

抗纤复方影响大鼠肝贮脂细胞生成 I、II型胶原的比较研究

张 斌, 王灵台, 陈建杰(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

摘要: 用免疫细胞化学染色法观察抗纤复方药物血清对大鼠正常肝传代贮脂细胞和纤维肝原代贮脂细胞 I、II型胶原表达的影响, 并对 I 型和 II型胶原的表达量进行比较分析。结果: 传代贮脂细胞 II型胶原增加显著, 而纤维肝贮脂细胞 I 型胶原增加明显, 抗纤复方能显著抑制贮脂细胞表达胶原, 且对传代贮脂细胞 II型胶原和纤维肝原代贮脂细胞 I 型胶原抑制作用更明显。

关键词: 肝纤维化; 贮脂细胞; 胶原; 抗纤复方

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2000)01-0033-03

Effect of Kangxian Chinese Prescription on Production of Collagen

Type I and III of Hepatic Fat Storing Cells

ZHANG Bin, WANG Ling-tai, CHEN Jian-jie

(Shuguang Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200021)

Abstract: The effects of the drug-containing sera from Kangxian Chinese prescription on the expression of collagen type I and III in subcultured fat storing cells from normal liver and primary fat storing cells from fibrous liver of rats were investigated by using immunocytochemical staining. The prescription could significantly inhibit the expression of collagen in fat storing cells. The action was stronger on collagen type III in subcultured fat storing cells and collagen type I in primary fibrous hepatocytes.

Key words: hepatic fibrosis, fat storing cells, collagen, Kangxian chinese prescription

肝纤维化的形成, 主要表现在细胞外基质(ECM)过量合成和降解减少, 其中以胶原的过度合成、沉积为主, 几乎肝脏各种细胞都参与了胶原的生成过程, 但较多的研究显示, 贮脂细胞是肝脏胶原的主要来源细胞^[1]。本文观察了抗纤复方对大鼠贮脂细胞生成胶原的影响, 对 I、II型胶原进行了比较研究。

1 材料与方法

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠, 体重 350~400g, 由中科院上海实验动物中心提供, 肝纤维化大鼠为 DMN 复制。

1.2 主要试剂 IV型胶原酶、Pronase E、Nycodenz、二甲基亚硝胺(DMN)均为 Sigma 公司产品; DMEM 培养基为 GIBCO BRL 公司产品; 小牛血清购自上海第二医科大学科技中心实验室。兔 Col I (1:50)、Col III (1:

100) 胶原抗体购自上海医科大学病理教研室, ABC 染色试剂盒为 VECTOR 公司产品。

1.3 药物和药物血清的制备 抗纤复方(由黄芪、丹参、郁金、地鳖虫、鸡内金、紫河车、姜黄等药物组成)由曙光医院制剂室制成口服液制剂, 含 2g 生药/ml; 秋水仙碱(Serva 公司产品)配制成 3mg/100ml 浓度。将抗纤复方和秋水仙碱给大鼠灌胃 1 周, 每天 1 次, 末次给药后 1h 无菌条件下取血, 分离血清, 56℃ 灭活 30min, 分装冻存备用。

1.4 贮脂细胞分离、培养^[2] 大鼠麻醉后行门静脉插管, 输入 D-Hank's 液冲净肝脏血液, 换酶灌流液(含 0.05% IV型胶原酶、0.1% Pronase E 的 Hank's 液)循环灌流, 取下肝脏剪碎用酶消化液(0.05% IV型胶原酶、0.02% Pronase E、0.01% DNA 酶的 Hank's

液)再次消化,离心洗涤后的肝脏细胞经18% (w/v) Nycodenz 密度梯度离心,得到纯化的贮脂细胞,用20%小牛血清的DMEM悬浮至 5×10^5 /ml接种培养。正常肝贮脂细胞长满单层后传代培养,取传二代细胞用于实验,肝纤维化大鼠肝贮脂细胞仅原代培养。

1.5 免疫细胞化学检测^[3] 贮脂细胞以 5×10^5 /ml细胞浓度接种于内置盖玻片的培养皿,贴壁培养5d后,分别换含10%抗纤复方药物血清,秋水仙碱药物血清和大鼠对照血清的DMEM培养液,处理培养72h,取出培养细胞片以ABC法做I、II型胶原染色。染色结果用SX-100计算机图像分析系统对各组细胞进行光密度测定,密度值越大表示阳性着色越深。胶原表达抑制率(%)=[(对照组密度值-药物组密度值)/对照组密度值]×100。

2 结果

2.1 正常肝传代贮脂细胞与纤维肝原代贮脂细胞I、II型胶原表达的比较 免疫细胞化学染色结果表明,传代贮脂细胞和纤维肝原代贮脂细胞I、II型胶原均见到明显的阳性着色,I、II型相关性分析结果表明,传代贮脂细胞II型胶原表达增加显著,I/III比为0.91,而纤维肝贮脂细胞I型胶原表达增加较II型更明显,I/III比为1.22(见表1)。

表1 正常肝与纤维肝贮脂细胞I、II型胶原表达的比较(密度值 $\bar{x} \pm s, n=20$)

	I型胶原	II型胶原	I/III比值
正常肝细胞	25.6±1.6	28.1±1.6	0.91
纤维肝细胞	26.8±2.0*	21.9±2.0**	1.22

注:与正常肝细胞比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.2 抗纤复方对传代贮脂细胞I、II型胶原表达的影响 抗纤复方药物血清处理的传代贮脂细胞I、II型胶原着色变浅,贮脂细胞I、II型胶原蛋白的表达被抑制,其中对II型胶原的抑制率较高。抗纤复方抑制胶原表达作用强于秋水仙碱(见表2)。

表2 抗纤复方对传代贮脂细胞I、II型胶原表达的影响(密度值 $\bar{x} \pm s, n=20$)

	I型胶原	抑制率 (%)	II型胶原	抑制率 (%)	I/III比值
对照血清	25.6±1.6		28.1±1.6		0.91
抗纤复方	11.0±1.7**	11.74	6.0±2.1**	18.13	1.83
秋水仙碱	17.1±2.6**#	6.83	9.3±1.9**#	15.42	1.84

注:与对照血清比较** $P < 0.01$;与抗纤复方比较# $P < 0.01$;下表同

2.3 抗纤复方对纤维肝贮脂细胞I、II型胶原表达的影响 抗纤复方药物血清能显著减少纤维肝贮脂细胞I、II型胶原的阳性着色,对I型胶原具有较高的抑制率,作用明显优于秋水仙碱组。秋水仙碱组贮脂细胞阳性着色也较对照血清组变浅,抑制II型胶原表达与抗纤复方接近(见表3)。

表3 抗纤复方对纤维肝贮脂细胞I、II型胶原表达的影响(密度值 $\bar{x} \pm s, n=20$)

	I型胶原	抑制率 (%)	II型胶原	抑制率 (%)	I/III比值
对照血清	26.8±2.0		21.9±2.0		1.22
抗纤复方	8.4±1.5**	14.93	7.9±1.9**	10.93	1.06
秋水仙碱	12.2±2.2**##	11.85	9.0±2.0**	10.07	1.36

3 讨论

胶原蛋白是肝脏ECM中最主要的一类组成成分,I型、III型和IV型胶原占绝大部分,肝纤维化的主要病理改变为胶原产生过多而降解减少,肝纤维化早期首先IV型胶原增加,随后逐渐降低,II型胶原增多,并呈优势性表达,I型胶原在进展期和晚期逐渐增加,I型和II型胶原均明显增多,且以I型为主^[4]。体外实验发现,培养的贮脂细胞内外存在胶原,这些胶原主要是I型、III型和IV型,培养第3d,II型、IV型和I型胶原分别占45%、45%以及10%,培养第7d,比例转为40%、15%和45%^[5],表明贮脂细胞培养时间不同,产生胶原类型存在差异。

正常肝来源的贮脂细胞经过传代培养

后,细胞特性和产生胶原表型发生一系列改变,胶原的表达量也明显增加,被视为纤维化的体外细胞模型,广泛运用于肝纤维化研究的体外实验,为了更接近肝纤维化时体内贮脂细胞的胶原表达状态,实验同时采用了纤维肝来源的原代培养贮脂细胞。以免疫细胞化学染色检测传代培养贮脂细胞和原代培养纤维肝贮脂细胞胶原蛋白表达,见到I型和II型胶原的阳性着色。观察了抗纤复方对贮脂细胞胶原表达的影响,结果表明抗纤复方对这两种贮脂细胞I型和II型胶原蛋白的表达均有抑制作用。

从本文研究结果的I、II型胶原相关性分析,抗纤复方对正常传代细胞的II型胶原和纤维肝原代细胞的I型胶原抑制率较高。肝纤维化时,贮脂细胞产生胶原的总量和种类发生改变,这种变化与肝纤维化的进程密切相关,纤维化早期II型胶原增加较显著,后期逐渐表现为I型胶原表达增强。正常肝分离的贮脂细胞经传代培养约需2周,而纤维肝贮脂细胞的体内造模过程则为4周,实验结果表明,传代贮脂细胞II型胶原表达增加

显著,纤维肝贮脂细胞I型胶原表达增加更明显,可否认为这两种细胞分别具有纤维化早期和晚期贮脂细胞的特征,尚需进一步研究证实,但从抗纤复方对I、II型胶原抑制率的差异,似可认为抗纤复方能选择性地抑制肝纤维化各阶段不同胶原类型的过量合成。

参考文献:

- [1] 杨晔、曾民德、江绍基. 肝脏细胞外基质与细胞的相互作用[J]. 国外医学消化系疾病分册, 1994, 12(2): 69
- [2] 张斌,王灵台,陈建杰. 大鼠肝贮脂细胞和肝细胞的同时分离与培养[J]. 中西医结合肝病杂志, 1998, 8(4): 212
- [3] 倪灿荣. 免疫组织化学实验新技术及应用[M]. 北京:北京科学技术出版社, 1993. 128
- [4] 杜卫东,张月娥,翟为溶,等. CCl₄ 诱导大鼠肝纤维化动物模型I、III及IV型胶原生成变化的研究[J]. 中华病理学杂志, 1992, 26(2): 74
- [5] Knittel T, Sohuppan D, Meyer KH, et al. Differential expression of collagen type I, III, and IV by fat-storing (Ito) cells in vitro[J]. Gastroenterology, 1992, 102(5): 1724

(收稿日期: 1999-05-25)