论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0486-04

三甲益肝颗粒含药血清对HSC-T6细胞形态、增殖和凋亡的影响

杨道坤,梁海军,申保生,孙屹峰,乔汉臣 (453100 河南 新乡,新乡医学院第一附属医院感染疾病科)

[摘要] **目的** 观察三甲益肝颗粒(San Jia Yi Gan granula,SJG)含药血清对HSC-T6细胞形态、增殖和凋亡的作用,探讨SJG抗肝纤维化的细胞学基础。**方法** 雄性SD大鼠30只按随机数字表法分为5组,每组6只,分别为生理盐水对照组(Control)、水飞蓟宾组(Sily)、低剂量SJG组(SJG-L)、中剂量SJG组(SJG-M)和高剂量SJG组(SJG-H)。SJG按低、中、高(1.7、3.4、6.8 g/kg)3个剂量灌胃大鼠制备含药血清,并用不同体积分数(5%、10%、20%、40%)SJG含药血清干预HSC-T6细胞株,用倒置相差显微镜观察HSC-T6细胞形态学的变化,MTT法检测SJG药物血清对HSC-T6细胞增殖的影响,流式细胞仪检测SJG药物血清诱导HSC-T6细胞早期凋亡。**结果** 含药血清干预后,细胞形态发生明显改变:药物组细胞较对照组细胞明显减少,细胞间隙较宽,细胞皱缩,核染色质浓集呈球形。MTT实验结果显示各组药物血清均可抑制HSC-T6细胞的增殖,SJG-M、SJG-H组对HSC-T6细胞增殖的抑制均显著高于Sily组($P<0.05$),SJG-L组与Sily组对HSC-T6细胞增殖的抑制无显著差异($P>0.05$)。SJG-M、SJG-H组凋亡率分别为(7.09±1.04)%、(11.63±1.53)%,显著高于Sily组[(4.38±1.07)%]、SJG-L组[(4.17±0.30)%]和对照组[(1.74±0.11)%]。与对照组比较,各药物血清干预组细胞凋亡数明显增加,以SJG-H组增加最为明显。**结论** SJG含药血清可显著抑制HSC-T6细胞的活化、增殖,并诱导其凋亡。

[关键词] 三甲益肝颗粒;HSC-T6细胞;细胞增殖;凋亡;肝硬化;大鼠

[中图法分类号] R285.5;R322.47;R329.28 **[文献标志码]** A

Effect of rat serum containing a traditional Chinese granule, San Jia Yi Gan on morphology, proliferation and apoptosis of HSC-T6 cells

Yang Daokun, Liang Haijun, Shen Baosheng, Sun Yifeng, Qiao Hanchen (Department of Infection Diseases, First Affiliated Hospital, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan Province, 453100, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of the serum of rat after intragastric injection of a traditional Chinese drug, San Jia Yi Gan granula (SJG) on the morphology, proliferation and apoptosis of rat hepatic stellate cell line HSC-T6 in order to elucidate the underlying mechanism by which SJG exerts anti-fibrosis on hepatic cells. **Methods** Thirty male SD rats were randomly and equally divided into 5 groups: control group, Silybin group (Sily, 4.38 mg/kg), low-dose SJG group (SJG-L, 1.7 g/kg), middle-dose SJG group (SJG-M, 3.4 g/kg), and high-dose SJG group (SJG-H, 6.8 g/kg). Solutions of normal saline, Sily, and SJG at corresponding doses were given the rats respectively by intragastrical injection once per day, for 7 d. The rats were killed in 1 h after last injection and their heart were removed to produce the drug-contained sera. HSC-T6 cells were exposed to different doses of drug-contained serum (5%, 10%, 20% and 40%) for 24 or 48 h. The morphology of HSC-T6 cells were observed with phase contrast microscopy, proliferation by MTT assay, and cell apoptosis by flow cytometry. **Results** HSC-T6 cells after the drug-contained sera treatment showed significant changes compared with those treated with the control serum, with lesser cells, intercellular space widening, shrinked cell body, and condensed chromatin to form spheres. MTT assay showed that various concentrations of drug-contained sera inhibited the proliferation of HSC-T6 cells, with SJG-M and SJG-H groups had stronger inhibitory effect than Sily group ($P<0.05$), while whose effect was no difference with that of SJG-L group. Flow cytometry demonstrated that the apoptotic ratios of HSC-T6 cells in SJG-H group [(11.63±1.53)%] and SJG-M group [(7.09±1.04)%] were higher than that in SJG-L group [(4.17±0.30)%], Sily group [(4.38±1.07)%], and the control group [(1.74±0.11)%, $P<0.05$]. SJG induced apoptosis

[基金项目] 河南省自然科学基金(200733004)

[通信作者] 乔汉臣,电话:(0373)4402555,E-mail:hanchenqiao@yahoo.com.cn

of HSC-T6 cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** SJG-contained serum significantly inhibits the proliferation of HSC-T6 and induces cell apoptosis.

[Key words] San Jia Yi Gan granula; HSC-T6 cells; proliferation; apoptosis; liver cirrhosis; rats

Supported by the Natural Science Foundation of Henan Province (200733004). Corresponding author: Qiao Hanchen, Tel: 86-373-4402555, E-mail: hanchenqiao@yahoo.com.cn

三甲益肝颗粒(San Jia Yi Gan granula,SJG)是经临床验证治疗肝纤维化有效的中成药复方制剂[1]。本课题组前期用免疫组化法证实三甲益肝颗粒具有通过抑制肝星状细胞活化来抗肝纤维化的作用机制[2]。中药血清药理学研究方法是用含药血清代替煎剂或粗提物进行实验研究的新方法,可避免直接添加药物引起的各种弊端,使中药复方能在细胞分子水平研究其作用机制,其可信性和科学性更强。肝星状细胞(hepatic stellate cells,HSCs)活化是肝纤维化形成的细胞学基础,本实验采用HSC-T6系为SV40转染SD大鼠的HSCs,是活化的HSCs,能表达α-SMA、波形蛋白(vimentin),具有表达高水平COL-Ⅰ、TIMP-1 mRNA特性,该细胞系能够长期传代,传代后具有稳定的表型。对人肝HSCs进行鉴定及培养研究发现,人HSCs与大鼠HSCs具有相似的形态学、标志物及培养生长特点[3],因此HSC-T6细胞可作为进行HSCs基因表达调控、抗肝纤维化药物作用及肝纤维化发生机制等研究的理想细胞模型[4]。本实验观察SJG含药血清对HSC-T6细胞形态、增殖和凋亡的作用,以进一步探讨其抗肝纤维化的细胞学基础。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

SJG由本院中药制剂室制成(豫药制Z04070029),组方:鳖甲、穿山甲、牡蛎、柴胡、大黄、莪术、桃仁、内金、赤芍、丹参、郁金、白术、黄芪、金钱草等,用生理盐水配制成溶液体内给药。水飞蓟宾胶囊(水林佳,35 mg/粒,天津天士力制药股份有限公司,批准文号:国药准字H20040299)用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配成相应浓度的混悬液,供体内给药用;HSC-T6细胞购于上海麦莎生物公司。健康、雄性SD大鼠30只,体质量160~180 g,新乡医学院实验动物中心提供,普通饲料喂养,自由进食、水。

胎牛血清(FBS)、四甲偶氮唑蓝(MTT,美国Sigma公司),Annexin V-FITC凋亡试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司);CO_2培养箱(美国Precision Scientific公司),CAM-1000型超净工作台、荧光显微镜(日本Olympus公司),倒置显微镜(重庆光学仪器厂),752分光光度计(上海光谱仪器厂),FACS流式细胞仪(美国Becton Dickson公司),NICON照相显微镜(日本尼康公司)。

1.2 方法

1.2.1 含药血清的制备 30只SD大鼠按随机数字表法分为5组:对照组、水飞蓟宾组(Sily)、低剂量三甲益肝颗粒组(SJG-L,1.7 g/kg)、中剂量三甲益肝颗粒组(SJG-M,3.4 g/kg)和高剂量三甲益肝颗粒组(SJG-H,6.8 g/kg),用生理盐水配制成溶液,每次10 ml/kg,每日19:00灌胃1次,对照组灌以等体积生理盐水,连续7 d,最后1次灌药(灌药前禁食不禁水12 h)1 h后,10%水合氯醛溶液(3 ml/kg)腹腔内注射麻醉,无菌条件下左心室取血,4 ℃过夜,3 000 r/min离心15 min,分离血清,同组血清混合,分别制成药物血清与对照血清,56 ℃ 30 min灭活,以除去可能存在的生物活性物质,再用0.22 μm的微孔滤膜过滤除菌,密封后置于-70 ℃冰箱保存备用。

1.2.2 细胞培养 将冷冻保存于液氮中HSC-T6细胞复苏后接种于含10%胎牛血清、100 IU/ml青霉素、100 μg/ml链霉素、4 mmol/L谷氨酰胺RPMI1640培养液中,37 ℃、5% CO_2条件下培养。当细胞呈单层致密状时,0.25%胰蛋白酶消化后传代,24 h换液,72 h再次传代。每次实验均在呈指数生长的细胞中进行。

1.2.3 MTT法检测SJG药物血清对HSC-T6细胞增殖的影响 用无酚红RPMI1640培养基配制成细胞悬液,按1×10^6/ml接种于96孔板,100 μl/孔培养24 h后,吸去孔中培养基;加入5%、10%、20%、40%不同体积分数的各组含药血清,分20组,每组6复孔分别培养24 h和48 h;分别于24、48 h取出培养板,吸去各孔培养基,换为无血清RPMI1640液90 μl,并加入MTT(5 mg/ml)10 μl,培养4 h;弃培养基,每孔加入DMSO 100 μl,振荡器上匀速振荡5 min;酶标仪检测波长492 nm光密度值[$D(492)$],并计算抑制率。

$$抑制率=[D(492)_{对照组}-D(492)_{干预组}]/D(492)_{对照组}\times100\%$$

1.2.4 溴化乙锭/吖啶橙双重染色(AO/EB)检测SJG药物血清诱导HSC-T6细胞凋亡 在荧光显微镜下观察不同药物血清组诱导HSC-T6细胞凋亡情况并照相。阳性结果判定[5]:①正常细胞,吖啶橙染色为深绿色,溴化乙锭染色很浅。②早期凋亡细胞,吖啶橙绿染明显,溴化乙锭红染较浅;晚期凋亡细胞,吖啶橙绿染变浅,溴化乙锭红染增强。③死亡细胞,溴化乙锭红染明显增强,吖啶橙绿染变暗。

1.2.5 流式细胞仪检测SJG药物血清诱导HSC-T6细胞早期凋亡 传代HSC-T6细胞用RPMI1640培养基配制成细胞悬液按1×10^6细胞/ml接种于6孔板,培养24 h后,吸去孔中培养基;加入无血清RPMI1640培养液培养24 h,吸去孔中培养基;加入10% Sily及SJG-L、M、H血清组,每组设3个平行孔。作用48 h,另以生理盐水血清组RPMI1640液培养的同期传代HSC-T6细胞作为对照;0.25%胰酶消化细胞,PBS液洗涤,取1 ml细胞,1 500 r/min,4 ℃离心10 min,3次,弃去PBS液,将细胞重悬于200 μl Binding Buffer;加入10 μl Annexin V-FITC和5 μl PI,轻轻混匀,避光室温反应15 min或4 ℃反应30 min。加入300 μl Binding Buffer,在1 h内送流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,组间差异采用单因素方差分析,两

两比较采用 LSD、t 检验。采用 SPSS 12.0 统计软件分析。

2 结果

2.1 药物血清对 HSC-T6 细胞形态学的影响

培养细胞含药血清干预 24 h 后有细胞脱落，悬浮于上清中，随药物浓度、时间的增加，上述改变愈加明显。但细胞膜一直保持完整。对照组 HSC-T6 细胞无明显形态改变。48 h 后，倒置相差显微镜下观察 HSC-T6 细胞形态发生明显的改变（图1）。对照组细胞呈星形，星芒状突起丰富，高倍镜下细胞核呈圆形或不规则形，核仁圆形，清晰可见。药物组细胞较对照组细胞明显减少，细胞间隙较宽，细胞皱缩，核染色质浓集呈球形，而对照组仍呈肌成纤维细胞样细胞（myofibroblast-like cell，MFB）外形，未见到核染色质浓集。

2.2 AO/EB 荧光染色结果

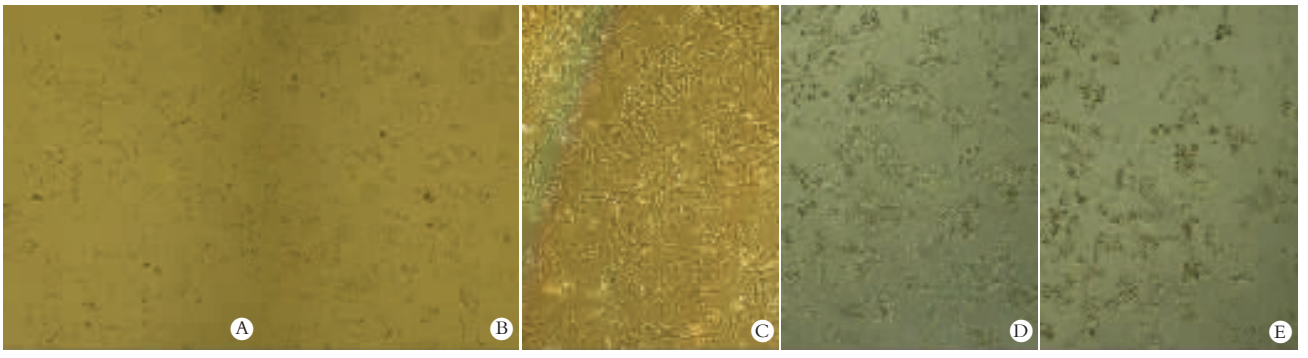
荧光显微镜观察可见对照组多为黄绿色或绿色细胞，药物血清组可见较多橙红色的凋亡细胞，且随 SJG 剂量的增高，凋亡细胞逐渐增多，Sily 组与 SJG-L 组比较无显著性差异（图2）。

2.3 各组药物血清对 HSC-T6 细胞凋亡的影响

各组药物血清均可抑制 HSC-T6 细胞的增殖，在 5% ~ 40% 体积分数范围内，抑制作用呈剂量依赖性关系，随 SJG 剂量增加，其抑制作用呈逐渐增强，其中 SJG-H 组 10%、20%、40% 药物血清对 HSC-T6 细胞增殖的抑制率（38.32%、38.74%、39.14%）组间比较无显著性差异（$F = 5.479$，$P > 0.05$）。SJG-M 组（20.47%）、SJG-H 组（38.32%）对 HSC-T6 细胞增殖的抑制均显著高于 Sily 组（13.52%，$t = 2.0671$，$t = 2.482$，$P < 0.05$），SJG-L 组（12.73%）、Sily 组对 HSC-T6 细胞增殖的抑制无显著性差异（$t = 0.02$，$P > 0.05$）。SJG 各组药物血清对 HSC-T6 细胞增殖的抑制均高于对照组（$t = 2.310$，$t = 2.354$，$t = 2.413$，$P < 0.05$）。

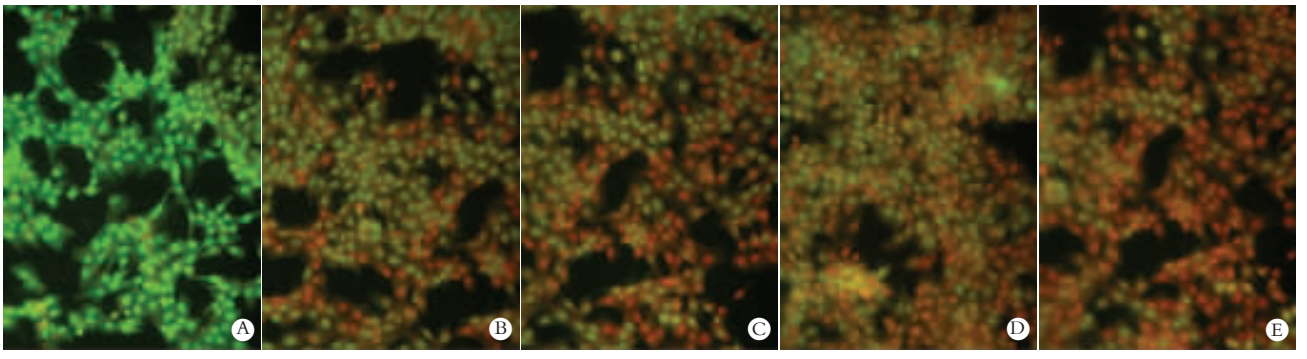
2.4 流式细胞仪检测 HSC-T6 细胞早期凋亡率结果

10% 药物血清干预各组 HSC-T6 细胞 48 h 均可诱导 HSC-T6 细胞凋亡，对照组凋亡率为（1.74 ± 0.11）%，SJG-M 组、SJG-H 组凋亡率分别为（7.09 ± 1.04）%、（11.63 ± 1.53）%，显著高于 Sily 组［（4.38 ± 1.07）%］和 SJG-L 组［（4.17% ± 0.30）%］（图3），差异有统计学意义（$F = 45.75$，$P < 0.05$），表明 SJG 可诱导 HSC-T6 细胞凋亡，且 SJG 随剂量增高，凋亡率升高。



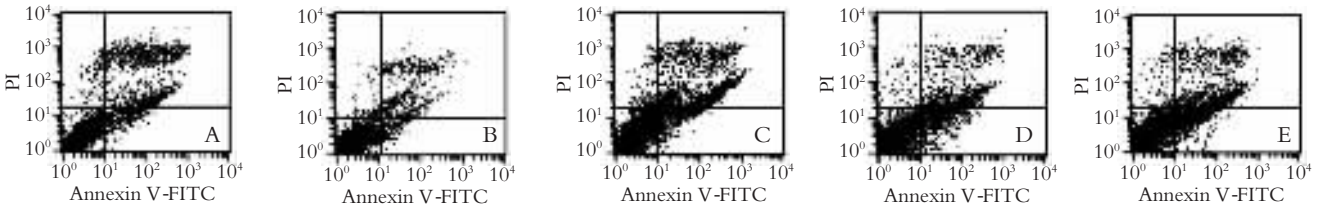
A：对照组；B：Sily 组；C：SJG-L 组；D：SJG-M 组；E：SJG-H 组

图1 10%含药血清干预 48 h 各组 HSC-T6 细胞形态观察（倒置相差显微镜 ×100）



A：对照组；B：Sily 组；C：SJG-L 组；D：SJG-M 组；E：SJG-H 组

图2 AO/EB 荧光染色检测 10%含药血清干预 48 h 各组 HSC-T6 细胞凋亡（×200）



A：SJG-H 组；B：对照组；C：Sily 组；D：SJG-L 组；E：SJG-M 组

图3 流式细胞仪检测 10%含药血清干预 48 h 各组 HSC-T6 细胞早期凋亡率

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝脏疾病发展至肝硬化的必经阶段[6,7]，HSCs活化不仅是肝纤维化的最终共同途径，而且还是肝纤维化的细胞学基础，是肝纤维化发生、发展的中心环节[8,9]。三甲益肝颗粒是在张仲景《金匮要略》"鳖甲煎丸"基础上，根据中医药理论加减组方研制而成，复方具有多途径、多靶点的整体优势，其综合作用为活血化瘀、清热解毒、软坚散结。目前中医药治疗肝纤维化虽然仍处于探索阶段，但已取得了可喜的成绩。水飞蓟宾胶囊为治疗肝病的国字号准药，具有直接清除活性氧、5′-脂氧合酶，保护肝细胞膜，促进被损伤的肝细胞膜合成DNA及结构蛋白、免疫调节和抗肝纤维化药理效应，且不良反应少，病人耐受力好，其作用已在实验及临床中得到了广泛的肯定，故本实验选择其为阳性对照药物与SJG进行比较，具有一定的可比性和较强的说服力。

本实验证实药物血清干预后肝星状细胞明显减少，细胞间隙较宽，细胞皱缩，核染色质浓集呈球形，而24 h后有细胞脱落，悬浮于上清中，随药物浓度、时间的增加，上述改变愈加明显，对照组仍呈MFB样外形，呈现活化的肝星状细胞；药物血清干预后，活化的肝星状细胞随着浓度药物血清的增加逐渐减少，失去产生肝纤维化的细胞学基础。

本实验各组药物血清均可抑制HSC-T6细胞的增殖，在5%～40%体积分数范围内，抑制作用呈剂量依赖性关系，随SJG剂量增加，其抑制作用呈逐渐增强，其中SJG-H 10%～40%药物血清组对HSC-T6细胞增殖的抑制无显著性差异（$P>0.05$）。SJG-M、H血清组对HSC-T6细胞增殖的抑制均显著高于Sily组（$P<0.05$），SJG-L组与Sily组对HSC-T6细胞增殖的抑制无显著性差异（$P>0.05$）。且各组药物血清对HSC-T6细胞增殖的抑制均高于对照组（$P<0.05$）。此结果与高庆华、贺宇彤等[10,11]研究结果一致。

本课题前期实验[2]采用免疫组化定性证明SJG具有诱导肝星状细胞凋亡的作用，本实验采用流式细胞仪定量检测肝星状细胞凋亡的作用，结果表明10%各药物血清组干预HSC-T6细胞48 h均可诱导HSC-T6细胞凋亡，SJG-M、SJG-H组凋亡率显著高于Sily组和SJG-L组，随着SJG剂量增大散点图在右下象限增加比较明显，即早期凋亡率增加，提示SJG-M、H血清作用HSC-T6细胞后，早期凋亡率明显高于Sily组和对照组，而SJG-L组与Sily组比较没有显著性差异，其原因可能是SJG没有达到最大有效药物浓度，提示诱导HSC-T6细胞凋亡可能是SJG发挥抗肝纤维化作用的重要途径，表明SJG对HSC-T6细胞的凋亡有促进作用，而且主要促HSC-T6细胞的早期凋亡，并具有剂量依赖性。研究[12]表明HSCs凋亡主要存在3条通路：死亡受体通路、线粒体通路和内质网通路，3条通路间是相互密切关联的。细胞增殖、凋亡是一种非常复杂的过程，受到细胞内外多种因素的影响，同时受到多条信号转导通路的精确调控，这些通路的作用形式不同，彼此之间又存在着错综复杂的关系。SJG对HSC-T6细胞的促进凋亡作用具体是通过哪条途径实现有待进一步研究。

参考文献：

[1] 乔汉臣，申保生，毛乾国，等. 三甲益肝冲剂对慢性肝炎和肝硬化患者的治疗作用[J]. 新乡医学院学报，2004，21(2)：83－85.
[2] 张超贤，乔汉臣，杨道坤，等. 三甲益肝冲剂对实验性肝纤维化大鼠脂质过氧化的影响[J]. 西安交通大学学报：医学版，2008，29(6)：710－713.
[3] Friedman S L, Rockey D C, McGuire R F, *et al*. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture[J]. Hepatology, 1992, 15(2): 234－243.
[4] Vogel S, Piantedosi R, Frank J, *et al*. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism *in vitro*[J]. J Lipid Res, 2000, 41(6): 882－893.
[5] 彭黎明，江虹. 细胞凋亡检测方法的研究进展[J]. 中华病理学杂志，2001，30(2)：135－136.
[6] Gutierrez-Ruiz M C, Gomez-Quiroz L E. Liver fibrosis: searching for cell model answers[J]. liver Int, 2007, 27(4): 434－439.
[7] Moreira R K. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(11): 1728－1734.
[8] Adrian J E, Poelstra K, Kamps J A. Addressing liver fibrosis with liposomes targeted to hepatic stellate cells[J]. J Liposome Res, 2007, 17(3/4): 205－218.
[9] Yin M F, Lian L H, Piao D M, *et al*. Tetrandrine stimulates the apoptosis of hepatic stellate cells and ameliorates development of fibrosis in a thioacetamide rat model[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(8): 1214－1220.
[10] 贺宇彤，刘殿武，丁里玉. 抗纤Ⅰ号等方剂和硒抗大鼠肝纤维化作用的实验研究[J]. 中医医院药学杂志，2004 24(1)：1－3.
[11] 高庆华，刘殿武，刘雅馨. 抗纤Ⅰ号对肝星状细胞增殖及相关基因表达的影响[J]. 第四军医大学学报，2005，26(22)：49－52.
[12] 张怡，平洁，汪晖. 肝星状细胞凋亡信号途径及其药物治疗的研究进展[J]. 中国药理学通报，2009，25(1)：16－18.

（**收稿**：2009-08-12；**修回**：2009-10-13）
（编辑 吴培红）