

扶正化癆方药物血清对原代培养大鼠肝细胞增殖及胶原生成率的影响

季光 刘平 刘成 徐列明 洪嘉禾(上海中医药大学肝病研究所 200032)

摘要 大鼠灌胃给扶正化癆方后分离的药物血清,能显著促进正常及损伤肝细胞的增殖,有效地抑制CC1₁所致损伤肝细胞培养上清液中ALT、AST活性,抑制正常及损伤肝细胞的胶原生成率。

关键词 扶正化癆方 血清药理学 抗肝纤维化 肝细胞

Effect of Sera from the Rats Treated with Fuzheng Huayu(FZHY) Decoction on Rat Hepatocyte Proliferation and Collagen Synthesis in vitro

Ji Guang, Liu Ping, Liu Cheng, Xu Lieming, Hong Jiahe

(Institute of Liver Diseases, Shanghai University of TCM, Shanghai, 200032)

Abstract: Fuzheng Huayu (FZHY) Decoction was orally given to rats. Then, the serum was derived from the rats. The results showed that the drug serum could markedly promote both normal and injured hepatocyte proliferation, effectively inhibit ALT and AST activities in the medium and decrease collagen synthesis of both cells.

Key Words: Fuzheng Huayu (FZHY) Decoction, serum pharmacology, anti-liver fibrosis, hepatocyte

既往的研究表明,肝细胞在病理情况下胶原生成明显增加,在肝硬化形成过程中起着重要作用^[1]。扶正化癆方(由丹参、桃仁、虫草、松黄等组成,其中松黄为松科植物马尾松的干燥花粉)是上海中医药大学肝病研究所在长期的临床和实验研究中筛选出的有效抗肝纤维化验方。研究证实,该方具有改善肝功能、纠正氨基酸代谢失衡、调节部分异常的免疫功能与激素代谢、抑制胶原合成、促进胶原分解等综合的抗肝纤维化作用^[2,3]。本研究通过大鼠灌胃给药后分离的药物血清,观察该方对原代培养正常肝细胞及CC1₁体外损伤肝细胞细胞增殖与胶原生成率的影响,探讨该方抗肝损伤及肝纤维化的部分机制。

1 材料和方法

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠,SPF级,由上海中医药大学实验动物中心提供。取体重180~220g者分离肝细胞;体重250~300g者用于制备药物血清。

1.2 主要试剂及材料 IV型胶原酶(colla-

genase IV); 纯化Ⅲ型胶原酶(collagenase Ⅲ); MEM培养基,β-氨基丙腈(β-aminopropionitrile fumarate),胰岛素(Insulin),地塞米松(Dexamethasone),均购自Sigma公司; 199培养基及DMEM培养基购自GIBCO公司; [³H]脯氨酸(L-³H-Proline),购自Amersham公司; [³H]胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)为中科院上海原子能研究所产品,小牛血清(FCS)购自上海第二医科大学科技中心实验室, Ficoll为上海试剂二厂产品。60mm一次性培养皿(Nunclon牌)为丹麦进口。

1.3 药物 扶正化癆方,由上海中华制药厂制成流浸膏,每克含生药8.160g。秋水仙碱(Colchicine)由上海实生细胞生物技术公司提供,工作浓度 $2.5 \times 10^{-7}M$ 。

1.4 方法

1.4.1 药血清的制备 大鼠禁食6h后,以成人0.46g/kg.wt.为参考浓度灌胃,分别于首次给药(1t)后1h(1t-1h)、2h(1t-2h)、2次重复给药(2t)后1h(2t-1h)、2h(2t-2h)、3h

(2t-3h), 无菌条件下下腔静脉取血, 1700rpm, 15min, 离心分离血清; 以肝细胞增殖率为参考指标, 筛选最适作用时相, 同法制备生理盐水对照、0.046、0.23、0.46、1.38g/kg. wt. 剂量灌胃后的药物血清, 56 C 30min 灭活, 以除去可能存在的生物活性物质对实验结果的影响。以 199 培养液(不含 FCS)作 1:1 稀释, -30 C 冻存, 用时 4 C 融化, 每皿加 300 μ l, 细胞培养液中血清含量为 5%。

1.4.2 肝细胞分离培养 参照中村敏一氏^[4]方法改进。用 0.05% 胶原酶原位灌流肝脏, 常规制备肝细胞悬液, 以无钙 Hank's 液洗涤细胞 3 次, 经 49.2% Ficol 梯度离心得精制肝细胞, 细胞得率在 10⁸cells/个肝脏以上, 台盼兰染色显示细胞活力大于 85%, 以 MEM 培养液洗细胞 3 次, 弃上清, 以 5% FCS 199(含 Insulin、Dexamethasone、L-glutamin、双抗各 10⁻⁸M) 悬浮肝细胞, 镜下计数, 调细胞浓度至 5 \times 10⁵cells/ml, 接种 3ml/皿。细胞鉴定依据相差显微镜下肝细胞呈扁平多角形, 大多数细胞连接, 低倍镜观察肝细胞呈索状排列。

1.4.3 CC1₄ 体外肝细胞损伤模型的制作^[5]

原代培养的正常大鼠肝细胞经 5% FCS 199 培养 48h 以上, 置培养皿于一密闭塑料盒内, 盒内置入 CC1₄0.4ml/L 容积, 37 C 60min, 造成体外肝细胞损伤的模型, 后转入正常培养。

1.4.4 细胞增殖率测定^[6] 正常大鼠肝细胞经 5%FCS 199 培养液培养 48h, 换无 FCS 199, 加不同时相或剂量药物血清, 培养 48h, 换无 FCS 199, 加³H-TdR 6 μ ci/皿, 续培养 24h, 收集细胞, 固相膜片法测定 CPM 值, 按下式计算增殖率(%)。

$$\text{细胞增殖率}(\%) = \frac{\text{药物组 CPM} - \text{对照组 CPM}}{\text{对照组 CPM}} \times 100$$

1.4.5 肝细胞胶原生成率测定^[7] 培养肝细胞经 5%FCS 199 培养 48h, 换无 FCS 199, 加药培养 48h, 分别收集上清液和细胞

层样本, 25mM TBS 透析至透析液中不含放射性, 各取 100 μ l 测定总 CPM(CPM_t), 另取 200 μ l, 加 100u/ml 纯化胶原酶 100 μ l 消化, 三氯醋酸沉淀, 离心后取 400 μ l 上清测胶原酶敏感蛋白质 CPM(CPM_c), 同设空白对照(以 Tris-HCl 代替胶原酶), 计数 CPM_b, 按下式计算培养上清液(细胞外)与细胞层样本(细胞内)中胶原在³H-Proline 掺入总蛋白中的相对含量及胶原生成抑制率。

$$\text{胶原}(\%) = \frac{100}{5.4 \times \frac{\text{CPM}_t - \text{CPM}_c}{\text{CPM}_c - \text{CPM}_b} + 1}$$

$$\text{生成抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组胶原} - \text{药物组胶原}}{\text{对照组胶原}} \times 100$$

1.4.6 统计方法均采用双侧 t 检验。

2 结果

2.1 不同时相药物血清对肝细胞增殖率的影响 大鼠正常及药物血清对原代培养肝细胞无明显的毒性作用, 细胞生长良好, 形态正常, 不同时相药物血清均能促进肝细胞增殖, 尤以 2t-1h 组的效果显著, 结果见表 1。

表 1 不同时相药物血清对肝细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	N	cpm/(1.5 \times 10 ⁶ cells)	增殖率(%)
对照血清组	4	30525.2 \pm 8518.6	
1t-1h 血清组	4	36060.7 \pm 5334.4	18.13
1t-2h 血清组	4	31812.6 \pm 5509.1	4.21
2t-1h 血清组	4	45290.5 \pm 6170.3*	48.37
2t-2h 血清组	4	37321.3 \pm 2354.4	22.26
2t-3h 血清组	4	39388.6 \pm 4494.2	29.04

注: 与对照血清组比较, *P<0.05

2.2 不同剂量药物血清对肝细胞增殖率的影响 在一定剂量范围内(0.046~0.46g/kg. wt.) 呈较好的量效关系, 1.38gt/kg. wt. 组则呈现一定的抑制作用, 结果见表 2。

表 2 不同剂量药物血清对肝细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	N	cpm/(1.5 \times 10 ⁶ cells)	增殖率(%)
对照血清组	4	31037.3 \pm 3502.9	
0.046g/kg 组	4	32706.3 \pm 4080.6	5.38
0.23g/kg 组	4	37896.0 \pm 842.8*	22.10
0.46g/kg 组	4	45459.8 \pm 5958.2*#	46.47
1.38g/kg 组	4	25076.0 \pm 8088.9	-19.21

注: 与对照血清组比较 *P<0.01,

与 0.23g/kg 组比较 #P<0.05

2.3 对 CCl₄ 体外损伤肝细胞增殖率的影响 以 CCl₄ 蒸汽法损伤培养中的肝细胞 60min 后,可见到部分肝细胞发生退缩,胞膜粗糙,细胞肿胀,说明肝细胞损伤严重,其增殖率的变化见表 3。

由表 1、2 可知,2t-1h 0.46g/kg.wt. 组药物血清促肝细胞增殖效果优于其它各组,故以 0.46g/kg.wt.、2t-1h 药物血清为下列实验用血清,并以秋水仙碱作为阳性对照药物。

2.4 对 CCl₄ 体外损伤肝细胞培养上清液

表 4 CCl₄ 损伤肝细胞培养上清液中 ALT、AST 活性的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	N	ALT 活性(u/L)		AST 活性(u/L)	
		24h	48h	24h	48h
正常肝细胞+对照血清	4	24.05±8.52	29.62±1.96	27.54±5.58	21.39±2.64
损伤肝细胞+对照血清	4	95.10±10.05*	102.14±7.95*	77.77±4.39*	75.06±10.06*
损伤肝细胞+药物血清	4	87.10±10.24	46.23±2.94#	70.73±12.07	47.30±6.35#
损伤肝细胞+秋水仙碱	4	92.88±6.26*	97.33±5.38*	69.50±6.62*	82.87±6.87*

注:与正常肝细胞+对照血清组比较 *P<0.001 与损伤肝细胞+对照血清组比较 #P<0.01

2.5 对正常及 CCl₄ 损伤肝细胞胶原生成率的影响 以 2t-1h 0.46g/kg.wt. 药物血清为实验用血清,秋水仙碱为对照用药物,观察

ALT、AST 活性的影响 以 ALT、AST 活性的变化观察扶正化癆方药物血清对 CCl₄ 损伤肝细胞的保护作用也取得了较好的效果,结果见表 4。

表 3 CCl₄ 损伤肝细胞增殖率的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	N	cpm/(1.5×10 ⁶ cells)	增殖率(%)
正常肝细胞+对照血清	4	31037.78±3502.98	
损伤肝细胞+对照血清	4	25050.75±4600.22#	-19.29
损伤肝细胞+药物血清	4	41924.13±1791.35*	67.36

注:与正常肝细胞+对照血清组比较 *P<0.05

与损伤肝细胞+对照血清组比较 #P<0.001

其对正常培养肝细胞及 CCl₄ 损伤肝细胞胶原生成率的影响,结果见表 5。

表 5 正常及损伤肝细胞胶原生成率的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞内		细胞外		
	胶原/总蛋白	抑制率(%)	胶原/总蛋白	抑制率(%)	
正常肝细胞	对照血清	0.313±0.089	0.305±0.018		
	药物血清	0.335±0.054	0.229±0.018#	24.92	
	秋水仙碱	0.385±0.022	-23.00	0.024±0.008	92.13
损伤肝细胞	对照血清	0.443±0.075#		0.449±0.041##	
	药物血清	0.374±0.064	15.58	0.243±0.032*	45.88
	秋水仙碱	0.512±0.049 [△]	-15.58	0.163±0.033*	63.37

注:与正常肝细胞对照血清组比较 #P<0.05; ##P<0.01 与损伤肝细胞对照血清组比较 *P<0.001

与损伤肝细胞药物血清组比较 [△]P<0.05 n=4

3 讨论

长期以来,由于中药复方所含成分的复杂性使抗肝纤维化有效复方的体外研究受到限制,难以进行深入的药理机制的研究。1984年,日本学者提出了给整体动物灌服中药一定时间后,取其血清进行实验的药理学新方法,即血清药理学方法^[8]。在传统的体外实验中,实验药物直接接触细胞或器官,中药粗制剂的杂质成分,各种电解质及鞣质成分,不同酸碱度的影响等,都会对实验结果造成一定

影响。而血清药理学方法,可以排除上述干扰因素,比较接近药物在体内环境中产生药理效应的真实过程。此外,中药复方原有的部分成分可能从胃肠吸收或经体内吸收代谢后失活,或机体在药物作用下产生的生物反应物质,这一方法所获得的实验结果可在一定程度上反映出来。

既往研究证实,扶正化癆方具有显著的保护肝细胞作用。我们的研究表明,不同时相的扶正化癆方药物血清具有促进正常肝

细胞增殖的功能,两次给药后血清效果优于一次给药,尤以 2t-1h 血清组最为显著。不同剂量药物血清在一定范围内(0.046g/kg~0.46g/kg.wt.)促肝细胞增殖作用呈较好的量效关系,0.23 和 0.46g/kg.wt. 组均能显著促进肝细胞增殖,尤以 0.46g/kg.wt. 组效果最好,而高浓度(1.38g/kg.wt. 组)则呈现一定的抑制作用,这其中的原因有待进一步研究。

CCl₄ 蒸汽法处理培养肝细胞后,可见部分肝细胞退缩,胞膜粗糙,细胞肿胀,上清液中 ALT、AST 在培养 24h 即显著增高,至 48h ALT 仍高于正常培养的肝细胞,扶正化癥方能有效地降低 CCl₄ 损伤肝细胞 ALT、AST 活性。

抗肝纤维化的治疗除病因治疗外,干扰肝纤维化胶原代谢不同环节的研究是一热点,在目前研究的药物中,秋水仙碱主要作用于细胞的微管系统,抑制前胶原向细胞外分泌,还能增加胶原酶的活性促进胶原降解^[9]。本文的研究结果与之相符,经秋水仙碱处理的正常肝细胞,其细胞胶原含量为正常的 1.23 倍,而细胞外胶原含量仅为正常的 1/13。扶正化癥方药物血清能明显降低细胞外胶原生成率,其细胞内胶原含量也接近正常水平,不似秋水仙碱组增加显著。CCl₄ 损伤肝细胞细胞内外胶原生成率较正常肝细胞均明显增高,胶原总生成率为正常肝细胞的 1.44 倍,药物血清能抑制细胞内胶原生成

率,抑制率为 15.58%,对细胞外胶原的作用更为明显,抑制率高达 45.88%;秋水仙碱则明显抑制细胞内胶原向细胞外分泌,其细胞外胶原虽处于较低水平,细胞内胶原生成率却显著高于药物组。上述实验结果提示除了该方抑制细胞内胶原的分泌外,还可能与促进细胞内外新生胶原的降解有关。结果显示,扶正化癥方既能促进肝细胞增殖,又可显著地抑制细胞胶原生成率,这在一定程度上体现了该方扶正与化癥的双重作用。

参考文献

- [1]钱绍诚. 中华消化杂志 1995;15(5): 251
- [2]刘平,刘成,胡义杨等. 肝脏病杂志 1994;2(2): 75
- [3]胡义杨,刘平,刘成等. 中国中西医结合杂志 1993;13(特集): 196
- [4]中村敏一. 初代培养肝细胞实验法. 东京:学会出版セソタ-,1986: 3
- [5]Cathering J, Watherfield. Biochem Pharmacol 1993;4(9): 589
- [6]叶维新,陈恺,孝延龄. 实验核医学. 吉林科技出版社. 第一版,1990: 38
- [7]Greet A, Phillips JO, Vroman B, et al. Hepatology 1989;9: 59
- [8]Iliroko Iwanca, Sakae Amagaya and Yukio Ogi-hara. J Ethnopharmacol 1987;211: 45
- [9]Kershenobich O, et al. N Engl J Med 1988;318: 1709

(收稿:1996-07-04)