

实验研究 ·

扶正化瘀 319 方药物血清对肝星状细胞 Ⅰ型胶原及转化生长因子 Ⅰ表达的影响*

刘成海 王晓玲 刘平 刘成 谭英姿 顾宏图

内容提要 目的:探讨扶正化瘀 319 方抗肝纤维化的主要作用机理。方法:分离正常大鼠肝星状细胞,并传代培养。用扶正化瘀 319 方给正常大鼠灌胃,制备药物血清,温育培养细胞。胶原酶消化法测定细胞内外胶原生成率,ELISA 法测定培养上清的 Ⅰ型胶原含量,免疫细胞化学染色、图像分析半定量转化生长因子 Ⅰ(TGF Ⅰ)蛋白表达,R^T-PCR 法分析 Ⅰ型前胶原、TGF ⅠmRNA 的表达量。结果:扶正化瘀 319 方药物血清能明显抑制肝星状细胞的细胞内外胶原生成率,抑制细胞的 Ⅰ型前胶原基因表达及其胶原分泌,抑制肝星状细胞 TGF Ⅰ与蛋白表达。结论:扶正化瘀 319 方能明显抑制肝星状细胞的活化,对肝星状细胞 Ⅰ型前胶原及 TGF ⅠmRNA 表达的抑制可能是该方抗肝纤维化的主要作用机理。

关键词 扶正化瘀 319 方 肝纤维化 肝星状细胞 Ⅰ型胶原 转化生长因子 Ⅰ 基因表达

Serapharmacological Effect of Fuzheng Huayu 319 Decoction on Expression of Type Ⅰ Collagen and Transforming Growth Factor Ⅰ in Hepatic Stellate Cells Liu Chenghai, Wang Xiaoling, Liu Ping, et al *Institute of Liver Disease, Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)*

Objective: To investigate the main serapharmacological mechanism of antifibrotic action of Fuzheng Huayu 319 Decoction (FHD) at cellular and molecular level. **Methods:** Hepatic stellate cells (HSC) were isolated from the normal rats and subcultured. Normal rats were medicated with FHD and their blood serum collected to prepare the medicated serum, which was incubated with the subcultured HSC. Then, the extra and intracellular collagen synthetic rates were assayed with collagenase digestion method, type Ⅰ collagen content in the medium measured with ELISA, transforming growth factor Ⅰ (TGF Ⅰ) protein production semiquantified by immunocytochemistry stain and image analysis system, the gene expressions of type Ⅰ procollagen and TGF Ⅰ analyzed by R^T-PCR. **Results:** FHD medicated serum could obviously inhibit the extra and intracellular collagen synthetic rates, decreased type Ⅰ procollagen mRNA expression and its secretion, downregulate TGF Ⅰ mRNA and its protein expression. **Conclusion:** FHD could inhibit HSC activation markedly, the main mechanism of its antifibrotic action may be the medicated serum inhibition on type Ⅰ procollagen and TGF Ⅰ gene expression.

Key words Fuzheng Huayu 319 Decoction, liver fibrosis, hepatic stellate cells, type Ⅰ collagen, transforming growth factor Ⅰ, gene expression

动物实验与临床观察发现扶正化瘀 319 方(以下简称 319 方)能有较好的保护肝细胞功能,抗肝纤维化效果^(1,2),为了进一步了解该方的抗肝纤维化作用机理,我们采用整体动物体内给药,分离药物血清,作用于体外培养细胞的血清药理学实验方法,探讨该方对肝星状细胞 Ⅰ型胶原与转化生长因子 Ⅰ(Transforming growth factor Ⅰ, TGF Ⅰ)蛋白及其基因(mRNA)

表达的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠,体重 400 ~ 500g,分离肝星状细胞用;体重 200 ~ 300g,制备药物血清用。动物购自中国科学院上海实验动物中心。

1.2 药物及药物血清制备 319 方由虫草菌丝、桃仁、丹参、松黄、七叶胆组成,上海中华制药厂协助制成流浸膏,每克流浸膏含生药 8.16g。按我们既往方

*国家自然科学基金资助项目(No. 39570889,39700192)
上海中医药大学肝病研究所(上海 200032)

法制备药物血清⁽³⁾,即对照血清组以生理盐水,药物血清组以 65kg 成人等体重 10 倍量的 319 方流浸膏,间隔 2h 灌胃大鼠 2 次,再 1h 后,下腔静脉采血,离心,分离血清,56℃、30min 灭活后使用。

1.3 PCR 引物 参照文献^(4,5)方法。

2 方法

2.1 肝星状细胞分离培养 用改良 Friedman 方法⁽⁶⁾,以 0.015 % 胶原酶和 1 % 链酶蛋白酶原位消化正常大鼠肝脏,12 % Nycodenz 梯度离心,获取肝星状细胞;以含 10 % 小牛血清的 199 培养液,在含 5 % CO₂ 潮湿空气的培养箱中培养。细胞长满单层后,经胰蛋白酶消化并传一代培养。

2.2 细胞胶原生成率的测定 传代细胞在 6 孔板中长至近单层时,加 5 %、10 %、20 % 药物血清温育 48h,其后换为含氘标记脯氨酸(³H)Pro, 185 KBq/孔)、抗坏血酸 50μg/ml、-氨基丙腈 100μg/ml 的无血清 DMEM 培养液,培养 24h,分别收集培养上清和细胞层样本,按 Greet's 方法⁽⁷⁾,测算细胞外与细胞内的胶原生成率。

2.3 细胞型胶原分泌量测定 经 10 % 药物血清温育 48h,收集培养上清及细胞层。ELISA 法测定培养上清型胶原含量,即包被样本及不同浓度型胶原标准品,兔抗大鼠抗型胶原抗体孵育,羊抗兔 IgG-HRP 结合,邻苯二胺及过氧化氢底物显色,Multi-skan MS 酶标仪上 492nm 波长处测定 OD 值,自动计算标准曲线与样品中型胶原含量。Bio-Rad 总蛋白试剂盒测定细胞层样本总蛋白含量。胶原分泌量以“胶原(ng)/细胞层总蛋白(mg)”表示。

2.4 细胞 TGF₁ 表达测定 经 10 % 药物血清温育 48h,收集细胞爬片,经 TGF₁ 抗体孵育,ABC 法免疫细胞化学染色。经同济医科大学清平影像公司 MPIAS500 彩色病理分析系统,分析阳性染色的积分光度(面积 × 平均光度)。

2.5 型胶原及 TGF₁ mRNA 分析 方法参照文献⁽⁸⁾。经 10 % 药物血清温育 48h,收集细胞,异硫氰酸胍一步法提取总 RNA,逆转录合成相应 cDNA。取 cDNA 2μl,加入 45μl PCR 混合物(包括 10 倍浓度的 PCR 缓冲液 5μl,1mmol/L 脱氧核糖核酸 1μl,50pmol/μl 型胶原或 GAPDH 或 TGF₁ 的上下游引物各 1μl、Taqase.2.5u),进行 PCR 扩增。扩增产物经 2 % 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,紫外透射反射仪下图像摄入,分析其积分光度。扣除相应内参照 GAPDH 积分光度值,即为型前胶原或 TGF₁ 胶原 mRNA 的相对表达量。

2.6 统计学方法 采用 t 检验。

结 果

1 细胞培养及 319 方药物血清对细胞形态的影响 新分离细胞的得率为(2~5) × 10⁷ 个星状细胞/肝脏,台盼蓝染色细胞活力在 95 % 以上。细胞鉴定依据相差显微镜下富含脂滴的形态及结蛋白免疫细胞化学染色等,原代细胞纯度 90 % 以上,传代后细胞纯度 95 % 以上。对照血清及药物血清均能维持细胞良好生长,显微镜下细胞形态无明显改变。

2 319 方药物血清对细胞胶原生成率的作用 见表 1。随血清浓度增加,对照血清组细胞内外胶原生成率呈上升趋势,药物血清组呈下降趋势,与同浓度对照血清比较,10 %、20 % 浓度药物血清能明显抑制传代活化肝星状细胞的细胞内外胶原生成率(P < 0.05)。

表 1 319 方药物血清对肝星状细胞胶原生成率的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	血清浓度	n	细胞内	细胞外
对照血清	5 %	6	0.42 ± 0.18	4.02 ± 1.63
	10 %	6	0.48 ± 0.16	4.49 ± 1.28
	20 %	6	0.58 ± 0.26	4.80 ± 1.47
药物血清	5 %	6	0.26 ± 0.10	3.12 ± 30.88
	10 %	6	0.25 ± 0.06 *	2.71 ± 1.04 *
	20 %	6	0.24 ± 0.08 *	2.59 ± 1.06 *

注:与同浓度对照血清组比较,* P < 0.05

3 319 方药物血清对细胞型胶原蛋白分泌及其 mRNA 表达的作用 见表 2。与对照血清组比较,扶正化瘀 319 方药物血清能明显抑制肝星状细胞的型胶原的分泌量(P < 0.01),抑制其 mRNA 表达(P < 0.05)。

表 2 319 方药物血清对肝星状细胞型胶原蛋白分泌及其 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	型胶原蛋白分泌量 (ng/mg 细胞层总蛋白)	型胶原 mRNA 表达量 (%)
对照血清	87.79 ± 15.34(6)	94.62 ± 10.23(5)
药物血清	58.61 ± 8.57 ** (6)	78.10 ± 9.42 * (5)

注:与对照血清组比较,* P < 0.05,** P < 0.01;()内为样本数

4 319 方药物血清对细胞 TGF₁ 蛋白及其基因表达的作用 见表 3。免疫细胞化学染色与凝胶电泳

表 3 319 方药物血清对肝星状细胞 TGF₁ 蛋白及其 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF ₁ 蛋白表达量 (OD 值)	mRNA 表达量 (%)
对照血清	142.49 ± 15.26(3)	82.45 ± 8.61(5)
药物血清	105.22 ± 8.14 * (3)	55.33 ± 6.51 * (5)

注:与对照血清组比较,* P < 0.05;()内为样本数

结果经图像分析表明,药物血清可明显抑制肝星状细胞 TGF β_1 蛋白 ($P < 0.05$),抑制其 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。

讨 论

肝纤维化是各种慢性肝病的共同病理特点。近年来大量研究表明,肝星状细胞是其病理形成的细胞学基础⁽⁹⁾,TGF β_1 是纤维增生的主要细胞因子⁽¹⁰⁾。因此,抑制肝星状细胞的活化及其 TGF β_1 分泌,有重要的抗肝纤维化意义。

肝星状细胞受炎性细胞因子等病理因素刺激后活化,大量增殖并生成胶原等细胞外基质(extracellular matrix, ECM),沉积于肝脏,形成肝纤维化。其在体外无包被的塑料培养皿中培养,可自发向肌成纤维样细胞转化,具有体内活化的生物学特征,是较理想的抗肝纤维化细胞模型⁽⁹⁾。我们的既往研究表明,整体动物灌胃中药,采集含药血清作用于培养细胞的血清药理学方法⁽³⁾,可较好的反映复方药效作用及用于复方的细胞分子药理研究;并且发现 319 方药物血清无细胞毒性,可抑制体外传代活化肝星状细胞的增殖,抑制二甲基亚硝胺肝纤维化模型大鼠体内活化肝星状细胞的增殖及其胶原生成率⁽¹¹⁾。肝纤维增生的主要成分是一型胶原,其先在细胞内转录转移为前胶原,分泌到细胞外加工形成胶原。本实验中发现,319 方药物血清对肝星状细胞的胶原合成与分泌率、一型胶原分泌量及其一型前胶原 mRNA 的表达均有显著抑制作用,表明该方不仅能抑制肝星状细胞总体数量的增多,更重要的在于抑制细胞的胶原基因表达及其蛋白生成,抑制单个细胞的纤维增生能力。

肝纤维化过程中,TGF β_1 通过旁分泌与自分泌两种方式,启动与维持肝星状细胞的活化,调节细胞增殖,促进胶原基因的转录与 ECM 增生。实验中发现药物血清对 TGF β_1 的基因及蛋白表达有明显抑制作用,提示该方抑制肝星状细胞活化的机理可能在于抑制细胞 TGF β_1 的表达及其自分泌,阻止细胞活化的持续放大,并可能通过 TGF β_1 生成的减少,影响 TGF β_1 细胞内信号传导,从而下调细胞一型前胶原的基因转录。

中医学认为肝纤维化的病机特点多为正虚血

瘀⁽¹²⁾。319 方以虫草菌丝等益精补虚,桃仁、丹参等活血化瘀,共奏扶正化瘀之效,用于具有肝纤维化病理改变的慢性肝炎、肝硬化患者,有显著改善肝功能、减少肝脏结缔组织增生沉积等良好临床疗效⁽¹⁾。本实验结果则进一步表明该方抗肝纤维化的作用机理可能主要在于抑制肝星状细胞的活化,抑制其 TGF β_1 及其胶原基因的表达。

参 考 文 献

1. 刘平,胡义扬,徐列明,等.扶正化瘀 319 方抗大鼠肝纤维化的研究.中国实验方剂学杂志 1997;3(4) 20—24.
2. 徐列明,刘平,刘成,等.扶正化瘀 319 方治疗慢性乙型肝炎肝纤维化.中华肝脏病杂志 1997;5(4) 207—209.
3. 刘成海,刘平,刘成,等.抗肝纤维化中药复方血清药理学方法探讨.中国实验方剂学杂志 1998;4(2) 16—19.
4. Nicoletti A, Heudes D, Appay MD, et al. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. Hypertension 1995;26(1) 101—111.
5. Yuji I, Gallucci RM, Luster MI, et al. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. Hepatology 1997;26(6) 1530—1537.
6. Alpini G, Aragona E, Dabeva M, et al. Distribution of albumin and alpha-fetoprotein mRNA in normal, hyperplastic and preneoplastic rat liver. American J Pathology 1992;141(3) 623—632.
7. Greets A, Vrijssen R, Rauterberg J, et al. In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. J Hepatol 1989;9 59—68.
8. Dieffenbach CW, Dveksler GS. RCP 技术指南.北京:科学出版社,1998 201—241.
9. Friedman SL. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. Sem in Liver Dis 1990;10(1) 20—29.
10. 刘成海,胡义扬,刘平,等.转化生长因子 β_1 与肝纤维化.中华肝脏病杂志 1996;4(1) 51—54.
11. 刘成海,刘成,刘平,等.扶正化瘀方对二甲基亚硝胺大鼠纤维化肝原代脂肪细胞形态及功能的影响.中国中西医结合脾胃杂志 1997;5(1) 32—35.
12. 史宇广,单书健主编.肝炎肝硬化专辑.北京:中医古籍出版社,1988 348—353.

(收稿:1998-07-27 修回:1999-03-20)