

舒肝颗粒对大鼠肝星状细胞活化增殖的抑制作用

石蕾*, 尹一然, 李昌平

(泸州医学院附属医院, 四川 泸州 646000)

[摘要] 目的: 研究中药舒肝颗粒对体外培养活化大鼠肝星状细胞(HSC)活化增殖的影响, 探讨舒肝颗粒抗肝纤维化的作用机制。方法: 用空白对照及 0.01, 0.02, 0.04 g·L⁻¹ 的舒肝颗粒分别处理 HSC 细胞系 HSC-T6 24 h 后, MTT 比色法检测细胞增殖, 光镜下观察 HSC 形态学变化, 免疫组化法测各组 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的变化。结果: 舒肝颗粒作用 HSC 细胞 24 h 后, 0.01, 0.02, 0.04 g·L⁻¹ 终浓度肝星状细胞抑制率分别为 7.02%, 13.33%, 20.85%, 明显高于空白对照组, 且与药物浓度相关。与对照组比较, 随着舒肝颗粒药物浓度的增高, HSC 的细胞增殖和胞体伸展受到明显抑制; 空白对照组, 舒肝颗粒 0.01, 0.02, 0.04 g·L⁻¹ 组 α -SMA 阳性表达率分别为 (62.83 ± 3.42)%, (47.31 ± 2.74)%, (37.79 ± 3.01)%, (25.74 ± 2.83)%, 各组与空白对照组相比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 舒肝颗粒抑制肝星状细胞活化、增殖并抑制 α -SMA 表达, 可能是其抗纤维化的作用机制。

[关键词] 舒肝颗粒; 肝星状细胞; 肝纤维化; α -SMA

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0136-03

Effects of Shugan Granule on Proliferation and Activation of Rat Hepatic Stellate Cells *in vitro*

SHI Lei*, YIN Yi-ran, LI Chang-pin

(Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To study effect of Shugan granule on proliferation and activation of rat hepatic stellate cells *in vitro* and investigate the main mechanism of Shugan granule in protection of liver fibrosis. **Method:** The experiment was divided into the blank control group, Shugan granule 0.01 g·L⁻¹ group, Shugan granule 0.02 g·L⁻¹ group and Shugan granule 0.04 g·L⁻¹ group. HSC was intervened *in vitro* for 24 h, then cell proliferation were found by MTT, the morphological changes were detected, α -smooth muscle actin (α -SMA) expression was investigated by Immunohistochemical method. **Result:** After 24 hours of incubation, Shugan granule at concentrations of 0.01, 0.02, 0.04 g·L⁻¹ reduced the rates of cell growth by 7.02%, 13.33%, 20.85%, respectively, showing inhibitory effects with concentration-dependent manner. Compared with the control group, cell proliferation and cell body extension was obviously inhibited by Shugan granule, the positive rate of expressed α -SMA in control group was (62.83 ± 3.42)%, in Shugan granule 0.01 g·L⁻¹ group was (47.31 ± 2.74)%, in Shugan granule 0.02 g·L⁻¹ group was (37.79 ± 3.01)%, in Shugan granule 0.04 g·L⁻¹ group was (25.74 ± 2.83)%, among control group and three Shugan granule intervention group there was a significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shugan granule can resist hepatic fibrosis through inhibiting the activation and proliferation of HSC.

[Key words] Shugan granule; hepatic stellate cell; liver fibrosis; α -smooth muscle actin

[收稿日期] 20110607(010)

[基金项目] 国家人事部留学回国人员基金(030079); 四川省卫生厅项目(川卫 125 号)

[通讯作者] *石蕾, 硕士, 医师, 从事肝胆疾病的诊治, Tel: 13982751821, E-mail: 676858889@qq.com

中药舒肝颗粒具有清热解毒、化湿化痰、活血通络之功效, 具有良好的抗纤维化作用。肝星状细胞在肝纤维化发病机制中发挥关键作用, 诱导肝星状细胞(HSC)凋亡是目前抗肝纤维化治疗的重要策

略之一。为了探讨舒肝颗粒抗肝纤维化作用的机制,我们采用舒肝颗粒作用于体外活化的肝星状细胞,观察舒肝颗粒对肝星状细胞活化增殖的影响。

1 材料

1.1 细胞系 大鼠 HSC 系 HSC-T6, 此细胞系保持体外培养激活的 HSC 特性. 可在体外无包被的塑料培养皿中培养, 可自发向肌成纤维细胞转化, 具有体内活化的生物学特征。购自上海中医药大学肝病研究所, 批号 20071120。

1.2 试剂 舒肝颗粒全方由党参、黄芪、白术、三棱、莪术、丹参、川芎、茵陈、虎杖、五味子、鳖甲组成, (泸州医学院附属医学院药物研究所研制), RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司, 批号 1272921)、胰酶 (Amresco), 特级胎牛血清 (北京元亨圣马生物技术研究所, 批号 05110816), 噻唑蓝 (MIT) (Sigma 公司产品, 批号 W2128), 小鼠抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 单克隆抗体 (批号 20070523), 即用型 SP 免疫组化试剂盒 (批号 20070511, 北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 仪器 CO₂ 恒温培养箱 (美国 Shel-Lab 公司), YJ-1450 型医州净化工作台 (苏州长春电子仪器厂), 1X71 型倒置相差显微镜 (日本 Olympus 光学仪器有限公司), 细胞用无菌超净工作台 (上海力申科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组及处理 HSC-T6 的培养与传代: 采用含 10% 的胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 在 37 °C 5% 的 CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 隔天换液, 待细胞长满培养瓶底 80% ~ 90% 时, 用 2.5 g·L⁻¹ 胰蛋白酶消化, 按 1:3 传代。取对数生长期的 HSC 细胞, 将试验分 4 组, 空白对照组、舒肝颗粒 0.01, 0.02, 0.04 g·L⁻¹ 组, 每组 10 例。

采用无血清 RPMI 1640 细胞培养液溶解舒肝颗粒, 37 °C 恒温水浴箱中加热 30 min, 离心观察颗粒完全溶解, 调节 pH 和渗透压, 经 0.4 μ m 滤器过滤除菌, 再制成终质量浓度分别为 0.01, 0.02, 0.04 g·L⁻¹, 加入分组细胞作用 24 h。

2.2 对 HSC 增殖的影响 取对数生长期的 HSC, 调整密度为 1 × 10⁴/mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 24 h 后弃上清液, 按分组将舒肝颗粒作用 24 h 后, 加入 5 g·L⁻¹ 的 MTT 液 20 μ L, 继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加 150 μ L DMSO 溶解, 震荡, 在酶标仪 (490 nm 波长) 上检测各孔吸光度 (A)。每组平行检测 10 孔, 设 1 孔只加 DMSO 不加 MTT 为空白对照。

白对照。

2.3 肝星状细胞形态学观察 光镜下观察经分组处理后的活化肝星状细胞的形态学变化。

2.4 肝星状细胞 α -SMA 免疫组化法染色 取对数生长期细胞。于加药前 24 h 消化后以 4 × 10⁴/mL 接种于置有经多聚赖氨酸处理的盖玻片的 24 孔板中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 孵箱中培养, 待细胞生长达 70% 融合, 按分组加药, 加药前以无血清培养基洗细胞 3 次。Tet 处理 24 h 后上。PBS 洗细胞 3 次, 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min, 4% Tri-tonX-100 通透细胞 30 min, 过氧化物酶阻断剂孵育 10 min。非免疫性动物血清中孵育 10 min。加一抗 4 °C 冰箱过夜后, 生物素标记的二抗中孵育 10 min, 加 SABC 复合物孵育 10 min, DAB 显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察, 照相。以 PBS 代替一抗作阴性对照。每组细胞各进行 6 次独立性实验。 α -SMA 阳性结果判断: 细胞质内呈现棕黄色或棕褐色。采用 sABC 法检测 α -SMA 在活化大鼠肝星状细胞的表达。采用计算机图像分析系统免疫组织化学图像分析软件, 所取参数为阳性细胞计数比率。同一盖玻片, 取 200 倍高倍视野下 α -SMA 显色摄取图像, 用细胞计数软件作定量分析代表阳性细胞计数比率。

2.5 统计学处理 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 对活化状态下大鼠肝星状细胞的影响 随着舒肝颗粒药物浓度的升高, 肝星状细胞的增殖受到明显抑制。见表 1。

表 1 舒肝颗粒对活化状态下大鼠肝星状细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	终浓度 /g·L ⁻¹	A	抑制率 /%	存活率 /%
空白对照	-	1.012 ± 0.004	-	100
舒肝颗粒	0.01	0.941 ± 0.011 ¹⁾	7.02	92.98
	0.02	0.877 ± 0.011 ¹⁾	13.33	86.67
	0.04	0.801 ± 0.004 ¹⁾	20.85	79.15

注: 与空白对照比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 肝星状细胞形态学观察 镜下观察 4 组细胞: 空白对照组肝星状细胞连接致密, 形态良好, 胞体扁平, 伸展成膜状, 呈肌成纤维细胞的改变; 舒肝颗粒 0.01 g·L⁻¹ 组, 细胞形态基本正常, 胞体伸展稍被抑制, 细胞间片状连接; 舒肝颗粒 0.02 g·L⁻¹ 组, 细胞

间连接较上组减少,生长密度稍减低。舒肝颗粒 0.04 g·L⁻¹组,细胞形态欠佳,胞体近梭形,胞质减少,细胞间少量连接,类似于静止期形态。各组均未见核固缩或凋亡现象。

3.3 肝星状细胞 α-SMA 表达的比较 随着舒肝颗粒药物浓度的增高,各组肝星状细胞 α-SMA 的表达强度受到明显抑制。见表 2。

表 2 舒肝颗粒对肝星状细胞 α-SMA 阳性表达率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	终质量浓度/g·L ⁻¹	阳性率/%
空白对照	-	62.83 ± 3.42
舒肝颗粒	0.01	47.31 ± 2.74 ²⁾
	0.02	37.79 ± 3.01 ²⁾
	0.04	25.74 ± 2.83 ²⁾

4 讨论

肝星状细胞是肝脏 ECM 的主要来源,是肝纤维化形成的细胞学基础^[1]。肝星状细胞活化后形态上表现为细胞伪足伸展、胞体变长;同时其还可以通过自分泌及旁分泌细胞因子促进为转化的肝星状细胞向肌成纤维细胞转化,功能表型上表现为:①胞质中脂滴、维生素 A 减少或消失;②表达平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、波形蛋白和结蛋白等;③分泌 E 细胞外基质增加;④组织抑制剂合成和分泌增加^[2];⑤收缩性增强^[3];细胞收缩可导致肝内微循环收缩和肝窦血管阻力升高,促进了肝硬化门静脉高压的发展。⑥基质金属蛋白酶抑制剂表达增强,影响基质金属蛋白活性;⑦细胞开始凋亡。其中细胞增殖、HSC 大量表达 α-SMA 和分泌胶原为最显著的活化特征。同时肝纤维化是一种可逆性的病变,Safadi^[4]等研究表明肝纤维化在去除损伤因素后尚有逆转的可能,及时地干预肝纤维化的病程能够减少肝硬化及其致命并发症的发生。舒肝颗粒方剂由党参、黄芪、白术、三棱、莪术、丹参、川芎、茵陈、虎杖、五味子、鳖甲组成,全方采用现代工艺精致而成。其中黄芪和丹参为君药,共同发挥补脾益气、活血化瘀之作用。黄芪的有效成分是黄酮类,丹参的有效成分为丹参素。该两种成分在临床以及实验研究中被证实有较明确的抗肝纤维化作用^[5-9]。

肝星状细胞株 HSCT6 表型为永久活化的 HSC,是较为理想的肝纤维化研究模型。本实验采用中药舒肝颗粒干预体外培养的 HSC,观察星状细胞的形态变化发现舒肝颗粒可使抑制肝星状细胞向肌成纤维细胞形态转化,使其呈静止期形态,并与药物浓度

成正比。通过 MTT 法观察舒肝颗粒对肝星状细胞增殖影响发现,随着舒肝颗粒药物浓度的增高,其增殖受到明显抑制。α-SMA 是肝星状细胞重要的功能标志,肝脏中除了大血管壁平滑肌细胞外,其他肝脏细胞均无 α-SMA 表达;所以一旦在肝星状细胞中出现 α-SMA 阳性,则提示肝星状细胞向肌成纤维细胞转化,因而 α-SMA 可作为肝星状细胞的一个激活标致,本实验发现舒肝颗粒可明显抑制活化肝星状细胞 α-SMA 的表达,且与浓度相关,表明舒肝颗粒可通过抑制肝星状细胞活化发挥其抗纤维化作用。

[参考文献]

[1] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南[J]. 中西医结合肝病杂志, 2006, 16(5):316.

[2] Cardoso C C, Paviani E R, Cruz L A, et al. Effect of pentoxifyll-line on arachidmic acid metabolism, neutral lipid synthesis and accumulation during induction of the lipocyte phenotype by retinol in murine hepatic stellate cell[J]. Mol Cell Biochem, 2003, 254:37.

[3] Murphy F R, Issa R, Zhou X, et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metal-lopmtainase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis [J]. J Biol Chem, 2002, 277:11069.

[4] Safadi R, Friedman S L. Hepatic fibrosis role of hepatic stellate cell activation[J]. Med Gen Med, 2002, 4:27.

[5] 吕志平, 刘晓燕, 马俊萍. 黄芪抗肝纤维化研究进展[J]. 陕西中医, 2003, 24(7):652.

[6] 陶艳艳, 刘成海. 丹参及其化学成分抗肝纤维化作用机制研究进[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(2):145.

[7] Liu P, Liu C H, Wang H N, et al. Effect of salvianolic acid B on collagen production and mitogen-activated protein kinase activity in rat Hepatic stellate cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23: 733.

[8] Zhang X L, Liu L, Jiang H Q. Salvia miltiorrhiza monomer IH764-3 induces hepatic stellate cell apoptosis via caspase-3 activation [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8: 515.

[9] 李冬, 戴立里, 余斌斌, 等. 丹参素对大鼠肝星状细胞增殖、凋亡及 NF-κB 活性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31: 724.

[10] Friedman S L. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver[J]. Sem Liver Dis, 1990, 10(1):20.

[责任编辑 聂淑琴]