

扶正化癥方对大鼠肝星状细胞旁分泌与自分泌活化途径的干预

姜春萌* 刘成 上海中医药大学肝病研究所 (上海 200032)

摘要: 为研究扶正化癥方对肝星状细胞(HSC)旁分泌与自分泌活化途径的干预,用含药(由桃仁、丹参、虫草菌丝等组成的319方)血清分别添加于大鼠损伤肝库普弗细胞(KC)与传代HSC(MFBC)中培养,制备含药血清作用过的KC条件培养液(IKCM)与MFBC条件培养液(MCM);并以添加正常血清制备的条件培养液为对照,温育大鼠原代HSC。通过MTT法观察对HSC增殖与ELISA法观察对HSC分泌Ⅲ型胶原的影响。结果显示,IKCM与MCM可明显促进HSC的增殖与Ⅲ型胶原的分泌;扶正化癥方则明显抑制了这一作用。提示扶正化癥方对HSC旁分泌与自分泌活化途径有明显的抑制作用。

关键词: 扶正化癥方;肝星状细胞;库普弗细胞;旁分泌;自分泌;Ⅲ型胶原

中图分类号: R 259.573.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1008-861X(2002)02-0051-03

肝星状细胞(Hepatic Stellate Cell, HSC)的活化是肝纤维化形成与发展的中心环节^[1],旁分泌活化途径是HSC活化启动的关键因素,肝库普弗细胞(Kapffer Cell, KC)是这种旁分泌激活的主要细胞之一。HSC活化后转化为肌成纤维样细胞(Myofibroblaste-like Cell, MFBC),可产生一系列细胞因子自分泌激活静止的HSC,是HSC活化得以持续的主要因素^[2]。本文通过含药血清添加法,观察扶正化癥方(简称319方)对上述HSC活化旁分泌与自分泌途径的干预。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性Wistar大鼠,SPF级。体重200g~300g,分离KC用;300g~400g,制备含药血清用;400g~500g,分离HSC用,均由上海中医药大学动物中心提供。

1.1.2 主要试剂与仪器 链酶蛋白酶E、Ⅲ型胶原酶、Nycodenz、鼠尾Ⅲ型胶原标准品, Sigma公司产品;199培养基、F12培养基、DMEM培养基、RPMI-1640培养基, Gibco公司产品;兔抗鼠Ⅲ型胶原抗体, Cal-

biochemic公司产品;辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体、噻唑蓝(MTT)、小牛血清(FBS),购自华美生物工程公司;兔抗人Desmin抗体,复旦大学医学院病理教研室提供;羊抗兔CD68抗体, Santa Cruz公司产品。CO₂培养箱, HERAEOS公司产品;倒置显微镜IX700型, Olympus公司产品;恒流泵, Watson Junelow公司产品;低温离心机, Heraeus公司产品;酶标仪, Lab-system Multiskan MS型, Labsystem公司产品。

1.1.3 细胞株 貂肺M-I-LU上皮细胞株、L929细胞株,购自中科院上海细胞生物研究所细胞库。

1.1.4 药物 319方由桃仁、丹参、虫草菌丝等组成,配制成浓度为0.04g/ml的灌胃液。

1.2 方法

1.2.1 急性肝损伤模型 造模大鼠以50%CCl₄-橄榄油溶液灌胃,0.05ml 0.1kg⁻¹,48h后分离KC。

1.2.2 含药血清制备 参照本所方法制备^[3]。其中药物灌胃的用量相当于临床成人用量的10倍。

1.2.3 损伤肝KC(KC)分离培养 方法参照文献^[4]并改进。肝脏常规灌注消化,细胞悬液经11%和16.5%Nycodenz双层不连续密度梯度离心(1400g,20min),取两层密度之间细胞培养1h,洗弃未贴壁细胞,贴壁者为KC,得率为1×10⁷/肝,纯度>90%。

1.2.4 HSC分离培养 参照本所方法进行^[5]。

基金项目:上海市教委发展基金资助项目(98C14)

*现在大连医科大学第二附属医院工作

1.2.5 含药血清 IKC 与 MFBC 条件培养液制备分离原代培养 24h 的 IKC 与传代的 HSC(MFBC) 均分 2 组, 每组 4 复孔, 分别更换含 10% 319 药物血清与 10% 对照血清的 F12 培养液, IKC 培养 24h; MFBC 培养 48h 后弃上清, 换无血清 199 培养液继续培养 24h, 收集上清, 分别为含药血清与对照血清作用过的 IKC 条件培养液(319 - IKCM 与 C - IKCM) 及 MFBC 条件培养液(319 - MCM 与 C - MCM)。

1.2.6 药物血清对 HSC 的作用 原代 HSC 随机分为对照组、C - IKCM 组与 319 - IKCM 组, 分别加入 10% FBS199 培养液、20% C - IKCM/10% FBS199 培养液与 20% 319 - IKCM/199 培养液, 分别培养 24h、48h、72h。以同样方法添加 MCM 条件培养液培养 HSC。

1.2.7 HSC 增殖检测 上述各组培养到各时间点后, 用 MTT 法测定^[6], 以酶标仪显示吸光度 A 值表示。

1.2.8 HSC 型胶原分泌量测定 上述各组添加条件培养液温育 48h 后, 换无血清 199 培养液继续培养 24h, 收集上清与细胞层, 用 ELISA 法测定 型胶原含量^[7]。

1.2.9 统计方法 t 检验。

2 结果

2.1 含药血清对 IKCM 促 HSC 增殖的影响

C - IKCM 组在培养 48h 和 72h 后, HSC 的 MTTA 值明显高于对照组, 表明对 HSC 的增殖有明显的促进作用; 含药血清作用后, 则明显抑制了这种病理性促进作用(见表 1)。

表 1 含药血清对 IKCM 促 HSC 增值作用的影响($n=4, \bar{x} \pm s, A$ 值)

Table 1 Influence of 319 Drug-Containing Serum on IKCM in promotion of HSC proliferation

Groups	A Value		
	24h	48h	72h
Control Groups	0.31 \pm 0.01	0.32 \pm 0.02	0.37 \pm 0.02
C - IKCM	0.32 \pm 0.01	0.42 \pm 0.05 *	0.47 \pm 0.05 *
319 - IKCM	0.32 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01 #	0.32 \pm 0.03 #

Note: In Comparison with control Group, * $P < 0.01$; In comparison with C - IKCM, # $P < 0.01$ (the same below)

2.2 含药血清对 MCM 促 HSC 增殖的影响

MCM 培养 HSC 24h 与 48h 对其增殖无影响, 培养 72h 后则有明显促 HSC 增殖作用。含药血清明显抑制了 HSC 的增殖(见表 2)。

表 2 319 含药血清对 MCM 促 HSC 增殖的影响($n=4, \bar{x} \pm s, A$ 值)

Table 2 Influence of 319 Drug-Containing Serum on MCM in promotion of HSC proliferation

Groups	A Value		
	24h	48h	72h
Control Group	0.30 \pm 0.01	0.34 \pm 0.05	0.39 \pm 0.06
C - IKCM	0.30 \pm 0.01	0.31 \pm 0.03 *	0.47 \pm 0.06 *
319 - IKCM	0.23 \pm 0.02	0.31 \pm 0.01 #	0.38 \pm 0.03 #

2.3 含药血清对 IKCM 促 HSC 分泌 型胶原的影响

对照组与 C - IKCM 组 HSC 型胶原分泌量分别为 63.09 \pm 9.72ng/ml 与 128.75 \pm 25.55ng/ml, 后者明显增加($P < 0.01$)。319 - IKCM 组 HSC 型胶原分泌量为 75.16 \pm 7.04ng/ml, 明显低于 C - IKCM 组($P < 0.01$)。

2.4 含药血清对 MCM 促 HSC 分泌 型胶原的影响

对照组 HSC 型胶原分泌量为 22.34 \pm 5.21ng/ml, C - MCM 组分泌量明显高于对照组, 为 67.74 \pm 27.39ng/ml ($P < 0.01$), 药物作用过的 319 - MCM 组则明显低于 C - MCM 组, 为 19.55 \pm 8.17ng/ml ($P < 0.01$)。

3 讨论

肝脏损伤时, HSC 在病理因素刺激下活化, 发生表型与功能的变化, 生成过量的细胞外基质, 并沉积于肝脏, 使纤维化形成与发展。刺激 HSC 活化的因素非常多, 涉及到细胞-细胞、间质-细胞间相互作用, 但途径不外两条, 即旁分泌途径与自分泌途径^[2]。其中肝 KC 的旁分泌在启动 HSC 活化中起着重要作用。文献报道, 正常肝 KC 对 HSC 并无激活作用, 而损伤后 KC 激活作用明显增加^[8]。我们在以往实验中得到同样结果。HSC 活化转化成 MFBC 后自分泌 TGF₁、PDGF 等细胞因子使得活化得以持

续^[2]。本实验观察显示,IKCM与MCM可明显增进HSC的增殖与Ⅰ型胶原的分泌,反映了上述HSC通过旁分泌与自分泌激活的途径。

319方通过临床与动物实验证实有良好的抗肝纤维化作用,体外实验显示该方对HSC的激活与胶原分泌的抑制是其抗肝纤维化作用的主要机制,并且还能抑制KC与MFBC分泌TGF₁、PDGF等细胞因子^[3,7,10]。本次实验,在IKCM与MCM中添加了含319方的中药药物血清后,显示可明显抑制HSC的增殖与Ⅰ型胶原的分泌。由此可见,药物不仅可直接作用于HSC,而且还可通过抑制KC与MFBC细胞因子的分泌来抑制HSC旁分泌与自分泌的活化途径,从而抑制了HSC的活化,达到抗肝纤维化的作用。

参考文献:

- [1] 姜春萌,刘成,刘平.肝纤维化过程中肝星状细胞的研究进展[J].中华消化杂志,2000,20(4):256-260.
- [2] Gressner AM. Cytokines and cellular Crosstalk involved in the activation of fat-storing cells[J].J - Hepatol. 1995,22(2 suppl):28-36.
- [3] 姜春萌,刘成,刘成海.扶正化痰方对大鼠CC₄损伤肝Kupffer细胞功能的影响[J].中西医结合肝病杂志,2000,10(5):26-28.
- [4] Janousek J,Stmen E and Cervais F. Purification of Kupffer cells by centrifugal elutriation[J].Journal of Immunological methods. 1993,164:109-117.
- [5] 徐列明,刘成,刘平,等.一种稳定和高产的肝贮脂细胞分离法.细胞生物学杂志[J],1995,17(3):143-封底.
- [6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J].J Imm Meth. 1983,65:55-63.
- [7] 刘成海,王晓玲,刘平,等.扶正化痰319方药物血清对肝星状细胞Ⅰ型胶原及转化生长因子表达的影响[J].中国中西医结合杂志,1999,19,412-414.
- [8] Masaki M. Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor :implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis[J].Hepatology. 1990,11:599-605.
- [9] 姜春萌,刘成,刘成海,等.大鼠急性CC₄损伤肝库普弗细胞对

肝星状细胞增殖与Ⅰ型胶原分泌的影响[J].肝脏,2000,5(2):91-92.

- [10] 刘成,刘成海,刘平,等.扶正化痰方抑制大鼠贮脂细胞增殖的研究[J].中国中医药科技.1997,4,97-99.

Interference of "Resistance-Strengthening and Stasis-Dispersing Formula" on Activation Channel of Para-Secretion and Auto-Secretion in Hepatic Stallate Cells

JIANG Chun-men, LIU Cheng

Institute of Hepatopathy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine

Abstract:

In order to study interference of "Resistance-Strengthening and Stasis-Dispersing Formula" on activation channel of parasecretion and auto-secretion in hepatic stallate cells (HSC), serum contained with drug (319 formula composed of Semen Persicae, Radix Salviae Miltiorrhizae, Cordyceps hyphae, etc.) was respectively added in rat injured Kupffer's cells (IKC) and generation-transmitted HSC (MFBC) for culture to prepare KC conditioned culture fluid (IKCM) and MFBC conditioned culture fluid (MCM) functioned by drug-containing serum, with conditioned culture fluid added with normal serum as comparison, for breeding primary generation of rat HSC, to observe HSC proliferation by MTT and to observe influence on Type collagen of HSC secretion by ELISA. The results showed that IKCM and MCM could remarkably promote HSC proliferation and secretion of type collagen, but "Resistance-Strengthening and Stasis-Dispersing Formula" obviously inhibited this function, indicating that "Resistance-Strengthening and Stasis-Dispersing Formula" possesses an obvious inhibitory function on activation channel of para-secretion and auto-secretion in hepatic stallate cells.

Key Words:

"Resistance-Strengthening and Stasis-Dispersing Formula", hepatic stallate cells, Kupffer's cells, para-secretion, auto-secretion, type collagen