

扶正化瘀复方药物血清对大鼠肝贮脂细胞增殖及胶原合成的影响*

刘成海 刘 成** 刘 平** 徐列明

(上海中医药大学 2000032)

摘要 采用正常大鼠灌胃给药、分离血清而体外作用培养细胞的血清药理学方法,探讨扶正化瘀方对培养大鼠肝贮脂细胞功能的影响。结果表明该复方血清无明显细胞毒性,抑制细胞增殖及胶原合成,而且该作用与复方的体内给药方式、给药剂量、取血时间、药物血清作用浓度等有一定关系。

关键词 扶正化瘀方 血清药理学 抗肝纤维化 贮脂细胞

Effect of Sera Containing Fuzheng Huayu (FZHY) Decoction on Ito Cell Proliferation and Collagen Synthesis in Rats

Liu Chenghai, Liu Cheng, Liu Ping, Xu Lieming

(The center of liver disease research, Shanghai University of TCM, Shanghai, 200032)

Abstract: Using a serum pharmacological method that the sera, derived from the rats orally taking FZHY, were incubated with cultured Ito cells (Fat-storing cells, passage 1) of the rats, it was investigated that FZHY affected Ito cell functions such as cell proliferation and collagen synthesis. The results showed that the FZHY sera had no cytotoxicity towards the Ito cells inhibited cell proliferation and collagen synthesis. Furthermore, this inhibition had a positive relation with administration and dosage of the FZHY decoction blood-taken time, and the concentration of the sera in the culture, was concluded that the inhibition of FZHY on Ito cells may be one of mechanisms through which liver fibrosis was prevented with it.

Key words: Fuzheng Huayu (FZHY) Decoction, Serum Pharmacology, Ito Cell (Fat-storing cell), Anti-liver Fibrosis

扶正化瘀方由虫草菌丝、桃仁、丹参等组成,既往的临床观察和动物实验发现该方能促进胶原降解、抑制胶原合成,促进肝脏结构和功能的恢复,有良好的抗纤维化作用^[1]。贮脂细胞是肝脏细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)合成的主要细胞,在肝纤维化病理过程中起着重要作用^[2]。为了明确该复方

抗肝纤维化的作用机制,本文采用正常大鼠灌胃给药后采血、分离血清的方法,观察药物血清对体外培养的大鼠肝贮脂细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠,体重 350—500g, SPF 级,普通大鼠饲料喂养,自由饮水,由上海中医药大学实验动物中心提供。

* 国家自然科学基金资助课题(No.39570889)

** 上海市中医药研究院肝病研究中心,导师

1.2 主要试剂

无钙 MEM 培养基 (Minimum Essential Medium Eagle, MEM)、199 培养基 (199 Medium)、DMEM 培养基 (Duboc modified Eagle's medium) 均购自 GIBCO 公司; 链酶蛋白酶 (Pronase E)、Ⅵ 型胶原酶 (Collagenase)、Ⅲ 型 DNA 酶 (DNase)、三碘苯甲酰葡萄糖 (Matrizamide) 均购自 Sigma 公司。

1.3 药物 扶正化瘀方 (又名扶正祛瘀方、319 肝平胶囊、319 方) 由虫草菌丝、桃仁、丹参等组成, 由上海中华制药厂中心实验室协助制成流浸膏, 每克流浸膏含生药 2.703 克。

1.4 方法

1.4.1 药物血清的制备 设低、中、高 3 个剂量组, 分别以 5.5%、11%、33% 浓度的浸膏稀释液, 按 10ml/Kg 大鼠体重剂量灌胃给药 (相当于 60Kg 成人每日用量的 5 倍、10 倍、30 倍); 对照组喂以等量生理盐水。采用一次及二次重复 (2h 后相同剂量重复给药一次) 给药方法。设 3 种采血时相, 分别于给药后 30min、1h、2h。无菌条件下自下腔静脉采血, 1700 离心, 取血清。每种条件 (剂量、给药方式、时相等) 选用 2—4 只动物, 将相同条件所采动物血清混合, 56℃、30min 灭活, -70℃ 冷藏备用。

1.4.2 贮脂细胞的分离及培养 按本中心常规方法进行^[4]。细胞得率 $2 \sim 5 \times 10^7$ /个肝脏, 细胞活力 (台盼蓝染色) 98% 以上, 细胞鉴定依据相差显微镜下富含脂滴的典型形态及结蛋白 (Desmin) 免疫组化染色阳性, 细胞纯度 90% 以上。

1.4.3 细胞增殖测定 24 孔板传一代培养贮脂细胞长满单层后, 分别用不同剂量浓度的药物血清的 199 培养液温育细胞 48h, 加入 ^3H -标记胸腺嘧啶脱氧核苷 (^3H -TdR, 2.5μCi/孔), 24h 后收集细胞, 固相膜片法测定 CPM 值。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = (1 - \frac{\text{药物组 CPM}}{\text{对照组 CPM}}) \times 100$$

1.4.4 细胞胶原生成测定 参照 Greets 方法^[5], 6 孔传一代贮脂细胞长满单层后, 以含 10% 不同剂量给药的动物血清的 199 培养液温育 72h, 更换含 ^3H -标记脯氨酸 (^3H -Proline) 5μCi/ml、抗坏血酸 50μg/ml、β-氨基丙脯 100μg/ml 的 DMEM 培养液 1ml, 24h 后分别收集培养上清液及细胞层。各样本的培养上清液及细胞层样本先充分透析, 各取 0.1ml 测总 CPM (CPMt), 继而各取 200μl, 加胶原酶 (纯化 Ⅲ 型胶原酶, 100u/ml) 100μl 消化, 三氯醋酸沉淀、离心, 取 0.4ml 上清液, 测胶原酶敏感蛋白质的 CPM (CPMc), 同时设空白管对照 (以 Tris-HCl 缓冲液代替胶原酶) 计数 (CPMb), 按以下公式分别计算培养上清液 (细胞外) 与细胞层 (细胞内) 中胶原在 ^3H -Proline 掺入总胶原中的相对生成量及胶原生成抑制率。

$$\text{胶原}(\%) = \frac{100}{5.4 \times \frac{(\text{cpm}_t - \text{cpm}_c)}{(\text{cpm}_c - \text{cpm}_b)} + 1}$$

$$\text{胶原生成抑制率}(\%) = (1 - \frac{\text{药物组胶原}}{\text{对照组胶原}}) \times 100$$

1.4.5 ^3H -Proline 细胞内掺入活力试验 传代贮脂细胞药物血清温育 48h 后, 更换含 ^3H -Proline 的 DMEM 培养液 (每孔含 ^3H -Proline 2.5μCi) 24h 后收集细胞, 测定 CPM 值, 方法同 ^3H -TdR 掺入法。

统计学处理 双侧 t 检验。

2 结果

2.1 正常大鼠血清对贮脂细胞增殖的影响

正常大鼠血清无论灭活与否均可维持贮脂细胞的贴壁生长, 与小牛血清相比较其细胞内 ^3H -TdR 掺入明显减少。但两组大鼠血清细胞内 ^3H -TdR 掺入则无明显差异 ($P < 0.05$), 因此以上实验全部采用灭活血清。(表 1)

2.2 扶正化瘀复方药物血清对培养贮脂细

胞形态及活力的影响

表 1 正常大鼠血清、小牛血清对贮脂细胞³H-TdR 掺入影响的比较($\bar{X} \pm SD$)

组 别	n	cpm/well
小牛血清	4	3724.90±485.59
灭活大鼠血清	4	2864.50±239.45 *
未灭活大鼠血清	4	2579.43±235.45 *

注:血清浓度 10%,n 为同一血清培养液的细胞样本数每一孔细胞为一个样本,(下同);与小牛血清比较 *P<0.05

所用药物及对照血清均可维持细胞正常生长,细胞无明显形态改变。以对照组³H-Proline 细胞内掺入率(3610.68±999.47cpm/well)为 100%,加入低、中、高剂量药物的血清的细胞内掺入率分别为 182.19±46.83%、266.30±26.03%、126.30±70.09%,表明药物血清对细胞活力无抑制影响,即无明显毒性作用,而且低中剂量药物血清可促进细胞内³H-Proline 掺入(P<0.05)。

表 2 中剂量二次给药不同时相药物血清对贮脂细胞³H-TdR 掺入的影响($\bar{X} \pm SD$)

组 别	n	cpm/well
对照组	4	2013.88±628.87
30min 药物血清组	4	1443.95±453.88
1h 药物血清组	4	1090.33±345.56 *
2h 药物血清组	4	390.58±246.30 *

注:与对照组相比 *P<0.05, * *P<0.01

2.3 药物血清对贮脂细胞增殖的影响

表 4 中剂量二次给药 1h 时相药物血清不同稀释浓度对贮脂细胞³H-TdR 掺入的影响($\bar{X} \pm SD$)

浓 度	n	对照组(cmp/well)	药物组(cmp/well)	抑制率(%)
5%	4	1481.90±168.03	703.03±138.37 *	52.56±9.34
10%	4	2013.88±628.87	637.33±214.53 *	68.35±10.68
20%	4	2709.88±788.19	480.20±264.31 *	82.27±9.75

注:与同浓度对照组比较 *P<0.05

2.4 对贮脂细胞胶原生成的影响 用不同剂量二次给药后 1h 的药物血清作用于贮脂细胞,发现药物血清对细胞内、外胶原生成都

2.3.1 给药后不同时相采血的药物血清对贮脂细胞增殖的影响 一次给药后 1h、2h 药物血清对细胞³H-TdR 的掺入无明显影响,二次重复给药后 30min 的药物血清亦无明显作用。而二次给药 1h、2h 的药物血清能明显抑制细胞³H-TdR 掺入。(表 2)

2.3.2 不同剂量给药后的药物血清对贮脂细胞增殖的影响 不同剂量二次给药后 1h 的药物血清作用贮脂细胞,发现各剂量组药物血清均能抑制细胞增殖,且随灌服剂量增加,其³H-TdR 掺入逐渐减少,呈剂量依赖性趋势。(表 3)

表 3 二次给药不同剂量药物血清对贮脂细胞³H-TdR 掺入的影响($\bar{X} \pm SD$)

组 别	n	cpm/well	抑制率(%)
对照组	4	2864.50±239.15	0
低剂量组	4	1979.65±76.67 *	30.94±2.65
中剂量组	4	1882.05±112.08 *	34.29±3.91
高剂量组	4	1781.93±49.69 *	37.79±1.74

注:与对照组比较 *P<0.05

2.3.3 不同浓度药物血清培养液对贮脂细胞增殖的影响 将中剂量二次给药后 1h 的药物血清以 5%、10%、20%不同作用浓度温育细胞,发现随正常血清浓度增加,³H-TdR 的掺入逐渐增加;而随药物血清浓度增高,³H-TdR 的掺入减少,对细胞增殖的抑制呈浓度依赖性。(表 4)

有一定抑制作用。细胞外胶原生成量较多,而且随剂量增加,药物血清对细胞外生成抑制增强。(表 5)

表5 不同剂量药物血清对贮脂细胞胶原生成的影响($\bar{X} \pm SD$)

组别	n	细胞内(%)		细胞外(%)	
		胶原	胶原生成抑制率	胶原	胶原生成抑制率
对照组	4	0.84±0.37	0	4.61±2.13	0
低剂量组	4	0.57±0.04	35.42±4.59	3.48±1.01	25.16±20.13
中剂量组	4	0.48±0.08	42.58±10.14	2.63±0.68	43.36±14.61
高剂量组	4	0.56±0.09	33.33±10.78	2.25±0.73	51.41±15.69

3 讨论

贮脂细胞位于肝脏狄氏间隙内,肝脏炎性等损伤后,贮脂细胞数量增多并活化为肌成纤维样细胞,大量合成新的胶原、蛋白多糖等细胞外基质,在肝纤维化病理过程中起着关键作用^[6]。抑制贮脂细胞的增殖、活化及其胶原等生成,有着重要的抗肝纤维化意义。本实验初步发现扶正化瘀方药物血清能明显抑制贮脂细胞增殖,且抑制程度与药物剂量及其血清浓度有关,即药物剂量与血清浓度越高细胞增殖抑制越明显;而且对贮脂细胞细胞内外胶原生成也有一定的抑制作用。这种作用效果可能是该方抗肝纤维化的部分作用机理。

中药复方由于其成份复杂,药代动力学等难以明了,干扰因素较多,给从体外细胞分子水平研究其药理机制带来许多困难。有的复方体外研究用其乙醇提取物或浸煎剂等直接加入培养液,作用于细胞。由于复方的复杂性,直接添加后可能会引起培养液渗透压、pH值等改变,影响细胞的生存环境,而乙醇对细胞及蛋白质也有一定的影响,因而有时难以正确反应复方的作用机理。日本学者^[7]等报导的整体动物体内给药、分离血清进行体外实验研究的方法为解决中药复方的体外实验研究提示了一条新的途径。临床中复方大多经口服吸收、肝脏代谢、进入血液循环而发挥作用,因此血清添加法较好地反应了复方的作用方式,并避免了直接添加的弊端。

³H-Proline 细胞内掺入可反应细胞的活力^[8],实验中未发现药物血清对其掺入有抑制作用,相反能促进其掺入即促进细胞活

力,排除了药物血清对细胞的毒性作用。用正常大鼠血清培养贮脂细胞,与小牛血清相比其细胞内³H-TdR 掺入减少,除种属差异外,可能与动物的年龄/月龄有关(所用大鼠均为成年大鼠)。

我们在实验中发现一次给药后 1h、2h 血清对细胞增殖无明显抑制,二次重复给药后 30min 血清亦无明显作用,而二次重复给药后 1h、2h 血清则出现明显抑制作用,表明给药方式以二次重复给药为好。而且作用效果呈剂量与浓度的依赖性,说明药物血清中确实是复方药物在起作用,而不是血清中其他物质及培养液成分变化的影响。上述结果进一步表明体内给药后分离血清的体外添加法是一较为稳定有效、符合生理实际的实验方法。

参 考 文 献

- [1]刘成,刘平,胡义杨等. 中医杂志. 1994;35: 602
- [2]Bissell DM, Friedman SL, Maheer JJ, et al. Hepatology 1990;11: 488
- [3]Alpini G, Phillips JO, Vroman B, et al. Hepatology 1994;20: 494
- [4]徐列明,刘成,刘平等. 细胞生物学杂志 1995; 117(3): 143
- [5]Greets A, Vrijssen R, Rauterberg J, et al. J Hepatology 1989;9: 59
- [6]Friedman SL. N Eng J Med 1993;24: 1828
- [7]获原幸夫,细谷英吉,山村雄一. Excerpta Medica, Ltd, Tokyo 1988
- [8]Mallat A, Preaux AM, Blazejewski S, et al. Hepatology 1995;21: 1003