

## 抗肝纤维化有效中药复方血清药理学方法探讨\*

刘成海 刘 平 刘 成 季 光 徐列明(上海中医药大学肝病研究所 上海 200032)

**摘 要** 扶正化癥方灌胃正常大鼠制备血清,温育大鼠肝细胞及星状细胞,将含药血清及冻干粉直接添加于培养细胞,通过观察细胞形态及功能变化,探讨复方抗肝纤维化的血清药理试验方法。结果表明冻干粉抑制细胞增殖及活力。二次给药 1h 后同种灭活血清抑制星状细胞增殖、促进肝细胞增殖,能较好地用于抗肝纤维化的体外药理试验。

**关键词** 血清药理学 肝纤维化 肝星状细胞 肝细胞

### Study on a Seropharmacological Method for an Effective Antifibrotic Formula

*Liu Chenghai, Liu Ping, Liu Cheng, Ji Guang, Xu Lieming*

*(Institute of Liver Diseases, Shanghai University of TCM, Shanghai, 200032)*

**Abstract:** The serum was collected from rats fed on Fuzheng Huayu (FZHY) decoction, and FZHY decoction was lyophilized into powder. And both were incubated with hepatic stellate cells (HSC) and hepatocytes. Then cell morphology and functions were observed to study the seropharmacological methods for antifibrotic traditional Chinese herbs. The results showed that the FZHY powder inhibited cell proliferation and viability. The deactivated rat's sera drawn 1h after FZHY-treatment twice had no cytotoxicity, promoted hepatocyte proliferation, and inhibited HSC proliferation. Therefore, this seropharmacological method could be applied for antifibrotic herbal formulae.

**Key words:** seropharmacological method, liver fibrosis, hepatic stellate cells, hepatocytes

血清药理学是当前复方药理研究的热点之一<sup>[1]</sup>。扶正化癥方由虫草菌丝、丹参、桃仁等组成,既往动物试验和临床观察发现该方能够抑制肝脏结缔组织增生、促进其降解,有着良好的抗肝纤维化作用<sup>[2]</sup>。本文通过采集灌服该方后的大鼠血清,添加于肝纤维化病理形成的重要细胞—培养的大鼠肝细胞及星状细胞<sup>[3]</sup>,探讨中药复方抗肝纤维化的血清药理试验方法及扶正化癥方的部分作用机制。

### 1 材料

**1.1 动物** Wistar 雄性大鼠,体重 350~

500g(分离星状细胞、制备血清用)或 160~220g(分离肝细胞用),SPE 级,由上海中医药大学动物试验中心提供。

**1.2 药物** 扶正化癥方,由上海中华制药厂中心实验室制成流浸膏,每 g 流浸膏含生药 2.703g。

**1.3 主要试剂** 无钙 MEM 培养基、199 培养基、DMEM 培养基均购自 GIBCO 公司。链酶蛋白酶、VI 型胶原酶、胰岛素、Ⅲ型 DNA 酶、三碘苯甲酰葡萄糖(Matrizamide)等均购自 Sigma 公司。氘标脯氨酸(L-

\* 国家自然科学基金资助项目(No:39570889)

[5-<sup>3</sup>H]Proline, [<sup>3</sup>H]Pro, 925GBq/mmol) 购自 Amersham 公司; 氚标胸腺嘧啶 ([<sup>3</sup>H]TdR, 1148GBq/mmol) 购自上海原子能研究所。聚蔗糖 (Ficoll) 购自上海试剂二厂。

2 方法

2.1 药物血清的制备 每种条件血清选用正常大鼠 2~4 只, 实验前禁食 12h。大鼠灌胃给药, 对照组喂以等量生理盐水。

2.1.1 设高、中、低 3 个剂量组 0.23、0.46、1.38g/kg 大鼠体重, 分别相当于 65kg 成人每日用量的 5 倍、10 倍、30 倍, 以双蒸水稀释复方浸膏, 10ml/kg 大鼠体重的容积灌胃。

2.1.2 设 2 种给药方式 一次给药及二次重复 (2h 后相同剂量重复给药 1 次)。

2.1.3 设 5 个采血时相 一次给药后 1、2h, 二次给药后 1、2、3h。无菌条件下自下腔静脉采血, 离心血清 (3000rpm, 20min, 4℃)。

2.1.4 设 2 种血清处理方式 将同一条件的动物血清混匀, 部分灭活 (56℃、30min), 部分不灭活, 均于 -70℃ 冷藏备用。下称药物血清。

2.2 扶正化瘀方冻干粉末培养液配制 将扶正化瘀方流浸膏冷冻干燥, 而后将其粉末以 0.1、0.2、0.3、0.5mg/ml 的浓度分别溶于含 10% 小牛血清的 199 培养液中。

2.3 星状细胞的分离及培养 按本所常规方法进行<sup>[4]</sup>。细胞得率 (2~5) × 10<sup>7</sup>/个肝脏, 细胞活力 98% 以上, 细胞鉴定依据相差显微镜下富含脂滴的典型形态及结蛋白免疫组化染色阳性, 细胞纯度 90% 以上。细胞长满单层后传一代培养。

2.4 肝细胞的分离培养 改进中村氏方法<sup>[5]</sup>。即以 0.05% (w/v) 胶原酶原位灌流肝脏, 12.3% (w/v) Ficoll 精制肝细胞, 然后以含 5% (v/v) 小牛血清、10<sup>-9</sup>mol/L 胰岛素、10<sup>-9</sup>mol/L 地塞米松的 199 培养液原代培养。

2.5 细胞增殖测定 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入法, 即 24 孔板传一代培养星状细胞长满单层后, 分别用药物冻干粉末培养液或含 5%、10%、

20% (v/v) 药物血清的 199 培养液温育细胞 48h, 加入 [<sup>3</sup>H]TdR (90.5μBq/孔), 24h 后收集细胞, 固相膜片法测定样本 cpm 值。

2.6 细胞活力测定<sup>[6]</sup> 同细胞增殖测定, [<sup>3</sup>H]TdR 改为等量 [<sup>3</sup>H]Pro。

2.7 统计学处理 双侧 *t* 检验。

3 结果

3.1 正常大鼠血清对细胞形态及增殖的影响 以含 10% 正常大鼠血清的 199 培养液温育细胞, 血清无论灭活与否, 均能维持星状细胞、肝细胞正常生长, 相差显微镜下细胞无明显改变。但大鼠血清组细胞内 [<sup>3</sup>H]TdR 的掺入量均较小牛血清组低 (表 1)。

表 1 正常大鼠血清对星状细胞、肝细胞 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入的影响 (cpm/well,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | <i>n</i> | 星状细胞             | 肝细胞                |
|------|----------|------------------|--------------------|
| 小牛血清 | 4        | 3724.9 ± 485.5   | 74171.7 ± 11524.5  |
| 大鼠血清 | 4        | 2864.5 ± 139.4 * | 30525.2 ± 8518.6 * |

注: 与小牛血清组比较 \* *P* < 0.05

3.2 血清灭活与否对星状细胞增殖的影响 将灭活、不灭活的正常大鼠血清及中剂量二次给药 1h 后的药物血清作用于星状细胞, 结果灭活血清组细胞内 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入量较低 (表 2)。以下均采用灭活血清。

表 2 血清灭活与否对星状细胞 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入的影响 (cpm/well,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | <i>n</i> | 灭活              | 未灭活               |
|-------|----------|-----------------|-------------------|
| 对照组   | 4        | 4430.1 ± 1554.1 | 5663.5 ± 1741.4 * |
| 药物血清组 | 4        | 2643.8 ± 548.0  | 3633.3 ± 1022.3 * |

注: 血清浓度 10%, 与灭活组比较 \* *P* < 0.05

3.3 一次给药药物血清对细胞增殖的影响 一次给药各剂量、各时相组的药物血清对星状细胞增殖、中剂量各时相组药物血清对肝细胞均无明显作用 (表 3)。

表 3(1) 一次给药药物血清对星状细胞 [<sup>3</sup>H]TdR 掺入的影响 (cpm/well,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | <i>n</i> | 1h             | 2h             |
|------|----------|----------------|----------------|
| 对照组  | 4        | 1752.5 ± 479.9 | 1752.5 ± 479.9 |
| 低剂量组 | 4        | 1629.6 ± 513.1 | 1454.9 ± 583.1 |
| 中剂量组 | 4        | 1826.6 ± 713.5 | 2003.5 ± 769.9 |
| 高剂量组 | 4        | 1161.1 ± 311.7 | 1714.0 ± 356.1 |

表 3(2) 一次给药中剂量药物血清对肝细胞<sup>[3H]</sup>TdR 掺入的影响( $\bar{x}\pm s$ )

| 组 别 | n | cpm/well       |
|-----|---|----------------|
| 对照组 | 4 | 30525.2±8518.6 |
| 1h  | 4 | 36060.7±5334.4 |
| 2h  | 4 | 31812.6±5509.1 |

3.4 二次给药药物血清对细胞增殖的影响

3.4.1 不同口服剂量的作用 低、中、高各剂量组二次给药 1h 后的药物血清对星状细胞<sup>[3H]</sup>TdR 掺入明显抑制,呈剂量依赖性趋势;低、中剂量组促进肝细胞<sup>[3H]</sup>TdR 掺入,尤以中剂量作用明显,但高剂量出现抑制效果(表 4)。

表 4 不同口服剂量药物血清对细胞<sup>[3H]</sup>TdR 掺入的影响(cpm/well, $\bar{x}\pm s$ )

| 组 别  | n | 星状细胞          | 肝细胞             |
|------|---|---------------|-----------------|
| 对照组  | 4 | 2864.5±239.2  | 31037.3±3502.9  |
| 低剂量组 | 4 | 1979.7±76.7*  | 37896.0±842.8*  |
| 中剂量组 | 4 | 1882.1±112.1* | 45459.8±5958.2* |
| 高剂量组 | 4 | 1781.9±49.7*  | 25076.0±8088.9  |

注:与对照组比较 \* $P<0.05$

3.4.2 不同时相血清的作用 中剂量各个时相组药物血清明显抑制星状细胞增殖、促进肝细胞增殖,其中均以 1h 时药物血清作用较强(表 5)。

表 5 不同时相药物血清对细胞<sup>[3H]</sup>TdR 掺入的影响(cpm/well, $\bar{x}\pm s$ )

| 组 别     | n | 星状细胞          | 肝细胞             |
|---------|---|---------------|-----------------|
| 对照组     | 4 | 4430.1±1554.1 | 30525.2±8518.6  |
| 1h 药物血清 | 4 | 2643.8±548.0* | 45290.5±6170.3* |
| 2h 药物血清 | 4 | 3049.7±269.2* | 37321.3±2354.4  |
| 3h 药物血清 | 4 | 2729.9±426.7* | 39388.6±4494.2* |

注:与对照组比较 \* $P<0.05$

3.4.3 不同温育浓度的作用 用含 5%、10%、20% 中剂量 1h 药物血清的培养液温育细胞,并以相同浓度的正常血清为对照,结果见表 6。

表 6 不同浓度药物血清对星状细胞<sup>[3H]</sup>TdR 掺入的影响(cpm/well, $\bar{x}\pm s$ )

| 组 别  | 浓 度           |               |               |
|------|---------------|---------------|---------------|
|      | 5%            | 10%           | 20%           |
| 对照组  | 1481.9±168.0  | 2013.9±628.8  | 2709.9±788.2  |
| 药物组  | 703.0±138.3** | 637.3±214.5** | 480.2±264.3** |
| 抑制率% | 52.56±9.34    | 68.35±10.68   | 82.27±9.75    |

注:与相应对照组比较 \*\* $P<0.01$ , $n=4$

3.5 扶正化瘀方冻干粉末直接添加对星状细胞形态及增殖的影响 0.5mg/ml 剂量组细胞大量死亡,其余剂量组作用见表 7。

表 7 冻干粉末直接添加对星状细胞<sup>[3H]</sup>TdR 掺入的影响(cpm/well, $\bar{x}\pm s$ )

| 组 别      | n | <sup>[3H]</sup> TdR |
|----------|---|---------------------|
| 对照组      | 4 | 8754.8±629.8        |
| 0.1mg/ml | 4 | 8881.1±1230.9       |
| 0.2mg/ml | 4 | 6710.4±188.6*       |
| 0.3mg/ml | 4 | 4805.1±549.9*       |

注:与对照组比较 \* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

3.6 药物血清与冻干粉末直接添加对星状细胞活力的影响 (表 8)

表 8(1) 冻干粉末对星状细胞<sup>[3H]</sup>Pro 掺入的影响( $\bar{x}\pm s$ )

| 组 别      | n | <sup>[3H]</sup> Pro(cpm/well) | % of Control |
|----------|---|-------------------------------|--------------|
| 对照组      | 4 | 11229±1866                    | 100          |
| 0.1mg/ml | 4 | 10018±1198                    | 77.58±37.23  |
| 0.2mg/ml | 4 | 5289±2210*                    | 45.15±19.46  |
| 0.3mg/ml | 4 | 8712±1521*                    | 89.23±10.67  |

注:与对照组比较 \* $P<0.05$

表 8(2) 药物血清对星状细胞<sup>[3H]</sup>Pro 掺入的影响( $\bar{x}\pm s$ )

| 组 别  | n | <sup>[3H]</sup> Pro(cpm/well) | % of Control |
|------|---|-------------------------------|--------------|
| 对照组  | 4 | 3610.7±999                    | 100          |
| 低剂量组 | 4 | 6577.7±1691.2*                | 182.19±46.83 |
| 中剂量组 | 4 | 9374.7±552.9**                | 266.30±26.03 |
| 高剂量组 | 4 | 4560.2±2603.3                 | 126.30±70.09 |

注:与对照组比较 \* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

3 讨 论

由于中药成分复杂,使其细胞分子水平上药理研究受到局限。若将复方粗提物直接添加于培养细胞,可能产生一些非药理影响。而以整体动物灌胃给药,采其血清,作用于培养细胞的血清药理学方法则可以克服以上诸多缺点,较好的反映复方的药理作用。但是,在动物血清制备、添加方式等具体方面国内外少有详细报道,尚缺乏统一的方法。

目前在动物种属的选择上,大多采用同种动物。但在药物血清的添加方法上,多是含药血清与常规培养血清(小牛或胎牛血清)并存。如本实验所见,不同种属的动物血清对细胞增殖等功能影响不尽相同。因此本试验仅

用一种大鼠血清,结果其正常血清维持细胞生长,促进细胞增殖,药物血清抑制细胞增殖,均呈浓度依赖性,表明培养系中只用一种血清可靠可行,同种的单一血清既可为细胞提供营养,又为药物载体,避免了多种血清的干扰。血清灭活后细胞增殖减弱,可能与血清中细胞生成因子减少有关,这有助于减少血清的非药理性干扰,也符合减少微生物感染的常规细胞培养要求。在给药方式上,本试验从一次给药开始,发现二次给药后采集血清即可满足要求,与7~10d连续用药相比具有简便性<sup>[7,8]</sup>。在动物的类型上,报道多用正常动物<sup>[7~9]</sup>。但复方经生理脏器与病理脏器、尤其是病变肝脏的代谢后,其药物本身及机体所产生的变化可能不全相同,而临床服用药物的对象为病理状态的患者,因此病理状态药物血清对细胞的影响尚需进一步探讨。

[<sup>3</sup>H]Pro 能广泛的掺入蛋白质中,可较好地反映细胞活力<sup>[6]</sup>。虽然该方的冻干粉直接添加也抑制细胞增殖,但是药效剂量范围较窄,稍大细胞死亡,稍小没有效应,对细胞活力有抑制作用,因此直接添加可能较易产生细胞毒性或其他作用影响。当然,由于血清中复方的有效成分含量目前难以精确测定,“血药浓度”高峰难以确定,直接添加法与血清法也难以严格比较。血清药理学的完善有待于复方药物血清成分分析及其药代动力学的发展。

总之,本文首次在培养系中运用单种含药动物血清,初步探讨了不同给药次数、给药剂量、血清温育浓度及灭活与否等扶正化瘀方药物血清对肝细胞、星状细胞形态及功能的影响。结果表明单种动物血清可以维持细胞的生长,药物血清对细胞形态无明显影响,促进星状细胞活力及肝细胞增殖,均以口服中剂量最佳,与体内试验中剂量的综合效果最好相符合,促进肝细胞增殖、抑制星状细胞增殖均以二次给药1h后药物血清效果较强。

且对抑制星状细胞增殖,呈药物剂量及血清温育浓度依赖性,有一定的量效关系。说明该实验方法稳定,二次给药1h后、同种的灭活血清能较好地用于抗肝纤维化的体外药理试验。扶正化瘀方药物血清对肝细胞增殖的促进,有利于其损伤的修复,体现了该方扶正的作用;而对星状细胞增殖的抑制,则有助于抑制活化及其细胞外基质生成,反映该方的化瘀效果。这些作用可能是其抗肝纤维化的重要机理之一。

#### 参考文献

- 1 张群豪,陈可冀. 血清药理学在中药及复方研究中应用的评价. 中国中西医结合杂志,1996,16(3):131
- 2 刘成,刘平,胡义杨,等. 扶正化瘀方抗肝纤维化的研究. 中医杂志,1994,35:602~604
- 3 Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. N Eng J Med, 1993, 24:1828~1835
- 4 徐列明,刘成,刘平,等. 一种稳定和高产的星状细胞分离法. 细胞生物学杂志,1995,117(3):14~16
- 5 中村敏一. 初代培养肝细胞实验法. 东京:学会出版セシター,1986. 3
- 6 Mallat A, Preaux AM, Blazejewski S, et al. In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. J Hepat, 1989,9:59~68
- 7 Umeeda M, Amagaya S, Ogihara Y. Effects of certain herbal medicines on the biotransformation of arachidonic acid: A new pharmacological testing method using serum. J Ethnopharmacol, 1988,23:91~98
- 8 王力倩,余上才,李仪奎,等. 用血清药理学研究苦参、仙鹤草的抗肿瘤作用. 中国中医药科技, 1995,2(1):19~22
- 9 张群豪,钟蓓,陈可冀,等. 用血清药理学方法观察血府逐瘀浓缩丸对试验性动脉粥样硬化家兔主动脉平滑肌细胞增殖的影响. 中国中西医结合杂志,1996,16(3):156~159

(收稿:1997-04-07)