前很多研究已表明在肝纤维化阶段即使用药物干预,可以阻断向肝硬化的发展甚至可以逆转肝纤维化的发生。姜辉等^[4]发现肝乐颗粒对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠具有保护作用,可以减少肿瘤坏死因子的表达,其机制可能通过抗机体脂质过氧化、抑制促炎因子的产生有关。青献春等^[5]认为肝纤维化的治疗以活血化瘀、清热解毒、滋养肝肾、健脾利湿为治则,由此治则组方软肝散结胶囊,通过动物试验也证明了运用中药通过保护肝细胞及抗脂质过氧化等多方面综合作用起到抗肝纤维化作用。任永申等^[6]用具有清热、解毒、利胆、退黄作用的茵



A. HSC 中 β -actin; B. HSC 中 $TGF-\beta_1$;

1. control 组; 2, 3. HD 组; 4, 5. HZ 组; 6, 7. HG 组

图 1 $TGF-\beta_1$ mRNA 和 β -actin mRNA 在 HSCs 中的表达

梔黄注射液作用于四氯化碳诱导的肝细胞损伤的大鼠,结果显示茵梔黄注射液具有体外抗肝细胞损伤的作用,能够减低血清 ALT, AST 含量,中药在防治肝细胞损伤预防肝纤维化方面具有很强优势。

化浊解毒方是李佃贵教授在总结前人经验基础上首次在“浊毒致病”理论指导下组方而成。李教授认为肝纤维化是因为浊毒内蕴,阻滞经络,气血不畅而成,病机为浊毒内蕴,气滞血瘀,根据中医的“法随证立,方从法出”,制定治疗大法“利湿化浊,解毒抗炎,补气养血”为主。经过多年的临床实践表明化浊解毒方在治疗肝纤维化和肝硬化等方面疗效显著^[7]。

肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 的活化是肝纤维化的重要事件。HSC 的激活、增殖是肝纤维化形成的主要原因。激活的 HSC 在多种促有丝分裂原作用下分裂增殖的同时,自身也分泌多种细胞因子,主要有 $TGF-\beta_1$, PDGF 等,进一步促进 HSC 活化,并使已被激活的 HSC 快速转化为肌成纤维细胞^[8],同时合成大量的胶原等细胞外基质,最终导致肝纤维化。因此,在试验中尤其是体外实验中, HSC 就被作为主要的研究对象。

本实验运用中药血清药理学, MTT 及分子生物学等技术证实了化浊解毒方能够有效的抑制活化的 HSC 的增殖和活性,并能够下调 $TGF-\beta_1$ mRNA 的表达。实验表明化浊解毒方有可能通过下调 $TGF-\beta_1$ 表达,阻断了 $TGF-\beta_1$ 信号传导,从而抑制 HSC 增殖,减少分泌 I 型胶原等细胞外基质,最终缓解甚至逆转肝纤维化,这些可能是化浊解毒方治疗肝纤维化的作用机制之一;同时初步验证了“浊毒”理论在

治疗肝纤维化中应用的正确性,“浊毒”被认为是蕴积在体内的代谢废物和病理产物,由于机体机能下降,无力将其排出体外,便成为影响人体健康的重要因素。“浊毒”蕴于肝脏,影响肝的正常代谢、解毒和分解功能,导致肝组织受损,肝细胞遭到破坏,从而释放大量的炎症介质和细胞因子也可归为浊毒,其中最重要的是 $TGF-\beta$, $TGF-\beta$ 信号通路是迄今为止研究最深入、最明显的促肝纤维化生成的通路,在促进 HSC 活化和表达 ECM 中起重要作用。 $TGF-\beta$ 细胞外激活后,与其细胞膜上特异性受体结合,将信号传导至细胞内,再通过 Smad 通路和非 Smad 通路传导至核内,激活 HSC,使之合成分泌大量细胞外基质,最终形成肝纤维化。化浊解毒方所含有的具有“化浊毒”的药物可以通过减少浊毒物质如 $TGF-\beta$ 的表达和释放,发挥抗肝纤维化作用。所以本试验也从侧面验证了在肝纤维化发生发展中运用化浊毒疗法的正确性,进一步说明了浊毒是肝纤维化形成的重要因素,在浊毒理论指导下组方而成的化浊解毒方具有治疗肝纤维化的作用。由于化浊解毒方成分复杂,为了进一步对其进行开发,取得更大的社会效益,对其有效成分的进一步细化研究将是今后研究的重点。

[参考文献]

[1] Hsu Y S, Chien R N, Yeh C T, et al. Long-term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B[J]. Hepatology, 2002, 35:1522.
[2] 巫贵成,周卫平,赵有芳,等.慢性乙型肝炎自然史的研究[J].中华肝脏病杂志,2002,10(1):46.
[3] Yokogawa K, Matsui-Yuasa I, Tamura A, et al. Inhibitory effects of ecklonia cava extract on high glucose-induced hepatic stellate cell activation[J]. Mar Drugs, 2011, 9(12):2793.
[4] 姜辉,尚莉丽,徐松龄,等.肝乐颗粒对肝纤维化大鼠的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):167.
[5] 青献春,刘炳辰,裴象萍,等.软肝散结胶囊抗大鼠肝纤维化实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):149.
[6] 任永申,张萍,鄢丹,等.茵梔黄注射液对体外四氯化碳致肝细胞损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):115.
[7] 李佃贵,李刚,刘金里,等.李佃贵以“浊毒”立论治疗肝纤维化经验[J].陕西中医,2006,27(11):394.
[8] 赵伟,孙国志.不同种实验动物间用量换算[J].实验动物,2010,5:52. [责任编辑 邹晓翠]