

加味四逆散药物血清对 HSC-T6 增殖的影响

郑旭锐¹,李长秦¹,李琦¹,孙守才¹,王礼凤¹,周滢^{2*}
(1. 陕西中医学院,陕西 咸阳 712046; 2. 重庆医科大学,重庆 400060)

[摘要] 目的:观察加味四逆散含药血清对瘦素刺激肝星状细胞增殖的影响,探讨其抗肝纤维化的机制。方法:SD 大鼠 30 只,随机分为 3 组:正常血清组、秋水仙碱对照组、加味四逆散组(37.5 g·kg⁻¹),每组均 10 只,将正常血清组大鼠每只按 10 mL·kg⁻¹ 给予生理盐水 ig,1 次/日;秋水仙碱对照组大鼠每只按 0.2 mg·kg⁻¹ 给予秋水仙碱 ig,1 次/日;加味四逆散组给予加味四逆散药液 10 mL·kg⁻¹ ig,1 次/日。以上各组均连续 ig 7 d,制备各药物含药血清,并将药物血清用培养基配制成 5%、10%、20%、40% 4 个浓度;培养肝星状细胞,取对数生长期细胞,使用噻唑蓝(MTT)比色法检测药物血清对 100 mg·L⁻¹ 的瘦素刺激肝星状细胞-T6(HSC-T6)增殖的影响。结果:加味四逆散药物血清对瘦素刺激的肝星状细胞增殖有抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$),在 5%~40% 的血清浓度范围内,抑制作用呈剂量依赖性关系;秋水仙碱对照组亦能抑制 HSC-T6 细胞的增殖($P<0.05$),但在 10%~40% 的血清浓度范围内加味四逆散组对 HSC-T6 增殖的抑制率显著高于秋水仙碱对照组($P<0.05$)。结论:加味四逆散药物血清具有抑制瘦素刺激 HSC-T6 增殖的作用。

[关键词] 加味四逆散;肝星状细胞;增殖影响
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)03-0181-03

Effect of Jiawei Sini San Serum on Proliferation of HSC-T6

ZHENG Xu-rui¹, LI Chang-qin¹, LI Qi¹, SUN Shou-cai¹, WANG Li-feng¹, ZHOU Ying^{2*}
(1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;
2. Chongqing Medical University, Chongqing 400060, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of Jiawei Sini San (JWSNS) serum on proliferation of hepatic stellate cells(HSC-T6) and to investigate the mechanism of hepatic fibrosis. **Method:** Thirty rats were randomly divided into three groups: normal serum, colchicine group and Jiawei Sinisan group, 10 rats each group. The normal serum group was given saline, 10 mL·kg⁻¹ ig, once each day; the colchicine group was given colchicine, 0.2 mg·kg⁻¹ ig, once each day; JWSNS group was given liquid of JWSNS 10 mL·kg⁻¹ ig, one each day. The three groups were administrated for 7 d. Drug serum was prepared with the medium to 5%, 10%, 20%, 40%; hepatic stellate cells was cultured, logarithmic growth phase of cells, was assayed by MTT for measuring serum leptin stimulation of 100 ng·mL⁻¹ HSC-T6 proliferation. **Result:** JWSNS serum inhibited the proliferation of hepatic stellate cells ($P<0.05$ or $P<0.01$) with, a dose-dependent manner; colchicine control group also inhibited the proliferation of HSC-T6 cells ($P<0.05$), but inhibition rate of 10% to 40% drug serum was significantly higher than that of colchicine group ($P<0.05$). **Conclusion:** JWSNS has the suppression on the proliferation of HSC-T6.

[Key words] Jiawei Sini San; hepatic stellate cell; proliferation

[收稿日期] 20110709(006)
[基金项目] 陕西省科技厅项目(SJ08C202)
[第一作者] 郑旭锐,博士研究生,副教授,从事中医药对感染性疾病的防治研究,E-mail:arosezxr@163.com
[通讯作者] *周滢,博士研究生,讲师,从事中药炮制与方剂,Tel:15723056096,E-mail:meiren129129@163.com

加味四逆散是临床治疗肝纤维化的有效经验方,作者在以往临床观察和实验研究中发现其具有显著改善肝脏微循环,保护肝细胞,恢复肝功能,抑制星状细胞活性,减少肝内胶原蛋白合成和沉积,促进胶原降解等作用^[1-6]。本研究通过观察加味四逆散药物血清对瘦素刺激肝星状细胞-T6(HSC-T6)增

殖的影响以探讨该方抗肝纤维化的机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,清洁级,体重(200 ± 20)g,购自西安交通大学医学院实验动物中心,合格证号医动字第 2007-001 号。

1.2 药物及试剂 加味四逆散煎剂:由柴胡 10 g,枳壳 10 g,白芍 20 g,甘草 5 g,姜黄 30 g,桃仁 10 g,丹参 25 g,黄芪 40 g 组成,方中药物均购自陕西中医学院附属医院中药房,药物经常规煎煮、过滤、水浴蒸发至 3.75 g·mL⁻¹的药液置于 4 ℃ 冰箱保存待用;RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);重组瘦素蛋白(美国 Protech 公司生产);噻唑蓝(MTT, Sigma 公司生产);胰蛋白酶(Sigma 公司生产,批号 HY27250);10% 胎牛血清(杭州四季青生物制品有限公司生产,批号 20090605);大鼠肝星状细胞(HSC-T6,购自上海肯强仪器有限公司,编号 zx1006)。秋水仙碱(西版纳制药厂生产,批号 C-1254,药物质量浓度为 0.05 g·mL⁻¹)。

2 方法

2.1 分组 将 30 只实验大鼠适应性喂养 1 周后随机分为 3 组:正常血清组、秋水仙碱对照组、加味四逆散组,每组 10 只。

2.2 制备含药血清^[7] 正常血清组大鼠每只按 10 mL·kg⁻¹给予生理盐水 ig,1 次/d;秋水仙碱对照组大鼠每只按 0.2 mg·kg⁻¹给予秋水仙碱 ig,1 次/d;加味四逆散组给予加味四逆散药液(37.5 g·kg⁻¹) 10 mL·kg⁻¹ ig,1 次/d。以上各组均连续 ig 7 d。末次给药(ig 前禁食不禁水 12 h)1 h 后,每只大鼠按 3.5 mL·kg⁻¹给予 10% 水合氯醛进行麻醉,心脏采血,2 mL/只,离心分离血清,56 ℃ 水浴中灭活 30 min,0.44 μm 微孔滤膜过滤,-20 ℃ 冷藏备用。

2.3 细胞培养^[7] HSC-T6 以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养于含 5% CO₂、饱和湿度为 37 ℃ 的环境中,RPMI-1640 培养液中含 100 U·mL⁻¹青霉素、100 U·mL⁻¹链霉素,每 2 天传代 1 次。培养方法:本实验的 HSC-T6 是原代细胞,将复苏后的 HSC-T6 进行常规 0.4% 台盼蓝拒染法进行细胞活力鉴定,细胞计数调节成(0.5 ~ 1) × 10⁵/L 的密度并接种在 100 mL 塑料培养瓶中,于 5% CO₂、饱和湿度 37 ℃ 的二氧化碳培养箱培养 1 ~ 3 d,当细胞完全贴壁后换液,以后每 3 ~ 4 d 换液 1 次,每隔 4 ~ 8 h 用显微镜观察细胞形态及生长状态。当细胞呈单层生长状态时用 0.25% 胰蛋白酶消化后以 1:2 或 1:3 稀释后传代,培养 24 h 换液,48 h 再次传代。

2.4 MTT 比色法 将复苏后处于对数生长期的 HSC-T6 经胰酶消化,以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液均匀接种在 96 孔培养板中,每孔 0.5 × 10⁴ 个细胞,于 37 ℃,5% CO₂ 温箱中培养 24 h 后弃去培养液,每孔加入含 100 μg·L⁻¹ 瘦素的培养液 200 μL,6 孔重复,继续培养 24 h 后弃培养液;分别取各含药血清 0.1 mL,并将其用培养液配制成 5%、10%、20%、40%^[8] 4 个体积分数,依次给不同的孔中加入不同浓度各含药血清 0.1 mL,6 孔重复进行药物干预,与 HSC-T6 作用 24,48 h,依次吸出培养液^[9],各孔中加入 20 μL 的 MTT 溶液(10 g·L⁻¹) 混匀,37 ℃ 培养 4 h 后,小心吸去上清,于每孔中加入 200 μL 二甲基亚砷(DMSO)。室温下将平板置于微孔板振荡器上振荡 10 min,用酶标仪测定 570 nm 处吸光度(A),并计算增殖率(PR)。

$$PR = A_{\text{处理孔}} / A_{\text{对照孔}} \times 100\%$$

2.5 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计学软件分析,采用秩和检验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

与正常血清组比较,加味四逆散组对 HSC-T6 的增殖有抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),在 5% ~ 40% 的血清浓度范围内,抑制作用呈剂量依赖性关系;秋水仙碱对照组亦能抑制 HSC-T6 细胞的增殖($P < 0.05$),但在 10% ~ 40% 的血清浓度范围内加味四逆散组对 HSC-T6 增殖的抑制率显著高于秋水仙碱对照组($P < 0.05$),见表 1。

4 讨论

加味四逆散是治疗肝纤维化的有效经验方,我们在以往临床观察和实验研究中发现其具有显著改善肝脏微循环,保护肝细胞,恢复肝功能,抑制星状细胞活性,减少肝内胶原蛋白合成和沉积,促进胶原降解等作用^[1-6],在本次研究中作者试图通过观察加味四逆散药物血清对瘦素刺激 HSC-T6 增殖的影响以探讨该方抗肝纤维化的机制。

本研究通过给正常大鼠 ig 加味四逆散药物来制备药物血清,以药物血清作为干预因素,减少了直接运用中药粗提物理化性质(如杂质、酸碱度、鞣质等)不十分恒定,体外实验结果可能影响药效的判断和评价的不足^[9-11],在方法学上提高了实验结果的真实性和可靠性。应用 MTT 比色法计算细胞增殖率来观察药物血清对瘦素刺激 HSC-T6 增殖的影响,其方法简便可行。MTT 法具有操作简便、经济快速、易自动化;灵敏度高,重复性好;没有 [³H]TdR

表 1 加味四逆散含药血清对瘦素刺激 HSC-T6 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	血清体积分数/%	24 h		48 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%
正常	5	0.603 ± 0.048	—	0.688 ± 0.054	—
	10	0.611 ± 0.038	—	0.692 ± 0.062	—
	20	0.622 ± 0.053	—	0.696 ± 0.058	—
	40	0.619 ± 0.047	—	0.683 ± 0.063	—
秋水仙碱	5	0.581 ± 0.041	3.66	0.639 ± 0.057	7.11 ¹⁾
	10	0.569 ± 0.039	6.87 ¹⁾	0.631 ± 0.059	8.83 ¹⁾
	20	0.548 ± 0.048	12.03 ¹⁾	0.622 ± 0.048 ¹⁾	10.61 ¹⁾
	40	0.557 ± 0.050	10.01 ¹⁾	0.608 ± 0.057 ¹⁾	10.92 ¹⁾
加味四逆散	5	0.563 ± 0.037	5.63	0.623 ± 0.029	9.45 ^{1,3)}
	10	0.529 ± 0.054	13.42 ^{1,3)}	0.569 ± 0.047	17.74 ^{1,3)}
	20	0.502 ± 0.046	19.42 ^{2,3)}	0.562 ± 0.041	19.25 ^{2,3)}
	40	0.499 ± 0.059	19.38 ^{2,3)}	0.558 ± 0.053	18.31 ^{1,3)}

注:与正常同浓度血清组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与秋水仙碱同浓度血清组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

(氚标胸腺嘧啶)掺入试验放射性污染的缺点。因此本研究通过 MTT 法来检测药物干预后增殖细胞的生长情况来反应该药物血清是否对增殖的细胞有抑制作用是可行的。

实验结果发现:与不含药血清组比较,加味四逆散组对 HSC-T6 的增殖有抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),在 5% ~ 40% 的血清浓度范围内,抑制作用呈剂量依赖性关系;秋水仙碱对照组亦能抑制 HSC-T6 的增殖($P < 0.05$),但在 10% ~ 40% 的血清浓度范围内加味四逆散组对 HSC-T6 增殖的抑制率显著高于秋水仙碱对照组($P < 0.05$),说明加味四逆散药物血清对 HSC-T6 增殖有明显的抑制作用,初步揭示其抗肝纤维化的作用是通过抑制 HSC-T6 增殖而实现的。

[参考文献]

[1] 孙守才,刘光炜.加味四逆散治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的初步研究[J].陕西中医学院学报,2001,24(1):46.

[2] 孙守才,李晓苗,曾福海,等.加味四逆散防治大鼠免疫性肝纤维化的实验研究[J].陕西中医学院报,2002,25(2):45.

[3] 孙守才,刘光炜,曾福海,等.加味四逆散对肝纤维化大鼠血清透明质酸、层黏连蛋白、Ⅳ型胶原及肝脏超

微结构的影响[J].中国中医基础医学杂志,2002,8(11):30.

[4] 李长秦,郑旭锐 孙守才,等.加味四逆散肝纤维化大鼠肝组织Ⅳ型胶原和转化生长因子 β_1 影响的免疫组化研究[J].云南中医学院学报,2004,27(3):25.

[5] 郑旭锐,孙守才,韦永红,等.加味四逆散对肝纤维化大鼠肝组织Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 影响的研究[J].时珍国医国药,2007,18(8):1923.

[6] 孙守才,李长秦,郑旭锐,等.加味四逆散对肝窦内皮细胞窗孔、增殖及一氧化氮的影响[J].陕西中医学院报,2004,24(2):31.

[7] 侯丽颖,贺松其,吕志平,等.保肝宁对瘦素刺激 HSC 增殖及其 JAK2-STAT3 信号通路影响的实验研究[J].上海中医药杂志,2007,41(3):60.

[8] 房红梅,姚希贤,姚金峰,等.拆方益肝康的两种药物血清对 HSC 活化增殖的影响[J].世界华人消化杂志,2005,13(16):1970.

[9] 张绪富,吕志平,赵进军.血清药理学在抗肝纤维化研究中的应用概况[J].南京中医药大学学报:自然科学版,2002,3(18):127.

[10] 米永杰,李健.中药血清药理学研究概述[J].四川解剖学杂志,2006,14(4):34.

[11] 包金凤,刘国卿.中药血清药理学的方法学研究概述[J].药学进展,2002,24(2):89.

[责任编辑 聂淑琴]