

丹参含药血清对肝星状细胞增生的抑制作用

谈 博, 张奉学, 刘 妮, 郭兴伯

谈博, 张奉学, 刘妮, 郭兴伯, 广州中医药大学热带医学研究所
广东省广州市 510405
谈博, 男, 1974-07-20 生, 湖北省武汉人, 汉族人, 1997 年北京中医药大学
本科毕业, 2002 年广州中医药大学博士毕业, 助理研究员, 主要从事肝炎、
肝纤维化的研究。
广东省自然科学基金资助项目, No. 000347
项目负责人: 张奉学, 510405, 广东省广州市机场路 12 号, 广州中医药大学
热带医学研究所. doczhang@tom.com
电话: 020-36585461 传真: 020-86373516
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-02-13

Inhibitory effect of Danshen-containing serum on proliferation of HSC-T6 cells

Bo Tan, Feng-Xue Zhang, Ni Liu, Xin-Bo Guo

Bo Tan, Feng-Xue Zhang, Ni Liu, Xin-Bo Guo, Tropical Medicine
Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine,
Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Supported by the Guangdong Natural Science Foundation, No. 000347
Correspondence to: Dr. Feng-Xue Zhang, Tropical Medicine Institute,
Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 12 Airport Rd.,
Guangzhou, 510405, Guangdong Province, China. doczhang@tom.com
Received: 2004-02-13 Accepted: 2004-03-04

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of Danshen-containing serum on the proliferation of HSC-T6 cells and to construct anti-hepatic-fibrosis *in vitro* system for screening potential herbal drugs.

METHODS: The proliferation status of HSC-T6 cells was evaluated by calculating its growth curve and cloning efficiency. HSC-T6 cells were exposed to different volume fractions of Danshen-containing serum, including 80%, 40%, 20%, 10%, and 5% of original serum, and its inhibitory effect and dose-effect relationship were investigated.

RESULTS: The population doubling time of HSC-T6 was 10.57 hours and its cloning efficiency was 82.4%, which showed that this cell line had good capacity of activity and proliferation for tests. Ranging from 5% to 80% of original concentration, Danshen-containing serum had the dose-dependent inhibitory effect on HSC-T6 cell (analysis by linear regression, coefficient of correlation=0.9487).

CONCLUSION: The Danshen-containing serum has significantly inhibitory effect on proliferation of HSC-T6 cells in a dose-dependent manner.

Tan B, Zhang FX, Liu N, Guo XB. Inhibitory effect of Danshen-containing serum on proliferation of HSC-T6 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(6):1357-1360

摘要

目的: 研究丹参含药血清对肝星状细胞(HSC)的增生抑制作用,

并探讨中药抗肝纤维化筛选平台的建立。

方法: 测定HSC-T6细胞的细胞生长曲线和克隆形成率, 观察其细胞增生状况。取原始血清体积分数的 80%, 40%, 20%, 10%, 5% 的丹参含药血清作用于 HSC-T6 细胞, 观察其增生抑制效应及量效关系。

结果: HSC-T6 细胞的细胞群体倍增时间为 10.57 h, 克隆形成率为 82.4%, 说明该转化细胞系的活力较好, 增生能力较强。在 5-80% 浓度范围之内, 丹参含药血清抑制 HSC 细胞增生作用呈剂量依赖性(经直线回归分析, 相关系数 $r=0.9487$)。

结论: 丹参含药血清能明显抑制 HSC-T6 细胞增生, 呈剂量依赖性。

谈博, 张奉学, 刘妮, 郭兴伯. 丹参含药血清对肝星状细胞增生的抑制作用. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1357-1360

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1357.asp>

0 引言

肝星状细胞的增生是肝纤维化病理发生发展过程中非常重要的关键环节。有体外实验表明^[1-2], 活血化瘀中药复方对于肝星状细胞增生有抑制作用, 这部分说明了其体内抗肝纤维化的作用机制。但是, 由于中药复方组分繁多, 不易分清到底是哪些药物起主导作用。因此, 我们从丹参的单药入手^[3-4], 借助现代血清药理实验方法, 探讨其对肝星状细胞增生的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM 培养基(高糖型)、新生小牛血清、胰蛋白酶及 HEPES 皆购自美国 Gibco 公司; L- 谷氨酰胺及 EDTA, Amresco 进口分装, 上海生工生物工程公司; MTT, 美国 sigma 公司。含药血清制备, 取 SD 大鼠, ♂, 质量 275 ± 15 g, 合格证号: 医实动第 26-2001A003 号, 由广州中医药大学实验动物中心提供。丹参 1 000 g, 购自广州中医药大学第一附属医院, 水煎浓缩成 100% 浓度(即 1 kg/L)。参照临床常用药量, 以 10 g/kg 剂量给大鼠灌药^[5-6], 连续 3 d, 2 次/d; 于第 3 d 给药后 1 h 用 100 mL/L 水合氯醛麻醉动物(剂量为 3.5 mL/kg); 用 750 mL/L 酒精消毒后仰卧位固定, 无菌条件下分离一侧颈总动脉, 注入肝素 50 U/kg, 用 7 号头皮针头插入颈总动脉进行采血, 离心分离血清(3 000 r/min \times 20, 4 $^{\circ}$ C), 经 56 $^{\circ}$ C, 30 min

灭活后,再以 0.45 μm 及 0.2 μm 双层微孔滤膜过滤除菌后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 方法^[7] 肝星状细胞 HSC-T6 细胞株由上海中医药大学肝病研究所徐列明教授惠赠,以 DMEM(高糖)培养液(含 100 mL/L 胎牛血清)培养 2-3 d 可以传代,中间换液 1 次。传代时吸出旧培养液,用 DMEM(高糖)培养液清洗细胞一遍,加入 2.5 g/L 胰蛋白酶消化至细胞收缩,立即加入含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液 5 mL,终止消化,吹打贴壁细胞,使成细胞悬液,然后按 1:2 比例接种于培养瓶内,每瓶再加含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液 10 mL,置培养瓶于 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 培养,8 h 即可贴壁生长;2-3 d 后细胞 60-70% 铺满瓶底即可再次传代,传至 3-4 代,细胞生长活跃,增生明显即可用于实验。取待测生长状态良好细胞,增长至接近汇合时,向培养瓶内加 1 mL 2.5 g/L 胰蛋白酶,温箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化,至细胞接近脱离瓶壁前吸出消化液,加入新的培养液,轻轻吹打制备成细胞悬液,并计数;取 24 孔培养板,接种等量细胞悬液 21 孔,分 7 组,每组 3 孔;从实验第 2 d 起,依次计数检测各组的细胞总数,并计算各组的均值,直至第 7 组结束;根据记录绘制细胞生长曲线,并按下列公式计算细胞群体倍增时间(DT)= $t/\log 2 \div (\log N_t - \log N_0)$ 。t 代表培养时间, N_0 及 N_t 分别代表接种后及培养 t 小时后的细胞数。

1.3 克隆形成率(cloning efficiency)的检测^[8] 取 80-90% 汇合的细胞,用 2.5 g/L 胰蛋白酶,温箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化,制备成单细胞悬液,并计数;根据细胞计数稀释成 2 个细胞/ cm^2 (24 孔板的底面积为 2 cm^2)的极低浓度,接种到 24 孔塑料培养板,置于培养箱培养(37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2);细胞贴壁后,记录每孔内实际接种的细胞数;隔 24 h 观察细胞克隆是否形成;待细胞克隆形成,终止培养,镜下计算克隆数。计算克隆形成率:细胞克隆形成率=形成克隆数 \div 接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.4 MTT 比色法测定 HSC-T6 细胞增生^[9] 实验分为正常血清对照组,80% 给药血清组,40% 给药血清组,20% 给药血清组,10% 给药血清组和 5% 给药血清组。将细胞以 DMEM 培养液(含 100 mL/L 小牛血清)调成 $5 \times 10^5/\text{L}$ 的细胞悬液,接种于 96 孔培养板 100 μL /孔。在 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 条件下培养 48 h,更换无血清的 DMEM 培养液,孵育 12 h 后,加入 100 μL 含药血清,每组设 6 个平行孔,每孔的总体积为 200 μL 。置 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 , 饱和条件下培养 24 h,每孔加入 400 mg/L 的 MTT 溶液 100 μL ,继续培养 4 h 进行显色反应,可

见紫色甲臞颗粒。弃去 MTT 液,加 1 kg/L DMSO 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min,待孔内甲臞颗粒完全溶解后置酶标仪上测 570 nm 波长处吸光度(A 值)。并根据 A 值计算药物对细胞增生的抑制率(IE)= $1 - A_i / A_0$ 。其中,IE (inhibitory effect) 表示药物对细胞增生抑制率, A_i 表示某浓度下的吸光度值, A_0 表示对照组细胞的吸光度值。

2 结果

2.1 HSC-T6 的细胞生长曲线 HSC-T6 细胞经台盼蓝染色计数,95% 以上的细胞不着色,说明培养中的 HSC-T6 细胞成活率较高。细胞生长曲线有明显的增生迟滞期(0-48 h);在指数增生期(48-72 h)计算细胞群体倍增时间为 10.57 h;而且在 72 h 之后出现平台期,而且由于细胞的老化,甚至细胞数略有减少(84-96 h)。(图 1)。

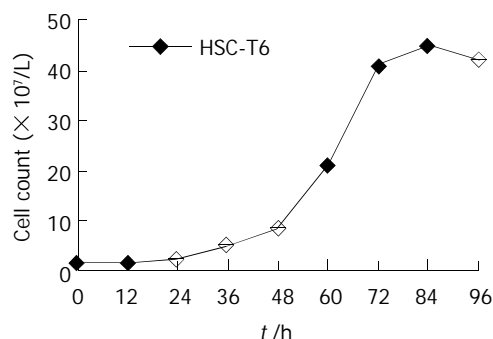


图 1 HSC-T6 细胞生长曲线。

2.2 克隆形成率 通过综合并计算 4 个复孔的接种细胞数和形成克隆的细胞数,得到 HSC-T6 细胞的克隆形成率为 $14/17=82.4\%$ 。说明该转化细胞系的活力较好,增生能力较强。

2.3 丹参含药血清对 HSC-T6 细胞增生的作用 在 5-80% 浓度范围之内,经直线回归分析得相关系数 $r=0.9487$,说明两个变量之间呈显著性正相关关系。丹参含药血清抑制 HSC 细胞增生作用呈剂量依赖性。经 SSPS 10.0 软件进行 ANOVA 分析,各剂量组的 A_{570} 值与对照组相比,均具有显著性差异($P < 0.05$, 表 1)。在 5-80% 这个浓度范围之内随着,丹参含药血清浓度的提高,细胞数有降低的趋势,即丹参含药血清抑制细胞增生的作用逐渐加强。若以抑制率(IE)作为纵坐标,以含药血清的对数浓度作为横坐标,作出量效曲线,可以更加清楚地看到其中的规律:丹参含药血清抑制 HSC 细胞增生活性呈明显剂量依赖性(图 2)。

表 1 丹参含药血清对 HSC-T6 细胞增生的影响

	培养液中丹参含药血清的体积分数					对照组
	80%	40%	20%	10%	5%	
A_{570}	0.76 ± 0.01	0.88 ± 0.07	0.93 ± 0.09	1.03 ± 0.02	1.13 ± 0.03	1.34 ± 0.05
抑制率	45.5%	34.3%	30.6%	23.1%	15.7%	-

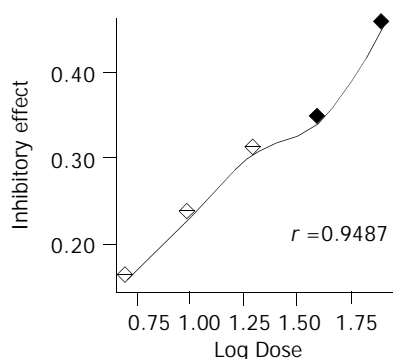


图2 丹参含药血清抑制 HSC-T6 细胞增生的量效曲线。

3 讨论

胶原代谢的异常和细胞外基质(ECM)构成变化是肝纤维化形成的主要特征,而有充足证据证明肝星状细胞是主要的 ECM 生成细胞,其激活和分泌活动增加是肝纤维化病理发生机制的重要环节^[10-11]。肝星状细胞的激活表现为复杂多样的表型,包括组织中显著的功能与病理改变,如细胞增生、纤维形成、细胞因子分泌紊乱及 ECM 降解等。尽管该领域的研究手段与方法已深入到分子生物学层次,但是抗肝纤维化药物对肝星状细胞增生的作用仍然是重点考察靶点之一^[12-13]。

基于中医辨证论治的精神,发挥中医药的传统优势,当前中医药抗肝纤维化的实验研究多采用临床验证有效的复方药物作为考察对象。其中多数复方具有活血化瘀功效:如中药复方丹参的长期治疗能使部分患者降低 P-III-P 和 LN 的水平至正常范围^[14];扶正化瘀方能抑制胶原合成,促进胶原降解,恢复肝脏结构及功能,且抑制大鼠脂肪细胞和肝细胞增生和胶原生成率^[1,2,15];血府逐瘀汤能抑制 I、III 型胶原^[16],抗纤方还可抑制 HSC-LI90 细胞 TIMP-1 的基因表达,从而促进胶原降解^[17-18]。另外,也有部分复方从清热利湿^[19]和疏肝软坚^[20-21]等多治则结合研究抗肝纤维化中药,如中药抗肝纤维颗粒可抑制 PDGF 诱导的 HSC 增生,并可能通过干扰 Ras-MEK-MAPK 信号通路发挥作用^[22-23]。但是,复方成分比较复杂,不易分清其针对某一特定模型的有效成分。因此,从中药单味药入手研究仍然有其积极意义。

在中药的体外研究引入血清药理学研究方法,这使得能一定程度上克服了传统的中药体外研究方法中的某些弊病^[24-25]。传统体外研究方法中,将药物提取物直接加入细胞培养液中,并不能反映药物在体内代谢中药物有效成分发生的变化;另外,在体外细胞药理实验中,往往需要使用比色法检测有关药效和毒理学指标,而许多中药制剂中所含色素或多或少地干扰了实验结果,影响了实验的可靠性。由于中药的有效成分可能是中药本身的化学成分,也可能是他在炮制或提取过程中产生的中间产物,还可能是进入体内后的代谢产物,甚至可能是内源性物质的激活物,通过采集药物代谢后的含药血清,血清药理学方法就能够模拟药物成分经代谢转化后再作用于靶细胞的作用模式。同

时,药物血清保持了一般血清的物理性状,适宜细胞培养的环境,能较好地满足比色分析法的实验要求^[26]。

本研究中的丹参具有一系列重要药理作用,如其有效成分丹酚酸 B 在体外有抗炎、抗氧化和抑制 HSC 增生与胶原合成的作用^[27-28],从丹参提取的单体 IH764-3 可诱导 HSC 凋亡^[29-30]。

我们以丹参含药血清作为施加因素,以 HSC-T6 细胞株为受试对象,并以 HSC 细胞增生作为效应指标。实验表明丹参含药血清能明显抑制 HSC 的细胞增生;而且这种效应呈剂量依赖性,即随着浓度的增加,其抑制增生的效应也越大。我们认为,以 HSC-T6 细胞增生作为效应指标和以中药含药血清作为样品所构建的中药抗肝纤维化体外细胞模型(药物筛选平台)具有所需样品量少,实验周期短,并且药物作用靶点(HSC-T6 细胞增生)明确等特点。

4 参考文献

- 刘成, 刘成海, 刘平, 徐列明, 胡义扬. 扶正化瘀方抑制大鼠脂肪细胞增生的研究. 中国中医药科技 1997;4:97-101
- 季光, 洪嘉禾, 刘平, 徐列明, 刘成. 扶正化瘀方对原代培养肝细胞增生及胶原生成率影响的血清药理学研究. 中国中医药科技 1997;4:101-103
- 马学惠, 赵元昌, 尹镭, 韩德五. 丹参对肝纤维重吸收的作用. 中西医结合杂志 1988;8:161-163
- 胡义扬, 刘平, 刘成, 顾宏图, 徐列明, 刘成海, 季光. 丹参提取物对 CCl₄ 和 DMN 诱导的大鼠肝纤维化的影响. 上海中医药杂志 1999;10:7-9
- 王力倩, 李仪奎, 符胜光, 付惠娣. 血清药理学方法研究探索. 中药药理与临床 1997;13:29-31
- 余黎, 王坚, 朱荃. 中药血清药理学研究中血清处理方法的探讨. 南京中医药大学学报(自然科学版) 2002;18:222-223
- Vogel S, Piantadosi R, Frank J, Lalazar A, Rockey DC, Friedman SL, Blaner WS. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. *J Lipid Res* 2000;41:882-893
- 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 第 1 版. 北京: 北京出版社, 1995:156-158
- 程宝鸾. 动物细胞培养技术. 第 1 版. 广州: 华南理工大学出版社, 2001:131-132
- Eng FJ, Friedman SL. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G7-G11
- Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:3-15
- Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001;5:315-334
- Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004;36:231-242
- 王惠吉, 王宝恩. 中药复方丹参(861 冲剂)治疗肝纤维化远期疗效观察. 中西医结合肝病杂志 1995;5:4-5
- 季光, 刘平, 洪嘉禾, 徐列明, 刘成. 扶正化瘀方药物血清对原代培养纤维肝细胞胶原生成及分泌白蛋白功能的影响. 中西医结合肝病杂志 1997;7:25-28
- 宋家武, 李绍白, 张文英. 血府逐瘀汤抗大鼠肝纤维化作用的研究. 中西医结合肝病杂志 1997;7:38-40
- Zhao G, Wang LT, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound contained serum on procollagen Type I and IV, matrix metalloproteinase and its tissue inhibitor-1 gene expression in HSC-LI90 cell line. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2004;24:47-50
- Wang LT, Zhang B, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound on collagen expression of hepatic cells in experimental liver fibrosis of rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:877-880
- 于世瀛, 贾长恩, 杨美娟, 赵丽云, 白锦雯. 清热利湿方药抗肝纤维化的形态学和免疫组织化学定量研究. 北京中医药大学学报 1997;20:28-30

- 20 顾立刚, 王庆国, 于世瀛, 庞鹤. 柴胡鳖甲汤对大鼠免疫损伤性肝纤维化的治疗作用. 上海免疫学杂志 1998;18:25-26
- 21 Zhang G, Zhang FC, Wang TC, Liang KH. The effects of Chinese national medicine of Huoxueruanjian compound on SMAD signal in hepatic stellate cell and its significance. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004;12:213-215
- 22 周正, 张赤志, 陈婕, 周萍. 抗纤软肝冲剂药物血清对肝星状细胞增生的影响. 中药材 2001;24:809-810
- 23 杨玲, 朱清静, 笪邦红, 张赤志. 中药抗纤软肝颗粒抑制 PDGF 诱导的肝星状细胞 MEK-1 和 c-fos 表达. 世界华人消化杂志 2004;12:347-350
- 24 杨彦芳, 王玉芹. 中药复方血清药理学方法规范化探讨. 中国中西医结合杂志 2000;20:380-382
- 25 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题. 中药新药与临床药理 1999;10:95-98
- 26 包金凤, 刘国卿. 中药血清药理学的方法学研究概述. 药学进展 2000;24:89-92
- 27 Liu P, Liu CH, Wang HN, Hu YY, Liu C. Effect of salvianolic acid B on collagen production and mitogen-activated protein kinase activity in rat hepatic stellate cells. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:733-738
- 28 Liu CH, Liu P, Hu YY, Xu LM, Tan YZ, Wang ZN, Liu C. Effects of salvianolic acid-A on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production in culture. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21:721-726
- 29 Zhang XL, Liu L, Jiang HQ. Salvia miltiorrhiza monomer IH764-3 induces hepatic stellate cell apoptosis via caspase-3 activation. *World J Gastroenterol* 2002;8:515-519
- 30 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库。该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70 167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84 948 条(54.76%)。

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序)。论文排序: 期刊论文数, 点击论文数。

2 网址

中国生物医学基金论文摘要 (<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体

3p21 区域一个表达下调的 **EST** 的鉴定. 癌症 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 **3p21** 区域一个表达下调的 **EST** 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287,30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点。本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础。方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选; 运用逆转录 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达; 并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况。结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5) 的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34) 的鼻咽癌活检组织检测到有 EST(N31985) 表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 染色体 3p21 区域 EST(N31985) 在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程。(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)