

复方 861 对原代培养大鼠肝细胞增殖和凋亡的作用

尤红, 王宝恩, 马雪梅, 马红, 阴赓宏, 贾继东
(首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050)

摘要: 目的: 研究中药复方 861 对原代培养大鼠肝细胞增殖和凋亡的干预作用。方法: 分离培养大鼠原代肝细胞并进行鉴定, 细胞增殖采用 H^3 标记胸腺嘧啶掺入法检测, 细胞凋亡采用电镜观察和流式细胞仪检测。结果: 一定浓度的复方 861 可以促进体外分离培养的大鼠肝细胞 DNA 合成 ($P < 0.05$), 这种作用在一定浓度范围内呈剂量效应关系。而该药对肝细胞的凋亡无显著影响 ($P > 0.05$)。结论: 中药复方 861 对体外培养的大鼠肝细胞具有促进增殖的作用。

关键词: 肝细胞; 增殖; 凋亡; 复方 861

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2001)02-0034-02

肝细胞是肝脏中数量最多的细胞, 它积极参与了肝脏再生、免疫应答的多个过程, 在纤维化形成中肝细胞的受损也是启动星状细胞活化的重要因素^[1]。本文探讨了中药复方 861 对体外培养的原代大鼠肝细胞增殖和凋亡方面的作用, 进一步阐明该药保护肝细胞以及抗肝纤维化的机理。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级 Wistar 大鼠购自中国预防科学院。IV 型胶原酶、噻唑蓝及碘化丙啶购自 Sigma 公司。 H^3 -胸腺嘧啶购自英国 Amersham Pharmacia Biotech 公司, 比活性 1.0mCi/ml。复方 861 由丹参、黄芪等 10 味中药组成, 为友谊医院制剂中心制备, 浓度按生药含量计算。经 0.45 μ m 滤器过滤后, 用培养液稀释成不同浓度加入细胞。

1.2 肝细胞的分离培养及鉴定

1.2.1 肝细胞的分离培养 按文献方法^[2], 略有改进。选用 100–200g 的 Wistar 大鼠, 行门静脉插管, 以含有 0.05% 的 IV 型胶原酶的 Hank's 液 (pH7.3, 37℃) 循环灌注。轻剥肝包膜离散肝细胞, 过滤后离心, 将沉淀的细胞进行台盼蓝染色, 判定存活率。再将细胞悬浮于含 10% 胎牛血清和 4U/ml 胰岛素的 DMEM 培养基中, 在 5% CO₂、95% 潮湿空气 37℃ 的培养箱中培养 4–6h, 待大多细胞贴壁后换用不含血清的 DMEM。以分离第 3d 至 5d 内的细胞作为本实验对象。

1.2.2 肝细胞的鉴定

1.2.2.1 电镜 1×10^6 细胞离心。常规 4% 戊二醛

固定包埋, 透射电镜观察。

1.2.2.2 糖原染色 常规 PAS 染色。

1.3 复方 861 对肝细胞存活率的影响 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法。药物加入细胞后培养 48h 吸出培养液, 0.05% 的 MTT 作用 4h, 吸出培养液后加二甲亚砷并混匀。测光密度值计算细胞存活率。

1.4 复方 861 对肝细胞增殖的影响 按文献方法^[3,4], 略有改进。将原代培养的肝细胞接种于 24 孔板中, 把浓度分别为 2.5mg/ml、5mg/ml、7.5mg/ml 的复方 861 加入细胞培养作用 48h。将 2 μ Ci/100 μ l 的 H^3 -胸腺嘧啶加入细胞继续培养 12h 后弃去培养液。消化, 漂洗, 离心后弃去上清, 转入甲苯闪烁液中, 用 β 液闪计数器测定 Cpm 值。

1.5 复方 861 对肝细胞凋亡的影响

1.5.1 电镜观察肝细胞的凋亡 把 5mg/ml 的复方 861 加入细胞作用 48h 后方法与肝细胞鉴定相同。

1.5.2 流式细胞仪碘化丙啶 (PI) 染色法 将浓度分别为 2.5mg/ml、5mg/ml、7.5mg/ml 的复方 861 加入肝细胞培养作用 48h。取以上各组 1×10^6 细胞, 离心弃上清, 4℃ 的 70% 冷乙醇固定。加 RNA 酶 50 μ g/ml 37℃ 作用 30min。加入 PI 50 μ g/ml 和 0.1% 的 Triton $\times 100$ 。24h 内流式细胞仪检测。计数凋亡细胞的百分率。

1.6 统计分析 采用 SPSS 软件对数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 肝细胞分离培养及鉴定 分离的原代大鼠肝细胞纯度达 80%, 存活率 90%。采用无血清培养液培养 48h 后, 纯度可达 90%。在分离培养后第 2–4h

部分肝细胞出现变形,呈不规则铺路石状,贴壁,第12h大多数变形的肝细胞可排列成条索状,形成细胞索。

鉴定结果:电镜显示细胞内存在多种细胞器,其中线粒体丰富,内质网、核蛋白体发达。滑面内质网附近常见糖原颗粒。细胞核圆形,位于细胞中央,有1~2个核仁。糖原PAS染色显示大于90%的细胞被染成红色。以上结果证明所分离的大鼠原代细胞为肝细胞。

2.2 复方861对肝细胞存活率的影响 MTT比色法揭示0~7.5mg/ml的复方861作用肝细胞,细胞的存活率大于90%。

2.3 复方861促进原代培养的肝细胞增殖 H^3 标记的胸腺嘧啶掺入法显示,与未加药组相比,2.5mg/ml,5mg/ml和7.5mg/ml的复方861使胸腺嘧啶掺入原代培养肝细胞的量增加,在一定浓度范围内呈剂量依赖关系。表明复方861促进了原代大鼠肝细胞的DNA合成($P < 0.05$),结果见表1。

表1 复方861对原代大鼠肝细胞增殖的影响(H^3 -TdR掺入法)

分组	空白对照组	复方861组		
		2.5mg/ml	5mg/ml	7.5mg/ml
H^3 -TdR 掺入量	273.2	336.4	372.5	317.5
(cpm值)	± 18.4	$\pm 28.3^*$	$\pm 17.7^* \Delta$	$\pm 10.6^*$

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与2.5mg/ml组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.4 复方861对原代培养的肝细胞凋亡无显著影响

2.4.1 电镜 正常肝细胞培养48h后,可见肝细胞凋亡改变:内质网扩张,细胞核不规则,染色质浓缩并凝结成块,核内异染色质沿核膜内侧排列。中药复方861作用后,仍可见部分细胞有上述凋亡的表现,但有些肝细胞内质网扩张程度减轻。

2.4.2 流式细胞仪PI染色显示 不同浓度的复方861作用原代肝细胞48h,用流式细胞仪检测凋亡率与未加药的对照组无显著差异($P > 0.05$),结果见表2。

表2 复方861对原代大鼠肝细胞凋亡的影响(流式细胞仪PI染色)

分组	空白对照组	复方861组		
		2.5mg/ml	5mg/ml	7.5mg/ml
细胞凋亡率(%)	22.5 $\pm$ 3.5	28.1 $\pm$ 2.8	26.2 $\pm$ 5.6	35.0 $\pm$ 7.1

3 讨论

复方861由丹参、黄芪等10味中药组成,已经有实验和临床研究资料表明它是治疗肝纤维化、早期肝硬化的有效复方,具有抑制胶原合成、促进胶原降解等作用^[5]。本研究通过 H^3 -胸腺嘧啶掺入法显示,复方861可以促进原代培养的大鼠肝细胞增殖。这种方法是依靠检测同位素标记的胸腺嘧啶掺入细胞量来反映细胞DNA的合成情况。这提示了复方861促进肝细胞增殖的原理是促进了肝细胞的DNA合成。

在所采用的复方861三个剂量中,对肝细胞增殖的促进作用并不完全呈明显的剂量效应关系,这可能是因为复方861的高剂量(7.5mg/ml)引起了部分肝细胞死亡,从而降低了对其增殖的影响。这也从另一侧面提示了选择合适的药物剂量产生所需要的生物效应对治疗的重要性。

做为群体细胞总数的增加,取决于增生和死亡的相对关系。复方861促进了肝细胞的DNA合成和增殖,对其凋亡无显著影响。从总体来看最终的结果表现为肝细胞的增生。这与临床观察到的复方861治疗慢性乙肝纤维化病人,可见促进肝细胞再生,减少活化的肝星状细胞是一致的^[6]。

参考文献:

- [1] 姚光弼. 肝脏损伤的机制[J]. 中华消化杂志, 1998, 18: 235—238.
- [2] Seglen PO. Preparation of rat liver cells. In: Prescott DM, ed. Methods in Cell Biology [J]. New York: Academic Press, 1987, 8: 29—83.
- [3] Vermijlen D, Luo D, Robaye B, et al. Pit cells (hepatic natural killer cells) of the rat induced apoptosis in colon carcinoma cells by the perforin/granzyme pathway [J]. Hepatology, 1999, 29: 51—56.
- [4] Runge DM, Runge D, Dorko K, et al. Epidermal growth factor and hepatocytes growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes [J]. J Hepatol, 1999, 30: 265—274.
- [5] Wang BE, Wang TL, Jia JD, et al. Experimental and clinical study on inhibition and reversion of liver fibrosis with integrated Chinese and western medicine [J]. CJIM 1999, (5): 6—11.
- [6] 尤红, 王宝恩, 王泰龄, 等. 肝星状细胞的增殖和凋亡及复方861对其干预作用的研究 [J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(2): 78—80.