

• 实验研究 •

抗纤方抑制 $TGF-\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡的实验研究*

张立煌 吴嘉庚 姚航平 李敏伟

内容提要 目的:探讨抗纤方对 $TGF-\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡的抑制作用。方法:采用细胞生物学等方法,利用 $TGF-\beta_1$ 可诱导肝细胞凋亡的特性,建立体外实验模型,观察抗纤方对 $TGF-\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡抑制作用。结果:实验表明 $TGF-\beta_1$ 以剂量依赖关系诱导肝细胞凋亡,当 $TGF-\beta_1$ 浓度在 500pg/ml 时可诱导 2.2.15 细胞凋亡达 63%,而 HepG2 细胞凋亡只有 42%;此时,用抗纤方 20mg/ml 可使 2.2.15 细胞凋亡率降至 33%,HepG2 细胞凋亡率降至 24%,抑制率均在 50%左右。结论:抗纤方体外对 $TGF-\beta_1$ 诱导的肝细胞凋亡有明显的抑制作用。

关键词 抗纤方 肝细胞 凋亡 $TGF-\beta_1$

Experimental Study of Inhibitory Effect of Kangxian Recipe on $TGF-\beta_1$ Induced Hepatocyte Apoptosis ZHANG Li-huang, WU Jia-geng, YAO Hang-ping, et al The First Affiliated Hospital, Zhejiang University College of Medicine, Hangzhou (310003)

Objective: To study the inhibitory effect of Kangxian Recipe (KXR) on $TGF-\beta_1$ induced hepatocyte apoptosis. **Methods:** The in vitro model of hepatocyte apoptosis was established by cell biologic methods, utilizing the characteristics of $TGF-\beta_1$ to observe the inhibitory effect of KXR on hepatocyte apoptosis. **Results:** $TGF-\beta_1$ induced apoptosis of hepatocyte in a dose-dependent manner. The apoptosis rate of 2.2.15 cells was 63% when 500 ng/L $TGF-\beta_1$ was used, while for HepG2 cell, it was merely 44%. After treatment of 20 ng/L KXR, the apoptosis rate of the two kinds of cell lines lowered to 33% and 24% respectively. The inhibition rate of both groups was about 50%. **Conclusion:** KXR had strong inhibitory effect on hepatocyte apoptosis induced by $TGF-\beta_1$.

Key words Kangxian Recipe, hepatocyte, apoptosis, $TGF-\beta_1$

最近的研究表明肝细胞凋亡是病毒性肝炎的重要病理基础^[1],进而发现 $TGF-\beta_1$ 体外可诱导肝细胞凋亡,并且肝内 $TGF-\beta_1$ 表达与肝细胞凋亡和肝功能损伤直接相关^[2]。因而,如能抑制肝细胞凋亡,即对肝细胞有保护作用。本研究利用 $TGF-\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡的特性,探讨行气活血中药抗纤方的护肝机理,为进一步提取其有效成分和临床应用提供理论依据。

材料和方法

1 材料

1.1 细胞株 HepG2 细胞(人肝癌细胞株)引自上海细胞生物研究所;2.2.15 细胞(转染 HBV DNA 的 HepG2 细胞)引自重庆肝病研究所。

1.2 细胞凋亡原位检测试剂盒 购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.3 药物 抗纤方以柴胡、白芍、枳壳、甘草、鳖

甲、白术、黄芩、赤芍、丹参组成,碾成粉状,100g 生药粉用 60%乙醇 1000 ml 浸泡 24h,80℃回流提取 1h,反复两次,尼龙网过滤,减压分流乙醇,离心去杂质,上清浓缩制成粉状,每克提取物相当于生药 20.4g,用培养基配成 1g/ml 生药浓度过滤除菌备用。

2 方法

2.1 药物毒性实验 参照 Mosmann 方法^[3],稍加修改。消化 2.2.15 细胞和 HepG2 细胞,调整细胞浓度 $1 \times 10^5/\text{ml}$,于 96 孔板中每孔中加入 $100\mu\text{l}$ 细胞悬液,37℃ 5% CO_2 条件培养 72h,弃上清,加不同浓度药物 $100\mu\text{l}/\text{孔}$,继续培养 96h,镜下观察各孔细胞的生长情况,测定 100%细胞死亡的最低药物浓度,50%细胞死亡的最低药物浓度及无细胞死亡的最高药物浓度。同时,加 2mg/ml MTT 溶液,每孔 $50\mu\text{l}$,继续培养 4h,于 570nm 处测 OD 值,结合镜下观察的细胞病变情况确定 IC₅₀ 相关数据。

2.2 $TGF-\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡 于 96 孔板中加入 2.2.15 细胞或 HepG2 细胞 $2 \times 10^4/\text{孔}$,培养 24h,

* 国家自然科学基金重点项目资助课题(No.39730420)
浙江大学医学院附属第一医院(杭州 310003)

弃上清,加入不同浓度的 $\text{TGF-}\beta_1$,以 2000 ng/L 为最高浓度,连续对倍稀释,继续培养 48 h ,加 TUNEL 反应结合液,培育 30 min ,离心洗涤细胞两次,加 $50\mu\text{l}$ 10% FCS1640 重悬,荧光显微镜下观察结果。

2.3 药物对 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡的抑制作用 于 24 孔板中加入 2.2.15 细胞或 HepG2 细胞($5 \times 10^4/\text{孔}$),培育 24 h ,弃上清。根据方法(2.2)结果,加入诱导凋亡的最适 $\text{TGF-}\beta_1$ 浓度 500 pg/ml ,每孔 0.5 ml ,作用 7 h 后,根据方法(2.1)结果,加入 ICD50 以下不同浓度的药物培养基 0.5 ml/孔 , 48 h 后收集细胞,检测凋亡程度。

结 果

1 抗纤方的细胞毒性作用 抗纤方对肝细胞无明显毒性作用的最高药物浓度为 25 mg/ml ;引起 50% 细胞死亡的最低药物浓度为 40 mg/ml ; 100% 细胞死亡的最低药物浓度 62 mg/ml ; MTT 试验确定 ICD50 为 40 mg/ml 。药物对 2.2.15 细胞和 HepG2 细胞的毒性作用比较差异无显著性。

2 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡作用 实验表明以 15 pg/ml $\text{TGF-}\beta_1$ 即引起 2.2.15 细胞凋亡明显增加,在 500 pg/ml $\text{TGF-}\beta_1$ 时使 63% 的 2.2.15 细胞发生凋亡;而在 HepG2 细胞,需要 31 pg/ml $\text{TGF-}\beta_1$ 才引起细胞凋亡明显增加,当 500 pg/ml $\text{TGF-}\beta_1$ 时使 42% 的细胞凋亡;继续增加 $\text{TGF-}\beta_1$ 浓度并不再明显提高细胞凋亡(见图 1)。

3 抗纤方对 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡的抑制作用 实验表明抗纤方对 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡均有明显的抑制作用,以 10 mg/ml 抗纤方,可使 2.2.15 细胞凋亡比率降至 46% ,HepG2 细胞凋亡比率降至 32% ;而当用 20 mg/ml 抗纤方时,使 2.2.15 细胞凋亡比率降至 33% ,HepG2 细胞凋亡比率降至 24% ,抑制率均在 50% 左右(见图 2)。

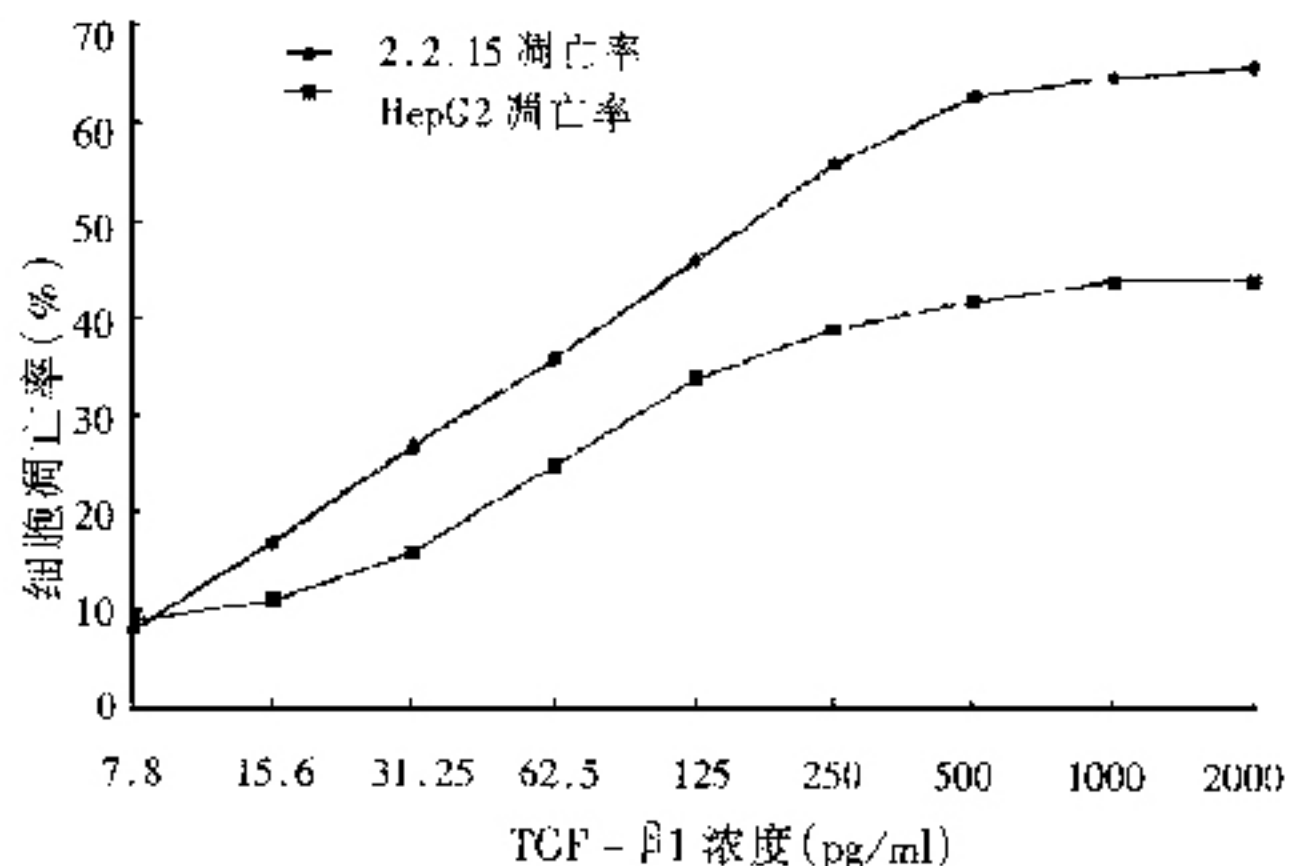


图 1 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡

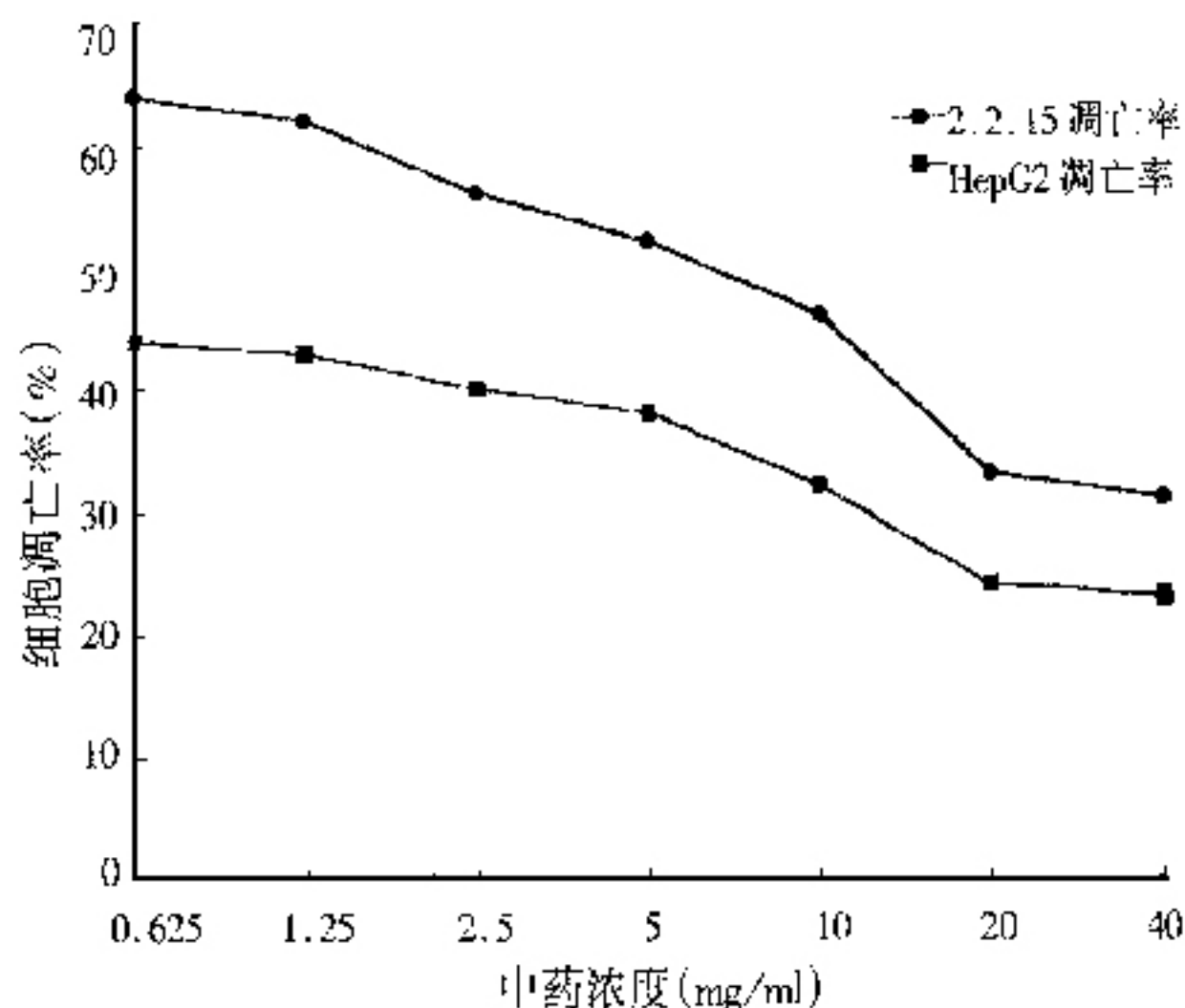


图 2 抗纤方对 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡的抑制作用

讨 论

现已知,肝炎病毒持续感染引起肝细胞损伤,通过自分泌或旁分泌机制表达大量 $\text{TGF-}\beta_1$,后者又作用于肝细胞和星状细胞,引起更多的肝细胞死亡和过量分泌胶原等细胞外基质成分,导致肝纤维化^[4]。Alison 等报道 $\text{TGF-}\beta_1$ 体外能诱导肝细胞凋亡,并认为肝细胞凋亡是各型肝炎的重要病理基础。因而,只要是能保护肝细胞稳定,降低肝细胞凋亡的药物,理论上就有护肝作用^[1]。Yamamoto 等应用 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导肝细胞凋亡的特性,筛选了众多中药成分,发现茵陈蒿酮能明显抑制 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导的肝细胞凋亡^[5]。本研究结果表明,当用 500 pg/ml $\text{TGF-}\beta_1$ 时,可引起 2.2.15 细胞凋亡达 63% ,而只引起 HepG2 细胞凋亡 42% ,这可能是由于 2.2.15 细胞转染 HBV DNA 增加了对 $\text{TGF-}\beta_1$ 的敏感性。用 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导 2.2.15 细胞凋亡的体外实验模型,可能更确切地反映体内肝炎的发病机制。2.2.15 细胞已广泛用于筛选抗乙肝病毒药物,但将其应用筛选护肝药物未见报道。

中医学认为行气活血化瘀药物能舒肝行气,使肝木舒畅条达,气机通畅,活血通经,消除瘀积,这种认识是基于肝郁气滞血瘀这一基本病理上。基于上述认识,我们自拟了以四逆散疏解郁结,调和肝脾,以黄芩、白术健脾扶正,以赤芍、丹参、鳖甲活血化瘀为基础的抗纤方,临床治疗慢性肝炎、早期肝硬化取得明显的效果^[6]。本研究结果表明抗纤方具有明显的抑制 $\text{TGF-}\beta_1$ 诱导的肝细胞凋亡作用,尤其是转染 HBV DNA 的 2.2.15 细胞,从细胞和分子生物学水平论证了抗纤方的临床作用机理,为进一步提取抗纤方有效成分和临床应用提供理论基础。

参 考 文 献

1. Alison MR, Sarraf CE. Liver cell death: Patterns and mechanism. Gut 1994;35: 577—581.
2. Chuang LY, Hung WC, Chang CC, et al. Characterization of apoptosis induced by TGF- β_1 in human hepatoma cells. Anticancer Res 1994;14: 147—152.
3. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J

Immunol Methods 1983;65: 55—63.

4. Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, et al. Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. Hepatology 1994;19: 1354—1359.
5. Yamamoto M, Ogawa K, Morita M, et al. The herbal medicine ichin-koto inhibits live cell apoptosis by TGF- β_1 . Hepatology 1996;23: 552—559.
6. 吴嘉庚, 张立煌, 邓银泉, 等. 中药抗纤方治疗肝炎肝纤维化的临床观察. 中国中西医结合杂志 1993;13(6): 356—357.

(收稿:1999-09-17 修回:2000-09-10)

丹参联合阿昔洛韦治疗带状疱疹疗效观察

邓新华 洪 英 黄智珍

我科于 1996 年 10 月~1999 年 12 月采用丹参联合阿昔洛韦治疗带状疱疹 60 例,与单独采用阿昔洛韦治疗带状疱疹 60 例作对照,结果显示:丹参联合阿昔洛韦可明显地降低神经后遗痛的发生率。现报告如下。

临床资料 120 例带状疱疹患者均为寻常型,具有典型的临床症状和体征。120 例患者随机分成 A 组和 B 组(对照组)。A 组 60 例,男性 37 例,女性 23 例;年龄 20~83 岁,平均 55.3 岁;受累神经:肋神经 30 例,颅神经 5 例,腰骶丛 13 例,臂丛神经 12 例;病程 2~13 天,平均 6.4 天。B 组 60 例,男性 32 例,女性 28 例;年龄 21~82.5 岁,平均 57 岁;受累神经:肋间神经 27 例,颅神经 6 例,腰骶丛 10 例,臂丛神经 17 例;病程 3~15 天,平均 5.7 天。两组临床资料比较,差异无显著性,具有可比性。

120 例患者来我科前均未口服及外用过任何药物,所有患者治疗前均进行肝、肾功能检查无异常。

治疗方法 A 组静脉滴注阿昔洛韦(湖北潜江制药厂生产)10mg/kg 体重,联合 5%葡萄糖生理盐水 500ml 加丹参注射液 20ml 静脉滴注,每天 1 次,7 天为 1 个疗程。B 组仅静脉滴注阿昔洛韦 10mg/kg 体重,每天 1 次,7 天为 1 个疗程,治疗过程中每天观察疗效及药物的不良反应。

结 果

疗效判定,因带状疱疹是自限性疾病,所以疗效观察主要在止疱、脱痂、全病程和止痛的天数方面以及并发症、后遗神经痛的发生情况。临床疗效,见表 1。

A 组与 B 组在止疱、脱痂及全病程天数方面比较差异无显著性($P > 0.05$),在止痛方面 A 组明显快于 B 组($P < 0.01$)。

表 1 两组疗效比较 (d)

组别	止疱	脱痂	全病程	止痛
A	2.73 $\pm$ 1.64	9.44 $\pm$ 3.72	13.66 $\pm$ 4.47	2.3 $\pm$ 0.95*
B	2.63 $\pm$ 1.20	8.69 $\pm$ 4.21	14.21 $\pm$ 4.76	6.3 $\pm$ 2.83

注:与 B 组比较,* $P < 0.01$;每组 60 例

不良反应:A 组 3 例发生不良反应,其中 1 例胃肠道不适,1 例出现头晕症状,1 例后遗神经痛。B 组 23 例发生不良反应,其中 3 例胃肠道不适,7 例出现头晕症状,13 例后遗神经痛。上述不良反应较轻微,无需中断治疗,两组病例均未发现疱疹播散。

讨 论

阿昔洛韦是治疗带状疱疹的首选药,它主要通过对病毒 DNA 多聚酶的抑制和直接渗入病毒 DNA 链中,抑制病毒 DNA 的合成而显示抗病毒性,对疱疹病毒有特异性作用,具有高效、低毒,对炎症细胞有高度选择性特点。丹参在治疗本病时具有活血化瘀功能,改变血液粘度,使毛细血管的微循环加速加快,改变毛细血管的渗透性,加快抗病毒药进入细胞内的速度,由于丹参能使结缔组织转化、吸收,抑制亢进的胶原合成,从而能迅速抑制神经节和相应的感觉神经纤维的充血、水肿和坏死,防止粘连形成,从而防止后遗症神经痛的发生。本研究结果显示治疗组和对照组在止疱、脱痂及全病程天数方面与对照组比较差异无显著性($P > 0.05$),但在止痛方面差异有显著性($P < 0.01$)。且 A 组仅 1 例,而 B 组 13 例后遗神经痛,这说明丹参联合阿昔洛韦可明显降低神经后遗痛的发生率,同时观察到本治疗组不良反应发生率低,而且轻微,不影响继续治疗。

因此,我们认为丹参联合阿昔洛韦静脉滴注治疗带状疱疹是安全、简便、高效的手段之一,值得在临床推广。

(收稿:2000-06-05 修回:2000-09-28)