

肝星状细胞 HSC - T6 体外肝纤维化模型的建立

刘 晔¹, 齐荔红¹, 王硕丰², 章超凡², 桂 敏², 张 珉², 张俊平² (1. 南京军区福州总医院药剂科, 福建 福州 350001; 2. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

摘要 目的: 研究以肝星状细胞 HSC - T6 为靶细胞, 建立体外肝纤维化模型。**方法:** 小鼠腹腔巨噬细胞先后用卡西霉素和脂多糖刺激培养 24h 制备巨噬细胞条件培养基。肝星状细胞增殖和胶原合成分别采用结晶紫染色法和³H - 脯氨酸掺入法测定。**结果:** 血清和巨噬细胞条件培养基可显著促进 HSC - T6 细胞增殖与胶原合成。IL - 1、TNF、EGF、FGF 和 PDGF 均可促进 HSC - T6 细胞增殖, 其中 PDGF 的促增殖能力最强。TGFβ1 可剂量依赖地促进 HSC - T6 细胞胶原的合成。**结论:** 用血清、巨噬细胞条件培养基、PDGF 或 TGFβ 刺激 HSC - T6 细胞增殖和胶原合成作为体外肝纤维化模型是可行的。

关键词 星状细胞; 巨噬细胞; 细胞因子; 纤维化

中图分类号: R965.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006 - 0111(2005)06 - 0339 - 04

Establishment of a liver fibrosis model *in vitro* by hepatic stellate HSC-T6 cells

LIU Ye¹, QI Li-hong¹, WANG Shuo-feng², ZHANG Yue-fan², GUI Min², ZHANG Min², ZHANG Jun-ping² (1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350001; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To establish a liver fibrosis model *in vitro* by hepatic stellate HSC-T6 cells. **Methods:** Mouse peritoneal macrophages were primed with calcimycin 10^{-6} mol/L for 8 h then elicited by lipopolysaccharides (LPS) 100 μg/L for 6 h to prepare macrophage conditioned medium (MCM). Proliferative activity and collagen stimulating activity was determined by crystal violet staining assay and [³H]-proline incorporation assay using rat hepatic stellate HSC-T6 cell. **Results:** Serum (0% - 20%) and MCM (1 : 32 - 1 : 2) concentration-dependently enhanced HSC-T6 cell proliferation and collagen synthesis. Among IL-1, TNF, EGF, FGF and PDGF, PDGF showed the highest proliferation enhancing activity. TGFβ1 increased HSC-T6 cell collagen synthetic capacity. **Conclusion:** It is feasible to establish an *in vitro* hepatic fibrosis model selecting HSC-T6 cell proliferation and collagen synthesis as indexes with stimulating factors serum, MCM and cytokines.

KEY WORDS hepatic stellate cells; macrophages; cytokine; fibrosis

肝纤维化的主要特征表现为肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 的大量增殖和细胞外基质特别是胶原的过度合成。肝星状细胞是细胞外基质的主要产生细胞。在肝纤维化的早期, HSC 细胞由“静止”转变为“活化”的肌成纤维细胞, 后者过度增殖并大量合成各种细胞外基质成分^[1,2]。鉴于肝星状细胞的重要作用, 以肝星状细胞为靶细胞, 建立体外肝纤维化模型对于筛选新的抗肝纤维化药物, 研究其作用机制具有重要意义。

原代分离培养肝星状细胞是一项费时、费力、耗资较大的工作, 激活的大鼠肝星状细胞系 HSC - T6 细胞, 具有稳定的形态与细胞生物学特性^[3], 用 HSC - T6 细胞替代分离培养激活的肝星状细胞则

可使实验简便易行。本文研究了血清、巨噬细胞血清、各种细胞因子对 HSC - T6 细胞增殖与胶原合成的影响。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂 卡西霉素、脂多糖、内皮细胞生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、血小板源生长因子 (PDGF) 和转化生长因子 TGFβ1 均购于 Sigma 公司, 肿瘤坏死因子 α (TNFα)、白细胞介素 - 1β (IL - 1β) 由 Dainippon 制药公司赠送, ³H - 脯氨酸为中科院北京原子能研究所产品, 结晶紫及其它化学试剂均为分析纯国产试剂。

1.2 动物和细胞培养 ICR 小鼠, 雌性, 体重 (28 ± 3) g, 购于第二军医大学实验动物中心 (清洁级, 证书号 28 - 48)。

大鼠肝星状细胞 HSC - T6 细胞由 Friedman S L

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30171087)。

通讯作者: 张俊平 (1963-) 男, 副教授, E-mail: jpzhang08@hotmail.com。

博士 (Liver center laboratory, San Francisco) 提供。细胞用含有 10% 新生牛血清 (NCS, 杭州四季青生物工程材料研究所) 的 DMEM 培养液 (Gibco 产品) 传代培养。

1.3 巨噬细胞条件培养液的制备 参照文献^[4], ICR 小鼠腹腔巨噬细胞先后用卡西霉素 1 μmol/L 和脂多糖 100 μg/L 刺激培养, 然后用 PBS 洗涤 3 次, 再用 DMEM 培养液孵育 24h, 收集细胞上清 -30℃ 贮存备用。

1.4 HSC - T6 细胞增殖试验 采用结晶紫染色法^[5]测定。96 孔细胞培养板每孔加入 1 × 10⁴ 个 HSC - T6 细胞, 在 37 °C CO₂ 孵箱中孵育 24 h。然后加入不同浓度血清、巨噬细胞培养上清液或各种细胞因子, 再孵育 48 h, 最后用结晶紫染色法测定 595 nm 处吸收度 A 值 A₅₉₅。

1.5 HSC - T6 胶原合成的测定 采用³H - 脯氨酸同位素法^[5]测定。将细胞浓度调整为 2.5 × 10⁵ 个/mL, 在 96 孔板上每孔加 100 μL, 培养 24h 使之形成单层, 以消除细胞生长对胶原合成的影响。然后加入含 50 μg/mL 的维生素 C 的药物与不同浓度血清、巨噬细胞培养上清液或细胞因子, 同时加入每孔³H - 脯氨酸 18.5 kBq。细胞孵育 48h 后用胰酶消化, 收集于玻璃纤维滤纸上, 用液闪仪测定细胞³H - 脯氨酸掺入值 (cpm)。

1.6 统计学处理 采用 ANOVA 和 t 检验判断差异的显著性。

2 结果

2.1 不同刺激因素对 HSC - T6 细胞增殖的影响

2.1.1 血清对 HSC - T6 细胞增殖的影响 不同浓度血清 (0% ~ 20%) 培养 HSC - T6 细胞 72h, 以结晶紫染色法测 A₅₉₅ 值, 结果显示: 与单独的培养液对照组相比, 血清呈浓度依赖地促进细胞增殖, 具有显著性差异 (图 1)。

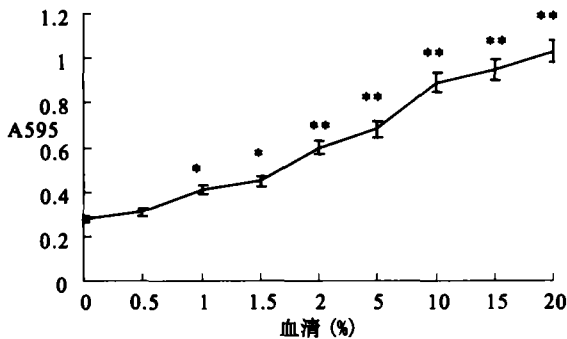


图 1 不同血清浓度对肝星状细胞 HSC - T6 增殖的影响 n=3, $\bar{x} \pm s$, 与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

2.1.2 巨噬细胞条件培养基对 HSC - T6 细胞增殖的影响 卡西霉素预刺激的巨噬细胞经 LPS 100 μg/mL 刺激 8h 后, 取其上清, 作用于 HSC - T6 细胞, 24h 后测 A₅₉₅ 值。结果巨噬细胞条件培养基 (MCM) 可刺激 HSC - T6 细胞增殖, 其中稀释比为 1 : 4 时, 促增殖能力最强, 达 37.84%, 与未经卡西霉素/LPS 处理的巨噬细胞培养上清液对照组相比, 具有显著性差异 (图 2)。

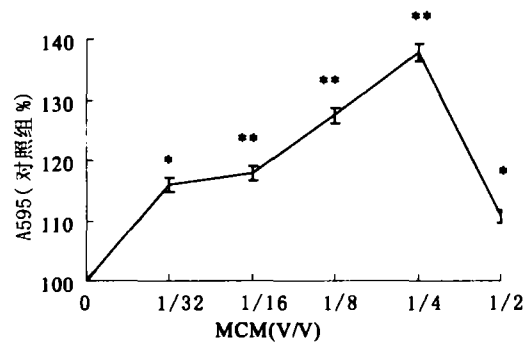


图 2 不同稀释比巨噬细胞条件培养基对肝星状细胞 HSC - T6 增殖的影响 n=3, $\bar{x} \pm s$, 与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

2.1.3 细胞因子对肝星状细胞 HSC - T6 细胞增殖的影响 (表 1) 肿瘤坏死因子 α (TNFα, 1 ~ 1000 U/mL)、

表 1 不同细胞因子对肝星状细胞 HSC - T6 细胞增殖的影响

细胞因子	细胞增殖活性 / A ₅₉₅	增殖率 (%)
对照组	0.60 ± 0.04	
肿瘤坏死因子 α (U/mL)		
1	0.62 ± 0.03	3.33
10	0.63 ± 0.01	5.00
100	0.64 ± 0.02	6.67
1000	0.67 ± 0.04 ¹⁾	11.67
白细胞介素 - 1β (U/mL)		
1	0.67 ± 0.03 ¹⁾	11.67
10	0.71 ± 0.01 ²⁾	18.33
100	0.73 ± 0.04 ²⁾	21.67
1000	0.67 ± 0.10 ¹⁾	11.67
内皮细胞生长因子 (ng/mL)		
6.25	0.64 ± 0.04 ¹⁾	6.67
12.5	0.71 ± 0.04 ²⁾	18.33
25	0.72 ± 0.07 ²⁾	20.00
50	0.76 ± 0.01 ²⁾	21.67
成纤维细胞生长因子 (ng/mL)		
6.25	0.64 ± 0.03 ¹⁾	6.67
12.5	0.68 ± 0.03 ¹⁾	13.33
25	0.79 ± 0.06 ²⁾	31.67
50	0.73 ± 0.02 ²⁾	21.67
血小板源衍生生长因子 (ng/mL)		
1	0.65 ± 0.03 ¹⁾	8.33
5	0.71 ± 0.05 ²⁾	18.33
10	0.86 ± 0.05 ²⁾	42.86
20	0.80 ± 0.04 ²⁾	33.67

n=3, $\bar{x} \pm s$, 与对照组比较: ¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01

白细胞介素-1 β (IL-1 β , 1~1000U/mL)、内皮细胞生长因子 (EGF, 6.25~50ng/mL)、成纤维细胞生长因子 (FGF, 6.25~50ng/mL)、血小板源衍生生长因子 (PDGF, 1~20ng/mL) 均对 HSC-T6 细胞的增殖具有剂量依赖的促进作用。其中以 PDGF 10ng/mL 作用最强。

2.2 不同刺激因素对 HSC-T6 细胞胶原合成的影响

2.2.1 血清对 HSC-T6 细胞胶原合成的影响

不同浓度血清 (0%~20%) 与完全融合的 HSC-T6 细胞共同孵育 48h, 结果剂量依赖性地刺激 HSC-T6 细胞胶原合成, 与对照组相比, 2% 以上血清均可显著促进细胞胶原合成 (图 3)。

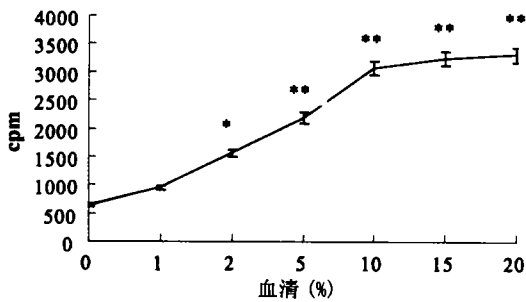


图 3 血清对 HSC-T6 细胞胶原合成的影响
n=6, $\bar{x} \pm s$, 与对照组比较: * P<0.05, ** P<0.01

2.2.2 巨噬细胞条件培养基对 HSC-T6 细胞胶原合成的影响

巨噬细胞条件培养基稀释比 (1:2~1:32) 与 HSC-T6 细胞作用 48h, 可促进 HSC-T6 细胞胶原合成, MCM 稀释比 1:4 时促进作用最明显。与未经卡西霉素/LPS 处理的巨噬细胞培养上清液对照组相比, 具有显著性差异 (图 4)。

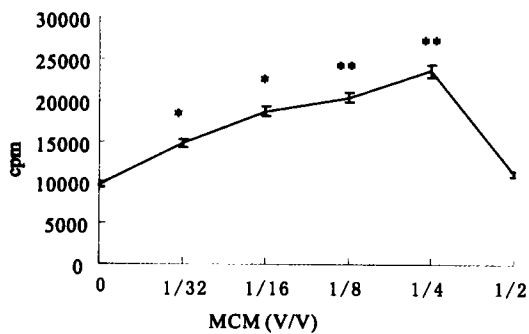


图 4 巨噬细胞条件培养基对 HSC-T6 细胞胶原合成的影响
n=6, $\bar{x} \pm s$, 与对照组比较: * P<0.05, ** P<0.01

2.2.3 TGF β 1 对 HSC-T6 细胞胶原合成的影响

TGF β 1 (1~8ng/mL) 与完全融合的 HSC-T6 细胞共同孵育 48h, 可剂量依赖性地刺激 HSC-T6 细胞胶原合成, 以 2ng/mL 时促进胶原合成能力最强, 与

对照组相比, 具有显著性差异 (图 5)。

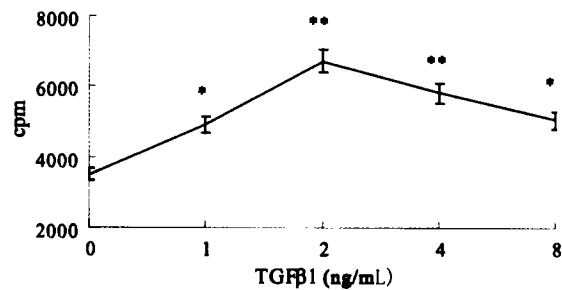


图 5 转化生长因子 b1 对 HSC-T6 细胞胶原合成的影响
n=6, $\bar{x} \pm s$, 与对照组比较: * P<0.05, ** P<0.01

3 讨论

肝星状细胞的大量增殖和细胞外基质特别是胶原的过度合成是肝纤维化的主要特征表现。本文研究了血清、巨噬细胞上清、各种细胞因子对 HSC-T6 细胞增殖与胶原合成的影响。血清含有血液中多种活性成分, 研究其对 HSC-T6 细胞的作用旨在反映体内大环境中血液成分的影响。巨噬细胞释放的多种细胞因子, 如 IL-1、TNF、PDGF、TGF β 等对肝星状细胞的激活、增殖和产生 ECM 起着重要的条件作用。研究巨噬细胞条件培养基对 HSC-T6 细胞的作用在于体现局部病变环境巨噬细胞释放的各种细胞因子对肝星状细胞的影响。PDGF、TGF β 等细胞因子反映的是生物活性分子对肝星状细胞的影响, 以上 3 种模型是从 3 个不同层次研究对肝星状细胞的影响。

结果显示, 血清、巨噬细胞条件培养基可显著促进 HSC-T6 细胞增殖与胶原合成。在 IL-1、TNF、EGF、FGF 和 PDGF 促增殖实验中, 显示 PDGF 的促增殖能力最强。TGF β 1 可剂量依赖地促进 HSC-T6 细胞胶原的合成。这与分离培养的肝星状细胞的作用基本一致^[6]。本实验结果提示用 HSC-T6 细胞替代分离培养激活的肝星状细胞进行研究是可行的, 同时也说明用血清、巨噬细胞条件培养基、PDGF 或 TGF β 刺激 HSC-T6 细胞作为体外肝纤维化模型是可行的。

参考文献:

[1] Alcolado R, Arthur MJ, Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. Clin Sci, 1997, 92(2): 103.
[2] Gressner AM, Bachem MG. Cellular communications and cell matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm [J]. Ann Biol Clin, 1994, 52(3): 205.
[3] Friedman SL, Lalazar A, Wong L, et al. HSC-T6 cells, an im-

- mortalized rat hepatic stellate cell line [J]. *Hepatology*, 1997, 27 (5): 338A.
- [4] Zhang JP, Zhang M, Jin C, *et al.* Matrine inhibits production and actions of fibrogenic cytokines released by mouse peritoneal macrophages. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(8):765.
- [5] 张珉, 张俊平, 王杰松, 等. 黄酮木素对 HSC-T6 细胞增殖和胶原合成的影响 [J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(5): 304.
- [6] Peterson TC, Isbrucker RA. Fibroproliferation in liver disease: role of monocyte factors [J]. *Hepatology*, 1992, 15(2): 191.

收稿日期: 2005-09-05

田基黄提取物保肝作用的实验研究

苏娟, 傅芃, 张卫东, 柳润辉, 徐希科, 张川 (第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 目的: 以 D-半乳糖胺盐酸盐腹腔注射造成大鼠急性肝损伤模型, 观察田基黄药材不同提取部位的肝保护作用, 最终确定有效部位。**方法:** 将 SD 大鼠给 D-半乳糖胺盐酸盐造成急性肝损伤模型, 腹腔注射田基黄不同溶剂的提取物, 观察血清中的 ALT、AST 的变化, 确定有效部位。**结果:** 给予田基黄乙醇总提物和乙酸乙酯部位均可降低大鼠血清中的 ALT、AST。**结论:** 田基黄乙醇总提取物和乙酸乙酯部位具有明显的保肝作用。

关键词 田基黄; 保肝作用; 急性肝损伤; 药理学

中图分类号: R961

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2005)06-0342-03

Experimental study on extracts of *Hypericum japonicum* in liver-protective effect

Su Juan, Fu Peng, Zhang Wei-dong, Liu Run-hui, Xu Xi-ke, Zhang Chuan (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To study the protecting effects of extracts of the *Hypericum japonicum* Thunb. for the acute liver injury in rats. **Methods:** The extracts of the *Hypericum japonicum* Thunb. were intraperitoneally given to every SD rat with acute liver injury induced by D-galactosamine. It was detected that the activities of ALT and AST by using colorimetric method. **Results:** The ethanol extract and ethyl acetate fraction of the *Hypericum japonicum* Thunb. significantly reduced acute liver injury induced by D-galactosamine, by means of decreasing ALT and AST in serum. **Conclusion:** The ethanol extract and ethyl acetate fraction of the *Hypericum japonicum* Thunb. have protecting effects for liver.

KEY WORDS *Hypericum japonicum* Thunb.; liver-protective effect; acute liver injury; pharmacology

田基黄, 又名地耳草, 是藤黄科金丝桃属植物地耳草 (*Hypericum japonicum* Thunb.) 的全草, 民间用来治疗肝炎、阑尾炎等症, 具有清热解暑、消肿止痛等功效^[1]。现代药理研究证实, 田基黄可以保护肝脏、提高免疫功能, 还具有肿瘤细胞抑制作用^[2]。笔者观察了田基黄总提物和各不同萃取部位对急性肝损伤的保护作用, 最终确定了其有效部位, 现将实验结果报告如下。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, 清洁级, 雌雄兼用, 体重 180~240g, 由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 田基黄采集于江西九江, 生药学

鉴定为藤黄科植物田基黄的全草。田基黄药材以 95% 乙醇提取浓缩制备成总提物, 再依次以石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇和水进行分部萃取, 浓缩得到各部位提取物。D-半乳糖胺盐酸盐 (D-galactosamine hydrochloride) 购自 Fluka 公司。苦参碱注射液系广州明兴制药有限公司产品。

1.3 仪器 BTS-370 plus 全自动生化分析仪系西班牙公司产品。

2 方法与结果

2.1 田基黄不同提取部位对大鼠急性肝损伤的保护作用 SD 大鼠 90 只, 雌雄各半, 按体重随机分为 9 组, 除正常对照组不造模不给药外, 均腹腔注射药物。田基黄不同提取部位的剂量均按照其得率折算成相当于田基黄药材的量。每日 1 次, 连续注射

基金项目: 上海市科技发展基金资助项目 (04DZ19815)。

作者简介: 苏娟 (1980-), 女, 硕士。E-mail: susu0225@hotmail.com.