

排钱草总生物碱对人肝星状细胞增殖 及肝纤维化相关胶原蛋白、细胞因子的影响

黄洁玲¹, 钟鸣^{2*}, 余胜民²

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西壮族自治区民族医药研究院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 观察排钱草总生物碱对人肝星状细胞系 Lx-2 增殖及分泌肝纤维化相关胶原、细胞因子的影响。方法: Lx-2 细胞调整细胞密度为 1.0×10^5 个/mL, 以 0.1 mL/孔接种于 37 °C 培养, 设空白对照组, 排钱草总生物碱 100, 75, 55, 40, 30, 20, 15, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 给药 48 h 后, 采用噻唑蓝 (MTT) 法检测 Lx-2 细胞增殖; Lx-2 细胞调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 以 0.1 mL/孔接种于 37 °C 培养, 设空白对照及秋水仙碱 ($6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 排钱草总生物碱 40, 20, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, 给药 48 h 后, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 法检测 Lx-2 细胞上清液 I 型胶原 (COL I)、III 型胶原 (COL III)、IV 型胶原 (COL IV) 和转化生长因子 β_1 ($\text{TGF} \beta_1$)、血小板衍生生长因子 (PDGF) 含量。结果: 与对照比较, 排钱草总生物碱在质量浓度为 100, 75, 55, 40, 30, 20, 15, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 能够浓度依赖性的抑制 Lx-2 细胞增殖, 抑制率分别为 49.4%, 25.9%, 24.7%, 15.3%, 15.3%, 12.9%, 2.35%, 1.18%; 与对照相比, 排钱草总生物碱 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 能显著抑制 COL I, COL III, COL IV 和 $\text{TGF} \beta_1$, PDGF 的分泌 ($P < 0.05$ 或者 $P < 0.01$)。结论: 排钱草总生物碱对 Lx-2 细胞的增殖和 COL I, COL III, COL IV, $\text{TGF} \beta_1$, PDGF 的分泌有抑制作用。

[关键词] Lx-2; 排钱草总生物碱; 增殖; 胶原; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0283-04

[doi] 10.11653/syfy2013130283

Effects of Total Alkaloids from *Phyllodium pulchellum* on Proliferation of Human Hepatic Stellate Cells and Collagen, Cytokines Related to Hepatic Fibrosis

HUANG Jie-ling¹, ZHONG Ming^{2*}, YU Sheng-min²

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Thnopharmacy Research Institute, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of total alkaloids from *Phyllodium pulchellum* on proliferation of human hepatic stellate cell line Lx-2 and the impact on secretion of collagen and cytokines which are related to liver fibrosis. **Method:** After recovery, Lx-2 cells in logarithmic growth were diluted to a concentration of 1×10^5 /mL, and inoculated 0.1 mL in hole in incubator at 37 °C, blank control group was set up, the concentration of the drug administered in an order of 100, 75, 55, 40, 30, 20, 15, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. After 48 h of administration, MTT assay was used to detect cell proliferation. Similarly, after recovery, Lx-2 cells in logarithmic growth were diluted to a concentration of 1×10^5 /mL, and inoculated 0.1 mL/hole in incubator at 37 °C, blank control group and Colchicine group ($6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) were set up. After 48 h of administration, ELISA method was used to detect Lx-2 cell supernatant for type I collagen (COL I), type III collagen (COL III), type IV collagen (COL IV), transforming growth factor β_1 ($\text{TGF} \beta_1$) and platelet-derived growth factor (PDGF) content. **Result:** Compared with the control group, Lx-2 cell proliferation was inhibited by the total alkaloids in a concentration-dependent manner with inhibition rates of 49.4%, 25.9%, 24.7%, 15.3%, 15.3%, 12.9%, 2.35% and 1.18%

[收稿日期] 20120927(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160559)

[第一作者] 黄洁玲, 硕士在读, 从事壮药药效学研究, Tel:15994352152, E-mail: zhengshuiwuxiang22@163.com

[通讯作者] * 钟鸣, 研究员, 从事壮药药效学研究, Tel:13707881236, E-mail: gxmymzm@163.com

accordingly. Compared with the control group, the total alkaloids of $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ could significantly inhibit COL I, COL III, COL IV, TGF- β_1 and PDGF secretion ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** The total alkaloids from *P. pulchellum* can inhibit the proliferation of Lx-2 cells and the secretion of COL I, COL III, COL IV, TGF- β_1 and PDGF.

[**Key words**] Lx-2; total alkaloids from *Phyllodium pulchellum*; proliferation; collagen; cytokines

排钱草为广西民间常用草药,全草含生物碱、酚类、有机酸和氨基酸等成分^[1]。已有研究表明排钱草总生物碱具有减少由 CCl_4 造成的大鼠肝细胞变性坏死及减轻肝纤维化程度的作用^[2],并能显著降低猪血清所致免疫性肝纤维化大鼠肝脏 I 型胶原 (COL I)、III 型胶原 (COL III)、IV 型胶原 (COL IV) 及转化生长因子 β_1 (TGF β_1) 的表达^[3] 以及 COL I, COL III 的 mRNA 表达^[4]。本实验旨在通过体外实验研究排钱草总生物碱对人肝星状细胞增殖以及对其分泌胶原、细胞因子的影响。

1 材料

1.1 细胞 人肝星状细胞系 Lx-2 细胞购自中南大学湘雅医学院细胞库。

1.2 试剂 高糖 DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司, 批号 1079887), 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 1069982), 0.25% 胰酶 (美国 HyClone 公司, 批号 SH30042.01), 二甲基亚砜 (DMSO, 北京索莱宝科技有限公司, 批号 302A033), MTT (美国 Sigma 公司, 批号 18180), Human Col I ELISA Kit (批号 CK-E10382H), Human Col III ELISA Kit (批号 CK-E10386H), Human Col IV ELISA Kit (批号 CK-E10385H)、Human TGF β_1 ELISA Kit (批号 CK-E10113H), Human PDGF ELISA Kit 批号 CK-E11527H (均为美国 R&D Systems 公司)。

1.3 药物 排钱草样品,由广西壮族自治区民族医院研究院戴斌主任药师鉴定为豆科植物排钱草 *Phyllodium pulchellum* (L.) Desv. 的根,排钱草总生物碱由大连医科大学提供。

1.4 仪器 311 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo Forma 公司), DMIRB-Leica 型光学倒置显微镜 (德国 Leica 公司), ELX-800 型酶标仪 (美国 Bio Tek), TB-215 型丹佛精密天平 (德国赛多利斯公司), ZDX-3SB 型座式自动电热压力蒸气灭菌器 (上海申安医疗器械厂), 80-Z 型台式离心机 (上海手术器械厂), DLE560 型超净工作台 (荷兰 Clean Air)。

2 方法

2.1 MTT 法检测 Lx-2 细胞增殖 取对数生长期

Lx-2 细胞,以 0.25% 胰酶消化,用完全培养液混悬细胞,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔板,每孔 100 μL 。在 37°C , 5% CO_2 培养箱预培养 24 h 后,轻轻吸弃培养孔中的培养液,分别加入终质量浓度为 100, 75, 55, 40, 30, 20, 15, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 排钱草总生物碱的含药培养液,并设空白对照 (不含药物完全培养液),每个质量浓度设 4 个复孔,培养 48 h 后,各孔加入 10 μL MTT 溶液,置 37°C , 5% CO_2 培养箱内孵育,4 h 后吸弃培养孔中的培养液,加 DMSO 0.1 mL/孔,于水平摇床上摇 10 min 待颗粒完全溶解,于酶标仪 570 nm 处测各孔吸光度 (A),取各组平均值,计算细胞生长抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{实验组 } A_{570} / \text{对照组 } A_{570}) \times 100\%$$

根据各组的抑制率确定后续试验排钱草总生物碱适宜的给药浓度。

2.2 ELISA 法测 Lx-2 细胞上清液 COL I, COL III, COL IV 含量 根据 2.1 结果,选择排钱草总生物碱对 Lx-2 细胞抑制与对照比无显著差异的剂量 10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 用于后续实验。

取对数生长期的 Lx-2 细胞,以 0.25% 胰酶消化,用完全培养液混悬细胞,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔板,0.1 mL/孔。在 37°C , 5% CO_2 培养箱预培养 24 h 后,轻轻吸弃取培养孔中的培养液。分别加入终质量浓度 10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 排钱草总生物碱的含药培养液,并设空白 (不含药物完全培养液) 及阳性对照 (6.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙碱),每个质量浓度设 3 个复孔,培养 48 h 后,小心收集细胞上清液于 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清,按 ELISA 试剂盒说明书检测 COL I, COL III, COL IV 含量。

2.3 ELISA 法测 Lx-2 细胞上清液 TGF β_1 , PDGF 含量 细胞培养方法同 2.2。培养 48 h 后,小心收集细胞上清液于 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,按 ELISA 试剂盒操作说明书检测 TGF β_1 , PDGF 的含量。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 11.5 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 Lx-2 细胞增殖的影响 作用于 Lx-2 48 h 后,与空白对照组比较,不同剂量的排钱草总生物碱能抑制 Lx-2 细胞增殖,且其抑制作用呈浓度依赖关系,见表 1。

表 1 排钱草总生物碱对 Lx-2 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率/%
对照	-	0.85 ± 0.05	-
排钱草总生物碱	100.0	0.43 ± 0.27 ²⁾	49.4
	75.0	0.63 ± 0.09 ²⁾	25.9
	55.0	0.64 ± 0.07 ²⁾	24.7
	40.0	0.72 ± 0.13	15.3
	30.0	0.72 ± 0.15	15.3
	20.0	0.74 ± 0.10	12.9
	15.0	0.83 ± 0.07	2.35
	10.0	0.84 ± 0.03	1.18

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与秋水仙碱组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

表 2 排钱草总生物碱对 Lx-2 细胞分泌 COL I, COL III,

COL IV 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	COL I	COL III	COL IV
对照	-	59.15 ± 1.44	30.63 ± 1.38	19.43 ± 0.76
排钱草总生物碱	40.0	44.94 ± 1.99 ¹⁾	26.54 ± 0.71 ¹⁾	17.25 ± 0.73 ¹⁾
	20.0	50.50 ± 1.98 ³⁾	28.93 ± 2.90	18.19 ± 0.45
	10.0	53.06 ± 3.21 ³⁾	28.44 ± 2.43	18.18 ± 1.16
秋水仙碱	6.25	43.23 ± 2.75 ¹⁾	24.64 ± 2.05 ¹⁾	13.74 ± 2.19 ¹⁾

表 3 排钱草总生物碱对 Lx-2 细胞分泌的

TGF β_1 , PDGF 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	TGF β_1	PDGF
对照	-	18.99 ± 5.15	39.01 ± 3.45
排钱草总生物碱	40.0	4.50 ± 1.98 ²⁾	19.35 ± 1.21 ¹⁾
	20.0	9.86 ± 6.35	34.56 ± 2.32 ³⁾
	10.0	14.13 ± 4.63 ³⁾	34.14 ± 3.12 ³⁾
	秋水仙碱	6.25	2.32 ± 1.16 ²⁾

4 讨论

肝纤维化是多种病因导致慢性肝损害的共同结局,肝星状细胞的激活、增殖是肝纤维化发生的中心环节^[5]。它的激活、增殖,使细胞外基质(ECM)等合成与降解失衡,肝星状细胞的大量增殖,合成以 I, III 型胶原为主的多种 ECM,在肝脏内过度沉积,改变肝脏结构,导致肝纤维化。因此,抑制肝星状细胞的增殖与胶原的分泌对肝纤维化的治疗具有重要意义。已有研究显示活血化瘀中药及其提取物对肝星状细胞分泌肝纤维化相关胶原蛋白和细胞因子有抑制作用^[6-10]。排钱草具有清热解毒、祛风行水、活

3.2 对 Lx-2 细胞分泌胶原的影响 作用于 Lx-2 细胞 48 h 后,与对照相比较,排钱草总生物碱 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 能显著抑制细胞 COL I, COL III, COL IV 的分泌($P < 0.05$),与秋水仙碱组相比无显著差别。与秋水仙碱组比较,排钱草总生物碱 20, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COL I 含量明显高于秋水仙碱组($P < 0.05$), COL III, COL IV 含量与秋水仙碱组无显著差别,见表 2。

3.3 对 Lx-2 细胞分泌 TGF β_1 , PDGF 的影响 作用于 Lx-2 细胞 48 h 后,与对照相比较,排钱草总生物碱 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与对照相比能显著抑制细胞 TGF β_1 , PDGF 的分泌($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),与秋水仙碱组相比无显著差别。排钱草总生物碱 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PDGF 含量显著高于秋水仙碱组($P < 0.05$), 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 TGF β_1 , PDGF 含量明显高于秋水仙碱组($P < 0.05$),见表 3。

血消肿的功效,为广西壮族地区临床常用药材,本研究采用排钱草所提取的总生物碱结果表明在排钱草总生物碱在 100 ~ 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对肝星状细胞的增殖具有抑制作用,且呈浓度依赖关系。时与对照相比排钱草 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 COL I, COL III, COL IV 的分泌具有显著抑制作用($P < 0.05$ 或者 $P < 0.01$),提示排钱草总生物碱在肝纤维化治疗中可能是通过降低胶原分泌量起治疗作用。

研究证实 TGF β_1 与肝星状细胞的激活关系密切^[6],是最强的肝纤维化促进因子,它可激活肝星状细胞,促进肝星状细胞合成、分泌细胞外基质,抑制细胞外基质的降解,在肝纤维化的起始和持续发展起关键作用。研究也同时表明 PDGF 具有较强促进细胞分裂和增殖的活性,是肝星状细胞最强的有丝分裂原。TGF β_1 , PDGF 是目前所知的最强大的促胶原生成因子,在肝纤维化的起始和持续发展中起关键作用^[7],因此,抑制肝星状细胞 TGF β_1 和 PDGF 的分泌对肝纤维化的治疗具有重大的意义。实验研究结果表明排钱草总生物碱对 Lx-2 细胞

宣肺化痰方标准煎剂与煮散剂药理作用对比

戴勇¹, 老昌辉¹, 魏成功¹, 黄雪君², 杜铁良², 田宁¹, 段晨霞^{1*}

(1. 广东省中西医结合医院呼吸内科, 广东 佛山 528000;

2. 广东省中医研究所, 广州 510095)

[摘要] **目的:** 对比观察宣肺化痰方标准煎剂及煮散剂的药理作用。**方法:** 大鼠分为 8 组, 分别灌入等体积蒸馏水、急支糖浆、宣肺化痰方标准煎剂高、中、低剂量(含生药 46.80, 23.40, 11.70 g·kg⁻¹)、宣肺化痰方煮散剂高、中、低剂量(含生药 23.40, 11.70, 5.85 g·kg⁻¹), 观察对小鼠毛细血管通透性的影响、对氨水致小鼠咳嗽的影响、对磷酸组胺诱发豚鼠哮喘的影响、对小鼠气管酚红排泌的影响、对慢性支气管炎大鼠超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的影响。**结果:** 宣肺化痰方标准煎剂和煮散剂均能显著降低小鼠毛细血管通透性; 延长小鼠咳嗽潜伏期和减少咳嗽次数; 延长豚鼠引喘潜伏期; 增加小鼠气管酚红排泌量; 升高慢性支气管炎大鼠血清 SOD 活性, 降低 MDA 含量。宣肺化痰方标准煎剂和煮散剂比较, 两者在同剂量组级别(高、中、低)之间作用无显著性差异。**结论:** 宣肺化痰方标准煎剂和煮散剂均有显著抗炎、止咳、平喘和化痰作用, 两者作用无显著性差异。

[关键词] 宣肺化痰方; 中药饮片; 煮散剂; 慢性支气管炎; 药效

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0286-05

[doi] 10.11653/syfj2013130286

[收稿日期] 20120808(018)

[基金项目] 广东省科技厅课题(2010B030700055)

[第一作者] 戴勇, 硕士研究生, 从事呼吸内科专业, Tel:0757-86288545, E-mail:daiyong249@sohu.com

[通讯作者] * 段晨霞, 硕士研究生, 从事呼吸内科专业, Tel:0757-86288545, E-mail:kuaipao424@sina.com

TGF β_1 , PDGF 的分泌均具有抑制作用($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 但其作用机制尚未清楚, 还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(下册)[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986; 2092.
- [2] 钟鸣, 杨增艳, 黄琳芸, 等. 排钱草总生物碱对化学损伤性肝纤维化大鼠肝脏病理及超微结构变化的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2001, 10(3): 230.
- [3] 钟鸣, 余胜民, 杨增艳, 等. 排钱草总生物碱对免疫性肝纤维化大鼠 I、III、IV 型胶原及 TGF- β_1 表达的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2005, 15(1): 38.
- [4] 钟鸣, 余胜民, 农朝赞. 排钱草总生物碱对肝纤维化大鼠 I、III 型胶原 mRNA 表达的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2003, 13(5): 272.
- [5] Bhattacharya M Babwah A V, Ferguson S S. Small GTP-binding protein-coupled receptors [J]. Biochem Soc Trans, 2004, 32(6): 1040.
- [6] 江海艳, 王春妍, 杨世忠. 化痰通络解毒法对肝纤维化大鼠血清超氧化物歧化酶、丙二醛和转化生长因

子 β_1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(6): 59.

- [7] 郑旭锐, 李长秦, 孙守才, 等. 加味四逆散对肝纤维化大鼠肝组织 IV 型胶原和 TGF- β_1 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 218.
- [8] 高湔, 陈桂敏, 梁振钰, 等. 芪松抗纤方中活血化瘀药对肝纤维化大鼠转化生长因子- β_1 及 Smad2/3 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 260.
- [9] 郝瑞春, 门九章, 李霞, 等. 雄芍汤对免疫性肝纤维化大鼠 MMP-9 和 TIMP-1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 219.
- [10] 蔡锐, 李珊, 伍参荣, 等. 中药加味四逆散对血吸虫病肝纤维化小鼠肝组织 I 型胶原、III 型胶原的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 178.
- [11] Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis [J]. Front Biosci, 2002, Sep 1; d1899.
- [12] 许佳平, 白宪光. 慢性乙型肝炎患者外周血 TGF- β_1 的检测及其对肝纤维化意义的探讨[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(8): 688.

[责任编辑 李玉洁]