

## · 实验研究 ·

# 复方中药 861 对大鼠肝星状细胞系一氧化氮合酶表达及其活性的影响\*

丁惠国<sup>1</sup> 王宝恩<sup>2△</sup> 尚宏伟<sup>3</sup> 王兴翠<sup>3</sup> 唐素珍<sup>2</sup> 贾继东<sup>2</sup> 赵春惠<sup>1</sup>

**内容提要** 目的 研究复方中药 861 对大鼠肝星状细胞系(HSC-T<sub>6</sub>)一氧化氮合酶(NOS)表达及其酶活性的影响,并探讨该药预防、治疗早期门脉高压的可行性。方法 细胞密度为  $1 \times 10^5/\text{ml}$  的 HSC-T<sub>6</sub> 接种于细胞培养皿中,95% O<sub>2</sub>,5% CO<sub>2</sub>,37℃,培养 24h 进行以下分组实验,每组重复 6 皿,继续培养 24h。1 组: HSC-T<sub>6</sub> 空白对照组 2 组: HSC-T<sub>6</sub> 加复方中药 861(2mg/ml) 3 组: HSC-T<sub>6</sub> 加复方中药 861(4mg/ml) 4 组: HSC-T<sub>6</sub> 加复方中药 861(8mg/ml) 5 组: HSC-T<sub>6</sub> 加复方中药 861(4mg/ml)加 L-硝基精氨酸甲酯(L-NAME, 4mg/ml)。采用化学比色法测定 NOS 活性,采用硝酸还原酶法测定培养液一氧化氮(NO)水平。4% 多聚甲醛固定细胞 2h,采用免疫细胞化学法观察 HSC-T<sub>6</sub> 诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达。结果:复方中药 861 能增加 HSC-T<sub>6</sub> NOS 活性( $P < 0.01$ ),上清液 NO 水平也平行增加( $P < 0.01$ ),L-NAME 不能抑制复方中药 861 刺激的 HSC-T<sub>6</sub> 合成、分泌 NO 增加( $P > 0.05$ )。免疫细胞化学研究发现,活化的 HSC-T<sub>6</sub> 细胞浆有 iNOS 表达,复方中药 861 能增加 HSC-T<sub>6</sub> iNOS 表达。结论:活化 HSC-T<sub>6</sub> iNOS 表达阳性,与自分泌 NO 有关;复方中药 861 能明显增加 HSC-T<sub>6</sub> iNOS 表达及其酶活性,NO 合成、分泌增加。复方中药 861 可能通过增加肝星状细胞分泌 NO 途径,抑制肝星状细胞的收缩,从而降低肝窦阻力。因此,复方中药 861 在预防、治疗早期门脉高压中可能具有重要作用。

**关键词** 复方中药 861 肝星状细胞 一氧化氮合酶 门脉高压

**Effect of Herbal Compound 861 on Expression and Activity of Nitric Oxide Synthase in Hepatic Stellate Cells**  
DING Hui-guo, WANG Bao-en, SHANG Hong-wei, et al *Department of Gastroenterology and Hepatology, You'an Hospital, Beijing (100054)*

**Objective:** To study the effect of herbal compound 861 (HB861) on expression and activity of nitric oxide synthase (NOS) in hepatic stellate cells (HSC), and to explore the feasibility of its application in preventing and treating the early portal hypertension. **Methods:** HSC of HSC-T<sub>6</sub> cell line ( $1 \times 10^5/\text{ml}$ ) were cultured in dish with 95% O<sub>2</sub> plus 5% CO<sub>2</sub> under 37℃ for 24 hrs, then divided into 5 groups, 6 dishes in each group. Group A was the blank control group. To Group B-E, HB861 2 mg/ml, HB861 4 mg/ml, HB861 8 mg/ml, HB861 4 mg/ml + N<sup>W</sup>-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) 4 mg/ml were added separately, and continuously cultured for 24 hrs. NOS activity was measured using colorimetry, NO level was determined by nitrate reductase technique. The cells were fixed by 4% paraformaldehyde for 2 hrs for test HSC-T<sub>6</sub> iNOS expression by immuno-cyto-chemical method. **Results:** HB861 in 2mg/ml, 4mg/ml and 8mg/ml could increase HSC-T<sub>6</sub> NOS activity from  $1.7 \pm 0.1$  to  $2.5 \pm 0.3$ ,  $3.5 \pm 0.4$  and  $3.7 \pm 0.9$  respectively ( $P < 0.01$ ), the NO levels in supernatant were increased in parallel from  $56.1 \pm 4.8$  to  $90.7 \pm 4.6$ ,  $99.7 \pm 4.1$  and  $109.0 \pm 2.7$  respectively ( $P < 0.01$ ). L-NAME could not inhibit the effect of HB861 in increasing the synthesis and secretion of NO by activated HSC-T<sub>6</sub>. Immuno-cyto-chemical study showed that there was iNOS expression in cytoplasm, and which could be increased by HB861. **Conclusion:** The activated HSC-T<sub>6</sub> showed positive iNOS expression, suggesting it could produce NO. HB861 could markedly increase HSC-T<sub>6</sub> iNOS expression and NOS activity, enhance the NO synthesis and secretion, it also could inhibit the contractility of activated HSC by way of increase HSC to secrete

\* 北京市科技新星计划课题(No. 954812500)

1. 北京佑安医院消化科(北京 100054); 2. 北京友谊医院肝病研究中心; 3. 首都医科大学综合实验室

△导师

NO ,so as to lower the resistance in hepatic sinusoid , therefore would play important role in preventing and treating of early portal hypertension.

**Key words** herbal compound 861 , hepatic stellate cell , nitric oxide synthase , portal hypertension

肝星状细胞在肝纤维化、门脉高压症的发生、发展中具有重要作用<sup>(1)</sup>。研究证明,一氧化氮(NO)能调节肝星状细胞的收缩、舒张功能,降低肝窦阻力。因此,本研究观察复方中药 861 对大鼠肝星状细胞系(HSC-T<sub>6</sub>)一氧化氮合酶(NOS)表达及其酶活性的影响,探讨复方中药 861 预防、治疗早期门脉高压的可行性。

材料与方法

1 HSC-T<sub>6</sub> 的复苏、培养及实验分组 HSC-T<sub>6</sub> (美国加利福尼亚旧金山总医院肝病研究中心 Friedman 教授惠赠),为 SV40 转染 SD 大鼠肝星状细胞。细胞于 37℃ 快速复苏,以含 10% 小牛血清的 DMEM (GIBCO BRC 公司)制备为 1×10<sup>5</sup> 个/ml HSC-T<sub>6</sub> 单细胞悬液,接种于 35mm 细胞培养皿(皿内先放置 20mm×20mm 的盖玻片)中,培养基总体积为 2ml。在 95% O<sub>2</sub> ,5% CO<sub>2</sub> ,37℃ 条件下,HSC-T<sub>6</sub> 于 TE-HER CO<sub>2</sub> 培养箱(德国)内培养 24h,细胞完全贴壁后进行以下分组实验,每组重复 6 个培养皿。1 组:HSC-T<sub>6</sub> 空白对照 2 组:HSC-T<sub>6</sub> 加复方中药 861(终浓度 2mg/ml) 3 组:HSC-T<sub>6</sub> 加复方中药 861(终浓度 4mg/ml); 4 组:HSC-T<sub>6</sub> 加复方中药 861(终浓度 8mg/ml) 5 组:HSC-T<sub>6</sub> 加复方中药 861(终浓度 4mg/ml)加 L-硝基精氨酸甲酯(L-NAME 终浓度 4mg/ml)。

细胞继续培养 24h,取培养上清液 1ml,分别做 NO 水平、NOS 活性测定。PBS 缓冲液清洗细胞片 3 次,4% 多聚甲醛固定制作细胞片,进行诱导型一氧化氮合酶(iNOS)水平免疫细胞化学研究。复方中药 861 由丹参、黄芪、鸡血藤、香附、陈皮等 10 味中药组成,委托江阴天江制药厂加工制备为颗粒剂(26g 相当于 1 付复方中药 861 汤剂)。颗粒剂用 DMEM 溶解,经 0.45μm 一次性滤器过滤,高压待用(pH 7.0)。

2 培养上清液 NO 水平测定 采用硝酸还原酶法,试剂盒购自深圳晶美生物有限公司,按说明书操作。

3 培养上清液 NOS 活性测定 采用化学比色法,试剂盒购自北京邦定生物公司,按说明书操作。

4 HSC-T<sub>6</sub> iNOS 表达 采用免疫细胞化学方法。4% 多聚甲醛固定细胞 2h,制作细胞片,PBS 缓冲液清洗细胞片 3 次,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 5min,1:50iNOS 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology 产品)4℃ 过夜,PBS 缓

冲液清洗 3 次,通用型二抗体 IgG-HRP 多聚体(二步法,工作液,北京中山公司)室温 15min,PBS 缓冲液清洗,DAB 显色,蒸馏水清洗、吹干,甘油封片,光学显微镜观察,采用半定量方法记录结果。

5 统计学方法 采用 SPSS 6.0 统计软件进行单因素方差分析、秩和检验。

结 果

1 各组培养上清液 NOS 活性及 NO 水平测定结果比较 见表 1。HSC-T<sub>6</sub> 能自分泌 NO,复方中药 861 能明显增加 HSC-T<sub>6</sub> NOS 活性及 NO 合成(P<0.01),具有剂量依赖性,L-NAME 不能抑制复方中药 861 刺激的 HSC-T<sub>6</sub> 合成、分泌 NO 增加(P>0.05)。

表 1 各组培养上清液 NOS 活性及 NO 水平测定结果 (x±s)

组别	n	NOS 活性(u/ml)	NO(μmol/L)
1	6	1.7±0.1	56.1±4.8
2	6	2.5±0.3*	90.7±4.6*
3	6	3.5±0.4*△	99.7±4.1*△
4	6	3.7±0.9*△	109.0±2.7*△
5	6	3.1±0.2*△	103.9±21.0*△

注:与 1 组比较,\*P<0.01;与 2 组比较,△P<0.01

2 HSC-T<sub>6</sub> iNOS 免疫化学染色结果

免疫细胞化学研究发现,HSC-T<sub>6</sub> 细胞浆 iNOS 表达阳性呈棕黄色。1 组阳性细胞少,细胞浆棕黄色浅;复方中药 861 能增加 HSC-T<sub>6</sub> iNOS 表达,阳性细胞明显增加,细胞浆棕黄,色深。

讨 论

NO 是 NOS 在辅酶Ⅱ、四氢生物蝶呤条件下,以 L-精氨酸为底物合成的一种高活性氧自由基。在调节血管局部张力中,NO 是一个重要的舒血管活性介质<sup>(1)</sup>。正常情况下,肝窦内皮细胞合成、分泌 NO 及内皮素(ET),两者处于生理性平衡状态,在调节肝脏微循环中具有重要作用;当肝脏损伤时,肝窦内皮细胞合成 NO、ET-1 减少<sup>(2,3)</sup>,但是活化肝星状细胞合成分泌 NO、ET-1 可能增加。目前研究证明<sup>(2,4-6)</sup>,NO、ET-1 的生理性平衡被破坏,在肝脏微循环障碍及肝硬化门脉高压的发生发展中具有重要意义,ET-1 与 NO 是调节肝星状细胞舒缩、影响肝窦血流量及肝内阻力的主要因素。当肝脏损伤时,肝星状细胞在内毒素及细胞因子(TNF-α、IFN-γ

等刺激下,激活 iNOS 产生大量 NO。NO 通过鸟氨酸环化酶途径引起细胞内 cGMP 增加,细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  降低,导致细胞舒张。研究还发现<sup>(4)</sup>,内源性 NO 阻断 ET-1 引起的传代培养肝星状细胞收缩。局部 NO 水平增加可使肝星状细胞膜 ET 受体表达减少,从而抑制了 ET-1 对肝星状细胞的收缩作用。有学者<sup>(7)</sup>应用 ecNOSmRNA 基因敲出小鼠导致 NO 合成减少,结果也发现肝星状细胞  $\text{ET}_\text{A}$  受体表达增加;同时,ET 对肝星状细胞的收缩作用增强。因此认为,NO 还能调节肝星状细胞表达  $\text{ET}_\text{A}$  受体。Suematsu 等<sup>(3,8)</sup>研究还发现,正常肝脏灌注时,NOS 抑制剂——L-NNA( $\text{N}^\omega$ -Nitro-L-Arginine)通过抑制肝窦内皮细胞合成 NO,使门脉压力增加;然而,另一种 NOS 抑制剂——L-NAME( $\text{N}^\omega$ -Nitro-L-Arginine Methyl Ester)未发现相同的结果。因此认为,L-NAME 可能不抑制肝窦内皮细胞合成 NO,于是提出肝脏局部一氧化氮(CO)可能调控肝星状细胞舒缩,其作用途径是 CO 调控 NO 介导的细胞内 cGMP 增加,细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  降低,细胞舒张。本研究也发现,L-NAME 不能抑制复方中药 861 刺激的肝星状细胞合成、分泌 NO 增加,其原因值得进一步研究。由此可见,肝脏微循环的调节因素十分复杂,目前仍不完全清楚。活化的肝星状细胞还表达生长抑素受体(SSTR1-3),生长抑素能抑制 ET 对肝星状细胞的收缩作用,其机理仍不完全清楚。肝星状细胞膜还存在 P 物质、VIP 等其他多种血管活性介质的受体<sup>(9)</sup>。因此,活化的肝星状细胞膜表达多种血管活性物质受体及自分泌 NO 等血管活性介质特性,为临床预防与治疗门脉高压症提供了新的途径。

本研究发现,HSC-T<sub>6</sub> 细胞系能表达 iNOS,可能与自分泌 NO 有关,与其他学者的结论基本一致<sup>(2,4)</sup>。复方中药 861 具有活血化瘀等之功效。王宝恩教授等经动物及临床研究证明,复方中药 861 具有明显的抗肝纤维化作用。本研究证明:复方中药 861 能明显增加 HSC-T<sub>6</sub> iNOS 表达及其酶活性,培养上清液 NO 水平增加,而且呈剂量依赖性。提示复方中药 861 能使肝

星状细胞合成、分泌 NO 增加;局部 NO 增加可能减少肝星状细胞膜 ET 受体表达,从而抑制了 ET 对肝星状细胞的收缩作用。从本研究结果推论,复方中药 861 可能通过增加肝星状细胞分泌 NO 途径,抑制肝星状细胞的收缩,从而降低肝窦阻力。因此,复方中药 861 在预防、治疗早期门脉高压中可能具有重要作用,值得进一步研究。

## 参 考 文 献

1. Sarkar R, Webb RC. Does nitric oxide regulate smooth muscle cell proliferation? J Vasc Res 1998;35:135—142.
2. Shah V, Haddad FG, Garcia-Gardena G, et al. Liver sinusoidal endothelial cell are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. J Clin Invest 1997;100:2923—2930.
3. Sakamoto M, Ueno T, Nakamura T, et al. Estrogen upregulates nitric oxide synthase expression in cultured rat hepatic sinusoidal endothelial cells. J Hepatol 2001;34:858—864.
4. Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. Hepatology 1997;26:2—6.
5. Rockey D, Weisiger R. Endothelin induced contractility of stellate cell from normal and cirrhotic rats liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. Hepatology 1996;24:233—243.
6. Gupta TK, Toruner M, Groszmann RJ. Role of nitric oxide. Digestion 1998;59:413—415.
7. Pinzani M, Gentilini P. Biology hepatic stellate cells and their possible relevance in the pathogenesis of portal hypertension in cirrhosis. Seminars in Liver Disease 1999;19:397—409.
8. Suematsu M, Goda N, Sano T, et al. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. J Clin Invest 1995;96:2431—2437.
9. Gorbis MN, Gines P, Bataller R, et al. Human hepatic stellate cells secrete adrenomedullin: potential autocrine factor in the regulation of cell contractility. J Hepatol 2001;34:222—229.

(收稿 2001-08-24 修回 2002-01-21)

## 第十三次全国中西医结合消化系统疾病学术交流会征文通知

中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会拟于 2002 年 9 月在浙江省杭州市召开第十三次全国中西医结合消化系统疾病学术交流会,现将会议征文有关事宜通知如下。

1 征文内容 (1)中西医结合防治 HP 相关性疾病、胃肠运动功能紊乱性疾病、慢性肝炎的进展、临床经验、研究成就等。(2)脾胃学说及脾虚证研究进展。

2 征文要求 (1)全文及摘要(800 字以内)各 1 份,摘要应包括目的、方法、结果、结论 4 部分。注明作者姓名、单位、通讯地址及邮编。(2)来稿须打印,手写须字迹清楚,用字规范。请自留底稿。(3)截稿日期 2002 年 6 月 30 日。(4)论文寄至:100010 北京市东城区美术馆后街 23 号北京市中医研究所 郭培元收。联系电话 010—84023593、64016677 转 676。