

赤芍水提物的药物血清对 HSC-T6 细胞 促凋亡作用的实验研究

韩海啸¹, 李军祥¹, 杨晋翔², 朱陵群², 刘大新³

(1. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078;

2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700;

3. 北京大学第一附属医院, 北京 100034)

摘要: 目的: 应用流式细胞法, 研究灌服赤芍水提物后的犬血清对乙醛造模后的肝星状细胞的促凋亡作用。方法: 采用乙醛造模后的肝星状细胞株 HSC-T6 作为体外研究模型; 以赤芍水提物给彼格犬 1 次性灌胃, 取给药前的血清、给药后 2 h、3 h 的血清作为实验药物血清; 以流式细胞法检测以上采血时间点上 2% 浓度的药物血清对乙醛造模后的 HSC-T6 作用 72 h 后的促凋亡作用。结果: 2 h、3 h 两个时间点的含药血清能明显促进 HSC-T6 细胞的凋亡, 和同样条件下用空白血清培养的 HSC-T6 细胞相比其凋亡比例 (apoptosis, APOP) 显著性增加 ($P < 0.05$)。在药物血清的作用下两个时点组的 HSC-T6 细胞在 G_0/G_1 期细胞比例明显上升 ($P < 0.05$); 而 S 期细胞显著减少 ($P < 0.05$); 但 G_2/M 期并没有一致性的变化。结论: 两个时点的药物血清对 HSC-T6 细胞都有显著的促凋亡作用, 且能显著增加 HSC-T6 细胞在 G_0/G_1 期的比例及显著降低 S 期的比例, 这可能是其抑制 HSC-T6 细胞增殖及促凋亡的原因之一。

关键词: 中药药理学; 赤芍水提物; 流式细胞术; 肝星状细胞 HSC-T6

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-2850(2008)06-0353-5

Apoptosis-promoting effect of Radix Paeoniae Rubra on HSC-T6 cells

HAN Haixiao¹, LI Junxiang¹, YANG Jinxiang², ZHU Lingqun², LIU Daxin³

(1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078;

2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700;

3. The First Hospital of Beijing University, Beijing 100034)

Abstract: Objective: To study the apoptosis-promoting effect of extract from Radix Paeoniae Rubra on hepatic stellate cell (HSC-T6) in the dog model. Methods: The HSC-T6 was taken as the model in vitro established by using acetaldehyde. The Radix Paeoniae Rubra extract was given to dog orally once only. The serum samples were taken before giving Radix Paeoniae Rubra extract, 2 and 3 hours after giving Radix Paeoniae Rubra extract respectively. The apoptosis-promoting effect of these serum samples (in 2% concentration) on HSC-T6 after 72 hours was detected by flow cytometry. Results: The serum samples promoted obviously HSC-T6 apoptosis in 2 hour group and 3 hour group. The apoptosis rate was increased remarkably compare with that of the blank group ($P < 0.05$). The proportion of HSC-T6 in G_0/G_1 phase was raised obviously in 2 hour group and 3 hour group ($P < 0.05$), while reduced in S phase ($P < 0.05$). There were no any changes in G_2/M phase. Conclusion: The serum samples of Radix Paeoniae Rubra extract all have obviously apoptosis-promoting effects in the two time points, raise the proportion of HSC-T6 in G_0/G_1 phase and reduce in S phase, which may be the mechanism of Radix Paeoniae Rubra extract for inhibiting HSC-T6 proliferation of cells and promoting its apoptosis.

Key words: Chinese pharmacology; Radix Paeoniae Rubra extract; flow cytometry; hepatic stellate cell HSC-T6

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20040026016)

作者简介: 韩海啸 (1976—), 女, 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 中医消化内科肝病

通信联系人: 李军祥, 博士研究生, 主任医师, 主要研究方向: 中医消化肝病、胃肠病等, E-mail: lijx9705@sohu.com

0 引言

肝星状细胞是肝纤维化的主要效应细胞,其大量增殖和凋亡的相对不足在肝纤维化的发生中起核心作用,抑制其增殖和(或)诱导其凋亡是抗肝纤维化的重要对策。近年来,研究表明活血化瘀类药物赤芍对肝纤维化有很好的作用,显示出良好的开发与应用前景。在过去的实验中发现,灌服赤芍水提取物后2 h、3 h提取的药物犬血清对HSC-T6的增殖抑制作用最强。根据以上结果,实验中采取这两个时间点的犬血清,观察此时间点药物血清对HSC-T6的促凋亡作用,为进一步研究赤芍入血后对肝星状细胞的凋亡机理提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞系

肝星状细胞株HSC-T6由北京友谊医院肝病中心馈赠。由SV40转染prague-Dauley大鼠星状细胞而成,其表型为活化的HSC,能表达高水平的I型胶原、TIMP-1 mRNA等^[1]。常规复苏、传代后,在5%CO₂饱和条件下细胞培养箱内培养待用。

1.2 药品和主要试剂

赤芍水提取物制备:赤芍水煮提取,提取液经50%乙醇沉淀后,滤除沉淀,上清液回收溶剂得赤芍水提取物,1 mL水提取物中含3 g生药,由北京中医药大学东方医院药学部提供。

主要试剂:DMEM/高糖培养基,美国GIBCO公司提供;标准胎牛血清,国产,天津川页公司提供;胰酶,GIBCO公司提供;乙醛,国产分析纯;6孔板细胞培养板,丹麦NUNC公司提供;染色液,碘化丙啶(propidium iodide,PI);RNA酶,SIGMA公司提供。

1.3 仪器

CO₂培养箱:美国NAPCO5410型;倒置相差显微镜:日本OLYMPUS IM2型;DNA周期及凋亡分析软件:Modit LT;流式细胞分析仪器及软件。

2 方法

2.1 药物血清制备

用赤芍水提取物给纯种雄性彼格犬1次性灌胃,剂量为2 mL/kg(相当于人体用量的10倍)。给药前空白狗血清、给药后2 h和3 h各时点的血清(采用1只雄性彼格犬,于灌胃后使用1次性真空抗凝管取血),灭活补体后于-20℃冰箱冷冻备用。

2.2 培养基的配制

基本培养基:DMEM培养基以三蒸水配制,加2.5 g/L的NaHCO₃,2.2 g/L的Hepes0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,4℃下保存。完全培养基:90%基本培养基、10%标准胎牛血清及青链霉素各100 000 μ/L。含药培养基:将取得的2 h、3 h采血时点药物血清与加有5%标准胎牛的基本培养基配制成2%浓度含药血清。

2.3 HSC-T6细胞的培养

细胞以完全培养基培养于37℃、5%CO₂的培养箱中。当细胞长到适当密度(80%~90%融合)后,按1:3传代。

2.4 实验分组及给药方法

实验分以下5组:正常组,HSC-T6细胞常规培养;模型组,乙醛造模HSC-T6细胞;无药2%组,乙醛造模HSC-T6细胞含2%空白血清;2 h含2%组,乙醛造模HSC-T6细胞2 h含2%药物血清;3 h含2%组,乙醛造模HSC-T6细胞3 h含2%药物血清培养组。

前期的实验中发现,灌服赤芍水提取物后2 h、3 h时间点2%浓度的药物犬血清对HSC-T6的增殖

抑制作用强。取对数生长期的 HSC-T6 细胞，使用 0.1%胰酶和 0.1%乙二胺四醋酸的混合消化液消化，用完全培养基将细胞悬液的浓度调至 2×10^4 /mL，接种于 6 孔板，加入细胞悬液 3 mL。培养 24 h 后加乙醛达到终末浓度 (87.5 μ M) 制造离体模型并按以上分组更换含药培养基继续培养 72 h，每板设 1 组常规培养细胞。

2.5 检测指标

使用消化液消化，离心收集细胞及培养上清，PBS 洗涤 1 次，70%冷乙醇 4℃分散固定过夜，PBS 洗涤 1 次，RNA 酶 (20 mg/L) 37℃消化 30 min，PBS 洗涤 1 次，PI 染液 (50 mg/L) 4℃避光染色 30 min，流式细胞仪分析细胞凋亡及细胞周期情况。

2.6 统计学处理

数据采用均数±标准差 (x±s) 表示，应用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

正常培养及乙醛造模后的 HSC-T6 细胞存在一定比例的凋亡，在含有一定比例含药血清的完全培养基中培养 72 h 后，经流式细胞仪检测发现被挑选出来的两个时间点的含药血清能明显促进 HSC-T6 细胞的凋亡，其凋亡比例显著性增加 ($P < 0.05$)，如表 1、图 1 所示。

表 1 药物血清对 HSC-T6 细胞周期的影响及促凋亡作用 (%; x±s; n=6)

Tab.1 Effect of medicated serum on HSC-T6's period and promoting its apoptosis (%; x±s; n=6)

分组	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	APOP
正常组	51.51±3.12 ^{#Δ}	12.22±1.36 ^{#Δ}	36.27±2.34 ^{#Δ}	2.21±1.12 ^{#Δ}
模型组	43.09±1.75 [*]	15.68±0.93 [*]	41.57±1.64 [*]	0.86±0.39 [*]
无药 2%组	44.05±0.88 [*]	15.70±0.81 [*]	40.09±0.532 [*]	0.38±0.17 [*]
2 h 含 2%组	46.40±1.42 ^{*#}	16.20±4.58 [*]	35.89±2.97 ^{#Δ}	5.71±1.09 ^{*#Δ}
3 h 含 2%组	53.62±4.32 ^{#Δ}	11.74±1.69 ^{#Δ}	34.64±3.06 ^{#Δ}	5.73±1.91 ^{*#Δ}

注：与正常组比较* $P < 0.05$ ；与模型组比较# $P < 0.05$ ；与无药 2%组比较 $\Delta P < 0.05$

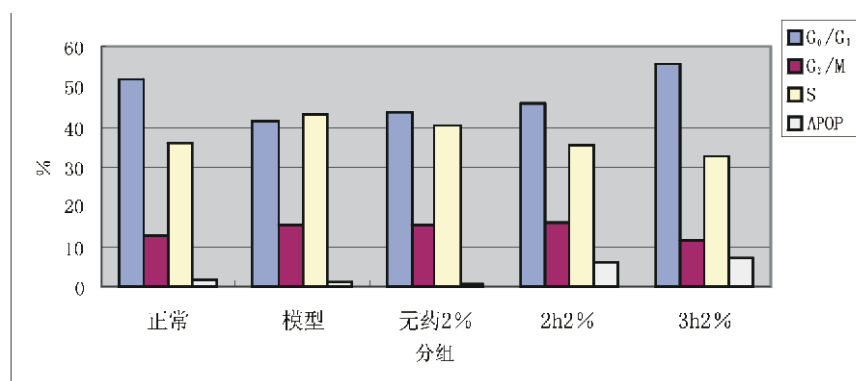


图 1 不同培养条件对 HSC-T6 细胞周期的影响

Fig.1 Effect of culture condition on HSC-T6's period

和正常组相比，模型组 G₀/G₁ 期细胞比例明显下降 ($P < 0.05$)，而 G₂/M 期和 S 期细胞显著增加 ($P < 0.05$)，表明乙醛可促进 HSC-T6 的增殖、活化及造模的成功；无药 2%组 G₀/G₁ 期、S 期及 APOP 期的细胞比例较正常组细胞有上升和下降，符合细胞增殖表现，较模型组细胞比例无明显变化；2 h 含 2%组、3 h 含 2%组在 G₀/G₁ 期细胞比例较模型组明显上升 ($P < 0.05$)，S 期细胞比例较模型组下降明显，在 APOP 期比例较正常组及模型组都有明显上升 ($P < 0.05$)。

通过比较正常培养、乙醛造模后、空白血清和药物血清刺激后 HSC-T6 细胞的 DNA 周期分析图

谱可以看出：2 h组、3 h组的 HSC-T6 细胞和模型组比较时发现 G_0/G_1 期所占比例增高，但 G_2/M 和 S 期下降，这说明药物血清作用后的 HSC-T6 细胞被阻滞于 G_0/G_1 期并抑制其增殖，同时 APOP 期细胞比例增加明显，表明此前细胞凋亡增加（如图 2 所示）。

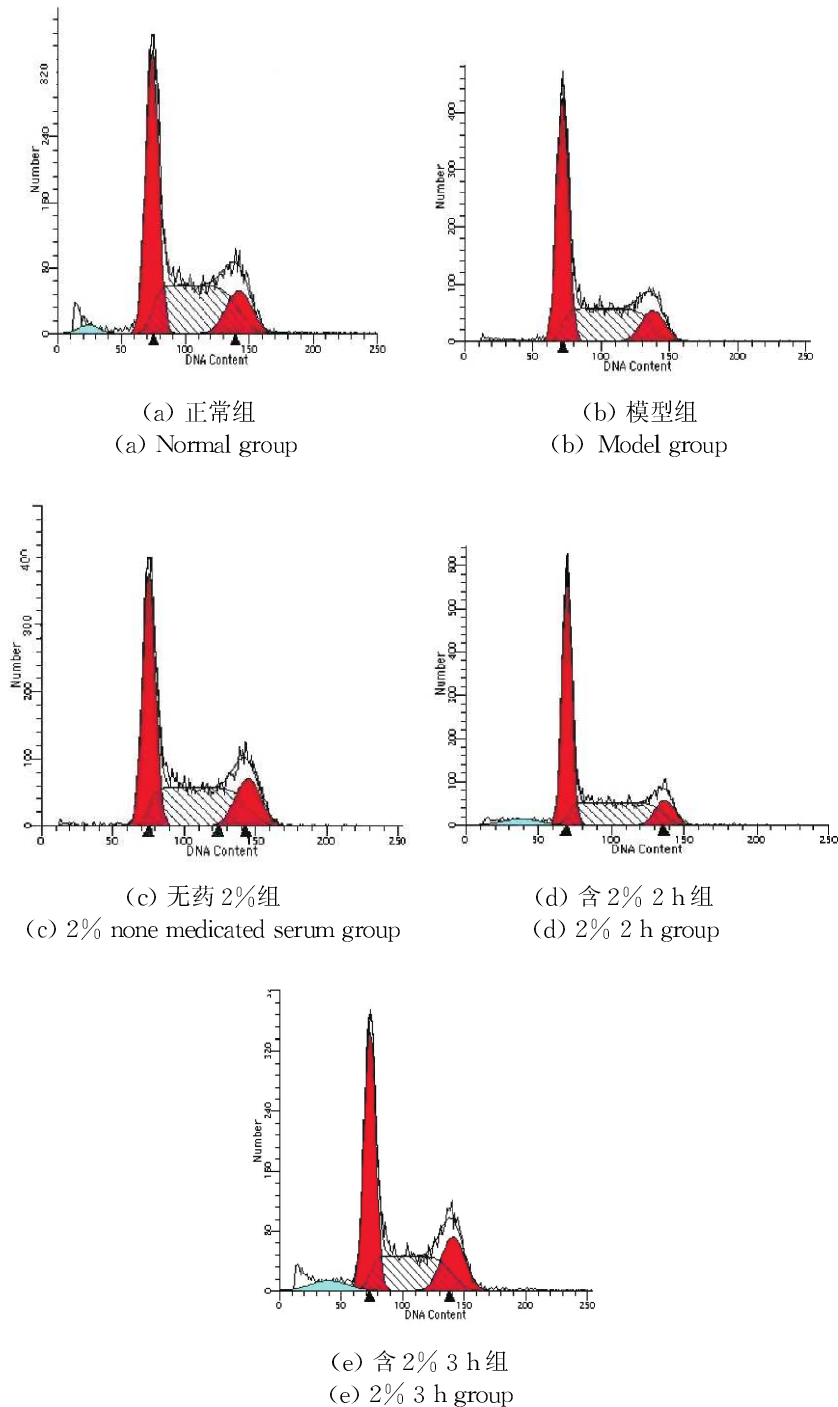


图 2 药物血清对 HSC-T6 细胞周期的影响的 DNA 分析图
Fig. 2 DNA analysis on effect of medicated serum on HSC-T6's period

4 讨论

酒精性肝纤维化表现为，在乙醇及其初级代谢产物乙醛的长期作用下，纤维结缔组织增生和降解

失去平衡，导致肝脏细胞外基质的异常沉积。目前认为活化肝星状细胞（HSC）在肝纤维化发病机制中发挥关键作用^[2]，减少活化 HSC 数量有利于肝纤维化逆转。WRIGHT 等^[3]证实诱导 HSC 凋亡可减轻肝纤维化程度，因此诱导 HSC 凋亡是抗肝纤维化的一种有效途径。IREALE 等^[4]研究发现，活化 HSC 数量的减少主要通过凋亡途径。

PI 染色法加散射光联合分析方法是流式细胞仪检测细胞凋亡的经典方法。这种方法除了能定量分析凋亡细胞的比例，最大优点是能同时进行细胞周期分析。通过先前实验发现，2 h 和 3 h 时间点 2% 药物血清对模型细胞生长有较好的抑制作用，并选取此时点含药血清对肝星状细胞株 HSC-T6 细胞进行流式细胞仪检测细胞周期及凋亡的实验，结果发现 HSC-T6 细胞在 2 h 和 3 h 两个时点 2% 药物血清的作用下 G₀/G₁ 期细胞比例较模型组有明显上升，S 期细胞比例较模型组有明显下降，APOP 期比例较正常组、模型组及空白血清组都有明显上升，具有显著的促凋亡作用。细胞凋亡与细胞周期活动密不可分，当细胞周期转换过程中的某一环节受阻时，机体可通过细胞周期调控相关基因诱导该细胞凋亡，清除该细胞，从而维持机体正常生理机能和自身稳定^[5]。本实验发现赤芍水提物使 HSC-T6 细胞各周期都发生了改变，尤其是其对 G₀/G₁ 期和 S 期的影响，HSC-T6 细胞在增殖信号的刺激下，由静止状态（G₀ 期）进入 G₁ 期—S 期—G₂ 期—M 期。细胞一旦进入 G₁ 期的后期，此期如无特殊干扰，便能按细胞周期顺序发展下去，直至重新回到 G₁ 期为止，如在 G₁—S 期阻断，便能有效地限制细胞的增殖^[6]。此期，用流式细胞仪测定 HSC-T6 细胞周期，发现模型组细胞 G₁ 期减少，S 期细胞增加，提示乙醛造模后细胞增殖活跃，予药物血清作用后，G₁ 期细胞增加，而 S 期细胞减少，说明赤芍水提物药物血清阻滞 HSC 从 G₁ 期向 S 期的进行，造成 G₁ 期细胞堆积，阻滞下一步的合成和复制，起到抑制 HSC-T6 增殖周期的作用。研究认为，很有可能正是这种由赤芍水提物药物血清造成的细胞周期转换过程的障碍，在 G₀/G₁ 期峰前出现了亚二倍体的凋亡峰，导致 HSC-T6 细胞增殖抑制和凋亡的发生。

本实验证明赤芍水提物可明显抑制 HSC-T6 的增殖和促其凋亡，考虑其作用机理是药物血清可增加细胞对凋亡的敏感性，阻止 HSC-T6 通过 G₁/S 关卡，干扰其细胞周期的正常进行，从而促进凋亡。然而参与细胞周期调控的因子很多，也比较复杂，故下一步实验将进行相关细胞分子生物学机制研究，以明确赤芍水提物影响细胞增殖和凋亡的作用机理。

[参考文献] (References)

- [1] CALLEJAS N, CASAO M. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 &-9 in rat[J]. *Hepatology*, 2001, 34(6): 860~867.
- [2] FRIEDMAN S L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury[J]. *Biol. Chem.*, 2001, 275(5): 1212~1226.
- [3] WRIGHT M C, ISSA R, SMART D E, et al. Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats[J]. *Gastroenterology*, 2001, 121(3): 685~698.
- [4] REDALE J P, BENYON R C, PICKERING J, et al. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors[J]. *J. Clin. Invest.*, 1998, 102(6): 538~549.
- [5] 王南瑶, 刘琳, 李苏宜, 等. 三氧化二砷抗肿瘤机制及其临床应用新进展[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2004, 9 (6): 660~662.
WANG N Y, LIU L, LI S Y, et al. Anti-tumor mechanism of arsenic trioxide and its clinical application of new progress[J]. *Journal of Clinic Oncology*, 2004, 9(6): 660~662. (in Chinese)
- [6] 吴坤, 赵艳. 细胞凋亡的研究进展[J]. *国外医学 (遗传分册)*, 2001, 24 (3): 134~138.
WU K, ZHAO Y. Progress in apoptosis[J]. *Foreign Medical Sciences(Section of Genetics)*, 2001, 24(3): 134~138. (in Chinese)