DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.021
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

文章编号:1000-5404(2004)07-0611-03

论著

益肝康的药物血清对大鼠HSCs增殖及PDGF基因表达的影响

房红梅,姚冬梅,姚希贤,王天轶 (河北医科大学第二医院消化病研究所消化内科,石家庄 050000)

提 要:目的 探讨中药复方益肝康抗肝纤维化的作用机制。方法 给正常大鼠灌服益肝康,提取药物血清,温育体外培养的肝星状细胞。^{3}H-TdR掺入法测定细胞增殖,流式细胞技术分析细胞周期,透射电镜观察细胞超微结构,免疫细胞化学法检测PDGF-BB蛋白表达。结果 益肝康药物血清显著抑制肝星状细胞的增殖,可使细胞生长周期延长,细胞增殖、活力受抑,并明显抑制PDGF-BB蛋白表达。结论 益肝康可抑制肝星状细胞增殖,对PDGF-BB表达的抑制作用可能是该方抗肝纤维化的主要机制之一。

关键词:益肝康;肝纤维化;肝星状细胞;血小板衍生生长因子
中图法分类号:R289;R349.21;R322.47 文献标识码:A

Seropharmacological effects of *Yigankang* decoction on proliferation of hepatic stellate cells and expression of platelet-derived growth factors

FANG Hong-mei, YAO Dong-mei, YAO Xi-xian, WANG Tian-yi (Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China)

Abstract: Objective To investigate the main seropharmacological mechanisms in the antifibrotic action of *Yigankang* decoction. Methods After administration of normal rats with *Yigankang* decoction through the stomach, rat serum was collected for incubation with the hepatic stellate cells (HSCs) cultured *in vitro*. The proliferation of HSCs was measured by ^{3}H-TdR incorporation. Cell cycles of HSCs were detected by flow cytometry. The ultrastructures of HSCs were observed transmission electron microscopically. The protein expression of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) was determined by immunocytochemistry. Results Serum of rats after administration of *Yigankang* decoction could obviously inhibit the proliferation of HSCs, increase the proportion of G_0/G_1 stage, and down-regulate PDGF-BB protein expression. Conclusion The inhibitory effect of *Yigankang* decoction on the proliferation of HSCs and PDGF-BB expression may be one of the main mechanisms in the antifibrotic action.

Key words: *Yigankang* decoction; hepatic fibrosis; hepatic stellate cell; platelet-derived growth factor-BB

以活血化淤药为主组方的益肝康(益肝冲/煎剂)投产10多年来,临床观察与动物实验显示其有较好的抗肝纤维化作用[1~7]。为了进一步了解该方的抗肝纤维化作用机制,我们采用整体动物给药,分离药物血清,作用于体外培养肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的血清药理学方法,探讨该方对HSC增殖及血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性Sprague Dawley大鼠80只,清洁级,体质量300~400 g,购自河北医科大学实验动物中心。

1.1.2 药物 益肝康由丹参、黄芪、归尾、赤芍等组成,本室自行制备成水煎剂灌胃液,每毫升含生药0.72 g。

1.1.3 细胞株 HSC株CFSC由美国Greenwel教授建株并惠赠,表型为活化的HSCs。

1.1.4 主要试剂 兔抗鼠PDGF-BB抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,^{3}H-胸腺嘧啶核苷酸(^{3}H-TdR)购自中国原子能科学研究院,HRP标记的山羊抗兔IgG、S-P试剂盒、DAB试剂盒购自北京中山生物技术公司,RPMI1640培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季青生物制品公司,胰蛋白酶购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 药物血清制备 按成人每公斤体质量10倍用量给大鼠灌益肝康水煎剂,每日2次,连续5 d,对照组灌以生理盐水。第6天按常规量再灌胃1次,1 h后,下腔静脉取血,静置3 h,3 000 r/min低温离心20 min,分离血清,56 ℃灭活30 min,过滤除菌后使用。

1.2.2 HSCs增殖测定 采用^{3}H-TdR掺入法。将HSC以每孔6.0×10^{3}的密度接种于96孔培养板,培养箱中孵育长至亚

作者简介:房红梅(1972—),女,河北省保定市人,博士研究生,主治医师,主要从事慢性肝病方面的研究,发表论文10篇。电话:(0311)6750677

收稿日期:2003-09-29;修回日期:2004-02-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

单层，换无血清的RPMI1640继续培养24 h，使细胞基本同步化于G_0期；分别添加5%、10%及20%的药物血清/对照血清，每组6复孔，温育6 h后，每孔加入1.11×10^4 Bq的^{3}H-TdR，继续温育18 h；0.25%胰蛋白酶消化，将细胞抽滤到玻璃纤维纸上，蒸馏水洗涤抽滤数次，60 ℃烘干，置于闪烁杯中，加入5 ml闪烁液，于液体闪烁记数仪上测定样品放射性。

1.2.3 细胞周期测定 采用流式细胞仪检测。接种3×10^5的细胞于25 cm^2的培养瓶中，长至亚单层，进行同步化处理后，给予10%药物/对照血清，温育24 h；0.25%胰蛋白酶消化，用PBS吹打成单细胞悬液，1 500 r/min离心5 min，调整每管细胞浓度不少于1×10^6/ml；弃上清，PBS洗1次；用0.5 ml PBS重悬细胞，加入预冷的70%乙醇3 ml迅速混匀，4 ℃固定过夜；离心收集细胞，PBS洗2遍，荧光染色；使用美国FACS-420流式细胞仪分析细胞周期并计算增殖指数(proliferation index，PI)，PI=($S+G_2/M$)/($G_0/G_1+S+G_2/M$)×100%。

1.2.4 HSCs超微结构观察 采用透射电镜下观察。接种3×10^5的细胞于25 cm^2的培养瓶中，长至亚单层，进行同步化处理后，给予10%药物/对照血清，温育24 h；0.25%胰蛋白酶消化，用PBS吹打成细胞悬液，1 000 r/min离心2~3 min；弃上清，用PBS将细胞团吹散，1 000 r/min离心10 min；弃上清，加入含4%戊二醛的PBS，室温放置30 min，进行透射电镜的蜡块包埋、切片、染色、观察及照相。

1.2.5 细胞PDGF-BB表达测定 采用免疫细胞化学法。以2.0×10^4/ml的密度接种1.5 ml制备细胞爬片，长至亚单层，进行同步化处理后，给予10%药物/对照血清，温育24 h；收集爬片，S-P法检测PDGF-BB表达；以PBS代替一抗作为阴性对照；棕黄色为阳性染色，经IMS-2000病理分析仪分析阳性细胞数及吸光度。

1.3 统计学方法

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，两组比较采用t检验，多组均数比较采用方差分析。两率的比较用χ^2检验。所有资料均用计算机统计软件SPSS10.0进行统计分析。

2 结果

2.1 益肝康药物血清对HSC增殖的影响

随血清浓度增加，对照血清组HSC内^{3}H-TdR掺入量呈上升趋势，药物血清组呈下降趋势。与同浓度对照血清相比，10%、20%浓度的益肝康药物血清能显著抑制HSC增殖($P<0.01$)。见表1。

表1 益肝康药物血清对HSCs增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Seropharmacological effects of *Yigankang* decoction on HSCs proliferation ($\bar{x}\pm s$)

Group	^{3}H-TdR incorporation (cpm)	Inhibition rate (%)
5% control serum	38 411.50±1 024.39	
5% *Yigankang* serum	37 485.07±822.17	2.41
10% control serum	40 823.00±1 287.63	
10% *Yigankang* serum	34 020.40±1523.11 *	16.66△
20% control serum	43 288.17±1 203.25	
20% *Yigankang* serum	32 996.75±718.32 *	23.77 #

*：$P<0.01$，*vs* control of the same concentration；△：$P<0.01$，*vs* 5% *Yigankang* serum；#：$P<0.01$，*vs* 10% *Yigankang* serum

2.2 益肝康药物血清对HSC细胞周期的影响

经10%药物血清干预后，G_0/G_1期细胞所占比例较对照血清组明显增加($P<0.01$)，而S期比例显著降低($P<0.01$)，增殖指数PI明显降低($P<0.01$)。见表2。

表2 益肝康药物血清对HSCs细胞周期的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Seropharmacological effects of *Yigankang* decoction on HSCs cycle (%，$\bar{x}\pm s$)

Group	Cell cycle			PI
	G_0/G_1	G_2/M	S	
10% control serum	67.32±3.10	8.97±4.65	25.83±6.74	32.63±5.23
10% *Yigankang* serum	86.97±5.26 *	4.28±3.17	9.86±5.02 *	13.98±4.61 *

*：$P<0.01$，*vs* 10% control serum

2.3 益肝康药物血清对HSC超微结构的影响

透射电镜下观察，10%益肝康药物血清干预后，细胞皱缩，空泡增多，线粒体减少、肿胀，内质网扩张，细胞核收缩，常染色质增加，核质比例减少，见图1、2。

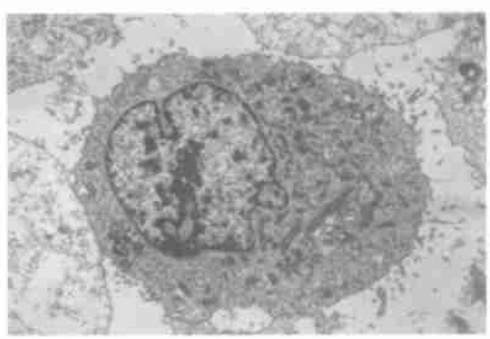


图1 对照血清组HSC透射电镜 (TEM×4 000)

Fig 1 Ultrastructures of HSCs in control serum group (TEM×4 000)

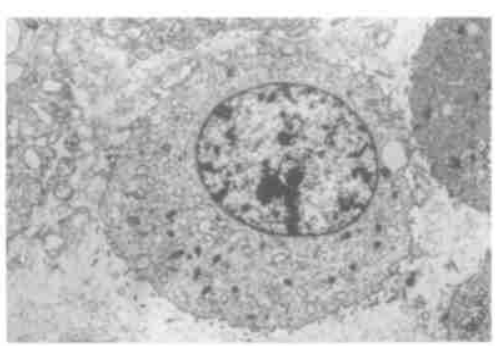


图2 益肝康药物血清组HSC透射电镜 (TEM×4 000)

Fig 2 Ultrastructures of HSCs in *Yigankang* serum group (TEM×4 000)

2.4 益肝康药物血清对HSC PDGF-BB的影响

活化的HSC胞浆表达PDGF-BB，阳性染色呈棕黄色。经图像分析，10%益肝康药物血清干预后，阳性细胞数及棕色吸光度均较对照血清组显著减少($P<0.05$，$P<0.01$)。见表3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　益肝康药物血清对 HSC PDGF-BB 的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Seropharmacological effects of *Yigankang* decoction on PDGF-BB expression in HSCs ($\bar{x}\pm s$)

Group	Rate of positive cells (%)	Absorbency
Control serum	80.39±8.97	0.049±0.001
Yigankang serum	66.18±7.43 *	0.032±0.002 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control serum

3　讨论

肝纤维化是各种慢性肝病进展为肝硬变的必经途径。近年来研究证实, 肝星状细胞是其病理形成的细胞学基础。HSCs 受细胞因子等病理因素刺激后活化, 大量增殖并生成胶原等细胞外基质, 沉积于肝脏, 形成肝纤维化。因此抑制 HSCs 活化、增殖, 诱导活化的 HSCs 凋亡以及促进胶原降解则成为阻止并逆转肝纤维化的主要途径。

随着发生机制的逐渐阐明, 使得肝纤维化的预防、治疗甚至逆转成为可能。但迄今为止, 现代医学尚无良好治疗方法, 而活血化淤为主中药以其良好的防治效果及低毒性反应展现出广阔前景。临床与实验研究表明, 以活血化淤药为主组方—益肝康对消除症状, 改善慢性肝炎(病)、肝纤维化病变, 恢复肝功能具有良好作用[1~7]。本实验采用血清药理学方法, 对体外培养的 HSCs 增殖及细胞因子 PDGF 进行研究, 结果表明益肝康药物血清可显著抑制 HSCs 增殖及 PDGF-BB 表达。具体表现为: ① 肝星状细胞在体外无包被的塑料培养皿中培养, 可自发向肌成纤维样细胞转化, 具有体内活化的生物学特征, 是较理想的抗肝纤维化模型[8]。细胞分裂增殖是活化 HSCs 的重要功能改变之一。本实验采用 ^{3}H -TdR 掺入法测定细胞增殖, 结果表明 10%、20%益肝康药物血清可显著抑制 HSCs 增殖, 抑制率分别达 16.66%及 23.77% ($P<0.01$); ② 细胞周期分析显示, 益肝康药物血清可使 HSCs 受阻于 DNA 合成前期[G_0/G_1: (67.32±3.10)%/(86.97±5.26)%, $P<0.01$], 而细胞周期的长短主要决定于 G_0/G_1 期, G_0/G_1 期阻滞使 HSCs 生长周期延长, 细胞增殖相应减慢(PI: 32.63±5.23/13.98±4.61, $P<0.01$)。③透射电镜下观察细胞超微结构, 表现为 HSCs 的增殖活力受到明显抑制。④HSCs 活化是由静止状态向肌成纤维细胞转化的过程, 依赖于众多细胞因子的网络调节, 其中 PDGF 系最强的促 HSCs 分裂增殖因子, 并可促进 HSCs 活化、迁移, 促进胶原产生和沉积, 诱导 HSCs 合成 TGF 等细胞因子。在炎症前期及炎症期, 炎症坏死、脂质过氧化以及肝细胞与 Kupffer 细胞分泌 PDGF、TGF-β1 等细胞因子激活 HSCs 的核转录因子, 启动 HSCs 活化; 于炎症后期, 活化的 HSCs 自分泌及激活 PDGF 等更多的细胞因子, 形成放大环, 使活化得以持续。PDGF 有 3 种不同的二聚体形式, 既 PDGF-AA、PDGF-BB 及 PDGF-AB, 研究证实 PDGF-BB 在促肝纤维化形成中作用尤为突出。本研究表明, 益肝康药物血清对 PDGF-BB 的蛋白表达有明显抑制作用[阳性细胞: (80.39±8.97)%/(66.18±7.43)%, $P<0.05$; 吸光度: 0.049±0.001/0.032±0.002, $P<0.01$], 提示该方抑制 HSCs 增殖的机制可能在于抑制细胞 PDGF-BB 的表达。

肝纤维化属中医"胁痛"、"积"、"血淤"范畴, 血液淤滞是本病主要病机特点, 治疗应以活血化淤为主, 益气健脾为辅。中药复方益肝康的前身为益肝冲剂, 于 80 年代投产并应用于临床, 因其良好的临床疗效而深受广大患者欢迎。益肝康是研制者对益肝煎剂进一步研究改进而成, 该方重用丹参, 辅以当归、赤芍等活血化淤, 并用黄芪、白术等益气健脾。大量临床与实验研究表明, 该药可改善肝功能, 消除症状, 抗脂质过氧化, 减少胶原沉积, 抑制 HSCs 活化、增殖, 促进 HSCs 凋亡, 保护受损肝细胞及线粒体等细胞器, 且无明显毒副作用[1~7]。本实验结果表明益肝康药物血清可抑制肝星状细胞增殖及细胞因子 PDGF-BB 的表达, 可能是该方抗肝纤维化的主要机制之一。

中药成分复杂, 确切说明其体内作用机制及有效物质基础十分困难, 直接限制了其临床推广应用。用中药粗制剂直接加入离体反应体系进行研究, 方法上存在很多问题, 如中药的杂质成分、各种电解质及酸碱度等均会对细胞的生长造成一定影响, 从而干扰实验结果的可靠性。而本研究采用给整体动物灌药, 收集药物血清进行体外实验的血清药理学方法, 可排除上述影响因素的干扰, 更接近药物在体内环境中发挥药效的真实过程。这种体内与体外相结合的方法不但能反映母体药物及其代谢产物的药理作用, 而且还能反映有可能由药物诱导机体产生的内源性成分所产生的作用。

参考文献:

[1] 姚希贤, 唐有为, 姚冬梅, 等. 益肝煎剂对实验性肝纤维化大鼠Ⅰ, Ⅲ型胶原蛋白表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(3): 263—267.

[2] Yao X X, Tang Y W, Yao D M, *et al*. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells[J]. World J Gastroenterology, 2002, 8(3): 511—514.

[3] 姚希贤, 姚　欣, 修贺明, 等. "益肝浓缩煎剂"等活血化淤药抗大鼠肝纤维化作用实验研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2001, 10(3): 217—222.

[4] Yao X X, Cui D L, Sun Y F, *et al*. Study on the anti-liver fibrosis effect of benefit liver granule and its mechanism in rats[J]. CJIM, 2002, 8(2): 118—121.

[5] 蒋树林, 姚希贤, 孙泽明, 等. 活血化淤中药对大鼠纤维化肝间质胶原的抑制作用[J]. 中华实用医学, 2002, 4(9): 10—13.

[6] 唐有为, 姚希贤, 姚洪森, 等. 益肝煎剂对实验性肝纤维化大鼠Ⅰ, Ⅳ型胶原蛋白表达的影响[J]. 中国消化病学杂志, 2002, 3(1): 16—19.

[7] 崔东来, 姚希贤, 姚金锋, 等. 丹参抗大鼠肝纤维化作用与机制研究[J]. 中华临床医药杂志, 2002, 3(13): 5—7.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net