

加味茵陈四逆汤含药血清对 TGF- β_1 干预的大鼠肝星状细胞 TGF- β_1 /Smads 通道及胶原蛋白的影响

邱建利^{1,2}, 柴玉娜², 李悦², 杨海蝶³, 李洁², 许华^{4*}

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000; 2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405;
3. 佛山市中医院, 佛山 528000; 4. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] 目的:探讨加味茵陈四逆汤含药血清对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 干预的大鼠肝星状细胞 TGF- β_1 /Smad 通道相关蛋白及胶原蛋白 3 (Collagen3) 生成量的影响。方法:以大鼠肝星状细胞 HSC-T6 为研究对象,将细胞分为空白组,模型组,阳性药物组(甲强龙,10%含药血清),加味茵陈四逆汤高、中、低剂量组(10%含药血清),共 6 组。除空白组外,其余均给予 TGF- β_1 (10 g·L⁻¹) 并采用相应 10% 的含药血清培养,并采用蛋白质免疫印迹 (Western blot) 的方法检测各研究组含药血清对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 Smad3, Smad7, Collagen3 蛋白表达的影响。结果:与空白组比较,模型组 HSC-T6 细胞 Smad3, Smad7, Collagen3 蛋白表达升高, Collagen3 蛋白表达升高较为明显 ($P < 0.05$); 与模型组比较,加味茵陈四逆汤低剂量明显降低 Smad3 蛋白表达 ($P < 0.05$), 加味茵陈四逆汤中剂量明显降低 Collagen3 蛋白表达 ($P < 0.05$)。结论:加味茵陈四逆汤含药血清使 Smad3, Collagen3 蛋白表达下调, Smad7 未见明显变化,提示本药在离体条件下可以延缓肝纤维化的进程。

[关键词] 加味茵陈四逆汤; 含药血清; 肝星状细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0142-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130142

Effect of Drug Serum of Modified Yinchen Sini Tang on TGF- β_1 /Smads Signaling Pathways and Collagen of TGF- β_1 -induced Rat Hepatic Stellate Cells

QIU Jian-li^{1,2}, CHAI Yu-na², LI Yue², YANG Hai-die³, LI Jie², XU Hua^{4*}

(1. *Affiliated First Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;*
2. *First School of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;*
3. *Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Foshan 528000, China;*
4. *Affiliated First Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of drug serum of modified Yinchen Sini Tang on transforming growth factor (TGF)- β_1 /Smads signaling pathways and Collagen3 of TGF- β_1 -induced rat hepatic stellate cells (HSC). **Method:** With rat hepatic stellate cells as the study objects, the cells were divided into blank group, model group, positive drug group (methylprednisolone, 10% drug serum), modified Yinchen Sini Tang high dose, middle dose and low dose groups (10% drug serum). All the other rats except those in blank group were given with TGF- β_1 (10 g·L⁻¹) and corresponding 10% drug serum culture was used, the effects of the drug serum on protein expression levels of Smad3, Smad7, Collagen3 in HSC-T6 cells were detected by using Western blot assay. **Result:** As compared with the blank group, protein expression levels of Smad3, Smad7, Collagen3 in HSC-T6 cells were increased in model group, and the increase of Collagen3 expression was more obvious ($P < 0.05$). As compared with the model group, the protein expression level of Smad3 was significantly decreased in modified Yinchen Sini Tang low dose group ($P < 0.05$), the protein expression level of Collagen3 was

[收稿日期] 20150805(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373686);广东省教育厅科研创新项目(2013KJCX0049)

[第一作者] 邱建利,博士,从事小儿脾胃病研究, Tel:13580494226, E-mail: qujianli@126.com

[通讯作者] *许华,博士,教授,从事小儿脾胃病研究, Tel:020-36591367, E-mail: xuhua212@126.com

significantly decreased in modified Yinchen Sini Tang middle dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Drug serum of modified Yinchen Sini Tang could down-regulate the protein expression levels of Smad3 and Collagen3, while there was no significant change in Smad7, suggesting that the drug can delay the process of liver fibrosis under the *in vitro* conditions.

[**Key words**] modified Yinchen Sini Tang; drug serum; hepatic stellate cells

茵陈四逆汤是经临床验证治疗黄疸有效的中药复方,而川芎是公认的活血化瘀的有效中药,现代药理研究其主要成分川芎嗪在肝纤维化发生过程中可以促进细胞外基质的降解,减少其沉积,从而延缓肝纤维化的发生^[1]。本课题组前期临床实践发现,在经典方茵陈四逆汤的基础上增加川芎可以有效延缓小儿胆道闭锁致肝纤维化的进程,明显改善患儿的生存质量^[2]。有研究表明转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 是作用明确的早期致纤维化的细胞因子,其作用途径是多方面的,如蛋白磷酸酶 2A 保护肝细胞,延缓肝纤维化的作用可能与 TGF- β_1 /Smads 通道有关;血清 TGF- β_1 , -509 CT 和肝纤维化及肝硬化关系密切,其作用机制也可能与 TGF- β_1 /Smads 通道有关^[3-5]。而现代药理学研究中药复方对细胞分子水平的影响是采用含药血清替代传统的中药煎剂或粗提物进行的,可在一定程度上避免直接添加药物引起的各种弊端,在方法学上其可信性和科学性更强。肝星状细胞(HSCs)活化是肝纤维化形成的细胞学基础。本研究即采用肝星状细胞细胞株 T6 (HSC-T6) 为研究对象,在给予外源性细胞因子 TGF- β_1 的刺激下,观察加味茵陈四逆汤含药血清对 TGF- β /Smads 通道中主要蛋白量的变化,探讨加味茵陈四逆汤延缓肝纤维化的可能的细胞分子水平的机制,以期对临床实践提供前期的实验基础。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,体重 260 ~ 300 g,60 只。由广东省医学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(粤)2013-0002。于广州中医药大学实验动物中心 SPF 级环境中饲养,实验动物中心许可证号 SYXK(粤)2013-0001。适应性饲养 1 周,实验中心温度维持在 18 ~ 25 °C 左右。

1.2 药物及试剂 加味茵陈四逆汤组方为茵陈、制附片、干姜、炙甘草、川芎组成,各药材均购于广州中医药大学第一附属医院,经鉴定均符合中华人民共和国药典标准。以上药物经加水浸泡、常规煎煮、过滤及水浴蒸发制成每毫升含 1 g 生药的水煎液(质量分数 100%),高温灭菌后 4 °C 冰箱保存备用。HSC-T6 细胞株为永生化大鼠肝星状细胞,购自江苏

博慧斯生物科技有限公司。胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司,批号 1365340),细胞计数试剂盒(CCK-8)试剂盒(日本同仁化学生产,批号 CK04),一抗:Smad3 (EP568Y),Smad7 (EPR622),胶原蛋白 3 (Collagen3) 抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab40854,ab124890,ab7778),二抗:兔抗和鼠抗(美国 CST 公司,批号分别为 CST58802,CST7071)。

1.3 仪器 BBD 6220 型 CO₂ 培养箱(美国 Precision Scientific 公司),CAM-1000 型超净工作台和 IX71-F22FL 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司),XDS-1B 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂),752 型分光光度计(上海光谱仪器厂),PowerPac 型电泳仪和 Chemi DocTMXRS + 型显影系统(美国 Bio-Rad 公司),multiskan 型酶标仪(美国 Thermo 公司),DL-5M 型低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 60 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 3 组,分别为正常组,茵陈四逆汤高剂量组,阳性药物组,药物给药剂量参照文献“药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算”^[6],其中茵陈四逆汤给予正常剂量的 2 倍制备高剂量含药血清,使用时采用空白血清稀释;正常组给予与茵陈四逆汤相同体积的蒸馏水 ig,阳性药甲强龙组给予正常剂量;连续 3 d,每天给予 2 次灌服,第 4 天早晨给予 1 次剂量灌服,1 h 后腹主动脉取血,4 °C,3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,将同组大鼠离心所得血清混合,56 °C 水浴灭活 30 min,最后用 0.22 μ m 的针头过滤器过滤除菌,分装后 -20 °C 保存备用。临用前用空白大鼠血清将中药血清稀释为中、低剂量使用。

2.2 细胞培养 将冷冻保存于 -80 °C 冰箱中 HSC-T6 细胞复苏后接种于含 10% FBS,100 IU·mL⁻¹ 青霉素,100 mg·L⁻¹ 链霉素,4 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺完全培养基中,37 °C 5% CO₂ 条件下培养。当细胞生长至单层 95% 融合时,0.25% 胰蛋白酶消化后传代,24 h 换液,72 h 再次传代。将 HSC 接种于 25 cm² 培养瓶中,24 h 细胞贴壁生长后,更换培养基,正常组(含 10% 正常大鼠血清 DMEM 培养液 5

mL),模型组(含 10% 正常大鼠血清 DMEM 培养液 5 mL),阳性药物组(含 10% 正常大鼠阳性药血清 DMEM 培养液 5 mL),加味茵陈四逆汤大鼠血清高剂量组(含 10% 大鼠高剂量血清 DMEM 培养液 5 mL),中剂量组(含 10% 大鼠中剂量血清 DMEM 培养液 5 mL)、低剂量组(含 10% 大鼠低剂量血清 DMEM 培养液 5 mL),除正常组外,其余各组分别加入 $TGF-\beta_1$ (终质量浓度 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),将各组细胞置于 5% CO_2 培养箱培养 48 h。培养结束后用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 遍,弃去 PBS,用处理过的细胞刮刀刮取细胞,并转移至 1.5 mL 离心管中,4 $^\circ\text{C}$,4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min 弃上清。

2.3 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 Smad3, Smad7, Collagen3 蛋白表达 取收集好的细胞(细胞数 1×10^5 个/mL),加 800 μL 预冷的蛋白裂解液(包含蛋白酶抑制剂),反复吹打,冰上震荡,裂解细胞,冰上静置半小时。于 4 $^\circ\text{C}$ 条件下 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min。离心完毕吸取上清液转移至一新的 1.5 mL 离心管中,即为蛋白粗提取液(所获蛋白提取液保存于 -20 $^\circ\text{C}$ 用于后续实验)。取上清用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。取相同质量的蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,PBS 配制含 50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉室温封闭 2 h,洗膜 3 次,每次 10 min,一抗用一抗稀释液 1:1 000 稀释,4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜(或至少 8 h);一抗孵育完成后,取出膜,摇床上洗膜缓冲液(TBST)洗脱 3 次,每次 5 min;二抗用 5% 脱脂牛奶 1:10 000 稀释,摇床上室温孵育 1 h。摇床上 TBST 洗脱,室温 3 次,每次 10 min。洗膜后显色,凝胶成像分析系统扫描分析,以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参照,以相应蛋白灰度结果与 β -actin 的比值作为相对表达量进行统计分析。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行处理,所有实验数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料间比较运用 t 检验,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 $TGF-\beta_1$ 诱导的 HSC-T6 细胞 Smad3 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 Smad3 蛋白表达略微升高,但无统计学差异;与模型组比较,加味茵陈四逆汤低剂量明显降低 Smad3 蛋白表达($P<0.05$)。见图 1。

3.2 对 $TGF-\beta_1$ 诱导的 HSC-T6 细胞 Smad7 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 Smad7 蛋白表达略微升高,但无统计学差异;与模型组比较,加味茵

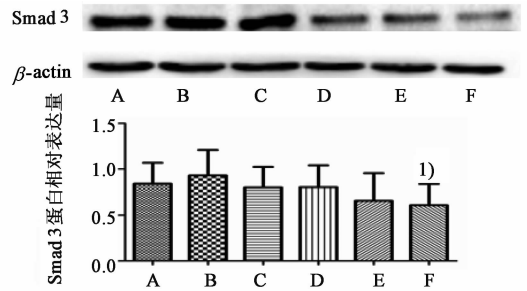


图 1 加味茵陈四逆汤对 $TGF-\beta_1$ 诱导的 HSC-T6 细胞 Smad3 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig.1 Effects of modified Yinchen Sini Tang on expression of Smad3 protein in HSC-T6 cells induced by $TGF-\beta_1$ ($\bar{x}\pm s, n=6$)

陈四逆汤高、中、低剂量略微降低 Smad7 蛋白表达,但无统计学差异。见图 2。

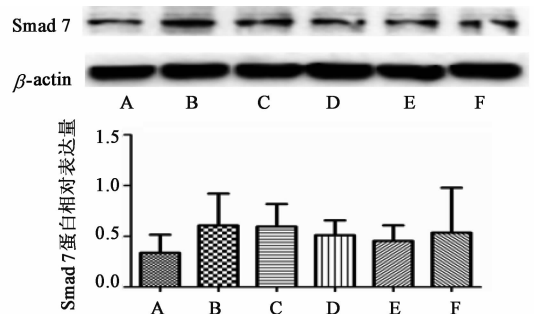


图 2 加味茵陈四逆汤对 $TGF-\beta_1$ 诱导的 HSC-T6 细胞 Smad7 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig.2 Effects of modified Yinchen Sini Tang on expression of Smad7 protein in HSC-T6 cells induced by $TGF-\beta_1$ ($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.3 对 $TGF-\beta_1$ 诱导的 HSC-T6 细胞 Collagen3 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 Collagen3 蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,加味茵陈四逆汤中、低剂量明显降低 Collagen3 蛋白表达($P<0.05$)。见图 3。

4 讨论

肝纤维化是多种病因引起的慢性肝损伤进行性发展所致的病理改变,主要表现为肝细胞外纤维增生和分解不平衡,纤维结缔组织过度异常地增生沉积,并进一步影响肝脏功能,是慢性肝病向肝硬化及终末期肝病发展的必经阶段。肝损伤时,HSCs 受到枯否细胞及其他细胞通过自分泌或旁分泌的方式产生大量的 $TGF-\beta_1$,而 $TGF-\beta_1$ 在慢性肝脏炎症反应导致肝纤维化的发生过程中起到关键的调节作

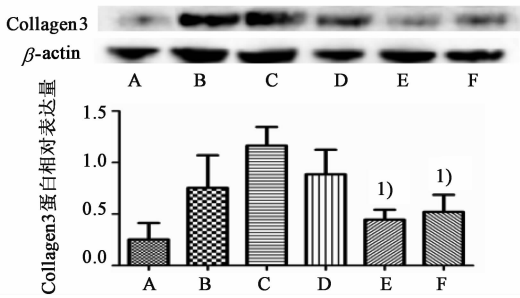


图 3 加味茵陈四逆汤对 TGF- β_1 诱导的 HSC-T6 细胞 Collagen3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of modified Yinchen Sini Tang on expression of Collagen3 protein in HSC-T6 cells induced by TGF- β_1 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

用^[7],其导致 HSCs 的活化,并形成逐级放大效应,这不仅是各种病因导致肝纤维化的途径,而且还是肝纤维化形成的细胞学基础^[8]。在 TGF- β /Smad 信号通路中,激活的 T β RI 作为起点信号传导 Smad3。当 Smad3 激活的 T β RI 在羧基端 SXS 位点磷酸化后形成 pSmad3C,和 Smad4 形成复合物。然后该复合物转位到细胞核,和其他的调节因子共同调节靶基因的表达。这个通路同时也被几个负反馈通路调节。尤其是 Smad7 可以和活化的 T β RI 稳定结合抑制 TGF- β 介导的 Smad2 和 Smad3 羧基端的磷酸化^[9-10]。

目前有研究表明,中药因其具有作用靶点多、作用途径广泛的特点,且具有免疫调节、抗炎、抗氧化、调节胶原蛋白的代谢,可抑制 HSC 的活性等多种功效可有效逆转早期肝纤维化并延缓肝硬化发生^[11]。相关文献报道茵陈蒿汤可以显著降低纤维化相关细胞因子的 mRNA 及蛋白表达,抑制 MMP-2 活性^[12];川芎的主要成分川芎嗪在肝纤维化发生的过程中不仅能减少肝细胞的氧化应激,还能减少 TGF- β 的分泌抑制肝细胞的凋亡,并部分阻断 TGF- β 抑制肝细胞的增殖作用;因目前尚缺乏公认的疗效确切的抗纤维化的阳性药物,本研究采用临床应用广泛的抑制炎症的甲强龙为阳性药,具有一定的可比性和较强的说服力。

本研究结果表明,加味四逆汤含药血清低剂量可抑制 Smad3 相对表达量,虽然中剂量在抑制 Smad3 方面与模型组在统计学上无显著差异,但是相对表达量也明显降低;在抑制胶原蛋白方面的研究,低、中剂量也都明显抑制了胶原蛋白的相对生成量,这可能与样本量相关,后续研究中将增加样本量;基于理论上 TGF- β /Smads 通道中 Smad3 的正性调节通道的激活可促进肝纤维化的发生,笔者可以

推测加味茵陈四逆汤在临床中延缓肝纤维化的发生可能也是通过下调 Smad3 的表达起作用,然而笔者的结论中 Smad7 在中药含药血清的干预下和模型组相比未见明显的变化,但 Collagen3 的表达较模型组有显著下降,笔者推测在本药抑制肝纤维化的机制中可能还有其他的机制参与,这需要笔者进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Zhang X, Zhang F, Kong D, et al. Tetramethylpyrazine inhibits angiotensin II-induced activation of hepatic stellate cells associated with interference of platelet-derived growth factor b receptor pathways[J]. FEBS J, 2014, 281(12): 2754-2768.
- [2] 赖东兰,许华,刘钧澄,等. 川芎嗪合中药治疗胆道闭锁 Kasai 术后临床观察[J]. 新中医, 2013, 45(2): 61-64.
- [3] Cong M, Iwaisako K, Jiang C, et al. Cell signals influencing hepatic fibrosis [J]. Int J Hepatol, 2012, doi:10.1155/2012/158547.
- [4] Lu N, Liu Y, Tang A, et al. Hepatocyte-specific ablation of PP2A catalytic subunit α attenuates liver fibrosis progression via TGF- β_1 /Smad signaling [J]. Biomed Res Int, 2015, doi: 10.1155/2015/794862.
- [5] Mohy A, Fouad A. Role of transforming growth factor- β_1 in serum and-509 C > T promoter gene polymorphism in development of liver cirrhosis in Egyptian patients [J]. Meta Gene, 2014, 9(2): 631-637.
- [6] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学和治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [7] Dooley S, Ten Dijke P. TGF-beta in progression of liver disease [J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1): 245-256.
- [8] 陈桂敏,梁振钰,高媛. 芪苓抗纤方及拆方药物血清对 HSC-T6 增殖及 TGF- β_1 mRNA 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 249-251.
- [9] Nakao A, Afrakhte M, Moren A, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling [J]. Nature, 1997, 389(6651): 631-635.
- [10] Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling [J]. Cell, 1997, 89(7): 1165-1173.
- [11] Feng Y, Cheung K F, Wang N, et al. Chinese medicines as a resource for liver fibrosis treatment [J]. Chin Med, 2009, doi: 10.1186/1749-8546-4-16.
- [12] 徐国萍,白娟,舒静娜,等. 茵陈蒿汤的药理研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2011, 21(1): 64-67.

[责任编辑 周冰冰]