

益肝康等活血化瘀中药抑制 IL-1 β 刺激的 HSC 增殖及 TIMP-1 的表达

赵霞, 姚希贤, 张亚平, 郑文明

赵霞, 姚希贤, 张亚平, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

郑文明, 唐山市中医院 河北省唐山市 063000

赵霞, 女, 1979-01-08生, 河北省沙河市人, 汉族, 河北医科大学消化内科在读硕士研究生, 主要研究方向为慢性肝病肝纤维化。

通讯作者: 姚希贤, 050000, 河北省石家庄市, 河北医科大学第二医院消化病研究所. zhaoxia_0108@163.com

电话: 0311-87222831

收稿日期: 2005-09-21 接受日期: 2005-12-10

Yigankang inhibits proliferation of hepatic stellate cells and expression of TIMP-1 mRNA induced by interleukin-1 β

Xia Zhao, Xi-Xian Yao, Ya-Ping Zhang, Wen-Ming Zheng

Xia Zhao, Xi-Xian Yao, Ya-Ping Zhang, Department of Digestology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Wen-Ming Zheng, Tangshan Traditional Chinese Medical Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Xi-Xian Yao, Department of Digestology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhaoxia_0108@163.com

China. zhaoxia_0108@163.com

Received: 2005-09-21 Accepted: 2005-12-10

Abstract

AIM: To investigate the effects of the blood-activating and stasis-eliminating traditional Chinese medicines (TCM), including *Yigankang*, small compound of *Radix Salviae Miltiorrizae* (scRSM), and *Radix Salviae Miltiorrizae* (RSM), on the proliferation of rat hepatic stellate cells (HSCs) and expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) mRNA induced by interleukin-1 β (IL-1 β).

METHODS: The activated rat HSCs were cultured *in vitro* and then randomly divided into 8 groups, named A, B, C, D, E, F, G, and H. The rats in group A served as the controls, and those in the rest groups were treated IL-1 β (10 μ g/L), IL-1 β (10 μ g/L) plus *Yigankang* (2 g/L), IL-1 β (10 μ g/L) plus scRSM (2 g/L), IL-1 β (10 μ g/L) plus RSM (2 g/L), RSM (2 g/L), scRSM (2 g/L), and *Yigankang* (2 g/L), respectively. The proliferation of HSCs was detected by cell counting

kit-8 (CCK-8) and the expression of the TIMP-1 mRNA was detected by semi-quantitative reverse transcription chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The proliferation of HSCs and expression of TIMP-1 mRNA in group A were significantly higher than those in group F, G, H (1.291 ± 0.09 vs 1.055 ± 0.105 , 1 ± 0.07 , 0.883 ± 0.06 , $P < 0.01$; 0.591 ± 0.064 vs 0.493 ± 0.088 , 0.458 ± 0.076 , 0.356 ± 0.046 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$), and they were markedly lower in group H than those in group F and G ($P < 0.05$). The proliferation of HSCs and expression of TIMP-1 mRNA in group B were significantly increased in comparison with those in group A, C, D, and E (1.575 ± 0.017 vs 1.291 ± 0.09 , 0.906 ± 0.09 , 1.015 ± 0.081 , 1.097 ± 0.038 , $P < 0.01$; 1.369 ± 0.097 vs 0.591 ± 0.064 , 0.694 ± 0.078 , 0.854 ± 0.05 , 0.898 ± 0.12 , $P < 0.01$), but they were notably increased in group C than those in group D and E ($P < 0.05$).

CONCLUSION: *Yigankang* as well as scRSM and RSM can inhibit the IL-1 β -induced proliferation of HSCs and expression of TIMP-1 mRNA, by which it plays a protective role against liver inflammation and fibrosis. *Yigankang* is more effective than scRSM and RSM.

Key Words: *Yigankang*; *Radix Salviae Miltiorrizae*; Interleukin-1 β ; Hepatic stellate cell; Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1

Zhao X, Yao XX, Zhang YP, Zheng WM. *Yigankang* inhibits proliferation of hepatic stellate cells and expression of TIMP-1 mRNA induced by interleukin-1 β . *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):173-178

摘要

目的: 探讨活血化瘀中药益肝康、丹参小复方、丹参对IL-1 β 刺激的活化的大鼠肝星状细胞(HSCs)增殖及基质金属蛋白酶抑制因子mRNA(TIMP mRNA)表达的影响。

方法: 体外培养活化的大鼠HSC, 随机分为8

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝炎向肝硬化发展的必经阶段, 随慢性肝炎的发展, 肝纤维化逐渐加重。如何阻止肝纤维化的发展并逆转至正常, 已成为治疗各种慢性肝病的中心问题。目前尚乏理想的抗纤维化西药。中医中药治疗慢性肝炎肝纤维化, 疗效显著, 且无毒性, 显示出良好趋势。故本文旨在从细胞水平研究活血化瘀中药抗肝纤维化机制, 为抗肝纤维化新药开发打下基础。

■研究前沿

对中药抗肝纤维化的分子机制的研究有以下几个方面: (1)清除自由基, 去除肝纤维化形成的诱因; (2)抑制肝HSC活化和增殖; (3)阻断ECM合成, 包括直接抑制ECM各组分的合成和修饰, 或间接抑制TGF, IL-1等细胞因子的活性; (4)促进ECM的降解, 包括提高基质金属蛋白酶(MMP)的表达和活性或降低基质金属蛋白酶(TIMPs)的表达和活性。

组: 对照组(A组)、IL-1 β 10 μ g/L(B组)、IL-1 β 10 μ g/L+益肝康2 g/L干预组(C组)、IL-1 β 10 μ g/L+丹参小复方2 g/L干预组(D组)、IL-1 β 10 μ g/L+丹参2 g/L干预组(E组)、丹参2 g/L(F组)、丹参小复方2 g/L(G组)、益肝康2 g/L(H组)。加药后24 h, 应用活细胞计数试剂盒-CCK-8检测各组HSC增殖, 采用半定量RT-PCR方法检测各组HSC TIMP-1 mRNA的表达。

结果: A组HSC增殖和TIMP-1 mRNA表达强于F、G、H组(1.291 ± 0.09 vs 1.055 ± 0.105 , 1 ± 0.07 , 0.883 ± 0.06 , $P < 0.01$; 0.591 ± 0.064 vs 0.493 ± 0.088 , 0.458 ± 0.076 , 0.356 ± 0.046 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); H组HSC增殖和TIMP-1 mRNA表达低于F组和G组($P < 0.05$); B组HSC增殖和TIMP-1 mRNA表达均明显强于A组(1.575 ± 0.017 vs 1.291 ± 0.09 , $P < 0.01$; 1.369 ± 0.097 vs 0.591 ± 0.064 , $P < 0.01$)和C、D、E组(1.575 ± 0.017 vs 0.906 ± 0.09 , 1.015 ± 0.081 , 1.097 ± 0.038 , $P < 0.01$; 1.369 ± 0.097 vs 0.694 ± 0.078 , 0.854 ± 0.05 , 0.898 ± 0.12 , $P < 0.01$); C组HSC增殖和TIMP-1 mRNA表达低于D组和E组($P < 0.05$)。

结论: 益肝康等活血化癥中药能抑制IL-1 β 刺激的HSCs增殖及TIMP-1 mRNA表达, 发挥其抗肝纤维化功效。益肝康抗肝纤维化作用强于丹参小复方和丹参单药。

关键词: 益肝康; 白细胞介素-1 β ; 肝星状细胞; 基质金属蛋白酶-1

赵霞, 姚希贤, 张亚平, 郑文明. 益肝康等活血化癥中药抑制IL-1 β 刺激的HSC增殖及TIMP-1的表达. 世界华人消化杂志 2006; 14(2): 173-178

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/173.asp>

0 引言

肝纤维化的形成是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与降解失衡的结果。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)为肝脏产生ECM的主要细胞, 其活化、增殖是肝纤维化发生的中心环节^[1]。目前研究表明, 肝ECM代谢主要由基质金属蛋白酶(MMP)及其抑制因子(TIMPs)所调节。白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)是在局部和全身炎症反应中起核心作用的细胞因子之一^[2]。研究表明IL-1在促进HSC活化、增殖等过程中发挥重要作用, 并促进TIMPs的表达^[3]。迄今, 以丹参等活血化癥为主中药“益肝康”、丹参小复方均已证

实有肯定的抗肝纤维化作用^[4-6], 我们观察丹参为主的益肝康等活血化癥中药对IL-1 β 刺激的大鼠HSC增殖及TIMP-1 mRNA表达的影响, 探讨其抗肝纤维化作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 肝星状细胞株CFSC由美国Greenwel教授建株并惠赠, 其表型为活化的HSCs, 从CCl₄诱发的肝硬化大鼠中分离并通过培养使细胞自发获得永生性, 冷冻保存于液氮中。IL-1 β 购自英国PeproTech公司; 活细胞计数试剂盒-CCK-8(cell counting kit-8)购自日本株式会社同仁化学研究所; 逆转录试剂盒购自Promega公司; 总RNA提取试剂(Trizol)、TaqDNA聚合酶、dNTP均购自北京赛百盛公司; TIMP-1和内参照GAPDH引物由北京赛百盛公司合成; RPMI-1640培养基购自Gibco公司, 新生牛血清购自杭州四季青生物制品公司。中药购自石家庄乐仁堂。益肝康系重用丹参, 由黄芪、归尾、赤芍、白术等组成; 丹参小复方由丹参、黄芪、归尾组成。

1.2 方法

1.2.1 中药的制备 生药浸泡过夜, 反复煮三次, 药液离心去杂质, 置于旋转蒸发仪上蒸去水分。浓缩药液再次离心去杂质后按1:3体积比加入950 mL/L乙醇4℃沉淀过夜, 去除蛋白成分, 将上清药液再置于旋转蒸发仪上蒸去乙醇和水制成中药浓缩纯化液。用含10 mL/L新生牛血清的RPMI-1640培养液配置成所需浓度, 干预细胞前用滤器过滤。干预后预实验细胞用台盼蓝染色, 细胞计数活细胞数大于95%。

1.2.2 细胞培养 将冷冻保存于液氮中的HSC细胞复苏后接种于含100 mL/L新生牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素、4 mmol/L谷氨酰胺及1 mmol/L HEPES的RPMI-1640培养液中, 37℃ 50 mL/L CO₂条件下培养。当细胞呈单层致密状分布时, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化后以1:3传代, 24 h换液, 72 h再次传代用于以下试验。

1.2.3 IL-1 β 和益肝康干预HSC试验 将传代的HSC以 3.5×10^4 /L的密度100 μ L接种于96孔板或5 mL接种于25 mL培养瓶, 培养箱中孵育至细胞80%-90%汇合时, 弃培养液, 换含10 mL/L新生牛血清的RPMI-1640培养液继续培养12 h, 使细胞基本同步于G₀期。吸弃上清, 而后分为8组: (1)对照组(A组), 加含10 mL/L新生牛血清的培养液; (2)IL-1 β 10 μ g/L干预组(B组), 加含IL-

1 β 10 μ g/L的10 mL/L新生牛血清培养液; (3)IL-1 β 10 μ g/L+益肝康2 g/L干预组(C组), 加含IL-1 β 10 μ g/L、益肝康2 g/L的10 mL/L新生牛血清的培养液; (4)IL-1 β 10 μ g/L+小复方2 g/L干预组(D组), 加含IL-1 β 10 μ g/L、小复方2 g/L的10 mL/L新生牛血清的培养液; (5)IL-1 β 10 μ g/L+丹参2 g/L干预组(E组), 加含IL-1 β 10 μ g/L、2 g/L丹参的10 mL/L新生牛血清的培养液; (6)丹参2 g/L(F组), 加含丹参2 g/L的10 mL/L新生牛血清的培养液; (7)小复方2 g/L(G组), 加含小复方2 g/L的10 mL/L新生牛血清的培养液; (8)益肝康2 g/L(H组), 加含益肝康2 g/L的1 mL/L新生牛血清的培养液, 继续培养24 h。

1.2.4 活细胞计数试剂盒-CCK-8检测HSC增殖 细胞接种于96孔板上干预24 h后, 每孔加入CCK-8试剂10 μ L, 继续培养3 h后在酶标仪上读取450 nm的吸光度。用吸光度A表示。每组设6个重复孔, 另设空白孔调零^[7]。

1.2.5 半定量RT-PCR检测TIMP-1 mRNA表达 (1)RNA抽提: 用RNA抽提试剂盒按照厂家推荐的操作步骤抽提各瓶HSC的总RNA, 用分光光度计测定RNA含量及纯度, A_{260}/A_{280} 均在1.8-2.0之间。 (2)cDNA的合成: 采用25 μ L逆转录反应体系, 内含待测RNA 2 μ g, M-MLV 30 U, RNA酶抑制剂20 U, 随机引物100 pmol及适量dNTP(10 mol/L)、5 \times buffer, 37 $^{\circ}$ C反应60 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min灭活M-MLV。 (3)引物: TIMP-1: 上游引物5'-TCC CCA GAA ATC ATC GAG AC-3', 下游引物5'-ATC GCT GAA CAG GGA AAC AC-3', 扩增片段长329 bp。内参照GAPDH: 上游引物5'-GGC CCC TCT GGA AAG CTG TG -3', 下游引物5'-CCG CCT GCT TCA CCA CCT TCT-3', 扩增片段长239 bp。 (4)共扩增PCR反应: 反应体系为25 μ L, 内含 cDNA 4 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTP(10 mol/L)1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各1.5 μ L, Taq酶2.5 U, 用水补至25 μ L。PCR反应在0.2 mL薄壁Eppendorf管中进行, 用GeneAmp 9600型PCR仪扩增。PCR反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 然后94 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s(35个循环), 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。 (5)半定量分析: PCR产物在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳后用凝胶成像系统对DNA条带进行光密度扫描测定灰度值, 用TIMP-1/GAPDH灰度值比表示TIMP-1的相对表达量。

统计学处理 数据用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 利用SPSS 11.0软件进行统计分

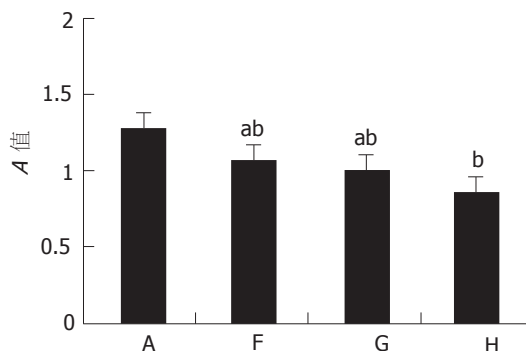


图1 益肝康等活血化癥中药对肝星状细胞增殖的影响。A: 对照组; F: 丹参组; G: 丹参小复方组; H: 益肝康组。^a $P<0.05$ vs H组, ^b $P<0.01$ vs A组。

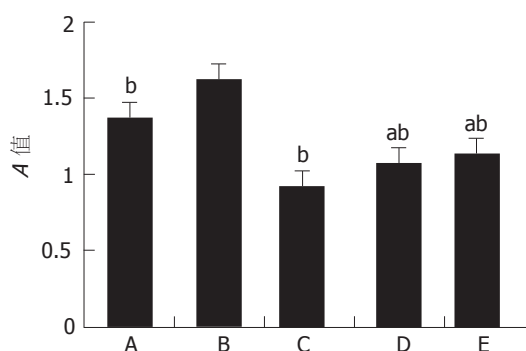


图2 益肝康等活血化癥中药对IL-1 β 刺激的HSC增殖的影响。A: 对照组; B: IL-1 β 组; C: IL-1 β +益肝康组; D: IL-1 β +丹参小复方组; E: IL-1 β +丹参组。^a $P<0.05$ vs C组, ^b $P<0.01$ vs B组。

析。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 有显著差异者进一步用最小显著差值法进行两两比较。

2 结果

2.1 活细胞计数试剂盒-CCK-8检测HSC增殖 A组的吸光度值(1.291 ± 0.09)明显高于F组(1.055 ± 0.105 , $P<0.01$)、G组(1 ± 0.07 , $P<0.01$)、H组(0.883 ± 0.06 , $P<0.01$); H组吸光度值明显低于F组($P<0.05$)和G组($P<0.05$); F组和G组相比差别无显著性($P>0.05$)(图1)。证实益肝康等活血化癥中药能抑制HSC增殖, 与丹参单药和丹参小复方相比组方益肝康抑制率最高, 其抗肝纤维化作用最强。B组吸光度值(1.575 ± 0.017)明显高于A组(1.291 ± 0.09 , $P<0.01$)、C组(0.906 ± 0.09 , $P<0.01$)、D组(1.015 ± 0.081 , $P<0.01$)、E组(1.097 ± 0.038 , $P<0.01$); D组、E组高于C组($P<0.05$); D组和E组相比差别无显著性($P>0.05$)(图2)。证实了IL-1 β 促HSC增殖作用, 但其作用能被益肝康等活血化癥中药所抑制, 并且益肝康的作用强于丹参单药及丹参小复方。

■创新盘点

本文不同与其他的创新之处在于本研究除了观察了活血化癥中药对活化的HSC的直接作用外, 还进一步观察了其对外源性IL-1刺激的HSCs的影响, 在研究其抗肝纤维化机制的同时, 证实了他在强有力的促纤维化因子的预刺激下仍发挥其强大功效, 这说明他对已形成的纤维化可能有一定的逆转作用; 亦可推测其抗肝纤维化作用的发挥可能与抑制促纤维化因子IL-1的作用有关系, 有待进一步研究。

■应用要点

本研究从活血化瘀中药对HSC与基质降解有关的关键酶TIMP影响来探讨了活血化瘀中药的抗肝纤维化的机制,还进一步比较了单味中药和中药组方的作用,结果表明组方的抗肝纤维化作用明显增强,这正符合了祖国传统医学基础理论君臣佐使合理配药这一精髓,为抗肝纤维化新药开发打下理论基础。

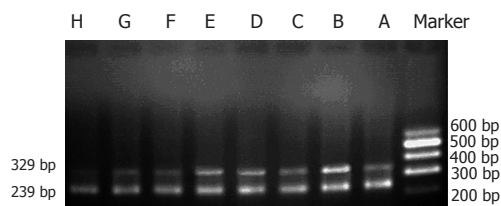


图3 各组HSC TIMP-1 mRNA经RT-PCR产物电泳图。A: 对照组; B: IL-1 β 组; C: IL-1 β +益肝康组; D: IL-1 β +丹参小复方组; E: IL-1 β +丹参组; F: 丹参组; G: 丹参小复方组; H: 益肝康组。

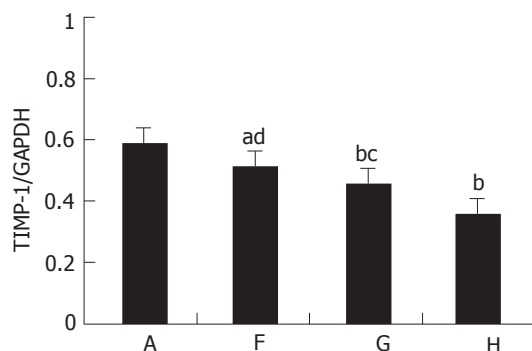


图4 益肝康等活血化瘀中药对HSC TIMP-1 mRNA的影响。A: 对照组; F: 丹参组; G: 丹参小复方组; H: 益肝康组。^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs A组, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs H组。

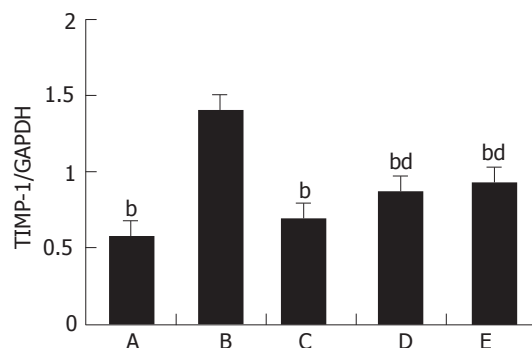


图5 益肝康等活血化瘀中药对IL-1 β 刺激的HSC TIMP-1 mRNA表达的影响。A: 对照组; B: IL-1 β 组; C: IL-1 β +益肝康组; D: IL-1 β +丹参小复方组; E: IL-1 β +丹参组。^b $P<0.01$ vs B组, ^d $P<0.01$ vs C组。

2.2 半定量RT-PCR检测TIMP-1 mRNA表达
TIMP-1 mRNA表达A组TIMP-1/GAPDH(0.591 ± 0.064)高于F组(0.493 ± 0.088 , $P<0.05$)、G组(0.458 ± 0.076 , $P<0.01$)、H组(0.356 ± 0.046 , $P<0.01$); H组低于F组($P<0.01$)和G组($P<0.05$); F组和G组相比差异无显著性($P>0.05$)(图3, 4)。证明益肝康等活血化瘀中药可以抑制HSC表达TIMP-1, 益肝康的作用强于丹参单药和丹参小复方。B组(1.369 ± 0.097)明显高于A组

(0.591 ± 0.064 , $P<0.01$)、C组(0.694 ± 0.078 , $P<0.01$)、D组(0.854 ± 0.05 , $P<0.01$)、E组(0.898 ± 0.12 , $P<0.01$); C组明显低于D组($P<0.01$)和E组($P<0.01$); D组和E组相比无显著性差异($P>0.05$)(图5)。证实了促进HSC表达TIMP-1 mRNA为IL-1 β 促进肝纤维化的发展的机制之一, 益肝康等活血化瘀中药可通过抑制IL-1 β 的这一作用来发挥其抗肝纤维化作用, 并且组方益肝康的作用明显强于丹参和丹参小复方。

3 讨论

激活的HSC是合成I、III型胶原、非胶原糖蛋白、蛋白多糖等ECM的主要细胞来源, 在肝纤维化的发生发展中起关键性作用^[8]。HSC的激活受多种细胞因子的调控, 如转化生长因子(TGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、血小板衍生生长因子(PDGF)等, HSCs又可分泌这些细胞因子并通过正反馈途径维持其活化状态。IL-1主要通过刺激肝脏炎症反应的产生而启动和加速肝纤维化的发展, 其机制主要是促进HSC活化和增生, 抑制ECM降解。MMP对ECM有广泛的降解作用, 是调节ECM动态平衡的最重要的一大酶系。现已发现20多种MMP, 间质性胶原酶主要包括MMP-1、MMP-8和MMP-13, 主要降解I、II、III型胶原; 明胶酶(MMP-2、MMP-9)主要降解基底膜重要成分天然IV型胶原、明胶和V型胶原等。肝纤维化形成过程中, 胶原沉积以间质胶原I、III型胶原为主, 降解此类胶原的酶在人类主要是MMP-1, 而鼠类主要是MMP-13。TIMPs为MMPs特异性抑制因子, 可与MMPs结合, 以1:1的比例形成MMPs-TIMP复合体, 从而阻断MMPs与底物结合, 是一种转录后调节机制。许多生长因子和细胞因子可以改变MMPs及TIMP的基因转录, 从而影响肝纤维化进程。重要者有IL-1 β 、表皮生长因子、PDGF、TNF α 等。王爱民 *et al*^[9]研究发现IL-1 β 可同时增强大鼠HSC的MMP-3、MMP-13、TIMP-1基因表达。本试验从IL-1 β 对HSCs增殖和TIMP-1基因表达这两个环节进行研究, 结果IL-1 β 组(B组)与对照组(A组)相比, B组HSCs增殖($P<0.01$)和TIMP-1 mRNA表达($P<0.01$)较A组明显增强(图2, 3, 5), 证实了IL-1 β 可明显促进大鼠HSC增殖和TIMP-1 mRNA表达, 即为其促肝纤维化的重要机制。

随着肝纤维化的发生机制逐渐阐明, 肝纤维化治疗成为可能。目前尚乏理想的抗纤维化

西药. 秋水仙碱、D-青霉胺、己酮可可碱等药疗效差、毒副作用大, 大多限于实验阶段^[1,10-12]. 以活血化瘀为主中医中药治疗慢性肝炎、肝纤维化疗效显著, 且乏毒性, 显示出良好趋势, 已为国内外所共识^[13-23]. 随着对肝纤维化机制的深入了解, 对中药抗肝纤维化机制进一步阐明^[19-21]. 多靶点、多环节、多途径的综合作用是丹参等活血化瘀中药复方抗肝纤维化的特点^[22-24]. 中药复方“益肝康”为根据中医基础理论和几十年临床经验精心研制的以丹参为主的治疗慢性肝病、肝纤维化的有效方剂, 具有明显抗肝纤维化作用^[25-27]. 我所研究已证实“益肝康”不仅有抑制HSC活化、增殖及促HSC凋亡的作用, 还可通过抑制PDGF、TGF等促纤维化细胞因子的表达、抗脂质过氧化、促进胶原降解等作用发挥其抗肝纤维化功效^[8,18,25-31]. 我们关注影响肝纤维化的另一重要因素——MMP/TIMP酶系, 观察益肝康等活血化瘀中药对大鼠HSCs增殖及TIMP-1 mRNA表达的影响以及其对外源性IL-1 β 刺激的大鼠HSC的影响. 结果表明对HSCs应用活血化瘀中药丹参(F组)、丹参小复方(G组)、益肝康(H组)后HSC增殖均低于对照组(A组)($P<0.01$)(图1), TIMP-1 mRNA表达也低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图4), 说明益肝康等活血化瘀中药通过抑制HSCs增殖和TIMP-1表达发挥抗肝纤维化作用, 为了进一步探讨其与IL-1 β 这一促肝纤维化因素的关系, 我们又研究了对IL-1 β 预刺激的HSCs(B组)应用益肝康(C组)、丹参小复方(D组)、丹参(E组)药物干预, 结果显示C组、D组、E组HSCs增殖均明显低于B组($P<0.01$), TIMP-1 mRNA表达也明显低于B组($P<0.01$), 说明益肝康等活血化瘀中药能有效抑制外源性IL-1 β 刺激的HSCs增殖和TIMP-1表达. 以上研究表明, 益肝康等活血化瘀中药具有强大的抗肝纤维化功效, 其重要机制是抑制HSCs增殖和TIMP-1 mRNA的表达. 在肝纤维化患者中, 血清IL-1 β 水平随着肝纤维化程度的加重及肝组织病理纤维化分期严重程度而显著增加, 我们可以推测, 活血化瘀中药可能通过抑制IL-1 β 的作用发挥其抗肝纤维化疗效, 有待进一步研究. 值得注意的是以上数据显示丹参、丹参小复方、益肝康的抗纤维化作用强弱亦有明显差别, 益肝康抑制HSCs增殖及TIMP-1 mRNA表达的作用均明显强于丹参($P<0.05$)和丹参小复方($P<0.05$), 丹参与丹参小复方二者作用并无显

著差异($P>0.05$). 说明以丹参为主的活血化瘀中药组方-益肝康的抗肝纤维化作用强于丹参单药和丹参小复方, 符合中医基础理论君臣佐使合理配药这一精髓. 多年的临床应用也证实了益肝康的强有力的抗肝纤维化功效^[32], 其机制的逐渐阐明, 为我国抗肝纤维化药物的研制开发提供了理论基础, 为进一步提高抗肝纤维化药物疗效打下基础.

4 参考文献

- 1 姚希贤, 徐克成主编. 肝纤维化的基础与临床. 第一版, 上海: 上海科技教育出版社, 2003: 9-21
- 2 Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamatsu Y, Hanazawa S, Yasui T, Hasegawa K. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine* 2005; 29: 159-168
- 3 Han YP, Zhou L, Wang J, Xiong S, Garner WL, French SW, Tsukamoto H. Essential role of matrix metalloproteinases in interleukin-1-induced myofibroblastic activation of hepatic stellate cell in collagen. *J Biol Chem* 2004; 279: 4820-4828
- 4 Yao XX, Jiang SL, Yao DM. Current research of hepatic cirrhosis in China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 617-622
- 5 王全楚, 申德林, 张成道, 许丽芝, 聂青和, 谢玉梅, 周永兴. 中药软肝缩脾丸对肝纤维化大鼠TIMP-1/2蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 379-382
- 6 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
- 7 Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 731-740
- 8 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 9 王爱民, 王宝恩, 杨跃伟, 赵一川, 韩涛, 杜双存. 白介素-1 β 对肝星状细胞基质分解素-1及其抑制因子基因表达的调节. *解放军医学杂志* 2000; 25: 374-375
- 10 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 363-369
- 11 Szalay F. Treatment of primary biliary cirrhosis. *J Physiol Paris* 2001; 95: 407-412
- 12 Wasser S, Lim GY, Ong CN, Tan CE. Anti-oxidant ebselen causes the resolution of experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1244-1253
- 13 郑旭锐, 孔莹, 孙守才, 胡建军, 靳光荣. 中药复方防治肝纤维化现代研究思路和策略. *陕西中医学院学报* 2005; 28: 29-30
- 14 薛冬英, 徐列明, 洪嘉禾. 浅谈中药复方在抗肝纤维化中的作用. *中国中医药信息杂志* 2003; 10: 34-35
- 15 姚欣, 姚希贤, 修贺明, 高君萍, 张玉琢. 活血化瘀中药益肝浓缩煎剂对大鼠肝纤维化的作用. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 544-548
- 16 孙玉凤, 姚希贤, 蒋树林. 肝纤维化的中医中药治疗.

■名词解释

君臣佐使: 为中医基础理论中中药合理配伍的原则. 简单讲就是中药组方讲究根据药性药效配合, 这样就会达到单味药所不及的特殊功效, 以发挥中药的强大的疗效. 提示我们不能把某一种中药等同于某一种西药的作用, 否则就容易走入中医“废医存药”的误区.

■同行评价

本文对临床肝纤维化治疗有一定的参考意义,为抗肝纤维化药物的研制开发提供了理论基础,有较强的科学性、创新性。

- 世界华人消化杂志 2000; 8: 686-687
- 17 梁萍, 薄爱华, 薛贵平, 韩瑞, 李海峰, 许永利. 苦参碱抗免疫性肝损伤机制的研究. 世界华人消化杂志 1999; 7: 104-108
- 18 姚希贤, 唐有为, 姚冬梅, 修贺明. 益肝煎剂对实验性肝纤维化大鼠 I, III 型胶原蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001; 9: 263-267
- 19 Gressner AM. The up-and-down of hepatic stellate cells in tissue injury: apoptosis restores cellular homeostasis. *Gastroenterology* 2001; 120: 1285-1288
- 20 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-416
- 21 Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 315-334
- 22 王伟, 杨肃文, 张立煌. 中药抗肝纤维化的细胞和分子机理研究进展. 中华实用中西医杂志 2004; 4: 813-815
- 23 凌云彪, 许瑞云, 邱万寿, 褚中华, 杨宏志, 谈智, 区庆嘉. 大鼠含抗肝纤维化中药的血清对肝星状细胞的作用. 中国病理生理杂志 2003; 19: 1649-1652
- 24 张文胜, 程明亮, 陆荫英. 中药复方对肝纤维化大鼠细胞因子的影响. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 285-287
- 25 姚希贤, 姚欣, 修贺明, 宋梅, 冯丽英. “益肝浓缩煎剂”等活血化瘀药抗大鼠肝纤维化作用实验研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2001; 10: 217-219
- 26 孙玉凤, 姚希贤, 崔东来. 益肝浓缩煎剂抗肝纤维化的实验研究. 中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 84-86
- 27 蒋树林, 李校天, 姚希贤. 益肝康对大鼠肝纤维化的防治作用. 中国全科医学 2002; 5: 525-527
- 28 房红梅, 姚冬梅, 姚希贤, 王天秩. 益肝康的药物血清对大鼠HSCs增殖及PD GF基因表达的影响. 第三军医大学学报 2004; 26: 611-612
- 29 Majima T, Lo IK, Randle JA, Marchuk LL, Shrive NG, Frank CB, Hart DA. ACL transection influences mRNA levels for collagen type I and TNF-alpha in MCL scar. *J Orthop Res* 2002; 20: 520-525
- 30 Kossi J, Aalto J, Haataja S, Niinikoski J, Peltonen J, Laato M. The effects of sialic acid on the gene expression of fibrillar collagens: different changes in normal and fibrotic scar derived fibroblasts. *Ann Chir Gynaecol* 2001; 90: 25-28
- 31 Garcia-Ruiz I, de la Torre P, Diaz T, Esteban E, Fernandez I, Munoz-Yague T, Solis-Herruzo JA. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 30551-30558
- 32 姚洪森, 张健, 姚希贤. “益肝康”治疗90例慢性乙型肝炎肝纤维化疗效观察. 武警医学 2004; 15: 30-33

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006 年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

第一届全国临床营养支持学术会议通知

经中华医学会外科学分会批准,“第十届全国临床营养支持学术会议”将于2006-05在上海召开。本次会议由中华医学会外科学分会营养支持学组主办、复旦大学附属中山医院承办,主要内容为临床营养支持领域的基础和临床实践总结。现将征文要求通知如下:

1 征文要求

请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要邮寄到上海市医学院路136号,上海中山医院外科吴国豪收,邮编:200032;同时请用Email将论文全文及摘要发送到prowugh@yahoo.com.cn,注明上海中山医院外科吴国豪收。征文请自留底稿,恕不退稿。

2 截稿日期

征文截止日期:2006-03-15。

本次会议举行优秀论文评奖活动,欢迎踊跃投稿。会议向正式代表颁布中华医学会继续教育学分。