

## 复方六月青对肝星状细胞增殖和细胞外基质的影响

张士军<sup>1</sup>, 张志伟<sup>2</sup>, 陈兆霓<sup>1</sup>, 焦杨<sup>1</sup>, 李勇文<sup>1</sup>, 黄仁彬<sup>1\*</sup>

(1. 广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021; 2. 广西中医学院附属瑞康医院, 南宁 530011)

[摘要] 目的: 研究复方六月青(CLYQ)对肝星状细胞(HSC)增殖和细胞外基质(ECM)的影响。方法: 采用四甲基唑蓝(MTT)法检测 CLYQ 对 HSC 的毒性。采用酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测 HSC 上清液羟脯氨酸(Hyp)、透明质酸(HA)和金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)。结果: CLYQ 体外对 HSC 的  $TC_{50} = 6.191 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $TC_0 = 3.504 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , CLYQ 抑制 HSC 的增殖。CLYQ 各剂量组均可显著降低 HSC 细胞上清液 Hyp, HA, TIMP-1 含量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 呈现量效反应关系。结论: CLYQ 通过抑制 HSC 的增殖, 从而使 ECM 合成减少, 肝纤维化减轻。

[关键词] 复方六月青; 肝纤维化; 肝星状细胞; 细胞增殖; 细胞外基质

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0135-04

## Influence of Compound Liuyueqing on Proliferation and Extracellular Matrix of Hepatic Stellate Cells

ZHANG Shi-jun<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-wei<sup>2</sup>, CHEN Zhao-ni<sup>1</sup>, JIAO Yang<sup>1</sup>, LI Yong-wen<sup>1</sup>, HUANG Ren-bin<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530011, China)

**[Abstract] Objective:** To study the influence of CLYQ on proliferation and extracellular matrix (ECM) of hepatic stellate cells (HSC). **Method:** Cytotoxicity caused by CLYQ was detected by MTT assay. The contents of hydroxyproline (Hyp), hyaluronic acid (HA) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in HSC cell supernate were detected by enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). **Result:**  $TC_{50}$  is  $6.191 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , and  $TC_0$  is  $3.504 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . CLYQ could inhibit the proliferation of HSC. The various concentration group of CLYQ could degrade significantly the contents of Hyp, HA and TIMP-1 in cell supernate ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), presenting the dose-effect relationship. **Conclusion:** CLYQ can inhibit the proliferation of HSC, so that reducing the synthesis of ECM and hepatic fibrosis.

**[Key words]** Compound Liuyueqing (CLYQ); hepatic fibrosis; hepatic stellate cell; cell proliferation; extracellular matrix

六月青系爵床科肖鸡笼属植物肖鸡笼(顶花马兰) *Taraphochlamys affinis*(Giff) Bremekhu 的干燥地上部分<sup>[1]</sup>, 为广西民族特色草药。由六月青、白花蛇舌草、栀子花根等组成复方六月青(CLYQ, 又称复方六月雪)。CLYQ 是根据长时期的临床观察而拟定

的治疗急慢性乙型肝炎的验方, 民间常用于治疗急性黄疸性肝炎的湿热黄疸等证。本课题组首次对该方进行了研究, 我们发现 CLYQ 在体外和体内均可有效地抑制乙型肝炎病毒 DNA 的复制<sup>[2-3]</sup>, 我们的实验结果初步显示 CLYQ 在抗乙肝病毒、保护肝脏

[收稿日期] 20100719(006)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0322024-5 E); 广西研究生教育创新计划资助项目(2006105981007D14)

[第一作者] 张士军, 博士, 副教授, 研究方向: 抗肝纤维化药物研究, Tel: 0771-5358272, E-mail: gxykdxzs@163.com

[通讯作者] \* 黄仁彬, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 抗肝纤维化和心血管药物研究, Tel: 13807713926, E-mail: huangrenbin518@163.com

方面具有良好的作用。本实验是前期系列研究的一部分,是复方六月雪临床前研究的必要补充,即采用肝星状细胞系 HSC-T6 细胞模型,应用 MTT 法检测 CLYQ 对 HSC-T6 细胞增殖的抑制作用和对细胞的毒性作用,采用 ELISA 法检测细胞上清液羟脯氨酸(Hyp)、透明质酸(HA)和金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)含量的变化,研究 CLYQ 在体外对 HSC-T6 细胞的增殖及 ECM 合成的影响,进一步完善复方六月青的药效学研究。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 肝星状细胞系 HSC-T6<sup>[4]</sup> 为 SV40 转染 SD 大鼠 HSC,其表型为活化的 HSC,表达高水平的 I 型胶原和 TIMP-1 mRNA 等。由本药理学教研室培养、传代。

**1.2 药品与试剂** CLYQ:由广西医科大学药理学教研室采用全方醇水双提的最佳工艺<sup>[5]</sup>提取,批号 20070423,提取物含齐墩果酸  $1.24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,总黄酮  $13.03 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ;秋水仙碱:美国 Sigma 公司,批号 C8402;MTT:美国 Sigma 公司,批号 M2128;Hyp:南京建成生物工程研究所,批号 20071026;HA:美国 Adlitteram Diagnostic Laboratories, Inc.,批号 RT110371;TIMP-1:武汉博士德生物工程有限公司,批号 20070904。

**1.3 仪器** Model 450 自动酶标仪:美国 Bio-Rad 公司。

## 2 方法

**2.1 CLYQ 含药培养液的配制** 将 CLYQ 以培养液配成  $72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (以生药计,下同)的母液,经  $0.45 \mu\text{m}$  的微孔滤膜,再经  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌后,置  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。实验时用完全培养液将 CLYQ 稀释成所需终浓度的应用液。

**2.2 CLYQ 对 HSC-T6 细胞增殖的影响** 根据 Mosmann 建立的 MTT 法检测药物对细胞的毒性作用<sup>[6]</sup>,稍加改进。将  $2 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液加入 96 孔培养板中,每孔  $200 \mu\text{L}$ ,置  $\text{CO}_2$  孵箱 ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ) 中培养 24 h 后,细胞贴壁且生长良好,吸除全部培养液,加入用完全培养液将 CLYQ 系列稀释成 5 个终浓度为:  $12.50, 8.84, 6.25, 4.42, 3.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的应用液  $200 \mu\text{L}$ ,每个浓度设 5 个复孔。连续培养 72 h,培养结束前 4 h,每孔加入 MTT  $10 \mu\text{L}$ ,于  $\text{CO}_2$  孵箱中继续培养。4 h 后小心吸弃上清液后,每孔加 DMSO  $150 \mu\text{L}$ ,微量振荡器振荡 5 min,使结晶

紫完全溶解。自动酶标仪(检测波长  $570 \text{ nm}$ ,参考波长  $630 \text{ nm}$ )读取各孔 A,记录结果。按 Reed-Muench 法<sup>[7]</sup>计算半数细胞毒浓度 ( $\text{TC}_{50}$ ) 和最大无毒浓度 ( $\text{TC}_0$ ),计算公式如下。

$$\text{药物抑制率} = (C - T) / C \times 100\%$$

式中 C 为无药对照孔 A 的均值, T 为加药孔 A 的均值

$$\text{TC}_{50} = \text{Antilog}[\log B +$$

$$\frac{50 - < 50\% \text{抑制百分数}}{> 50\% \text{抑制百分数} - < 50\% \text{抑制百分数}} \times D]$$

B 为抑制率 50% 时的药物浓度, D 为 log 稀释倍数

$$\text{TC}_0 = \text{Antilog}[\log E +$$

$$\frac{10 - < 10\% \text{抑制百分数}}{> 10\% \text{抑制百分数} - < 10\% \text{抑制百分数}} \times D]$$

E 为抑制率 10% 时的药物浓度, D 为 log 稀释倍数

**2.3 CLYQ 对 HSC-T6 细胞 ECM 的影响** 将  $2 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液加入 24 孔细胞培养板,每孔  $1000 \mu\text{L}$ ,置  $\text{CO}_2$  孵箱 ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ) 中培养 24 h 后,细胞贴壁且生长良好,吸除全部培养液,根据细胞毒性试验结果,分别加入最大无毒浓度以下系列 2 倍稀释成 3 个终浓度为:  $3.6, 1.8, 0.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的应用液,每个浓度设 3 个复孔。以等量的完全培养液为空白对照,以秋水仙碱  $6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  为阳性对照。继续培养 24 h 后,分别吸出上清液于  $1.5 \text{ mL}$  灭菌 Eppendorf 管中,  $-20^\circ\text{C}$  保存,统一待检。采用样本碱水解法检测细胞培养上清液 Hyp 含量,采用 ELISA 法检测细胞培养上清液 HA 和 TIMP-1 含量,以上均严格按照试剂盒说明书进行操作。

**2.4 统计方法** 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,以 SPSS 13.0 统计学软件统计。组间比较采用 t 检验。  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 CLYQ 对 HSC-T6 细胞增殖的抑制作用** 随着药物浓度的增加, HSC-T6 细胞被抑制效果越明显,药物对 HSC-T6 细胞的生长有一定的量效关系。各药物组与空白对照组相比较,其生长抑制率有显著性差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),说明 CLYQ 在体外可抑制 HSC-T6 细胞的增殖。  $\text{TC}_{50} = 6.191 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{TC}_0 = 3.504 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,即当各药物浓度  $\text{TC}_0$  时, HSC-T6 细胞无论在形态上还是数量上与空白对照相同,都没有发生变化。实验结果提示提示 CLYQ 对 HSC-T6 细胞毒性很低。结果见表 1。

**3.2 CLYQ 对 HSC-T6 细胞 ECM 的影响** 与空白对照组相比较, CLYQ 高剂量组可显著降低 HSC-T6

细胞上清液 Hyp 和 HA 含量 ( $P < 0.05$ )。CLYQ 高、中剂量组均可显著降低 HSC-T6 细胞上清液 TIMP-1 含量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结果见表 2。

表 1 CLYQ 对 HSC-T6 细胞增殖的抑制作用 (̄±s, n=5)

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	A	抑制率/%
空白对照	-	0.463 ±0.046	-
CLYQ	12.50	0.283 ±0.065 <sup>2)</sup>	78.40
	8.84	0.571 ±0.045 <sup>2)</sup>	56.40
	6.25	0.645 ±0.059 <sup>2)</sup>	50.68
	4.42	0.968 ±0.111 <sup>2)</sup>	26.00
	3.13	1.194 ±0.079 <sup>1)</sup>	02.28

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)

表 2 CLYQ 对 HSC-T6 细胞 ECM 的影响 (̄±s, n=3)

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	Hyp/ng·L <sup>-1</sup>	HA/μg·L <sup>-1</sup>	TIMP-1/ng·L <sup>-1</sup>
空白对照	-	10.91 ±1.95	161.47 ±26.89	2743.25 ±105.53
秋水仙碱	6.25 ×10 <sup>-3</sup>	6.53 ±1.83 <sup>1)</sup>	103.85 ±18.87 <sup>1)</sup>	2446.91 ±118.60 <sup>1)</sup>
CLYQ	3.6	6.26 ±2.13 <sup>1)</sup>	104.28 ±22.38 <sup>1)</sup>	2214.54 ±29.12 <sup>2)</sup>
	1.8	6.60 ±2.02	129.66 ±16.50	2417.99 ±27.41 <sup>1)</sup>
	0.9	7.00 ±2.43	135.53 ±26.41	2603.44 ±25.09

#### 4 讨论

肝纤维化是慢性肝病共有的病理改变,特点是活化的 HSC 大量增生和以胶原为主的细胞外基质过度沉积。HSC 是参与肝纤维化发生发展的重要细胞,其体外培养的成功为肝纤维化的研究提供了理想的细胞模型,研究证实,HSC 活化和转型在肝纤维化中发挥关键作用,HSC 的激活在肝纤维化发生、发展中处于中心地位<sup>[8]</sup>。

HSC 的增殖和激活是胶原合成增加的原因,是肝纤维化发生的中心环节。各种致纤维化因素均把 HSC 作为靶细胞,使之活化。活化的 HSC 合成大量 ECM 沉积在肝脏,从而导致肝纤维化的发生。HSC 的持续激活也导致 HSC 的增殖增加,最终引起 ECM 的异常增多、沉积。因此对 HSC 增殖的抑制是抗肝纤维化的策略之一。

静息状态的 HSC 激活为肌成纤维细胞并产生大量的 ECM,而 ECM 合成、沉积增多,降解相对减少甚至抑制,其结果是肝细胞功能进一步受损、肝脏结构破坏而最终导致肝硬化。因此,抑制 HSC 激活以及 ECM 的沉积与否则是一个非常重要的靶点,是促进肝纤维化逆转的重要因素<sup>[9]</sup>。

HSC-T6 细胞是采用 SV40 的 T 亚型抗原转染原

代分离的大鼠 HSC 得来的永生化细胞株,基本保持原代 HSC 特性,是用于探讨肝纤维化分子机制一个比较理想的模型<sup>[5]</sup>。激活状态下 HSC-T6 细胞可分泌多种 ECM 成分,ECM 成分比例的失调是引起肝纤维化的关键。

中医对肝纤维化病因病机的论述包括湿热、疫毒、痰瘀、血瘀、正虚等几个方面。全面考虑认为肝纤维化的病机演变是一个动态变化的过程,即是由实而虚、由表及里、由聚至积、由气入血及络的病变过程。“虚、瘀、痰(浊)、湿、毒”是导致肝纤维化发生、发展的病机关键。CLYQ 是通过长时期的临床观察而拟定的治疗肝纤维化的验方,具有清热解毒、利湿退黄的功效,主要针对肝纤维化痰浊、湿毒之病机施治,临床疗效显著。

本实验采用 MTT 比色法检测 CLYQ 对 HSC-T6 细胞增殖的作用,实验结果显示 CLYQ 可以有效地抑制 HSC-T6 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),并且 CLYQ 对 HSC-T6 细胞毒性很低。本实验采用 ELISA 法检测 HSC-T6 细胞上清液中与肝纤维化程度密切相关的指标 Hyp, HA 和 TIMP-1,实验结果显示 CLYQ 能够显著抑制 Hyp, HA 和 TIMP-1 的产生。可能是 CLYQ 直接抑制 HSC-T6 细胞分泌 Hyp, HA 和 TIMP-1,也可能是由于 CLYQ 抑制 HSC-T6 细胞的增殖,使细胞增长数量相对减缓,从而降低了上清液中 Hyp, HA 和 TIMP-1 的含量。由于 CLYQ 的干预使 HSC-T6 细胞分泌的 TIMP-1 减少,使其对胶原酶活性的抑制解除,胶原酶活性增强,可促进胶原的降解,从而达到阻止肝纤维化发生的目的。本实验结果表明 CLYQ 具有抗肝纤维化的作用,其作用机制可能是通过抑制 HSC 的增殖及活化而发挥作用,值得进一步研究开发。

#### [参考文献]

- [1] 林兴,黄权芳,黄仁彬,等. 广西民间药六月青的性状与显微鉴定[J]. 中药材,2005,28(7):541.
- [2] 张士军,焦杨,黄仁彬,等. 复方六月雪对鸭乙型肝炎病毒的抑制作用研究[J]. 中国药房,2008,19(33):2563.
- [3] 张士军,焦杨,黄仁彬,等. 复方六月雪对 HepG2. 2.15 细胞 HBV DNA 的抑制作用[J]. 中药药理与临床,2007,23(1):59.
- [4] Friedman S L, Lalazar A, Wang L, et al. HSC-T6 cells, an immortalized rat hepatic stellate cell line[J]. Hepatology, 1997, 26(4pt2):338A.

# 中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经保护作用及血管内皮生长因子表达的影响

王宝亮<sup>1</sup>, 韩艳丽<sup>2\*</sup>

(1. 河南中医学院第一附属医院脑病区, 郑州 450008; 2. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 观察中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经保护作用及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的影响。方法: 50 只 SD 大鼠随即分成: 假手术组, 缺血再灌注组, 脑缺血再灌注 + 中风皂贝化痰胶囊高、中、低剂量组 (1.62, 1.08, 0.54 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。采用 Zea-Longa 方法制备大鼠脑缺血再灌注模型, 观察中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经保护作用及 VEGF 表达的影响。结果: 与假手术组相比, 缺血再灌注大鼠出现严重的神经功能缺失症状, 皮质和海马区 VEGF 表达增强; 与脑缺血再灌注组相比, 中风皂贝化痰胶囊治疗组能显著改善大鼠神经功能缺失症状, 增加 VEGF 的表达, 其中以中风皂贝化痰胶囊高剂量组的神经保护作用最为显著, VEGF 阳性细胞区积分吸光度为 (150.8 ± 9.8)。结论: 中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 其作用机制可能与增加 VEGF 的表达有关。

[关键词] 中风皂贝化痰胶囊; 脑缺血再灌注损伤; 血管内皮生长因子; 大鼠模型

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0138-04

## Influence of Zhongfeng Zaobei Huatan Jiaonang on Nerve Protection and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

WANG Bao-liang<sup>1</sup>, HAN Yan-li<sup>2\*</sup>

(1. Encephalopathy Department of No. 1 Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract] Objective:** To observe the effect of Zhongfeng Zaobei Huatan Jiaonang (ZFZBHTJN) on nerve protection and the VEGF expression in cerebral ischemia-reperfusion injury rats model. **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into sham operation group, ischemia-reperfusion (I-R) group, ZFZBHTJN high, Medium, low

[收稿日期] 20100711(008)

[基金项目] 河南省教育厅教育攻关项目 (2007360031)

[第一作者] 王宝亮, 本科, 主任医师, 教授, 研究方向: 脑血管病的防治与研究, E-mail: wang\_baoliang@163.com

[通讯作者] \* 韩艳丽, E-mail: 42354658@qq.com

[5] 李江, 黄忠仕, 黄仁彬, 等. 复方六月雪颗粒提取工艺研究[J]. 中国药房, 2005, 16(1): 16.

[6] Mbsmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1/2): 55.

[7] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 143.

[8] Gressner A M, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(1): 76.

[9] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(2): 209.

[责任编辑] 聂淑琴