

鳖甲煎丸对大鼠肝星状细胞增殖与凋亡的影响

樊尔艳¹ 贺松其¹ 文彬² 孙海涛¹ 贾文燕¹ 陈冠新¹

摘要 目的 通过研究鳖甲煎丸药物血清对大鼠肝星状细胞(HSC-T6)的增殖抑制作用及诱导其凋亡的影响,探讨鳖甲煎丸抗肝纤维化的可能作用机制。**方法** Wistar 大鼠 40 只,系统随机抽样(抓阄法)分为阴性对照组(NC 组)、阳性药对照组(P 组)、鳖甲煎丸高(H)、中(M)、低(L)剂量组,每组 8 只。L、M、H 剂量组分别按 21.87、43.75、87.50 mg/mL 灌服鳖甲煎丸混悬液。P 组灌胃 0.01 mg/mL 秋水仙碱溶液,NC 组灌予等量的生理盐水。每只大鼠每次灌胃 2 mL,每日 2 次。每次灌胃间隔 12 h,连续灌胃 7 次,制备药物血清。将 HSC-T6 分为药物血清组(H/M/L/NC 组)、秋水仙碱对照组(P 组)及空白对照组(BC 组),H、M、L、NC 及 P 组给予对应药物血清进行培养,BC 组为不含药物血清的培养基。采用 CCK8 法检测 HSC-T6 细胞 24、48、72 h 时增殖抑制率,流式细胞术检测细胞凋亡率及细胞周期,Western blot 法检测凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达水平。**结果** 与 NC 组比较,M、H、P 组 24 h 细胞增殖抑制率明显增高($P < 0.05$); 48、72 h 时与 NC 组比较,L、M、H、P 组细胞增殖抑制率明显增高($P < 0.05$)。但 24、48、72 h 各时间点之间 L、M、H、P 组细胞增殖抑制率差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 NC 组、BC 组比较,M、H、P 组的 HSC-T6 早期凋亡与晚期凋亡率明显升高($P < 0.05$),M、H、P 组 G0/G1 期细胞数明显增多($P < 0.05$),L、M、H、P 组 S 期与 G2/M 期细胞数明显减少($P < 0.05$)。各组间 Bcl-2 蛋白表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 NC 组比较,P、H、M、L 组的 Bax 蛋白表达明显升高($P < 0.01$)。**结论** 鳖甲煎丸抗肝纤维化的作用机制可能与其抑制肝星状细胞增殖并诱导其凋亡有关。

关键词 肝星状细胞;鳖甲煎丸;细胞增殖;细胞凋亡;B 细胞淋巴瘤-2;Bcl-2 相关 X 蛋白

Effects of Biejiajian Pill on Proliferation and Apoptosis of Hepatic Stellate Cells in Mice FAN Er-yan¹, HE Song-qi¹, WEN Bin², SUN Hai-tao¹, JIA Wen-yan¹, and CHEN Guan-xin¹ 1 College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou (510515); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, The 458th Hospital of the PLA, Guangzhou (510602)

ABSTRACT Objective To observe the possible mechanism of Biejiajian Pill (BP) in fighting against hepatic fibrosis of hepatic stellate cell T6 (HSC-T6) by studying effect of BP containing serum on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of HSC-T6. **Methods** Forty Wistar rats were randomly divided into the negative control group (NC), the positive drug control group (P), high, middle, and low dose groups (H, M, L), 8 in each group. BP suspension was administered by gastrogavage to rats in Group H, M, L at 21.87, 43.75, and 87.50 mg/mL, respectively. Rats in Group NC were administered with equal volume of normal saline. Rats in Group P were administered with 0.01 mg/mL colchicine solution by gastrogavage. Each rat received 2 mL corresponding solution, twice per day, with an interval of 12 h gastrogavage, a total of 7 successive times to prepare drug containing serum. HSC-T6 cells were then randomly divided into drug containing serum groups (group H/M/L/NC), colchicine positive control group (group P), and the blank control group (BC). Cells in Group H/M/L/NC/P were fed with corresponding drug containing serums, while those in Group BC were cultured with free drug serum. The proliferation in-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81373807);广东省中医药局资助课题(No. 2013265)

作者单位:1.南方医科大学中医药学院(广州 510515);2.中国人民解放军第四五八医院中医科(广州 510602)。

通讯作者:贺松其, Tel:020-61648247, E-mail:hesongqijz@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.08.0960

hibition rate of HSC-T6 was detected using CCK8 method at 24, 48, and 72 h, respectively. The apoptotic rate and cell cycle were detected using flow cytometry. Protein expressions of B cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) were detected using Western blot. Results Compared with Group NC, 24-h proliferation inhibition rate of HSC-T6 was obviously elevated in Group M, H, P ($P < 0.05$). Compared with Group NC, 48- and 72-h proliferation inhibition rate of HSC-T6 was obviously elevated in Group L, M, H, P ($P < 0.05$). But there was no statistical difference in 24-, 48-, and 72-h proliferation inhibition rate of HSC-T6 among Group L, M, H, P ($P > 0.05$). Compared with Group NC and BC, early- and late-stage apoptosis rates of HSC-T6 obviously increased in Group M, H, P ($P < 0.05$); G_0/G_1 phase cell number obviously increased in Group M, H, P ($P < 0.05$); S phase and G_2/M phase cell numbers obviously decreased in Group L, M, H, P ($P < 0.05$). There was no statistical difference in Bcl-2 protein expression among each group ($P > 0.05$). Compared with Group NC, Bax protein expression obviously increased Group L, M, H, P ($P < 0.01$). Conclusion The mechanism of BP for fighting against hepatic fibrosis might be associated with inhibiting proliferation of HSC-T6 and inducing apoptosis.

KEYWORDS hepatic stellate cell; Biejiajian Pill; proliferation; apoptosis; B cell lymphoma-2; Bcl-2-associated X protein

肝纤维化是肝脏受损时的一种修复反应,是慢性肝病导致肝硬化的共同病理基础,其病理本质是以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成增多,降解相对不足,两者失去动态平衡,致使过多的 ECM 沉积于肝内导致^[1]。目前肝纤维化尚无有效且公认的治疗药物和方法。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSCs)被认为是肝脏合成细胞外基质的主要细胞,其激活向肌成纤维细胞转化是肝纤维化发生的重要环节^[2]。鳖甲煎丸出自东汉医家张仲景所著《金匱要略》,具有益气养血、软坚散结、活血化瘀等多方面作用。现代研究表明,鳖甲煎丸具有抗纤维化、抗癌、调节机体免疫等作用^[3-5]。鳖甲煎丸还可抑制 HSC 的活化与增殖^[6],但其作用机制尚不明确。本实验在前期研究的基础上^[7-10],以 HSC-T6 为研究对象,运用血清药理学方法,研究鳖甲煎丸对肝星状细胞 HSC-T6 增殖与凋亡的影响,探讨其抗肝纤维化的作用机制,为鳖甲煎丸的临床应用提供理论依据。

材料与方法

1 动物 Wistar 大鼠 40 只,雌雄各半,体重(250 ± 20) g,清洁级,由南方医科大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(粤)2011-0015。

2 细胞 HSC-T6 细胞株:具有永生表型,由南方医院肝病中心馈赠(馈赠者购买于中科院上海细胞库),系 SV40 转染的大鼠 HSC。

3 药物 鳖甲煎丸药物组成及制备方法按中国药典 1985 年版一部执行,药物组成:鳖甲胶、阿胶、蜂房(炒)、鼠妇虫、土鳖虫(炒)、蜣螂、射干、黄芩、柴胡、干姜、大黄、白芍(炒)、桂枝、葶苈子、石韦、厚朴(姜

制)、牡丹皮、瞿麦、半夏(制)、党参、硝石(精制)、桃仁,3 g/袋,购自武汉中联药业集团股份有限公司,产品批号:130390;秋水仙碱,片剂,0.5 mg/片,产品批号:101015,购自西双版药业有限公司。

4 试剂与仪器 DMEM(高糖)、胎牛血清购自 GIBCO 公司;胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司;CKK8 购自广州康龙生物有限公司;AnnexinV-FITC 凋亡试剂盒购自 BD 公司,碘化丙啶(PI)购自广州浩玛生物科技有限公司;Bax 抗体、Bcl-2 抗体、 β -actin 抗体购自 CST 公司;蛋白提取试剂盒、BCA 法蛋白浓度测定试剂盒、预染蛋白 marker 购自上海碧云天生物技术有限公司;PVDF 膜购自上海优宁维生物科技有限公司;ECL 发光液购自美国 Santa Cruz 公司;Mini-Protein 电泳槽购自美国 Bio-Rad 公司;Kodak Image Station 2000MM 成像系统购自美国 KODAK 公司;超净台购自苏净集团安泰公司;恒温细胞培养箱购自 Heraeus 公司;酶标定量测定仪购自德国 Thermo 公司。

5 方法

5.1 含药血清的制备 Wistar 大鼠饲养在室温(21 ~ 25 °C)、相对湿度 50% ~ 60%、昼夜各半的环境中,普通饲料喂养、自由饮水。Wistar 大鼠 40 只,系统随机抽样(抓阄法)分为阴性对照组(NC 组)、阳性药对照组(P 组)、鳖甲煎丸高(H)、中(M)、低(L)剂量组,每组 8 只。将鳖甲煎丸溶解在生理盐水中制成混悬液,L、M、H 剂量组分别按人体剂量日用量 3.5、7、14 倍(21.87、43.75、87.50 mg/mL)灌胃。P 组以浓度为 0.01 mg/mL 秋水仙碱溶液灌胃,NC 组灌予等量的生理盐水。每只大鼠每次灌胃

2 mL, 每日 2 次。每次灌胃间隔 12 h, 连灌 7 次, 第 7 次给药前禁食不禁水 12 h, 给药后 1 h, 使用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 无菌条件下腹主动脉采血, 4 °C 静置 4 h, 3 000 r/min 离心 20 min, 分离血清, 56 °C 水浴中灭活 30 min, 0.22 μm 微孔膜过滤, -70 °C 冷藏备用。

5.2 细胞培养 HSC-T6 HSC-T6 使用含有 10% FBS (体积分数) 的 DMEM 培养于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的孵箱内, 细胞处于对数生长期时进行传代, 长到第三代后, 按实验所需浓度分别接种于 6 孔板、96 孔板中, 分为药物血清组 (H/M/L/NC 组)、秋水仙碱对照组 (P 组)、不含药物血清的培养基作为空白对照组 (BC 组)。待细胞贴壁后弃掉上清, 分别依组加入含 10% 药物血清的培养液及 DMEM 进行培养, 按实验要求培养到所需时间后收取细胞进行实验。

5.3 CCK8 法检测细胞增殖抑制率 取上述细胞在倒置显微镜下进行计数, 按密度为 5×10^4 /mL 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 分 H、M、L、NC 及 P 组, 每组实验设 4 个复孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的孵箱内培养, 细胞贴壁后弃培养基, 各组给予相对应药物血清, BC 组加入等体积的含 10% 胎牛血清的 DMEM, 分别培养 24、48、72 h 后, 在避光条件下每孔加入 10 μL CCK-8, 37 °C 孵育 2 h, 酶标仪 450 nm 下测吸光度值 (OD 值), 实验重复 3 次。细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 试验的吸光度/空白对照组的吸光度) × 100%。

5.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 取上述细胞在倒置显微镜下进行计数, 按密度为 2.5×10^6 /mL 的密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL。待细胞贴壁后弃培养基, 系统随机抽样 (抓阄法) 分为 P 组、H 组、M 组、L 组、NC 组和 BC 组, 分别更换为含 10% 药物血清的 DMEM, BC 组加入等量含 10% 胎牛血清的 DMEM, 培养 24 h 后弃去上清液, 用无 EDTA 的胰蛋白酶进行消化收集细胞, 冷 PBS 洗涤 2 次。加入 $1 \times$ Annexin V-FITC 结合液重悬细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 /mL, 每组取 100 μL 细胞悬液移入 5 mL 的流式管中, 试验避光下加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 避光条件下室温 (20 ~ 25 °C) 孵育 15 min。加入 400 μL $1 \times$ Annexin V-FITC 结合液混匀细胞, 流式细胞仪进行检测 (UR 区表示晚期凋亡细胞, LR 区表示早期凋亡细胞), Cell quest 软件分析结果, 实验重复 3 次。

5.5 流式细胞术检测细胞周期 取上述细胞在倒置显微镜下进行计数, 按密度为 2.5×10^6 /mL 的密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL。待细胞贴壁后弃培养

基, 系统随机抽样 (抓阄法) 分为 P 组、H 组、M 组、L 组、NC 组和 BC 组, 分别更换为含 10% 药物血清的 DMEM, BC 组加入等量含 10% 胎牛血清的 DMEM, 培养 24 h 后收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 3 次, 以 1 000 r/min 转速离心机离心 5 min; 加入预冷的 70% 乙醇 4 °C 固定过夜。加入含 100 μg/mL RNase A 的 50 μg/mL 碘化丙啶溶液 37 °C 下染色 30 min。采用流式细胞术分析 DNA 分期, Modfit 软件分析结果, 实验重复 3 次。

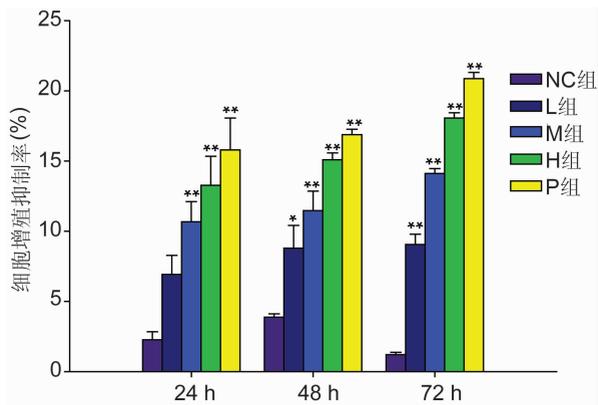
5.6 Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达水平 取上述细胞在倒置显微镜下进行计数, 按密度为 2.5×10^6 /mL 的密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL。待细胞贴壁后弃培养基, 系统随机抽样 (抓阄法) 分为 P 组、H 组、M 组、L 组和 NC 组分别更换为含 10% 药物血清的 DMEM, 培养 24 h 后弃去上清液, 按照蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白。BCA 法蛋白定量法 (参照说明书进行) 测各组蛋白浓度。用细胞裂解液将各组蛋白稀释至等浓度, 与 5 × 上样缓冲液按 4:1 混合, 100 °C 变性 5 min。每组取蛋白 100 μg, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳 (90 V、20 min, 100 V、90 min), 转膜以恒流 90 mA, 转移 90 min 至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉室温摇床上封闭 1 h, 孵一抗 (Bax、Bcl-2 抗体均为 1:200) 4 °C 过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 封闭液稀释二抗 (1:200) 后, 常温下孵育 1 h。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, ECL 发光试剂盒在曝光仪中进行曝光, 以内参 β-actin 为对照, 实验重复 3 次。采用 Image J 软件进行灰度分析, 积分吸光度值 (IA) = 平均吸光度值 × 面积, 以靶蛋白 IA 值/β-actin IA 值来表示靶蛋白的表达含量。

5.7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 分析数据, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组及各时间点间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞增殖抑制率比较 (图 1) 药物血清作用于细胞 24 h 后, L、M、H、P 组细胞增殖抑制率明显增高, 与 NC 组比较, M、H、P 组差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 药物血清作用于细胞 48、72 h 后, 与 NC 组比较, L、M、H、P 组细胞增殖抑制率明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。但 24、48、72 h 各时间点之间 L、M、H、P 组细胞增殖抑制率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2 各组凋亡率比较 (图 2, 表 1) UR 区 (PI+/Annexin V+) 表示晚期凋亡细胞, LR 区 (PI-/Annexin



注:与 NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 各组不同时间点 HSC-T6 细胞增殖抑制率比较 ($n = 3$)

表 1 各组细胞凋亡率的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	早期凋亡	晚期凋亡
BC	6	0.86 ± 0.21	0.60 ± 0.43
NC	6	0.77 ± 0.15	0.57 ± 0.49
L	6	1.13 ± 0.06	0.47 ± 0.35
M	6	1.53 ± 0.35 * Δ	2.30 ± 0.60 * Δ
H	6	1.43 ± 0.38 * Δ	3.33 ± 0.21 * Δ
P	6	1.77 ± 0.31 * Δ	4.23 ± 0.35 * Δ

注:与 BC 组比较, * $P < 0.05$;与 NC 组比较, $\Delta P < 0.05$

V+)表示早期凋亡细胞。与 NC 组、BC 组比较, M 组、H 组、P 组早期凋亡与晚期凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

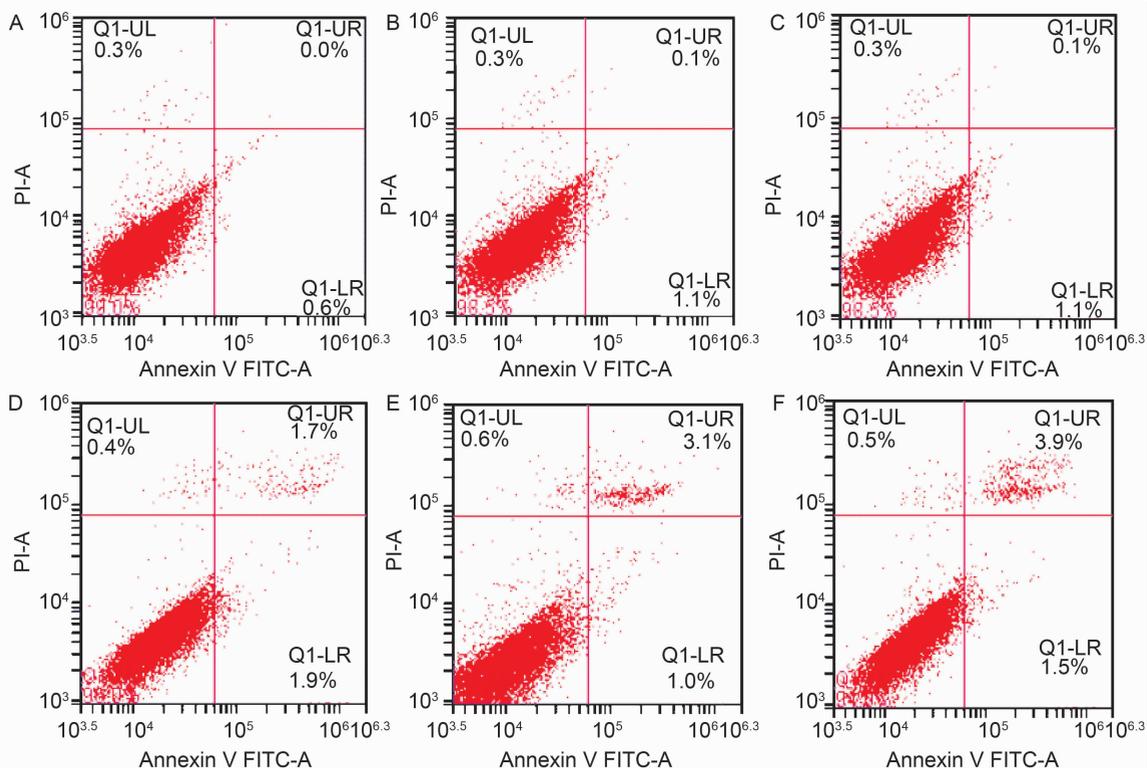
3 各组细胞周期比较(图 3、表 2) 与 BC 组和 NC 组比较, M、H、P 组 G0/G1 期细胞数明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$), L、M、H、P 组 S 期与 G2/M 期细胞数明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4 各组 Bax、Bcl-2 蛋白表达比较(图 4、图 5) 各组间 Bcl-2 蛋白表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 NC 组比较, P、H、M、L 组 Bax 蛋白表达明显升高,差异有统计意义($P < 0.01$)。

表 2 各组各细胞周期比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

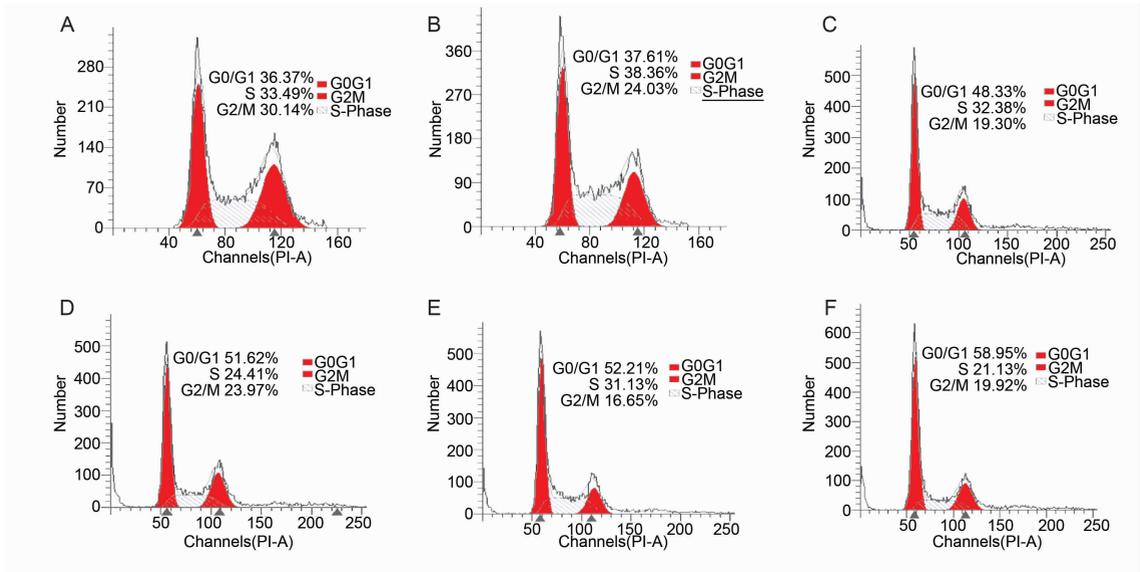
组别	n	G0/G1	S	G2/M
BC	6	36.52 ± 0.97	33.30 ± 1.65	29.11 ± 0.91
NC	6	37.61 ± 0.82	34.08 ± 1.45	29.75 ± 1.77
L	6	49.03 ± 1.03	32.65 ± 0.52 * Δ	18.56 ± 0.83 * Δ
M	6	51.26 ± 0.87 * Δ	27.96 ± 0.55 * Δ	21.45 ± 2.22 * Δ
H	6	53.29 ± 0.87 * Δ	26.05 ± 0.48 * Δ	16.53 ± 0.59 * Δ
P	6	59.14 ± 1.66 * Δ	21.40 ± 1.08 * Δ	18.66 ± 1.14 * Δ

注:与 BC 组比较, * $P < 0.05$;与 NC 组比较, $\Delta P < 0.05$



注:A 为 NC 组;B 为 BC 组;C 为 L 组;D 为 M 组;E 为 H 组;F 为 P 组

图 2 各组细胞凋亡情况



注:A 为 BC 组;B 为 NC 组;C 为 L 组;D 为 M 组;E 为 H 组;F 为 P 组

图 3 各组 HSC-T6 细胞周期比较

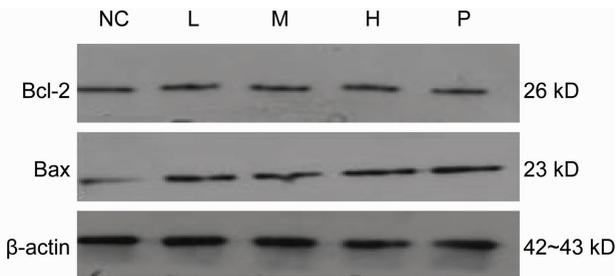
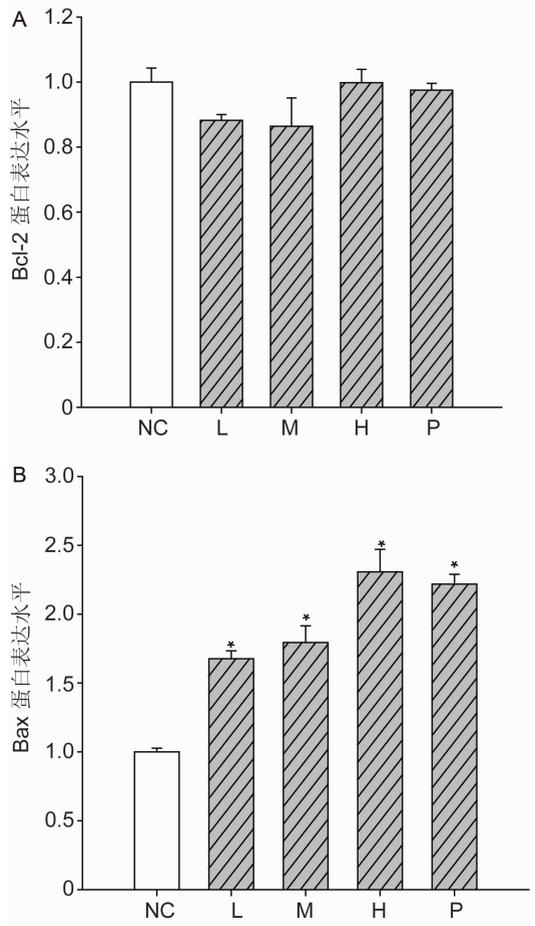


图 4 各组 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平电泳图

讨 论

肝纤维化是多种慢性肝病发展至肝硬化的必经中间环节,根据其病因、病机以及临床表现,可归属于中医学“胁痛”、“积聚”等范畴。多由外感湿热、感染疫毒或饮酒过度酿生湿热,湿热羁留不去,导致气滞血瘀,津液涩滞,肝络瘀阻而成。目前肝纤维化的临床治疗仍处于探索阶段,西医药的疗效还不十分理想^[11],而中医药治疗肝纤维化有其一定的优势。鳖甲煎丸出自东汉张仲景《金匱要略·疟病脉证并治》,本方原治疟母结于胁下。方中以鳖甲胶为君药,鳖甲入肝软坚化瘕;硝石、土鳖虫、大黄、蛭螂、鼠妇虫均为攻逐之品,具有破血消癥之功;柴胡、黄芩、白芍和解少阳;厚朴、射干、半夏行气消癖;干姜、桂枝温中,与黄芩相伍,辛开苦降而调节寒热;桃仁、牡丹皮、蜂房活血化瘀;党参、阿胶补气养血;瞿麦、葶苈子、石韦利水祛湿。全方具有益气养血,软坚散结,活血化瘀等多方面作用,临床主要用于治疗肝纤维化、肝硬化及肝癌^[9, 12]。秋水仙碱具有直接抑制肝细胞内微血管形成,干扰胶原分



注:A 为 Bcl-2 蛋白的表达水平, B 为 Bax 蛋白的表达水平;与 NC 组比较,*P < 0.01

图 5 各组 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平比较

泌,促进胶原降解,抑制细胞分裂增殖等作用,但由于秋水仙碱为细胞分裂抑制剂,在治疗肝纤维化过程中

部分病人出现造血系统及消化道副作用,在临床应用上受到限制^[13,14]。本研究采用秋水仙碱为对照药物,研究鳖甲煎丸抗肝纤维化的作用机制,为临床应用提供实验依据。

肝纤维化病理本质是以胶原为主的细胞外基质合成增多,降解相对减少,两者失去动态平衡,致使过多的 ECM 沉积于肝内引起肝纤维化^[1]。HSC 被认为是肝脏合成细胞外基质的主要细胞^[2],其在正常肝脏组织中数目很少,为肝内合成胶原的主要细胞,在肝纤维化发生发展过程中起着至关重要作用。HSC 的激活和增殖促进肝纤维化,抑制其增殖、诱导其凋亡,可减轻甚至逆转肝纤维化。本研究结果表明,鳖甲煎丸可以有效抑制 HSC-T6 细胞的增殖,且随着浓度及时间的增加,抑制率明显增高,但程度比秋水仙碱较低。

细胞凋亡是一种主动的细胞死亡过程,是由生理或病理信号引发的自主性的细胞清除过程,是区别于坏死概念的一种细胞程序性死亡方式^[15]。近年研究表明^[16],肝纤维化的消退,活化状态 HSC 的减少主要是由于发生凋亡,而不是 HSC 表型的转化。HSC 凋亡是消除活化 HSC 的一种理想方式,即 HSC 凋亡可以在不引起溶酶体等细胞器的破坏以及微环境发生炎症损伤的情况下减少增生活化的 HSC 数量,HSC 凋亡也是导致活化的 HSC 减少的中心环节。细胞发生凋亡时,细胞膜成分发生改变,如磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻^[17]。Annexin V 是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,能与 PS 高亲和力特异性结合,以荧光素标记了的 Annexin V 作为探针,利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生。本实验采用流式细胞术 Annexin V FITC/PI 双染法检测 HSC 的凋亡情况,结果显示,HSC-T6 细胞经鳖甲煎丸药物血清作用后,细胞增殖受抑制,细胞膜上磷脂酰丝氨酸外翻(Annexin V + 细胞),表明鳖甲煎丸药物血清可以显著诱导肝星状细胞凋亡,且凋亡程度与药物浓度有关,但作用程度较秋水仙碱低。

HSC 的增殖、凋亡与细胞周期的调控有密切关系^[18]。细胞周期分为 G1 期、S 期、G2 期、M 期 4 个连续的时期,细胞不增殖时处于 G0 期。其中 G0、G1 期细胞的 DNA 含量为二倍体(2n),G2、M 期细胞的 DNA 含量增加为四倍体(4n),S 期细胞的 DNA 含量介于二倍体和四倍体之间(2n ~ 4n)。流式细胞仪通过检测细胞的 DNA 含量,将细胞分为 G0/G1 期、S 期、G2/M 期^[19]。在细胞周期的 G0/G1 期及 G2/M 期存在着具有确保细胞有丝分裂同步进行功能的细胞周期调控检验点,它们保证细胞周期在上游事件

正确完成的情况下才能启动下游事件^[20]。因此,在细胞周期 G0/G1 期及 G2/M 期发生改变将会导致细胞分裂不能正常进行,进而影响细胞的增殖与分化。为进一步研究细胞凋亡发生的周期时间点,本研究通过流式细胞仪检测 HSC 内 DNA 含量来确定细胞所处的周期时相。研究结果表明,鳖甲煎丸可导致 HSC-T6 细胞发生 G1 期阻滞,阻止其正常进入 S 期,导致 S 期细胞数量减少。提示鳖甲煎丸可能通过阻滞 HSC-T6 细胞在 G1 期,抑制 HSC-T6 细胞的增殖并诱导其凋亡。

Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡相关基因研究中研究最多的一类蛋白质^[21]。Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最有代表性的抑制凋亡基因和促进凋亡基因,并且 Bax 是 Bcl-2 活性的主要调控因子。另一方面,Bcl-2 又具有细胞周期阻滞作用,降低细胞的增殖能力,且其抗凋亡与抗增殖的能力可能是独立的,而 Bax 却可加速 S 期的进程,促进增殖^[22]。研究表明 Bcl-2 和 Bax 在 HSC 凋亡中具有重要的作用^[23-25],但它们调节细胞凋亡的确切作用机制尚未阐明。本研究结果表明,鳖甲煎丸可明显上调促凋亡蛋白 Bax 的表达水平,且高剂量组作用程度比秋水仙碱组高,而对抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平无明显影响。结合增殖和凋亡结果可见,Bax 促凋亡和促增殖的能力可能也是独立的,关键看何者占主导地位。提示鳖甲煎丸可能通过上调促凋亡蛋白 Bax 的表达水平来诱导 HSC 的凋亡。

综上所述,鳖甲煎丸可显著抑制 HSC-T6 细胞增殖并诱导其凋亡,从而达到抗肝纤维化的作用。其机制可能与鳖甲煎丸促使 HSC-T6 细胞周期发生 G1 期阻滞和上调 Bax 表达有关。HSC 的增殖及凋亡机制非常复杂,涉及许多细胞因子、调节蛋白及各种信号通路,下一步笔者将进行 HSC 增殖和凋亡与 Wnt 信号通路的调控关系实验研究,进一步研究 HSC 增殖和凋亡的分子机制。

参 考 文 献

- [1] 张国民,王鑫,赵新辉. 肝纤维化形成机制的研究进展[J]. 中国健康月刊, 2011, 30(8): 56-58.
- [2] 万赞燕,胡国信. Wnt 信号转导通路与肝纤维化关系的研究现状[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(17): 1761-1766.
- [3] 罗庆东,王月飞,赵红晔,等. 鳖甲煎丸对肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织生长及转移的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 230-232.
- [4] 缪京翔. 鳖甲煎丸抗乙肝后肝纤维化作用的机制研究

- [J].河南中医, 2010, 30(5): 457-459.
- [5] 王丹, 关洪全. 鳖甲煎丸煎剂对大鼠免疫功能影响的实验研究[J].辽宁中医药大学学报, 2010, 12(7): 103-104.
- [6] 王宇涵, 孙玉凤, 王卜, 等. 鳖甲煎丸及罗格列酮药物血清对大鼠肝星状细胞 T β R II 和 Smad3 mRNA 表达的影响[J].河北中医药学报, 2013, 28(1): 3-4.
- [7] 贺松其, 文彬, 吕志平, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化模型大鼠转化生长因子 β 1 的影响[J].中国中西医结合消化杂志, 2006, 14(1): 11-13.
- [8] 贺松其, 文彬, 陈育尧, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化模型大鼠结缔组织生长因子的影响[J].辽宁中医杂志, 2005, 32(12): 1334-1335.
- [9] 陈瑞玉, 贺松其, 程喆, 等. 鳖甲煎丸治疗慢性乙型肝炎肝纤维化疗效观察[J].新中医, 2011, 43(3): 34-35.
- [10] 姚飞龙, 贺松其, 吕志平, 等. 鳖甲煎丸联合阿德福韦酯治疗乙型肝炎后肝硬化 50 例疗效观察[J].新中医, 2011, 43(4): 31-32.
- [11] 翁红雷, 蔡卫民, 王宝恩, 等. 重组干扰素 γ 治疗慢性乙型肝炎肝纤维化临床研究[J].中华医学杂志, 2003, 83(11): 943-947.
- [12] 曹阳. 鳖甲煎丸加减在原发性肝癌治疗中的应用[J].中国中医基础医学杂志, 2000, 6(7): 30-31.
- [13] 夏海珊, 陈少茹, 钟月春, 等. 肝纤维化的发病机制和药物治疗现状[J].中国医药导报, 2014, 11(18): 162-165.
- [14] 黄惠英, 袁波锋, 张文利, 等. 秋水仙碱抗肝纤维化模型作用的研究概要[J].中华医学写作杂志, 2005, 12(10): 880-882.
- [15] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239-257.
- [16] 陶庆, 胡义扬. 中药抗肝纤维化作用与诱导肝星状细胞凋亡机制研究概述[J].中西医结合肝病杂志, 2007, 17(2): 125-127.
- [17] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(3): 231-241.
- [18] 吴丹, 谷秋红, 李智伟. 细胞周期素依赖性激酶、细胞周期调控与肝纤维化[J].世界华人消化杂志, 2013, 21(22): 2158-2163.
- [19] Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress [J]. Environ Health Perspect, 1999, 107(1): 5-24.
- [20] Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events[J]. Science, 1989, 246(4930): 629-634.
- [21] Ishii HH, Gobe GC, Yoneyama J, et al. Role of p53, apoptosis, and cell proliferation in early stage Epstein-Barr virus positive and negative gastric carcinomas [J]. J Clin Pathol, 2004, 57(12): 1306-1311.
- [22] 王文文, 邓毛程. Bcl-2、Bax 及 Bid 与细胞周期阻滞及凋亡调控的关系 [J].广东轻工职业技术学院学报, 2009, 8(3): 21-24.
- [23] 梁红梅, 朱清静, 杨玲, 等. 剔毒护肝方药物血清对肝星状细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的影响[J].中西医结合肝病杂志, 2009, 19(2): 98-99.
- [24] 韦燕飞, 钟振国, 黄仁彬, 等. 白花丹醌对人肝星状细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J].世界华人消化杂志, 2011, 19(4): 349-354.
- [25] 赵晓芳, 李中华, 付蕾, 等. 半枝莲含药血清对肝星状细胞凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 的影响[J].临床医药实践, 2013, 22(2): 112-114.

(收稿: 2015-06-11 修回: 2016-05-15)