

## 舒肝颗粒对大鼠肝星状细胞增殖及胶原分泌的影响

李志, 漆红, 李昌平

李志, 泸州医学院附属中医医院消化内科 四川省泸州市 646000

漆红, 遂宁市中心医院消化内科 四川省遂宁市 629000

李昌平, 泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

四川省卫生厅科研基金资助项目, No. 030079

作者贡献分布: 此课题由李昌平与李志设计; 研究过程、数据分析及论文写作由李志与漆红完成。

通讯作者: 李昌平, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院消化内科。

1ichangping88@hotmail.com

电话: 0830-2392753 传真: 0830-2392753

收稿日期: 2009-06-22 修回日期: 2009-11-14

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2010-01-18

### Shugan Granule inhibits hepatic stellate cell proliferation and collagen production

Zhi Li, Hong Qi, Chang-Ping Li

Zhi Li, Department of Gastroenterology, the Second Hospital (TCM) Affiliated to Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Hong Qi, Department of Gastroenterology, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan Province, China

Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of the Health Department of Sichuan Province, No. 030079

Correspondence to: Professor Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. 1ichangping88@hotmail.com

Received: 2009-06-22 Revised: 2009-11-14

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2010-01-18

### Abstract

**AIM:** To observe the effects of Shugan Granule on hepatic stellate cell (HSC) proliferation and collagen production.

**METHODS:** Cultured HSC-T6 cells were divided into three groups: blank control group, normal control group and Shugan Granule intervention group. The blank control group and normal control group were cultured in serum-free RPMI 1640 medium, while the Shugan Granule intervention group was cultured in serum-free RPMI 1640 medium containing different concentrations of Shugan Granule (0.56, 0.28, 0.14, 0.07, 0.035, 0.018 and 0.009 g/L, respectively).

Cell proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay. The contents of type I, III and IV collagen were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** After 48 hours of incubation, Shugan Granule at concentrations of 0.56, 0.28, 0.14, 0.07, 0.035, 0.018 and 0.009 g/L reduced the rates of cell growth by 48.59%, 38.24%, 28.12%, 21.55%, 8.47%, 7.26% and 0.33%, respectively, showing concentration-dependent inhibitory effects. The reduced rate of cell growth was more significant in the Shugan Granule intervention group than in the normal control group. The contents of type I, III and IV collagen in culture supernatants were significantly lower in the Shugan Granule intervention group than in the normal control group ( $5.437 \mu\text{g/L} \pm 0.043 \mu\text{g/L}$  vs  $13.817 \mu\text{g/L} \pm 0.787 \mu\text{g/L}$ ,  $3.26 \mu\text{g/L} \pm 0.217 \mu\text{g/L}$  vs  $8.629 \mu\text{g/L} \pm 0.178 \mu\text{g/L}$ , and  $2.187 \mu\text{g/L} \pm 0.245 \mu\text{g/L}$  vs  $5.29 \mu\text{g/L} \pm 0.315 \mu\text{g/L}$ , respectively; all  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Shugan Granule can inhibit HSC proliferation and collagen production. This may explain why Shugan Granule can prevent liver fibrosis.

**Key Words:** Shugan Granule; Hepatic stellatae cell; Liver fibrosis

Li Z, Qi H, Li CP. Shugan Granule inhibits hepatic stellate cell proliferation and collagen production. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(2): 169-172

### 摘要

**目的:** 观察舒肝颗粒对肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)增殖及胶原分泌的影响。

**方法:** 体外培养HSC-T6。设空白对照组、正常对照组和舒肝颗粒干预组, 其中, 舒肝颗粒干预组设7个浓度梯度, 前两者加入无血清的RPMI 1640细胞培养液, 后者加入含舒肝颗粒的无血清RPMI 1640细胞培养液, 药物终浓度分别为0.56、0.28、0.14、0.07、0.035、0.018和0.009 g/L。采用MTT法检测细胞增殖,

### ■背景资料

HSC的活化增殖是肝纤维化形成的中心环节, ECM过量产生和沉积是形成肝纤维化, 并最终导致肝硬化、肝功能衰竭的主要原因。

### ■同行评议者

徐列明, 教授, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

## ■ 研发前沿

舒肝颗粒采用现代工艺精制而成, 具有补虚逐瘀, 清热解毒, 软坚散结的功效, 对酒精性肝病尤其是酒精性肝纤维化具有良好效果, 但其抗肝纤维化的作用机制有待进一步研究。

ELISA法检测 I、III 及 IV 型胶原含量。

**结果:** 经48 h, 舒肝颗粒干预组HSC抑制率分别为48.59%、38.24%、28.12%、21.15%、8.47%、7.26%和0.33%, 明显高于正常对照组, 且呈剂量效应关系。舒肝颗粒干预组细胞上清液中 I、III、IV 型胶原含量较正常对照组明显降低( $5.437 \mu\text{g/L} \pm 0.043 \mu\text{g/L}$ 、 $3.26 \mu\text{g/L} \pm 0.217 \mu\text{g/L}$ 、 $2.187 \mu\text{g/L} \pm 0.245 \mu\text{g/L}$  vs  $13.817 \mu\text{g/L} \pm 0.787 \mu\text{g/L}$ 、 $8.629 \mu\text{g/L} \pm 0.178 \mu\text{g/L}$ 、 $5.29 \mu\text{g/L} \pm 0.315 \mu\text{g/L}$ , 均 $P < 0.01$ )。

**结论:** 舒肝颗粒可通过抑制HSC增殖和胶原蛋白的分泌, 减少胶原纤维在肝脏内的沉积, 这可能是其抗肝纤维化的作用机制之一。

**关键词:** 舒肝颗粒; 肝星状细胞; 肝纤维化

李志, 漆红, 李昌平. 舒肝颗粒对大鼠肝星状细胞增殖及胶原分泌的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(2): 169-172  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/169.asp>

## 0 引言

舒肝颗粒具有补虚逐瘀, 清热解毒, 软坚散结的功效, 对酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)尤其是酒精性肝纤维化具有良好效果, 已为动物实验和临床试验所证实<sup>[1]</sup>。为进一步阐明其抗肝纤维化的作用机制, 本研究将观察其对体外培养的大鼠肝星状细胞(hepatic stellatae cell, HSC)增殖及胶原分泌的影响, 为临床治疗提供新的实验依据, 同时也为下一步制剂开发奠定坚实的理论基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HSC-T6购自上海中医药大学肝病研究所, 其表型为活化的HSC。特级胎牛血清购自北京元亨圣马生物技术研究所, 批号: 05110816。RPMI 1640培养基购自Gibco公司, 批号: 1272921。噻唑蓝(MTT)购自Sigma公司, 批号: W2128。ELISA试剂盒胶原 I、III、IV购自Sigma公司, 批号: 0602015。舒肝颗粒由泸州医学院附属医院药物研究所提供, 处方为: 黄芪、丹参、党参、白术、三棱、莪术、川芎、鳖甲、茵陈、虎杖、甘草, 每包10 g。

### 1.2 方法

**1.2.1 药物处理:** 参照杨玲等方法<sup>[2,3]</sup>, 由于直接加药法和含药血清法所得结果一致, 故采用无血清RPMI 1640细胞培养液溶解舒肝颗粒, 37 °C 恒温水浴箱中加热30 min, 离心观察颗粒完全溶

解, 调节pH值和渗透压, 制成144 g/L提取液, 经0.45 μm滤器过滤除菌后, 4 °C 贮存备用。

**1.2.2 HSC-T6的培养与传代:** 采用含100 kU/L青霉素、100 kU/L链霉素、100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液, 在37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下培养, 隔天换液, 待细胞将近长满培养瓶底时, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化, 按1:3传代。所有实验均取对数生长期细胞。

**1.2.3 MTT法观察舒肝颗粒对HSC增殖的影响:** 采用96孔板, 每孔植入 $1 \times 10^4$ 个细胞, 设空白对照组、正常对照组和舒肝颗粒干预组, 其中, 舒肝颗粒干预组设7个浓度梯度, 并分别设4个复孔。24 h后吸出培养液, 正常对照组和空白对照组每孔各加入200 μL无血清的RPMI 1640细胞培养液, 舒肝颗粒干预组根据预实验确定的药物浓度每孔各加入200 μL含舒肝颗粒的无血清的RPMI 1640细胞培养液, 药物终浓度分别为0.56、0.28、0.14、0.07、0.035、0.018和0.009 g/L。48 h后吸出培养液, 各孔加入200 μL浓度为0.05%的MTT, 37 °C 孵育4 h, 去上清液, 各孔加入200 μL二甲亚砷(DMSO), 震荡10 min, 混匀以溶解被还原的MTT结晶, 在酶标仪上检测波长为490 nm吸光度值( $A_{490\text{nm}}$ ), 计算不同浓度药物作用下细胞的抑制率。存活率 = (药物组A值/对照组A值) × 100%, 抑制率 = [1 - (药物组A值/对照组A值)] × 100%。选择48 h HSC抑制率小于10%的任意浓度作为以下实验所用药物浓度(该浓度药物对HSC-T6细胞生长无明显影响)。

**1.2.4 ELISA法检测细胞上清液中 I、III、IV 型胶原含量:** HSC-T6细胞均匀接种到8个100 mL培养瓶中, 放置在37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下培养箱中进行培养, 同时设正常对照组和舒肝颗粒干预组。待细胞将近长满培养瓶底时, 吸出培养液, 正常对照组换用无血清的RPMI 1640细胞培养液, 舒肝颗粒干预组换用含舒肝颗粒的无血清的RPMI 1640细胞培养液。继续培养48 h后收集上清液, ELISA法检测 I、III、IV 型胶原含量, 分别按试剂盒使用说明书处理。

**统计学处理** 采用SPSS11.5统计软件进行数据的分析处理, 实验数据用mean ± SD表示, 两组均数的比较采用t检验。

## 2 结果

**2.1 舒肝颗粒对HSC-T6细胞增殖的影响** 舒肝颗粒干预组HSC的抑制率48 h时明显高于正常对照组, 且呈明显的剂量效应关系(表1)。

表 1 不同浓度舒肝颗粒对大鼠HSC增殖的影响 (mean ± SD)

分组	孔数	剂量(g/L)	抑制率(%)	存活率(%)	A值
正常对照组	4	-	-	100.00	0.668 ± 0.005
舒肝颗粒组(g/L)					
0.009	4	0.009	0.30	99.70	0.666 ± 0.003
0.018	4	0.018	7.19	92.81	0.620 ± 0.007
0.035	4	0.035	8.53	91.47	0.611 ± 0.004
0.07	4	0.070	21.11	78.89	0.527 ± 0.005
0.14	4	0.140	28.14	71.86	0.480 ± 0.009
0.28	4	0.280	38.17	61.83	0.413 ± 0.005
0.56	4	0.560	48.65	51.35	0.343 ± 0.006

表 2 舒肝颗粒对大鼠HSC胶原分泌的影响 (n = 4, mean ± SD, μg/L)

分组	I型胶原	III型胶原	IV型胶原
正常对照组	13.817 ± 0.787	8.629 ± 0.178	5.290 ± 0.315
舒肝颗粒组	5.437 ± 0.043	3.260 ± 0.217	2.187 ± 0.245
t值	21.269	38.333	15.533
P值	0.000	0.000	0.000

## ■应用要点

本研究显示, 舒肝颗粒可抑制HSC的增殖以及胶原I、III、IV的分泌, 进一步提示其具有抗肝纤维化的作用, 为本方的临床应用奠定了良好基础。

2.2 镜下细胞生长状况的同步观察 0.28-0.56 g/L浓度时, 可见细胞轻度破坏, 细胞生长缓慢, 但胞膜完整, 胞质、胞核颜色有所加深, 胞质减少, 胞核缩小, 透亮度下降, 细胞形态欠佳, 多数聚集成岛状, 亦有散在细胞贴壁生长, 培养液基本清澈。0.07-0.14 g/L浓度时, 细胞较上损伤较轻, 多数细胞生长较好, 细胞形态基本正常, 细胞连接成片状, 密度较正常略低。0.009-0.035 g/L浓度时, 细胞无明显破坏, 生长致密, 形态正常。

2.3 细胞上清液中I、III、IV型胶原含量 选择对HSC-T6细胞生长无明显影响的浓度(细胞抑制率小于10%)0.018 g/L作为实验用药浓度。与正常对照组相比, 舒肝颗粒干预组48 h时细胞上清液中I、III、IV型胶原含量明显降低( $P < 0.01$ , 表2)。

## 3 讨论

肝纤维化是各种原因引起的慢性肝损伤所共有的病理改变, HSC的活化增殖是肝纤维化形成的中心环节, 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过量产生和沉积是形成肝纤维化, 最终导致肝硬化、肝功能衰竭的主要原因。因此, 可从抑制HSC活化增殖、促进HSC凋亡、抑制胶原合成分泌、促进胶原降解进行抗肝纤维化治疗。

舒肝颗粒的研制主要针对ALD尤其是酒精性肝纤维化的防治, 其组方思路为: 结合传统中

医中药理论和乙醇及其代谢产物乙醛等物质对肝脏的影响, 我们认为ALD及其酒精性肝纤维化属于中医的胁痛、积聚、肝癖等范畴, 病因为酒, 而酒为醇酿之品, 易生湿热, 久则成毒, 损伤血络, 因此病机为湿、热、毒、瘀互结入络, 邪毒较甚, 肝木横逆克脾土, 久则伤肾, 气血亏损。依据上述理论我们采用补虚逐瘀, 清热解毒, 软坚散结方法, 并结合现代中药药理学, 选用黄芪补脾益气, 丹参活血化瘀, 共为君药; 党参, 白术补中益气, 燥湿健脾, 三棱、莪术, 川芎破血逐瘀、理气止痛, 助丹参活血化瘀为臣; 鳖甲滋阴潜阳、软坚散结, 茵陈、虎杖清热利湿解毒, 又能活血, 共为佐使。全方采用现代工艺精制而成。其中主药丹参及其提取物具有一系列重要的药理作用如抗炎、抗氧化、抑制HSC活化增殖、诱导HSC凋亡等作用<sup>[4-9]</sup>; 黄芪可抑制大鼠HSC增殖及I型、III型、IV型胶原的分泌, 能抑制肌成纤维细胞的生长和增殖, 尤其对核分裂有明显抑制作用, 促进已形成的肝纤维化组织重新吸收, 减轻肝内胶原纤维的沉积, 有效地促进受损的免疫功能复常<sup>[10]</sup>。全方经动物实验和临床研究发现其对ALD尤其是酒精性肝纤维化确有很好的疗效<sup>[1]</sup>。本研究从细胞分子水平证实其能抑制HSC的增殖, 且抑制程度与药物剂量呈一定依赖关系; 能抑制胶原蛋白的分泌, 可能与直接抑制HSC活化增殖从而间接减少胶原合成和

#### ■同行评价

本文探讨了舒肝颗粒对大鼠HSC增殖及胶原分泌的影响,有一定的可读性.

直接抑制HSC合成胶原两种机制有关,进一步提示其具有抗肝纤维化作用,与我们的动物实验和临床研究结果一致.但肝纤维化形成是一个多因素的复杂的过程,舒肝颗粒作为多成分、多环节、多途径、多靶点的中药,除上述作用外,可能还有促进HSC凋亡和胶原降解、调节相关细胞活性因子、调控细胞内信号传导等作用,因此尚需进一步深入研究.

#### 4 参考文献

- 1 朱本贵,李昌平,陈霞,尹思源,肖顺汉.舒肝颗粒对酒精性肝纤维化的疗效及其机制的实验研究.中国中西医结合消化杂志 2006; 14: 8-11
- 2 杨玲,张赤志,朱清静,杨胜兰.抗纤软肝颗粒对肝星状细胞增殖的影响.中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 323-325
- 3 杨玲,朱清静,笄邦红,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
- 4 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

- 5 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
- 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 张亚平,姚希贤,刘晓玲,赵霞.复方中药益肝康抑制肝星状细胞增殖的作用机制.世界华人消化杂志 2006; 14: 1272-1276
- 8 王晓玲,刘平,崔云华,胡旭东,李伯勤,应馨萍.丹酚酸对刺激的肝星状细胞增殖的抑制作用.世界华人消化杂志 2009; 17: 476-480
- 9 李冬,戴立里,余斌斌,姜中华.丹参素对大鼠肝星状细胞增殖、凋亡及NF- $\kappa$ B活性的影响.第三军医大学学报 2009; 31: 724-728
- 10 马红,王宝恩,马雪梅.黄芪抑制大鼠肝星状细胞增殖及胶原分泌的研究.中国中医药信息杂志 2001; 8: 35-36

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 汤姆森-路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果:*World Journal of Gastroenterology(WJG)*的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标.与影响因子不同的是,这个指标不仅考察了引文的数量,而且考虑了施引期刊的影响力,即:某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用,则该期刊的影响力也越高.正如Google考虑超链接的来源,特征因子也充分考虑引文的来源,并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重.特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况.与影响因子比较,期刊特征因子分值的优点主要有:(1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段,而影响因子只统计了2年的引文时段,后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份;(2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学,更为全面、完整;(3)特征因子的计算扣除了期刊的自引;(4)特征因子的计算基于随机的引文链接,通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间.在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中,*WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任:程剑侠 2009-06-19)