

消癥方对体外 CCl₄ 损伤大鼠原代肝细胞保护作用的研究

吴亚云, 程明亮, 李 宏, 陆 彤, 耿晓霞

吴亚云, 程明亮, 李宏, 陆彤, 耿晓霞, 贵阳医学院附属医院感染科
贵州省贵阳市 550004
贵州省自然科学基金资助项目, No. E-199
通讯作者: 吴亚云, 550004, 贵州省贵阳市云岩区贵医街 28 号, 贵阳医学院
附属医院感染科. qywuyy@21cn.com
收稿日期: 2005-03-01 接受日期: 2005-03-22

摘要

目的: 探讨消癥方抗肝纤维化作用的机理.

方法: 采用 IV 型胶原酶消化及 Ficoll 密度梯度离心的方法, 分离、培养大鼠肝细胞, 先加入 5%、10%、20% 药物血清干预体外培养的肝细胞 24 h, 再用四氯化碳(CCl₄)熏蒸法制造肝细胞损伤模型. 分别用 MTT 法及荧光实时定量 RT-PCR 法检测 CCl₄ 损伤后肝细胞的增殖、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)mRNA 表达, 并检测细胞培养上清中的谷草转氨酶(AST)活性.

结果: 消癥方药物血清能显著地促进 CCl₄ 损伤后肝细胞的增殖($P < 0.05$, $P < 0.01$). CCl₄ 损伤模型肝细胞内有一定量的 caspase-3mRNA 表达(6.96 ± 0.69 ng), 加 5%、10%、20% 正常大鼠血清干预后, 肝细胞 caspase-3mRNA 的表达(6.31 ± 0.64 , 6.01 ± 0.68 , 5.54 ± 0.58 ng)稍低于 CCl₄ 损伤模型, 加 5%、10%、20% 消癥方药物血清干预后, 肝细胞 caspase-3mRNA 的表达(5.51 ± 0.72 , 4.87 ± 0.45 , 3.08 ± 0.82 ng)显著下调($P < 0.05$, $P < 0.01$). CCl₄ 损伤模型肝细胞培养上清中 AST 活性为 1203.91 ± 86.85 nkat, 加 5%、10%、20% 正常大鼠血清干预后, 其培养上清中 AST 活性降低为 1092.39 ± 57.01 , 1025.54 ± 29.17 , 996.03 ± 53.68 nkat, 加 5%、10%、20% 消癥方药物血清干预后, 其培养上清中 AST 活性(998.70 ± 30.67 , 885.51 ± 44.82 , 753.48 ± 35.17 nkat)显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$). 消癥方药物血清对 CCl₄ 损伤后肝细胞增殖的影响、下调肝细胞 caspase-3mRNA 的表达及降低肝细胞培养上清中 AST 活性的作用, 均呈明显的血清浓度依赖关系.

结论: 消癥方抗肝纤维化机理与其保护肝细胞免受损害、抑制肝细胞凋亡有关.

吴亚云, 程明亮, 李宏, 陆彤, 耿晓霞. 消癥方对体外 CCl₄ 损伤大鼠原代肝细胞保护作用的研究. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1139-1141
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1139.asp>

0 引言

肝细胞凋亡与肝细胞坏死是肝纤维化发生发展的始动因素^[1]. 保护肝细胞、防止其变性、坏死, 促进肝细胞功能恢复, 在慢性肝病的治疗中具有重要意义. 消癥方由半枝莲、白花蛇舌草、断肠草等组成, 是贵州省施秉苗族同胞用于外敷治疗癥痕疙瘩的偏方, 鉴于中医异病同

治理论^[2], 我们已通过动物实验证明消癥方具有预防肝纤维化作用^[3], 但具体作用机理尚未完全清楚. 本实验通过观察消癥方药物血清对 CCl₄ 损伤后肝细胞的增殖、caspase-3mRNA 表达及培养上清中 AST 活性的影响, 旨在探讨消癥方抗肝纤维化作用机理.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar 雄性大鼠, 体重 200-350 g, 由贵阳医学院动物实验中心提供.

1.1.2 主要试剂 消癥方为细粉末状, 由贵州省施秉县苗族老人田兴兰提供, 用前用自来水配成所需浓度, 煮沸备用. IV 型胶原酶、RPMI-1640 培养基干粉、MTT (Sigma 公司); 小牛血清 (杭州四季青公司); 淋巴细胞分离液 (Ficoll) (上海华精生物公司); 培养板 (Nunc 公司); 促肝细胞生长素 (广东阳江制药厂); 糖原染色试剂盒 (上海红桥医用试剂实验研究所). $10 \times$ PCR Buffer II、10 mmol/L dNTP、50 μ mol/L OligodT、20 U/ μ L RNase Inhibitor、50 U/ μ L MuLr (RNA 反转录酶)、SYBRgreen DNAPCR 试剂盒、caspase-3 及内参照 β -action 引物均由美国国立卫生研究院癌症/环境卫生研究所刘杰博士惠赠. 引物序列如下: caspase-3 正向引物: 5'-TGCGCCATGCTGAACTG-3'; 反向引物: 5'-TGGCCACCTTCCGGTTAAC-3'; β -action 正向引物: 5'-TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCT-3'; 反向引物: 5'-GCTCAGTAACAGTCCGCTAGA-3'.

1.1.3 仪器 二氧化碳孵箱 (MC0175, SANYO), 紫外分光光度计、2400 型 PCR 仪、定量 PCR 仪、酶标仪, Beckman 全自动生化分析仪.

1.2 方法

1.2.1 消癥方药物血清的制备 10 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、消癥方给药组, 每组 5 只. 给药组按 5 g/(kg·d) 予消癥方灌胃, 正常组按 5 g/(kg·d) 灌予生理盐水, bid \times 3 d, 末次给药后 2 h 再重复灌胃 1 次, 1 h 后颈动脉放血, 收集血液, 1 500 r/min 离心 15 min, 混匀同组大鼠血清, 56℃ 水浴 30 min 灭活补体, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装, -80℃ 保存备用.

1.2.2 肝细胞的分离与鉴定 用 1% 巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 同时腹腔注射 5 000 U 肝素钠抗凝. 麻醉生效后, 用碘酒、酒精消毒, 打开腹腔, 用静脉输液管行门静脉插管, 灌入 D-Hank's 液 (15 mL/min), 同时剪断下腔静脉放血. 灌注至肝完全变为土黄色后, 小心分离肝脏, 移于平皿中用 0.5 g/L IV 型胶原酶继续循环灌

注, 至肝脏表面出现细小的液泡时剥去包膜, 小心取下肝脏, 剪碎. 吸肝组织悬液于100 mL三角烧瓶中37℃水浴箱中震荡消化20 min, 200目钢网过滤. 滤液500 r/min离心1-2 min, 洗涤3-4次, 5 mL沉淀物重悬于4倍体积的49.2%(V/V)Ficoll液上部, 进行梯度离心500 r/min × 5 min. 吸弃上清, 用RPMI-1640液沉洗2-3次, 沉淀细胞悬浮于RPMI-1640培养液中. 新分离的肝细胞用4 g/L台盼蓝溶液染色, 鉴定细胞活力并计算细胞数. 点涂片, 片干后用70 mL/L酒精固定约15 min, 行糖原染色(PAS染色)鉴定细胞的纯度^[4]. 阳性细胞于细胞质中见密集粉红色糖原颗粒, 胞核呈空泡状. 将原代肝细胞用含100 mL/L小牛血清、胰岛素5 mg/L、促肝细胞生长素20 mg/L、氢化可的松 10^{-6} mol/L、L-谷氨酰胺30 g/L、Hepes 50 mmol/L、青霉素 1×10^5 U/L、链霉素100 mg/L的1640培养液配成 2.5×10^8 /L浓度.

1.2.3 CCl₄熏蒸法制备肝细胞损伤模型^[5] 将浓度为 2.5×10^8 /L的原代肝细胞以按 1×10^5 /cm²种于96孔及24孔培养板中. 37℃、50 mL/L CO₂孵育箱中预培养24 h后, 更换新鲜培养液, 加入不同浓度的正常大鼠血清和消癥方药物血清(每组设5复孔), 继续培养15 h. 将培养板置于含0.4 mL/L浓度CCl₄的密闭盒内, 37℃下作用60 min后, 移出密闭盒常规培养36 h.

1.2.4 MTT比色法测定肝细胞的增殖 上述96孔培养板每孔加入5 g/L的MTT液20 μL. 继续孵育4 h, 每孔加入DMSO 200 μL, 稍振荡后, 用酶标仪于波长620 nm测其吸光度(A值). A值越高, 说明HSC的增殖越强.

1.2.5 肝细胞内caspase-3 mRNA表达的检测 吸弃上述24孔培养板培养上清, 每孔加入TRIzol 1 mL, 反复吹洗, 收集细胞悬液, 然后按以下步骤检测caspase-3 mRNA表达情况: (1) 提取、纯化各组HSC的总RNA: 按TRIzol Reagent说明书进行, 用紫外分光光度计检测总RNA纯度(RNA样品 $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$), 再计算其浓度. (2) 反转录合成cDNA: 100 μL的反应体系中, 25 mmol/L MgCl₂ 22 μL, $10 \times$ PCR Buffer II 10 μL, 10 mmol/L dNTP 20 μL, 50 μmol/L OligodT 5 μL, 2×10^7 U/L RNase

抑制剂2 μL, 5×10^7 U/L MuL_v(RNA反转录酶)2.5 μL, 最后补RNase-free H₂O至100 μL. 于PCR仪上反转录合成cDNA, 反应条件: 25℃ 10 min → 48℃ 60 min → 95℃ 5 min → 4℃保存. (3) 荧光实时定量PCR: 25 μL的反应体系中, $2 \times$ Buffer 12.5 μL, 正向引物(100 μmol/L) 0.5 μL, 反向引物(100 μmol/L) 0.5 μL, RNase-free H₂O 6.5 μL, 样本cDNA 5 μL. 于定量PCR仪上进行PCR反应, 条件如下: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min(1个循环) → 95℃ 15 s, 60℃ 1 min(40个循环). 反应结束后分析PCR过程中各样本Ct值, 绘制标准曲线, 以β-action为内参照, 参考文献[6]计算出各组mRNA含量(ng).

1.2.6 肝细胞培养上清AST的检测 收集上述24孔培养板培养上清, 经1 500 r/min离心3 min后, 用Beakman全自动生化分析仪测定AST.

统计学处理 计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示, 采用t检验.

2 结果

2.1 大鼠肝细胞产率、活力及纯度 采用Ficoll梯度离心平均每只大鼠获取 2.3×10^8 个肝细胞, 台盼蓝溶液染色鉴定细胞活力达90%以上, 糖原染色纯度高达98%以上.

2.2 消癥方对CCl₄损伤肝细胞增殖的影响 正常大鼠血清及消癥方药物血清对CCl₄损伤后肝细胞的增殖均有促进作用, 随浓度增高, 增殖逐渐增强, 呈浓度依赖关系; 与相同浓度的正常大鼠血清比较, 消癥方药物血清促肝细胞增殖作用更明显(表1).

2.3 消癥方对CCl₄损伤肝细胞内caspase-3 mRNA的影响 CCl₄损伤模型组有一定量的caspase-3 mRNA表达. 正常大鼠血清及消癥方药物血清均能显著下调肝细胞内caspase-3 mRNA的表达, 与同浓度的正常大鼠血清比较, 消癥方药物血清的作用更明显, 尤以20%浓度最显著(表1).

2.4 消癥方对CCl₄损伤肝细胞培养上清AST的影响 CCl₄损伤肝细胞模型培养上清的AST活性明显增高. 采用正常大鼠血清及消癥方药物血清干预的CCl₄损伤肝细胞培养上清的AST活性均较CCl₄损伤模型组明显降低, 与同浓

表1 不同浓度血清对CCl₄损伤后肝细胞增殖、caspase-3 mRNA表达及AST的影响(mean ± SD, n = 5)

组别	浓度(%)	吸光度(A值)	caspase-3 mRNA(ng)	AST(nkat/L)
CCl ₄ 损伤模型组	—	0.26 ± 0.03	6.96 ± 0.69	1 203.91 ± 86.85
正常大鼠血清组	5	0.28 ± 0.04	6.31 ± 0.64	1 092.39 ± 57.01
	10	0.31 ± 0.03	6.01 ± 0.68	1 025.54 ± 29.17
	20	0.32 ± 0.02 ^a	5.54 ± 0.58 ^a	996.03 ± 53.68 ^a
消癥方药物血清组	5	0.29 ± 0.03	5.51 ± 0.72 ^a	998.70 ± 30.67 ^{ad}
	10	0.38 ± 0.04 ^{be}	4.87 ± 0.45 ^{be}	885.51 ± 44.82 ^{bf}
	20	0.41 ± 0.02 ^{de}	3.08 ± 0.82 ^{bf}	753.48 ± 35.17 ^{df}

^aP<0.05, t = 3.25-4.55; ^bP<0.01, t = 5.45-8.12; ^cP<0.01, t = 9.38和10.76 vs CCl₄损伤模型组; ^dP<0.05, t = 3.12-3.23; ^eP<0.01, t = 5.87-8.46 vs 同浓度正常大鼠血清.

度的正常大鼠血清比较, 消癥方药物血清的作用更明显, 亦呈浓度依赖关系(表1)。

3 讨论

培养体系中的肝细胞可以很好地模拟体内肝脏生理环境, 可作为研究肝特异代谢过程和肝脏功能的重要工具^[7]。我们采用二步灌流联合Ficoll密度梯度离心方法分离肝细胞, 其纯度高达98%以上, 细胞活力达90%以上。CCl₄为不溶于水的无色液体, 是经典的亲肝毒物。利用其极易挥发的特点而设计的CCl₄熏蒸法制造肝细胞损伤模型, 方法简单易行, 成功率高^[5]。

我们通过用MTT法对消癥方药物血清干预的体外培养CCl₄损伤后大鼠肝细胞的增殖进行测定, 结果显示: 消癥方药物血清较正常大鼠血清显著地能促进肝细胞的增殖, 随血清浓度增高, 对肝细胞增殖的促进作用增强, 呈浓度依赖关系, 说明消癥方具有促进肝细胞再生作用, 有助于肝损伤时肝细胞的修复。在凋亡过程中的caspase联级反应中, caspase-3是主要的效应性caspase, 是细胞凋亡中公共的下游效应因子, 即凋亡下游的关键执行者, 在细胞凋亡中扮演重要角色。激活的caspase-3可进一步切割各种蛋白底物蛋白使细胞最终走向死亡^[8-9], 因此, 检测细胞内caspase-3的变化可作为判断细胞凋亡干预措施是否有效的可靠指标。caspase-3mRNA的表达与细胞凋亡呈正相关, caspase-3的定量检测还可克服形态学方法不能精确定量、亦不能很好地区别细胞的凋亡和坏死, 具有一定的假阳性等的不足^[10]。我们的结果表明: 随血清浓度增高, 消癥方药物血清较正常大鼠血清能显著下调肝细胞caspase-3mRNA的表达, 影响了蛋白酶的切割过程, 进而防止肝细胞凋亡和坏死的发生。细胞凋亡过程中的caspase激活涉及到两条途径, 即细胞表面死亡受体途径及线粒体途径, 有关消癥方是如何调控肝细胞信号

转导, 还有待进一步研究。

转氨酶活性是肝细胞损伤的敏感指标。肝细胞损伤时, 其细胞膜通透性发生改变, AST从肝细胞内泄漏至培养基中, 其活性的高低与肝实质细胞受损的程度一致。我们的结果显示: 随消癥方药物血清浓度增高, 肝细胞培养上清的AST下降, 提示消癥方具有防止肝细胞炎症、坏死及抗肝细胞损伤作用, 与整体动物实验结果吻合^[3]。总之, 我们从细胞水平证明消癥方具有保护肝细胞、防止其凋亡、变性和坏死作用, 阐明消癥方抗肝纤维化作用是通过减少引起肝纤维化的始动刺激因素而发挥的。

致谢: 本实验细胞培养部分在贵阳医学院免疫与干细胞中心完成, 得到左丽教授、舒利平讲师、赵星助教等同志的大力帮助, 在此一并致谢!

4 参考文献

- 1 Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004;39:273-278
- 2 张东伟, 牛建昭, 陈家旭, 王冠一. 异病同治理论在中医研究中的应用的思考. *世界科学技术—中医药现代化* 2002;5:16-21
- 3 吴亚云, 姚玉梅, 熊涛, 刘琴, 邓开盛, 程明亮. 苗族草药“消疤草”预防猪血清免疫性肝纤维化的实验研究. 第十三次全国中西医结合肝病学术会议会编 2003:276-278
- 4 谢华福, 甘淋, 李娟, 刘小燕, 宋杰, 李洪. 一种简单的肝细胞分离、培养和鉴定方法. *泸州医学院学报* 2003;26:306-307
- 5 孙燕荣, 董俊兴, 吕秋军, 吴曙光. 二咖啡酰奎宁酸对大鼠肝原代细胞保护作用的研究. *解放军药学报* 2004;20:80-84
- 6 Liu WH, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 2002;302:52-59
- 7 张莉萍, 康格非. 原代肝细胞培养的研究现状. *国外医学临床生物化学与检验学分册* 2004;25:193-196
- 8 Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med* 2000;108:567-574
- 9 张晓田. Caspase-3与细胞凋亡的研究. *医学综述* 2002;8:621-623
- 10 张勇, 沈佰华, 余奇文, 马安伦, 李宁丽, 张冬青. 用荧光定量检测caspase-3的活性. *细胞与分子免疫学杂志* 2001;17:188-190

编辑 张海宁