

· 论 著 ·

黄芩甙对肝星状细胞凋亡的影响

贾丽萍¹, 戴里立², 周 娴², 郑元义³

(1. 重庆第九人民医院消化科 400700; 2. 重庆医科大学第二附属医院消化科 400010;

3. 泸州医学院附属医院消化科, 四川 646000)

摘要:目的 研究黄芩甙对大鼠肝星状细胞(HSC)凋亡的影响,探讨黄芩甙抗肝纤维化的机制。方法 采用胶原酶循环灌流法分离肝星状细胞。以不同浓度黄芩甙作用后,通过相差显微镜观察细胞形态变化,用 MTT 法、溴乙锭/吖啶橙荧光染色法、流式细胞术检测黄芩甙对活化的 HSC 凋亡的影响。结果 黄芩甙显著促进活化的 HSC 凋亡,此作用随黄芩甙浓度增加而增强,呈药物浓度依赖关系。结论 黄芩甙可以促进 HSC 凋亡,减少活化 HSC 的总量,发挥其抗肝纤维化作用。

关键词:肝纤维化;黄芩甙;肝星状细胞;凋亡**中图分类号:**R575.205;R282.71**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2010)13-1665-02

Effects of Baicalin on apoptosis of cultured HSC

JIA Li-ping¹, DAI Li-li², ZHOU Xian², et al.

(1. Department of Gastroenterology, the Ninth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400700, China;

2. Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing

Medical University, Chongqing 400010, China; 3. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital,

Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract:Objective To study the effects of Baicalin on the apoptosis of cultured rat hepatic stellate cells (HSCs). **Methods** HSCs were cultured with different concentrations of Baicalin 0, 75, 150, 300, 600, 1 200 $\mu\text{g/mL}$ for 24 hours. Cell apoptosis was detected with phase contrast light microscopy, MTT colorimetric assay, AO/EB fluorescent staining and flow cytometry. **Results** Baicalin markedly increases apoptosis of HSCs, and the effect depends on the drug dose. **Conclusion** Baicalin can cause HSCs apoptosis directly, which might be one of the mechanisms of Baicalin in reducing liver fibrosis.

Key words:liver fibrosis; baicalin; hepatic stellate cell; apoptosis

肝纤维化是诸多慢性肝病发展至肝硬化过程中所共有的病理变化,是影响慢性肝病预后的重要环节;目前研究认为肝纤维化是可逆的^[1]。而中医药被证实有防治肝纤维化的作用,黄芩甙(Baicalin)是一种黄酮类化合物,是黄芩的主要有效成分,也是小柴胡汤、清开灵、银黄合剂等复方制剂的有效成分之一,具有广泛的药理作用。Nan^[2]实验发现黄芩具有抗肝纤维化的作用,且 Tomoo^[3]和 kayano^[4]发现黄芩素具有抗大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)增殖作用,目前国内外尚无黄芩甙对肝纤维化作用的报道。本研究通过分离培养大鼠 HSC,观察黄芩甙对体外培养 HSC 的影响,探讨黄芩甙是否具有抗肝纤维化作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 Wistar 大鼠,体质量 300~450 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物、试剂及主要仪器 黄芩甙为西安量维公司提供。黄芩甙加入 DMEM 液中配成不同浓度的药液,并调 pH 值为 7.4。链霉蛋白酶 E、IV 型胶原酶、DNA 酶 I、DMEM 培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;D-Hank's 干粉、Nycodenz 购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;吖啶橙(AO)、溴乙锭(EB)购自美国 FLUKA 公司;MTT、DMSO 购自北方同正生物技术发展公司。DDB-300 电子蠕动泵、倒置显微镜及成像系统、酶标计数仪 ELX800、流式细胞仪、离心机、CO₂ 细胞培养箱等。

1.3 实验方法

1.3.1 HSC 的分离、培养、鉴定 参照文献[5-6]的方法,采用胶原酶原位循环灌流,密度梯度离心法分离纯化大鼠 HSC。用小鼠抗 desmin 抗体、抗 α -SMA 抗体、SABC 法做免疫细胞化学染色进行鉴定。

1.3.2 观察项目及检测方法 (1)相差显微镜下观察 HSC 的形态变化,分为空白对照组(用不含血清的 DMEM 培养液)和不同剂量黄芩甙用组(75、150、300、600、1 200 $\mu\text{g/mL}$)。药物作用于细胞 24 h,观察细胞贴壁及细胞形态变化情况;(2)采用 MTT 法检测黄芩甙作用后,剩余活化的 HSC 数量,分组同上。将细胞接种于 96 孔板中,培养 24 h,加入药物作用 24 h,吸弃培养基,加入 MTT(5 mg/mL)10 μL ,反应 4 h,弃培养基,加二甲亚砜 100 μL ,振荡 10 min 后用酶标计数仪测定其吸光值(A 值),测定波长为 630 nm;(3)AO/EB 荧光染色法检测黄芩甙对 HSC 凋亡的影响,细胞种板后培养 24 h,加入不同浓度黄芩甙作用 24 h,吸弃培养液,加入少许的 AO、EB 混合液(100 $\mu\text{g/mL}$),荧光显微镜下观察并摄片;(4)流式细胞术检测,传代细胞按 1×10^6 /孔接种于 6 孔板,培养 24 h,额定时间内吸去培养基,改为无血清培养基培养 24 h,弃培养基,加入不同浓度的黄芩甙(0、75、150、300、600、1 200 $\mu\text{g/mL}$),继续作用 24 h,胰酶消化细胞,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液, PBS 洗涤,1 000 r/min 离心 5 min,反复 3 次,弃上清液,收集细胞,将沉淀混匀,加入 75%冰乙醇固定过夜,送流式细胞仪检测。

1.4 统计学方法 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 统计软件进行统计学处理,行 q 检验进行分析。

2 结 果

2.1 HSC 鉴定 0.4% 台盼蓝常规染色, 细胞存活率在 95% 以上。原代培养第 10 天的 HSC 做 α 平滑肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)染色均呈阳性(封 3 彩图 1)。

2.2 细胞形态学观察 对照组细胞生长状态良好, 黄芩甙用药组在用药后 5 h 左右开始看到有部分细胞与其周围的细胞分离, 细胞皱缩成圆形或卵圆形, 可以清楚地观察到凋亡细胞的发泡和凋亡小体, 并随着时间的延长而增多, 且随药物浓度的增加而明显增强, 呈浓度依赖性。12 h 后黄芩甙 600 $\mu\text{g/mL}$ 作用的细胞呈团状飘浮于培养液中, 已无贴壁细胞(封 3 彩图 2)。

2.3 MTT 法检测 黄芩甙各浓度组吸光度值(OD_{550} , A 值)均低于空白对照组, 75 $\mu\text{g/mL}$ 时 A 值为 $(0.060 \pm 6.53) \times 10^{-3}$, 150 $\mu\text{g/mL}$ 时 A 值为 $(0.052 \pm 7.38) \times 10^{-3}$, 300 $\mu\text{g/mL}$ 时 A 值为 $(0.036 \pm 1.26) \times 10^{-3}$, 600 $\mu\text{g/mL}$ 时 A 值为 $(0.023 \pm 1.72) \times 10^{-3}$, 1 200 $\mu\text{g/mL}$ 时 A 值为 $(0.013 \pm 4.15) \times 10^{-3}$, 空白对照组 A 值为 $(0.065 \pm 1.32) \times 10^{-4}$, 不同剂量黄芩甙用药组与空白对照组比较差异有统计学意义($F=1147.611$, $P<0.05$)。提示黄芩甙对 HSC 增殖具有明显抑制作用, 并呈浓度依赖性。

2.4 AO/EB 荧光染色法 荧光显微镜下观察细胞形态可见, 空白对照组 HSC 胞体饱满, 胞核大, 呈均匀绿色, 偶尔可见极个别死亡细胞。而黄芩甙用药组可见 4 种细胞形态: 活细胞(VNA), 核染色质着绿色并呈正常结构; 早期凋亡细胞(VA), 核染色质着绿色并呈固缩状或片断状; 非凋亡的死亡细胞(NVNA), 核染色质着橘红色并呈正常结构; 晚期凋亡细胞(NVA), 核染色质着橘红色并呈固缩状或片断状。其中可见大量凋亡细胞, 胞核固缩呈圆珠状或碎裂呈片断状、碎片状, 可见多量的凋亡小体; 亦可见胞体和胞核结构完整呈绿色荧光的正常细胞或呈橘红色荧光的死亡细胞。随浓度增加, 凋亡细胞明显增加(封 3 彩图 3)。

2.5 流式细胞术检测 如封 3 彩图 4 所示, 空白对照组未出现亚二倍体峰, 而黄芩甙用药组在 G_0-1 期前逐渐出现亚二倍体峰, 结合相差显微镜下细胞形态改变, 判断其为细胞凋亡峰, 并且随着黄芩甙浓度的增加, 此峰的高度逐渐升高。说明随着黄芩甙浓度的增加, 细胞凋亡率明显增加。

3 讨 论

肝纤维化的主要病理特征是细胞外基质(ECM)在肝内的过量沉积。目前认为, 活化的 HSC 是肝纤维化 ECM 的主要来源细胞。HSC 在多种因素刺激后被激活转换成为肌成纤维样细胞(myofibroblast-like cell, MFBLC), 细胞大量增殖, 合成 ECM, 并在肝内过量沉积, 发生肝纤维化^[7]。抑制 HSC 的活化增殖、促进活化的 HSC 凋亡是防治肝纤维化的重要途径。活化增殖后的 HSC 有 2 种结果: (1) 回到静止状态; (2) 通过凋亡等途径死亡。肝纤维化的逆转与活化的 HSC 数量减少相关^[8], 其中, 凋亡途径不但可以减少增生活化的 HSC 数量, 而且凋亡的细胞可在数小时内被周围的细胞所吞噬, 很少引起微环境的炎症损伤, 是一种理想的清除增生 HSC 的方式^[9-10]。Lang 等^[11]发现在纤维化恢复过程中, 肝组织内检测到凋亡的

HSC 与其数量的减少相互平行, 证实凋亡是一种逆转肝纤维化的有效策略。AO/EB 双荧光染色法结果显示黄芩甙用药组与空白对照组比较, 凋亡细胞明显增多, 呈浓度依赖性。流式细胞术检测结果发现黄芩甙用药组出现凋亡峰, 并随着浓度增加凋亡峰明显升高; 结合形态学观察及 MTT 实验提示, 黄芩甙对体外培养的活化 HSC 具有抑制增殖、促进凋亡的作用。既往研究表明黄芩甙有抗乙型肝炎病毒、护肝、抗脂质过氧化作用, 本实验旨在探讨黄芩甙是否具有抗肝纤维化的作用。结果证明黄芩甙可以明显抑制活化 HSC 增殖, 促进其凋亡, 直接或间接抑制 HSC 合成 ECM 的能力, 并干扰肝窦毛细血管化的形成, 从而达到防治肝纤维化的目的。如与其抗乙型肝炎病毒、护肝、抗脂质过氧化作用相结合, 在治疗中会起到协同作用, 因此黄芩甙的应用前景广阔。

参考文献:

- [1] Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy[J]. J Gastroenterol, 1997, 32: 424.
- [2] Nan JX. Scutellaria baicalensis inhibits liver fibrosis induced by bile duct ligation or carbon tetrachloride in rats[J]. J Pharm Pharmacol, 2002, 54: 555.
- [3] Tomoo I. Strong antiproliferative effects of baicalein in cultured rat hepatic stellate cells[J]. Eur J Pharmacol, 1999, 378: 129.
- [4] Kayano K. Inhibitory effects of the herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) on cell proliferation and procollagen gene expressions in cultured rat hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 1998, 29: 642.
- [5] Ramm GA. Isolation and culture of rat hepatic stellate cells[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1998, 13: 846.
- [6] 罗云, 戴立里, 沈鼎明. 一种肝星状细胞的提取方法[J]. 重庆医科大学学报, 2002, 30(1): 26.
- [7] Dan L, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy[J]. J Gastroen Hepa, 1999, 14: 618.
- [8] Iredale JP, Benyon RC, Pickering J. Mechanism for spontaneous resolution for rat liver fibrosis, hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors[J]. J Clin Invest, 1998, 102: 538.
- [9] 尤红, 王宝恩, 王泰龄, 等. 复方 861 对肝星状细胞的增殖和凋亡的干预作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(1): 78.
- [10] David L, Spector D, Robert D. 细胞实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 102.
- [11] Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, et al. Nuclear factor kappa B in proliferation, activation and apoptosis in rat hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 2000, 33: 49.

(收稿日期: 2010-04-14 修回日期: 2010-05-20)